

高效启动子在微生物生产 4-羟基丁酸中的应用

周琴, 陈金春, 陈国强

清华大学生命科学学院, 北京 100084

周琴, 陈金春, 陈国强. 高效启动子在微生物生产 4-羟基丁酸中的应用. 生物工程学报, 2012, 28(1): 48-55.

Zhou Q, Chen JC, Chen GQ. Application of high efficiency promoters in microbial production of 4-hydroxybutyric acid. Chin J Biotech, 2012, 28(1): 48-55.

摘要: 4-羟基丁酸 (4HB) 是一种精神类药物, 还可用于合成聚-4-羟基丁酸酯 (P4HB)、聚 (3-羟基丁酸酯-co-4-羟基丁酸酯) (P3HB4HB) 等聚合物。在醇脱氢酶 (DhaT) 和醛脱氢酶 (AldD) 的共同作用下, 1,4-丁二醇 (BD) 可转化为 4-羟基丁酸。通过引入 T7 和 P_{Re} 两种高效启动子, 加强了 *dhaT* 和 *aldD* 基因的表达, 促进合成 4-羟基丁酸的反应进行。同时还研究了底物 1,4-丁二醇的浓度对 4HB 生产的影响。结果表明: 提供 10 g/L 的 1,4-丁二醇, 受 P_{Re} 启动子调控的重组菌 *A. hydrophila* 4AK4 (pZQ01) 可生产 6.00 g/L 的 4-羟基丁酸, 比对照组提高 43.20%; 而受 T7 启动子调控的重组菌 *A. hydrophila* 4AK4 (pZQ04) 可生产 4.87 g/L 4-羟基丁酸, 比对照组提高 16.23%。意味着 T7 和 P_{Re} 这两种启动子确实发挥了提高基因表达水平的作用, 加速了 4-羟基丁酸的生物合成。

关键词: 4-羟基丁酸, 1,4-丁二醇, 重组嗜水气单胞菌, 启动子, 生物合成

Application of high efficiency promoters in microbial production of 4-hydroxybutyric acid

Qin Zhou, Jinchun Chen, and Guoqiang Chen

School of Life Science, Tsinghua University, Beijing 100084, China

Abstract: 4-hydroxybutyric acid (4HB) is a psychotropic drug used for polymer synthesis such as poly (4-hydroxybutyric acid) (P4HB) and poly (3-hydroxybutyric acid-co-4-hydroxybutyric acid) (P3HB-co-4HB). 1,4-butanediol (BD) can be converted to 4-hydroxybutyric acid by alcohol dehydrogenase (DhaT) and aldehyde dehydrogenase (AldD). In this study, high

Received: May 20, 2011; **Accepted:** June 8, 2011

Supported by: National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2010AA101607).

Corresponding author: Guoqiang Chen. Tel: +86-10-62783844; Fax: +86-10-62794217; E-mail: chengq@mail.tsinghua.edu.cn.

Jinchun Chen. Tel: +86-10-62788784; Fax: +86-10-62794217; E-mail: chenjc@mail.tsinghua.edu.cn.

国家高技术研究发展计划 (863 计划) (No. 2010AA101607) 资助。

efficiency promoters including T7 promoter and P_{Re} promoter were cloned to increase expression of *dhaT* and *aldD*, and thus accelerate the conversion from BD to 4HB. *A. hydrophila* 4AK4 (pZQ01), the recombinant strain under the control of T7 promoter, produced 6.00 g/L 4HB from 10 g/L BD with the productivity increased by 43.20%. While *A. hydrophila* 4AK4 (pZQ04), the strain under the control of T7 promoter, produced 4.87 g/L 4HB from 10 g/L BD, and the productivity was increased by 16.23%. Thus, the gene expression was increased by T7 and P_{Re} promoters, leading to an accelerated biosynthesis of 4HB.

Keywords: 4-hydroxybutyric acid, 1,4-butanediol, recombinant *Aeromonas hydrophila*, promoter, biosynthesis

4-羟基丁酸, 又称 γ -羟基丁酸, 简称 GHB 或 4HB。它能促进生长素释放, 并对中枢神经系统有较强的抑制作用, 是一种二类精神药物^[1-3]。临床上可将它作为附加麻醉剂和催眠剂用于手术操作。4-羟基丁酸对酒精戒断症候群和睡眠障碍 (如嗜睡) 也有一定的治疗效果^[4-5]。研究还发现, 4HB 很可能是一种抑制性的递质^[6]。因此, 4HB 在医学上有重要的潜在应用价值。

此外, 4-羟基丁酸可作为前体, 用来合成聚羟基脂肪酸酯 (PHA)^[7-9]。其中聚 4-羟基丁酸 (P4HB) 具有韧性强、熔点低、易进行材料加工等特点^[10-12], 且 P4HB 比 P3HB 更容易被脂肪酶或酯酶降解, 可用作补片材料、人造血管、缝合线等医用材料^[13-15]。4-羟基丁酸作为一种微生物合成聚合物的 4HB 前体来源, 相对于 1,4-丁二醇、 γ -丁内酯, 其利用效率更高, 且产物中 4HB 的含量也更高。现已发现许多微生物中存在 4HB 特异性的辅酶 A 转移酶基因, 如 *orfZ*^[16-17]。因此 4HB 对于 P4HB、P3HB4HB 等聚合物的合成, 也起着重要作用。

尽管 4-羟基丁酸在医学和生化领域都具有重要研究价值, 但它属于管控药物, 且价格昂贵, 因此 4HB 的来源成为限制 4HB 相关研究的重要因素。目前 4-羟基丁酸主要以石油类为底物通过化学方法生产^[18]。2009 年张磊等报道了利用来源于铜绿假单胞菌 *Pseudomonas aeruginosa* 的醇

脱氢酶 (DhaT) 和醛脱氢酶 (AldD), 将 1,4-丁二醇转化进而转化为 4-羟基丁酸的方法^[19]。转化反应中, 1,4-丁二醇在醇脱氢酶的催化作用下转化为 4-羟基丁醛, 经醛脱氢酶作用进一步转化为 4-羟基丁酸。该合成途径相对于化学方法具有产率高、污染小、产物易分离等优点, 并已成功用于 P4HB 的合成。

以上研究中的 *dhaT* 和 *aldD* 基因受来源于大肠杆菌的 *lac* 启动子的调控。相对于 *lac* 启动子, T7 启动子能够启动高效表达, 并且已经广泛用于大肠杆菌表达系统。该启动子专一受控于 T7 RNA 聚合酶, 在引入了外源 T7 RNA 聚合酶的大肠杆菌中, 它能有效提高基因表达水平^[20]。大肠杆菌 *E. coli* BL21 (DE3) 是一种适用于 T7 启动子表达系统的菌株, 在 IPTG (β -半乳糖苷酶) 的诱导下, BL21 菌株能够高效表达目的基因^[21]。而来源于真氧产碱杆菌 *Ralstonia eutropha* 中 *phbCAB* 操纵子的 P_{Re} 启动子也有相似的功能, 不同于 T7 启动子不同的是, 该启动子不受外源物质的调控即可发挥作用^[22-23]。

1 材料与方法

1.1 菌株

嗜水气单胞菌 *Aeromonas hydrophila* 4AK4 (pZL-dhaT-aldD) 为清华大学微生物实验室保存。

1.2 培养基及培养条件

质粒构建和结合转化所用的大肠杆菌以及嗜水气单胞菌均用 LB 培养基培养。根据菌株和质粒的抗性在培养基灭菌冷却后添加抗生素。氨苄青霉素浓度为 100 mg/L, 卡那霉素为 50 mg/L。底物 1,4-丁二醇在灭菌前加入培养基。

大肠杆菌的培养条件为 37 °C, 48 h; 嗜水气单胞菌的培养条件为 30 °C, 48 h; 摇床转速均为 200 r/min (太仓市试验设备厂; HYG-A 型)。

1.3 重组菌株的构建

克隆 P_{Re} 启动子序列, 构建到 pZL-dhaT-aldD 质粒中并取代原有的 *lac* 启动子, 得到 pZQ01 (图 1)。

T7 启动子需要在 T7 RNA 聚合酶的作用下才能高效启动表达, 于是分别克隆 T7 启动子以及 T7 RNA 聚合酶的序列, 共同构建到切除了 *lac* 启动子的 pZL-dhaT-aldD 载体中, 得到 pZQ04 (图 1)。

将 pZQ01 和 pZQ04 通过电转化方法转入 *E. coli* S17-1 感受态中, 然后再通过接合转化方法转入 *A. hydrophila* 4AK4, 分别得到重组菌 *Aeromonas hydrophila* 4AK4 (pZQ01) 和 *Aeromonas hydrophila* 4AK4 (pZQ04)。

1.4 4-羟基丁酸分析方法

4-羟基丁酸的分析方法参见文献[24], 具体操作与 PHA 的检测步骤基本相同, 但所用样品为菌液离心后所得的上清, 将上清冰干并酯化后进行气相色谱分析。

2 结果与分析

2.1 重组菌株 *A. hydrophila* 4AK4 (pZQ01) 和 *A. hydrophila* 4AK4 (pZQ04) 生产 4-羟基丁酸

以 4AK4 (pZL-dhaT-aldD) 为对照组, 在 1,4-丁二醇浓度为 10 g/L 的条件下生产 4-羟基丁酸, 验证 T7 和 P_{Re} 启动子对底物转化的影响 (表 1)。

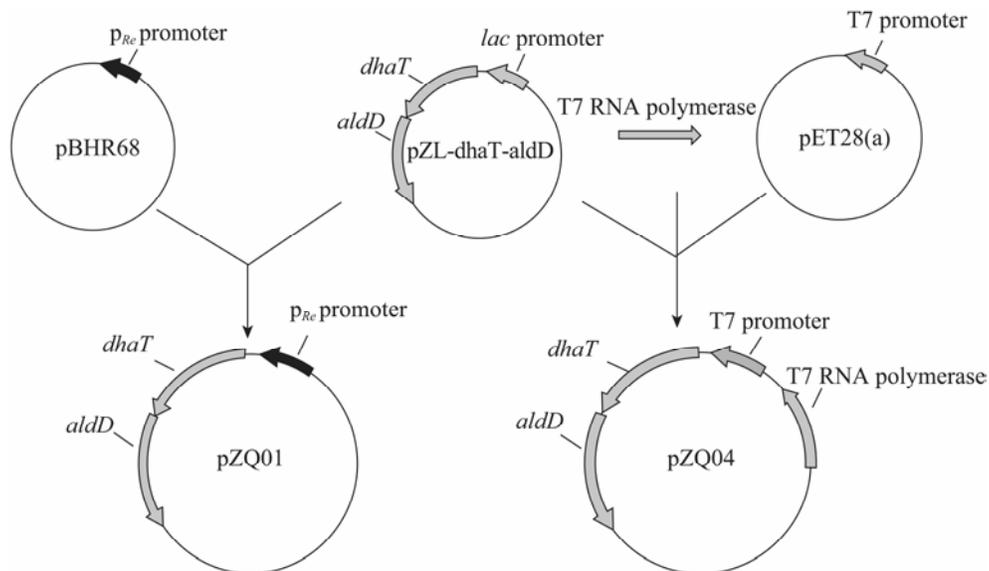


图 1 pZQ01 和 pZQ04 的构建

Fig. 1 Construction of pZQ01 and pZQ04.

表 1 *A. hydrophila* 4AK4 (pZQ01) 和 *A. hydrophila* 4AK4 (pZQ04) 以及对照菌株生产 4-羟基丁酸
Table 1 Production of 4-hydroxybutyric acid by *A. hydrophila* 4AK4 (pZQ01), *A. hydrophila* 4AK4 (pZQ04), and the control strain

Strains	CDW (g/L)	4HB (g/L)	Consumption ratio (%)
4AK4 (ZQ01)	3.88±0.07	6.00±0.08	51.94
4AK4 (pZQ04)	3.79±0.03	4.87±0.04	42.16
4AK4 (pZL-dhaT-aldD)	3.65±0.03	4.19±0.09	36.27

Strains were cultured at 30 °C for 48 h. 10 g/L 1,4-butanediol was added into medium before sterilization. pZQ01 harbored P_{Re} promoter, and pZQ04 harbored T7 promoter. CDW: cell dry weight.

同条件下, 对照组 *A. hydrophila* 4AK4 (pZL-dhaT-aldD) 的 4-羟基丁酸产量为 4.19 g/L, 而受 P_{Re} 调控的 *A. hydrophila* 4AK4 (pZQ01) 的 4-羟基丁酸产量提高到 6.00 g/L, 产出速率为 0.125 g/(L·h), 比对照菌株提高 43.20%。经过 48 h 的培养, 51.94% 的 1,4-丁二醇被重组菌转化成 4-羟基丁酸。以上结果表明, 引入 P_{Re} 启动子使重组菌转化 1,4-丁二醇的速度加快, 促进了 4-羟基丁酸的合成。

受 T7 启动子调控的 *A. hydrophila* 4AK4 (pZQ04) 最终产出 4.87 g/L 4-羟基丁酸, 产量比对照菌株提高了 16.23%, 全程中 42.16% 的 1,4-丁二醇被消耗。尽管 4HB 产量比对照组也有一定提高, 但明显低于 P_{Re} 调控下的实验组产量, 说明 T7 启动子对基因表达的促进程度有限。推测此结果可能与 T7 RNA 聚合物酶基因在质粒上的表达水平有关, 可通过将 pZQ04 质粒转化到 *E. coli* BL21 (DE3) 或其他含有 T7 RNA 聚合酶的受体菌中进行表达, 确保 T7 启动子的功能。

综上, P_{Re} 和 T7 启动子通过提高基因的表达水平, 促进 1,4-丁二醇转化。

此外, 表 1 中的细胞干重与 4-羟基丁酸浓度呈正相关。可能是因为质粒基因的高效表达加速

了 1,4-丁二醇的消耗, 使 1,4-丁二醇对细胞生长的抑制作用削弱。

相对于对照菌株, 两株重组菌转化 1,4-丁二醇的速率 (菌株培养时间相同) 均提高。增加底物浓度可能促进转化反应进行, 进而促进 4-羟基丁酸的产生。然而, 由于 1,4-丁二醇具有一定毒性, 高浓度的 1,4-丁二醇对细胞生长的抑制作用也更强, 可能使菌体浓度以及质粒量降低, 从而导致 4-羟基丁酸的产量降低。下面通过浓度梯度实验, 分析 1,4-丁二醇浓度对重组菌生产 4-羟基丁酸的影响。

2.2 1,4-丁二醇浓度对重组菌 *A. hydrophila* 4AK4 (pZQ01) 生产 4-羟基丁酸的影响

分别在 10~40 g/L 的 1,4-丁二醇浓度下培养重组菌, 分析细胞干重、产物浓度以及单位细胞的 4HB 产量 (4HB 产量与细胞干重之比, 即 4HB/CDW) 随时间的变化趋势 (图 2)。

高浓度的 1,4-丁二醇对 *A. hydrophila* 4AK4 (pZQ01) 产生强烈的抑制作用, 其细胞干重随着 1,4-丁二醇浓度升高明显降低。1,4-丁二醇为 20 g/L 时, 细胞干重仅为 10 g/L 1,4-丁二醇培养条件下细胞干重的 65%。而 4HB 产量和 BD 的消

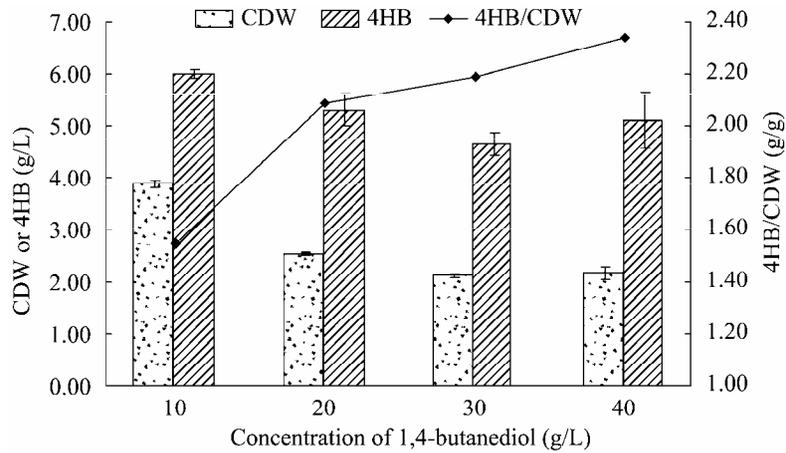


图2 不同浓度的1,4-丁二醇对 *A. hydrophila* 4AK4 (pZQ01) 生产4-羟基丁酸的影响

Fig. 2 Effect of 1,4-butanediol concentration on production of 4-hydroxybutyric acid by *A. hydrophila* 4AK4 (pZQ01). *A. hydrophila* 4AK4 (pZQ01) was cultivated in LB medium containing 1,4-butanediol, with its concentration varying from 10 g/L to 40 g/L. 4HB/CDW represented the 4HB productivity per cell.

耗比率也随底物浓度升高而降低。其中4HB产量从6.00 g/L降低到5.10 g/L,而BD的消耗比率从51.94%降低到11.04%。增加底物供应,并不利于 *A. hydrophila* 4AK4 (pZQ01) 转化1,4-丁二醇。

图中的4HB/CDW-BD浓度曲线却表明单位细胞的4HB产量(4HB/CDW)随着底物浓度上升而增加。菌株在含有40 g/L 1,4-丁二醇的培养基中培养时,单位细胞的4HB产量达到2.34 g/g,而底物为10 g/L时单位细胞的4HB产量仅为1.55 g/g。此结果表明,增加底物浓度虽然使 *A. hydrophila* 4AK4 (pZQ01) 细胞总量降低,但也促进了转化反应进行,致使单位细胞的4HB产量增加。

2.3 1,4-丁二醇浓度对 *A. hydrophila* 4AK4 (pZQ04) 生产4-羟基丁酸的影响

同样,在10~40 g/L的1,4-丁二醇条件下培

养受T7启动子调控的重组菌 *A. hydrophila* 4AK4 (pZQ04),检测细胞干重、4HB产量以及单位细胞的4HB产量与底物浓度的变量关系(图3)。

对于 *A. hydrophila* 4AK4 (pZQ04),随着1,4-丁二醇浓度升高,4-羟基丁酸产量呈上升趋势,最高达6.03 g/L。1,4-丁二醇的消耗比率从42.16%降低到13.05%。而该菌株的细胞干重并没有表现出明显的变化,即使在40 g/L底物条件下,其细胞干重(3.56 g/L)与10 g/L底物条件下的细胞干重(3.79 g/L)相比,也没有显著降低。说明该重组菌对1,4-丁二醇的耐受性相对较强。

从单位细胞的4HB产量-BD浓度曲线可看出,提高1,4-丁二醇浓度同样也促进 *A. hydrophila* 4AK4 (pZQ04) 转化1,4-丁二醇,但相同条件下,单位 *A. hydrophila* 4AK4 (pZQ04) 细胞的4HB产量明显低于受 P_{Re} 启动子调控的 *A. hydrophila* 4AK4 (pZQ01)。

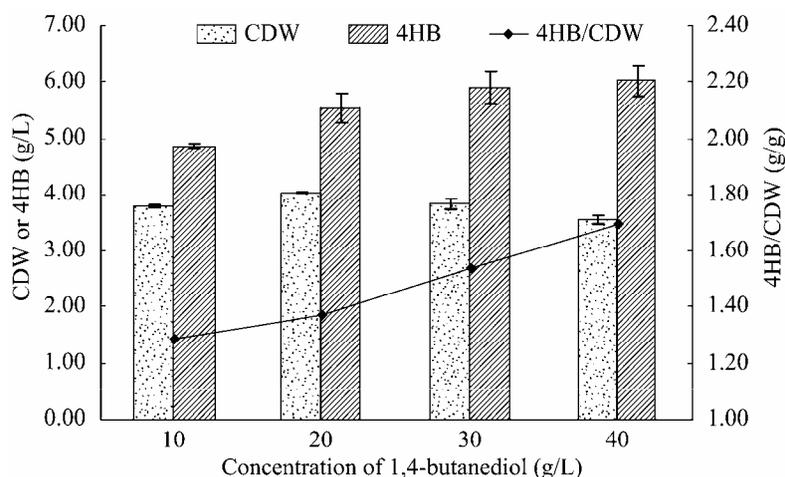


图 3 不同浓度的 1,4-丁二醇对 *A. hydrophila* 4AK4 (pZQ04) 生产 4-羟基丁酸的影响

Fig. 3 Effect of 1,4-butanediol concentration on production of 4-hydroxybutyric acid by *A. hydrophila* 4AK4 (pZQ04). *A. hydrophila* 4AK4 (pZQ04) was cultivated in LB medium containing 1,4-butanediol, with its concentration varying from 10 g/L to 40 g/L. 4HB/CDW represented the 4HB productivity per cell.

底物浓度变化对 *A. hydrophila* 4AK4 (pZL-dhaT-aldD) 的影响与其对 *A. hydrophila* 4AK4 (pZQ04) 的作用相似, 前面已证明对照菌株转化 1,4-丁二醇的效率低于含高效启动子的重组菌, 因此这里未呈现关于底物浓度影响 *A. hydrophila* 4AK4 (pZL-dhaT-aldD) 积累 4HB 的具体结果。

综上, 提高 1,4-丁二醇浓度能够提高单位细胞的 4HB 产量, 但由于其毒性对细胞生长的抑制, 使细胞量 (细胞干重) 降低。研究中发现, 对高浓度 1,4-丁二醇耐受性差的 *A. hydrophila* 4AK4 (pZQ01) 转化生成的 4HB 总产量随底物浓度升高而降低, 而耐受性相对较强的 *A. hydrophila* 4AK4 (pZQ04) 的 4HB 产量则与底物浓度呈正相关的趋势。综合考虑底物消耗比率、成本及 4HB 产量, 扩大生产中适宜用 *A. hydrophila* 4AK4 (pZQ01) 作生产菌, 1,4-丁二醇

浓度宜设为 10 g/L。

由于细胞量直接影响质粒量, 进而影响脱氢酶的表达量, 还可通过底物流加、采用碳源丰富的培养基等方法促进细胞生长从而提高 4HB 产量。

充足的前体供应为 P3HB4HB、P4HB 及其他潜在的聚合物奠定了基础。可将含有 4HB 的上清供给 PHA 合成菌以生产 PHA, 也可将 pZQ01 与含有 PHA 合成相关基因的质粒共转, 实现一步法生产聚合物, 简化生产工艺并降低成本。

3 结论

本研究在重组嗜水气单胞菌 *A. hydrophila* 4AK4 (pZL-dhaT-aldD) 中分别引入了高效启动子——T7 启动子和 P_{Re} 启动子, 提高了 1,4-丁二醇的转化速率和 4HB 产量。其中, *A. hydrophila* 4AK4 (pZQ01) 在 10 g/L 1,4-丁二醇条件下可产

出 6 g/L 4-羟基丁酸, 产出速率为 0.125 g/(L·h), 51.9% 的底物被消耗, 比对照菌 *A. hydrophila* 4AK4 (pZL-dhaT-aldD) 提高 43.29%。而受 T7 启动子诱导的重组菌 *A. hydrophila* 4AK4 (pZQ04) 其 4HB 产量也有一定提高。通过摇瓶实验分析了 1,4-丁二醇浓度对重组菌 *A. hydrophila* 4AK4 (pZQ01) 及 *A. hydrophila* 4AK4 (pZQ04) 生产 4HB 的影响。结果表明, 提高底物浓度促进单位细胞的 4HB 产量提高, 但抑制细胞生产, 使细胞干重降低。综合考虑生产成本、产出效率, 宜采用 *A. hydrophila* 4AK4 (pZQ01) 在 10 g/L 1,4-丁二醇的条件下进行生产转化。此外, 可将 pZQ01 与含有 PHA 合酶、3-羟烷基辅酶 A 转移酶 (或合成酶) 的质粒共转, 用于聚合物合成。

REFERENCES

- [1] Liu W, Shen M, Liu XQ, et al. Study on distribution and distribution of GHB in biological fluids and tissues of acute poisoned rats. *J Foren Med*, 2006, 22(1): 55-57.
刘伟, 沈敏, 刘晓茜, 等. γ -羟基丁酸在急性中毒大鼠体液和组织中的检测及分布. *法医学杂志*, 2006, 22(1): 55-57.
- [2] Couper FJ, Logan BK. Determination of γ -hydroxybutyrate (GHB) in biological specimens by gas chromatography mass spectrometry. *J Anal Toxicol*, 2000, 24(1): 1-7.
- [3] Tunnicliff G. Sites of action of gamma-hydroxybutyrate (GHB)-a neuroactive drug with abuse potential. *J Toxicol Clin Toxicol*, 1997, 35(6): 581-590.
- [4] Takahara J, Yunoki S, Yakushiji W, et al. Stimulatory effects of gamma-hydroxybutyric acid on growth hormone and prolactin release in humans. *J Clin Endocrinol Metab*, 1977, 44(5): 1014-1017.
- [5] Trendelenburg G, Strohle A. γ -hydroxybutyrate-a neurotransmitter, medicine, and drug. *Nervenarzt*, 2005, 76(7): 832-838.
- [6] Song RL. The effect of γ -hydroxybutyric acid as a transmitter in central nervous system. *Chem Life*, 1989, 9(1): 18-20.
朱荣林. γ -羟基丁酸在中枢神经系统中的递质作用. *生命的化学*, 1989, 9(1): 18-20.
- [7] Song SS. Studies on production of poly (4-hydroxybutyric acid) by recombinant strain of *Escherichia coli*. *Microbiol China*, 2002, 29(1): 10-14.
宋水山. 利用重组大肠杆菌产聚-4-羟基丁酸的研究. *微生物学通报*, 2002, 29(1): 10-14.
- [8] Song SS, Hein S, Steinbüchel A. Production of poly (4-hydroxybutyric acid) by fed-batch cultures of recombinant strains of *Escherichia coli*. *Biotechnol Lett*, 1999, 21(3): 193-197.
- [9] Saito Y, Nakamura S, Hiramitsu M, et al. Microbial synthesis and properties of poly (3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate). *Polym Int*, 1996, 39(3): 169-174.
- [10] Ishida K, Wang Y, Inoue Y. Comonomer unit composition and thermal properties of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate)s biosynthesized by *Ralstonia eutropha*. *Biomacromolecules*, 2001, 2(4): 1285-1293.
- [11] Hein S, Söhling B, Gottschalk G, et al. Biosynthesis of poly (4-hydroxybutyric acid) by recombinant strains of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett*, 1997, 153(2): 411-418.
- [12] Mukai K, Doi Y, Sema Y, et al. Substrate specificities in hydrolysis of polyhydroxyalkanoates by microbial esterases. *Biotechnol Lett*, 1993, 15(6): 601-604.
- [13] Wu Q, Wang Y, Chen GQ. Medical application of microbial biopolyesters polyhydroxyalkanoates. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol*, 2009, 37(1): 1-12.
- [14] Martin DP, Williams SF. Medical applications of poly-4-hydroxybutyrate: a strong flexible absorbable biomaterial. *Biochem Eng J*, 2003,

- 16(2): 97–05.
- [15] Zhang YF, Tian L, Song SS. Microbial synthesis and medical application of poly-4-hydroxybutyrate. *Eng Plast Appl*, 2011, 39(1): 48–52.
张岩峰, 田立, 宋水山. 聚-4-羟基丁酸的微生物合成及医学应用. *工程塑料应用*, 2011, 39(1): 48–52.
- [16] Song SS, Hein S, Steinbüchel A. Production of poly (4-hydroxybutyric acid) by fed-batch cultures of recombinant strains of *Escherichia coli*. *Biotechnol Lett*, 1999, 21(3): 193–197.
- [17] Satoh Y, Murakami F, Tajima K, et al. Enzymatic synthesis of poly (3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) with CoA recycling using polyhydroxyalkanoate synthase and acyl-CoA synthetase. *J Biosci Bioeng*, 2005, 99(5): 508–511.
- [18] Efe C, Straathof AJJ, van der Wielen LAM. Options for biochemical production of 4-hydroxybutyrate and its lactone as a substitute for petrochemical production. *Biotechnol Bioeng*, 2008, 99(6): 1392–1406.
- [19] Zhang L, Shi ZY, Wu Q, et al. Microbial production of 4-hydroxybutyrate, poly-4-hydroxybutyrate, and poly (3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) by recombinant microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2009, 84(5): 909–916.
- [20] Studier FW, Moffatt BA. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol*, 1986, 189(1): 113–130.
- [21] Chao YP, Law WS, Chen PT, et al. High production of heterologous proteins in *Escherichia coli* using the thermo-regulated T7 expression system. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2002, 58(4): 446–453.
- [22] Chung A, Liu Q, Ouyang SP, et al. Microbial production of 3-hydroxydodecanoic acid by *pha* operon and *fadBA* knockout mutant of *Pseudomonas putida* KT2442 harboring *tesB* gene. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2009, 83(3): 513–519.
- [23] Zheng Z, Li M, Xue XJ, et al. Mutation on N-terminus of polyhydroxybutyrate synthase of *Ralstonia eutropha* enhanced PHB accumulation. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2006, 72(5): 896–905.
- [24] Yang YH, Jiang L, Yang SL, et al. Site-directed mutagenesis and effects on the enzymatic properties of Subtilisin E. *Chin J Biotech*, 2000, 16(3): 341–344.
杨永华, 蒋岚, 杨胜利, 等. 枯草蛋白酶 E 的定点突变及其对酶性质的影响. *生物工程学报*, 2000, 16(3): 341–344.