

文章编号 :1009-038X(2002)02-0116-04

大肠杆菌中乙醇合成途径的构建

谢丽萍, 诸葛健, 王正祥

(江南大学 教育部工业生物技术重点实验室 江苏 无锡 214036)

摘 要 :采用 PCR 技术扩增了运动发酵单胞菌 *Zymomonas mobilis* 的两个产乙醇的关键酶基因 *pdc* 和 *adh II*, 分别克隆到载体 pUC19 和 pUC18 中, 形成重组质粒 pUC19::*pdc* 和 pUC18::*adh*, 从中分离出两基因并串联到经 *EcoR I* 酶切的 pUC18 中, 转化大肠杆菌 *E. coli* DH5 α 获得重组质粒 pPA. 携带 pPA 的重组菌 Pp+a 被证明具有丙酮酸脱羧酶酶活且提高了乙醇脱氢酶酶活. 通过代谢工程在 *Escherichia coli* 中成功地构建了乙醇合成途径.

关键词 :乙醇 ; 重组大肠杆菌 ; 代谢工程

中图分类号 :O 623.41

文献标识码 :A

Construction of an Ethanol Synthesis Pathway in *Escherichia coli*

XIE Li-ping, ZHUGE Jian, WANG Zheng-xiang

(The Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract : The two key genes encoded pyruvate decarboxylase and alcohol dehydrogenase II for ethanol production were amplified by PCR from the chromosomal DNA of *Zymomonas mobilis*. The amplified products were digested and inserted into pUC19 or pUC18 to form recombinant plasmid pUC19::*pdc* and pUC18::*adh*, respectively. The recombinant plasmid pPA for ethanol biosynthesis was further constructed by inserting *pdc* and *adh* gene from pUC19::*pdc* and pUC18::*adh* into pUC18 at *EcoR I* site by transforming into *E. coli* DH 5 α . *E. coli* Pp+a carrying pPA was proved to have activity of pyruvate decarboxylase and higher activity of alcohol dehydrogenase than the original organism. An ethanol biosynthesis pathway was constructed successfully in *Escherichia coli* by metabolic engineering.

Key words : ethanol ; recombinant *E. coli* ; metabolic engineering

乙醇工业是我国轻工业领域中重要的一部分, 通过微生物将葡萄糖等转化为乙醇是乙醇生产的主要方法之一, 能够生物合成乙醇的微生物主要为厌氧和兼性厌氧型, 包括酵母和细菌, 但生物合成途径有所不同. 酵母是通过丙酮酸脱羧酶(PDC)和乙醇脱氢酶(ADH)催化糖酵解中间产物 3-磷酸甘

油醛生成乙醇. 20 世纪 80 年代初发现并深入研究的运动发酵单胞菌能够以较高的转化率将葡萄糖等碳源转化成乙醇, 其代谢途径和酵母相似. 由于其对糖的耐受力低, 生长速度慢, 且只能利用 3 种化合物, 加上工业设备不完善等原因, 无法在乙醇发酵生产中得到独立的运用. 尽管酵母具备理想的

收稿日期 2001-08-29; 修订日期 2001-12-20.

基金项目 教育部优秀青年教师基金项目资助课题.

作者简介 谢丽萍(1977-), 女, 江西宁冈人, 发酵工程硕士研究生.

乙醇生产者的特性 ,但它不能发酵许多廉价和易获得的基质 ,从而使乙醇生产费用较高 ,而且发酵后的酒糟废料易造成环境污染。细菌(如大肠杆菌)的乙醇生物合成途径与酵母和运动发酵单孢菌不同 ,主要由丙酮酸甲酸裂解酶催化丙酮酸生成乙酰 CoA 再生物合成乙醇。目前有关大肠杆菌的生理学、基因学和代谢机理已较清楚 ,而且 DNA 重组操作在大肠杆菌中比较容易和稳定 ,其代谢速度之快及利用基质范围之广已成为国外许多学者用以研究乙醇生产的重要的宿主。国外对运动发酵单孢菌产乙醇的机理已有深入研究 ,乙醇合成的关键酶为丙酮酸脱羧酶和乙醇脱氢酶 ,分别由 *pdh* 和 *adh* II 编码 ,这为乙醇生物合成途径奠定了基础^[1]。

在产乙醇基因工程细菌的研究方面 ,国内尚未有报道。作者采用 PCR 技术克隆得到了来源于运动发酵单孢菌的两个具有功能的关键酶基因 ,构建了载体 pPA ,在大肠杆菌(*E. coli* DH5 α)中进行了表达 ,并进行了初步的发酵试验。

1 材料与方法

1.1 材料

菌株和质粒及生长条件 : *Zymomonas mobilis* ZM4 由南非 Rogers 教授馈赠 ; *E. coli* DH5 α 由作者所在实验室提供 ;质粒 pUC18、 pUC19 为上海 TaKaRa 生物工程公司产品 ;限制性酶 *Eco*R I、 *Sal* I、 *Taq* DNA 聚合酶、 T4 连接酶为上海华美生物工程公司产品。柱式胶回收试剂盒由上海华舜生物工程有限公司提供。

LB 培养基(由 1 g/dL 的蛋白胨 ,0.5 g/dL 的酵母膏 ,1 g/dL 的 NaCl 组成)用于种子的培养 ,LB 培养基中补加 5 g/dL 葡萄糖用于发酵试验 ,加 100 μ g/mL 的 Amp^r ,20 mg/mL 的 Xgal 和 200 mg/mL 的 IPTG 用于转化子的挑选 ,由亚硫酸氢钠和副品红构成的 Schiff 试剂及 95% 的乙醇形成的乙醛指示平板用于乙醇脱氢酶 ADH 酶活的鉴定。丙酮酸脱羧酶 PDC 酶活的测定则用葡萄糖或丙酮酸替代 95% 的乙醇即可。在 250 mL 的三角瓶中(装液量 50 mL)进行发酵。

1.2 方法

1.2.1 引物设计及 PCR 扩增

根据 EMBL 机构公开的运动发酵单孢菌中的 *pdh* 和 *adh* II 基因 DNA 序列信息设计引物。

pdh Primer1 :
5' TCCTGAATTCAGACATAGTGTTTTG3'
Primer2 :
5' GCTTGTCTGACAGGCTTACGGCT3' ;

adh II primer1 :
5' TGCTGTCTGACTAGTATGTAGGGTGAG3'
primer2 :
5' ATTAGAATTTCGAGGCATTGTTTG3'

PCR 扩增的条件 :超纯水 33 μ L ,10 倍缓冲液 5 μ L , MgCl₂ (25 mmol/L) 3 μ L , dNTPs (10 mmol/L) 4 μ L ,引物 P1(100 pmol/ μ L) 1 μ L ,引物 P2(100 pmol/ μ L) 1 μ L ,模板 DNA(135 ng/mL) 1 μ L , *Taq* DNA 多聚酶(3 U/ μ L) 1 μ L。

反应温度及时间 :1) 95 $^{\circ}$ C 5 min ; 2) 94 $^{\circ}$ C 50 s ,55 $^{\circ}$ C 90 s ,72 $^{\circ}$ C 3 min ,36 个循环 ;3) 72 $^{\circ}$ C 10 min。

1.2.2 克隆及阳性转化子的筛选 将 PCR 扩增出来的 *pdh* 和 *adh* 基因以 *Eco*R I , *Sal* I 酶切并分别插入到 pUC19、 pUC18 中 ,形成重组质粒 pUC19 :: *pdh* 和 pUC18 :: *adh* ,分别转化 *E. coli* DH5 α 。在 LB-Amp^r-Xgal-IPTG 平板上 ,筛选得到白色转化子 P_{pdh} 和 P_{adh} ,再对所得白色转化子提质粒进行酶切验证 ,从琼脂糖凝胶中回收酶切片断 ,用柱式胶回收试剂盒纯化后以 T₄ DNA 连接酶连接两基因片断于 pUC18 中 ,形成重组质粒 pPA ,再转化到 *E. coli* DH5 α 中 ,同上筛选出白色转化子 P_{p+a}。

1.2.3 酶活的测定 将转化子 P_{pdh}、 P_{adh}、 P_{p+a} 及 pUC18 转化的对照菌在 20 mL 液体 LB 培养基中培养 16~20 h ,10 000 r/min 离心 5 min ,用缓冲液洗涤 ,超声波破碎。具体方法见文献[2]。酶活定义 :一个单位的酶活为每分钟内(PDC 在 30 $^{\circ}$ C , ADH 在 25 $^{\circ}$ C)每还原 1 μ mol NAD 所需的酶量 ,表示为每毫克总蛋白质中含有多少单位的酶。蛋白质浓度的测定参照文献[3]。

1.2.4 发酵液中乙醇含量的测定 在含 3 mL LB 液体培养基的试管中分别接种 P_{p+a} 及空载的 pUC18 转化的菌株 ,过夜 ,以 1:100(体积比)稀释转到 250 mL 的三角瓶中(装液量 50 mL)进行发酵 (37 $^{\circ}$ C ,60 r/min) ,取样蒸馏。吸取 5 mL 蒸馏液置于 10 mL 的离心管中 ,加 1 mL 2% 的重铬酸钾溶液和 5 mL 浓硫酸 ,摇匀。在 600 nm 波长下测光密度 ,与标准曲线相对照^[4]。

2 实验结果

2.1 重组表达质粒的构建

以 *Eco*R I、 *Sal* I 酶切重组质粒 pUC19 :: *pdh* 和 pUC18 :: *adh* 经低熔点琼脂糖凝胶回收获得了 1.7 kb 及 1.2 kb 大小的外源 DNA 插入片断。纯化

后进行两个外源片断的连接并插入 pUC18 的 *EcoR* I 位点,形成乙醇生物合成重组质粒 pPA,载体构建见图 1.

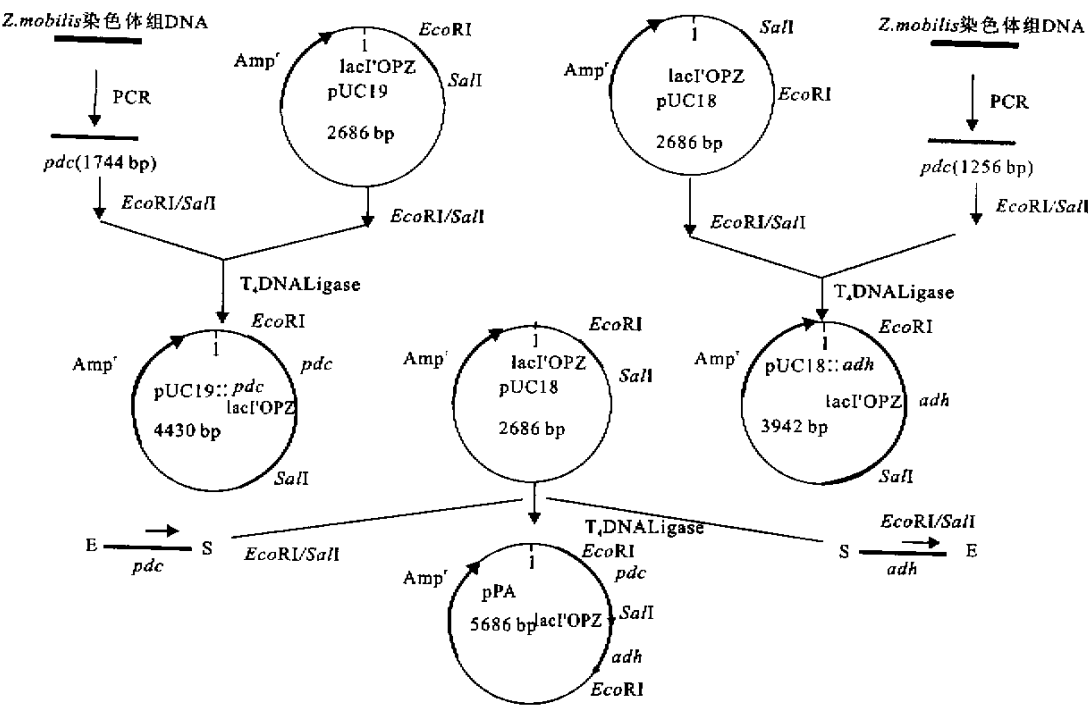
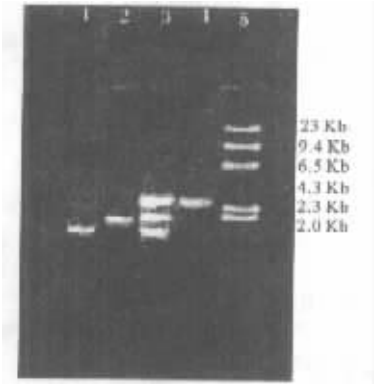


图 1 pPA 质粒的构建
Fig.1 The construction of recombinant plasmid pPA

2.2 重组质粒的酶切验证

将重组质粒进行 *EcoR* I、*Sal* I 双酶切,电泳发现酶切后的片断与两基因 PCR 扩增后双酶切所在位置一致,切出来的 pUC18 与标准 pUC18 线性片断在同一位置上,见图 2,表明两基因连接成功.



1. PCR products of adh(*EcoR* I/*Sal* I 双酶切); 2. PCR products of pdc(*EcoR* I/*Sal* I 双酶切); 3. pPA(*EcoR* I/*Sal* I 双酶切); 4. pUC18(*EcoR* I/*Sal* I 双酶切); 5. λ DNA(*Hind* III 单酶切)
图 2 重组质粒 pPA 的酶切验证
Fig.2 Restricted profile of plasmid pPA

2.3 转化子中丙酮酸脱羧酶及乙醇脱氢酶的活性测定

丙酮酸脱羧酶在大肠杆菌中以复合酶的形式

存在,需要加入焦磷酸硫胺素及 $MgCl_2$ 作为辅因子.另外细胞破碎液中含有的乳酸脱氢酶会直接氧化丙酮酸及还原 NAD^+ 从而干扰酶活的测定,可在 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 热处理 30 min .对照菌的 PDC 酶活为零,说明在空载的大肠杆菌中不存在该酶. pPA 中 PDC 的酶活为 0.36 U/mg pUC19::*pdc* 中 PDC 的酶活为 0.40 U/mg .

空载质粒的大肠杆菌中存在着微弱的 ADH 的酶活,其值为 0.08 U/mg pUC19::*adh* 中 ADH 酶活为 0.47 U/mg .在含有副品红和亚硫酸氢盐所形成的玫瑰红底色的培养基中,若乙醇脱氢酶存在活力,则乙醇会在乙醇脱氢酶的作用下生成乙醛,乙醛再与玫瑰红底物反应,则使克隆子呈现红色,但比对照菌——大肠杆菌及运动发酵单孢菌的颜色略红.

2.4 重组菌的葡萄糖发酵及 pH 值、残糖变化曲线

测定了不同发酵时间重组菌及对照菌发酵液中乙醇体积分数、残糖质量分数及 pH 值的变化.从图 3 可以看出,转化子及对照菌从种子培养基以 1:100 接种 10 h 后合成产物的速率很慢.随着菌体的自我复制,经过 43 h 后,重组菌仍有上升的趋势最大值达 0.16% ,而对照菌由于各个分支碳架物质的

分散及产生的有机酸对菌体具有毒害作用,产乙醇的量在 0.02% 上下波动.这说明 PDC 和 ADH 的引入强化了丙酮酸合成乙醇的途径.两种菌对糖的利用率均较低,这可能因为酸性物质对细胞有毒性从而影响了基质的吸收.从图 3 可以看出,含对照菌的发酵液中 pH 值在 10~20 h 下降更快,说明了 pH 对宿主菌合成产物有重要的影响.

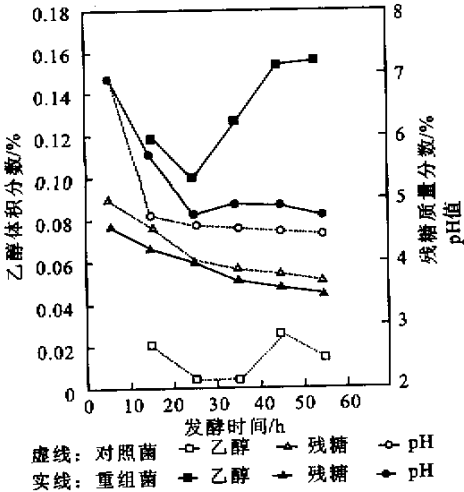


图 3 葡萄糖发酵过程中乙醇体积分数、残糖质量分数及 pH 值的变化曲线

Fig.3 The curve of ethanol amount, residual glucose, pH during glucose fermentation

3 讨论

作者用基因工程的手段在 *E. coli* 中引入了一个新的生化反应合成途径.在大肠杆菌中两个基因串联表达成功,但表达水平还不高.在作者所构建的载体中,丙酮酸脱羧酶中含有的 *Z. mobilis* 的启动子似乎能被大肠杆菌识别,因此有可能只在自身

的启动子的控制之下表达.这表明了两种不同的菌种之间的启动区域具有相似性. *pPA* 中 PDC 的酶活为 0.36 U/mg,与文献中报导的在 *lac* 启动子控制之下所表达的酶活相差甚远.这也间接地说明驱动 *pdc* 基因进行转录的可能不是 *lac* 启动子,而是 *pdc* 基因自身带有的运动发酵单孢菌的启动子.

另外 *adh II* 基因只在 *Z. mobilis* 的 P_2 启动子的控制之下也是低水平转录^[6],曾有以处于对数生长期的 *Z. mobilis* CP₄ 中分离出来的 mRNA 进行引物延伸实验来鉴别转录起始位点,发现含有完全的 *adh II* 的启动区域的转录起始位点是一个与 *Z. mobilis* P_2 启动区域所用的胸苷直接相邻的弱的起始位点^[7].在所构建的载体 PLOI286 中, *lac* 启动子的转录受到了阻碍.而 *Z. mobilis* 中 *adh II* 基因的转录来自 P_1 、 P_2 启动子的控制,然而在其它的原核生物中如果要得到一个重要的、高调节的基因是不期望出现这种情况的^[5,8],以上理论分析也许可以解释为什么实验中两个基因表达的酶活及产乙醇的量都较低.

重组菌的表达调控方式对发酵过程有重要的影响,而且代谢网络很复杂,发酵过程需遵循外源基因的表达规律及细菌的生长规律.本实验中载体的构建及在 *E. coli* 中的表达有点类似于组成型表达.虽然组成型表达系统最为简便和经济,但过早的表达产物往往会对细胞产生毒害作用,使宿主菌的比生长速率下降甚至使细胞死亡.所以工程菌发酵大都还是采用可诱导的启动子,基于这种理论指导,需进一步构建能利用可诱导启动子的载体,使之能利用如 PL, PR, *tac*, *lac* 等启动子的控制.另外还要选择合适的表达宿主菌进行高密度发酵的研究.

参考文献:

[1] COLEMAN J R, DNG M D. Ethanol synthesis by genetic engineering in *Cyanobacteria* [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1999, 65 (2): 523-528.

[2] HOPNER T C, DOELLE H W. Purification and kinetic characteristics of pyruvate decarboxylase and ethanol dehydrogenase from *zymomonas mobilis* in relation to ethanol production [J]. *Eur J Appl Microbiol Biotechnol*, 1983, 17: 152-157.

[3] 李如亮. 生物化学实验 [M]. 武汉: 武汉大学出版社, 1997. 57-59.

[4] 天津轻工业学院. 工业发酵分析 [M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1979. 61-62.

[5] DOI R H, WANG L F. Multiple prokaryotic ribonucleic acid polymerase sigma factors [J]. *Microbiol Rev*, 1986, 50: 227-243.

[6] CONWAY T Y A, OSMAN J I, KONNAN E M, et al. Promoter and nucleotide sequences of the *zymomonas* pyruvate decarboxylase [J]. *J Bacteriol*, 1987, 169: 949-954.

[7] CONWAY T, SEWELL G W, OSMAN Y A, et al. Cloning and sequence of the Alcohol dehydrogenase II gene from *zymomonas mobilis* [J]. *J Bacteriol*, 1987, 169: 2591-259.

[8] McClure W R. Mechanism and control of transcription initiation in prokaryotes [J]. *Annu Rev Biochem*, 1985, 54: 171-204.