

一株联产 L-精氨酸和聚羟基丁酸酯的 重组钝齿棒杆菌的构建

秦敬儒, 徐美娟, 张 显, 杨套伟, 许正宏, 饶志明*

(江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: *Corynebacterium crenatum* SYPA 5-5 是一株用于 L-精氨酸(Arg)生产的工业菌株。聚羟基丁酸酯(PHB)是在细菌内部形成的聚合物,将 PHB 代谢途径引入细胞内可影响胞内的全局代谢网络,实现联产 PHB 和相关化工产品如琥珀酸、L-谷氨酸和 L-色氨酸等。采用基因工程技术,将来源于 *Ralstonia eutropha* H16 的 PHB 合成基因簇 *phbCAB* 导入到 L-精氨酸生产菌株 *C. crenatum* SYPA 5-5 中,进行组成型表达,旨在获胞内产 PHB、胞外产 L-精氨酸的效果,对出发菌和重组菌分别进行 5 L 容积发酵罐实验,并对发酵相关参数进行测定分析。结果表明,由于 PHB 合成基因簇的导入,重组菌中 PHB 质量为细胞干质量的 12.8%,实现了胞外产 L-精氨酸、胞内产 PHB 的效果,并发现胞内 PHB 的积累对菌体生产 L-精氨酸有一定的正向作用,发酵 96 h,L-精氨酸的产量达到 43.21 g/L,相比于出发菌提高了 20%。

关键词: L-精氨酸;聚羟基丁酸酯;钝齿棒杆菌;联产;发酵

中图分类号:Q 78 文献标志码:A 文章编号:1673—1689(2016)03—0240—07

Co-Production of L-Arginine and Polyhydroxybutyrate in Recombinant *Corynebacterium crenatum*

QIN Jingru, XU Meijuan, ZHANG Xian, YANG Taowei, RAO Zhiming*

(School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: *Corynebacterium crenatum* SYPA 5-5 is a industrial strain for L-arginine production. Polyhydroxybutyrate (PHB) is a kind of polymer stored in the bacterial as carbon source and energy. Due to its environment-friendly properties such as biodegradability and biocompatibility, PHB can be made into plastic containers and surgical suture to reduce the white pollution and can be digested easily in the body. It was reported that co-producing PHB and some other industrial valuable compounds, such as succinate, L- glutamate and tryptophan, were possible by introducing PHB metabolic pathways into the cells to influence the intracellular pathways. In this study, a co-produce PHB and L-arginine strain was constructed by introducing the entire *phbCAB* operon of *Ralstonia*

收稿日期: 2014-12-23

基金项目: 国家 973 计划项目(2012CB725202); 国家 863 计划项目(2012AA022102); 国家自然科学基金项目(31300028)。

* 通信作者: 饶志明(1975—), 男, 江西临川人, 农学博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事工业微生物育种和发酵代谢方面的研究。

E-mail: raozhm@jiangnan.edu.cn

eutropha H16 into *C. crenatum* SYPA 5-5. Fermentation were conducted of the start strain and recombinant one, separately, in a 5-L fermentor and relevant fermentation parameters were detected and analysed. The result showed that intracellular PHB(12.8% of DCW) and extracellular L-arginine (43.21 g/L) were obtained and accumulated in the recombinant strain,.In addition,The PHB production also promote the L-arginine yield, which weas increased by 20%.

Keywords: L-arginine, polyhydroxybutyrate, *Corynebacterium crenatum*, co-production, fermentation

L-精氨酸是一种含有胍基的碱性氨基酸,是生物体尿素循环中重要的代谢产物,具有独特的生理和药理作用^[1],广泛应用于食品、药品、保健品行业^[2-3]。近年来精氨酸生产备受关,发酵法生产精氨酸成为国内外研究的热点^[4]。聚羟基脂肪酸酯(PHAs)是原核微生物在碳、氮营养失衡的情况下作为碳源和能源贮存而合成的一类热塑性聚酯。目前已经发现 PHA 至少有 125 种不同的单体结构,并且还在不断地发掘出新的单体;而聚-β-羟基丁酸酯 (PHB)是 PHA 中发现最早、研究最多的一种,由于其具有良好的生物可降解性和生物相容性,可用来制作可降解容器及手术缝合线等,目前已经初步进入商品化生产阶段^[5-6]。*Corynebacterium crenatum* SYPA 5-5 是

作者所在实验室筛选得到的高产 L-精氨酸的突变菌株^[7]。据相关文献报道,将 PHB 代谢途径引入细胞内,可实现 PHB 和相关化工产品的联产,如琥珀酸、L-谷氨酸和 L-色氨酸等,提高了底物利用率。在 *E.coli* 中 PHB 质量可达到细胞干质量的 50%以上,但在棒杆菌中,PHB 的含量则相对较低。由于 PHB 在胞内的积累,菌株生产相应产物的产量都有所提高^[8-10]。

在本研究中,以 *C. crenatum* SYPA 5-5 这一 L-精氨酸生产菌株作为研究对象,将来源于 *Ralstonia eutropha* H16 的 PHB 代谢途径引入菌体内,以期得到胞外产 L-精氨酸、胞内产 PHB 的效果,其代谢途径如图 1 所示。经一系列的研究,观察 PHB 代谢途径的引入对宿主及 L-精氨酸产量的影响。

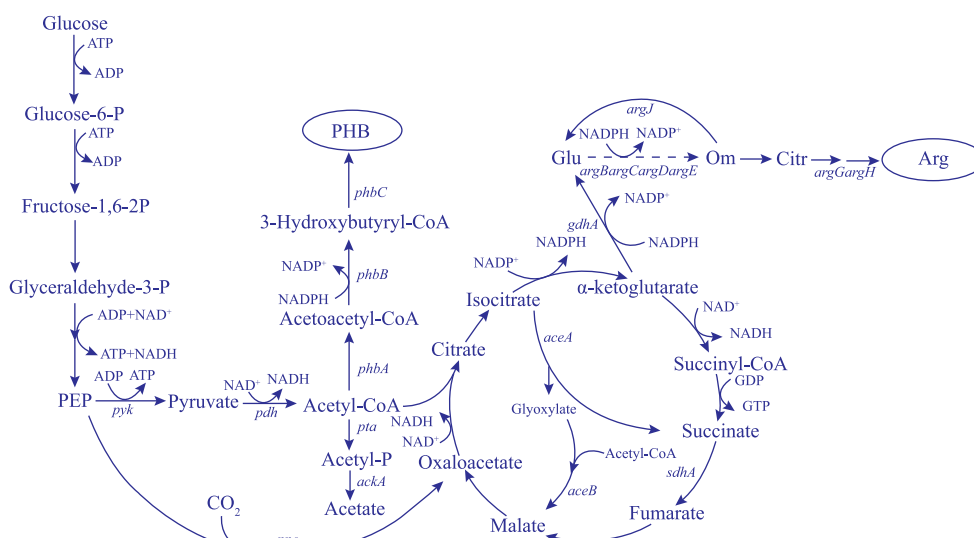


图 1 细胞内联产 L-精氨酸与 PHB 代谢途径

Fig. 1 Metabolic pathways of co-producing L-arginine and PHB in the cells

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种与质粒 钝齿棒杆菌 *Corynebacterium*

crenatum SYPA 5-5, 质粒 pDXW-10-phbCAB, 均由作者所在实验室保存;质粒 pDXW-10, 由江南大学国家重点实验室王小元教授研究室惠赠。

1.1.2 试剂 限制性内切酶 *EcoRI*、*BamHI*、*BglII*、

Hind III, T₄ DNA 连接酶, DL2000 DNA Marker, λ -*Hind* III digest DNA Marker, TaKaRa 公司产品; 乙酰辅酶 A, NADH, NADPH, 乙酰乙酰辅酶 A, 3-羟基丁酰辅酶 A (3HB-CoA), 5,5'-二硫双(2-硝基苯甲酸, DTNB), β -羟酰 CoA 脱氢酶, 氨苄青霉素, 卡那霉素, Sigma-Aldrich 公司产品; 柱式质粒小量提取试剂盒和 DNA 凝胶回收试剂盒, 上海生工生物公司产品; 其他试剂均为国产试剂。

1.1.3 培养基

种子培养基: 一水合葡萄糖 50 g/L, 硫酸铵 20 g/L, 酵母提取物 12 g/L, 七水合硫酸镁 0.5 g/L, 磷酸二氢钾 1.5 g/L, 去离子水配置, pH 7.0。

发酵培养基: 一水合葡萄糖 200 g/L, 硫酸铵 18 g/L, 酵母提取物 12 g/L, 七水合硫酸镁 0.5 g/L, 氯化钾 1 g/L, 磷酸二氢钾 2 g/L, 七水合硫酸亚铁 0.02 g/L, 一水合硫酸锰 0.02 g/L, 去离子水配置, pH 7.0。将发酵培养基用体积分数 50% 的氨水调节其 pH 保持在 7.0, 在 121 °C 下高温灭菌 30 min。

1.1.4 主要仪器 核酸电泳系统, 北京六一仪器厂制造; UVP 凝胶成像仪, UVP 有限公司(英国)制造; 3K-15 型大型冷冻离心机, 1-14 型小型离心机, Sigma 公司(德国)制造; VC130 型超声破碎仪, SONICS 公司(美国)制造; UV-2000 型紫外分光光度仪, 尤尼科(上海)仪器有限公司制造; 5-L 发酵罐, 上海宝兴生物仪器公司制造; 隔水式恒温培养箱, 立式压力蒸汽灭菌锅, 上海博讯实业有限公司制造; SBA-50 型生物传感分析仪, 山东省科学院生物研究所研制; 安捷伦 1100 型 HPLC, 安捷伦科技公司研制; GC-1690J 气相色谱仪, 杭州科晓化工仪器公司制造。

1.2 方法

1.2.1 质粒与菌株构建 文献 [11] 报道过的质粒 pBHR68 含有来自于 *Ralstonia eutropha* H16 的聚- β -羟基丁酸(PHB)合成操纵子基因 *phbCAB*, 采用基因工程技术, 将 *phbCAB* 连接到表达载体 pDXW-10, 构建得到重组质粒 pDXW-10-*phbCAB*, 如图 2 所示。将重组质粒 pDXW-10-*phbCAB* 以电转的方法转化至 *C. crenatum* SYPA 5-5 中, 于 kan^r 抗性平板上挑取阳性转化子, 即得到重组钝齿棒杆菌 *C. crenatum* SYPA 5-5/pDXW-10-*phbCAB*。

1.2.2 酶活测定 将重组菌 *C. crenatum* SYPA 5-5/pDXW-10-*phbCAB* 与出发菌株 *C. crenatum* SYPA

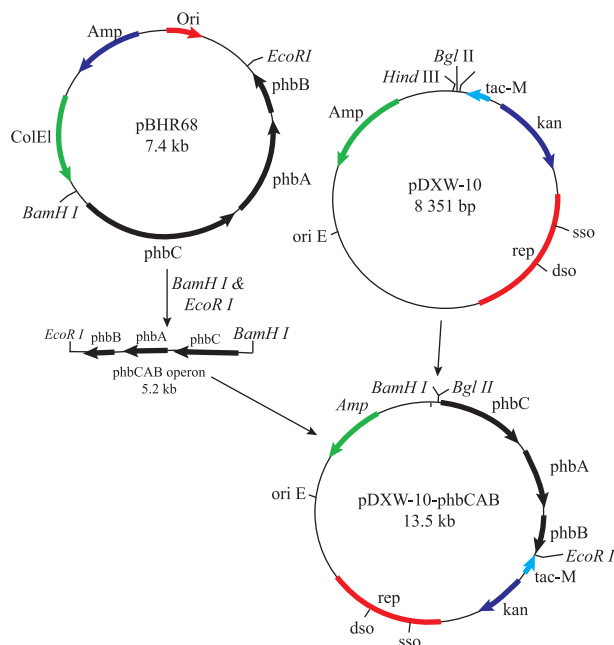


图 2 重组质粒 pDXW-10-*phbCAB* 的构建

Fig. 2 Construction of recombinant pDXW-10-*phbCAB*

5-5 分别接种于 10 mL 含卡那霉素的 LBG 培养基, 30 °C 振荡培养 24 h, 按体积分数 4% 的接种量转接于 LBG 培养基, 30 °C 培养 24 h, 取发酵液于 4 °C 10 000 r/min 离心 10 min, pH 7.0 的磷酸钠缓冲液清洗 3 次, 悬浮在 pH 7.0 的磷酸钠缓冲液, 超声波破碎处理制备粗酶液。将 30 μ L 粗酶液加入到酶活力测定缓冲体系, 立即检测相应波长下吸光值的变化^[12-13]。具体酶活测定缓冲体系分别为:

1) β -酮基硫解酶 (PhbA): 0.106 mol/L Tris-HCl (pH 7.3), 0.67 mmol/L DTT, 0.806 mmol/L 乙酰CoA, 1.88 mmol/L NADH, 2.5 U β -羟酰 CoA 脱氢酶;

2) 乙酰乙酰 CoA 还原酶 (PhbB): 25 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5), 0.25 mmol/L MgCl₂·6H₂O, 12.5 mmol/L DTT, 6.0 mmol/L NADPH, 1.25 mmol/L 乙酰乙酰 CoA;

3) PHB 合成酶 (PhbC): 50 μ mol/L 3HB-CoA, 25 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5), 1 mmol/L DTNB。

1.2.3 发酵研究 将钝齿棒杆菌 *C. crenatum* 从活化平板上挑取单菌落接种于 10 mL 含卡那霉素的 LBG 培养基, 30 °C 振荡培养 24 h, 然后全部转接于 150 mL 种子培养基, 30 °C 培养 24 h; 将上述培养好的种子液按体积分数 6% 接种量接种于发酵培养基中进行发酵培养, 发酵温度为 30 °C, pH 为 7.0, 搅拌

转速为 600 r/min,培养 96 h,初始发酵培养体积为 2.5 L。发酵过程中,温度与搅拌转速由发酵罐自动控制,pH 通过补加体积分数 50%氨水维持稳定。从第 24 小时起,每 12 h 取样一次,采用分光光度仪在 562 nm 下测定细胞 OD 值,葡萄糖用生物传感分析仪测定。

1.2.4 产物测定 PHB 含量用气相色谱测定^[14-15]。色谱条件如下:毛细管柱 30 m×0.32 mm,色谱柱中固定液为 AT.SE-30,检测器为 FID,柱温 160 ℃,汽化室与检测器的温度均为 250 ℃,载气为 N₂,流速压力 0.1 MPa,进样量 2 μL,采用外标法定量。采用氨基酸自动分析仪测定发酵液中各种氨基酸的含量。将菌体培养至指数期,进行电子透镜分析^[16]。

2 结果与讨论

2.1 含 PHB 合成基因簇菌株的构建

研究中所用到的质粒与菌株如表 1 所示。

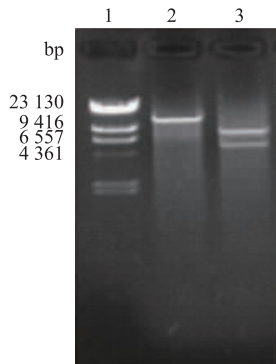
表 1 研究中所涉及的菌株与质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study

菌株与质粒	相关特征	来源
<i>Corynebacterium crenatum</i> SYPA 5-5	L-精氨酸生产菌株	文献 [17]
<i>C. crenatum</i> SYPA 5-5/pDXW-10-phbCAB	来自于 <i>C. crenatum</i> SYPA 5-5, 含有 pDXW-10-phbCAB	本研究
pBHR68	含有 <i>Ralstonia eutropha</i> H16 的 PHB 合成基因簇 <i>phbCAB</i>	文献 [11]
pDXW-10	<i>E. coli</i> - <i>C. crenatum</i> 穿梭表达载体, kanr	文献 [18]
pDXW-10-phbCAB	来自于 pDXW-10, 含有 <i>Ralstonia eutropha</i> H16 的 PHB 合成基因簇 <i>phbCAB</i>	本研究

质粒 pBHR68 含有来自于 *Ralstonia eutropha* H16 的聚-β-羟基丁酸 (PHB) 合成操纵子基因 *phbCAB*, 通过限制性内切酶 *Bam*HI 和 *Eco*RI 处理 pBHR68, 得到 PHB 合成操纵子基因 *phbCAB*, 与经过 *Bgl*II 和 *Eco*RI 处理的表达载体 pDXW-10 在 T₄DNA 连接酶的作用下 16 ℃ 过夜连接, 见图 2, 将质粒转化至大肠杆菌感受态 *E. coli* JM109 中, 挑取阳性转化子, 提取转化子中的质粒, 经酶切验证并确认重组质粒 pDXW-10-*phbCAB* 构建成功。将重组质粒 pDXW-10-*phbCAB* 以电转的方法转化至 *C. crenatum* SYPA 5-5 中, 于 kan^r 抗性平板上挑取阳性

转化子, 经显微镜检测并提取重组质粒验证, 见图 3, 条带大小正确, 即得到重组钝齿棒杆菌 *C. crenatum* SYPA 5-5/pDXW-10-*phbCAB*。



1: Marker λHind III; 2: Single digestion by *Eco*RI; 3: Double digestion by *Eco*RI and *Hind*III

图 3 重组质粒 pDXW-10-*phbCAB* 单双酶切验证

Fig. 3 Verification of recombinant pDXW-10-*phbCAB* by single and double enzyme digestion

2.2 PHB 合成关键酶酶活分析

对 *C. crenatum* 出发菌与重组菌分别超声破碎细胞, 并测定 PHB 合成关键酶的酶活。由表 2 可知, 在出发菌 *C. crenatum* SYPA 5-5 中, 3 个酶的酶活都较低, 然而在重组菌 *C. crenatum* SYPA 5-5/pDXW-10-*phbCAB* 中, PHB 合成酶酶 (PhbC) 活提高了 13 倍, β-酮基硫解酶 (PhbA) 和乙酰 CoA 还原酶 (PhbB) 也分别提高了 29 倍和 10 倍。由此可知, 外源导入的 PHB 合成基因簇在钝齿棒杆菌中有表达, 且表达较好。

表 2 PHB 合成关键酶酶活分析

Table 2 Enzyme activities assay of crude PhbC, PhbA and PhbB

菌株	比酶活/(U/mg)		
	PhbC	PhbA	PhbB
<i>C. crenatum</i> SYPA 5-5	0.02±0.00	0.02±0.00	0.06±0.01
SYPA 5-5/pDXW-10- <i>phbCAB</i>	0.27±0.01	0.58±0.02	0.64±0.02

2.3 菌株电镜分析

为了更加直观说明 PHB 合成基因簇在钝齿棒杆菌中的表达, 对 *C. crenatum* 出发菌与重组菌分别做了电子透镜分析。见图 4, 图 4(a) 为 *C. crenatum* SYPA 5-5 的电镜图, 菌体内几乎看不到 PHB 颗粒, PHB 含量很低; 然而在图 4(b) 重组菌 *C. crenatum* SYPA 5-5/pDXW-10-*phbCAB* 中, 可以看到明显的 PHB 颗粒存在。由此也进一步说明 PHB 合成基因

簇在钝齿棒杆菌中有较好的表达。

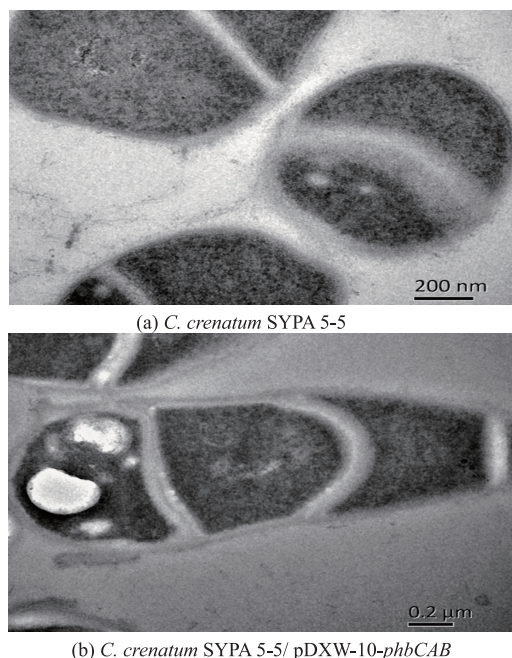


图 4 *C. crenatum* SYPA 5-5 与 *C. crenatum* SYPA 5-5/pDXW-10-phbCAB 电子透视图

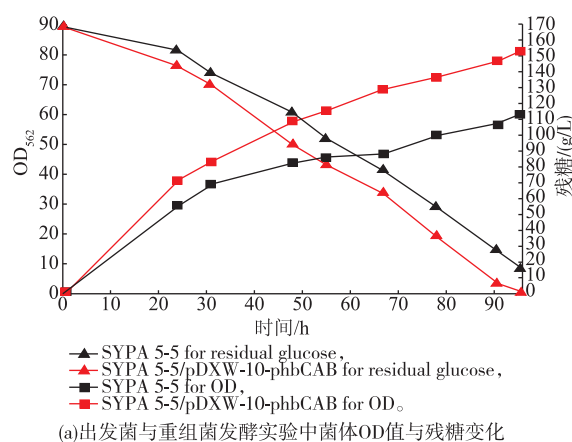
Fig. 4 TEM pictures of *C. crenatum* SYPA 5-5 and *C. crenatum* SYPA 5-5/pDXW-10-phbCAB

2.4 钝齿棒杆菌发酵研究及发酵参数分析

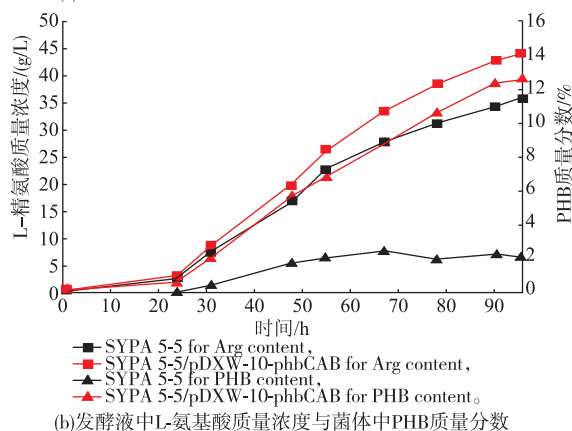
菌体内生产 L-精氨酸与 PHB 的代谢途径如图 1 所示,从底物葡萄糖出发,一方面,经过 EMP/TCA 循环,再经 ArgC—H 等一系列 L-精氨酸合成酶,最终到产物 L-精氨酸;另一方面,经 EMP 形成公共前体乙酰辅酶 A,然后经过 PHB 合成 3 个关键酶 β -酮基硫解酶 (PhbA)、NADPH 依赖的乙酰辅酶 A 还原酶 (PhbB) 和 PHB 合成酶 (PhbC) 的分别作用,最终得到产物 PHB。

对 *C. crenatum* 出发菌与重组菌分别活化,转接于种子培养基,再接种到 5 L 的发酵罐中进行分批发酵实验,定时取样并检测菌体 OD 值和发酵液中残糖含量,检测发酵液中 L-氨基酸含量与菌体中 PHB 含量,结果如图 5 所示。可知,由于 PHB 合成基因簇在菌体内有很好的表达,相比于出发菌,重组菌中 PHB 含量提高了 4 倍,占细胞干质量的 12.8%。整个分批发酵过程中,初始葡萄糖质量浓度相同,重组菌生长更快,同时糖耗速度更快,发酵至 96 h 葡萄糖耗尽,而出发菌的葡萄糖质量浓度剩余量为 15 g/L,分批发酵至 103 h 结束(图中未显示),PHB 在细胞内的积累影响到了细胞的生长。令人惊

喜的是,发酵至 96 h,重组菌中 L-精氨酸的产量达到了 43.21 g/L,比出发菌增加了 20 %,然后对发酵液中的相关氨基酸也进行了分析,见表 3。发酵液中可检测到的氨基酸中,除了 Gly 产量稍有增加及 Arg 产量显著增加外,其他大部分氨基酸产量都有所降低,初始葡萄糖质量浓度相同,说明更多的底物或代谢中间物流向 L-精氨酸合成途径。PHB 在重组菌胞内的积累,赋予了细胞一定的抗逆性,同时充当细胞的碳源与能源,国内已有相关报道^[19]。另外,结果还显示,相同时间内菌株生物量更大,菌株消耗更多的底物葡萄糖,公共前体乙酰辅酶 A 合成量增加,经过 ArgC—H 等一系列 L-精氨酸合成酶作用,从而能更好的合成 L-精氨酸。这些都说明,胞内 PHB 的积累影响了细胞整个代谢网络。在 *C. crenatum* 重组菌中,得到了联产 L-精氨酸和 PHB 的效果,同时发现,PHB 在胞内的积累对 L-精氨酸的产量有正向促进效果。



(a)出发菌与重组菌发酵实验中菌体OD值与残糖变化



(b)发酵液中L-氨基酸质量浓度与菌体中PHB质量分数

图 5 *C. crenatum* SYPA 5-5 与 *C. crenatum* SYPA 5-5/pDXW-10-phbCAB 发酵结果

Fig. 5 Fermentation result of *C. crenatum* SYPA 5-5 and *C. crenatum* SYPA 5-5/pDXW-10-phbCAB

表3 *C. crenatum* 出发菌与重组菌发酵液中氨基酸分析
Table 3 Analysis of related amino acids by *C. crenatum* SYPA 5-5 and SYPA 5-5/pDXW-10-phbCAB

氨基酸	质量浓度/(g/L)	
	<i>C. crenatum</i> SYPA 5-5	<i>C. crenatum</i> SYPA 5-5/pDXW-10-phbCAB
Ile	2.62±0.00	2.34±0.00
Lys	4.39±0.01	4.09±0.01
Glu	1.03±0.02	0.73±0.00
Gly	0.30±0.00	0.45±0.00
Thr	0.29±0.00	0.19±0.00
Val	0.56±0.00	0.42±0.00
Orn	0.52±0.00	0.26±0.00
Ser	0.21±0.00	0.10±0.00
Arg	35.95±0.62	43.21±0.87

3 结 语

在本课题研究中,采用基因工程手段,在L-精氨酸生产菌株 *C. crenatum* SYPA 5-5 中组成型表达含有 PHB 基因簇的质粒,对 PHB 合成关键酶的酶活进行测定,并对菌体进行电镜检测,发现3个关键酶表达良好,在5 L 的发酵罐上进行发酵实验,经检测,发酵96 h,胞内 PHB 质量为细胞干质量的

12.8%,出发菌株里不到3%,而发酵液中L-精氨酸质量浓度达到43.21 g/L,比出发菌株提高了20%;同时,发酵液中除L-精氨酸以外的氨基酸含量都有所降低,说明由于PHB代谢途径的引入,*C. crenatum* SYPA 5-5 的代谢网络受到影响,细胞生长更快,同时糖耗更快,实现了胞内产PHB、胞外产L-精氨酸的效果,并且L-精氨酸的产量得到了提升。清华大学陈国强教授团队将PHB代谢途径导入*C. glutamicum* 中,重组菌中L-谷氨酸的产量在发酵罐上增加23%^[9];康振等在大肠杆菌中实现了PHB和琥珀酸的联产^[8];顾鹏飞等在重组大肠杆菌中表达PHB合成基因,使L-色氨酸产量有明显提高^[10]。PHB代谢途径引入菌株,会影响细胞全局代谢网络,减少相应代谢副产品的生产,并提高细胞的抗逆性^[9]。因此,本课题研究中引入PHB代谢途径到*C. crenatum* SYPA 5-5 中,可作为一种提高L-精氨酸产量的方法。

从本文中图2可看出,PHB和L-精氨酸的合成过程都需要消耗NADPH,两者在辅酶水平上存在竞争关系。因此,接下来的研究工作可从胞内辅酶水平着手,并结合相关机理性研讨,作进一步深入探究。

参考文献:

- [1] Granik V G. Metabolism of L-Arginine[J]. **Pharmaceutical Chemistry Journal**, 2003, 37(3): 111-127.
- [2] Elias D B D, Barbosa M C, Rocha L B d S, et al. L-arginine as an adjuvant drug in the treatment of sickle cell anaemia[J]. **British Journal of Haematology**, 2013, 160: 410-412.
- [3] Hristina K, Langerholc T, Trapecar M. Novel metabolic roles of L-arginine in body energy metabolism and possitive clinical applications[J]. **The Journal of Nutrition, Health & Aging**, 2014, 18(2): 213-218.
- [4] 王哲,周岩民. L-精氨酸的理化性质、生理功能及生产工艺研究进展[J]. **饲料研究**, 2014, 13: 80-85.
WANG Zhe, ZHOU Yanming. The physicochemical properties, physiological functions and production process of L-Arginine[J]. **Feed Study**, 2014, 13: 80-85. (in Chinese)
- [5] Reinecke F, Steinbuechel A. *Ralstonia eutropha* strain H16 as model organism for PHA metabolism and for biotechnological production of technically interesting biopolymers[J]. **J Mol Microbiol Biotechnol**, 2009, 16(1-2): 91-108.
- [6] 堵国成,陈坚,伦世仪. 真养产碱杆菌积累聚-β-羟基丁酸发酵条件的研究[J]. **生物工程学报**, 2000, 16(1): 103-109.
DU Guocheng, CHEN Jian, LUN Shiyi. Studies on fermentation conditions of the accumulation of Poly-β-hydroxybutyrate in *Alcaligenes eutrophus*[J]. **Chinese Journal of Biotechnology**, 2000, 16(1): 103-109. (in Chinese)
- [7] Xu M, Rao Z, Xu H, et al. Enhanced production of L-arginine by expression of Vitreoscilla hemoglobin using a novel expression system in *Corynebacterium crenatum*[J]. **Appl Biochem Biotechnol**, 2011, 163(6): 707-719.
- [8] Kang Z, Gao C, Wang Q, et al. A novel strategy for succinate and polyhydroxybutyrate co-production in *Escherichia coli*[J]. **Bioresour Technol**, 2010, 101(19): 7675-7678.
- [9] Liu Q, Ouyang S P, Chen G Q, et al. The impact of PHB accumulation on L-glutamate production by recombinant *Corynebacterium glutamicum*[J]. **J Biotechnol**, 2007, 132(3): 273-279.
- [10] 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.
- [11] Spiekermann P, Rehm B H, Kalscheuer R, et al. A sensitive, viable-colony staining method using Nile red for direct screening of bacteria that accumulate polyhydroxyalkanoic acids and other lipid storage compounds[J]. **Archives of Microbiology**, 1999, 171(2):73-80.
- [12] Doronina N V, Ezhov V A, Trotsenko Yu A. Growth of methylosinus trichosporium OB3b on methane and Poly- β -Hydroxybutyrate biosynthesis[J]. **Applied Biochemistry and Microbiology**, 2008, 44(2):182-185.
- [13] Valentin H E, Steinbüchel A. Application of enzymatically synthesized short-chain-length hydroxy fatty acid coenzyme A thioesters for assay of polyhydroxyalkanoic acid synthases[J]. **Appl Microbiol Biotechnol**, 1994, 40:699-709.
- [14] Braunegg G, Sonnleimer B, Lafferty R. A rapid gas chromatographic method for the determination of Poly- β -hydroxybutyric acid in microbial biomass[J]. **European J Appl Microbiol Biotechnol**, 1978(6):29-37.
- [15] Cui Y, Barford J, Renneberg P, et al. Gas chromatographic determination of Poly(3-hydroxybutyrate) with alkaline hydrolysis and acid esterification[J]. **Analytical Letters**, 2007, 40(15):2915-2924.
- [16] Mayet C, Deniset-Besseau A, Prazeres R, et al. Analysis of bacterial polyhydroxybutyrate production by multimodal nanoimaging [J]. **Biotechnology Advances**, 2013, 31(3):369-374.
- [17] 熊筱晶, 奚文芳, 许正宏. L-精氨酸高产菌的诱变育种及其摇瓶产酸条件[J]. 无锡轻工大学学报, 2003, 22(3):10-13.
XIONG Yijun, DOU Wenfang, XU Zhenghong. L-Arginine production by arginine analog-resistant mutant of microorganisms [J]. **Journal of Wuxi University of Light Industry**, 2003, 22(3):10-13. (in Chinese)
- [18] Xu D, Tan Y, Wang X, et al. An improved shuttle vector constructed for metabolic engineering research in *Corynebacterium glutamicum*[J]. **Plasmid**, 2010, 64(2):85-91.
- [19] Wang Q, Yu H, Xia Y, et al. Complete PHB mobilization in *Escherichia coli* enhances the stress tolerance: a potential biotechnological application[EB/OL]. (2009-08-31)[2014-12-29]. <http://www.microbialcellfactories.com/content/8/1/47>.

会 议 信 息

会议名称(中文): 2016 年 SPIE 转化生物光子学国际会议

会议名称(英文): SPIE Translational Biophotonics 2016

所属学科: 光学、生物物理学、生物化学及分子生物学

开始日期: 2016-05-16

结束日期: 2016-05-17

所在城市: 美国

具体地点: Houston, Texas

主办单位: 国际光学工程学会

会议网站: <http://spie.org/TBP/conferencedetails/translational-biophotonics>

会议背景介绍:

SPIE Translational Biophotonics 2016 will bring together representatives of three communities:

academia, industry, practicing clinicians. Organized by SPIE and Rice University, this meeting will enable discussion between these related communities and encourage continuing development of new technologies and techniques with the goal of successful translation into practical biomedical use. Leaders in the field will discuss paths that led to their advancements and will also plot new directions for the future of optical imaging for both research and clinical applications. Clinicians will present their perspectives on application needs, while industry representatives will discuss pathways to commercialization. The poster session will be dedicated to new research advancements contributed by participants.