



江南大学
JIANGNAN UNIVERSITY

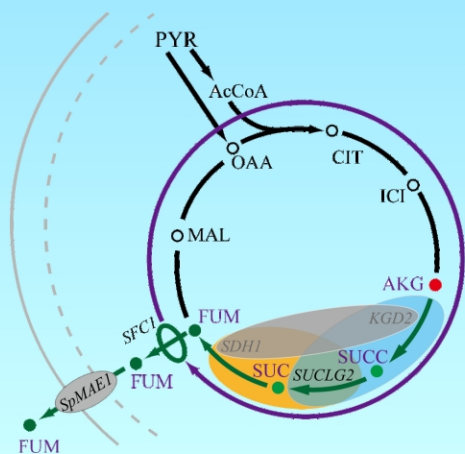


2015年微生物代谢工程 与发酵工程学术研讨会

摘要集

主办单位：江南大学
江苏省微生物学会

江苏·无锡
二〇一五年十一月



目录

小基因组 <i>B. amyloliquefaciens</i> 菌株的构建以及 γ -聚谷氨酸的生物合成.....	1
酒石酸高效生物合成关键技术及其应用	3
厌氧高效利用低劣生物质合成琥珀酸细胞工厂构建	4
基于转录组学的大肠杆菌丁醇耐受性机制研究	6
通过代谢工程改造芽胞杆菌实现发酵过程及产品脱臭	7
RAISE 技术改组转录调控因子 RpoD 调控大肠杆菌低 pH 耐受性	8
基于 mariner 转座子的产溶剂梭菌随机突变方法及其在优势表型筛选中的应用	9
ATG22 敲除对醋酸胁迫下酿酒酵母程序性细胞死亡作用	10
苏云金芽孢杆菌 L-异亮氨酸羟化酶的酶学性质及其在酶法合成 4-羟基异亮氨酸中的应用研究	11
<i>Acetobacter sp.</i> 生物合成 3-HP 转化机制及催化技术研究	12
“生物钢”蜘蛛丝的高效生物制造	13
微生物合成黄酮类物质的系统代谢工程策略	14
大肠杆菌高产 L-丝氨酸的基因工程菌构建	15
Systematic analysis of intracellular mechanisms of propanol production in the engineered <i>Thermobifida fusca</i> B6 strain	16
枯草芽孢杆菌发酵产 surfactin 与聚- γ -谷氨酸的工艺优化	17
基于代谢工程改造策略强化 2,3-丁二醇合成途径	18
Yeast cell-based analysis of human lactate dehydrogenase isoforms	19
高产四氢嘧啶的大肠杆菌工程菌构建	20
重组钝齿棒杆菌 SYPA-phbCAB-ppnK 的构建及 PHB 胞内积累对 L-精氨酸合成的影响	21
基于动态代谢组学分析与合成途径动力学模型的途径诊断方法的构建与应用	22
真菌多糖水解规律及单糖组成研究	23
通过敲除胞外蛋白酶和细菌多糖提高 <i>Bacillus amyloliquefacien</i> LL3 果聚糖产量	24
<i>Pichia pastoris</i> 甘油抑制甲醇代谢分子机理研究	25
高产泛酸的酿酒酵母菌株的构建	26
mreB 过表达对门多萨假单胞菌 NK-01 菌体形态及产物的影响	28
在高温下同步利用葡萄糖和木糖同时生产乙醇与木糖醇的工程酵母的构建与应用	29
响应面法对威兰胶发酵体系 pH 优化	30
产蛋氨酸的大肠杆菌工程菌株的构建	31
一株产 γ -聚谷氨酸的非谷氨酸依赖型高产菌株筛选	32
通过弱化细胞壁和增加细胞膜流动性的方法提高谷氨酸棒杆菌的电转化效率	33
全局调控工程提高工业酿酒酵母糠醛耐受性的研究	34
嗜极微生物中热激蛋白改善 <i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC824 丁醇耐受性的研究	35
基于发酵和双气旋收集的虫生真菌孢子产量系统优化	36
Efficient Biocatalytic Reduction of Ethyl Acetoacetate with Recombinant <i>Escherichia coli</i> cells in an ionic liquid containing system	37
以甘油为底物发酵生产一种新型黄原胶	38
构建 <i>DUR1,2</i> 基因高表达的工业黄酒酵母工程菌减少黄酒中氨基甲酸乙酯的形成	39
重金属胁迫下生物转化脱脂蚕蛹生产酵母油脂条件的优化及基因改造策略	40
毕赤酵母中重组猪溶菌酶基因表达的密码子优化策略比较	41
一株产灵菌红素粘质沙雷氏菌发酵条件的优化	43

响应面法优化疏螺旋体素发酵培养基	44
漆酶 <i>lac1338</i> 原核表达发酵条件优化	45
脱硫微生物的筛选及脱硫效率的初步评价	46
毕赤酵母核糖体蛋白功能及其对外源蛋白合成的调控	47
黑曲霉细胞表面展示体系的构建及其展示脂肪酶催化特性的表征	48
毕赤酵母 GPI 型细胞壁蛋白的功能分析	49
里氏木霉 <i>Cel6A</i> 基因在毕赤酵母里的异源表达	50
基于差分进化算法的酿酒酵母分批补料培养在线自适应控制	51
阿维链霉菌唾液酸苷酶的异源表达及酶学性质的研究	52
一步 PCR 技术快速高效组合进化酶和代谢途径	53
羟脯氨酸高产菌株的构建以及发酵条件的优化	54
不同溶氧对谷氨酸棒杆菌发酵过程关键物质及酶活的影响	55
三阶段发酵策略提高 <i>Mycobacterium neoaurum</i> JC-12 雄甾二烯二酮产量的研究	56
丙丁梭菌-酿酒酵母混合培养耦联外添乙酸强化丙酮合成	57
壳聚糖对纤维素酶的诱导作用	58
一株产顺式-4-羟基-L-脯氨酸基因工程菌的构建及发酵初步优化	59
脂肪酶的异源表达及蛋白表达条件优化	60
易错 PCR 技术诱变选育反式-4-羟脯氨酸生产菌株及响应面法优化发酵条件	61
利用重组 <i>B. subtilis</i> 168 进行高效生物转化法生产 L-鸟氨酸	62
铜绿假单胞菌利用甘油/脂肪酸生产鼠李糖脂	63
Significantly improving the yield of recombinant proteins in <i>Bacillus subtilis</i> by a novel powerful mutagenesis tool	64
一种基于调控枯草芽孢杆菌内源毒素-抗毒素系统的食品级表达系统的构建与应用	65
通过定点突变提高 <i>Staphylococcus aureus</i> 来源 α -乙酰乳酸脱羧酶的酸性稳定性	66
通过调控 NADH 和 NADH/NADPH 比率再分配枯草芽孢杆菌中乙偶姻和 2,3-丁二醇的比例	67
基于 2, 3-二羟基苯甲酸为前体的顺, 顺-粘康酸生物合成途径的构建	68
以右旋糖酐发酵废液为原料发酵生产丁二酸	69
利用廉价农业废弃生物质原料发酵生产表面活性素	70
外源引入海藻糖合成能力提高丁酸梭菌的抗逆性	71
表面活性剂对纽莫康定 B ₀ 发酵的影响	72
代谢改造解淀粉芽孢杆菌 (<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>) LL3 提高谷氨酸浓度进而提高 γ -PGA 产量	73
解淀粉芽孢杆菌噬菌体操纵子弱化区基因改造对胞苷代谢的影响	74
解淀粉芽孢杆菌 <i>pyrR</i> 基因敲除对胞苷生物合成的影响	75
Optimization of the fermentation conditions of 1,3-propanediol from <i>Klebsiella</i> sp. ZH-1	76
发酵产生普鲁兰多糖的条件优化、菌种选育以及中间底物的初步研究	77
微生物木糖发酵产酒精代谢工程的研究进展	78
高产泛酸的酿酒酵母菌株的构建	79
使用生物印迹和固定化技术提高磷脂酶 A1 的油脂脱胶能力	80
产黄青霉形态突变株构建技术研究	81
Improvement of Vitamin K2 Production by <i>Bacillus subtilis</i> (<i>natto</i>) with γ ray irradiation	82

第一篇 大会报告

小基因组 *B. amyloliquefaciens* 菌株的构建以及 γ -聚谷氨酸的生物合成

宋存江 冯俊 谷燕燕 高伟霞 全玉芬 党雨蕾 王淑芳

南开大学分子微生物与技术教育部重点实验室 songcj@nankai.edu.cn, 022-23503866

摘要：目前，合成生物学的研究主要集中在以下方面 ① 生物元件标准化及生物模块的设计与构建及其适配性研究；② 最小基因组研究；③ 基因组的设计、合成与组装。

小基因组微生物构建主要步骤包括：① 掌握菌株全基因组数据背景；② 菌株基因组的生物信息学分析（必须基因、基因组岛和复制起始位点等）；③ 建立大片段无痕敲除基因序列的方法；④ 利用所构建的方法进行基因组精简；⑤ 检验所构建的小基因组菌株生长和合成产物状况。

本研究完成了 *Bacillus amyloliquefaciens* LL3 的全基因组测序，该菌株拥有一个 3995227 bp 染色体组和一个 6758bp 的内源性质粒。生物信息学分析的结果显示出：原有基因 4325 个，必须基因 273 个；具有经过水平转移获得的大片段的基因组岛 8 个；该菌株复制起始位点位于 3994731-3994423，另外 *dnaA* 在 1753-1973。本研究建立了利用温敏质粒结合反向筛选标记的大片段无痕删除基因序列的方法。利用该方法对基因组进行了精简，共计删除了约 10% 的基因组序列。小基因组菌株的特征表现为生长速度有所加快。另外，研究组对该菌株进行了改造，构建了 γ -聚谷氨酸合成工程菌株。

通过代谢改造 γ -PGA 合成相关代谢网络包括：副产物合成， γ -PGA 降解，谷氨酸前体合成， γ -PGA 合成以及自诱导因子合成。构建了一株 γ -PGA 产量提高的解淀粉芽孢杆菌工程菌。首先在解淀粉芽孢杆菌 NK-1 出发菌株的基础上敲除了胞外多糖合成基因簇 *epsA-O*，果聚糖合成基因簇 *sac*，脂多糖合成相关基因 *lps*，乙酸合成相关基因 *pta*，得到 NK-E7 菌株产量较野生型有微小提高从 3.8 提高到 4.15 g/L。然后在 NK-E7 菌株基础上敲除 γ -PGA 降解酶基因 *pgdS* 以及细胞壁水解酶基因 *cwlO*，得到 NK-E10 菌株产量从 4.15 提高到 9.18 g/L。在 NK-E10 菌株的基础上敲除细胞自诱导因子合成基因 *luxS*，聚谷氨酸产量从 9.18 提高到 9.54 g/L。通过人工设计合成的 sRNA 对谷氨酸利用途径关键基因进行抑制表达。实验发现当谷氨酸脱氢酶基因 *rocG* 抑制时，菌株 NK-anti-rocG 的 γ -PGA 产量最高达到 11.04 g/L。最后利用 5-L 发酵罐对 NK-anti-rocG 菌株进行补料分批发酵实验，以蔗糖为发碳源，菌株在发酵 54 h 时产量最高达到 20.3 g/L。

2014 - 2015 发表的论文：

- [1] Weitao Geng, Chao Yang, Yanyan Gu, Ruihua, Liu, Wenbin Guo, Xiaomeng Wang, Cunjiang Song* and Shufang Wang*. Cloning of ϵ -poly-L-lysine (ϵ -PL) synthetase gene from a newly isolated ϵ -PL-producing *Streptomyces albulus* NK660 and its heterologous expression in *Streptomyces lividans* *Microbial Biotechnology*, 2014, 7, 155–164.
- [2] Jun Feng, Weixia Gao, Yanyan Gu, Wei Zhang, Mingfeng Cao, Cunjiang Song*, Peng Zhang, Min Sun, Chao Yang, Shufang Wang*. Functions of poly- γ -glutamic acid (γ -PGA) degradation genes in γ -PGA synthesis and cell morphology maintenance. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2014, **98**:6397-6407.
- [3] Yanyan Gu, Chao Yang, Xiaomeng Wang, Weitao Geng, Yang Sun, Jun Feng, Yuanyuan Wang, Yufen Quan, You Che, Chi Zhang, Ting Gong, Wei Zhang, Weixia Gao, Zhenqiang Zuo, Cunjiang Song*, Shufang Wang. Genome Sequence of the ϵ - Poly -L-Lysine-Producing Strain *Streptomyces albulus* NK660, Isolated from Soil in Gutian, Fujian Province, China. *Genome Announcements*, 2014, 2(3), e00532-14.

- [4] Jun Feng, Yanyan Gu, Yang Sun, Lifang Han, Chao Yang, Wei Zhang, Mingfeng Cao, Cunjiang Song*, Weixia Gao and Shufang Wang*. Metabolic engineering of *Bacillus amyloliquefaciens* LL3 for poly- γ -glutamic acid (γ -PGA) overproduction. *Microbial Biotechnology*, 2014, 7, 446–455.
- [5] Wei Zhang, Cunjiang Song* et al. A markerless gene replacement method for *B. Amyloliquefaciens* LL3 and its use in genome reduction and improvement of poly- γ -glutamic acid production. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2014, **98**, 8963–8973.
- [6] Wei Zhang, Yulian He, Weixia Gao, Jun Feng, Mingfeng Cao, Chao Yang, Cunjiang Song* and Shufang Wang*. Deletion of genes involved in glutamate metabolism to improve poly- γ -glutamic acid production in *B. amyloliquefaciens* LL3. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2015, **42**, 297–305.
- [7] Yuanyuan Wang, Chi Zhang, Ting Gong, Zhenqiang Zuo, Fengjie Zhao, Xu Fan, Chao Yang*, Cunjiang Song*. An upp-based markerless gene replacement method for genome reduction and metabolic pathway engineering in *Pseudomonas mendocina* NK-01 and *Pseudomonas putida* KT2440. *Journal of Microbiological Methods*, 2015, doi: 10.1016/j.mimet.2015.03.022
- [8] Jun Feng#, Yanyan Gu#, Lifang Han, Kexin Bi, Yufeng Quan, Chao Yang, Wei Zhang, Mingfeng Cao, Shufang Wang, Weixia Gao, Yang Sun and Cunjiang Song*. Construction of a *Bacillus amyloliquefaciens* strain for high purity levan production. 2015, *FEMS Letters*, doi: 10.1093/femsle/fnv079
- [9] Jun Feng, Yanyan, Yufen Quan, Wei Zhang, Mingfeng Cao, Weixia Gao, Cunjiang Song*, Chao Yang, Shufang Wang* Recruiting a new strategy to improve levan production in *Bacillus amyloliquefaciens*. *Scientific Reports* | 5:13814 | DOI: 10.1038/srep13814.
- [10] Jun Feng, Yanyan Gu, Yufen Quan, Mingfeng Cao, Weixia Gao, Wei Zhang, Shufang Wang*, Chao Yang, Cunjiang Song*. Improved poly- γ -glutamic acid production in *Bacillus amyloliquefaciens* by modular pathway engineering. *Metabolic Engineering*, (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymben.2015.09.011>.

酒石酸高效生物合成关键技术及其应用

李永泉* 张建国 谢志鹏 潘海峰

浙江大学生物化学研究所；杭州宝晶生物股份有限公司，杭州 310058

摘要：酒石酸是重要的食品添加剂，主要用作葡萄酒与饮料的酸味剂、食品乳化剂合成原料等。浙江大学和宝晶生物股份历时 10 年产学研合作，建立了 L-酒石酸高效生物合成技术，实现了连续化生产（连续运行 90 天），原料成本仅 9000 多元/吨，完全颠覆了欧洲人从葡糖酒酿造过程产生的酒石提取 L-酒石酸的传统工艺(原料成本约 2.5 万元/吨)和现行批式生物合成工艺(原料成本约 1.5 万元/吨)，节能减排，消除了高氯废水的污染。

L-酒石酸高效生物合成技术已于 06 年在宝晶生物股份投产，2014 年销售额逾 4 亿，80%出口，近三年销售总收入逾 10 亿、利税近 3 亿、出口创汇逾 1.5 亿美元；每年并产生间接经济效益 60 多亿。当我国有机酸产业普遍遭遇国际反倾销诉讼时，公司依托发明的创新技术于 06 年和 2012 年两次赢得欧盟对华酒石酸的反倾销诉讼，成为获“零反倾销税率”待遇的国内唯一企业，是国际最大的酒石酸生产商，全球市场占有率为 30%以上。

项目组历时 10 余年，产学研合作联合攻关，建立了创新技术体系。（1）建立了酒石酸合成酶的高效可溶表达技术。从自然界筛选到产酶菌株，破译表达量极低的天然酶编码基因，通过 JCat 优化密码子、筛选温敏启动子 PLPR、构建含融合标签的表达载体，实现高效可溶表达，成功制备了 L-酒石酸合成酶、D-酒石酸合成酶。（2）构建了酒石酸合成酶重构技术，利用基因突变技术理性重构合成酶，大幅提高酶活力和热稳定性。重构的 L-酒石酸合成酶工程菌酶活力达 20 万 U/g，是野生型的 20 倍，最适稳定温度从 35℃提高到 40℃。（3）构建了高催化性能含酶细胞载体，解决了固定化细胞通透性、表面结垢等关键问题，提高了固定化催化剂催化效率。使用含酶细胞载体，L-酒石酸合成酶酶促效率由 0.5kg/kg 提高到 0.7kg 产物/kg 细胞/小时。（4）采用生物合成与分离耦合技术，降低了产物抑制效应，提高了合成速率。通过反应与分离耦合，实现了 L-酒石酸连续化生产（连续运行 90 天），相比批式技术底物摩尔转化率从 80%提高到 95%、原料成本降低 38.8%，减排 32.2%，基本消除了高氯废水的污染问题。

项目授权国家发明专利 13 项，受理欧洲专利 1 项，发表论文 25 篇（19 篇 SCI），获浙江省科学技术奖一等奖和教育部科技进步奖一等奖，生产的 L-酒石酸被评为国家重点新产品，08 年教育部组织项目鉴定，结论为“国际先进水平”。本发明技术已推广到 D-酒石酸、酮基葡萄糖酸、苹果酸、没食子酸丙酯等有机酸及衍生物的开发，为有机酸产业转型升级、提高国际竞争力提供了技术支撑。

厌氧高效利用低劣生物质合成琥珀酸细胞工厂构建

姜岷 吴明科 马江锋

南京工业大学生命与制药工程学院, 南京 211816

摘要: 琥珀酸是重要的碳四平台化合物, 利用生物法替代石化法合成琥珀酸是大势所趋, 其中开发实现利用低劣生物质原料合成琥珀酸是研究热点之一。然而, 与淀粉基葡萄糖不同, 以木质纤维素水解液为代表的低劣生物质中含有葡萄糖、木糖、阿拉伯糖等糖组分及预处理过程中生成的水解抑制因子, 这些复杂成分构成的生物转化体系对生产菌株的底物利用范围、物质代谢能力及抗逆性能提出了新的要求。1) 为实现五碳糖的高效利用, 分析比较产琥珀酸放线杆菌和大肠杆菌代谢途径的差异, 发现 ATP 供给不足是导致重组大肠杆菌丧失木糖代谢能力的关键因素。通过引入外源 ATP 合成途径, 强化胞内能量的供给使大肠杆菌代谢木糖合成琥珀酸的效率提高 12.4 倍。^[1] 进一步地, 敲除糖转运调控基因 (ptsG) 解除了葡萄糖效应, 实现了葡萄糖与木糖的同步利用, 大大缩短了发酵周期。^[2] 2) 针对重组菌株厌氧条件下生长及代谢停滞, 通过改造 NAD(H) 合成途径, 调节了 NAD(H) 的总量以及 NADH/NAD⁺ 的比例, 增强了厌氧菌株代谢的速率, 产物琥珀酸的合成速率提高了 30.7 倍。^[3] 在此基础上, 进一步改造胞内 ATP 代谢途径, 获得了驱动力代谢调节能力优异的重组大肠杆菌 BA209, 菌株生长及产物琥珀酸合成速率明显提高。^[4] 3) 驱动力不仅参与菌株胞内物质的代谢, 众多研究表明 NADH 和 ATP (尤其是 ATP) 参与到菌株对于极端环境的耐受保护机制中。考察重组菌 BA209 对于低 pH、高盐和高糖浓度的耐受性能发现其在相应的环境胁迫下菌株生长和代谢性能都得到了提高。^[5] 本研究从驱动力的角度改造提高厌氧条件下菌株琥珀酸的合成性能, 实现了利用低劣生物质高效合成琥珀酸, 为利用低劣生物质炼制其它大宗化学品的提供了借鉴。

参考文献

- [1] Liu RM, Liang LY, Jiang M et al. Fermentation of xylose to succinate by enhancement of ATP supply in metabolically engineered *Escherichia coli*. *Applied microbiology and biotechnology*, 2012, **94**: 959-968.
- [2] Liu RM, Liang LY, Jiang M et al. Efficient succinic acid production from lignocellulosic biomass by simultaneous utilization of glucose and xylose in engineered *Escherichia coli*. *Bioresource technology*, 2013, **149**: 84-91.
- [3] Liang LY, Liu RM, Jiang M et al. Effects of overexpression of NAPRTase, NAMNAT, and NAD synthetase in the NAD(H) biosynthetic pathways on the NAD(H) pool, NADH/NAD⁺ ratio, and succinic acid production with different carbon sources by metabolically engineered *Escherichia coli*. *Biochemical engineering journal*. 2013, **81**: 90-96.
- [4] Jiang M, Chen X, Liang LY et al. Co-expression of phosphoenolpyruvate carboxykinase and nicotinic acid phosphoribosyltransferase for succinate production in engineered *Escherichia coli*. *Enzyme and microbial technology*, 2014, **56**: 8-14.
- [5] Wu MK, Guan Z, Jiang M et al. Efficient succinic acid production by engineered *Escherichia coli* using ammonia as neutralizer. *Journal of chemical technology and biotechnology*, doi: 10.1002/jctb.4828.

第二篇 分会报告

基于转录组学的大肠杆菌丁醇耐受性机制研究

司海明 张法 韩瑞枝 许国超 倪晔*

江南大学生物工程学院, 无锡 214122

摘要: 微生物在医药、能源、精细化工等工业生产过程中发挥着重要的作用, 然而其应用过程中有机溶剂的存在会严重破坏微生物细胞的生理功能。因此, 提高微生物细胞的有机溶剂耐受性及其耐受性机制研究, 对微生物菌株在生物催化和生物燃料等产业应用中具有重要的意义。研究室通过全局转录组学结合高通量筛选^[1,2]获得一株能够耐受 2% (v/v) 丁醇的突变株, 并利用基因芯片进行转录组学分析。芯片结果显示: 329 个差异表达基因被鉴定 (包括 197 个上调基因和 132 个下调基因) ($P < 0.05$; $FC \geq 2$)。这些差异表达基因所编码的蛋白主要参与碳代谢, 能量代谢, 氧化压力应答, 信号转导通路等生物过程。为了验证差异表达基因与溶剂耐受性的关系, 选择了转录水平差异显著的上下调基因进一步研究^[3]。结果显示上调基因 *gcl*、*glcG*、*tdcD* 等的过表达能够明显提高大肠杆菌对丁醇的耐受性, 下调基因 *yibT*、*yghW* 等的敲除使大肠杆菌对丁醇的耐受性也有所改善。*gcl* 编码乙醛酸连接酶参与乙醛酸循环 (TCA 循环支路), 检测显示代谢中间物丙酮酸水平显著提高, 推测该基因的上调有利于提高细胞内能量水平, 这正是细胞应对溶剂压力的调控方式之一。*yibT*、*yghW* 编码的两个假定蛋白参与细胞脂肪酸代谢途径, 研究表明在细胞应对溶剂压力时, 这两个蛋白的上调可影响细胞膜脂肪酸的组成, 导致细胞膜疏水性降低从而增强其对溶剂的排斥。本研究利用基因芯片技术对溶剂耐受菌株的基因转录水平进行了系统的分析, 对微生物溶剂耐受性机制的阐明和相关菌株的构建提供了理论依据。

参考文献

- [1] Alper H et al., Engineering yeast transcription machinery for improved ethanol tolerance and production. *Science*, **314**, 1565-8, 2006.
- [2] Ni Y, Song L, Qian X, Sun Z. 2013. Proteomic analysis of *Pseudomonas putida* reveals an organic solvent tolerance-related gene mmsB. *PLoS One* **8**(2):e55858.
- [3] Qian X, Song L, Ni Y. 2014. Enhanced organic solvent tolerance of *Escherichia coli* by 3-hydroxyacid dehydrogenase family genes. *Appl Biochem Biotechnol* **172**(6):3106-15.

通过代谢工程改造芽胞杆菌实现发酵过程及产品脱臭

魏雪团 陈杨阳 黄花花 陈守文

华中农业大学食品科学与技术学院，武汉 430070

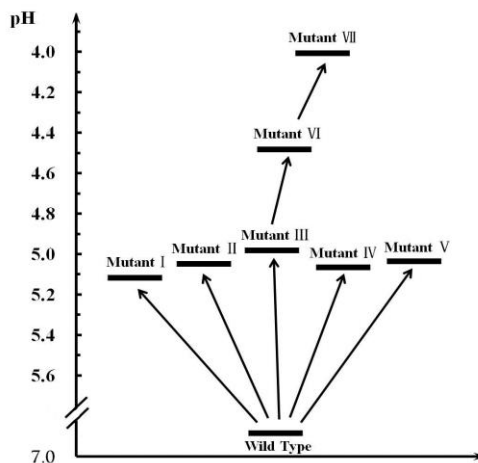
摘要：常用的芽胞杆菌包括枯草芽胞杆菌、解淀粉芽胞杆菌、地衣芽胞杆菌等，可分泌多种生物制品，具有重要的应用价值，广泛应用于农业、食品、医药、化妆品等领域。芽胞杆菌发酵过程产生的臭味物质会造成严重的负面效应，一方面，臭味废水、废气、废渣造成环境污染和人体不适，影响发酵产业的发展；另一方面，臭味物质影响食品、保健品、医药产品以及饲料产品的口感和气味，影响消费对象对其接受程度。因此，发酵过程及产品脱臭具有重要的意义。芽胞杆菌所产生的支链短链脂肪酸和生物胺等物质是其主要异味物质，由芽胞杆菌特定代谢途径产生。因此，通过代谢工程手段阻断臭味物质产生基因，同时不影响关键代谢物的产量，具有重要的意义。本课题组通过基因敲除阻断了地衣芽胞杆菌和解淀粉芽胞杆菌的支链锻炼脂肪酸形成的系列基因，显著降低了臭味物质含量，基本消除了所发酵产品的臭味，并评价关键基因缺失对目标代谢物的影响，获得了既可消除发酵产品臭味又可维持原代谢物产量的工程菌株，具有重要的工业化应用价值。

RAISE 技术改组转录调控因子 RpoD 调控大肠杆菌低 pH 耐受性

高茜 朱丽英 江凌* 黄和

南京工业大学生物与制药工程学院，南京 210009

摘要：发酵产业是我国生物产业的重要组成部分，其中，以有机酸、氨基酸为代表的传统发酵工业是我国发酵产业一个成熟的分支。但是，在有机酸或原材料酸解的生物转化过程中，微生物由于自身对酸性代谢产物或低 pH 环境的抗逆性差，其代谢活性受到严重影响。为解决该问题，本实验采用 RAISE (Random Insertional-deletional Strand Exchange Mutagenesis) 重组技术，将各种长度的随机插入、缺失和替代引入全局调控因子 RpoD 目的基因，构建大量区域交换随机突变文库，通过对突变文库的多轮迭代筛选，获得大肠杆菌的耐酸性能显著提高的突变菌株 Mutant VII。实验表明，在 pH 3.17 时，相比原始菌株 0.15 h^{-1} 的生长速率，该突变菌株展现出明显的生长优势，生长速率为 0.22 h^{-1} 。结合转录组分析和表型组学分析进一步解析全局转录调控因子 RpoD 对大肠杆菌工程菌株的调控网络的影响。分析表明，菌株中共有 95 (2.1%) 个基因上调，178 (4.0%) 个基因下调，所调控基因除与耐酸能力相关之外，主要涉及海藻糖合成，核酸利用，碳代谢，氨基酸利用等方面。此外，主要调控蛋白(ArcA, EvgA, H-NS, RpoS)和基因/启动子转录调控因子(GadX, GadW, AppY, YdeO, KdgR)都受到 RpoD 的影响。实验结果证明了 RpoD 在大肠杆菌生长阶段所起到的全局转录调控作用，不仅为后期改善不同大肠杆菌工业生产菌株的耐酸性能提供有力的理论依据，还为有机酸、氨基酸发酵行业的节能减排奠定了坚实的理论基础和技术源头。



参考文献

- [1] Mazumdar S., Blankschien M. D., Clomburg J. M., et al, Microb. Cell Fact., 2013, **12** (7), 10-1186.
- [2] Abdel-Rahman M. A., Tashiro Y., Sonomoto K., Biotechnol. Adv., 2013, **31** (6), 877-902.
- [3] Dragosits M., Mattanovich D., Microb. Cell Fact., 2013, **12**, 64.
- [4] Alper H., Moxley J., Nevoigt E., et al, Science, 2006, **314** (5805), 1565-1568.
- [5] Jiang L., Lin M., Zhang Y., et al, PloS One, 2013, **8** (10), e77437.

基于 *mariner* 转座子的产溶剂梭菌随机突变方法及其在优势表型筛选中的应用

张慧¹ 徐舒¹ 张颖² 杨晟¹ 姜卫红¹ Nigel P. Minton² 顾阳*¹

¹ 中国科学院上海生命科学研究院植物生理生态研究所, 上海 200032; ² School of Life Sciences, University of Nottingham, Nottingham NG7 2RD, UK

摘要: 产溶剂梭菌 (solventogenic clostridia) 是一类重要的工业微生物。其底物谱广泛, 可利用粮食淀粉、木质纤维素 (秸秆、麦秆等) 乃至含碳气体 (如 CO, CO₂) 等多种原料; 且在发酵过程中可产生一系列有机酸和醇类化学品及生物燃料, 如乙酸、丁酸、乙醇、丁醇、2, 3-丁二醇等。因此, 近年来产溶剂梭菌的基础应用研究受到广泛关注^[1]。

得益于近年来产溶剂梭菌遗传操作技术的快速发展, 研究者们已经能够在分子水平对该类微生物进行改造以克服其发酵性能上的缺陷, 进而提高菌株的发酵能力和经济性, 但目前距离工业生产需求仍有一定差距。造成上述结果的主要原因是我们对于产溶剂梭菌这类严格厌氧微生物复杂的生理生化机制的认知仍然有限, 无法对菌株进行高效的设计和改造。基于此, 采用“反向代谢工程”技术是加快目前产溶剂梭菌研究进度的有效策略之一^[2]。在反向代谢工程研究中, 转座子随机突变是一种重要的技术手段。

我们以两种重要的产溶剂梭菌模式菌株—丙酮丁醇梭菌和拜氏梭菌作为研究对象, 建立了高效的基于 *mariner* 转座子的诱导型随机突变方法, 获得了高质量的单基因突变体库, 转座效率 90% 以上, 且转座突变具有很好的随机性。在此基础上, 上述突变体库被用于优势表型筛选, 分别获得了一株产量显著提高的丙酮丁醇梭菌和对玉米秸秆水解液抑制物耐受能力显著增强的拜氏梭菌。上述结果证明了基于 *mariner* 转座子的产溶剂梭菌随机突变技术平台在优势表型筛选中的作用。

参考文献

- [1] Tracy B. P., Jones S. W., Fast A. G., et al, Curr. Opin. Biotechnol., 2012, **23** (3), 364-381.
- [2] Zhang Y., Grosse-Honebrink A., Minton N.P. PLoS One, 2015, **10**, e0122411

ATG22 敲除对醋酸胁迫下酿酒酵母程序性细胞死亡作用

董亚晨 胡竞进 陈启和

浙江大学食品科学与营养系； 浙江省食品微生物技术研究重点实验室， 杭州 310058

摘要：醋酸阻断了酿酒酵母细胞的胞内氨基酸营养吸收，启动了程序性细胞死亡。Atg22 是一种液泡内膜蛋白，它对于液泡内氨基酸进出与自噬性降解是必须的。本文重点开展 ATG22 基因在酵母细胞应对醋酸胁迫死亡过程中的作用机制。我们检测了几种凋亡标记因子，研究发现 Atg22 的敲除和过表达分别延迟和提高醋酸胁迫下酵母细胞的程序性死亡。基于表观上分析，酵母 Atg22 蛋白的表达受到醋酸作用的抑制。而且，Atg22 基因敲除的酵母细胞在醋酸处理后胞内氨基酸和 NH₃ 大量的积累，这可以帮助应对细胞氨基酸饥饿和胞内环境酸化。与此同时，在 ATG22 基因敲除后的细胞中系列胁迫保护基因也在转录水平上发生上调。本研究结果为解析 Atg22p 在醋酸导致的程序性细胞死亡中的作用提供了依据，也为改善工业酿酒酵母其醋酸耐受能力提供了新靶标。

参考文献

- [1] Almeida, B., Ohlmeier, S., Almeida, A. J., Madeo, F., Leao, C., Rodrigues, F. and Ludovico, P. (2009). Yeast protein expression profile during acetic acid-induced apoptosis indicates causal involvement of the TOR pathway. *Proteomics* **9**, 720-732.
- [2] Bauer, B. E., Rossington, D., Mollapour, M., Mamnun, Y., Kuchler, K. and Piper, P. W. (2003). Weak organic acid stress inhibits aromatic amino acid uptake by yeast, causing a strong influence of amino acid auxotrophies on the phenotypes of membrane transporter mutants. *European Journal of Biochemistry* **270**, 3189-3195.
- [3] Carmona-Gutiérrez, D., Bauer, M. A., Ring, J., Knauer, H., Eisenberg, T., Büttner, S., Ruckenstein, C., Reisenbichler, A., Magnes, C., Rechberger, G. N., Birner-Gruenberger, R., Jungwirth, H., Fröhlich, K. U., Sinner, F., Kroemer, G. and Madeo, F. (2011). The propeptide of yeast cathepsin D inhibits programmed necrosis. *Cell Death and Disease* **2**, e161.

苏云金芽孢杆菌 L-异亮氨酸羟化酶的酶学性质及其在酶法合成 4-羟基异亮氨酸中的应用研究

张成林 麻杰 薛宁 王鑫鑫 刘远 陈宁*

天津科技大学生物工程学院代谢控制发酵技术国家地方联合工程实验室;工业微生物教育部重点实验室, 天津 300457

摘要: 4-羟基异亮氨酸(4-Hydroxyisoleucine, 4-HIL)具有葡萄糖浓度依赖的促进胰岛素分泌的活性以及增强肌细胞对血糖吸收、加速脂肪代谢、降血脂和保护肝功能的作用, 因此具有广泛的应用前景和市场需求。目前采用胡芦巴种子提取法生产的 4-HIL 构型多样且提取率, 而仅(2S, 3R, 4S)-4-羟基异亮氨酸具有生物学活性。本文克隆了来源于苏云金芽孢杆菌 *Bacillus thuringiensis* TCCC 11826 的 L-异亮氨酸羟化酶 (L-isoleucine-4-hydroxylase, IDO)编码基因 *ido*, 测序发现该基因含 723 个核苷酸, 编码 240 个氨基酸, 未见相同序列基因的报道。氨基酸序列分析发现该 IDO 含有 His¹-X-Asp/Glu-Xn-His² 基序, 属于 Fe²⁺和 α -酮戊二酸依赖型羟化酶家族。成功构建了 *ido* 基因过表达菌株 BL-IDO 并采用 Ni-NTA 亲和层析法分离纯化重组 IDO 后检测其酶学特性, 结果表明该酶能够特异性地催化 L-异亮氨酸生成 (2S, 3R, 4S)-4-HIL, 其 K_m 和 V_m 分别为 0.18mmol/L 和 2.10 μ mol/min/mg, 最适反应温度和 pH 分别为 35℃和 7.0, 于 35℃条件下反应 5h 后仍具有 85.1%的活性。BL-IDO 经培养、IPTG 诱导并冷冻处理后于适宜条件下能够特异性地催化异亮氨酸生成 (2S, 3R, 4S)-4-HIL, 其转化率最高可达 90.7 %。本文新发现了一段 IDO 编码基因序列(Accession No. KC884243)并首次较为系统地研究了其酶学特性, 该酶反应条件温和且具有较高的活性及稳定性, 在酶法合成 4-HIL 中具有一定的应用价值。本研究可为 4-HIL 及其它氨基酸衍生物的生物制造技术奠定理论基础。

Acetobacter sp.生物合成 3-HP 转化机制及催化技术研究

李俊 陆信曜 宗红 诸葛斌

江南大学生物工程学院, 无锡 214122

摘要: 3-羟基丙酸(3-hydroxypropionic acid, 3-HP)是一种具有高经济价值的重要工业用化学中间体, 具有广泛的应用前景^[1-6], 但目前尚未实现工业化生产。本实验室前期研究已筛选获得了一株可高效催化 1,3-丙二醇 (1,3-PDO) 合成 3-HP 的菌株—*Acetobacter* sp.^[7], 本课题旨在探明 1,3-PDO 经全细胞催化合成 3-HP 的醇脱氢氧化过程和机理, 并通过驯化培养获得具有高底物耐受性的菌株, 利用细胞固定化催化合成 3-HP, 以期生物合成 3-HP 提供一种新方法。

经过多轮次底物胁迫驯化获得了能够耐受高浓度 1,3-PDO (50 g/L) 的子代菌株, 同时菌体的催化活性也得到了相应提高。以提高菌体的呼吸链水平为切入点, 通过优化碳源组合和添加辅酶 Q 前体物质、生长因子以及辅酶金属离子, 对培养基进行优化, 使 *Acetobacter* sp.生物量增加了 55.9%。

通过固定化技术在 3-HP 生物合成中的应用, 利用 *Acetobacter* sp.催化反应 80 h 后, 3-HP 的产量最高达 34.96 g/L, 摩尔转化率为 86.79%。且固定化细胞在重复利用 5 次之后转化率仍高于 80%, 在 4 °C 的条件下贮存 100 h 后其催化能力仍能保持在较高水平。功能菌体 *Acetobacter* sp.的固定化研究工作克服了工业实际应用的中存在的操作难点, 固定化细胞具有良好的生产应用稳定性, 为生物转化合成 3-HP 的工业生产提供借鉴。这一研究结果为生物合成 3-HP 提供了新思路, 具有重要的参考价值。

参考文献

- [1] Jiang XL, Meng X, Xian M. Biosynthetic pathways for 3-hydroxypropionic acid production[J]. Appl Microbiol and Biotechnology. 2009, **82**(6): 995-1003.
- [2] Werpy T, Petersen G, Aden A, Bozell J, Holladay J, White J, Manheim A, Eliot D, Lasure L, Jones S. Top value added chemicals from biomass: results of screening for potential candidates from sugars and synthesis gas[M]. Energy Efficiency and Renewable Energy, Washington D.C., 2004.
- [3] Brown SF. Bioplastic fantastic[J]. Fortune. 2003, **148**:92-97.
- Della Pina C, Falletta E, Rossi M. A green approach to chemical building blocks. The case of 3-hydroxypropanoic acid[J]. Green Chemistry. 2011, **13** (7):1624-1632.
- [4] Falletta E, Della Pina C, Rossi M, He Q, Kiely CJ, Hutchings GJ. Enhanced performance of the catalytic conversion of allyl alcohol to 3-hydroxypropionic acid using bimetallic gold catalysts[J]. Faraday Discuss. 2011, **152**:367-379.
- [5] Kumar V, Ashok S, Park S. Recent advances in biological production of 3-hydroxypropionic acid[J]. Biotechnol Adventure. 2013, **31**:945-961.
- [6] 吴金鑫, 诸葛斌, 宗红, 陆信曜, 方慧英, 宋健. 高效催化合成 3-羟基丙酸的菌株特性研究[J]. 应用与环境生物学报, 2014, **20**(5):804-808.

“生物钢”蜘蛛丝的高效生物制造

钱志刚 钟建江 夏小霞

微生物代谢国家重点实验室；上海交通大学生命科学技术学院，上海 200240

摘要：蜘蛛丝是一类天然高分子蛋白质纤维，不仅具有合成纤维 Kevlar 相当的强度及其他物质难以媲美的弹性和断裂功，而且还具有质轻、耐高低温等特点，是一种优质、难得的天然生物材料，被称为“生物钢”。优异的机械性能使蜘蛛丝在高性能材料如降落伞绳索、军事防护服、航天飞机复合材料等方面具有重要的应用价值，蜘蛛丝良好的生物相容性和可降解性在医用材料、器械方面的应用也得到越来越广泛的关注（1-4）。

天然蜘蛛丝产量非常低，而且蜘蛛同类相食的个性使其无法高密度养殖。几十年来，研究人员测试了转基因动物、植物和微生物等多种宿主体系，但是由于蜘蛛丝是由高度重复基因序列表达的大分子量蛋白质（250-320 kDa）构成，很难大量生产。为了克服生物制造中的瓶颈问题，我们开展了基于机理探索的微生物代谢调控研究。首先，从实验中观察到的蛛丝蛋白生产造成微生物宿主生长阻滞的现象出发，采用比较蛋白组学分析的方法来研究微生物宿主代谢失衡的机制。其次，从代谢网络和发酵过程调控两个层面出发，探索缓解表达宿主代谢失衡的工程策略，提升外源蛛丝蛋白的生产水平，为后续的蜘蛛丝产业化研究奠定科学基础，还为其他生物基材料单体化学品的高效生物合成提供借鉴（5）。

参考文献

- [1] Qian Z. G., Zhou M. L., Song W. W., Xia X. X. *Biomacromolecules*, 2015, DOI: 10.1021/acs.biomac.5b01231
- [2] Xia X. X., Qian Z. G., Ki C. S., Park Y. H., Kaplan D. L., Lee S. Y. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, **107**(32), 14059-14063.
- [3] Xia X. X., Wang M., Lin Y., Xu Q., Kaplan D. L. *Biomacromolecules*, 2014, **15**(3), 908-914
- [4] Wang Q., Xia X., Huang W., Lin Y., Xu Q., Kaplan D. L. *Advanced Functional Materials*, 2014, **24**(27), 4303-4310.
- [5] Yu J. L., Xia X. X., Zhong J. J., Qian Z. G. *Biotechnology and Bioengineering*, 2014, **111**(12), 2580-2586

微生物合成黄酮类物质的系统代谢工程策略

周景文 吴俊俊 堵国成 陈坚

江南大学生物工程学院, 无锡 214122

摘要: 黄酮类物质是一大类具有类似结构的植物天然产物, 在食品、医药等领域具有重要应用, 一直以来主要通过植物提取法生产。采用微生物合成来源于植物的天然产物, 具有低成本、低污染、受季节影响小等优点, 引起越来越多研究者的关注。为了解决植物提取法所存在的一系列问题, 通过在微生物中构建由 3-脱氧-D-阿拉伯庚酮酸-7-磷酸合成酶(DAHPS)、分支酸变位酶/预苯酸脱氢酶(CM/PDH)、酪氨酸氨基裂解酶(TAL)、4-香豆酸:辅酶 A 连接酶(4CL)、查尔酮合成酶(CHS)、查尔酮异构酶(CHI)、丙二酸辅酶 A 合成酶、多种 P450 氧化酶系等组成的黄酮类物质合成途径。通过模块优化策略得到的最优的代谢模块组合菌株可以在胞外以葡萄糖为碳源, 积累(2S)-柚皮素和(2S)-生松素。研究发现, 黄酮类物质合成的关键前体——丙二酰辅酶 A, 在生长过程中被大量用于细胞膜组分的合成, 导致仅有少部分可以被用于黄酮类物质的合成。因此, 构建了针对丙二酰辅酶 A 代谢途径关键基因的反义 RNA 调控策略。研究表明, 基于 mRNA 互补序列和 CRISPR/dCas9 的反义 RNA 调控系统在大肠杆菌中的活性具有特定的规律。在此基础上, 通过系统构建模块化合成策略, 实现了(2S)-柚皮素、(2S)-生松素、圣草酚等多种黄酮类化合物的高效合成。相关研究结果为采用大肠杆菌更为有效的合成黄酮类化合物建立了一系列的系统代谢工程方法, 并为后续改造微生物更为有效的合成种类更为多样的黄酮类提供了通用的方法学参考。

参考文献

- [1] Wu J. J., Du G. C., Chen J., et al, Scientific Reports. 2015, **5**: 13477.
- [2] Zhou J. W., Wang K., Xu S., et al, Journal of Proteomics. 2015, **113**: 15-28.
- [3] Wu J. J., Yu O., Du G. C., et al, Applied and Environmental Microbiology. 2014, **80**(23):7283-7292.
- [4] Zhu S. J., Wu J. J., Du G. C., et al, Applied and Environmental Microbiology. 2014, **10**(80): 3072-3080.
- [5] Zhou J. W., Du G. C., Chen J.. Current Opinion in Biotechnology. 2014. **25**: 17-23.
- [6] Wu J. J., Du G. C., Zhou J. W., et al, Metabolic Engineering. 2013. **16**:48-55.

大肠杆菌高产 L-丝氨酸的基因工程菌构建

赵志军¹ 崔云凤¹ 刘岩² 史吉平¹

¹ 中国科学院上海高等研究院 生物炼制实验室, 上海 201210; ² 大连工业大学生物工程学院, 大连 116034

摘要: L-丝氨酸是生物体内一种重要的中间代谢产物, 现已广泛应用于医药、食品、化妆品等领域。以 *E. coli* W3110 为出发菌株, 首先以定点突变的方法解除了 L-Ser 对基因 *serA* 编码的磷酸甘油酸脱氢酶的反馈抑制作用, 并将该突变基因与其它三个关键酶编码基因 *serB*、*serC* 和 *pgk* 进行串联表达; 其次, 通过随机突变方法, 筛选获得了比酶活降低的丝氨酸羟甲基转移酶突变体 GlyA^m, 并进一步考察了敲除丝氨酸脱水酶编码基因对菌株产 L-Ser 的影响; 发酵结果表明, 当同时敲除基因 *sdaA* 和 *sdaB* 时, 菌体发酵约 35 h 后, L-Ser 产量最高可达 33 g/L, 葡萄糖转化率约为 18%。

Systematic analysis of intracellular mechanisms of propanol production in the engineered *Thermobifida fusca* B6 strain

邓禹

江南大学粮食发酵工艺与技术国家工程实验室， 无锡 214122

Abstract: *Thermobifida fusca* is a moderately thermophilic actinobacterium naturally capable of utilizing lignocellulosic biomass. The B6 strain of *T. fusca* was previously engineered to produce 1-propanol directly on lignocellulosic biomass by expressing a bifunctional butyraldehyde/alcohol dehydrogenase (adhE2). To characterize the intracellular mechanisms related to the accumulation of 1-propanol, the engineered B6 and wild-type (WT) strains were systematically compared by analysis of the transcriptome and intracellular metabolome during exponential growth on glucose, cellobiose and Avicel. Of the 18 known cellulases in *T. fusca*, 10 cellulase genes were transcriptionally expressed on all three substrates along with three hemicellulases. Transcriptomic analysis of cellodextrin and cellulose transport revealed that *Tfu_0936* (multiple sugar transport system permease) was the key enzyme regulating the uptake of sugars in *T. fusca*. For both WT and B6 strains, it was found that growth in oxygen-limited conditions resulted in a blocked TCA cycle caused by repressed expression of *Tfu_1925* (aconitate hydratase). Further, the transcriptome suggested a pathway for synthesizing succinyl-CoA: oxaloacetate to malate (by malate dehydrogenase); malate to fumarate (by fumarate hydratase) and fumarate to succinate (by succinate dehydrogenase/fumarate reductase) which was ultimately converted to succinyl-CoA by succinyl-CoA synthetase. Both the transcriptome and the intracellular metabolome confirmed that 1-propanol was produced through succinyl-CoA, L-methylmalonyl-CoA, D-methylmalonyl-CoA and propionyl-CoA in the B6 strain.

枯草芽孢杆菌发酵产 surfactin 与聚- γ -谷氨酸的工艺优化

易高斌 李霜*

南京工业大学生物与制药工程学院, 南京 210009

摘要: Surfactin, 由*Bacillus spp.*产生的一种环状脂肽类表面活性剂, 由一个亲水的环七肽头部连接一个多碳链脂肪酸疏水尾部组成, 具有抗菌、抗支原体衣原体、抗病毒、抑制肿瘤细胞增殖等生物学功能, 具有广阔的应用前景[1]。Hyun Gi Kong等学者发现Surfactin的发酵液对草莓、番茄灰霉病的生物防治作用, 将发酵液稀释100倍, 对草莓、番茄灰霉病控制率分别可达91.2%和92.3%[2]。聚- γ -谷氨酸(poly- γ -glutamic acid, γ -PGA)是由L-谷氨酸和D-谷氨酸通过酰胺键结合形成的一种多肽分子, 具有增稠、保湿、无毒、生物可降解等性能, 适用于化妆品、生物医学、生物肥料等领域[3]。Jiang Yue等研究发现添加聚- γ -谷氨酸肥料比普通肥料可使土壤中 $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+-\text{N}$ 含量提高25-61 %, 并使番茄对 NO_3^--N 的吸收提高50 %。本实验室从胜利油田土壤中筛选得到的一株枯草芽孢杆菌-*NJtech* 489, 可同时发酵生产Surfactin与聚- γ -谷氨酸; 在蔗糖/硝酸铵合成培养基中, 二者发酵浓度分别为262.23 mg/L和1.51 g/L。为了提高Surfactin和 γ -PGA的发酵产量, 进一步提高实现双功能物质的生产应用的可能性, 本文以通过单因素分析, 结合智能可视化软件(IVOS)对菌株发酵工艺条件进行优化分析。确立碳源、氮源、谷氨酸钠、氯化钠、磷酸二氢钾、接种量6个影响因子, 10水平, 采用 $U_{10}^*(10^8)$ 均匀设计实验, 实验结果通过智能可视化软件(IVOS)分析得出最佳培养工艺条件。结果表明, 温度37 °C、发酵时间36h、转速200 rpm、接种量3.69 %、甘油31.56 g/L、硫酸铵8.44 g/L、谷氨酸钠29.89 g/L、氯化钠 5.61 g/L、磷酸二氢钾 1.37 g/L、七水合硫酸亚铁0.02 g/L、七水合硫酸镁0.2 g/L。发酵生产表面活性素和聚谷氨酸产量分别可达543.21 mg/L和21.74 g/L, 比最初产量分别提高了1.1倍和13.5倍。

关键词 枯草芽孢杆菌; Surfactin; 聚谷氨酸; 智能可视化分析(IVOS)

参考文献

- [1] Kakinuma A, Hori M, Isono M, et al. Determination of amino acid sequence in Surfactin, a crystalline peptidolipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*[J]. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1969a, **33**: 971-997.
- [2] Kong H G, Choi G J, Kim H J, et al. Production of Surfactin and iturin by *Bacillus licheniformis* N1 responsible for plant disease control activity[J]. *The Plant Pathology Journal*, 2010, **26**(2): 170-177.
- [3] 施庆珊.精细与专用化学品, 2004, **12**(11) : 20~23.
- [4] Jiang Yue, Liu Liming, Luo Guangfu, et al. Effect of γ -PGA Coated Urea on N-Release Rate and Tomato Growth, *Wuhan University Journal of Natural Sciences*, 2014, **4**: 335-340

基于代谢工程改造策略强化 2,3-丁二醇合成途径

杨套伟 刘梅 戴悦 刘畅 李磊 周昌洋 张显 徐美娟 饶志明*

江南大学生物工程学院, 工业生物技术教育部重点实验室, 无锡 214122

摘要: 2,3-丁二醇是一个重要的生物基四碳平台化合物, 被广泛应用于化工、食品、医药、燃料及航空航天等领域^[1]。2,3-丁二醇合成途径由 EMP 途径和 2,3-丁二醇支路组成, 同时也是一个氧化还原途径^[2]。本文主要概述近期本研究室对 2,3-丁二醇支路的代谢工程改造策略。2,3-丁二醇支路共有三个关键酶: 乙酰乳酸合成酶 (ALS)、乙酰乳酸脱羧酶(ALDC)和乙偶姻还原酶(ACR)。而直接过量共表达这三个关键酶基因, 给菌体生长带来负担, 从而会降低生产效率^[3]。ALS 和 ALDC 的表达受 *alsSD* 操纵子的调控, 而转录调控子 *ALsR* 调控 *alsSD* 的表达^[4]。Yang^[3] 和 Zhang 等^[5]研究发现, 适度增强转录调控子 *ALsR* 的表达量和提高 ACR 表达量都可以增强 2,3-丁二醇支路碳流量。另外, 2,3-丁二醇合成过程中需要 NADH 参与, 因此, NADH 水平对 2,3-丁二醇合成具有重要影响。Yang 等^[2, 3]通过强化 NADH/NAD⁺再生速率, 提高了支路的通量; 另外, 他们通过敲除 NADH 氧化酶, 并引入甲酸-甲酸脱氢酶组成的 NADH 再生系统, 提高了体系中 NADH 水平, 进而提高了 2,3-丁二醇产量, 并降低了副产物乙偶姻的积累^[6]。另外, 乙醇、乳酸等副产物支路不仅和 2,3-丁二醇途径竞争碳流, 同时竞争 NADH, 因此, 阻断这些副产物支路可以进一步提高 2,3-丁二醇支路代谢通量^[6]。

参考文献

- [1] Ji XJ, Huang H, Ouyang PK. Microbial 2,3-butanediol production: a state-of-the-art review[J]. *Biotechnol Adv.* 2011, **29**(3): 351-364.
- [2] Yang T-W, Rao Z-M, Zhang X, *et al.* Improved production of 2,3-butanediol in *Bacillus amyloliquefaciens* by over-expression of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and 2,3-butanediol dehydrogenase[J]. *Plos One.* 2013, **8**(10): e76149.
- [3] Yang T, Rao Z, Zhang X, *et al.* Enhanced 2,3-butanediol production from biodiesel-derived glycerol by engineering of cofactor regeneration and manipulating carbon flux in *Bacillus amyloliquefaciens*[J]. *Microb Cell Fact.* 2015, **14**(1): 122.
- [4] Fradrich C, March A, Fiege K, *et al.* The transcription factor *AlsR* binds and regulates the promoter of the *alsSD* operon responsible for acetoin formation in *Bacillus subtilis*[J]. *J Bacteriol.* 2012, **194**(5): 1100-1112.
- [5] Zhang X, Zhang R, Bao T, *et al.* The rebalanced pathway significantly enhances acetoin production by disruption of acetoin reductase gene and moderate-expression of a new water-forming NADH oxidase in *Bacillus subtilis*[J]. *Metab Eng.* 2014, **23**: 34-41.
- [6] Yang T, Rao Z, Hu G, *et al.* Metabolic engineering of *Bacillus subtilis* for redistributing the carbon flux to 2,3-butanediol by manipulating NADH levels[J]. *Biotechnol Biofuels.* 2015, **8**: 129.

Yeast cell-based analysis of human lactate dehydrogenase isoforms

高晓冬 Mohamed LA 中西秀树
江南大学生物工程学院，无锡 214122

摘要：很多癌症细胞都拥有共同的代谢特征：即在氧气充足的条件下，大多数的癌症细胞会将葡萄糖经过糖酵解途径转化成乳酸。这一特征被称作有氧糖酵解。由于乳酸脱氢酶（LDH）是有氧糖酵解不可缺少的，乳酸脱氢酶被认为是很有潜力的治疗癌症的研究点。

本研究，在酿酒酵母细胞中重建乳酸发酵系统，来研究酿酒酵母细胞中的人源化 LDH。*pdc* 敲除（内源性丙酮酸脱羧酶基因敲除）的酿酒酵母无法进行酒精发酵。在电子传递链抑制剂如抗霉素 A 的存在下，*pdc* 敲除菌株表现出生长缺陷。本研究首先分析了在抗霉素 A 存在的情况下，*pdc* 缺陷菌株的生长延迟现象；然后，将人源的 LDHA 基因转化至 *pdc* 缺陷菌株。研究发现，LDHA 的表达能弥补 *pdc* 缺陷菌株的生长缺陷，而且这种弥补作用是由于 LDHA 的催化活性。与 LDHA 相似，LDHC 也能弥补 *pdc* 缺陷菌株的生长缺陷，尽管 LDHC 不能发酵产生与 LDHA 相同水平的乳酸。相反，LDHB 能发酵产生与 LDHC 相同水平的乳酸，但是 LDHB 不能弥补 *pdc* 缺陷菌株的生长缺陷。进一步研究发现，LDHB-RFP 在酵母细胞内的荧光分布累计成泡状，而 LDHA-RFP 和 LDHC-RFP 的荧光主要分布在细胞质中。因此，LDHB 在酵母细胞内表达具有独特的特征。由于酵母细胞进行遗传分析和基于细胞的高通量筛选，PDC / LDH 菌株有望用于人类 LDH 的多方面的分析。

关键词 酒精发酵；乳酸发酵；乳酸脱氢酶；丙酮酸脱氢酶；酿酒酵母

参考文献

- [1] Mohamed LA, *J Biochem.* 2015 Jun 30. pii: mvv061. [Epub ahead of print]
- [2] Doherty, J.R., *Journal of Clinical Investigation.* **123**, 3685-3692 (2013)

高产四氢嘧啶的大肠杆菌工程菌构建

吴雪娇 宁义科 陈宁 谢希贤

天津科技大学生物工程学院；代谢控制发酵技术国家地方联合工程实验室，天津 300457

摘要：四氢嘧啶是一种调节渗透压，稳定天然蛋白质的水合层，保护酶、DNA 等生物大分子和细胞膜结构的物质，可以帮助细胞抵抗冷冻、干旱、高温、高盐、辐射等各种逆境^[1]。其合成途径仅存在于一些中度嗜盐微生物中。传统发酵法使用嗜盐微生物在高盐浓度下合成四氢嘧啶。本文在大肠杆菌中重构了四氢嘧啶合成通路，并利用代谢工程手段提高了四氢嘧啶积累量。首先以 *Escherichia.coli* W3110 菌株为出发菌株，将来源于 *Halomonas.elongata* 菌株的四氢嘧啶合成基因 *ectABC* 异源表达，重构四氢嘧啶的合成途径，实现四氢嘧啶的积累。经摇瓶发酵四氢嘧啶产量达到 4.88 g/L。通过敲除 *thrA* 和 *lysA* 基因分别阻断、弱化苏氨酸和赖氨酸支路，增加四氢嘧啶合成支路的代谢通量，四氢嘧啶产量比原菌提高了 109 %。在此基础上，过表达来源于 *Corynebacterium glutamicum* 菌株编码天冬氨酸激酶的 *lysC* 基因并对其定点突变，解除苏氨酸、赖氨酸对四氢嘧啶前体物 L-天冬氨酸- β -半醛的反馈抑制^[2]，四氢嘧啶产量提高了 17 %。然后，通过替换 *ppc* 基因启动子为 *trc* 启动子，加强磷酸烯醇式丙酮酸到草酰乙酸的直接合成；通过敲除 *iclR* 基因增强乙醛酸支路循环以增加草酰乙酸的供应，继而提高天冬氨酸的供应^[3]，四氢嘧啶产量提高了 21 %。最终得到一株能够在发酵液中大量积累四氢嘧啶的大肠杆菌工程菌。摇瓶分批补料发酵 24 h 发酵液中四氢嘧啶积累达 16 g/L，5L 发酵罐分批补料发酵 30 h 发酵液中四氢嘧啶积累达 25 g/L。

参考文献

- [1] 王颖群, 陶涛. 微生物渗透压调节过程中的相容性溶质[J]. 微生物学报, 1994 (21) : 293-296.
- [2] Kwang Ho Lee, Jin Hwan Park, Tae Yong Kim. Systems metabolic engineering of *Escherichia coli* for L-threonine production[J]. *Molecular Systems Biology* 3:149.
- [3] 周叶欣, 谢建平等, 结核分枝杆菌 *iclR* 转录调控因子 Rv2989 的功能研究[D]. 西南大学, 2012.

重组钝齿棒杆菌 SYPA-phbCAB-ppnK 的构建及 PHB 胞内积累对 L-精氨酸合成的影响

徐美娟 秦敬儒 张显 杨奎伟 饶志明*

江南大学生物工程学院, 工业生物技术教育部重点实验室, 无锡 214122

摘要: L-精氨酸作为一种人体半必需氨基酸, 因其生理和药理功效而广泛应用于食品、药品和保健品等行业; 聚羟基脂肪酸酯(PHAs)是微生物在碳源、氮源比例过高等条件下, 在细胞内形成的作为细胞自身碳源和能源储备物的一类聚酯, 其中聚- β -羟基丁酸酯(PHB)是一种研究较为成熟的 PHAs, 由于其良好的生物可降解性和生物相容性, PHB 具有广泛应用。

钝齿棒杆菌 *Corynebacterium crenatum* SYPA 5-5 是一种钝齿状、革兰氏阳性的无芽孢菌株, 是已应用到工业生产的 L-精氨酸菌株。本研究就是在该菌的基础上, 将来自于 *Ralstonia eutropha* H16 的 PHB 合成操纵子转入该菌中, 实现胞外生产 L-精氨酸和胞内积累 PHB, 并考察对 PHB 的胞内积累对 L-精氨酸的合成代谢途径的影响。将来自于 *R. eutropha* H16 的整个 PHB 合成操纵子构建至钝齿棒杆菌 SYPA 5-5 中得到重组菌 SYPA 5-5/pDXW-10-phbCAB。由于 L-精氨酸和 PHB 在合成过程中竞争需要辅酶 NADPH, 需要通过过表达同源 NAD 激酶来调节胞内的辅酶水平, 构建并获得重组菌 SYPA-phbCAB-ppnK, 进行酶活、含量及电泳检测, 钝齿棒杆菌胞内 PHB 的含量显著提高, 同时对菌株内 L-精氨酸合成途径关键基因进行转录水平分析, 发现 PHB 的积累和 NAD 激酶的过表达可促进这些基因的转录表达。在 5-L 发酵罐上对重组菌 SYPA 5-5/pDXW-10-phbCAB-ppnK 培养基中碳源浓度、碳氮比、发酵罐搅拌速度和发酵策略等对二者产量影响较大的因素进行优化, 结果为: 碳源浓度 180 g/L, 碳氮比 9: 1, 搅拌速度 600 r/min, 优化后 L-精氨酸产量达 65.7 g/L, PHB 含量占细胞干重的 15.7 %, 明显高于优化前的产量, 补料分批发酵延长发酵时间, 二者产量得到进一步提升。

参考文献

- [1] Liu Q, Ouyang S P, Kim J, et al. The impact of PHB accumulation on L-glutamate production by recombinant *Corynebacterium glutamicum*[J]. J Biotechnol, 2007, 132(3): 273-279.
- [2] Gu P, Kang J, Yang F, et al. The improved L-tryptophan production in recombinant *Escherichia coli* by expressing the polyhydroxybutyrate synthesis pathway[J]. Applied microbiology and biotechnology, 2013, 97(9): 4121-4127.
- [3] Shi F, Huan X, Wang X, et al. Overexpression of NAD kinases improves the L-isoleucine biosynthesis in *Corynebacterium glutamicum* ssp. lactofermentum[J]. Enzyme Microb Technol, 2012, 51(2): 73-80.
- [4] Xu M, Rao Z, Dou W, et al. Site-directed mutagenesis and feedback-resistant N-acetyl-L-glutamate kinase (NAGK) increase *Corynebacterium crenatum* L-arginine production[J]. Amino Acids, 2012, 43(1): 255-266.
- [5] Xu M, Rao Z, Yang J, et al. Heterologous and homologous expression of the arginine biosynthetic argC~H cluster from *Corynebacterium crenatum* for improvement of (L) -arginine production[J]. J Ind Microbiol Biotechnol, 2012, 39(3): 495-502.

基于动态代谢组学分析与合成途径动力学模型的途径诊断方法的构建与应用

刘龙 刘延峰 堵国成 陈坚

江南大学生物工程学院, 无锡 214122

摘要: 系统生物学和合成生物学的迅速发展提高了工程菌构建的效率^[1, 2]。然而目前缺少对已构建工程菌限速步骤系统分析的方法, 阻碍了工程菌改造靶点的选取及途径优化。本研究建立了一种基于动态代谢组学和动力学模型鉴定目标产物合成瓶颈的方法, 通过动态模拟不同潜在限速步骤存在时的合成途径启动阶段的动力学, 结合代谢组学实验测定合成途径启动阶段的动力学变化, 可以鉴定出合成途径中的限速步骤。以前期研究中构建的一株可以生产重要的功能糖 N-乙酰氨基葡萄糖 (GlcNAc) 的重组枯草芽孢杆菌作为研究对象^[3-5], 系统解析了 GlcNAc 合成途径动力学及限速步骤。首先, 比较代谢组系统分析及产物合成前体途径改造表明, GlcNAc 合成前体物质 (包括乙酰基、氨基以及碳架结构) 的供给不是 GlcNAc 合成限制性因素; 其次, GlcNAc 合成途径动力学分析及动态模拟鉴定出 GlcNAc 合成瓶颈为 GlcNAc-6-P 与 GlcNAc 之间的存在的无效循环, 并通过[U-¹³C]葡萄糖动态标记实验进一步验证了无效循环的存在为合成途径的限制性因素; 最后, 通过敲除葡萄糖激酶编码基因 *glcK* 阻断了由 GlcNAc 流向 GlcNAc-6-P 的代谢流, 解除了 GlcNAc 合成途径中的无效循环, 细胞比生长速率和 GlcNAc 生产强度得到提高, 分别是阻断无效循环之前的 2.1 倍和 2.3 倍。本研究建立的动态代谢途径分析方法和合成途径限制性因素的鉴定方法为微生物代谢工程改造生产其它重要化合物提供参考。

参考文献

- [1] Julleson, D., David, F., Pfleger, B. et al., Biotechnol. Adv. 2015, <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.02.011>.
- [2] Sander, J.D., Joung, J. K., Nat. Biotechnol., 2014, **32**, 347-355.
- [3] Liu, Y., Zhu, Y., Ma, W., et al., Metab. Eng., 2014, **23**: 42-52.
- [4] Liu, Y., Zhu, Y., Ma, W., et al., Metab Eng, 2014, **24**: 61-69.
- [5] Liu, Y., Liu, L., Shin, H-d, et al., Metab Eng, 2013, **19**: 107-115.

真菌多糖水解规律及单糖组成研究

马耀宏 郑岚 孟庆军 史建国 杨俊慧 杨艳

山东省科学院生物研究所生物传感器重点实验室, 济南 250014

摘要: 食药真菌多糖是从食药真菌菌丝体、发酵液、子实体以及菌核中分离出来的一类的高分子糖类化合物^[1-2], 在国际上被称为“生物反应调节剂 (Biological response modifiers, BRM)”, 具有显著的免疫调节功能, 还在抗肿瘤、护肝、抗氧化、降血脂、降血糖等方面具有广泛的生物学功效^[3-9]。

利用 SBA-40C 型生物传感分析仪和 SGD-IV 型全自动还原糖测定仪绘制树舌多糖、灵芝多糖、虫草多糖的部分酸水解曲线。实验结果表明, 同种多糖样品水解曲线的变化趋势几乎一致, 而不同的多糖样品水解曲线有明显差异。因此, 真菌多糖的水解有一定的规律性, 这种规律性可以为鉴别多糖提供一种新方法。

通过柱前衍生化 HPLC 法分析了 6 种真菌多糖的单糖组成。将 6 种真菌的胞外粗多糖及其菌体用 1 mol/L 的硫酸水解成单糖, 用 1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮 (PMP) 衍生化, 利用高效液相色谱法检测各单糖。结果表明, 灵芝、树舌类真菌胞外多糖的产率均较高, 胞外多糖产率在 0.92 g/L~1.53 g/L 之间。胞外多糖主要以甘露糖为主, 其次含有葡萄糖和半乳糖, 并且一般含有少量的阿拉伯糖。胞内多糖中葡萄糖含量最高, 其次含有甘露糖和半乳糖, 个别菌种还含有少量的阿拉伯糖和葡萄糖醛酸。而虫草胞外多糖的组成依次为半乳糖、葡萄糖、甘露糖和葡萄糖醛酸, 胞内多糖同样是主要含有葡萄糖, 其次含有甘露糖、半乳糖和葡萄糖醛酸。

参考文献

- [1] 李盛, 许淑琴, 张俐娜, 高分子学报, 2010, **12**: 1359-1375.
- [2] Ye M., Chen W. X., Qiu T., et al, Food Chemistry, 2012, **132**: 338-343.
- [3] Chen J. J., Yong Y. Y., Xing M. C., et al, Carbohydrate Polymers, 2013, **97**: 604-613.
- [4] Chen W., Zhao Z., Li Y. Q., et al, Carbohydrate Polymer, 2011, **85**(2): 369-375.
- [5] Liang Y., Chen Y. J., Liu H. H., et al, Biomedicine and Preventive Nutrition, 2011, **1**(4): 245-254.
- [6] Ma J. W., Qiao Z. Y., Xia X., et al, Carbohydrate Polymers, 2011, **84**(3): 1061-1068.
- [7] Shao B. M., Dai H., Xu W., et al, Biochemical and Biophysical Research Communications, 2004, **323**(1): 133-141.
- [8] Wang J. M., Hu Y. L., Wang D. Y., et al, International Journal of Biological Macromolecules, 2010, **46**(2): 212-216.
- [9] Gao C. J., Wang Y. H., Wang C. Y., et al, Carbohydrate Polymers, 2013, **92**: 2187-2192.

通过敲除胞外蛋白酶和细菌多糖提高 *Bacillus amyloliquefacien* LL3 果聚糖产量

谷燕燕¹ 冯俊¹ 高伟霞¹ 全玉芬¹ 王淑芳² 宋存江¹

¹南开大学 分子微生物与技术教育部重点实验室, 天津 300071; ²南开大学 药物化学生物学国家重点实验室, 天津 300071 E-Mail: songcj@nankai.edu.cn

摘要: 果聚糖是自然界普遍存在的一种主要由果糖基连接成的碳水化合物的总称。微生物来源的果聚糖是一种含有 β (2 $\rightarrow$ 6)糖苷键及少量 β (2 $\rightarrow$ 1)侧链的果聚糖, 其除了具有天然多糖的共同特点, 如生物相容性、生物降解性、安全无毒, 同时还具有抗肿瘤、抗糖尿病、免疫增强、降血脂等多种重要的生物学功能, 而且可用于制备纳米材料, 在生物医药和功能食品等方面具有巨大的应用潜能, 体现出巨大的潜在市场价值。

本实验室从豆类发酵食品中分离得到一株 *Bacillus amyloliquefacien* LL3, 它能够利用蔗糖同时合成 γ -聚谷氨酸 (γ -PGA) 和低分子量的果聚糖, 但产量相对较低。为了提高果聚糖的产量和纯度, 通过基因工程的方法在 *B. amyloliquefacien* NK-1 中连续缺失了六个胞外蛋白酶基因 (*bpr*, *epr*, *mpr*, *vpr*, *nprE*, *aprE*), *tasA* (编码的主要生物膜基质蛋白 TasA), *pgsBCA* (负责 γ 聚谷氨酸 (γ -PGA) 的合成) 以及 3 个细菌多糖基因 (簇) (*epsA-O*, *lps*, *gly*)。最终获得果聚糖产量最高的菌株为 NK-Q-7 (Δ *tasA*, Δ *bpr*, Δ *epr*, Δ *mpr*, Δ *vpr*, Δ *nprE*, Δ *AprE* 和 Δ *pgsBCA*), 其果聚糖产量为 31.1g/L, 较野生菌 NK-LP (15.3 g/L) 提高了 103 %。同时 NK-Q-7 菌株果聚糖纯度有了较大的提高, 从野生菌的 82.8%提高到 93.1%。但在 NK-Q-7 菌株的基础上连续缺失 3 个细菌多糖基因 (簇) 后, 果聚糖的产量有所下降。此外, 研究还发现 NK-Q-7 菌株中 α -淀粉酶的产量较野生菌株 NK- Δ LP 提高了 94.1%, 提示胞外蛋白酶基因缺陷在生产内源性分泌蛋白的积极作用。

Pichia pastoris 甘油抑制甲醇代谢分子机理研究

战春君 杨艳坤 白仲虎

江南大学粮食发酵工艺与技术国家工程实验室, 无锡 214122; 江南大学生物工程学院, 无锡 214122

摘要: 作为巴斯德毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) 当中应用最为广泛的诱导性启动子, 醇氧化酶启动子 (P_{AOX1}) 被大量应用于外源蛋白的表达。但是, 相关研究结果表明, 作为诱导型启动子, P_{AOX1} 仅在甲醇作为唯一碳源的培养基当中才会发挥作用, 进而诱导其后目的蛋白的表达。因此, 目前在巴斯德毕赤酵母外源表达过程中一般采取两步发酵的方法, 即在甘油培养基中生长然后转入甲醇培养基中表达, 在诱导培养基当中需要清除培养基当中的甘油以避免其对 P_{AOX1} 的抑制作用。在本研究当中, 我们通过生物信息学的方法 (同源建模、进化树、跨膜结构分析等) 筛选出巴斯德毕赤酵母疑似甘油转运体 GT1, 然后将其与 EGFP 蛋白在巴斯德毕赤酵母中共表达, 通过荧光显微镜下观察我们发现, 与 GT1 蛋白融合表达的 EGFP 定位于细胞膜上, 而单独的 EGFP 荧光则出现在胞质当中, 这说明 GT1 蛋白是一个跨膜蛋白; 最后我们将构建的 GT1 表达载体导入在甘油做为唯一碳源培养基中不能生长的粟酒裂殖酵母当中, 发现与野生型粟酒裂殖酵母相比, 含有 *gt1* 基因的粟酒裂殖酵母可以在甘油作为唯一碳源的培养基当中生长, 说明 GT1 蛋白具有转运甘油的功能。并且, 在本研究当中, 我们通过巴斯德毕赤酵母突变体 ($\Delta gt1$) 与野生型菌株在不同培养基 (甘油培养基、甘油与甲醇混合培养基、甲醇培养基) 当中的生长状况以及 AOX1 酶活测定发现, 在甘油培养基当中突变体中 AOX1 酶活是野生型 AOX1 酶活的 18 倍 (0.03U); 在甘油与甲醇混合培养基当中, 突变体的 AOX1 酶活是野生型的 48 倍 (0.102U); 在甲醇培养基当中, AOX1 酶活以及表达量两者相近 (0.12U)。为了排除与野生型相比突变体中 AOX1 酶活较高是由于甘油缺失导致的, 我们对野生型以及突变体培养基当中甘油消耗量以及残存量通过 HPLC 进行测定, 结果表明在甘油培养基当中, 野生型甘油消耗速率平均为 $18\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$, 突变体为 $16\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$; 在甘油与甲醇混合培养基当中, 野生型甘油消耗速率平均为 $16\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$, 突变体为 $15\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ 。即在同一培养基当中突变体与野生型对于甘油的消耗速率相近; 上述结果说明, 甘油转运体的缺失可以在一定程度上解除甘油对于 AOX 的抑制作用, 即甘油转运体可能参与甘油对于 AOX1 抑制途径当中, 但是目前具体的途径尚不清楚。本研究的意义在于对于甘油转运体的确认以及甘油抑制 AOX1 途径的探究可以为以后新型巴斯德毕赤酵母表达系统 (在甘油亦或者是甘油甲醇混合培养基当中可以通过 P_{AOX1} 进行外源蛋白的表达) 的研究奠定了良好的基础。

参考文献

- [1] Koutz P, Davis GR, Stillman C, Barringer K, Cregg J, Thill G. Structural comparison of the *Pichia pastoris* alcohol oxidase genes. *Yeast*. 1989;5(3):167-77. doi: 10.1002/yea.320050306. PubMed PMID: 2660463.
- [2] Staley CA, Huang A, Nattestad M, Oshiro KT, Ray LE, Mulye T, et al. Analysis of the 5' untranslated region (5'UTR) of the alcohol oxidase 1 (AOX1) gene in recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Gene*. 2012;496(2):118-27. doi: 10.1016/j.gene.2012.01.008
10.1016/j.gene.2012.01.006. PubMed PMID: 22285974; PubMed Central PMCID: PMC3464313.

高产泛酸的酿酒酵母菌株的构建

孙杰 魏春 于欣君 汪钊

浙江工业大学生物工程学院, 杭州 310014

摘要: 泛酸 (pantothenic acid), 又称遍多酸或维生素B₅, 在生物体内同腺嘌呤、核糖核酸、磷酸等生物分子组成辅酶A, 参与糖、脂肪、蛋白质及能量的代谢^[1]。动物需要从饮食中获取泛酸。D-泛酸的最大用途是作为饲料添加剂使用。目前的D-泛酸生产方法是使用立体专一性D-泛解酸内酯水解酶水解化学合成的DL-泛解酸内酯, 得到D-泛解酸, 再经过内酯化反应生成D-泛解酸内酯, 之后与 β -丙氨酸钙反应制得D-泛酸钙^[2, 3]。上述方法需要化学合成泛解酸内酯, 并且工艺复杂, 使用有机溶剂导致环境污染。

饲料工业是泛酸最主要的应用领域, 我国是饲料生产大国, 蛋白饲料供应远远不足。酿酒酵母可以补充饲料蛋白, 但是泛酸合成受到培养基中葡萄糖的抑制^[2, 3]。本研究将酿酒酵母泛酸合成途径代谢酶编码基因ECM31、YHR063c、YIL145c、FMS1去除线粒体信号肽编码序列后, 使用overlap PCR方法, 与强启动子GPM1p、TDH3p、TEF1p和PGK1p连接。利用同源序列, 使上述基因在酵母菌体内重组, 并整合在基因组上。在无泛酸培养基中, 根据植物乳杆菌增值的浑浊度, 测定工程菌72小时YPD发酵培养基中的泛酸含量, 达到2g/L。下一步将继续使用该方法增强上游合成途径的基因表达, 进一步提高酿酒酵母泛酸合成能力, 从而提供一个环境友好的饲用泛酸新来源。

参考文献

- [1] Duncan ES, Alessio C, Chris A. Coenzyme biosynthesis: enzyme mechanism, structure and inhibition. *Nat Prod Rep*, 2007, **24**: 1009-1026.
- [2] Kataoka M, Shimizu K, Sakamoto K, et al. Lactonohydrolase-catalyzed optical resolution of pantoyl lactone: selection of a potent enzyme producer and optimization of culture and reaction conditions for practical resolution. *Applied Microbiology and Biotechnology* 1995, **44**: 333-338
- [3] 孙志浩; 过鑫富. 产 D-泛解酸内酯水解酶的微生物及其制备 D-泛解酸的方法: 中国, CN200510123566.4. 2006.06.28
- [4] White WH, Gunyuzlu PL, Toyn JH. *Saccharomyces cerevisiae* is capable of de Novo pantothenic acid biosynthesis involving a novel pathway of beta-alanine production from spermine. *J Biol Chem*. 2001 **6**; **276**(14):10794-10800.

第三篇 墙报

mreB 过表达对门多萨假单胞菌 NK-01 菌体形态及产物的影响

宋存江¹ 范旭¹ 赵风杰¹ 王媛媛¹ 王淑芳²

¹南开大学分子微生物与技术教育部重点实验室天津; ²南开大学生物活性材料教育部重点实验室天津 Tel: 022-23503866; Email:songcj@nankai.edu.cn

摘要: 门多萨假单胞菌 (*Pseudomonas mendocina*) NK-01 为本室分离到的一株假单胞菌, 它可以生产褐藻寡糖和聚羟基脂肪酸酯 (PHA), 并且本室已对其完成了全基因组测序。其中褐藻寡糖具有凝胶性和生物相容性, 在医药和食品领域有广泛的应用; 而 PHA 具有类似于合成塑料的物化特性, 以及合成塑料所不具备的生物可降解性等许多优秀性能, 在可生物降解的组织工程材料、缓释材料等方面有广阔的应用前景。本室致力于研究菌种基因组改造与菌种双产物产量之间的关系。将已测序的 NK-01 基因组经过序列比对后发现, NK-01 中含有四个骨架蛋白基因, 分别为 *mreB*、*minD*、*ftsA* 和 *ftsZ*。其中骨架蛋白 MreB 负责维持棒状细菌细胞形态, 同时参与染色体的分离、确定细胞极性等活动, 但目前尚不清楚骨架蛋白 MreB 与菌体产物产量之间的关系。

本研究将克隆得到的 NK-01 基因组中 *mreB* 基因插入表达质粒 pBBR1MCS2 中, 构建出表达载体 pBBR-*mreB*, 并采用同源重组的方法将表达载体导入 NK-01 基因组中, 实现 *mreB* 基因在基因组中的多拷贝, 通过抗性基因的筛选得到过表达 *mreB* 基因的突变菌株。利用扫描电镜观察发现, 相较于野生型菌株, 突变菌株长度增加 1.51 倍, 宽度增加 1.49 倍, 而长宽比略有减小。利用双产物合成培养基培养后发现, 相较于野生型菌株, 突变菌株的胞外褐藻寡糖产量明显升高至 0.96g/L, 达到了野生菌株的 5.86 倍, 但同时 PHA 产量却有所下降。

在高温下同步利用葡萄糖和木糖同时生产乙醇与木糖醇的工程酵母的构建与应用

张标 张佳 王冬梅 洪洞*

中国科学技术大学生命科学学院, 合肥 230026

摘要: 葡萄糖和木糖为木质纤维素水解后产物中最多的两种糖类。由于酵母中葡萄糖抑制效应的存在以及利用木糖发酵的能力较差, 使得水解液中木糖往往难以被充分利用。构建能够同步利用木糖和葡萄糖的菌株会大幅度地提高木质纤维素水解产物的利用效率[1]。并且, 由于木糖醇有着比乙醇更高的附加值, 将葡萄糖转化成乙醇的同时将木糖转化成木糖醇可以使对木质纤维素的利用更有经济性。本研究在之前构建的木糖醇高产耐热酵母菌株 *Kluyveromyces marxianus* YZJ015[2]的基础上进一步进行改造, 构建了在高温下同步利用葡萄糖和木糖同时生产乙醇与木糖醇的耐高温工程酵母。主要改造策略包括过表达木糖特异的转运蛋白基因以促进对木糖的利用, 敲除 3-磷酸甘油脱氢酶基因以降低副产物积累, 过表达葡萄糖-6-磷酸脱氢酶基因以改善辅酶供给。结果显示木糖特异的转运蛋白 ScGAL2-N376F 突变体可以大幅度提高葡萄糖和木糖的同步利用; 3-磷酸甘油脱氢酶基因的敲除可以显著降低副产物甘油和乙酸的积累, 但是菌的生产速率、乙醇和木糖醇的产率都有所下降; 过表达葡萄糖-6-磷酸脱氢酶基因反而使发酵全面下降。最终获得的 *K. marxianus* YZJ119 在 42℃ 同步利用 80 g/L 葡萄糖和 40 g/L 木糖 产生 40.43 g/L 木糖醇和 34.66 g/L 乙醇。然后将 YZJ119 菌株应用到酸处理的玉米芯的同步糖化与共发酵 (SSCF) 上。在 42℃, 利用脱毒的酸处理玉米芯生产达到了 32.03 g/L 木糖醇和 44.58 g/L 乙醇, 同时对产物分析发现, 该菌株能够降解糠醛及 5-羟甲基糠醛。于是, 采用未脱毒的酸处理玉米芯进行了发酵, 生产了 31.72 g/L 木糖醇和 29.82 g/L 乙醇。本研究实现采用单一工程菌利用未脱毒的酸处理玉米芯同时生产木糖醇和乙醇。本研究的结果可以促进能够利用木质纤维素进行化学品高效生产的耐高温代谢工程平台的构建。

参考文献

- [1] Latimer, L. N., Lee M. E., Medina-Cleghorn D., et al., *Metabolic Engineering*, 2014, **25**: 20-29.
- [2] Zhang, J., Zhang B., Wang D.M., et al., *Bioresource Technology* 2014, **152**: 192-201.

响应面法对威兰胶发酵体系 pH 优化

李华山 董淑浩

南京工业大学生物与制药工程学院

摘要：威兰胶(welan gum)是由某些鞘胺醇单胞杆菌合成的微生物胞外多糖。易溶于水，其水溶液具有独特的流变学性质和良好的增粘、耐酸碱性。随着威兰胶发酵合成时间的推移，整个发酵体系的pH会显著降低。pH的变化对发酵菌株产威兰胶有着重要的影响。前人研究表明当pH控制在7.0时更有利于胞外多糖威兰胶的生产。

本研究通过响应面法对发酵体系pH进行优化。对发酵温度、磷酸氢二钾、磷酸二氢钾进行三水平三因素优化。优化结果表明:磷酸氢二钾和磷酸二氢钾的添加量分别为: 4.07g/kg, 1.05 g/kg, 发酵温度为 30.5℃时发酵体系pH能有效地控制在 6.9 ± 0.3 。模拟出的威兰胶的产量24.6 g/L。实际摇瓶发酵威兰胶的产量达到了25.2g/L。响应面法优化结果与实际发酵产量相一致，因此响应面法优化培养基是一种简单可靠的途径，为后续实验提供了理论依据。

参考文献

- [1] Kawase, Moo-Young M, et al. Mixing time of bioreactors. J Chem TechBiotechnol, 1989, **44**(1): 63-75.
- [2] Xu HM, Zhao L, Wu H, et al. Experimental research on The new foam drilling fluid system. Adv. Mater, 2013, **28**(57): 781-784.
- [3] V.D.Prajapati, G.K.Jani, B.S.Zala, et al. An insight into the emerging exopolysaccharide gellan gum as a novel polymer. Carbohydr. Polym, 2013, **92**(54): 670-678.
- [4] Li H, Xu H, Li S, et al. Effects of dissolved oxygen and shear stress on the synthesis and molecular weight of welan gum produced from *Alcaligenes* sp. CGMCC2428. Process Biochemistry, 2011, **46**(11): 1172-1178
- [5] Jansson. P. E, Widmalm. G. Welan gum (S-130) contains repeating units with randomly distributed L-mannosyl and L-rhamnosyl terminal groups, as determined by FABMS [J]. Carbohydr. Res. 1994, **256**(2): 327-330.
- [6] 张太平, 磷酸盐缓冲溶液($\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$)pH计算公式及其应用. 高等函授学报(自然科学版). 2001, **14** (2) : 25-26.
- [7] 李 莎, 徐 虹, 石宁宁, 微生物聚多糖PS-238合成条件的研究. 食品与发酵工业. 2004, **30**(12): 6-9.

产蛋氨酸的大肠杆菌工程菌株的构建

李华 石贵阳

江南大学生物工程学院，无锡 214122

摘要：作为禽类第一限制性必需氨基酸，蛋氨酸是动物饲料里一种必不可少的添加剂；在医药工业中，蛋氨酸是氨基酸输液和复合氨基酸的主要成分之一。目前蛋氨酸的主要生产方式是化工法合成法如海因法和氰醇法，但是化工合成属高能耗、高污染行业。由于传统诱变育种在选育高产蛋氨酸生产菌株尚未有成功的案例，近年来，研究开始集中在通过代谢工程手段改造大肠杆菌和谷氨酸棒状杆菌生产蛋氨酸。本研究通过对大肠杆菌蛋氨酸合成途径的理性改造，构建了一株能发酵葡萄糖生产蛋氨酸的工程菌株。首先，我们敲除了大肠杆菌基因组上 *lysA* 和 *thrBC* 基因，以阻断蛋氨酸碳代谢竞争途径。另外敲除了大肠杆菌基因组上 *metJ* 基因，以解除阻遏蛋白 MetJ 对蛋氨酸合成途径的负调控。构建了 *lysA*、*thrBC*、*metJ* 基因缺失重组菌 E.coli M4。通过实验我们证实天冬氨酸半醛脱氢酶是蛋氨酸碳骨架合成的限速酶。在 M4 中过量表达 *thrA* 基因和抗蛋氨酸反馈调节的 *metA^{Fbr}* 基因，摇瓶发酵显示，发酵 48 h 胞外可积累 0.21 g/L 的蛋氨酸。而通过 15-L 发酵罐培养，蛋氨酸的最大产量为 1.27 g/L。

参考文献

- [1] WILLKE T. Appl Microbiol Biotechnol, 2014, **98**(24), 9893-9914.
- [2] 党万利, 金利群, 郑裕国等, 食品与发酵工业, 2012, **38**(004), 152-158.
- [3] KROMER J O, WITTMANN C, SCHRODER H, et al. Metab Eng, 2006, **8**(4), 353-369.
- [4] GOMES J, KUMAR D. Enzyme and microbial technology, 2005, **37**(1), 3-18.
- [5] DATSENKO K A, WANNER B L. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000, **97**(12), 6640-6645.

一株产 γ -聚谷氨酸的非谷氨酸依赖型高产菌株筛选

邱益彬 沙媛媛 徐虹

南京工业大学材料化学工程国家重点实验室, 南京 210009;

南京工业大学食品与轻工学院, 南京 210009

摘要: γ -聚谷氨酸(Poly γ -glutamic acid, γ -PGA)是一种由微生物大量合成的胞外氨基酸聚合物, 它是由 L-型或 D-型谷氨酸通过 γ -酰胺键聚合而成的均聚氨基酸^[1], 是一种水溶性很好的可生物降解的新型高分子材料。目前, γ -PGA 已经被广泛应用于化妆品、医疗保健、食品添加剂等领域。由于其具有较强的离子螯合能力、生物可降解性及环境友好性等特点, 在农业生产上也表现出了巨大的应用潜力和广阔的应用前景^[2]。目前大多数用于 γ -PGA 工业化生产的菌株都属于谷氨酸依赖型菌株, 即在培养基中需加入大量的谷氨酸作为底物且利用率很低, 大大增加了生产成本。

为了更好的研究 γ -PGA 生物合成的分子机制以及构建 γ -PGA 合成不依赖谷氨酸的高产菌株, 本文从谷氨酸非依赖型菌株的筛选出发, 从豆制品中分离得到一株不依赖谷氨酸作为发酵底物的菌株 NX-2S, 通过形态、生理生化试验和遗传学研究, 鉴定 NX-2S 为解淀粉芽胞杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)。在以蔗糖为碳源, 氯化铵为氮源, 32℃震荡培养 48h, γ -PGA 的产量可达 5g/L。

参考文献

[1] Shih Ing-Lung, Van Yi-Tsong, et al, Bioresource Technol, 2001, **79**: 207-225

[2] Xu Z., Wan Ch., Xu X., Feng X., Xu H, et al, J Soil Sci Plant Nut, 2002, **13**: 774-775

通过弱化细胞壁和增加细胞膜流动性的方法提高谷氨酸棒杆菌的电转化效率

阮伊丽 朱林江 李崎

江南大学生物工程学院, 无锡 214122

摘要: 一种基于电转化的方法进一步提高了外源质粒 DNA 和单链 DNA 在谷氨酸棒杆菌中的转化效率。筛选出一种半复合的高渗培养基, 里面添加了甘氨酸和 DL-苏氨酸弱化细胞壁, 以及吐温 80 增加细胞壁的流动性, 这些组分的优化都通过响应面设计进行。对细胞不同的生长状态, 电转化缓冲液和转化方法这些方面都进行了优化。短暂的热激会抑制宿主限制性酶, 这表明热激对转化有很重要的影响。经优化后, 最终得到转化质粒 DNA 的效率为 $3.57 \pm 0.13 \times 10^7$ cfu/ μ g, 转化单链 DNA 的效率为每 10^9 个活细胞中有 1.05×10^6 个抗性转化子, 这对于谷氨酸棒杆菌的基因组编辑和功能性基因组学的应用具有指导作用。

参考文献

- [1] Davidson LA, Takayama K, Isoniazid inhibition of the synthesis of monounsaturated long-chain fatty acids in *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra, *Antimicrob Agents Chemother*, 1979, **16**:104.
- [2] Kortmann M, Kuhl V, Klaffl S, Bott M, A chromosomally encoded T7 RNA polymerase-dependent gene expression system for *Corynebacterium glutamicum*: construction and comparative evaluation at the single-cell level, *Microb Biotechnol*, 2014, **8**:253-265.
- [3] Krylov AA, Kolontaevsky EE, Mashko SV, Oligonucleotide recombination in corynebacteria without the expression of exogenous recombinases, *J Microbiol Methods*, 2014, **105**:109-115.
- [4] Pátek M, Holátko J, Busche T, Kalinowski J, Nešvera J, *Corynebacterium glutamicum* promoters: a practical approach, *Microb Biotechnol*, 2013, **6**:103-117.
- [5] Wang Y, Weng J, Waseem R, Yin X, Zhang R, Shen Q, *Bacillus subtilis* genome editing using ssDNA with short homology regions, *Nucleic Acids Res*, 2012, doi: 10.1093/nar/gks248.
- [6] Xu G, Jin X, Guo W, Dou W, Zhang X, Xu Z, Characterization, modification, and overexpression of 3-phosphoglycerate dehydrogenase in *Corynebacterium glutamicum* for enhancing L-serine production, *Ann Microbiol*, 2014, **65**:929-935.
- [7] Zhang G, Bao P, Zhang Y, Deng A, Chen N, Wen T, Enhancing electro-transformation competency of recalcitrant *Bacillus amyloliquefaciens* by combining cell-wall weakening and cell-membrane fluidity disturbing, *Anal Biochem*, 2011, **409**:130-137.

全局调控工程提高工业酿酒酵母糠醛耐受性的研究

罗平 屈春云 王菊芳*

华南理工大学生物科学与工程学院, 广州番禺大学城 510006

摘要: 糠醛是木质纤维素材料水解过程中产生的主要抑制物之一, 提高工业酿酒酵母糠醛耐受性是有效利用这类廉价底物发酵产乙醇的关键。然而酿酒酵母的糠醛耐受性受多基因调控, 依靠传统的单基因改造技术难以得到预期效果。*irrE* 是耐辐射异常球菌属中编码全局调控因子 PprI 的基因, 在本研究中将其起始密码子更换成真核生物通用的起始密码子 ATG, 随后进行 3 轮连续易错 PCR 突变, 电转进入工业酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* AS2.489 中, 经大规模筛选后得到一株糠醛耐受性表现优异的突变株并命名为 FR。在 200g/L 葡萄糖和 3.5g/L 糠醛组合条件下处理 2h, 对照组胞内总活性氧(ROS)水平发现是 FR 突变株的 2.71 倍。该菌株在葡萄糖/糠醛不同组合压力的耐性测试下, 生长延滞期比对照组缩短 10-40h。在 200g/L 葡萄糖和 2.0g/L 糠醛组合条件下, 发酵周期比对照组缩短 24h, 两组乙醇产量相差不大(分别为 89.63g/L 和 88.12g/L), 但乙醇产率分别为 1.179g/L/h、0.899 g/L/h。本研究通过对工业酿酒酵母糠醛耐受表型和机理的初步探讨, 为木质纤维素发酵产乙醇提供了可工业化生产的菌株; 同时也表明一些原核生物的调控因子可以应用于真核生物某些性状的调控, 为类似的研究和应用提供了良好的思路。

参考文献

- [1] Hua Y, Narumi I, Gao G, et al, *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, **306**, 354-360.
- [2] LiBZ, Yuan YJ, *Appl Microbiol Biotechnol*, 2010, **86** (6), 1925-1924.
- [3] Liu ZL, Ma M, Song M, *Mol Genet Genomics*, 2009, **282** (3), 233-244.
- [4] Palmqvist E, Hahn-Hägerdal B, *Bioresour Technol* 2000, **74**, 25-33.

嗜极微生物中热激蛋白改善 *Clostridium acetobutylicum* ATCC824 丁醇耐受性的研究

廖正平 黄晓燕 王菊芳*

华南理工大学生物科学与工程学院, 广州番禺大学城, 510006

摘要: 随着原油价格不断上涨, 环境问题不断恶化, 具有可持续发展、清洁环保等优势的生物能源越来越受到重视。目前, 丁醇被认为是最具发展前景的生物燃料, 其主要通过 ABE 发酵生产, 然而 ABE 发酵遇到的最大瓶颈就是丁醇对细胞的毒性使其产量只能维持在 15-18g/L。因此, 提高菌种对丁醇的耐受性迫在眉睫。本研究将来自耐辐射球菌 *Deinococcus wulumuqiensis* R12 的 *groESL* 和 *Dnak* 基因分别在 *Clostridium acetobutylicum* ATCC824 中过表达, 结果显示工程菌株 *C. acetobutylicum* ATCC824(*groESL*) 和 *C. acetobutylicum* ATCC824(*Dnak*) 在丁醇耐受性方面较野生菌均有显著提高。同时, 在 50g/L 葡萄糖发酵测试中, ATCC824(*Dnak*) 的丁醇产量达到 11.6g/L, 是野生菌的 2.34 倍, 并且在发酵 42 小时后基本将底物葡萄糖完全耗尽。本研究为提高 *C. acetobutylicum* ATCC824 丁醇耐受性和丁醇产量提供了新思路。

参考文献

- [1] Luan G., Dong H., Zhang T., et al, J Biotechnol, 2014, **178**, 38–40.
- [2] Tomas CA, Papoutsakis ET, J Biotechnol, 2004, **186**(7), 2006-2018.
- [3] Tomas CA, Welker NE, Papoutsakis ET, Appl Environ Microb, 2003, **69**(8), 4951-4965.
- [4] Xu M., Zhao J., Yang ST., et al., Appl Microbiol Biotechnol, 2015, **99**, 1011–1022.

基于发酵和双气旋收集的虫生真菌孢子产量系统优化

王鹏 刘红霞 赵根海 刘会 王丽 王晗 吴荷芳 孙孝娟 尉鸿飞

中国科学院合肥科学研究院技术生物与农业工程研究所，合肥 230001

摘要：本研究对发酵过程中的培养基和培养条件进行了优化，以提高虫生孢子产量。在培养过程中，采用了“梯度湿度”的培养方法，即在菌株生长的不同时期采用不同的梯度。对虫生真菌 Bb3088 来说，发酵时间在 1-4d 时，湿度设置为 95-100%，5-6d 时，湿度为 80%，7d 时，湿度为 60%，孢子的产量达到最大值。对虫生真菌 Ma2677 来说，最佳湿度为，发酵时间在 1-7d 时，湿度设置为 95-100%，8-11d 时，湿度为 80%，12-13d 时，湿度为 60%。这可能是因为，在发酵前期，高的湿度用于菌体的生长，发酵中期时，降低湿度用于产孢，在发酵后期，采用较低的湿度来结束产孢子。虫生真菌 Bb3088 和虫生真菌 Ma2677 的孢子产量达到 11.2 mg/g 和 24.5 mg/g，比优化前分别提高了 72.31% 和 52.17%。固体发酵产生孢子以后，孢子、菌丝以及培养基混合在一起，难以分离。传统的方法不但耗时比较长，孢子的收率比较低，而且收到的孢子经常和菌丝混合在一起，纯度不高。为了得到高纯度的孢子，我们对孢子的收集方式进行了研究，采用双气旋法作为最优的孢子收集方法。并对影响孢子产量的三个因素进行响应面优化。这三个因素分别是：基质高度与装料桶高度比、收集时间、物料干燥时间。得到最优的基质高度与装料桶高度比(A)、收集时间(B)、物料干燥时间(C)分别为 18%、4 min 和 44 h。在优化状态下，虫生真菌 Bb3088 最大的估计值为 20.9 mg/g，比优化前提高了 221.5%。利用双气旋装置，采用最优的收集参数，对虫生真菌 Ma2677 孢子进行验证收集，得到最大的孢子产量为 42.2 mg/g，比优化前总共提高了 162.1%。为了验证收集孢子的纯净度，对虫生真菌 Bb3088 和虫生真菌 Ma2677 的孢子形态进行了宏观和微观的观察，发现所收集到的虫生真菌 Bb3088 和虫生真菌 Ma2677 孢子粉直观表现类似细腻的滑石粉状粉末，不含菌丝和杂质，非常的纯净。

Efficient Biocatalytic Reduction of Ethyl Acetoacetate with Recombinant *Escherichia coli* cells in an ionic liquid containing system

Jing Hou Liping Zhang Jin Huang Pu Wang*
College of Pharmaceutical Science, Zhejiang University of Technology,
Hangzhou 310032 * Email: wangpu@zjut.edu.cn

Asymmetric reduction of prochiral carbonyl compounds is an effective approach for the preparation of chiral alcohols by microbial whole cells with highly stereoselectivity. In our previous study, a recombinant *E. coli* was successfully constructed and applied for the bioreduction of some prochiral carbonyl compounds with excellent anti-Prelog stereoselectivity^[1-3]. (R)-ethyl-3-hydroxybutyrate ((R)-EHB) is a key chiral intermediate for the synthesis of L-carnitine, imipenem and other carbapenems chiral drugs. Several studies have reported so far to carry out the biocatalytic asymmetric reduction of ethyl acetoacetate (EAA) to (R)-EHB^[4].

In the present study, the optimization of fermentation medium for the bioreduction of EAA with recombinant *Escherichia coli* cells was carried out. The obtained optimized medium was composed of: maltose 15 g/L, peptone 10 g/L, yeast extract 10 g/L, NaCl 10 g/L, FeCl₃ 0.01g/L, KH₂PO₄ 0.15 g/L, ZnSO₄ • 7H₂O 0.1 g/L, with the maximum enzyme activity of 1276 U/L. A best yield of 93.7 % with above 99.0% of product e.e. was obtained at 1500 mM of substrate concentration. Furthermore, a [N1,1,1,1][Cys]-containing system was successfully constructed and applied in the asymmetric reduction of EAA to (R)-EHB, the substrate concentration was further improved to 2500 mM, the yield and the product e.e. reached 91 % and > 99.0%, respectively, which are much higher than the previously reported.

Acknowledgements

This work was supported by grants from the National Natural Science Foundation of China (No. 21076193), and the Program of Science and Technology of Zhejiang Province, China (No. 2014C33274).

References

- [1] NQ Wang, J Huang, HD Luo, P Wang*, J Li. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. 2013, **92**: 1-6.
- [2] NQ Wang, J Sun, J Huang, P Wang*. Applied Microbiology and Biotechnology. 2014, **98**: 8591-8601.
- [3] NQ Wang, J Li, J Sun, J Huang, P Wang*. Biochemical Engineering Journal. 2015, **101**: 119-125.
- [4] JY He, LM Zhou, P Wang*, L Zu.. Process Biochemistry. 2009, **44**: 316-321.

以甘油为底物发酵生产一种新型黄原胶

王子朝¹ 吴剑荣¹ 郑志永¹ 高敏杰¹ 朱莉² 詹晓北^{1*}

¹江南大学生物工程学院生化工程与生物反应器研究室, 江苏无锡 214122; ²江苏瑞光生物科技有限公司, 江苏无锡 214122; *通讯作者, E-mail: xbzhan@yahoo.com

摘要:以野油菜黄单胞菌(*Xanthomonas campestris*) NK-01^[1]为出发菌株, 经过两年时间的诱变、筛选和以甘油为唯一碳源的驯化, 得到一株可以利用甘油发酵生产黄原胶的野油菜黄单胞菌突变株, 命名为 WXLB-006。NK-01 以蔗糖为碳源发酵得到的黄原胶称为 NK-01-XG, WXLB-006 以甘油为碳源发酵得到一种新型黄原胶, 命名为 WXLB-006-XG。qRT-PCR 结果显示: WXLB-006 中与黄原胶合成相关的甘油通道蛋白(glpF)、甘油激酶(glpK)、甘油-3-磷酸脱氢酶(glpD)和果糖-1,6-二磷酸激酶(fbp)四个主要基因与 NK-01 相比, 分别提高了 3.36、3.05、4.75 和 2.53 倍。WXLB-006-XG 的平均分子量 $M_w=3.0 \times 10^6$ Da, 是 NK-01-XG 平均分子量($M_w=5.8 \times 10^6$ Da)的一半左右, 10g/L 的 WXLB-006-XG 水溶液在 6 rpm 的剪切速率下表观粘度为 1800 Pa.s, 是同等条件下 NK-01-XG 水溶液表观粘度(10800 Pa.s)的六分之一。两种黄原胶冻干样品的扫描电子显微镜结果显示: WXLB-006-XG 的双螺旋较细且结构松散, 而 NK-01-XG 形成的棒状双螺旋较粗且结构紧密。两者在形成水溶液时, WXLB-006-XG 的水化速率明显快于 NK-01-XG, 且 WXLB-006-XG 形成分散均匀、没有鱼眼状胶团的均一胶溶液^[2]。

黄原胶的年产量接近20万吨, 绝大部分用于石油开采, 只有少量用于食品等其他行业。黄原胶在食品中的应用主要是作为增稠剂、乳化剂和悬浮剂^[3]。虽然已报道过黄原胶具有抗肿瘤、抗氧化的功能, 并且对肥胖、糖尿病、心脑血管疾病等“文明病”有很好的预防和治疗功效, 但是由于黄原胶形成的水溶液粘度高, 使其在食品中的添加量有限, 限制了其生理功能的发挥。因此, 国内外对黄原胶生理功能的研究和报道很少。在形成水溶液时的低粘度可以增加新型黄原胶 WXLB-006-XG 在食品中的添加量, 使其生理功能得到很好的发挥, 本研究结果一方面拓宽了黄原胶的应用领域, 为黄原胶开拓了新市场; 另一方面可以为黄原胶企业多元化发展提供一定的指导, 使企业在原有设备和技术的条件下, 实现新型黄原胶的生产, 避免遭受国际油价不稳定对黄原胶企业造成的冲击。WXLB-006-XG速溶且均匀分散的特性, 使其在食品加工时投料能够被充分利用, 避免原料的浪费; 其次, 有助于减少加工时间, 增加生产批次, 提高产量; 最后, 可以降低设备投资和搅拌时动力消耗, 从而降低加工成本。同时, 还可以减少机械搅拌对食品的品质和口感造成的破坏。

关键词:野油菜黄单胞菌; 突变株; 甘油代谢; 新型黄原胶

参考文献

- [1] 李时岩等, 微生物学通报, 1993, **20** (5), 278-282.
- [2] Sereno N M., Hill S E., Mitchell J R., Carbohydrate research, 2007, **342**(10), 1333-1342.
- [3] Palaniraj A., Jayaraman V., Journal of Food Engineering, 2011, **106**(1), 1-12.

构建 *DUR1,2* 基因高表达的工业黄酒酵母工程菌减少黄酒中氨基甲酸乙酯的形成

吴殿辉 李晓敏 陆健 陈坚 张梁 谢广发

江南大学生物工程学院, 无锡 214122

摘要: 氨基甲酸乙酯(ethyl carbamate, EC)是一种普遍存在于传统发酵食品(酱油、食醋、泡菜、腐乳等)和酒精饮料(葡萄酒、中国黄酒、日本清酒等)中的潜在致癌性物质。尿素和乙醇是黄酒中 EC 的主要前体物,在黄酒发酵过程中,酵母代谢精氨酸生成的尿素一部分被脲基酰胺酶降解,另一部分会被直接分泌到胞外与发酵液中的乙醇反应形成 EC。本研究以野生型工业黄酒酵母 N85 为出发菌株,通过代谢工程改造获得了 *DUR1,2* 基因(编码脲基酰胺酶)高表达的两株工程菌 N85^{*DUR1,2*} 和 N85^{*DUR1,2*}-c,通过促进发酵液中尿素的降解来降低黄酒中 EC 的含量。与亲本菌株相比, N85^{*DUR1,2*} 和 N85^{*DUR1,2*}-c 使黄酒发酵液中 EC 的含量分别降低了 49.1%和 55.3%。此外,工程菌的生长能力和发酵特性与亲本菌株也无明显差异,且遗传稳定性好。而酵母菌株在代谢改造过程中无外源基因的引入,保证了酵母工程菌的生物安全性,具有工业化应用的潜在可行性,从而提高成品黄酒的安全性。

参考文献

- [1] Coulon J, Husnik JI, Inglis DL, et al, American Journal of Enology and Viticulture ,2006, **57**: 113-124.
- [2] Dahabieh MS, Husnik JI & Van Vuuren HJJ, Journal of Applied Microbiology, 2010,**109**: 963-973.
- [3] Hofman-Bang J, Molecular biotechnology, 1999, **12**: 35-71.
- [4] Jiao ZH, Dong YC & Chen QH, Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2014, **13**: 611-626.
- [5] Liu YP, Dong B, Qin ZS, et al, Food Additives & Contaminants Part B-Surveillance, 2011, **4**: 1-5.

重金属胁迫下生物转化脱脂蚕蛹生产酵母油脂条件的优化及基因改造策略

史馨怡¹ 徐晓慧¹ 金传琪¹ 刘兆欣¹ 王俊^{1,2*}

¹江苏科技大学生物技术学院, 镇江 212018; ²中国农业科学院蚕业研究所, 镇江 212018

摘要: 在产油酵母 *Yarrowia lipolytica* W29 利用蚕蛹蛋白水解液来生产微生物油脂的过程中, 微生物细胞会面临多种不利于生物生长的胁迫作用, 包括酸胁迫、渗透压胁迫以及温度胁迫[1]。蚕取食桑叶后摄入各类金属离子残留在其水解液组成的培养基中, 对产油酵母的生长造成影响[2]。微生物油脂生物合成中的众多关键酶如苹果酸酶(Malicenzyme, ME)、异柠檬酸脱氢酶(Isocitrate dehydrogenase, ICDH)和柠檬酸裂解酶(ATP:Citrate lyase, ACL)等都是金属离子依赖性酶 [3, 4]。这些胁迫诱导的基因调节作用, 可能影响细胞的重要生理功能, 从而影响生物转化生成油脂的效率。

对出发菌株 *Y. lipolytica* W29 的发酵培养基添加不同浓度的 Mn^{2+} (2, 4, 6, 8 和 10 mg/L)、 Cu^{2+} (2, 4, 6, 8 和 10 mg/L)、 Zn^{2+} (2, 4, 6, 8 和 10 mg/L) 及 Co^{2+} (5, 10, 15, 20, 25), 在摇瓶发酵的水平上优化和考察 4 种重金属离子对 *Y. lipolytica* W29 的影响。在优化金属离子浓度下(Mn^{2+} 8 mg/L, Cu^{2+} 4 mg/L, Zn^{2+} 6 mg/L 和 Co^{2+} 10 mg/L), 菌体油脂含量显著提高, 油脂得率比空白组都提高 10%以上。

借助高通量的检测手段, 化学诱变培养于添加有过量金属离子的选择性培养基上的 *Y. lipolytica* W29, 可以快速有效地从由诱变过的突变群体中筛选出据有高产微生物油脂的表现型, 然后以多轮递归原生质体融合的方式使众多基因随机重组, 最终从获得的突变株库中筛选出抗性显著升高的突变株[5]。应用反向生理功能工程, 快速找出突变表型所对应的某个基因型或多个基因型, 通过构建相应的缺失突变株, 证实这些突变株对金属离子的存在敏感性增加, 表明有可能通过过量表达这些基因来减轻重金属离子对细胞的毒害。最后把鉴定出的目标基因导入 *Y. lipolytica* 中, 使目标菌株获得所希望的理想表型。筛选出的具有重金属抗性的突变菌株, 拓宽了 *Y. lipolytica* 利用各种来源底物的能力, 为该类酵母菌用作微生物油脂生产的细胞工厂提供了一个良好的平台。

参考文献

- [1] Jayakody L N, Kadowaki M, Tsuge K, et al. Applied microbiology and biotechnology, 2015, **99**(1), 501-515.
- [2] 徐宁, 俞燕芳, 毛平生, 等. 农学学报, 2015, **5**(1), 37-40.
- [3] Beopoulos A, Cescut J, Haddouche R, et al. Progress in lipid research, 2009, **48**(6): 375-387.
- [4] Jin M, Slininger P J, Dien B S, et al. Trends in biotechnology, 2015, **33**(1), 43-54.
- [5] 付瑞燕, 李寅. 生物工程学报, 2010, **26**(9), 1209-1217.

毕赤酵母中重组猪溶菌酶基因表达的密码子优化策略比较

朱德伟 蔡国林 陆健

江南大学生物工程学院, 无锡 214122

摘要: 猪溶菌酶在溶菌酶的进化史上处于非常重要的地位, 它是猪体内免疫系统的重要组成部分, 其体外生产可以解决其他溶菌酶用于猪体内的抗原性问题。然而在养殖业规模不断扩大的今天, 尤其是在饲用抗生素逐渐受限的形势下, 猪溶菌酶的体外生产还罕见报道。本研究利用毕赤酵母表达系统 (*Pichia pastoris* X-33 和质粒 pPICZαA), 对猪溶菌酶基因进行外源表达; 且为了提高其表达效率, 对其编码基因进行了密码子优化。在大肠杆菌表达系统中, 有两种最常用的密码子优化方法——“一对一优化”和“随机优化”; 而在毕赤酵母系统中, 前者基本没有报道。本文对此两种方法在猪溶菌酶基因的优化效果方面进行了比较。

结果显示, 在摇瓶发酵水平, 经过 1% 的甲醇诱导表达 5 天后, 猪溶菌酶在两种情况下的最高表达水平分别为 153.33 ± 10.41 和 538.33 ± 15.18 U/mL, 其蛋白表达量为 80.03 ± 1.94 和 239.60 ± 4.16 mg/L。与野生型基因 (表达水平 178.33 ± 7.64 U/mL, 89.97 ± 2.90 mg/L) 相比, 经“随机优化”策略优化的重组菌表达量提高了 2.6 倍, 显示了该方法的优越性; 而经第一种方法优化后的表达水平并没有明显变化。在总的分泌蛋白中, 野生型基因以及两种方法优化后的基因对应的目的蛋白分别占到 $75.06 \pm 0.25\%$, $74.56 \pm 0.14\%$ 和 $79.00 \pm 0.14\%$, 这对其后续的分选纯化是有利的。利用亲和层析对重组猪溶菌酶进行了分离纯化, 并对纯化得到的目的蛋白进行酶学性质的研究, 结果发现其分子量 (18kD) 较天然猪溶菌酶 (14.4kD) 稍大, 主要是因为表达质粒上带的 His-tag 纯化标签所致, 但这并不影响其酶活性。此外, 其最适温度 (35℃) 和最适 pH (6.0) 与天然猪溶菌酶的性质 (最适温度和 pH 分别为 37℃ 和 6.0) 基本一致。这对后续继续提高其产量与规模化生产猪溶菌酶奠定了理论基础。

参考文献

- [1] Callewaert, L., Michiels, C.W., *J. Biosci.*, 2010, **35**(1): 127-160.
- [2] Palmieri, C., Brunetti, M. and Salda, L.D., *Res. Vet. Sci.*, 2007, **83**: 109-115.
- [3] Gao, M., Shi, Z., *Chin. J. Chem. Eng.*, 2013, **21**(2): 216-226.
- [4] Sinclair, G., Choy, F.Y.M., *Protein Expr. Purif.*, 2002, **26**: 96-105.
- [5] Menzella, H.G., *Microb. Cell Fact.*, 2011, **10**(15): 1-8.
- [6] Tang, W., Zhang, J., Wang, Z. et.al., *Zhi Wu Sheng Li Xue Bao*, 2000, **26**(1): 64-68.
- [7] Bradford, M.M., *Anal. Biochem.*, 1976, **72**: 248- 254.
- [8] Teng, D., Fan, Y., Yang, Y., et.al., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2007, **7**: 1074-1083.
- [9] Potvin, G., Ahmad, A. and Zhang, Z., *Biochem. Eng. J.*, 2012, **64**: 91-105.

第四篇 其他报告

一株产灵菌红素粘质沙雷氏菌发酵条件的优化

张德伟 王洲 苏艳楠 何阳登 张国锋 薛正莲*

安徽工程大学生物与化学工程学院, 芜湖 241000

摘要: 为提高灵菌红素产量, 对发酵产灵菌红素的条件进行优化。首先对发酵条件进行了单因素优化, 在单因素优化的基础上在进行 Box-Behnken 中心组合试验和响应面分析, 确定了摇瓶发酵产灵菌红素的最佳条件: 甘油 32ml/L, 胰蛋白胨 17 g/L, 甘氨酸 1.5 g/L, NaCl 5g/L, 发酵温度 28 °C, 转速 210rpm, 装液量 30 mL/250 mL, 接种量 4%, 初始 pH5.0。在最佳条件下, 灵菌红素的产量为 3.285g/L $\pm$ 0.0257 g/L, 较优化前的 1.957 g/L 提高了 40.43%, 与单因素优化的产量 2.950g/L 相比, 提高了 10.2%。

参考文献

- [1] Fender J E, Bender C M, Stella N A, et al. *Serratia marcescens* quinoprotein glucose dehydrogenase activity mediates medium acidification and inhibition of prodigiosin production by glucose [J]. Applied and environmental Microbiology, 2012, **78**(17):6225-6235.
- [2] Venil C K, Lakshmanaperumalsamy P. Application of statistical design to the optimization of culture medium for prodigiosin production by *Serratia marcescens* SWML08 [J]. Malaysian Journal of Microbiology, 2009, **5**(1):55-61.
- [3] 布佐日古丽 喀迪尔, 古丽祖热 佐努尼, 吾甫尔 米吉提, 新疆块根芍药内生菌 XJU-PA-6 产灵菌红素发酵条件的优化 [J].安徽农业科学,2015, **43**(18):26-28, 36.
- [4] Kim S J, Lee H K, Lee Y K. et al. Mutant selection of *hahella chejuensis* KCTC 2396 and statistical optimization of medium components for prodigiosin yield-up [J]. Journal of microbiology, 2008, **46**(2):183-188.

响应面法优化疏螺旋体素发酵培养基

周剑¹ 陈宏² 杨煌建¹ 方东升¹ 张引¹ 张欣¹ 郑卫^{1*}

¹福建省微生物研究所, 福州 350007; ²福建省中医药研究院, 福州 350003

摘要: 目的: 提高链霉菌 BOR-0331 发酵液中的生物活性成分疏螺旋体素 (borrelidin) 含量。方法: 采用单因素实验、Plackett-Burman 实验、最陡爬坡试验、中心组合设计实验等方法优化发酵培养基组成及比例。结果: 当黄豆饼粉 2.4%, 甘露醇 3.2%, 可溶性淀粉 1.8 甘油 0.7% 氯化钠 0.1 时, 效价最高。较原始培养基提高%。结论: 经过发酵培养基优化, 效价从 2.2mg/L 提升至 35.3mg/L, 提高了 1504%。

关键词: 发酵; 培养基优化; 疏螺旋体素; 响应面法; 中心组合设计

参考文献

- [1] Berger J, Jampolsky L M, Goldberg M W. Borrelidin, a new antibiotic with antiborrelia activity and penicillin enhancement properties [J]. Arch Biochem, 1949, **22**(3): 476-8.
- [2] Lumb M, Macey P E, Spyvee J, et al. Isolation of vivomycin and borrelidin, two antibiotics with anti-viral activity, from a species of Streptomyces (C2989) [J]. Nature, 1965, **206**(981): 263-5.
- [3] Sugawara A, Tanaka T, Hirose T, et al. Borrelidin analogues with antimalarial activity: design, synthesis and biological evaluation against Plasmodium falciparum parasites [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2013, **23**(8): 2302-5.
- [4] Otoguro K, Ui H, Ishiyama A, et al. In vitro and in vivo antimalarial activities of a non-glycosidic 18-membered macrolide antibiotic, borrelidin, against drug-resistant strains of Plasmodia [J]. J Antibiot, 2003, **56**(8): 727-9.
- [5] Ishiyama A, Iwatsuki M, Namatame M, et al. Borrelidin, a potent antimalarial: stage-specific inhibition profile of synchronized cultures of Plasmodium falciparum [J]. J Antibiot (Tokyo), 2011, **64**(5): 381-4.
- [6] Wakabayashi T, Kageyama R, Naruse N, et al. Borrelidin is an angiogenesis inhibitor; Disruption of angiogenic capillary vessels in a rat aorta matrix culture model [J]. J Antibiot, 1997, **50**(8): 671-6.
- [7] Krishna C V, Maitra S, Dev R V, et al. Studies towards the total synthesis of (-)-borrelidin: a strategy for the construction of the C11-C15 cyanodiene fragment and the utility of RCM for macrocyclization using model systems [J]. Tetrahedron Letters, 2006, **47**(34): 6103-6.
- [8] 李周,赵圣印. 娄彻氏链霉菌 ATCC10739 产抗生素 Borrelidin 发酵条件优化及其分离纯化[J].微生物学通报,2011,**38**(7):1051-1055.
- [9] 张泽生,祖玉姣,余悦等.响应面法优化春雷霉素发酵培养基及培养条件[J].中国抗生素杂志,2014,**39**(8):584-589.

漆酶 *lac1338* 原核表达发酵条件优化

夏玉林 李荷

广东药学院基础学院生物化学与分子生物学系, 广州 510006

摘要: 我国是纺织业大国, 印染废水量大, 对环境造成了严重污染, 常规水污染处理技术不能很好的解决此类问题, 随着生物科学的迅速发展, 生物酶法处理印染废水已呈现出良好的发展前景。漆酶是一类含铜的多酚氧化酶, 作用底物包括酚类、芳胺类、羧酸类、甾体激素和生物色素等。其不仅在木质素的降解和制浆造纸中有重要的应用前景, 在废水处理、生物漂白、环境污染物降解、土壤修复、生物监测、食品加工和有机合成等方面也具有潜在的应用价值, 尤其在废水处理方面具有独特优势。然而目前限制漆酶处理废水的重要因素之一是漆酶的低表达量, 本研究为了提高漆酶基因 *lac1338* 在 *Escherichia coli* BL21 (DE3) 中的表达水平, 解决漆酶在废水处理方面的瓶颈问题, 采用响应面法对其发酵条件进行优化。首先用 Plackett-Burman 法筛选出 3 个影响较大的重要因素, 分别为: 温度 ($Q1$), 诱导时间 ($Q3$), 以及诱导前菌体浓度 $OD_{600\text{ nm}}$ ($Q4$)。继而结合响应面分析, 建立了以漆酶酶活为响应值的二次回归方程模型, 即 $Y=75.33 + 3.30A + 9.35B + 5.35 - 1.69AB + 0.80AC + 11.50BC - 25.97A^2 + 1.83B^2 - 4.66C^2$, 决定系数 $R^2>0.9$, 相对酶活的最大估计值为 94.74%, 最佳点为 $A=0.323$ 、 $B=0.946$ 、 $C=0.904$, 即诱导温度为 31 °C, 诱导时间为 20 h, 诱导前的菌体浓度 $OD_{600\text{ nm}}$ 为 1.8, 此点相对酶活为 94.74%, 即蛋白表达量最大, 经纯化后用 BCA 法测得蛋白含量为 550 mg L⁻¹, 与初始条件 (450 mg L⁻¹) 相比, 产漆酶浓度提高了 22.22%。其试验值与预测值基本相符, 说明预测模型可靠性高, 可应用于漆酶发酵条件的优化。

参考文献

- [1] 申乃坤, 王青艳, 陆雁, 秦燕, 黄日波, 生物工程学报, 2010, **26** (1), 42-47.
- [2] 冯娟, 覃炎锋, 李荷, 应用与环境生物学报, 2014, **20** (6): 1076-1081.
- [3] Zhang YJ, Li Q, Zhang YX, Wang D, Xing JM, Zhejiang Univ Sci B, 2012, **13** (2), 103-110.

脱硫微生物的筛选及脱硫效率的初步评价

李璐 梁书利 林影

华南理工大学生物科学与工程学院, 广州 510006

摘要: 燃烧石油燃料所排放的含硫化合物会影响石油产品质量、腐蚀设备、污染环境, 因此如何脱除石油中的硫成为研究热点。原油中的有机硫以硫醇、硫醚、噻吩及其衍生物为主, 其中二苯并噻吩 (DBT) 含量较高, 难降解, 是有机含硫化合物的典型代表。目前被认为最有工业应用前景的脱硫途径为“4S”途径, 该途径可以专一切断 C-S 键, 生成底物二羟基苯酚 (HBP) 和硫酸根, 最大程度地保留烃类母体的燃烧值。

本研究以 DBT 作为模型底物以及唯一硫源, 在 96 孔板中进行高通量筛选, 以期得到通过“4S”代谢途径将底物 DBT 降解为 HBP 的脱硫微生物。从油库周边采集的土样、污水样和油污样, 预处理后, 用含有 DMSO 的无机盐培养基 (BSM) 进行富集, 随后在 BSM+0.25mM DBT 培养基中进行初筛, 筛选能够利用并且耐受 DBT 的菌落。土样、污水样和油污样在 BSM+DBT 平板上均得到生长良好的乳白色、表面扁平光滑、边缘整齐的菌落。“4S”途径的终产物 HBP 能与 Gibbs 试剂的主要成分 2, 6-二氯 (溴) 苯醌氯亚胺相互作用生成亮蓝色的物质; 若细菌培养液显蓝色, 说明该菌以“4S”途径脱硫并生成终产物 HBP。初筛得到的微生物在每孔盛有 200 μ l BSM+0.25mM DBT 的 96 孔板中培养 48h 后, 使用 Gibbs 显色法进行复筛, 获得 7 株生成 HBP 的脱硫菌。通过高效液相色谱法对 DBT 和 HBP 进行定量分析, 进而对微生物的脱硫效率进行初步评价, 目前分离到的 1 株微生物可在 12h 内将 0.045mM DBT 近乎完全降解。接下来将在解析该微生物脱硫途径相关酶分子的基础上, 基于代谢工程的理论进行分子改造, 以期获得具有高效脱硫能力的微生物制剂。

参考文献

- [1] Andres Abin-fuentes, Magdy EI-Said Mohamed, Daniel I.C.Wang, et al, Applied and Environmental Microbiology, 2013, **79**, 7807-7817.
- [2] L.Alves, S.M.Paixao, Bioresource Technology, 2011, **102**, 9162-9166.
- [3] Hideo Kawaguchi, Hajime Kobayashi, Kozo Sato, Journal of Bioscience and Bioengineering, 2012, **113**, 360-366.
- [4] Shilpi Aggarwal, I.A.Karimi, John J.Kilbane, et al, Molicular Biosystems, 2012, **8**, 2724-27

毕赤酵母核糖体蛋白功能及其对外源蛋白合成的调控

廖锡豪 林影

华南理工大学生物科学与工程学院, 广州 510006

摘要: 外源蛋白过量表达的调控研究中, 关于基因转录、蛋白质修饰、折叠和分泌途径的分子机理研究及其在蛋白合成调控中的应用已经较为广泛。由于核糖体结构存在复杂性, 关于外源蛋白过量表达在核糖体翻译水平的研究及调控的报道较少。

毕赤酵母作为外源蛋白表达和生产的重要工业菌株, 已成为外源蛋白高效表达调控研究的重要对象。在过去的研究中通过选择高效启动子提高外源蛋白基因转录水平, 过量表达内源 UPR 相关因子提高蛋白质折叠水平, 优化分泌信号肽均达到提高外源蛋白合成与表达量的目的。前期研究在外源蛋白过量表达的毕赤酵母细胞中发现了大量核糖体蛋白表达下调及细胞生长下降的现象, 对核糖体蛋白及核糖体结构功能进行深入分析, 有望从翻译水平上研究核糖体蛋白对细胞外源过量表达的分子机理。

本课题使用 iTRAQ LC-MS/MS 技术分析重组毕赤核糖体蛋白及能量代谢途径的差异表达, 发现在过表达木聚糖酶过程中有 30 个核糖体蛋白出现下调。对表达下调的核糖体蛋白进行基因缺失构建毕赤酵母突变菌株, 通过 Cre/loxP 筛选标记可重复利用基因敲除系统在毕赤酵母 GS115 宿主中进行核糖体蛋白突变菌株的筛选及功能研究, 成功获得了 $\Delta RPL22$ 、 $\Delta RPL24$ 、 $\Delta RPL26$ 等 10 个核糖体蛋白突变菌株。初步分析突变株的细胞生长特性与外源蛋白合成效率, 并测定分析了其多聚核糖体图谱, 结果表明缺失核糖体蛋白对细胞生长有不同程度的影响, 且可使细胞翻译效率大幅下降。研究结果表明这些核糖体蛋白影响细胞生长及核糖体的蛋白翻译功能, 为进一步分析核糖体蛋白对翻译、内质网胁迫耐受及蛋白合成分泌等功能的影响和深入探讨核糖体蛋白对重组毕赤酵母细胞生长及外源蛋白表达的分子调控机制提供了基础。

参考文献

- [1] Lin X, Liang S, Han S, et al. Quantitative iTRAQ LC-MS/MS proteomics reveals the cellular response to heterologous protein overexpression and the regulation of *HAC1* in *Pichia pastoris* [J]. Journal of proteomics, 2013, 91: 58-72.
- [2] Steffen K K, McCormick M A, Pham K M, et al. Ribosome deficiency protects against ER stress in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Genetics, 2012, 191(1): 107-118.
- [3] Gerashchenko M V, Lobanov A V, Gladyshev V N. Genome-wide ribosome profiling reveals complex translational regulation in response to oxidative stress [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2012, 109(43): 17394-17399.

黑曲霉细胞表面展示体系的构建及其展示脂肪酶催化特性的表征

潘志友 潘力 郑穗平 韩双艳 林影*

华南理工大学生物科学与工程学院, 广州 510006

摘要: 黑曲霉 (*Aspergillus niger*) 是重要的工业微生物, 在食品、药品和工业用酶等生产领域有着广泛的应用, 具有极好的生物安全性。目前, 黑曲霉也被开发为高效的异源蛋白表达宿主, 用于生产众多的工业用酶, 其中许多酶制剂产品及其生产过程已获得美国 FDA 的 GRAS 认证^[1]。黑曲霉有望成为生物工业中一个极为重要的平台微生物^[2]。微生物细胞表面展示系统在基础科学研究和工业应用研究中有着重要的开发价值。与重组蛋白分泌表达系统相比, 酶的细胞表面展示表达系统既具有固定化酶可重复多次利用的优点, 又具有生产工艺简单、无需专门的固定化工序等特点, 使之成为最近几年生物技术领域的研究热点之一^[3]。为丰富微生物细胞表面展示酶体系及拓展其在食品工业中的应用, 本课题采用一株野生型黑曲霉作为平台, 从头构建了一个潜在的食品级黑曲霉表面展示脂肪酶全细胞催化剂, 并对其表面展示脂肪酶的催化特性进行了表征。

以黑曲霉的内源壁蛋白 CwpA 作为锚定模块, 将南极假丝酵母脂肪酶 B (CALB) 的成熟肽融合表达在 CwpA 的 N 端, 利用黑曲霉内源的高效糖化酶启动子调控 CALB-Flag-CwpA 融合蛋白的表达, 以符合 GRAS 认证和食品级要求的乙酰胺水解酶表达盒作为显性遗传标记筛选黑曲霉重组菌, 实现了 CALB 在黑曲霉细胞表面的高活性展示。采用激光共聚焦显微镜进行免疫荧光检测和测定黑曲霉菌丝表面的脂肪酶活性的方法确证了融合蛋白 CALB-Flag-CwpA 在黑曲霉菌丝表面的功能性展示表达。麦芽糖诱导表达 45h 后, 黑曲霉菌丝表面展示脂肪酶的水解活性 (以对硝基苯酚丁酸酯作为底物) 达到 400 U/g dry cell, 合成活力 (以己酸和乙醇作为底物) 达到 240 U/g dry cell。在无溶剂体系中, *A. niger* / CALB-CwpA 全细胞催化剂能高效率地合成一系列碳链长度的脂肪酸乙酯, 反应 2h, 己酸乙酯 (C6) 和月桂酸乙酯 (C12) 的脂肪酸转化率分别达到 87% 和 89%; 反应 3h 硬脂酸乙酯 (C18) 的脂肪酸转化率达到 84%。连续使用 5 个批次, *A. niger* / CALB-CwpA 全细胞催化剂合成己酸乙酯的活性仍保持在 97% 以上。这些结果表明, 黑曲霉内源的甘露糖蛋白 CwpA 可以作为一个有效的细胞表面展示模块, *A. niger* / CALB-CwpA 全细胞催化剂在非水相催化体系中表现出优异的合成活性和高的底物耐受性, 是一个潜在的、满足绿色食品加工工艺要求的高效食品级脂肪酶制剂^[4]。

参考文献

- [1] Olempska-Beer Z S, Merker R I, Ditto M D, et al, Regulatory Toxicology and Pharmacology, 2006, 45(2): 144-158.
- [2] Fleißner A, Dersch P., Applied microbiology and biotechnology, 2010, 87(4): 1255-1270.
- [3] Kondo A, Ueda M., Applied microbiology and biotechnology, 2004, 64(1): 28-40.
- [4] Aravindan R, Anbumathi P, Viruthagiri T., Indian Journal of Biotechnology, 2007, 6(2): 141.

毕赤酵母 GPI 型细胞壁蛋白的功能分析

王盼 林影

华南理工大学生物科学与工程学院, 广州 510006

摘要: 毕赤酵母作为常用的蛋白表达系统, 广泛应用于实验室规模的蛋白质制备、表征以及结构解析等方面, 已有上千种蛋白在毕赤酵母系统中成功地得到表达。在工业酶制剂领域, 也有许多酶制剂包括植酸酶、脂肪酶、甘露聚糖酶、木聚糖酶等利用毕赤酵母实现了产业化规模的生产[1]。

细胞壁作为细胞的重要组成部分, 能够维持细胞渗透压平衡, 在形态发生过程中产生并维持细胞的形态, 并且在环境压力中有保护细胞的作用[2]。酵母细胞壁由三类基本成分组成: β -葡聚糖、几丁质和甘露糖蛋白, 在电子显微镜下观察发现, 酵母的细胞壁厚约 200nm, 分为电子密度不同的两层结构, 外层甘露糖蛋白层和内层葡聚糖骨架[3]。GPI 型细胞表面蛋白是酵母生存和维持正常细胞形态所必须的。通过对毕赤酵母全基因组中所有编码的蛋白进行预测和分析, 对这蛋白进行分泌信号肽和内部跨膜区域的预测, 最终在毕赤酵母 GS115 中发现 50 个潜在的 GPI 型细胞壁蛋白[4];然而关于这些蛋白的生化分析及功能鉴定需要进一步的探索。

通过对毕赤酵母 GS115 潜在的 50 个 GPI 细胞壁蛋白进行基因敲除, 研究了各细胞壁缺陷菌株在不同碳源条件下的生长情况, 以及对细胞壁干扰剂的耐受性情况。敲除细胞壁蛋白会引起细胞多方面的变化, 分泌外源蛋白的能力也会发生变化, 但是由于细胞壁补偿机制的存在, 也存在敲除后细胞壁结构和性质变化不明显的现象。对细胞壁蛋白的功能进行深入的研究, 将为毕赤酵母高效分泌外源蛋白提供重要的参考价值。

参考文献:

- [1] Rabert C, Weinacker D, Pessoa Jr A, Far s JG. Recombinants proteins for industrial uses: utilization of *Pichia pastoris* expression system. *Brazilian Journal of Microbiology* 2013; **44**:351-6.
- [2] Klis FM, Mol P, Hellingwerf K, Brul S. Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS microbiology reviews* 2002; **26**:239-56.
- [3] Kondo A, Ueda M. Yeast cell-surface display—applications of molecular display. *Applied microbiology and biotechnology* 2004; **64**:28-40.
- [4] Zhang L, Liang S, Zhou X, Jin Z, Jiang F, Han S, Zheng S, Lin Y. Screening for glycosylphosphatidylinositol-modified cell wall proteins in *Pichia pastoris* and their recombinant expression on the cell surface. *Applied and Environmental microbiology* 2013; **79**:5519-26.

里氏木霉 Cel6A 基因在毕赤酵母里的异源表达

白仁惠¹ 张云博¹ 许银彪¹ 孙付保¹ 张震宇¹ 丁灿灿¹

江南大学生物工程学院 工业生物技术教育部重点实验室 糖化学与生物技术教育部重点实验室,
江苏无锡 214122

摘要: 为实现里氏木霉糖苷水解酶 6 号家族外切葡聚糖酶(CBH II)基因 Cel6A 在毕赤酵母中高效产酶并比较 AOX1 和 GAP 调控系统对毕赤酵母产酶的影响, 本文通过对 Cel6A 基因进行密码子偏好性优化, 并分别在 AOX1 和 GAP 调控下在毕赤酵母中表达。为进一步提高表达水平, 对两种转化子进行摇瓶优化。并比较两种转化子产酶规律, 对所获得重组蛋白进行酶学性质研究。结果表明, Cel6A 在两种调控系统中均能实现异源表达, 通过摇瓶优化, AOX1 与 GAP 启动子调控下所产酶活分别提高了 4 倍和 1.4 倍, 最高酶活 0.26 U/mL。通过产酶规律对比, 发现 GAP 调控系统发酵周期仅为 AOX1 调控系统一半, 但后者呈现出更优秀的工业应用潜力。通过酶学性质研究, 重组 CBH II 蛋白最适反应温度 pH 分别为 60 °C、5.5, 并在 50 °C 条件下 1 h 保留 94%以上酶活, 表明重组蛋白适用于工业生产。

关键字: 葡聚糖外切酶, 密码子优化, AOX1 和 GAP 启动子, 毕赤酵母, 里氏木霉, 发酵条件优化, 酶学性质

基于差分进化算法的酿酒酵母分批补料培养在线自适应控制

丁健 张许 高敏杰 史仲平

江南大学生物工程学院, 无锡 214122

摘要: 酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 是与人类生活息息相关的一种真核微生物, 可用于生产多种产物。酿酒酵母分批培养过程中, 过高的碳源浓度会导致乙醇的大量积累, 伴随着大量 CO_2 的排放, 大大降低碳源的利用效率^[1,2]。高浓度的乙醇也会对细胞结构及功能造成不可逆转的损伤, 抑制产物合成^[3]。若减少碳源添加, 可有效缓解乙醇积累, 但过低的碳源浓度同样会降低酵母细胞的生长速率和产物的合成速率。酿酒酵母合成及消耗乙醇的过程具有明显的时变性和滞后性特征, 利用常规的比例-积分-微分 (PID) 控制策略无法在保证细胞正常生长的前提下将乙醇浓度稳定地控制在较低水平。为解决这一问题, 本研究构建了一种新型的自适应控制器。该控制器利用自回归移动平均模型 (Autoregressive moving average model, ARMA)^[4] 实时追踪酵母培养过程的动力学特性, 并将差分进化算法 (Differential evolution, DE)^[5] 这一新兴的全局优化算法与标准 PID 控制器相结合, 根据酵母培养过程动力学特性的变化在线优化 PID 控制参数。利用文献报道的酵母培养模型^[6] 对标准 PID 控制器和本研究所构建的自适应控制器的控制性能进行验证, 结果表明: 在标准 PID 控制条件下, 随着培养过程的进行, 乙醇浓度波动逐渐增大, 培养 50 h 后的细胞密度为 26.70 g-DCW/L; 在自适应控制条件下, 乙醇浓度始终被稳定地控制于设定值 (1 g/L) 附近, 培养 50 h 后的细胞密度达到 34.45 g-DCW/L, 明显高于前者。最后, 将标准 PID 控制器和该自适应控制器用于实际的酿酒酵母分批补料培养过程, 结果表明: 在标准 PID 控制条件下, 乙醇浓度仍然难以稳定控制, 培养 33 小时后的细胞密度为 17.9 g-DCW/L; 在自适应控制条件下, 乙醇浓度控制性能明显优于前者, 培养 33 小时后的细胞密度达到 24.6 g-DCW/L。本研究中所构建的自适应控制器不仅可以用于酿酒酵母培养过程乙醇浓度的控制, 还可以用于其他发酵过程中其他在线参数的控制, 在分批补料发酵生产中具有广泛的适用性。

参考文献

- [1] 王萍, 王泽建, 张嗣良, 中国生物工程杂志, 2013, 33(2), 88-95.
- [2] Zigova J., J. Biotechnol, 2000, 80(1), 55-62.
- [3] Gibson B. R., Lawrence S. J., Leclaire J. P. R., et al, FEMS Microbiol. Rev., 2007, 31(5), 535-569.
- [4] Can I., Tosunoglu F., Kahya E., Water Environ. J., 2012, 26(4), 567-576.
- [5] Storn R., Price K., J. Global Optim., 1997, 11(4), 341-359.
- [6] Takamatsu T., Shioya S., Okada Y., et al., Biotechnol. Bioeng., 1985, 27(12), 1675-1686.

阿维链霉菌唾液酸苷酶的异源表达及酶学性质的研究

郭佳 王宜成 关锋

江南大学生物工程学院, 无锡 214122

摘要: 唾液酸苷酶(Sialidases, EC 3.2.1.18)是一类水解糖蛋白、糖脂和其他糖缀合物末端唾液酸苷键的外切糖苷酶, 来源广泛[1]。其中。细菌来源的唾液酸苷酶可用于将多唾液酸神经节苷脂(Gangliosides, GLS)转化为神经系统疾病治疗药物单唾液酸神经节苷脂(GM1) [2, 3], 开发和研究具有高度底物特异性并能够高效转化GLS生成GM1的唾液酸苷酶是目前研究的热点。

本研究成功构建了阿维链霉菌唾液酸苷酶NeuA3的大肠杆菌表达载体pET28-NeuA3, 并转化表达宿主*E. coli* BL21(DE3)在诱导剂IPTG浓度0.05 mM条件下16℃诱导9 h, 成功诱导了唾液酸苷酶NeuA3的表达, 并通过镍柱纯化获得纯酶。研究该酶的酶学性质发现, 该酶对 α -2,3连键形式唾液酸的水解效率稍高于 α -2,6连键形式的唾液酸。此外, 该酶还具有良好的金属离子耐受性, 并在常温和弱酸性条件下稳定性良好。将该唾液酸苷酶应用于GLS的生物转化, 成功将GLS转化为GM1, 通过在人恶性膀胱癌细胞YTS-1培养基中添加NeuA3发现, 该酶的加入增加了YTS-1细胞中的GM1的合成, 并且细胞的迁移能力下降。

参考文献

- [1] Chen, X. and A. Varki. ACS Chem Biol, 2010. 5(2): p. 163-76.
- [2] Fukano, Y. and M. Ito. Appl Environ Microbiol, 1997. 63(5): p. 1861-5.
- [3] 董惠钧, 姜俊云, 中国医药生物技术, 2010. 5(2): p. 139-142.

一步 PCR 技术快速高效组合进化酶和代谢途径

金鹏 堵国成 陈坚 康振*

江南大学生物工程学院, 无锡 214122

摘要: 酶作为生物催化的主导者, 合成生物学和代谢工程的核心参与者, 被广泛应用于复杂的药物、中间体、化合物的合成, 甚至生物燃料的合成。然而, 在大多数情况中, 天然酶的性质局限性, 极大地限制了它在各种复杂条件下的使用, 因此, 迫切需要对天然酶进行人工进化和改造。随机突变(例如易错 PCR)是应用较广的进化方式之一, 通过 PCR 过程中引进随机的碱基替换, 进而筛选理想的突变体。随后在此基础上发展起来的各种依赖 PCR 技术引入突变点进化基因的技术如定点突变、基因嵌合以及瞬时模板的随机嵌合等方法。然而, 上述方法产生的突变点多样性少, 产生的突变体也多为有害突变, 工作量大而且效率极低。

当前合成生物学和代谢工程对合成途径的改造基本都注重在对合成途径基因的表达水平调控上, 而往往忽略了对合成途径中关键酶的改造也是非常必要的, 例如关键酶的限速问题、受产物或者底物反馈抑制。因为, 如果仅仅加强表达水平, 可能会导致细胞合成能力的浪费和细胞生长负担, 而不能从根本上解决代谢途径流量平衡的问题。

因此, 为了解决上述两方面的问题, 本研究采用“Rapidly Efficient Combinatorial Oligonucleotides for Directed Evolution”(RECODE)体外 PCR 进化方法, 在合成单链 DNA 内部引入突变碱基(简并碱基、碱基插入和删除等), 结合耐热 DNA 聚合酶和 DNA 连接酶参与的 PCR 热循环反应, 获得含有多样性极其丰富的突变文库, 再利用体外重组技术构建突变筛选文库。在本研究中, 通过采用 RECODE 技术, 我们快速构建了一个启动子突变文库(活性范围 8%-460%), 以底物专一性的透明质酸酶亲本进化出了一个肝素酶突变体(一次进化实现了在 489 个氨基酸的蛋白中同时引入了三十多个氨基酸的突变)。同时对 heme 合成途径的启动子、核糖体结合位点和酶进行组合突变, 我们实现了 δ -aminolevulinic acid (ALA)产量 20 倍的提升(2500 ± 120 mg/L)。这些结果充分证明了我们开发的 RECODE 技术可以广泛应用于蛋白改造、代谢工程和合成生物学领域。

此方法克服了上述随机突变多样性不足和代谢工程改造中的难点, 而且本方法操作实施简单, 易于快速获得丰富的突变体文库, 为基因体外快速进化奠定了基础, 同时, 结合蛋白结构生物信息学和合成生物学, 特别适合于酶基因和代谢合成途径的快速定向进化应用。

羟脯氨酸高产菌株的构建以及发酵条件的优化

林凡 张震宇 孙付保

江南大学生物工程学院，无锡 214122

摘要：本文研究目的旨在构建羟脯氨酸高产菌株。在已构建好的大肠杆菌 BL21(DE3) $\Delta putA$ 的基础上，敲除大肠杆菌的 *sucA* (α -酮戊二酸复合体的 E1 亚基) 基因并插入反式-4-羟化酶基因 (*hyp*)。 *sucA* 表达的酶催化 TCA 循环中由 α -酮戊二酸到琥珀酸的途径，而 L-脯氨酸反式-4-羟化酶的催化作用下，以 α -酮戊二酸为共同底物，羟基化生成反式-4-羟脯氨酸和琥珀酸，故用羟化酶来部分“回补”TCA 循环中打断的 α -酮戊二酸到琥珀酸的途径，缩短敲除菌的生长延滞期。之后转入质粒 pUC19-P_{trp2}-hyp-vgb (pUHVT4)，加大羟化酶的表达量，提高 L-脯氨酸的羟基化效率。优化后的发酵条件为 35 °C，220 rpm，初始 pH 8.5，接种量 6%。发酵培养基：葡萄糖 17 g/L，玉米浆 5 g/L，硫酸铵 5.5 g/L，甘油 6 g/L，磷酸氢二钾 11 g/L，氯化钙 0.005 g/L，硫酸镁 1 g/L，亚铁 1 mM。在初始脯氨酸添加量为 100 mM，发酵 12 h 时的羟脯氨酸产量为 1344.1 mg/L，是优化前的 5.53 倍左右。与大肠杆菌 BL21(DE3) (pUHVT4) 相对比较而言，该菌在产羟脯氨酸上具有一定的优势。

参考文献

- [1]Byung Jo Yu, Bong Hyun Sung, Ju Young Lee,,Sung Hwa Son, Mi Sun Kim , Sun Chang Kim. FEMS Microbiol Lett ,2006(254): 245–250.
- [2] Kirill A. Datsenko and Barry L. Wanner. PNAS, **2000** (6):6640-6645.
- [3]周丽, 牛丹丹, 李宁, 陈献忠, 石贵阳, 王正祥, 微生物学通报, 2010,**37**(6): 923–928.
- [4]尹国华, 刘楠, 孙兆楠, 宋云枝, 朱常香, 温孚江, 山东农业大学学报(自然科学版),2009,**40**(3):461-464.

不同溶氧对谷氨酸棒杆菌发酵过程关键物质及酶活的影响

王芬 孙杨 刘秀霞 杨艳坤 白仲虎

江南大学生物工程学院, 无锡 214122

摘要: 本文以谷氨酸棒杆菌为研究对象, 分别控制在 0%、30%、50% 3 种溶氧水平下进行发酵, 考察分析了这 3 种溶氧水平下谷氨酸棒杆菌 BZH001 发酵过程中的相关物质和关键酶活的变化, 并结合转录组测序的数据结果分析了参与物质代谢和能量代谢过程中关键基因的表达模式。本文改进了谷氨酸棒杆菌发酵代谢物含量的高效液相色谱分析方法, 成功分离了样品中的谷氨酸、丙酮酸、天冬氨酸、 α -酮戊二酸、乳酸和琥珀酸等, 建立关键酶活的检测方法, 以及优化了谷氨酸棒杆菌 BZH001 的破碎条件。通过以上实验得到的结果表明, 低溶氧 0% 下菌体生长受到抑制, 菌浓为高溶氧条件下的 44.7%, 但是后期耗糖速率加快, 三羧酸循环还原途径中的缬氨酸、精氨酸含量有所增加, 乳酸、丙酮酸积累较多。通过分析不同溶氧条件下的相关酶活和氧化还原状态, 发现溶氧 30% 和 50% 菌体进入生长对数期后, 丙酮酸羧化酶活性迅速升高, 最高达到 0.1008, 且两种溶氧下的酶活变化趋势相近。而低溶氧 0% 下, 谷氨酸脱氢酶和异柠檬酸脱氢酶活性较低, 胞内氧化还原电势升高, 共同作用使得代谢流流向 TCA 循环还原途径及乳酸合成途径, 不利于生成谷氨酸。并通过实时荧光定量 PCR 对关键代谢途径涉及到的基因进行了表达模式分析, 可在此基础上进一步改造代谢途径, 使代谢流向有利于产物生产的途径, 使谷氨酸棒杆菌高效表达目的产物。

关键词: 谷氨酸棒杆菌; 溶氧代谢物; 酶活; 关键基因

三阶段发酵策略提高 *Mycobacterium neoaurum* JC-12 雄甾二烯二酮产量的研究

邵明龙 张显 徐美娟 杨套伟 饶志明*

江南大学生物工程学院, 无锡 214122

摘要: 甾体激素类药物是指分子结构中含有甾体结构的药物, 其具有很强抗感染、抗过敏、抗病毒及抗休克的药理作用, 是临床上一类重要的药物[1]。雄甾二烯二酮是具有雄性激素作用的一种甾体化合物, 是生产甾体激素类药物重要的中间体之一[2]。化学法合成雄甾二烯二酮是通过多步反应来完成的。但是化学合成法最终表现为合成过程冗长、毒性大、成本高、低产率等问题[3]。1952年, Upjohn 公司的一个关于孕酮 C₁₁ 羟化方法的专利的申请, 成为微生物转化生产甾体类药物的一个里程碑[4]。从此, 微生物转化法因其明显的优越性, 成为甾体激素类药物中间体合成的主要途径。从 19 世纪 80 年代开始, 植物甾醇的微生物转化成为甾醇领域研究的焦点[5]。目前, 科学家已经阐明了甾醇类物质被细菌降解的机理并确定了其在降解过程中的各种中间产物[6,7]。但是利用新金色分枝杆菌转化植物甾醇合成雄甾二烯二酮的产量依然较低[8]。为了提高新金色分枝杆菌转化植物甾醇合成雄甾二烯二酮的产量, 在 5-L 发酵罐上, 我们提出了三阶段发酵调控策略。第一阶段, 我们用果糖作为初始碳源以提高菌体的生长速率同时缩短菌体的生长的延滞期。第二阶段, 流加葡萄糖为菌体生长和代谢提供必要的碳源, 同时流加底物进行转化。此时, 雄甾二烯二酮的产量达 13.0 g/L, 发酵周期从 168 h 缩短为 120 h, 雄甾二烯二酮的生产效率从 0.071 g/(L h) 提高到 0.108 g/(L h)。在此基础上, 为了进一步提高雄甾二烯二酮的产量, 我们提出了三阶段发酵策略。通过第三阶段流加底物, 最终雄甾二烯二酮的产量达 18.6 g/L, 这是文献报道中雄甾二烯二酮的最高产量。

参考文献

- [1] Marina V. D., Olga V. E., Applied Microbiology and Biotechnology, 2012, **94** (6), 1423-1447.
- [2] Zhang, W. Q., Shao, M. L., Rao, Z. M., et al, Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 2013, 135, 36-42.
- [3] Fernandes P., Cabral J. M. S., Bioresource Technology, 2007, **98** (12), 2335-2350.
- [4] Murray, H. C., Peterson, D. H., US Patents, 1952.
- [5] Perez C., Falero A., Duc H. L., et al, Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2006, **33** (8), 719-723.
- [6] Yao, K., Wang, F. Q., Zhang, H. C., et al, Metabolic Engineering, 2013, 15, 75-87.
- [7] Sih C. J., Wang K. C., Tai H. H., Biochemistry, 1968, **7** (2), 796-807.
- [8] Shao, M. L., Zhang, X., Rao, Z. M., et al, PLoS ONE, 2015, **10** (9), e0137658.

丙丁梭菌-酿酒酵母混合培养耦联外添乙酸强化丙酮合成

罗洪镇 丁健 史仲平*

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

摘要: 丙酮(A)-丁醇(B)-乙醇(E)发酵, 简称 ABE 发酵, 其产品是丙酮、丁醇和乙醇的混合物^[1]。迄今为止, 有关 ABE 发酵的研究基本上都是围绕着提高主产物—丁醇的产量、提高丁醇在总溶剂中所占比例来进行的^{[2][3]}, 而丙酮的生物合成基本不受重视。丙酮和丁醇都是重要的平台化合物和高效液态燃料或添加剂^[4]。丙酮作为柴油助燃剂使用时, 可以提高柴油的燃烧性能、减少有害气体(NO_x、SO_x 等)的排放, 环境效益明显^[5]。然而, 目前尚无专一性发酵生产丙酮的微生物菌株, 丙酮基本上完全依靠不可再生的、化石原料合成生产, 其可持续发展和碳排放存在很大问题^[6]。针对以上问题, 本文提出了丙丁梭菌-酿酒酵母混合培养耦联外添乙酸强化丙酮生物合成的发酵策略。当丙丁梭菌(*C. acetobutylicum* ATCC 824)发酵进入产溶剂期后(~24 h), 同时添加 0.20 g-DCW/L-broth 活性酿酒酵母和 4.0 g/L-broth 乙酸, 最终的丁醇、丙酮浓度和丙酮/丁醇比分别达到 13.91 g/L、8.27 g/L 和 0.59, 与对照相比分别提高 19.6%、41.1%和 18.0%。理论和实验分析可知, 该发酵策略可刺激有利于梭菌生存和丁醇合成的 4 种氨基酸的分泌; 可以在保证丁醇正常合成的前提下, 适度抑制 NADH 再生、降低细胞能量周转、强化丙酮生物合成, 进而显著改善 ABE 发酵性能。为进一步降低发酵原料成本, 在混菌体系下, 利用乙酸发酵上清液替代化学合成乙酸的可行性进行了研究, 结果表明外添廉价的乙酸发酵上清液时, 相应的发酵指标达到 14.23 g/L、8.55 g/L 和 0.60, 分别提高 22.4%、46.0%和 20.0%。上述结果大大提高了利用可再生生物质强化丙酮生物合成的可能性和潜在能力, 同时也使得 ABE 发酵产品更加精细化。

参考文献

- [1] Lee S. Y., Park J. H., Jang S. H., et al, *Biotechnol Bioeng*, 2008, **101**(2), 209-228.
- [2] Jiang Y., Xu C., Dong F., et al, *Metab Eng*, 2009, **11**(4), 284-291.
- [3] Wang S., Zhu Y., Zhang Y., et al, *Appl Microbiol Biotechnol*, 2012, **93**(3), 1021-1030.
- [4] Peralta-Yahya P. P., Zhang F. Z., del Cardayre S. B., et al, *Nature*, 2012, **488**(7411), 320-328.
- [5] Wu H., Nithyanandan K., Zhou N., et al, *Fuel*, 2015, **142**, 109-116.
- [6] Zhou J., Zhang H., Zhang Y., et al, *Metab Eng*, 2012, **14**(4), 394-400.

壳聚糖对纤维素酶的诱导作用

苏存生 孙付保 张震宇

江南大学生物工程学院, 工业生物技术教育部重点实验室&糖化学与生物技术教育部重点实验室
无锡 214122

摘要: 纤维素酶生产成本在纤维素乙醇行业中占据较大的比例, 因此降低纤维素酶成本势在必行。为了提高纤维素酶产量, 降低其成本, 本实验以里氏木霉 RUT-C30 为发酵菌株通过向发酵液当中添加壳聚糖, 对壳聚糖的添加时间和添加量进行优化, 并简单探索了壳聚糖诱导产酶的机制。结果表明, 当 96 h 时, 向发酵液中添加 1.5 g/L 的壳聚糖使纤维素酶酶活从之前的 1.85 U/mL 提高到 2.77 U/mL, 酶活提高了 49.6%; 经过初步分析认为壳聚糖不仅能够破坏细胞结构而且进入细胞后的降解产物能够诱导酶的表达。因此, 在纤维素酶工业化生产中, 适当添加壳聚糖有利于酶活的提高, 节约成本。

参考文献

- [1] Dos Reis L, Fontana RC, Delabona Pda S, et al. Increased production of cellulases and xylanases by *Penicillium echinulatum* S1M29 in batch and fed-batch culture[J]. *Bioresource technology*. 2013, **146**:597-603.
- [2] Culbertson A, Jin M, da Costa Sousa L, et al. In-house cellulase production from AFEX™ pretreated corn stover using *Trichoderma reesei* RUT-C30[J]. *RSC Advances*. 2013, **3**: 259-265.
- [3] Liao H, Fan X, Mei X, et al. Production and characterization of cellulolytic enzyme from *Penicillium oxalicum* GZ-2 and its application in lignocellulose saccharification[J]. *Biomass and Bioenergy*. 2015, **74**: 122-131.
- [4] 马立娟, 蔡瑞, 崔有志, 等. 玉米芯诱导里氏木霉 RUT-C30 产纤维素酶的分析[J]. *天津科技大学学报*. 2015, **30**:122-128.
- [5] 方镇宏, 邓红波, 张小希, 等. 木薯纤维素乙醇发酵的纤维素酶成本评价[J]. *生物工程学报*. 2013, **29**: 312-324.
- [6] Peterson R, Nevalainen H. *Trichoderma reesei* RUT-C30--thirty years of strain improvement[J]. *Microbiology*. 2012, **158**: 58-65.

一株产顺式-4-羟基-L-脯氨酸基因工程菌的构建及发酵初步优化

王付才 姚动邦 周杨 孙付保 张震宇*

江南大学生物工程学院, 工业生物技术教育部重点实验室 糖化学与生物技术教育部重点实验室, 无锡 214122

摘要: 顺式-4-羟基-L-脯氨酸是一种可用于合成多种药物和香料的手性结构物质。通过对 L-脯氨酸顺式-4-羟化酶基因的优化设计, 并引入色氨酸串联启动子, 构建出一株能表达 L-脯氨酸顺式-4-羟化酶的重组大肠杆菌 JM109/pEHC4, 从而可以将游离的 L-脯氨酸转化为顺式-4-羟基-L-脯氨酸。对该菌株进行摇瓶发酵优化, 得出最佳培养基为 (g/L): 葡萄糖 10, 甘油 10, 蛋白胨 10, NaCl 6, FeSO₄ · 7H₂O 0.278, L-抗坏血酸 0.528, (NH₄)₂SO₄ 5, K₂HPO₄ 1, MgSO₄ 0.2, CaCl₂ 0.015, L-脯氨酸 4。在最佳条件下发酵 12 h, 顺式-4-羟基-L-脯氨酸的产量达到 657.08 mg/L, 比优化前提高了 3.76 倍; 在 24 h 时产量达到 1582.75 mg/L。研究结果为顺式-4-羟基-L-脯氨酸的微生物转化法生产提供了基础。

参考文献

- [1] Smith JA, Savage GP, Hutt OE. Studies on the synthesis of *cis*-4-Hydroxy-L-proline[J]. Australian Journal of Chemistry, 2011, **64**(11): 1509-1914.
- [2] Christian Klein, Wolfgang Hüttel. A simple procedure for selective hydroxylation of L-proline and L-pipecolic acid with recombinantly expressed proline hydroxylases[J]. Advanced Synthesis & Catalysis, 2011, **353**(8): 1375-1383.
- [3] Ryotaro Hara, Kuniki Kino. Characterization of novel 2-oxoglutarate dependent dioxygenases converting L-proline to *cis*-4-hydroxy-L-proline[J]. Biochemical and Biophysical Research Communication, 2009, **379**(4): 882-886.
- [4] Ryotaro Hara, Naoko Uchiumi, Kuniki Kino. Identification and characterization of 2-oxoglutarate-dependent dioxygenases catalyzing selective *cis*-hydroxylation of proline and pipecolinic acid from actinomycetes[J]. Journal of Biotechnology, 2014, **172**: 55-58.
- [5] Bach T M H, Hara R, Kino K, et al. Microbial production of *N*-acetyl *cis*-4-hydroxy-L-proline by coexpression of the Rhizobium L-proline *cis*-4-hydroxylase and the yeast *N*-acetyltransferase Mpr1[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, **97**(1): 247-257.

脂肪酶的异源表达及蛋白表达条件优化

王鸿江 陈瑞东 杨彬 陈修来 刘立明*

江南大学食品科学与技术国家重点实验室, 无锡 214122; 江南大学生物工程学院, 无锡 214122

摘要: 微生物脂肪酶已成为脂肪酶工业应用的主要来源, 通过代谢调控巴斯德毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) 分泌表达脂肪酶, 蛋白表达量的研究具有重要意义。为了获得更高水平的脂肪酶表达量, 本研究以南极假丝酵母脂肪酶 A (CALA) 为对象, 利用甘油醛-3-磷酸脱氢酶启动子 pGAP 指导重组 CALA 在巴斯德毕赤酵母中的组成型表达。首先运用生物信息学手段对 CALA 基因序列进行密码子优化, 随后采用重组蛋白表达水平略高于醇氧化酶 1 (AOX1) 的 GAP (pGAP) 启动子, 构建 CALA 的毕赤酵母组成型表达系统; 通过对初始 pH、初始葡萄糖浓度进行优化, 发现最适 pH 为 6.8, 初始葡萄糖浓度为 25 g/L 时, CALA 酶活达到最高, 为 420 U/mL; 研究发现脂肪酶酶活与重组菌体的菌体浓度呈正相关, 通过提高摇床转速可以迅速提高溶氧水平, 当转速为 250 rpm, 脂肪酶酶活为 834 U/mL; 通过采用重复电转的方法, 在高浓度的博来霉素(Zeocin)平板上筛选高拷贝重组菌株, 获得了菌株 CALA-3, 该菌株表达后脂肪酶酶活达 3452 U/mL, 较重复电转前而言, 酶活提高了 75.8 %。本文对所使用的无机盐培养基成分进行优化以及采用重复电转的方法提高了重组基因拷贝数, 促使菌体较快生长、达到较高的外源蛋白表达量, 使得脂肪酶大规模的工业化生产更易实现。

参考文献

- [1] C. Feng, Y. Lin, S. L. Liang, et al., Food & Fermentation Industries, 2010.
- [2] X. M. Sun, W. U. Han, B. U. Xiu-Juan, et al., Food Science & Technology, 2012.
- [3] H. L. Yan, D. M. Lan, Y. H. Wang, et al., Modern Food Science & Technology, 2011.
- [4] Q. Zhou, B. D. Gao and X. F. Wang, Biotechnology, 2010, **20**, 62-64.
- [5] Y. Zhang, Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2010.
- [6] L. Sun, D. Lan, B. Yang, et al., China Brewing, 2011.
- [7] M. A. Stefan, S. B. Alicia, F. B. Pau, et al., Journal of Biotechnology, 2010, 146, 194-19

易错 PCR 技术诱变选育反式-4-羟脯氨酸生产菌株及响应面法优化发酵条件

王金霞¹ 孙付保¹ 张震宇¹ 黄建华¹

江南大学生物工程学院 工业生物技术教育部重点实验室 糖化学与生物技术教育部重点实验室, 江苏无锡 214122

摘要: 反式-4-羟脯氨酸是一种泛应用于医药、化工、动物饲料、营养和美容等许多行业的高附加值小品种氨基酸,而在其合成生产过程中微生物法较生物提取和化学合成方法展现出独特的优势。在微生物合成法过程中,为了提高反式-4-羟脯氨酸产量,本研究利用易错 PCR 技术对来自指孢囊菌(*Dactylosporangium* sp. RH1)的脯氨酸-4-羟化酶基因进行随机突变,构建了在大肠杆菌中的突变体库。通过单菌落琼脂块法和氨基酸显色法相结合的方法筛选高产反式-4-羟脯氨酸的菌株,获得高产菌 P71,其产量提高比原菌株 109.8%。为了进一步提高反式-4-羟脯氨酸的产量,通过响应面法对诱变后的 *E.coli* (DE3) P71 的发酵条件进行优化,最终确定高产反式-4-羟脯氨酸的最优发酵培养基:甘油 20 g/L,胰蛋白胨 7.01 g/L,磷酸氢二钾 2 g/L,硫酸铵 5 g/L, NaCl 2 g/L,硫酸镁 0.02 g/L,氯化钙 0.2%,L-脯氨酸 11.51 g/L 和硫酸亚铁 1.41 mol/L,培养基优化后的反式-4-羟脯氨酸产量为 1.59 g/L,与优化前(1.07 g/L)相比提高了 48.60%。

利用重组 *B. subtilis* 168 进行高效生物转化法生产 L-鸟氨酸

王梅洲 徐美娟 杨套伟 张显 饶志明*

江南大学生物工程学院, 无锡 214122

摘要: L-鸟氨酸是一种重要的非蛋白质氨基酸, 具有保肝护肝的重要生理功能。L-鸟氨酸通常通过蛋白质水解法和微生物发酵法获得。但由于产量低, 生产周期长等缺点而在工业生产上受到限制。

本文通过一种高效的全细胞转化法进行 L-鸟氨酸的生产。精氨酸酶由 *argI* 基因编码, 能够催化 L-精氨酸生成 L-鸟氨酸和尿素。将来源于 *Bacillus amyloliquefaciens* B10-127 的 *argI* 基因克隆至安全生产菌株 *B. subtilis* 168 中, 构建的重组枯草芽孢杆菌精氨酸酶活力达到 21.9 U/mg。精氨酸酶的酶学性质表明其最适温度和 pH 分别为 40 °C 和 pH 10.0, Mn^{2+} 对精氨酸酶的酶活具有较强的促进作用。以得到的重组菌作为生物催化剂, L-精氨酸作为底物, 对转化体系进行优化, 在最佳的转化条件下进行全细胞转化法生产 L-鸟氨酸。在 5-L 发酵罐中采用分批次补加底物 L-精氨酸策略, 转化 12 h, 最终 L-鸟氨酸的产量达到 356.9 g/L。本文中讲述的全细胞转化生产 L-鸟氨酸的方法具有效率高、产物纯度高等优点, 为工业化生产 L-鸟氨酸奠定基础。

参考文献

- [1] 张皓, 张涛, 食品工业科技, 2012, **33**(12):225-229.
- [2] Dakshayani KB, Velvizhi S, Subramanian P, Ann Nutr Metab 2002,**46**(2):93-96.
- [3] Georgi T, Rittmann D, Wendisch VF, Metab Eng, 2005,**7**(6):291-301.
- [4] Hwang GH, Cho JY, J Ind Microbiol Biotechnol, 2014, **41**(12):573-578.
- [5] Jiang LY, Zhang YY, Li Z, Liu JZ, J Ind Microbiol Biotechnol, 2013, **40**(16):1143-1151.
- [6] Kim SY, Lee J, Lee SY, Biotechnol Bioeng, 2015,**112**(9):416-421.
- [7] Lee YJ, Cho JY, Biotechnol Lett 2006,**28**(21):1849-1856.
- [8] Meizhou Wang, Meijuan Xu, Zhiming Rao, J Ind Microbiol Biotechnol, DOI 10.1007/s10295-015-1672-z

铜绿假单胞菌利用甘油/脂肪酸生产鼠李糖脂

王盼盼 吴剑荣

江南大学生物工程学院，无锡 214122

摘要：鼠李糖脂是一种具有很大潜力的生物表面活性剂，由 1~2 个鼠李糖和不同碳链长度的 β 羟基脂肪酸两部分连接组成。鼠李糖脂发酵生产的碳源一般是植物油，但是植物油发酵得到的鼠李糖脂乳化现象严重，纯化工艺复杂，增加了下游提取成本，这也是鼠李糖脂一直未能广泛应用的主要原因。研究表明鼠李糖脂的组成部分- β 羟基脂肪酸的主要来源途径是来自脂肪酸 β 氧化作用，而并非脂肪酸的从头合成作用。根据植物油的脂肪酸组成，利用甘油为碳源，通过加入脂肪酸底物，增强 β 氧化作用，提高鼠李糖脂前体的浓度，从而鼠李糖脂的浓度也相应增加。通过优化脂肪酸以及发酵培养基种类和浓度，提高鼠李糖脂的产量，并且通过比较加入脂肪酸前后发酵生产的鼠李糖脂的结构特性以及乳化能力，表面活性，研究鼠李糖脂在处理重金属污染土壤方面的应用。

参考文献

- [1] Abdel-Mawgoud A. M., Lepine, F., Chemistry & biology . 2014, **21**, 156-164.
- [2] Zhang L, Tracey A., Veres-Schalnat A. S., Applied and Environmental Microbiology. 2012: **78**: 8611-8622.
- [3] Wan J. Z., Meng D., Long T., et al, PLoS One, 2015, **10**(6): 1-14.

Significantly improving the yield of recombinant proteins in *Bacillus subtilis* by a novel powerful mutagenesis tool

Yingfang Ma Wei Shen Xianzhong Chen Fei Xu Haiquan Yang*

School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi, 214122

In this study, atmospheric and room temperature plasma (ARTP), a promising mutation breeding technique, was successfully applied to generate *Bacillus subtilis* mutants that yielded large quantities of recombinant protein. The high throughput screening platform was implemented to select those mutants with the highest yield of recombinant α -amylase (AMY), including the preferred mutant *B. subtilis* WB600 mut-12#. The yield and productivity of recombinant AMY in *B. subtilis* WB600 mut-12# increased 35.0% and 8.8%, respectively, the extracellular protein concentration of which increased 37.9%. *B. subtilis* WB600 mut-12# exhibited good genetic stability. Cells from *B. subtilis* WB600 mut-12# became shorter and wider than those from the wild-type. This study is the first to report a novel powerful mutagenesis tool (ARTP) that significantly improves the yield of recombinant proteins in *B. subtilis* and may therefore play an important role in the high expression level of proteins in recombinant microbial hosts.

一种基于调控枯草芽孢杆菌内源毒素-抗毒素系统的食品级表达系统的构建与应用

杨森 堵国成 陈坚 康振*

江南大学生物工程学院, 无锡 214122

摘要: 枯草芽孢杆菌作为一种具有悠久利用历史的食品级安全微生物, 被广泛应用于食品级代谢产物和酶制剂的生产, 越来越多成熟的表达系统也被应用于简化操作的流程和提高目的产物的产量。但由于食品级表达系统对抗性基因和非安全菌株来源基因的严格限制, 现有的绝大部分表达系统都被排除在外。我们通过调控枯草芽孢杆菌内源的毒素 (*ydcE*)-抗毒素 (*ydcD*) 系统构建了一套稳定高效的食品级表达系统。首先构建了一株在基因组上通过木糖诱导启动子 P_{xyI} 诱导表达毒素基因 *ydcE* 的枯草芽孢杆菌菌株作为宿主, 通过添加不同浓度的木糖实验, 确定诱导剂木糖浓度在高于 2 g/L 时, 能够诱导产生足够量核酸内切酶 (毒素) 降解胞内的信使 RNA 而导致菌体生长停滞, 从而形成筛选压力。然后通过在内源性的质粒上组成型表达抗毒素基因 *ydcD* 作为表达载体, 抗毒素的表达会因与毒素的结合而导致其失活。在含有大于 2 g/L 木糖的培养条件下, 稳定遗传解毒质粒的菌株因为毒素的失活而正常生长, 与之相反, 丢失了含有抗毒素基因质粒的重组菌会因毒素基因的表达而生长停滞。在木糖浓度维持在高于 2 g/L 的条件下, 该系统能够稳定遗传 100 代而未发生质粒的丢失。与利用抗生素筛选和维持的传统表达系统相比, 采用该食品级表达系统得到了更高的菌体量和更多目的产物。以上实验结果表明, 该食品级表达系统能够用于食品级酶制剂和代谢产物的生产。

通过定点突变提高 *Staphylococcus aureus* 来源 α -乙酰乳酸脱羧酶的酸性稳定性

张显 龙水清 徐美娟 杨套伟 饶志明*

江南大学生物工程学院, 无锡 214122

摘要: α -乙酰乳酸脱羧酶 (ALDC) 可以通过降低双乙酰的生成加速啤酒的成熟。本研究在安全菌株 *Bacillus subtilis* WB600 中高效表达来源于 *Staphylococcus aureus* L3-15 的 ALDC 编码基因 *saald*。SDS-PAGE 分析表明, 来源于 *S.aureus* 的 α -乙酰乳酸脱羧酶 (SaALDC) 在重组 *B.subtilis* 中成功地表达。采用镍亲和层析纯化 SaALDC, 在 45 °C, pH 6.0 条件下酶活最高。酶的动力学参数 K_m 和 V_{max} 分别为 17.7 μ M、2.06 mM min⁻¹。由于在啤酒生产过程中 pH 较低, SaALDC 在酸性条件下不稳定, 因此我们通过定点突变来提高该酶的酸性稳定性。同源建模分析表明突变 K52D 在蛋白表面产生负电势而突变 N43D 与周围氨基酸残基之间形成的氢键数增加。将 N43D 和 K52D 进行复合突变, 重组酶 SaALDC_{N43D-K52D} 的酸性稳定性得到显著提高, 在 pH4 条件下, 复合突变酶半衰期延长到 3.5h (原始菌株为 1.5h)。在 5 L 发酵罐中, 重组 *B.subtilis* 过表达 SaALDC_{N43DK52D}, 酶活达到 135.8 U mL⁻¹ 是原始酶 (0.42 U mL⁻¹) 的 320 倍。本研究为以 *B.subtilis* 为表达宿主时 SaALDC 酸稳定性的提高提出了一个有效的策略。

参考文献

- [1] Arnold K, Bordoli L, Kopp J, Schwede T, Bioinformatics, 2006, **22**, 195–201.
- [2] Biasini M et al, Nucleic Acids Res, 2014, **42**, W252–W258.
- [3] Bordoli L, Kiefer F, Arnold K, Benkert P, Battey J, Schwede T, Nat Protoc, 2009, **4**, 1–13.
- [4] Bradford MM, Anal Biochem, 1976, **72**, 248–254.
- [5] Curic M, Stuer-Lauridsen B, Renault P, Nilsson D, Appl Environ Microbiol, 1999, **65**, 1202–1206.
- [6] Diderichsen B, Wedsted U, Hedegaard L, Jensen BR, Sjolholm C, J Bacteriol, 1990, **172**, 4315–4321.
- [7] Dulieu C, Moll M, Boudrant J, Poncelet D, Biotechnol Prog, 2000, **16**, 958–965.
- [8] Garmyn D, Monnet C, Martineau B, Guzzo J, Cavin JF, Divies C, FEMS Microbiol Lett, 1996, **145**, 445–450.
- [9] Goelling D, Stahl U, Appl Environ Microbiol, 1988, **54**, 1889–1891.
- [10] Goupil-Feuillerat N, Coccagn-Bousquet M, Godon JJ, Ehrlich SD, Renault P, J Bacteriol, 1997, **179**, 6285–6293.
- [11] Goupil-Feuillerat N, Corthier G, Godon JJ, Ehrlich SD, Renault P, J Bacteriol, 2000, **182**, 5399–5408.
- [12] Guo W, He X, Tie C, Zhang B, Wei Sheng Wu Xue Bao, 2001, **41**, 105–108.
- [13] Huang L et al, Biotechnol Lett, 2012, **34**, 1115–1121.
- [14] Joshi MD, Sidhu G, Pot I, Brayer GD, Withers SG, McIntosh LP, J Mol Biol, 2000, **299**, 255–279.
- [15] Kunst F et al, Nature, 1997, **390**, 249–256.
- [16] Laemmli UK, Nature, 1970, **227**, 680–685.
- [17] Le Nours J, Ryttersgaard C, Lo Leggio L, et al, Protein Sci, 2003, **12**, 1195–1204.
- [18] Lei H, Zheng L, Wang C, Zhao H, Zhao M, Int J Food Microbiol, 2013, **161**, 76–83.
- [19] Liu Y, Cui W, Liu Z, Cui Y, Xia Y, Kobayashi M, Zhou Z, FEMS Microbiol Lett, 2014, **352**, 38–44.
- [20] Repizo GD, Mortera P, Magni C, Microbiology, 2011, **157**, 2708–2719.

通过调控NADH和NADH/NADPH比率再分配枯草芽孢杆菌中乙偶姻和2,3-丁二醇的比例

赵晓静 包腾 张显 徐美娟 杨套伟 饶志明*

江南大学生物工程学院, 无锡 214122

摘要: 乙偶姻是枯草芽孢杆菌的主要胞外代谢产物, 除此以外还有一些 NADH 依赖型的副产物, 尤其是 2,3-丁二醇。本研究使用代谢工程的方法, 通过实现 NADH 的下调和 NADH/NADPH 的再分配, 来调节芽孢杆菌细胞内的代谢流, 使其利于乙偶姻的合成。首先, 使用不同氧化态的碳源, 可以导致不同的 NADH/NAD⁺ 胞内比例和乙偶姻的产率。以葡萄糖和葡萄糖酸的混合物作为底物, 可以产生低水平的 NADH/NAD⁺ 比例, 进而提高乙偶姻的产量而副产物显著降低。为了使用利用廉价的葡萄糖作为底物时也可以降低 NADH/NAD⁺ 比例, 本研究加强了磷酸戊糖途径, 显著提高了乙偶姻的产量: 6-磷酸葡萄糖脱氢酶的加强表达, 可降低胞内的 NADH/NADPH 比例 (1.9 倍) 和 NADH/NAD⁺ 的比例 (1.7 倍)。补料分批培养中, 工程菌可以产乙偶姻 43.3 g/L, 2,3-丁二醇 1.7g/L。利用辅因子水平的调控策略来分配代谢流, 提供了一种新的策略来提高乙偶姻工业化发酵生产。

参考文献

- [1] Zhang, X., Yang, T. W., Lin, Q., Xu, M. J. et al., Isolation and identification of an acetoin high production bacterium that can reverse transform 2,3-butanediol to acetoin at the decline phase of fermentation. *World J. Microbiol Biotechnol*, 2011, **27**, 2785–2790.
- [2] San, K. Y., Bennett, G. N., Berrios-Rivera, S. J., Vadali, R. V. et al., Metabolic engineering through cofactor manipulation and its effects on metabolic flux redistribution in *Escherichia coli*. *Metab. Eng.*, 2002, **4**, 182–192.
- [3] Sun, J. A., Zhang, L. Y., Rao, B., Shen, Y. L., Wei, D. Z., Enhanced acetoin production by *Serratia marcescens* H32 with expression of a water-forming NADH oxidase. *Bioresour. Technol*, 2012, **119**, 94–98.
- Ji, X. J., Xia, Z. F., Fu, N. H., Nie, Z. K. et al., Cofactor engineering through heterologous expression of an NADH oxidase and its impact on metabolic flux redistribution in *Klebsiella pneumoniae*. *Biotechnol. Biofuels*, 2013, **6**, 7.
- [4] Zhang, X., Zhang, R., Bao, T., Rao, Z. et al., The rebalanced pathway significantly enhances acetoin production by disruption of acetoin reductase gene and moderate-expression of a new water-forming NADH oxidase in *Bacillus subtilis*. *Metab. Eng.*, 2014, **23C**, 34–41.
- [5] Zamboni, N., Fischer, E., Laudert, D., Aymerich, S. et al., The *Bacillus subtilis* yqjI gene encodes the NADP⁺-dependent 6-P-gluconate dehydrogenase in the pentose phosphate pathway. *J. Bacteriol*, 2004, **186**, 4528–4534.
- [6] Berrios-Rivera, S. J., Sanchez, A. M., Bennett, G. N., San, K. Y., Effect of different levels of NADH availability on metabolite distribution in *Escherichia coli* fermentation in minimal and complex media. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 2004, **65**, 426–432.

基于 2, 3-二羟基苯甲酸为前体的顺, 顺-粘康酸生物合成途径的构建

王杰 郑璞* 陈鹏程

江南大学生物工程学院, 无锡 214122

摘要: 顺,顺-粘康酸 (ccMA) 是一种树脂、医药、食品和农药的基础原料, 是大宗化学品己二酸和对苯二甲酸的直接前体^[1], 目前主要依赖石油来源的芳香族化合物的有机反应生产, 存在石油资源不可再生并且反应条件苛刻, 能耗大, 污染环境的问题^[2]。由于顺,顺-粘康酸为非生物体自身代谢的产物, 本研究通过代谢工程手段, 在大肠杆菌中人工组装从葡萄糖出发, 经莽草酸、分支酸、异分支酸、2, 3-二羟基苯甲酸 (2,3-DHB)、邻苯二酚至顺,顺-粘康酸的生物合成途径。为实现可持续的、环境友好的生物法生产粘康酸及己二酸提供参考。

首先在大肠杆菌中, 通过质粒 pACYCDUET-1 表达 2,3-二羟基苯甲酸脱羧酶 (EntX) 和邻苯二酚-1,2-双加氧酶 (CatA) 基因, 组装由 2,3-DHB 经邻苯二酚至 ccMA 的异源合成途径。其次, 通过过表达异分支酸合成酶 (EntC)、异分支酸裂解酶 (EntB) 和 2,3-二氢-2,3-二羟基苯甲酸脱氢酶 (EntA) 三个基因, 强化重组菌中由分支酸到 2,3-DHB 的合成途径。再次, 为了克服芳香族氨基酸对于莽草酸途径的反馈抑制, 将 3-脱氧-D-阿拉伯庚酮糖合成酶基因 *aroG* 进行定点突变, 同时强化表达编码莽草酸脱氢酶基因 *aroL*, 获得重组菌 Jm-5。摇瓶发酵产 ccMA 浓度 605.14 mg/L。在 3-L 发酵罐进行产酸实验, 发酵 50 h 后, ccMA 产量达到 2.88 g/L, 但中间产物 2,3-DHB 产量达到 5.89 g/L。通过羧苄青霉素抗性代替氨苄青霉素抗性, 避免了质粒 pET-XA (携带 *entX* 和 *catA*) 的丢失, 发酵 85 h, 菌体 OD600 达到 148, 基本检测不到 2,3-DHB, ccMA 浓度达到 5.76 g/L。

参考文献

- [1] Kathleen A. Curran, John M. Leavitt, Ashty S. Karim, Hal S. Alper. Metabolic engineering of muconic acid production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Metabolic Engineering*, 2013, **15**, 55-66.
- [2] Bui V, Lau MK, MacRae D, Schweitzer D. Methods for producing isomers of muconic acid and muconate salts. US Patent 20130030215 A1, 2013.

以右旋糖酐发酵废液为原料发酵生产丁二酸

查鑫华¹ 郑璞^{1*} 魏哲² 陈鹏程¹

¹江南大学生物工程学院, 无锡 214122 ; ²山东金洋药业有限公司, 淄博 255000

摘要: 右旋糖酐发酵废液是生物法生产右旋糖酐过程中提取产物之后剩下的发酵液, 一般被作为工业废水进行环保处理。该废液中残存较高浓度的果糖和少量葡萄糖, 若被作为发酵生产丁二酸的碳源, 将即能效减少右旋糖酐生产过程中的废水排放量, 又能降低生物基丁二酸的生产成本。

本文利用琥珀酸放线杆菌以右旋糖酐发酵废液为原料发酵生产丁二酸。在比较不同糖浓度废液对发酵产酸影响的基础上, 通过 Plackett-Burman 试验筛选出对摇瓶发酵产丁二酸的主要影响因素 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 单因素试验确定其最适浓度为 2.8 g/L。在 3 L 发酵罐上进行分批发酵和补料分批发酵, 以 60 g/L 初糖浓度的右旋糖酐发酵废液为碳源, 分批发酵 46.8 h 产丁二酸 40.5 g/L; 采用 30 g/L 葡萄糖为起始发酵培养基的碳源, 后续补加浓缩右旋糖酐发酵废液的策略进行补料分批发酵, 丁二酸浓度达到 55.0 g/L, 生产强度 1 g/L/h, 糖酸转化率为 0.83 g/g。结果表明: 以右旋糖酐发酵废液为原料发酵生产丁二酸, 为解决废液处理排放提供了新途径, 具有良好的应用前景。

利用廉价农业废弃生物质原料发酵生产表面活性素

陈晨 李霜*

南京工业大学生物与制药工程学院, 南京 210009

摘要: 表面活性素 (surfactin) 是芽孢杆菌属产生的脂肽结构的物表面活性剂。Surfactin 具有良好的表面活性, 能把水的表面张力由 72mN/m 降低到 27mN/m, 其临界胶束浓度(CMC)低于 20mg/L, 且具有耐高温、耐碱、耐盐等特性, 在石油开采领域具有良好的应用前景[1]。但 surfactin 的产量低、生产成本高等原因, 使得其应用推广受到限制。国内外所报道的文献中, 高产 surfactin 的培养基多以葡萄糖为碳源, 且大多需要添加蛋白胨、酵母膏以及氨基酸等昂贵的氮源[2]。

本研究以枯草芽孢杆菌 BS-37 为生产菌株[3], 以木糖为碳源, 以羽毛水解提取氨基酸后的废液为氮源, 通过培养基优化, 获得最适培养基组分为: 木糖 (20g/L)、羽毛水解废液 (1.5%, V/V)、硫酸镁 (0.2g/L)、硫酸亚铁 (0.02g/L)、磷酸二氢钾 (1g/L), pH7.5, 摇瓶发酵 48h, surfactin 产量可达 500mg/L。考虑到玉米芯酸解液的主要成分为木糖, 但存在甲酸、乙酸、糠醛、5-羟甲基糠醛等发酵抑制物, 因此进一步研究了秸秆稀酸水解的抑制物对 surfactin 的影响, 结果表明低浓度的乙酸 (1-3g/L) 可以促进 surfactin 的合成, surfactin 产量提高 12%; 甲酸、糠醛和 5-羟甲基糠醛可抑制 surfactin 的合成, 其抑制浓度分别在 1mL/L、0.6mL/L 和 0.5mL/L, 因此秸秆稀酸预处理过程中需控制上述抑制物的浓度。以脱毒的玉米芯稀酸水解液为碳源 (木糖含量约 20g/L), 以羽毛水解废液为氮源 (1.5%, V/V), 摇瓶发酵 48h, surfactin 产量可达 480mg/L。

该研究表明, 秸秆稀酸水解液中的木糖组分可以成为 surfactin 发酵的有效碳源, 羽毛水解氨基酸后的废弃液可以成为 surfactin 发酵的有效氮源, 利用这两种廉价的农业废弃生物质资源可以大幅降低 surfactin 的发酵原料成本, 推动 surfactin 在石油开采等领域的应用。

关键词: surfactin; 木糖; 秸秆; 羽毛水解液

参考文献

- [1] Qiang Liu, Junzhang Lin, Weidong Wang, He Huang, Shuang Li. Biochemical Engineering Journal[J], **93**(2015)31-37.
- [2] J.F. Pereira, E.J. Gudiña, R. Costa, R. Vitorino, J.A. Teixeira, J.A. Coutinho, L.R. Rodrigues. Fuel[J], **111** (2013) 259-268.
- [3] Zhu, L., Xu, Q., Jiang, L., Huang, H., & Li, S. (2014). PloS one[J], **9**(2). e88207.

外源引入海藻糖合成能力提高丁酸梭菌的抗逆性

刘婷婷¹ 吴茜¹ 江凌^{2*} 黄和³

¹南京工业大学生物与制药工程学院, 南京 210009, ¹南京工业大学轻工与食品学院, 南京 210009, ¹南京工业大学药学院, 南京 210009

摘要: 丁酸梭菌作为一种新型益生菌可以有效地改善动物及人体肠道的生态平衡。但是, 由于丁酸梭菌对酸和胆盐的耐受性较差, 菌剂在加工过程中要经受高温、富氧以及低温储存等一系列环境压力, 因此有必要寻求一种提高丁酸梭菌抗逆性的方法。海藻糖是一种具有重要生物学意义的非还原二糖, 在高温、高寒、高渗透压及干燥失水等恶劣环境条件下能在细胞表面形成独特的保护膜, 有效地保护蛋白质分子不变性失活, 因此在科学界素有“生命之糖”的美誉。本研究成功克隆了一段来自于极端微生物沙漠奇异球菌 (*Deinococcus deserti*) 的海藻糖合成酶 (trehalose synthase) 基因, 并首次在了丁酸梭菌中实现了可溶性异源表达。研究结果表明, 外源导入海藻糖合成途径, 使丁酸梭菌具有海藻糖合成能力, 胞内可积累 500 mg/g 细胞干重。胞内合成的海藻糖, 显著提高了宿主的空气耐受性, 如通空气 3 h, 重组菌株细胞的存活率比对照菌株提高了 10⁴ 倍; 同时, 在经过 72 h 的发酵后, 重组菌株的丁酸终产量为 36.6 g/L, 产率为 68%, 高于对照组的 39%, 提高近一倍多。此外, 当 pH 在 5.0 时, 重组菌株的 CFU/mL 为 10⁶, 而对照菌体为 10⁴, 并且, 随着 pH 的进一步下降, 重组菌株的 CFU/mL 均显著高于野生型菌体, 表现出明显的生长优势。实验结果证明了, 在丁酸梭菌中引入海藻糖的合成途径, 可以增强细胞损伤保护的冗余功能, 从而提高宿主细胞的鲁棒性。

参考文献

- [1] Zhu, L.J., Dong, H.J., Zhang, Y.P., Li, Y., Metab Eng, 2011, **13**, 426-434.
- [2] Kalscheuer, R., Stolting, T., Steinbuchel, A., Microbiology-SGM, 2006, **152**, 2529-2536.
- [3] Masip, L., Veeravalli, K., Georgioui, G., Antioxid. Redox Signal, 2006, **8**, 753-762.
- [4] Nicolaou, S.A., Gaida, S.M., Papoutsakis, E.T., Metab Eng, 2010, **12**, 307-331.
- [5] Fiocco, D., Capozzi, V., Goffin, P., Hols, P., Spano, G., Appl. Microbiol. Biotechnol, 2007, **77**, 909-915.

表面活性剂对纽莫康定 B₀ 发酵的影响

秦婷婷 宋萍 冯昆达 王晓婷

南京工业大学生物与工程学院, 南京 211816

摘要: 棘白菌素化合物纽莫康定 B₀ (pneumocandin B₀)^[1-3]是抗真菌药物卡泊芬净 (Caspofungin) 的前体, 可通过非竞争性抑制真菌细胞壁中的 β -1,3-D-葡聚糖合成酶活性而抑制真菌细胞壁的合成^[4,5], 从而能够起到抗菌效果。目前, 制约纽莫康定 B₀ 生产的主要因素是发酵时间长和产量低。表面活性剂是一类分子中含有亲水基和亲油基的有机物, 广泛应用于各个工业领域^[6]。表面活性剂在微生物发酵中的主要作用是在不影响细胞正常生长的条件下, 提高细胞膜的渗透性, 减少氧及营养物质进入细胞的传递阻力, 从而提高目标产物产量^[7]。本文研究不同类型表面活性剂对 *Glarea lozoyensis* 发酵生产纽莫康定 B₀ 的影响, 并进一步研究发酵过程中十二烷基磺酸钠 (SDS) 添加量和添加时间对纽莫康定 B₀ 合成的影响。

表面活性剂添加方式: 从斜面培养基上刮取 *G. lozoyensis* 至装有 50 mL 种子培养基的 250 mL 三角瓶中, 置于 25℃ 摇床中, 180 r/min 培养 5 d。将种子液以 10 %接种量接入装有 50 mL 发酵培养基的 250 mL 三角瓶中, 置于 25℃ 摇床中, 180 r/min 培养 18 d。在发酵第 10 d 分别添加 50 μ L (母液浓度均为 100 g/L) 阳离子型表面活性剂: 十六烷基三甲基溴化铵 (CTAB), 非离子型表面活性剂: Tween-80、PEG6000、TritonX-100, 阴离子型表面活性剂: SDS。结果表明: SDS 在质量浓度 0.1 g/L 时, 纽莫康定 B₀ 的产量比对照提高了 37.9 %, 明显优于其他表面活性剂。进一步确定 SDS 的最佳浓度及最佳添加时间分别为: 当发酵 13 d 时添加 SDS 质量浓度为 0.2 g/L 时, 纽莫康定 B₀ 的产量达到最大 (1.7 g/L), 与对照组相比最高提高了 54.5 %。

本研究发现不同类型的表面活性剂对 *G. lozoyensis* 发酵生产纽莫康定 B₀ 的影响不同, 获得了较高的产量, 这对 *G. lozoyensis* 发酵生产纽莫康定 B₀ 有一定的指导意义, 但表面活性剂对纽莫康定 B₀ 发酵影响的机制还有待进一步研究。

参考文献

- [1] Walsh T J, Pizzo A, Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 1988, 7: 460-475.
- [2] Bills GF, Platas G, et al., Mycological Research, 1999, 103(2): 179-192.
- [3] Schwartz RE, Giacobbe RA, et al., J Antibiot, 1989, 42(2): 163-167.
- [4] Sawistowskaschroder ET, Kerridge D, et al., FEBS Lett, 1984, 173(1): 134-138.
- [5] 宋萍, 章人川, 等, 中国抗生素杂志, 2015, 40(1): 6-12.
- [6] 任石苟, 李奠础, 化学与生物工程, 2006, 23(6): 50-52.
- [7] 刘建国, 丛威, 等, 工业微生物, 2001, 31(2): 17-19.

代谢改造解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*) LL3 提高谷氨酸浓度进而提高 γ -PGA 产量

高伟霞¹ 冯俊¹ 全玉芬¹ 谷燕燕¹ 王淑芳² 宋存江^{1,2*}

¹南开大学 分子微生物与技术教育部重点实验室 天津 300071; ²南开大学 药物化学生物学国家重点实验室 300071; E-Mail: songcj@nankai.edu.cn

摘要: γ -聚谷氨酸 [poly(γ -glutamic acid), γ -PGA] 是由 D/L-谷氨酸通过 γ -酰胺键聚合而成的一种高分子阴离子多肽型聚合物。 γ -PGA 主链上含有大量游离羧基, 使其具有水溶性聚羧酸的性质, 如强吸附、保湿性, 这些活性位点为材料的功能化提供了条件, 如交联、衍生化、螯合等, 使其衍生物具有极佳的成膜性、成纤维、可塑性、粘结性、可生物降解等独特的理化和生物学特性, 对人体和环境无毒害作用, 并具有生物相容性, 从而在水凝胶、凝聚剂、成膜剂、增稠剂、分散剂、药物控释载体、化妆品和食品添加剂等领域获得广泛应用。

解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*) LL3 为本室分离保存的一株谷氨酸非依赖型的 γ -PGA 合成菌株, 并进行了全基因组测序。该菌能够利用聚谷氨酸合成酶 PgsBCA 催化谷氨酸合成 γ -PGA, 前期研究发现 PgsBCA 合成酶活性不是该反应的限制因素。因此本研究希望通过改造谷氨酸代谢途径提高谷氨酸浓度, 从而提高 γ -PGA 产量。

利用基因组信息对 *B. amyloliquefaciens* LL3 代谢流分析发现, 谷氨酸是代谢中碳氮代谢转化的重要中间物质, 其主要由三羧酸循环 (TCA 循环) 中的 α -酮戊二酸通过谷氨酸合成酶 (GOGAT) 催化合成, 而 TCA 循环主要来自糖酵解途径中的磷酸烯醇式丙酮酸 (PEP) 和丙酮酸盐。同时, 谷氨酸盐、谷氨酰胺通过谷氨酸盐 N-乙酰转移酶、谷氨酸盐激酶 1、磷酸核糖氨基转移酶等合成精氨酸、嘌呤、脯氨酸、鸟氨酸等。因此, 本研究通过无痕基因敲除、sRNA 抑制、更换强启动子、基因过表达等方法提高 α -酮戊二酸、草酰乙酸盐等前体物质, 并且抑制或阻断谷氨酸下游代谢通路, 进而提高谷氨酸盐浓度, 从而提高 γ -PGA 产量。

通过对代谢改造菌株 *B. amyloliquefaciens* A4-2 进行发酵生产发现, γ -PGA 产量较野生菌提高了 59.9%, 这些数据说明通过谷氨酸代谢流改造提高谷氨酸浓度确实能够提高 γ -PGA 产量。

解淀粉芽孢杆菌噬菌体操纵子弱化区基因改造对胞苷代谢的影响

王梦娇 方海田* 刘慧燕 贺晓光 吴庆 杨菊梅

宁夏大学农学院, 银川 750021

摘要: 胞苷是核苷酸类保健食品和功能性食品的重要原料, 也是抗病毒、抗肿瘤和抗艾滋病药物的良好中间体。在提高发酵单位高效生产胞苷过程中噬菌体操纵子的调控对胞苷的过量合成非常关键。在噬菌体操纵子调控区域, 存在对转录起弱化作用的三个弱化子, 影响胞苷代谢中 6 个关键酶基因的表达。本实验以解淀粉芽孢杆菌为出发菌株通过基因定向改造, 采用同源重组法敲除噬菌体操纵子上弱化区基因, 研究弱化区基因改造对胞苷生物合成代谢的影响; 采用 qRT-PCR 方法, 表征基因的相对表达水平。结果表明, 弱化区基因敲除后, 使噬菌体操纵子的相对表达水平提高了约 50 倍。通过改造解淀粉芽孢杆菌噬菌体操纵子的弱化区基因, 可以改变噬菌体操纵子的转录水平, 有效地提高操纵子的表达水平, 使噬菌体操纵子过量表达和弱化区基因失活, 能够增强胞苷合成途径的代谢流量, 对胞苷的过量合成有着至关重要的作用。

参考文献

- [1] 吴庆,刘慧燕,方海田,何建国,贺晓光,于丽男,王梦娇.解淀粉芽孢杆菌高效合成胞苷的代谢调控机制及育种策略[J]. 中国生物工程杂志,2015,09:122-127
- [2] 苏静,邓培生,谢希贤,等.基于 *cdd* 基因敲除和噬菌体操纵子转移的胞苷产生菌的研究.天津科技大学学报,2010,25(5):1-5
- [3] 范晓光,李燕军. 基于分子生物学技术的胞苷生产菌的育种研究进展[J]. 发酵科技通讯,2015,01:53-57.
- [4] 方海田,周运佼,谢希贤,徐庆阳,陈宁. 大肠杆菌 *cdd* 和 *thrA* 基因的敲除及其对胞苷积累量的影响[J]. 现代食品科技. 2012(10)
- [5] 魏志强, 徐庆阳, 刘淑云. 枯草芽孢杆菌生产胞苷的途径分析[J]. 现代食品科技, 2008, 24(6) : 544-547.
- [6] FANG Haitian, XIE Xixian, XU Qingyang, et al. Enhancement of cytidine production by coexpression of *gnd*, *zwf* and *prs* genes in recombinant *Escherichia coli* CYT 15[J]. Biotechnology letters, 2013, 35(2) : 245-251.
- [7] FANG Haitian, ZHANG Chenglin, XIE Xixian et al. Enhanced cytidine production by a recombinant *Escherichia coli* strain using genetic manipulation strategies[J]. Annals of Microbiology, 2014, 64(3) : 1203-1210.

解淀粉芽孢杆菌 *pyrR* 基因敲除对胞苷生物合成的影响

吴庆 方海田* 何建国 刘慧燕 贺晓光 王梦娇 杨菊梅

宁夏大学农学院, 银川 750021

摘要: 胞苷又名胞嘧啶核苷, 是许多抗病毒、抗肿瘤和抗艾滋病药物的良好中间体, 同时也是基因工程研究的重要原材料, 因此胞苷具有非常广泛的应用前景, 胞苷的产量需求也逐年递增。微生物发酵法是一种高效生产胞苷的方法, 关键是胞苷高产菌株的选育, 以不断提高胞苷发酵水平。*pyrR* 基因编码 PyrR 调节蛋白, 在嘧啶操纵子调控机制中, PyrR 调节蛋白通过作用于 *pyr* 操纵子非翻译区域的三段转录终止位点, 即位于 *pyr* mRNA 的上游转录弱化区域内, 起到控制转录的作用。本实验以天然磷酸单酯酶活力旺盛的解淀粉芽孢杆菌为出发菌株, 采用同源重组法对 *pyrR* 基因进行敲除, 使嘧啶操纵子中调节蛋白 *pyrR* 失活, 首先分别扩增得到 *pyrR* 基因的上游同源序列和下游同源序列, 拼接到温敏型质粒 pKS1 上, 构建得到温敏型敲除质粒 pKS1-*pyrR*, 转化后验证; 采用 qRT-PCR 方法, 表征基因的相对表达水平, 考察 *pyrR* 基因对胞苷合成基因的表达与调控的影响。结果表明, 通过失活 PyrR 弱化调节蛋白, 使 UMP 无法与 PyrR 蛋白结合, 有效提高了嘧啶操纵子的转录水平, 从而提高了嘧啶操纵子下游结构基因的表达剂量, 使细胞能够过量合成并积累胞苷。

参考文献

- [1] 姜妍, 许爱军. 国内外抗病毒药物研发进展[J]. 黑龙江医药, 2006, **19**(5): 388-392.
- [2] 方海田, 周运佼, 谢希贤, 徐庆阳, 陈宁. 大肠杆菌 *cdd* 和 *thrA* 基因的敲除及其对胞苷积累量的影响[J]. 现代食品科技. 2012(**10**):1306-1310.
- [3] FANG Haitian, XIE Xixian, XU Qingyang, et al. Enhancement of cytidine production by coexpression of *gnd*, *zwf* and *prs* genes in recombinant *Escherichia coli* CYT 15[J]. Biotechnology letters, 2013, **35**(2) : 245-251.
- [4] FANG Haitian, ZHANG Chenglin, XIE Xixian et al. Enhanced cytidine production by a recombinant *Escherichia coli* strain using genetic manipulation strategies[J]. Annals of Microbiology, 2014, **64**(3) : 1203-1210.
- [5] LIU Shijie. Evolution and Genetic Engineering. 4th ed. Bioprocess Engineering, 2013, 695-741.
- [6]Seul, Keyung-Jo, Hyun-Soo Cho et al. Characterization of a PyrR-deficient mutant of *Bacillus subtilis* by a proteomic approach.Korean[J]. Microbiol. Biotechnol, 2011, **39**(1) : 9-19.

Optimization of the fermentation conditions of 1,3-propanediol from *Klebsiella* sp. ZH-1

Zhi-fang ZHAO Qing-ping HU *

College of Life Science, Shanxi Normal University, Linfen 041004 China

Abstract: 1,3-propanediol (1,3-PD) is an important chemical raw material with variety of use. It has broad in the field of cosmetics, textile, food, and medicine, etc. The main two methods for the synthesis of 1,3-PD are chemical synthesis and microbial fermentation, but microbial fermentation was widely used for green environmental protection. *Klebsiella* sp. is a kind of microorganism which can produce 1,3-PD through glycerol fermentation. In this study, the fermentation temperature, fermentation time, PH, inoculation amount and glycerol concentration of *Klebsiella* sp.ZH-1 were optimized. Data ANOVA showed that the production of 1,3-PD increased from the original 3.398g/L to 8.434g/L when the optimal fermentation culture for pH, temperature and time were determined as 7.0, 35℃, and 72h, and the inoculum amount and glycerol concentration were 10% and 10g/L, respectively. This result provided a theoretical basis to produce 1, 3-PD through microbial fermentation in a expanding way.

Key words: *Klebsiella* sp.ZH-1; 1,3-PD; fermentation conditions

发酵产生普鲁兰多糖的条件优化、菌种选育以及中间底物的初步研究

乔菊 李柏林 欧杰

上海海洋大学食品学院, 上海 201306

摘要: 普鲁兰多糖是一种天然的、水溶性的胞外多糖。它独特的线性结构使其具有独特的物理性质,能够应用于诸多领域。近年来,无论是科学界 还是工业界都更加积极地关注于开发绿色环保的天然材料。普鲁兰多糖作为一种天然无污染的高分子物质,能够被广泛应用于食品,医药,化妆品,卫生保健,农业,化学工业等方面。目前其他研究者针对课题方面的研究主要集中在利用响应面法对发酵产生普鲁兰多糖的培养基种类及配比进行优化^[1],而利用此方法对其发酵工艺条件进行优化选择的较少。针对这一现状,本文选用出芽短梗霉为发酵菌种,同时就温度、转速、初始 pH 值、装液量、时间、接种量这六个主要的发酵工艺条件进行 Plackett-Burman 实验设计和响应面法分析,利用这种优化实验条件的统计学方法,实现用较少的实验数据推算出目标值普鲁兰多糖产量的最优条件,最终有效提高优化效率^[2-3]。

关键字: 普鲁兰多糖, 发酵, Plackett-Burman 实验, 响应面法

参考文献

- [1] Ram SS,Gaganpreet KS,John FK.Pullulan:Microbial sources,production and applications[J].Carbohydrate Polymers,2008,73:515-531.
- [2] 周喻,吴文惠,苏同伟,等.响应面法优化海洋镰刀菌皮腐菌产出 HMG-CoA 还原酶抑制的培养条件[J].微生物学通报,2014,41(8):1516-1524.
- [3] Betiku E,Ezekiel A T,Modeling and optimization of bioethanol production from breadfruit starch hydrolyzate vis-a-vis response surface methodology and rtificial neural network[J].Renewable Energy,2015,74:87-94.

微生物木糖发酵产酒精代谢工程的研究进展

闫文华 欧杰

上海海洋大学食品学院

摘要：木糖发酵是生物转化木质纤维素产生酒精的关键环节，同时具有广泛的应用前景，但自然界中缺少能将木糖有效转化为乙醇的微生物。近年来，根据代谢工程原理，利用基因敲除技术对酵母进行遗传改造，减少副产物产量；或通过细胞融合技术将木糖代谢基因引入酿酒酵母，从而提高酵母的耐酒精性；或使原本可以利用多种糖底物的细菌获得选择性产生酒精的能力，构建各种不同类型的木糖发酵重组菌株。虽然这些重组菌株在木糖转化酒精方面均显示出良好的应用前景，但仍存在诸多问题。所以，有必要对木糖代谢调控机制进行系统深入的研究，改良菌种，优化发酵工艺，以实现木质纤维素高效转化为乙醇。

参考文献：

- [1] 靳艳,白凤武,等. 融合株 SPSC 发酵生产酒精的研究[J]. 酿酒科技,1996,06.
- [2] 毛华,曲音波,高培基,等. 酵母属间原生质体融合改进菌株木糖发酵性能[J]. 生物工程学报,1996, 12:157-162.
- [3] 刘健,陈洪章,李佐虎. 木糖发酵生产乙醇的研究[J]. 工业微生物,2001, 31(2): 36-37.
- [4] 徐勇,范一民,勇强,等. 木糖发酵重组菌研究进展[J]. 中国生物工程杂志,2004, 24(6):58-63.
- [5] 张颖,马瑞强,洪浩舟,等. 重组运动发酵单胞菌的构建及木糖利用特性研究. 生物技术通报, 2009,7:160-165.

高产泛酸的酿酒酵母菌株的构建

孙杰 魏春 于欣君 汪钊

浙江工业大学生物工程学院, 杭州 310014

摘要: 泛酸 (pantothenic acid), 又称遍多酸或维生素B₅, 在生物体内同腺嘌呤、核糖核酸、磷酸等生物分子组成辅酶A, 参与糖、脂肪、蛋白质及能量的代谢^[1]。动物需要从饮食中获取泛酸。D-泛酸的最大用途是作为饲料添加剂使用。目前的D-泛酸生产方法是使用立体专一性D-泛解酸内酯水解酶水解化学合成的DL-泛解酸内酯, 得到D-泛解酸, 再经过内酯化反应生成D-泛解酸内酯, 之后与 β -丙氨酸钙反应制得D-泛酸钙^[2, 3]。上述方法需要化学合成泛解酸内酯, 并且工艺复杂, 使用有机溶剂导致环境污染。

饲料工业是泛酸最主要的应用领域, 我国是饲料生产大国, 蛋白饲料供应远远不足。酿酒酵母可以补充饲料蛋白, 但是泛酸合成受到培养基中葡萄糖的抑制^[2, 3]。本研究将酿酒酵母泛酸合成途径代谢酶编码基因ECM31、YHR063c、YIL145c、FMS1去除线粒体信号肽编码序列后, 使用overlap PCR方法, 与强启动子GPM1p、TDH3p、TEF1p和PGK1p连接。利用同源序列, 使上述基因在酵母菌体内重组, 并整合在基因组上。在无泛酸培养基中, 根据植物乳杆菌增值的浑浊度, 测定工程菌72小时YPD发酵培养基中的泛酸含量, 达到2g/L。下一步将继续使用该方法增强上游合成途径的基因表达, 进一步提高酿酒酵母泛酸合成能力, 从而提供一个环境友好的饲用泛酸新来源。

参考文献

- [1] Duncan ES, Alessio C, Chris A. Coenzyme biosynthesis: enzyme mechanism, structure and inhibition. Nat Prod Rep, 2007, **24**: 1009-1026.
- [2] Kataoka M, Shimizu K, Sakamoto K, et al. Lactonohydrolase-catalyzed optical resolution of pantoyl lactone: selection of a potent enzyme producer and optimization of culture and reaction conditions for practical resolution. Applied Microbiology and Biotechnology 1995, **44**:333-338
- [3] 孙志浩;过鑫富. 产 D-泛解酸内酯水解酶的微生物及其制备 D-泛解酸的方法: 中国, CN200510123566.4. 2006.06.28
- [4] White WH, Gunyuzlu PL, Toyn JH. Saccharomyces cerevisiae is capable of de Novo pantothenic acid biosynthesis involving a novel pathway of beta-alanine production from spermine. J Biol Chem. 2001 6;276(14):10794-10800.

使用生物印迹和固定化技术提高磷脂酶 A1 的油脂脱胶能力

李哲敏 刘会 赵根海 王鹏 王丽 郑之明

中国科学院合肥科学研究院技术生物与农业工程研究所，合肥 230001

摘要：食用油脂中的磷脂会在脱溶加热等加工过程及储藏中带来异味、褐变、焦化、劣变加速等不良影响，需要通过脱磷脂（脱胶）工序除去。使用磷脂酶 A1（phospholipase A1，PLA1）特异性水解并脱除磷脂的酶法脱胶是一种经济环保，前景广阔的脱胶方法，但在非水相体系中酶活性较低，未脱溶混合油中有机溶剂强烈抑制酶活等因素限制了其应用。为改善磷脂酶 A1 在油脂精炼中的脱胶能力，对商品化磷脂酶 Lecitase Ultra 进行了生物印迹修饰。在 pH 5.0 条件下，使用 5% 卵磷脂乳液进行生物印迹，磷脂酶 A1 在正己烷溶剂中磷脂水解活性增加了 30.9 倍，底物特异性也得到了显著的提升。使用 105 倍(w/w)硅藻土载体对印迹磷脂酶 A1 进行吸附固定化，其在正己烷中的催化活性进一步提升了 129%。课题进一步研究了原始磷脂酶 A1，印迹化磷脂酶 A1 和固定印迹化磷脂酶 A1 在大豆毛油和未脱溶大豆浸提混合油脱胶（毛油含量 50%，w/w）中的表现，发现固定印迹化磷脂酶 A1 表现最佳。其在 100 mg/kg 加酶量，2% 含水量，50 ℃ 孵育 180 分钟条件下，能将毛油中含磷量从 406.mg/kg 降低到 7.3 mg/kg。在 100 mg/kg 加酶量，2% 含水量，50 ℃ 孵育 180 分钟，使用 3 M NaOH 中和的条件下，能将混合油中含磷量从 406.mg/kg 降低到 18.7 mg/kg。本课题初步实现了未脱溶浸提混合油的酶法脱胶。

产黄青霉形态突变株构建技术研究

刘会 孙小雯 赵根海 王鹏 王丽 郑之明*

中国科学院离子束生物工程学重点实验室；中国科学院合肥物质科学研究院， 合肥 230031

摘要：产黄青霉是工业上用于发酵生产青霉素的重要丝状真菌。已有研究表明青霉素的分泌与菌丝延伸速率及顶端生长有关，因此对产黄青霉进行形态学描述具有重要意义。几丁质作为真菌细胞壁的主要成分，在决定真菌形态变化相关过程如顶端生长、分支以及细胞壁分化中起重要作用。作为几丁质合成过程中最关键的酶，几丁质合成酶已成为丝状真菌形态发生研究的前沿方向。在不同的真菌中存在着一种至多种的几丁质合成酶同功酶。这些同功酶在维持细胞壁完整性，菌丝正常生长和无性孢子产生等方面起重要作用，然而产黄青霉中还未见相关的研究报道。

将产黄青霉全基因组与构巢曲霉中几丁质合成酶基因进行比对，选择其中一致性最高且编码 III 类几丁质合成酶的 *chs4* 基因作为研究对象。构建干扰载体后利用聚乙二醇介导的原生质体转化方法转化产黄青霉。RT-PCR 和 qRT-PCR 检测发现各转化株的 *chs4* 基因表达水平均有不同程度地下降。所有转化株的生长速度和孢子产生率相对于原始菌都有明显下降，暗示 *chs4* 在菌丝发育和孢子形成中有重要作用。对各菌进行摇瓶培养，发现所有转化株的菌丝生长相对于原始菌都有严重缺陷，特别是 1-17，菌丝短小膨胀且发育不良。2-1 与 2-6 菌丝都变得较为粗短且分支较多。另外，1-17 与 2-1 生长速度明显慢于其他菌，菌液很稀，菌丝多结团成球。进入发酵期后，各菌菌丝都发生缠绕形成菌丝团，缠绕紧密度由大到小依次为：1-17>2-1>2-6≥原始菌。1-17 与 2-1 很快就形成了有致密核的菌丝球，且 1-17 菌球直径明显大于 2-1。粘度检测发现原始菌的粘度一直都在上升，除了生物量变大的影响外，后期菌丝断裂也使菌液变得粘稠。转化株则是先升后降再升的趋势，原因可能是前期菌丝快速合成，生物量变高，菌球快速形成使粘度降低，后期菌丝断裂粘度又上升。青霉素效价测定显示几株转化株的青霉素产量都高于原始菌，特别是 1-17 和 2-1，产量分别比原始菌高 27% 和 41%。由此推断，形态变化对青霉素产量有重要影响，可能与菌丝的分支增多有关。另外，菌球的形成使得发酵液粘度下降，有利于氧传递和营养吸收，可能也是青霉素产量提高的一个原因。

青霉素合成过程中的菌丝形态分化是一个很复杂的问题。本文以几丁质合成酶为切入点，首次将分子生物学手段与形态代谢工程结合用于产黄青霉的形态改造，成功获得了高产优良形态突变株。如果以上研究结果也适用于其他工业菌的话，将为丝状菌发酵改善产量提供一种快捷便宜的方法。

Improvement of Vitamin K₂ Production by *Bacillus subtilis* (*natto*) with γ irradiation

Li wang Zhiming zheng Peng wang Genhai zhao Hui liu Xiaojuan sun Han wang
Hefang wu

Key Lab of Ion Beam Bioengineering, Hefei Institutes of Physical Science,
Chinese Academy of Sciences, Hefei 230031, China

Abstract: γ ray irradiation as a novel mutagen has been increasingly applied in the microbial mutagenesis for its higher mutation frequency and wider mutation spectra. In this work, *Bacillus subtilis*(*natto*) cells were exposed to γ ray radiation and the cell survival rate and yield of vitamin K₂ were investigated. Optimization of process parameters under submerged fermentation was carried out to improve the vitamin K₂ yield of mutant N1A-13. Mutation resulted in 2.76-fold higher production of vitamin K₂ than that of the original strain. That was achieved by four successive radiation under the conditions of 100Gy. A further optimization increased the yield of the mutant which occurred in the mutant prescreened by 50 mg/L hydroxynaphthoate added to the selection plate and cultivated at 37 °C, pH 7.0 and 240 rpm for 144 h. The results showed that the γ ray irradiation mutations, optimizing process parameters and prescreened by hydroxynaphthoate were effective methods to enhance vitamin K₂ production.