

研究报告

聚羟基丁酸路径在克雷伯氏菌中的构建

郭晓晨^{1,2}, 刘宏娟², 王艳萍¹, 张建安², 刘德华³

1 天津科技大学 食品工程与生物技术学院, 天津 300457

2 清华大学 核能与新能源技术研究院, 北京 100084

3 清华大学 化工系, 北京 100084

郭晓晨, 刘宏娟, 王艳萍, 等. 聚羟基丁酸路径在克雷伯氏菌中的构建. 生物工程学报, 2013, 29(10): 1504-1514.

Guo XC, Liu HJ, Wang YP, et al. Construction of polyhydroxybutyrate pathway in *Klebsiella pneumoniae*. Chin J Biotech, 2013, 29(10): 1-11.

摘要: 以生物柴油的副产物甘油生产高附加值的 1,3-丙二醇, 现已成为提升生物柴油产业链经济性的重要途径, 而中间代谢产物 3-羟基丙醛积累造成细胞死亡, 发酵异常终止是生物法生产 1,3-丙二醇过程中的关键问题。不同于传统的降低 3-羟基丙醛积累的思路, 本文从增强克雷伯氏菌对 3-羟基丙醛的抗逆性出发, 改善克雷伯氏菌 1,3-丙二醇的生产性能, 首次将聚羟基丁酸路径引入克雷伯氏菌中, 构建了新型基因工程菌, 并对其 1,3-丙二醇发酵性能及聚羟基丁酸代谢进行了初步的研究。经 IPTG 诱导, 工程菌中检测到聚羟基丁酸, 其含量随 IPTG 浓度增加而增大。优化的 IPTG 浓度为 0.5 mmol/L。初始甘油 50 g/L 时, 野生菌可正常发酵生产 1,3-丙二醇, 1,3-丙二醇浓度达到 22.1 g/L, 其质量得率为 46.4%。当初始甘油达到 70 g/L 时, 由于高浓度 3-HPA 积累, 野生菌发酵终止, 而工程菌可正常发酵生产 1,3-丙二醇, PDO 产量可达 31.3 g/L, 其质量得率为 43.9%。同时检测到聚羟基丁酸积累。研究结果有助于加深对克雷伯氏菌 1,3-丙二醇代谢机理的认识, 为克雷伯氏菌的进一步优化提供了新的思路。

关键词: 1,3-丙二醇, 克雷伯氏菌, 3-羟基丙醛, 聚羟基丁酸

Received: June 24, 2013; **Accepted:** September 29, 2013

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 21106078).

Corresponding author: Hongjuan Liu. Tel/Fax: +86-10-89796086; E-mail: liuhongjuan@tsinghua.edu.cn

国家自然科学基金 (No. 21106078) 资助。

Construction of polyhydroxybutyrate pathway in *Klebsiella pneumoniae*

Xiaochen Guo^{1,2}, Hongjuan Liu², Yanping Wang¹, Jian'an Zhang², and Dehua Liu³

¹ College of Food Engineering and Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China

² Institute of Nuclear and New Energy Technology, Tsinghua University, Beijing 100084, China

³ Department of Chemical Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China

Abstract: 1,3-propanediol production with the byproduct of biodiesel production is important to increase the economic benefit of biodiesel industry. Accumulation of 3-hydroxypropionaldehyde is one of the key problems in the 1,3-propanediol fermentation process, leading to the cell death and the fermentation abnormal ceasing. Different from the traditional way of reducing the accumulation of the 3-hydroxypropionaldehyde, we introduced the polyhydroxybutyrate pathway into the *Klebsiella pneumoniae* for the first time to enhance the tolerance of *K. pneumoniae* to 3-hydroxypropionaldehyde, at the same time, to improve the 1,3-propanediol production. Plasmid pDK containing phbC, phbA, phbB gene was constructed and transformed into *K. pneumoniae* successfully. PHB was detected in the engineered *K. pneumoniae* after IPTG induction and its content enhanced with the IPTG concentration increasing. The optimized IPTG concentration was 0.5 mmol/L. The constructed *K. pneumoniae* could produce 1,3-propanediol normally, at the same time accumulate polyhydroxybutyrate. With the constructed strain, the fermentation proceeds normally with the initial glucose was 70 g/L which the wild type strain stopped growing and the fermentation was ceasing; 1,3-propanediol concentration and yield reached 31.3 g/L and 43.9% at 72 h. Our work is helpful for the deep understanding of 1,3-propanediol metabolic mechanism of *Klebsiella pneumoniae*, and also provides a new way for strain optimization of *Klebsiella pneumoniae*.

Keywords: 1,3-propanediol, *Klebsiella pneumoniae*, 3-hydroxypropionaldehyde, polyhydroxybutyrate

1,3-丙二醇(PDO)是一种重要的化工原料, 具有独特的对称结构, 可用于医药工业、汽车工业、印染工业等。目前 PDO 最重要的用途是用作新型聚酯聚对苯二甲酸丙二醇酯 (PTT) 的单体^[1]。PTT 是继上世纪 50 年代聚对苯二甲酸乙二醇酯 (PET)、70 年代聚对苯二甲酸丁二醇酯 (PBT) 之后实现工业规模的新型可成纤聚酯高分子材料, 是一种极有发展前途的新型聚酯材料。生物法生产 1,3-丙二醇具有发酵条件温和, 较易操作; 选择性好, 副产物少, 易于分离纯化以及可以利用成本较低的可再生资源等优点, 具有较好的发展前景。近年来, 以生物柴油的主要副产物甘油生产高附加值的 1,3-丙二醇^[2-5], 已成为提升生物柴油产业链经济性

的重要途径。

在 PDO 的生产菌中, 克雷伯氏菌 *Klebsiella pneumoniae* 具有较高的底物转化率和 PDO 生产强度^[6-7], 近年来受到国内外研究者的广泛关注。3-羟基丙醛 (3-HPA) 是 *K. pneumoniae* PDO 代谢的中间产物, 但 3-HPA 又具有细胞毒性, 高浓度 3-HPA 积累导致细胞死亡, 发酵异常终止^[8-10]。近年来, 人们采用不同途径对 3-HPA 积累的问题进行了研究。一方面, 通过工艺调控来降低 3-HPA 积累(ZL200710063347.0), 另一方面通过基因工程手段降低菌种的 3-HPA 积累^[11-13]。降低 3-HPA 积累虽能降低 3-HPA 对细胞的毒害, 但由于 3-HPA 也是 PDO 代谢的中间产物, 因此, PDO 的产量也会随之而降低。

聚 β -羟基丁酸酯(PHB)是微生物在不平衡生长条件下作为碳源和能源的储备物而贮存于细胞内的一种高分子聚合酯类^[14],是最广泛、结构最简单的一种聚羟基脂肪酸酯(Polyhydroxyalkanoic acids, 简称 PHA),其单体是 3-羟基脂肪酸,在自然界中可被多种微生物合成^[15]。PHA 作为生物可降解塑料的应用已有广泛报道^[16],而 PHA 与微生物抗逆的相关研究近年来也引起了研究者的关注。许多 PHA 合成菌能够在有机物以及重金属离子污染区生存,这提示我们 PHA 可能与细菌的抗逆能力有一定的关系^[17-18]。自 Satoh 等率先提出活性污泥积累 PHA 的可能性开始^[18-20],活性污泥法合成 PHB 工艺已日趋成熟^[21]。Nancy 等分离出一株耐高温能力很强的假单胞菌,其耐受程度与自身 PHA 的积累程度相关^[14]。Nicolaps 等发现假单胞菌 *Pseudomonas* p11423 对低温的耐受能力很强,此菌表现出高水平的 PHB 累积量^[22]。Lopez 等研究了具有 PHB 合成能力的巨大芽胞杆菌 *Bacillus megaterium* 和罗尔斯通氏菌 *Ralstonia eutropha* 及其相应 PHB 合成缺陷型突变株,结果表明缺陷株的生存能力明显减弱^[23]。Kadouri 等的研究表明原始菌较 PhaZ 缺失型突变株具有更高的生长速率,而且对饥饿、渗透压、热激、紫外照射等不利因素的抗逆程度也更高^[24]。

上述研究表明 PHB 路径可能增强菌株的抗逆能力。因此,本文首次将 PHB 路径引入克雷伯氏菌中,以增强克雷伯氏菌对 3-HPA 的抗逆性,改进克雷伯氏菌 PDO 的生产性能。本研究有助于加深对克雷伯氏菌 PDO 代谢机理的认识,同时也为解决 3-羟基丙醛积累造成 1,3-丙二醇发酵过程异常中断的难题提供了新的思路

和方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种与质粒

本文所用的菌株与质粒如表 1 和表 2 所示。

1.1.2 培养基

Luria-Bertani(LB) 液体培养基:酵母浸粉 5 g, 蛋白胨 10 g, NaCl 10 g, 去离子水定容至 1 L, 用 NaOH 调节 pH 7.0~7.2, 121 °C 高压蒸汽灭菌 20 min。

LB 固体培养基:在 LB 液体培养基灭菌前加入 10~15 g/L 的琼脂粉。

表 1 实验用菌株

Table 1 Experimental strain

Bacterial strain	Property and genotype	Source and reference
<i>Klebsiella pneumonia</i> HR521	Wild type, Amp ^r	Laboratory collection
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	Lacz Δ M15	Tiagen biotech co.,LTD.
CAB-pDK6/DH5 α	Cm ^r , Amp ^r , Km ^r	This work
K.P/pCAB	Cm ^r , Amp ^r , Km ^r	This work
pDK6/P.S	Cm ^r , Amp ^r , Km ^r	This work

表 2 实验用质粒

Table 2 Experimental plasmid

Plasmid	Property and genotype	Source and reference
pBHR68	Km ^r	Gifted by Prof. Chen Guoqiang (Department of Biological Sciences and Biotechnology, Tsinghua University, China)
pDK6	Expressing vector, Km ^r	Kleiner et al ^[25]
pDK-CAB	Constructed, Km ^r	This work

种子培养基及发酵培养基见表 3。微量元素组成见表 4。铁溶液的配制：每升水中加入 37% 的浓盐酸 4 mL， $\text{FeSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 5.0 g。

1.2 方法

1.2.1 培养方法

大肠杆菌的培养：在 LB 培养基中，37 °C、200 r/min 培养。需要加入抗生素时，卡那霉素终浓度 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

表 3 发酵培养基及种子培养基组成

Table 3 Medium composition

Composition	Fermentation medium (L^{-1})	Seed medium (L^{-1})
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	4.0 g	2.0 g
KH_2PO_4	0.25 g	3.4 g
$\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	0.69 g	1.3 g
MgSO_4	0.2 g	0.2 g
Glycerol	20–50 g	1.0 g
Yeast extract	1.5 g	30 g
Fe^{2+} solution	1.0 mL	1.0 g
Trace element solution	1.0 mL	2.0 mL
CaCO_3	/	1.0 g

表 4 微量元素溶液组成

Table 4 Trace element solution composition

Component	Content (L^{-1})
ZnCl_2	70 mg
$\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	25 mg
H_3BO_3	60 mg
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	29.28 mg
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	200 mg
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	100 mg
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	35 mg
37% HCl	0.9 mL

克雷伯氏肺炎杆菌的种子培养：250 mL 三角瓶，100 mL 种子培养基，接入斜面培养菌一环，用 8 层纱布封口后置于 30 °C 摇床培养，转速 180 r/min，培养 14 h。

克雷伯氏肺炎杆菌的摇瓶发酵培养：250 mL 三角瓶，100 mL 发酵培养基，接种量 1%，用 8 层纱布封口后置于 37 °C 摇床培养，转速 150 r/min 培养 12~48 h。

克雷伯氏肺炎杆菌的发酵罐培养：5 L 的发酵罐(B.Braun, Germany)，装量 4 L，接种量为 1%，通气量 0.5 vvm，搅拌转速 250 r/min，发酵温度 37 °C，利用质量分数为 30% 的 NaOH 溶液控制发酵体系 pH 6.5。

1.2.2 克雷伯氏菌感受态细胞的制备

用接种环挑取野生克雷伯氏菌株一环，接种到灭菌 LB 液体培养基中，37 °C 摇床过夜。取 150 μL 菌液接种至 15 mL LB 培养基中，继续摇至 OD 值在 0.3~0.4 之间。将菌液在冰上预冷 30 min，分装至 50 mL 预冷灭菌离心杯中，4 °C、2 500 r/min 离心 10 min。弃上清，用灭菌 ddH₂O 使沉淀悬浮后离心，重复 2 次。弃上清，离心杯中加入 5 mL 10% 甘油，沉淀悬浮后，将菌液以 200 μL 分装于 1.5 mL 离心管中，放入 -80 °C 冰箱中保存。

1.2.3 克雷伯氏菌的电转化方法

将质粒、0.1 cm 电极杯以及感受态细胞分别预冷 10 min。之后在 200 μL 感受态细胞中加入 10 μL 质粒，冰上放置 10 min。开电转仪(BTX, 美国)，调节电压值 2.5 kV。将混合物转移至预冷电极杯中，将电极杯推入电转仪。结束后，向电极杯中迅速加入 1 000 μL SOC 液体培养基，重悬细胞并转至 1.5 mL 离心管中。37 °C，

200 r/min 复苏培养 1 h。取 100 μ L 菌液涂在相应抗性平板上。37 $^{\circ}$ C 培养箱静置培养。

1.2.4 SDS-PAGE 蛋白电泳

分别制备分离胶和浓缩胶。取样品与适量体积的上样缓冲液混合,放入沸水浴中 5 min, 12 000 r/min 离心 3 min,取上清液 20 μ L 进行电泳。浓缩胶 80 V,分离胶 120 V。电泳结束后加入考马斯亮蓝染色液染色约 0.5 h 后用脱色液脱色,直至呈现清晰条带。

1.3 分析方法

1.3.1 生物量测定

根据 650 nm 光吸收值与菌体干重的标准曲线,通过测定发酵液 650 nm 的光吸收计算菌体的生物量。

1.3.2 发酵液中底物与产物含量测定

甘油、PDO、乳酸、乙酸、2,3-丁二醇、丁二酸、乙醇采用高效液相色谱(岛津公司,日本)测定。色谱柱为 AminexHPX-87H 柱,检测器为 RID-10vp 型折光示差检测器,柱温为 65 $^{\circ}$ C,流动相为 0.005 mol/L H_2SO_4 溶液,流速为 0.8 mL/min。进样量为 20 μ L。发酵液中各组分含量通过标准曲线计算得到。

1.3.3 3-HPA 含量的测定

3-HPA 含量采用比色法测定^[26],用丙烯醛代替 3-HPA 作标准品。该检测系统中含 1 mL 样品,3 mL 37%的浓盐酸及 0.75 mL 色氨酸试剂,37 $^{\circ}$ C 水浴 20 min 显色,然后在 560 nm 处检测吸光值。色氨酸试剂:浓盐酸 4.16 mL, D,L-色氨酸 2.04 g,用蒸馏水稀释至 1 L。

1.3.4 PHB 含量测定

1) 样品的制备:收集发酵液,10 000 \times g 离心 5 min 获得菌体,用去离子水洗涤后再次离

心,弃上清,在-80 $^{\circ}$ C 冰箱冰冻 30 min;用冷冻干燥机将细胞冰冻干燥 48 h,测定细胞干重。称取约 50 mg 干细胞于酯化管中,加入 2 mL 酯化液(3%体积的浓硫酸溶于甲醇中,含 2 g/L 苯甲酸作为内标)和 2 mL 氯仿,加盖密闭,在 100 $^{\circ}$ C 烘箱中酯化 4 h;冷却至室温后,加入 1 mL 去离子水,充分振荡,静置分层,取下层氯仿相进行气相色谱(岛津公司,日本)分析。2) 标样的制备:用分析天平精确称取约 10 mg PHB 纯物质于酯化管中,同上操作,作为气相色谱分析标样。3) 气相色谱分析:气相色谱分析使用安捷伦公司的 HP6890 气相色谱仪。色谱柱为 HP-5 毛细管柱。检测器为火焰离子化检测器(Flame ionization detector, FID)。用高纯氮气作为载气,氢气作为燃气,空气为助燃气。根据样品浓度的不同,进样量为 0.4~1 μ L。采用内标法对 PHB 进行定量分析。PHB 含量定义为 PHB 对细胞干重的比值。

2 结果与分析

2.1 重组载体 pDK6-CAB 的构建及验证

聚羟基丁酸酯(PHB)在生物体中合成途径如图 1 所示。

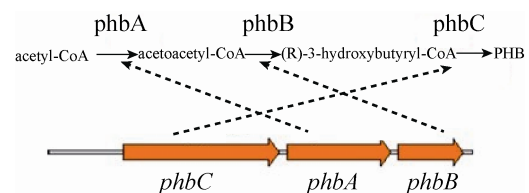


图 1 *Wautersia eutropha* H16 中的 PHB 合成途径
Fig. 1 PHB synthesis way of *Wautersia eutropha* H16. PhbA: β -ketothiolase; PhbB: NADPH-dependent acetoacetyl-CoA reductase; PhbC: PHA synthase.

PHB 的合成涉及到 3 个独立的酶, 由 *phbA* 编码的 β -酮基乙酰辅酶 A 硫解酶(β -ketothiolase, PhbA)、由 *phbB* 编码的 NADPH 依赖型乙酰乙酰辅酶 A 还原酶以及由 *phbC* 编码的 PHB 合成酶。2 个乙酰辅酶 A 分子 β -酮基硫解酶(PhbA) 催化生成 1 个乙酰乙酰辅酶 A 分子, 后者再在 NADPH 依赖型还原酶(PhbB)的作用下还原为 (R)-羟基丁酰辅酶 A, 最后在 PHA 聚合酶(PhbC)的作用下聚合成 PHB。PhbC、*phbB*、*phbA* 源自 *Ralstonia eutropha* H16 染色体 DNA 的 1 个操纵元上, 共用 1 个启动子。

以携带有 *phbA*、*phbB* 和 *phbC* 基因(以后简称 CAB)的质粒 pBHR68 为模板进行 Touch Down-PCR(TD-PCR), 获得目的基因 CAB, 大小为 3 961 bp。TD-PCR 所使用的引物序列如下:

CAB-F: 5'-agtgaattcATGGCGACCGGCAAA GGCGCGGCAGC-3'; CAB-R: 5'-tcaaagcttTCA GCCCATATGCAGGCCGCCGTTGAAGG-3'。

扩增结果经琼脂糖凝胶电泳, 结果如图 2 所示, 由图可知, TD-PCR 产物条带与目标 CAB 基因大小相符, 表明成功获得 CAB 基因片段。

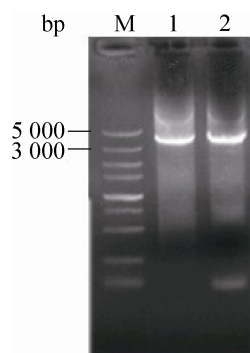


图 2 目的基因 CAB 琼脂糖凝胶电泳

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of CAB gene. M: DL 5000 DNA marker; 1, 2: CAB.

将所获得的目的基因 CAB 以及载体 pDK6 用 *EcoR* I 和 *Hind* III 进行双酶切, 通过凝胶回收试剂盒得到含相同粘性末端的目的基因和载体, 再用 T4 DNA 连接酶进行连接得重组质粒 CAB-pDK6。

将构建好的重组载体 CAB-pDK6 用热激法转化感受态大肠杆菌 DH5 α , 在卡那霉素抗性平板上筛选单菌落, 进行菌落 PCR, 初步验证所得到的转化子。菌落 PCR 扩增条件如下: 95 $^{\circ}$ C 2 min; 95 $^{\circ}$ C 20 s, 53 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 34 个循环; 72 $^{\circ}$ C 4 min, 4 $^{\circ}$ C 0.08 min, 16 $^{\circ}$ C 保存。

由于目的基因较长, 为节约 PCR 时间, 重新设计了菌落 PCR 下游引物 B-R, 该引物和基因 *phbB* 的末端配对, 产物长度为 1 770 bp, 上游引物保持不变。菌落 PCR 引物序列如下:

CAB-F: 5'-agtgaattcATGGCGACCGGCAAA GGCGCGGCAGC-3';

B-R: 5'-TCATGCCTTGGCTTTGACGTATG GC-3'。

菌落 PCR 结果见图 3, 从图中可知, 从卡

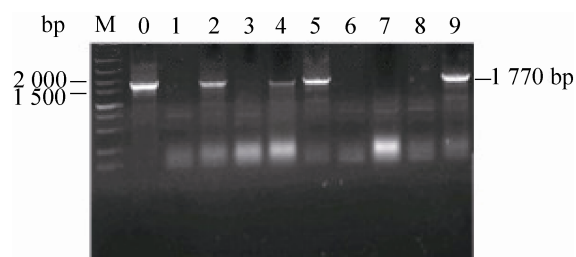


图 3 工程菌 CAB-pDK6/DH5 α 菌落 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳

Fig. 3 Agarose gel electrophoresis of engineered bacteria CAB-pDK6/DH5 α colony-PCR. M: DL 5000 DNA marker; 0: purpose gene CAB; 1-9: colony-PCR products of nine engineered bacterial colonies picked up randomly.

那霉素抗性平板上挑选的 9 个转化子, 经过菌落 PCR, 2、4、5、9 号均扩增出了与目标条带 1 770 bp 相符的片段, 成功获得工程菌 CAB-pDK6/DH5 α 。

2.2 PHB 路径在克雷伯氏菌中的构建

从大肠杆菌阳性克隆 CAB-pDK6/DH5 α 中提取重组表达载体 CAB-pDK6, 通过电转化法将其转入克雷伯氏肺炎杆菌感受态细胞 P.S, 在卡那霉素抗性平板上筛选单菌落, 鉴定并分离出阳性克隆。

挑取筛选后的转化子, 提取质粒并对其进行 *EcoR* I 和 *Hind* III 的双酶切, 以 CAB-pDK6 质粒及其酶切产物进行对照, 结果如图 4 所示, 工程菌中提取的质粒与重组质粒 CAB-pDK6 位置一致, 对其进行酶切之后, 出现与重组质粒酶切后大小相同的条带。证明成功获得工程菌 K.P/pCAB。

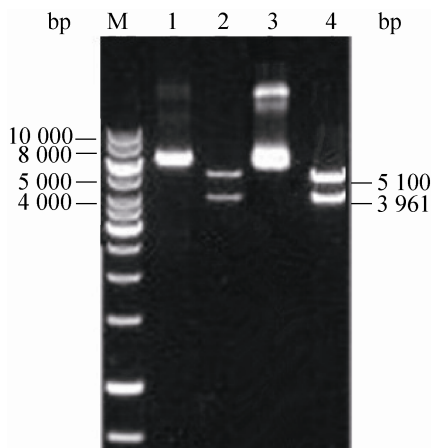


图 4 工程菌 K.P/pCAB 质粒及其酶切的琼脂糖凝胶电泳

Fig. 4 Agarose gel electrophoresis of plasmid and its enzyme-digested products in the engineered bacteria K.P/pCAB. M: 1 kb DNA ladder; 1: recombinant plasmid CAB-pDK6; 3: plasmid in engineered bacteria K.P/pCAB; 2,4: enzyme-digested products of 1 and 3.

将工程菌 K.P/pCAB 在摇瓶发酵培养基中进行培养, 用 0.5 mmol/L 的 IPTG 诱导, 以野生菌 HR521 为阴性对照, 分别对其进行 SDS-PAGE 电泳。如图 5 所示, 加入 IPTG 诱导后, 合成 PHB 所需的 3 种酶 *phbA*、*phbB* 和 *phbC* 均得到了有效的表达。

2.3 PHB 含量的测定

将野生菌和重组菌分别进行摇瓶培养和发酵罐培养, 重组菌在 50 μ g/mL 的卡那霉素浓度下, 培养 6 h 后, 分别加入 1 mmol/L IPTG 和 0.5 mmol/L IPTG 诱导, 取 24 h 和 48 h 的样品分别测菌体中 PHB 含量。测定结果如表 5 所示。

由表 5 可知, 野生菌中无 PHB 的合成, 而重组菌中均检测到了 PHB, 说明成功将聚羟基丁酸途径引入克雷伯氏野生菌中, 使其获得了 PHB 合成能力。随发酵时间的延长, 发酵 48 h 时, 菌体 PHB 最高含量可达到菌体质量的 34.39%。当采用不同浓度的 IPTG 进行诱导时, 随着 IPTG 浓度由 0.5 mmol/L 增大到 1 mmol/L, 重组菌中 PHB 含量也随之增加, 由 20.47% 增加至 34.39%。在实验中也观察到, 当

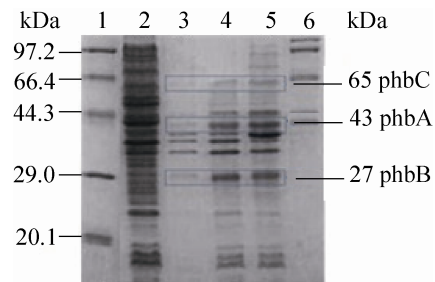


图 5 菌体全细胞 SDS-PAGE 电泳

Fig. 5 SDS-PAGE analysis of proteins in whole cells. 1: promixed protein marker (low); 2: wild type *K. pneumoniae* HR521; 3-5: recombinant strain K.P/pCAB; 6: promixed protein marker (high).

表 5 野生菌与重组菌 PHB 含量比较

Table 5 Comparison of PHB content in wild type *K. pneumonia* HR521 and recombinant strain *K. pneumonia*/pCAB

Cultivation time	HR521 PHB content (%)	K.P/pCAB PHB content (%) (IPTG 1 mmol/L)	K.P/pCAB PHB content (%) (IPTG 0.5 mmol/L)
24 h (Shake flask)	0	9.74(±0.315)	6.27(±0.179)
48 h (Shake flask)	0	21.34(±0.785)	15.54(±0.523)
24 h (Bioreactor)	0	26.93(±1.217)	16.13(±0.794)
48 h (Bioreactor)	0	34.39(±1.547)	20.47(±1.149)

IPTG 浓度大于 0.5 mmol/L 时, 菌体生长速度有所减慢, 虽然 PHB 合成量较大, 但 PDO 得率下降。这说明添加过量 IPTG 诱导会影响工程菌菌体生长以及其最终发酵产物 PDO 的合成。推测其原因, 一方面 IPTG 浓度过高会导致 PHB 的大量合成, PHB 可以作为微生物的碳源储备, 因碳源分流使 PDO 得率降低。另一方面 IPTG 的添加对菌体生长也有一定的毒害作用。因此较优化的 IPTG 浓度为 0.5 mmol/L。

2.4 野生克雷伯氏菌 HR521 50 g/L 甘油发酵生产 1,3-丙二醇

用野生克雷伯氏菌在摇瓶中进行 1,3-丙二醇的发酵实验, 初始甘油浓度为 50 g/L, 卡那霉

素浓度 50 μg/mL, 培养 6 h 后, 加入 0.5 mmol/L IPTG 诱导, 48 h 取样分别测发酵液中底物和各种产物浓度, 结果如表 6 所示, 在甘油浓度为 50 g/L 的条件下野生克雷伯氏菌 HR521 可正常发酵生产 PDO 22.1 g/L, 其得率为 46.4%。

2.5 野生菌 HR521 和重组菌 K.P/pCAB 70 g/L 甘油发酵生产 1,3-丙二醇

采用野生菌 HR521 和工程菌 K.P/pCAB 在摇瓶中进行 70 g/L 甘油发酵 1,3-丙二醇的对比实验, 卡那霉素浓度 50 μg/mL, 培养 6 h 后, 加入 0.5 mmol/L IPTG 诱导, 72 h 取样测发酵液中底物和各种产物浓度, 结果见表 7。

底物甘油浓度为 70 g/L 时, 野生菌发酵 24 h

表 6 底物浓度为 50 g/L 时的野生菌 PDO 发酵

Table 6 PDO fermentation with the initial glucose of 50 g/L by wild type *K. pneumonia* HR521

Cultivation time	Strain	PDO yield (%)	PDO (g/L)	BDO (g/L)	SUC (g/L)	ACE (g/L)	LAC (g/L)	ETH (g/L)
48 h	HR521	46.42	22.11	4.43	0	0	0	1.35

表 7 底物浓度 70 g/L 野生菌与重组菌发酵 PDO

Table 7 PDO fermentation with the initial glucose of 70 g/L by wild type *K. pneumonia* HR521 and recombinant strain *K. pneumonia*/pCAB

Cultivation time	Strain	PDO yield (%)	3-HPA max (mmol/L)	PDO (g/L)	BDO (g/L)	SUC (g/L)	ACE (g/L)	ETH (g/L)
72 h	HR 521	42.90	6.77	18.87	10.22	0.35	2.24	0.00
	K.P/pCAB	43.89	7.09	31.30	9.05	0.00	1.51	0.80

后逐渐停止生长,甘油停止消耗,PDO产量也不再增加,此时3-HPA持续积累显著,野生菌致死,而工程菌K.P/pCAB则可正常发酵生产PDO,耐受3-HPA的浓度更高,表明工程菌具有较高的3-HPA的耐受性。推测其原因可能是在克雷伯氏菌中引入PHB之后,诱导某种含有不稳定巯基的保护蛋白高水平表达,该蛋白可与3-HPA的醇醛基团结合,从而保护核糖核苷酸还原酶维持其正常活性,使得菌体在高浓度3-HPA积累下依然可进行正常的细胞生长与分裂。由表7可知,培养72h时,工程菌PDO产量达到31.30 g/L,比野生菌增加39.71%,其得率为43.89%;2,3-丁二醇的产量为9.05 g/L,同比野生菌降低11.45%,副产物乙酸产量为1.51 g/L,较野生菌降低32.59%。

Xue等的研究表明,PHB往往与细菌抗逆能力密切相关。致病型问号钩端螺旋体(问号钩体, *Leptospira interrogans*)和腐生型双曲钩体 *L. biflexa* 由于能够大量合成菌体内贮藏物聚羟基脂肪酸酯(PHA, 亚类如聚 β -羟基丁酸 PHB等),使得其能够在贫瘠环境中长时间存活,且适应不同的宿主和体外环境^[27]。隐藏嗜酸菌 *Acidiphilium cryptum* 常存在于极低pH、放射性和重金属污染的环境中,而在有机质存在时该菌可在体内合成聚 β -羟基丁酸(PHB),而Yang等的研究表明,隐藏嗜酸菌 *DXI-1* 单细胞内PHB的积累高达88%,由此表明PHB与菌株抗逆具有一定的相关性^[28]。Wang等将phbCAB基因在大肠杆菌 *E. coli* DH5 α 中进行表达,耐压实验表明在有PHB积累的情况下,工程菌抗压性显著增加,原因可能是一方面PHB在大肠杆菌中的积累,导致细胞生长能力减弱,降低细胞

合成代谢蛋白的能力,同时诱导保护蛋白的高水平表达;另一方面,PHB的降解过程会伴随着ATP以及ppGpp的升高,而ppGpp的升高使得rpoS基因表达水平升高,从而上调菌株对于环境的抗压能力^[29]。本文在克雷伯氏菌中构建了PHB路径,且该菌株可正常生产PDO。PHB路径与克雷伯氏菌抗逆性的相关机理还有待进一步研究。

3 结论

本文以载体pDK6为基础,构建了能够在大肠杆菌以及克雷伯氏菌中较稳定存在并较高水平表达CAB外源基因的表达质粒CAB-pDK6,从而成功引入了一条从乙酰辅酶A到乙酰乙酰辅酶A再到3-羟基丁酰辅酶A,最终生成PHB的代谢途径。针对PDO发酵过程中底物和各产物的抑制作用以及3-HPA的致死性积累问题,通过基因工程的方法成功构建了含PHB表达途径的克雷伯氏肺炎杆菌K.P/pCAB,并且通过EcoR I和Hind III双酶切以及全细胞SDS-PAGE鉴定了工程菌K.P/pCAB的正确性。

发酵过程中,重组菌中均检测到了PHB。高浓度IPTG不利于菌体生长和PDO合成。优化的IPTG浓度为0.5 mmol/L。初始甘油50 g/L时,野生菌可正常发酵生产1,3-丙二醇,初始甘油浓度为70 g/L时,野生菌发酵终止。工程菌K.P/pCAB在积累PHB的同时,可正常发酵生产PDO。

当前,开发低成本的PDO生产技术已成为化纤行业关注的热点。随着PTT市场的逐步打开,生物法生产PDO将会面临更广阔的应用前景。本研究结果对深入理解克雷伯氏菌PDO代

谢机理提供了有益的参考,对克雷伯氏菌的进一步优化提供了新的思路。

REFERENCES

- [1] Saxena, RK, Anand, P, Saran, S. Microbial production of 1,3-propanediol: recent developments and emerging opportunities. *Biotechnol Adv*, 2009, 27(6): 895–913.
- [2] Xu YZ, Liu HJ, Du W, et al. Integrated production for biodiesel and 1,3-propanediol with lipase-catalyzed transesterification and fermentation. *Biotechnol Lett*, 2009, 31(9): 1335–1341.
- [3] van Gelder AH, Aydin R, Alves MM, et al. 1,3-propanediol production from glycerol by a newly isolated *Trichococcus* strain. *Microbial Biotechnol*, 2012, 5(4): 573–578.
- [4] Jensen TO, Kvist T, Mikkelsen MJ, et al. Fermentation of crude glycerol from biodiesel production by *Clostridium pasteurianum*. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2012, 39(5): 709–717.
- [5] Hu QL, Zheng ZM, Liu CM, et al. Microbial production of 1,3-propanediol with crude glycerol from biodiesel production. *China Oils Fats*, 2010, 35(10): 52–56 (in Chinese).
胡秋龙, 郑宗明, 刘灿明, 等. 生物柴油副产物甘油发酵生产 1,3-丙二醇的研究. *中国油脂*, 2010, 35(10): 52–56.
- [6] Gui YW, Tao WQ, Wang RM. Optimization of fermentation conditions for *Klebsiella pneumoniae* by response surface design. *China Brewing*, 2012, 31(3): 132–135 (in Chinese).
桂妍雯, 陶文卿, 王瑞明. 克雷伯氏菌发酵条件的响应面设计. *中国酿造*, 2012, 31(3): 132–135.
- [7] Liu HJ, Xu YZ, Zheng ZM, et al. 1,3-propanediol and its copolymers: research, development and industrialization. *Biotechnol J*, 2010, 5(11): 1138–1148.
- [8] Barbirato F, Soucaille P, Bories A. Physiologic mechanisms involved in accumulation of 3-hydroxypropionaldehyde during fermentation of glycerol by *Enterobacter agglomerans*. *Appl Environ Microbiol*, 1996, 62(12): 4405–4409.
- [9] Chen Z, Liu HJ, Liu DH. Metabolic pathway analysis of 1,3-propanediol production with a genetically modified *Klebsiella pneumoniae* by overexpressing an endogenous NADPH-dependent alcohol dehydrogenase. *Biochem Eng J*, 2011, 54(3): 151–157.
- [10] Zheng ZM, Wang TP, Xu YZ, et al. Inhibitory mechanism of 3-hydroxypropionaldehyde accumulation in 1,3-propanediol synthesis with *Klebsiella pneumoniae*. *Afr J Biotechnol*, 2011, 10(35): 6794–6798.
- [11] Hao J, Wang W, Tian JS. Decrease of 3-hydroxypropionaldehyde accumulation in 1,3-propanediol production by over-expressing dhaT gene in *Klebsiella pneumoniae* TUAC01. *J Ind Microbiol Biot*, 2008, 35(7): 735–741.
- [12] Chen Z, Liu HJ, Liu DH. Metabolic pathway analysis of 1,3-propanediol production with a genetically modified *Klebsiella pneumoniae* by overexpressing an endogenous NADPH-dependent alcohol dehydrogenase. *Biochem Eng J*, 2011, 54: 151–157.
- [13] Chen Z, Liu HJ, Liu DH. Regulation of 3-hydroxypropionaldehyde accumulation in *Klebsiella pneumoniae* by overexpression of dhaT and dhaD genes. *Enzyme Microb Technol*, 2009, 45(4): 305–309.
- [14] Hazer B, Steinbüchel A. Increased diversification of polyhydroxyalkanoates by modification reactions for industrial and medical applications. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, 74: 1–12.
- [15] Steinbüchel A, Valentin HE. Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids. *FEMS Microbiol Lett*, 1995, 128(3): 219–228.
- [16] Yang Y, Xu AL. Advances in PHB synthesized by microorganism. *Life Sci Res*, 2006, 10(4): 61–67 (in Chinese).
杨宇, 徐爱玲. 生物合成材料聚 β-羟基丁酸 (PHB) 的研究进展. *生命科学研究*, 2006, 10(4): 61–67.
- [17] Alvarez HM, Pucci OH, Steinbüchel A. Lipid

- storage compound in marine bacteria. *Appl Microbiol Biot*, 1997, 47(2): 132–139.
- [18] Satoh H, Iwamoto Y, Mino T. Activated sludge as a possible source of biodegradable plastic. *Water Sci Technol*, 1998, 38(2): 103–109.
- [19] Satoh H, Mino T, Matsuo T. Uptake of organic substrate and accumulation of polyhydroxyalkanoates linked with glycolysis of intracellular carbohydrates under anaerobic condition in the biological excess phosphate removal process. *Water Sci Technol*, 1992, 26(5): 933–942.
- [20] Satoh H, Mino T, Matsuo T. PHA production by activated sludge. *Int J Biol Macromol*, 1999, 25(1): 105–109.
- [21] Yu MX, Pan Y, Huang Y, et al. Research advances in producing PHB by activated process. *Technol Water Treatment*, 2012, 38(6): 1–6 (in Chinese). 俞苗新, 潘杨, 黄勇, 等. 活性污泥法合成 PHB 的研究进展. *水处理技术*, 2012, 38(6): 1–6.
- [22] Yub ND, Pettinari MJ, Jimena A. A polyhydroxybutyrate-producing *Pseudomonas* sp. isolated from antarctic environments with high stress resistance. *Curr Microbiol*, 2004, 49(3): 170–174.
- [23] Lopez NI, Floccari ME, Steinbuechel A. Effect of poly (3-Hydroxybutyrate) (Phb) content on the starvation-survival of bacteria in natural waters. *FEMS Microbiol Ecol*, 1995, 16(2): 95–101.
- [24] Kadouri D, Jurkevitch E, Okon Y. Poly-beta-hydroxybutyrate depolymerase (PhaZ) in *Azospirillum brasilense* and characterization of a phz mutant. *Arch Microbiol*, 2003, 180(5): 309–318.
- [25] Kleiner D, Paul W, Merrick MJ. Construction of multicopy expression vectors for regulated over-production of proteins in *Klebsiella pneumoniae* and other *Enteric* bacteria. *J Gen Microbiol*, 1988, 134: 1779–1784.
- [26] Circle SJ, Stone L, Boruff CS. Acrolein determination by means of tryptophan. *Ind Eng Chem*, 1945, 17: 259–262.
- [27] Xue F, Liu Y, Hong CL, et al. Pathway analysis of the leptospiral polyhydroxybutyrate (PHB) synthesis. *Microbiol China*, 2013, 40(9): 1–10 (in Chinese). 薛峰, 刘媛, 洪彩玲, 等. 钩端螺旋体聚 Beta 羟基丁酸 (PHB) 生物合成途径分析. *微生物学通报*, 2013, 40(9): 1–10.
- [28] Yang Y, Wang X, Huang L, et al. Progresses on *Acidiphilium cryptum*. *Life Sci Res*, 2013, 17(2): 179–184 (in Chinese). 杨宇, 王项, 黄露, 等. 隐藏嗜酸菌 *Acidiphilium cryptum* 的研究进展. *生命科学研究*, 2013, 17(2): 179–184.
- [29] Wang Q, Yu HM, Xia YZ, et al. Complete PHB mobilization in *Escherichia coli* enhances the stress tolerance: a potential biotechnological application. *Microb Cell Fact*, 2009, 8: 47–55.

(本文责编 郝丽芳)