研究论文

DOI:10.3969/j.issn. 1673–1689.2018.08.008

sucA 缺失型大肠杆菌菌株的构建与发酵条件优化

林 凡[1,2,3]， 张震宇[1,2,3]， 孙付保[*1,2,3]， 于 林[1]

(1. 江南大学 生物工程学院,江苏 无锡 214122;2. 工业生物技术教育部重点实验室,江苏 无锡 214122;3. 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–羟脯氨酸在多领域具有重要应用价值。为了进一步提高反式–4–羟脯氨酸的产量,在已构建好的 *E. coli* BL21(DE3)Δ*putA* 的基础上,敲除基因 *sucA* 的同时插入密码子优化后的反式–4–羟化酶基因 (*hyp*)，并将构建好的质粒 pUC19–ptrp2–*hyp*–*vgb* 导入该基因敲除菌株中。之后在摇瓶水平上,单因素优化发酵条件与发酵培养基的组分,并通过正交实验进一步确定敲除菌株的培养条件。结果表明：与含有同样质粒的原菌和两种单敲除菌 *E. coli* BL21(DE3)Δ*sucA* 、*E. coli* BL21(DE3)Δ*putA* 相比,*E. coli* BL21(DE3)Δ*putA*Δ*sucA* 双敲除菌具有最高的全细胞酶活,大约是原菌的 2.6 倍;在摇瓶水平上,发酵条件优化后,以 100 mmol/L 的 L–脯氨酸为底物进行发酵,12 h 后可得到 1.08 g/L 的羟脯氨酸,是优化前的 3.87 倍。

关键词：反式–4–羟脯氨酸;*sucA*;透明颤菌血红蛋白;基因敲除;重组大肠杆菌;全细胞酶活

中图分类号:TQ 920.1　　**文献标志码**:A　　**文章编号**:1673—1689(2018)08—0830—08

Construction of *sucA*–Knockout *E. coli* Strains and Optimization of Fermentation Conditions

LIN Fan[1,2,3]， *ZHANG Zhenyu*[1,2,3]， *SUN Fubao*[*1,2,3]， *YU Lin*[1]

(1. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Wuxi 214122, China; 3. Key Laboratory of Carbohydrate Chemistry and Biotechnology, Ministry of Education, Wuxi 214122, China)

Abstract: *trans*-4-hydroxyproline has important applications in many fields. On the basis of the constructed *E. coli* BL21 (DE3)Δ*putA strain*,*sucA* gene was knocked out and the optimized *trans*-4-hydroxylase gene (*hyp*) was introduced. Then, the constructed plasmid pUC19-ptrp2–*hyp*–*vgb* which included a tryptophan tandem promoter and *Vitreoscilla* hemoglobin(VHb) was imported into the recombinant strain and overexpressed. Then in the flask level, fermentation conditions and medium components were confirmed by single factor optimization and orthogonal experiment. The results showed that, compared with the original bacteria and two single knockout strains containing

收稿日期：2016–01–06

基金项目：国家自然科学基金项目(30800018,30970058);高等学校博士学科点专项科研基金项目(200802951036);江苏省自然科学基金项目 (BK2012554)；工业生物技术教育部重点实验室主任基金项目 (KLIB–ZR200801)；国家自然科学基金面上项目(21176106)。

* **通信作者**：孙付保(1975—),男,河南南阳人,工学博士,副教授,硕士研究生导师,主要从事木质纤维素原料生物转化生物能源和生物基产品的研究。E–mail:fubaosun@ jiangnan.edu.cn

引用本文：林凡,张震宇,孙付保,等. *sucA* 缺失型大肠杆菌菌株的构建与发酵条件优化[J]. 食品与生物技术学报,2018,37(08):830–837.

the same plasmid, the double knockout strain had the highest whole-cell activity, which is about 2.6 times as the original bacteria. After optimizing the fermentation conditions, *trans*-4-hydroxyproline was accumulated to 1.08 g/L, which increased 2.87 fold.

Keywords: *trans*-4-hydroxyproline, *sucA*, *Vitreoscilla* hemoglobin, gene knockout, recombinant *E. coli*, whole cell activity

反式-4-羟脯氨酸属于不常见的氨基酸，其在医药、美容、化工、食品等领域均具有重要作用[1-3]，故近年来对其研究愈发增多。羟脯氨酸最初是在特定的蛋白中发现的，如胶原蛋白、肽类抗生素（放线菌素、绿灰菌素）[4]，目前主要是从动物胶原蛋白中分离提取获得[5]，但由于该方法需要复杂的纯化过程并会产生大量的废弃物[6]，所以研究酶转化生产羟脯氨酸具有现实必要性。

putA 编码的 PutA 蛋白具有脯氨酸脱氢酶和吡咯啉-5-羧酸脱氢酶双重功能，在 *E. coli* 细胞中，该蛋白可以催化脯氨酸氧化生成谷氨酸，使得细胞内的脯氨酸积累量减少，不利于羟脯氨酸的生成。敲除 *putA* 基因可以有效提高由脯氨酸向羟脯氨酸的转化率[7]。在 TCA 循环中，α-酮戊二酸脱氢酶催化 α-酮戊二酸到琥珀酸的过程[8-9]，*sucA* 基因编码的是 α-酮戊二酸脱氢酶复合体的 E1 亚基，敲除该基因可以使 α-酮戊二酸脱氢酶活性丧失[10]。而来自于指孢囊菌并已进行密码子优化的反式-4-羟化酶基因（*hyp*）编码的酶可以将游离的 L-脯氨酸转化为反式-4-羟脯氨酸[1,6]，同时将 α-酮戊二酸转化为琥珀酸。利用此特点，以羟化酶基因取代 *sucA* 基因，使得菌株在生长的同时可以积累反式-4-羟脯氨酸。在此过程中，反式-4-羟脯氨酸的积累与细胞的生长相互偶联。此外，编码透明颤菌血红蛋白（VHb）的 *vgb* 基因可以通过提高氧气的传递而增强呼吸作用和能量代谢[11-12]，故在质粒上引入该基因对于长时间的发酵过程较为有利。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种与质粒 *E. coli* BL21（DE3）Δ*putA* 为本实验室前期构建，*E. coli* JM109、*E. coli* BL21（DE3）为本实验室保存；表达载体 pUC19-ptrp2-*hyp*-*vgb*（简称 pUHVT4）为实验室之前构建的，质粒 pET21a、pKD4 为本实验室所有，质粒 pKD46 由他人惠赠，T 载（pUCm-T）购自上海生工。

1.1.2 试剂与酶 实验中涉及的限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、*rTaq* DNA 聚合酶、DNA Marker 购自 Takara（大连宝生物），*Taq* DNA 聚合酶和 *Pfu* DNA 聚合酶购自上海生工。胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒、PCR 产物纯化试剂盒、胰蛋白胨和酵母提取物购自上海生工。其他的生化试剂购自国药。

1.1.3 引物 引物 H1 和 H2 用于合成 *sucA* 基因的上游同源臂，P1 和 P2 用于合成卡那抗性基因（*kan*），引物 H3 和 H4 用于合成 *sucA* 基因的下游同源臂，同源臂选用长同源臂，引物设计参考文献[13]。其中，引物 H1 的 5′端带有 *Nde* I 酶切位点，H4 的 5′端带有 *Xho* I 酶切位点，用于基因片段与载体的连接；引物 H2 带有 *Hind* III 和 *BamH* I 酶切位点，用于羟化酶基因的插入；引物 H2 和 P1、P2 和 H3 反向互补，用于基因片段的融合。上述引物均由上海生工合成。

表 1　研究中用到的引物

Table 1　Primers used in the research

引物名称	引物序列（5′-3′）
H1	GGCCGTAGCATATGTGTTAGCGGCATATCGTTTC
H2	GAAGCAGCTCCAGCCTACAGGATCCATAAATAAGCTTCATCGTGATCCCTTAAGCATCTT
H3	TTAGTTCCTATTCCGAAGTTCCGCCAGCATCATTTCCGTGAAG
H4	GCATTACTCGAGCGAGTCAGACGACCACCCAC
P1	AAGATGCTTAAGGGATCACGATGAAGCTTATTTATGGATCCTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
P2	CTTCACGGAAATGATGCTGGCGGAACTTCGGAATAGGAACTAA
Y1	GGTGGTAGACATGGGACAAT

1.2 方法

1.2.1 含有打靶片段载体的构建 扩增获得 *sucA* 基因的上、下游同源臂和卡那抗性基因,将三者以摩尔比 1:1:1 进行混合,以 H1 和 H4 为引物,扩增获得 3 个基因片段的融合片段[14-15]。将融合片段与 T 载(pUCm-T)以 7:1~10:1 的比例混合,用 T4 DNA 连接酶进行连接后导入 *E. coli* JM109, 载体命名为 pUCm-T-AK,连接体系和条件参照 Takara 说明书。之后用 *Xho* I 和 *Nde* I 双酶切载体 pUCm-T-AK 获得含有酶切位点的融合片段, 与同样双酶切的 pET21a 进行连接,载体命名为 pET21a-AK。*Hind* III 和 *BamH* I 双酶切质粒 pUHVT4 获得 *hyp* 基因,与同样双酶切的质粒pET21a-AK 进行连接,载体命名为 pET21a-AKH,从而获得含有打靶片段的载体。

1.2.2 *sucA* 基因敲除菌的获得 本次基因敲除是基于 Red 重组系统进行的,具体实施步骤参考文献[16-18]。

1.2.3 发酵液中羟脯氨酸的测定 采用比色法测定发酵液中的羟脯氨酸含量,反应原理与具体实验步骤参考文献[19]。

1.2.4 初步筛选高产菌株 将质粒 pUHVT4 转入 *E. coli* BL21(DE3)Δ*putA*Δ*sucA* 的转化子中,35 ℃,220 r/min 进行发酵 ,比色法测定羟脯氨酸的产量,将最为高产的菌株作为后续实验的研究对象。提取该菌株的基因组,以 Y1 和 H4 为引物,PCR 获得打靶片段所在的基因片段,并测序。

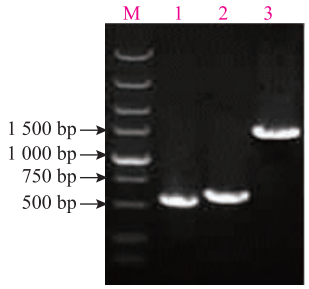
1.2.5 全细胞酶活测定 在平板上划线后,挑取单菌落接种 LB 液体培养基,37 ℃培养 12 h, 测定菌的全细胞酶活,测定方法参考[1,4]。其中,1 个单位酶活的定义为:1 min 催化反应得到 1 μmol 反式-4-羟脯氨酸的酶量,单位为 U;全细胞酶活为每 g 干菌体的酶活,单位为 U/DCW。

1.2.6 重组菌株发酵条件的优化 种子培养:挑取活化后的 *E. coli* BL21 (DE3)Δ*putA*Δ*sucA* (pUHVT4)单菌落接种到含有抗生素的 30 mL(250 mL 锥形瓶)LB 培养基中,37 ℃,220 r/min 培养 8 h。发酵培养:将种子液以 6%的接种量接入 30 mL(250 mL 锥形瓶)发酵培养基中,35 ℃,220 r/min 培养 12 h。在摇瓶水平优化发酵培养基的组分与发酵条件下,确定较优的培养基组分。包括葡萄糖(0、2、4、8、12、16 g/L)和甘油(0、3、6、10、14 g/L)、玉米浆(8、12、16、20、24 g/L)、K_2HPO_4 (1.5、9、11、14、17、25 g/L)、(NH4)2SO4(0、3、8、13、17、21 g/L)和 $FeSO_4$ 浓度 (0、1、2、3、4 mmol/L) 以及 pH(6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5),之后进行正交实验。

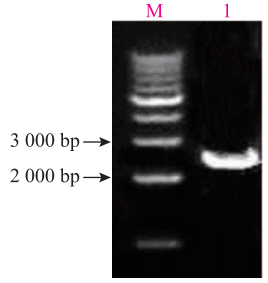
2 结 果

2.1 *sucA* 基因的上、下游同源臂、卡那抗性基因以及融合片段的获得

以提取的 *E. coli* BL21(DE3)的基因组为模板,以 H1、H2 和 H3、H4 为引物,PCR 获得 *sucA* 基因的 548 bp 的上游同源臂和 591 bp 的下游同源臂。以质粒 pKD4 为模板,以 P1 和 P2 为引物,获得大小为 1 521 bp 的 *kan* 基因片段(图 1)。三者混合,PCR 获得大小为 2.6 kb 的片段。



M—DNA Marker; 1—上游同源臂; 2—下游同源臂; 3—*kan*基因片段
(a)



M—DNA Marker; 1—融合片段
(b)

图 1 基因敲除用 PCR 片段的电泳图谱

Fig. 1 Electrophoresis maps of PCR products for gene deletion

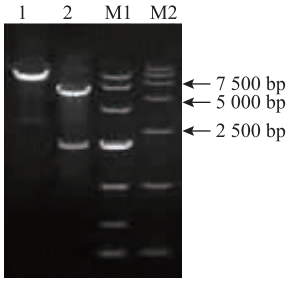
2.2 含有打靶片段的载体构建

重组质粒 pUCm-T-AK,用引物 H1 和 H4 作为验证引物, 以提取的质粒为模板,PCR 获得大小为 2.6 kb 的条带为正确质粒。质粒 pET21a-AK 用 *Hind* III 单酶切获得大小为 8 049 bp 的条带,*Xho* I 和 *Hind* III 得到大小分别为 2 093 bp 和 5 956 bp 的两条条带,凝胶电泳图谱见图 2。

2.3 *E. coli*△*putA* 菌株的 *sucA* 基因敲除

以提取的质粒 pET21a-AKH 为模板, 以 H1 和

H4 为引物，获得大小为 3.4 kb 的打靶片段。电转后的转化子以引物 Y1 和 P2 作为验证引物，在 NCBI 里将该引物与 *E. coli* BL21(DE3)的基因组比对后没有条带，缺失菌经菌落 PCR 扩增则获得大小为 3 kb 的电泳条带。验证正确的 *E. coli* BL21(DE3) Δ*putA*Δ*sucA*(BPAP)转化子有 4 个，分别导入质粒 pUHVT4。初始腐氨酸浓度为 8 mmol/L，发酵 12 h 的发酵结果如图 3 所示，选用羟脯氨酸产量最高的 3 号菌株作为后续的实验对象。提取 3 号菌株的基因组，以 Y1 和 H4 为引物进行 PCR，将获得的 PCR 片段进行测序，测序结果表明，羟化酶基因成功重组到基因组上。



1—双酶切条带；2—单酶切条带；M1、M2—DNA Marker

图 2　pET21a–AK 单、双酶切

Fig. 2　Double digests of pET21a–AK

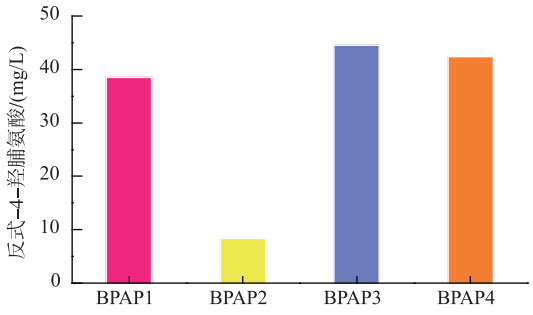
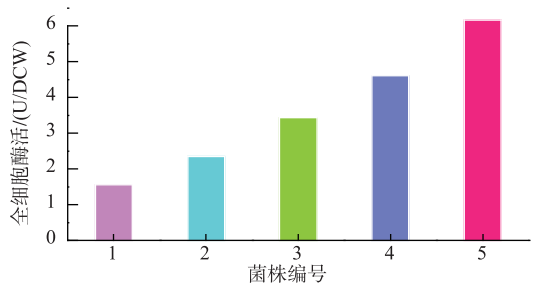


图 3　4 个转化子的发酵结果

Fig. 3　Fermentation results of converters

2.4　各种菌株的全细胞酶活测定

测定 *E. coli* BL21 (DE3)、*E. coli* BL21(DE3) (pUHVT4)、*E. coli* BL21(DE3)Δ*putA* (pUHVT4)、*E. coli* (DE3)Δ*sucA* (pUHVT4)、*E. coli* BL21 (DE3) Δ*putA*Δ*sucA*(pUHVT4)五株菌株的全细胞酶活，结果见图 4。从测定结果看，菌株 *E. coli* BL21(DE3) Δ*putA*Δ*sucA*(pUHVT4)的全细胞酶活最高，其次是 *E. coli* BL21(DE3)Δ*sucA*(pUHVT4)和 *E. coli* BL21 (DE3)Δ*putA* (pUHVT4)，均高于原菌 *E. coli* BL21 (DE3)(pUHVT4)，说明不论单基因敲除还是双基因敲除均有利于提高细胞的全细胞酶活。其次，*E. coli* BL21(DE3)Δ*sucA* (pUHVT4)的全细胞酶活高于菌 *E. coli* BL21(DE3)Δ*putA* (pUHVT4)，说明从全细胞酶活来看，敲除基因 *sucA* 后的产羟脯氨酸的效果要好于敲除基因 *putA*。而菌株 *E. coli* BL21 (DE3)Δ*putA*Δ*sucA* (pUHVT4)的全细胞酶活高于任何一个单敲除菌，说明两个基因的敲除效果是相互叠加的却又不是简单的相加效果。



1–*E. coli* BL21(DE3)；2–*E. coli* BL21(DE3)(pUHVT4)；3–*E. coli* BL21 (DE3)Δ*putA* (pUHVT4)；4–*E. coli* BL21 (DE3) Δ*sucA*(pUHVT4)；5–*E. coli* BL21(DE3)Δ*putA*Δ*sucA*(pUHVT4)

图 4　不同菌株的全细胞酶活

Fig. 4　Whole cell activity of strains

2.5　发酵单因素优化

2.5.1　碳源对反式–4–羟脯氨酸产量的影响　在不加甘油的前提下，对葡萄糖的质量浓度进行优化。从图 5 来看，不加葡萄糖时，OD_{600} 与羟脯氨酸的产量远低于其他浓度，但是羟脯氨酸的产量也在 160 mg/L 左右，分析原因可能是：发酵用的玉米浆中含有还原糖，可以为微生物提供少量的碳源。葡萄糖质量浓度为 2 g/L 时的 OD_{600} 远高于不加葡萄糖，但在高于 2 g/L 之后便没有明显的变化，而羟脯氨酸的产量则在葡萄糖质量浓度为 4 g/L 时达到了最高值。在葡萄糖添加质量浓度为 4 g/L 的条件下，优化甘油的浓度。从图 6 来看，甘油质量浓度对 OD_{600} 没有明显的影响，而羟脯氨酸的产量则在甘油质量浓度为 6 g/L 时达到了最大值。

2.5.2　氮源对反式–4–羟脯氨酸产量的影响　玉米浆中富含多肽、多糖、亚硫酸、蛋白质以及多种氨基酸，这些成分多作为发酵生产氨基酸的前提物质。在发酵生产过程中除了作为氮源，玉米浆中的生长因子尤其是生物素对氨基酸的生产也有促进作用，故以玉米浆作为发酵有机氮源，成本低廉并且有效[20]。从图 7 来看，玉米浆的添加有利于菌体的生长，在低于 20 g/L 时有利于羟脯氨酸的生成，但添加量高

于 20 g/L 时,羟脯氨酸的产量不但没有提高,反而有所下降。最终优化后,将最适的玉米浆质量浓度定为 20 g/L。

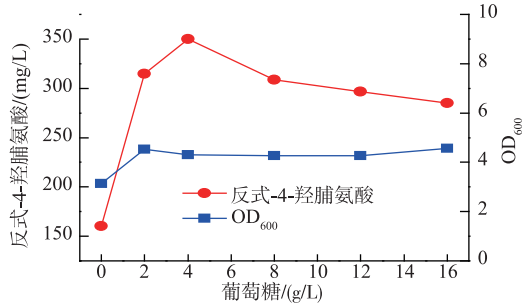


图 5　葡萄糖对反式–4–羟脯氨酸产量的影响

Fig. 5　Effect of glucose on trans–4–hydroxyproline

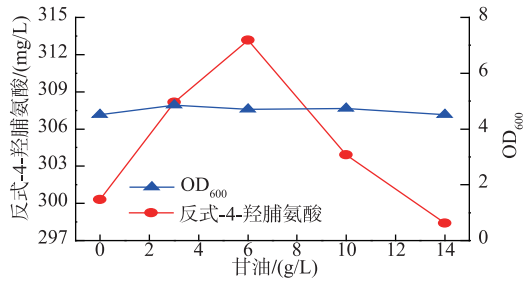


图 6　甘油对反式–4–羟脯氨酸产量的影响

Fig. 6　Effect of glycerol on trans–4–hydroxyproline

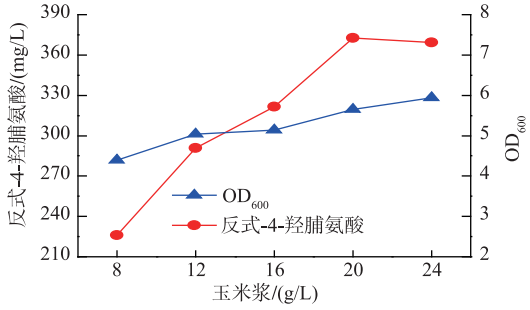


图 7　玉米浆对反式–4–羟脯氨酸产量的影响

Fig. 7　Effect of corn steep liquor on trans –4 –hydroxyproline

2.5.3　K_2HPO_4 对反式–4–羟脯氨酸产量的影响　对 K_2HPO_4 的质量浓度进行优化，发现其对羟脯氨酸产量的影响最为显著。从图 8 来看,在 K_2HPO_4 的质量浓度低于 17 g/L 时,OD_{600} 随着 K_2HPO_4 的添加逐渐升高,当质量浓度高于 17 g/L 时,OD_{600} 有所下降。而羟脯氨酸的产量在质量浓度为 11 g/L 时达到了最高值,由初始培养基的 216 mg/L 达到了 753 mg/L。分析原因:K_2HPO_4 为微生物的生长与氨基酸的发酵提供磷、钾元素;同时,K_2HPO4 水溶液呈微碱性,可以与酸性物质反应生成 KH_2PO_4,KH_2PO_4 则与碱性物质反应生成 K_2HPO4,K_2HPO_4 与 KH_2PO_4 的酸碱性均不强，可以将发酵体系的 pH 维持在较为稳定的范围。

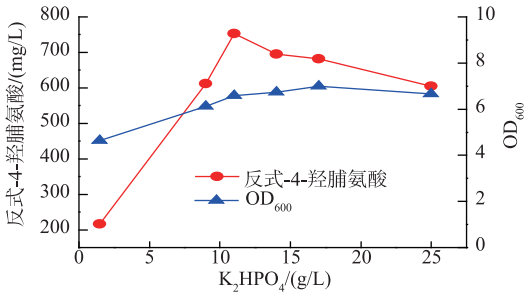


图 8　K_2HPO_4 对反式–4–羟脯氨酸产量的影响

Fig. 8　Effect of K_2HPO_4 on trans–4–hydroxyproline

2.5.4　$(NH_4)_2SO_4$ 对反式–4–羟脯氨酸产量的影响　发酵过程中,$(NH_4)_2SO_4$ 既可以作为无机氮源,同时 NH_4^+是一种较好的缓冲离子，在某种程度上可以调节 pH。其质量浓度对羟脯氨酸产量的影响如图 9 所示,在 $(NH_4)_2SO_4$ 质量浓度低于 17 g/L 时,OD_{600} 随着 $(NH_4)_2SO_4$ 的添加而升高，当添加质量浓度高于 17 g/L 时,OD_{600} 开始下降。而羟脯氨酸的产量则在 $(NH_4)_2SO_4$ 质量浓度为 13 g/L 时达到了最高值。

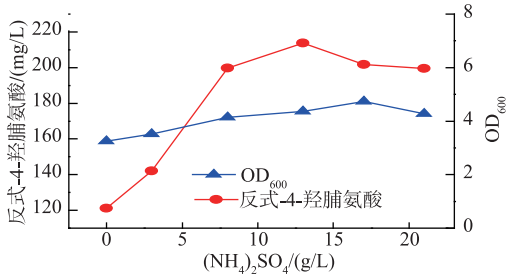


图 9　$(NH_4)_2SO_4$ 对反式–4–羟脯氨酸产量的影响

Fig. 9　Effect of $(NH_4)_2SO_4$ on trans–4–hydroxyproline

2.5.5　$FeSO_4$ 对反式–4–羟脯氨酸产量的影响　脯氨酸羟基化生成羟脯氨酸的过程是由反式–4–羟化酶催化的，而反式–4–羟化酶属于 2–酮戊二酸依赖型双加氧酶家族,该酶的催化过程需要 Fe^{2+}的参与[6]。从图 10 来看,OD_{600} 随着 $FeSO_4$ 浓度的升高而升高,也就是说，适量的添加亚铁离子有利于菌体的生长。当不添加 $FeSO_4$ 时,仍有较高的羟脯氨酸产量,可能是由于玉米浆中含有一定浓度的铁元素。最终优化结果表明,羟脯氨酸的产量在 $FeSO_4$ 浓度为

1 mmol/L 时达到了最高值。

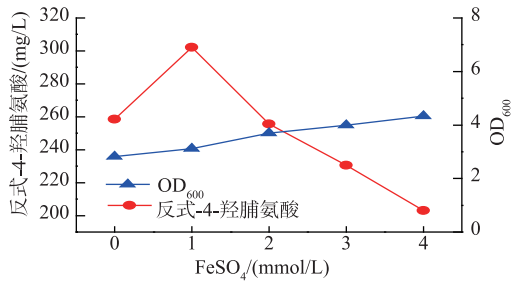


图 10　$FeSO_4$ 对反式–4–羟脯氨酸产量的影响

Fig. 10　Effect of $FeSO_4$ on trans–4–hydroxyproline

3.5.6　pH 对反式–4–羟脯氨酸产量的影响　发酵培养液的初始 pH 会直接影响菌株的生长与代谢活动[21]，随着发酵过程的进行，培养基成分的改变和微生物的代谢产物都会使 pH 发生极大变化。从图 11 来看，随着初始 pH 的增大，菌体 OD_{600} 有所升高，但当 pH 到 9.5 时，菌体的生长受到极大的抑制，几乎不能够进行生长。而羟脯氨酸的积累量随着 pH 的增大而逐渐升高，在 pH 为 8.5 时达到了最大值，之后迅速下降。表明，过碱的环境会严重抑制菌的生长与羟脯氨酸的产生。

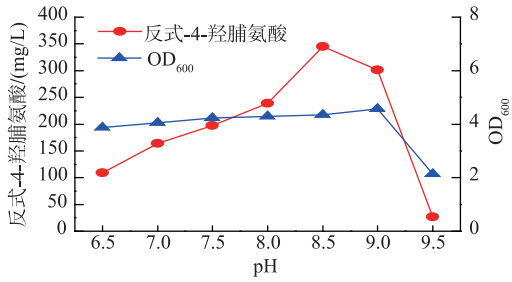


图 11　pH 对反式–4–羟脯氨酸产量的影响

Fig. 11　Effect of pH on trans–4–hydroxyproline

3.5.7　正交实验　根据单因素优化的结果，进行正交实验，正交因素和水平以及正交结果分别如表 2 和表 3 所示。

表 2　正交实验因素水平

Table 2　Factors level of orthogonal experiment

编号	因素	水平 1	水平 2	水平 3
A	葡萄糖/(g/L)	2	4	8
B	甘油/(g/L)	3	6	10
C	玉米浆/(g/L)	16	20	24
D	K_2HPO_4/(g/L)	9	11	14
E	$(NH_4)_2SO_4$/(g/L)	8	13	17
F	NaCl/(g/L)	0.75	1.00	2.00
G	Fe^{2+}/(mmol/L)	0	1	2

表 3　正交实验结果

Table 3　Results of orthogonal experiment

序列号	A	B	C	D	E	F	G	反式–4–羟脯氨酸/(mg/L)
1	1	1	1	1	1	1	1	851.31
2	1	2	2	2	2	2	2	775.30
3	1	3	3	3	3	3	3	552.70
4	2	1	1	2	2	3	3	762.33
5	2	2	2	3	3	1	1	626.90
6	2	3	3	1	1	2	2	885.53
7	3	1	2	1	3	2	3	505.94
8	3	2	3	2	1	3	1	714.37
9	3	3	1	3	2	1	2	832.61
10	1	1	3	3	2	2	1	578.94
11	1	2	1	1	3	3	2	845.58
12	1	3	2	2	1	1	3	849.50
13	2	1	2	3	1	3	2	762.33
14	2	2	3	1	2	1	3	677.27
15	2	3	1	2	3	2	1	788.57
16	3	1	3	2	3	1	2	560.54
17	3	2	1	3	1	2	3	830.50
18	3	3	2	1	2	3	1	563.36
均值 1	742.222	670.232	818.483	721.498	815.59	733.022	687.242	
均值 2	750.488	744.987	680.555	741.768	698.302	727.463	776.982	
均值 3	667.887	745.378	661.558	697.33	646.705	700.112	696.373	
极差	82.601	75.146	156.925	44.438	168.885	32.910	89.740	

由表中的极差得到因素的主次顺序依次为：$(NH_4)_2SO_4$(E)>玉米浆(C)>Fe^{2+}(G)>葡萄糖(A)>甘油(B)>K_2HPO_4(D)>NaCl(F)，得到的最佳组合：$A_2B_3C_1D_2E_1F_1G_2$，即葡萄糖 4 g/L，甘油 10 g/L，玉米浆 16 g/L，K_2HPO_4 11 g/L，$(NH_4)_2SO4$ 8 g/L，NaCl 0.75 g/L，$MgSO_4$ 0.3 g/L，$CaCl_2$ 0.005 g/L，$FeSO_4$ 1 mmol/L。优化后的发酵培养基验证：同样培养条件下，培养基优化前的反式-4-羟脯氨酸产量为 0.28 g/L，培养基优化后的反式-4-羟脯氨酸产量为 1.08 g/L，是优化前的 3.87 倍。

3 结 语

本文在 *E. coli* BL21(DE3)Δ*putA* 的基础上，进一步敲除了基因 *sucA* 并在基因组上引入羟化酶基因(*hyp*)。但由于基因组上的表达量不够高，故导入辅助质粒 pUC19-ptrp2-*hyp*-*vgb*，其中，*vgb* 基因能够提高细胞的溶氧，对于长时间的发酵过程较为有利。实验室前期进行菌株 *E. coli* BL21(DE3)(pUHVT4)的培养基优化，在初始脯氨酸 400 mmol/L，发酵 24 h 后的反式-4-羟脯氨酸产量为 0.97 g/L。而构建的突变菌优化发酵培养基后，在初始 L-脯氨酸为 100 mmol/L，发酵 12 h 时的产量为 1.08 g/L，相比较而言，双敲除菌 *E. coli* BL21(DE3)Δ*putA*Δ*sucA*(pUHVT4)具有明显优势，不仅缩短了发酵时间，而且提高了脯氨酸的转化率。

接下来需在摇瓶优化的基础上，进行发酵罐的放大实验，通过流加葡萄糖，维持重组大肠杆菌的持续生长从而不断积累反式-4-羟脯氨酸，为工业化生产做准备。

参考文献：

[1] LIU Hedong,YUAN Chunwei,ZHANG Zhenyu. Expression of codon-optimized proline-4-hydroxylase in *Escherichia coli* and its effect on *trans*-4-hydroxyproline biosynthesis [J]. **Chinese Journal of Bioprocess Engineering**,2014,12 (6):44-51.(in Chinese)

[2] FRIEDEMANN N M,EUSTERGERLING A,NUBBEMEYER U. New optically active 4-Alkoxyprolinol ethers derived from *trans*-4-Hydroxy-L-proline[J]. **European Journal of Organic Chemistry**,2012,2012(4):837-843.

[3] KUMAR A V,RAO K R. *trans*-4-Hydroxy-L-proline:a novel starting material for N -alkylpyrroles synthesis [J]. **Tetrahedron Letters**,2011,52(25):3237-3239.

[4] SHIBASAKI T,MORI H,CHIBA S,et al. Microbial proline 4-hydroxylase screening and gene cloning [J]. **Applied & Environmental Microbiology**,1999,65(9):4028-4031.

[5] ZHANG Ziqiang,ZHAO Dongxu,YANG Xinlin. Research and development of hydroxyproline [J]. **Amino Acids and Biotic Resources**,2006,28(1):55-58.(in Chinese)

[6] SHIBASAKI T,OZAKI A M H. Enzymatic production of *trans*-4-hydroxy-L-proline by regio- and stereospecific hydroxylation of L-proline[J]. **Bioscience Biotechnology & Biochemistry**,2000,64(4):746-750.

[7] SHIBASAKI T,HASHIMOTO S,MORI H,et al. Construction of a novel hydroxyproline-producing recombinant *Escherichia coli* by introducing a proline 4-hydroxylase gene[J]. **Journal of Bioscience & Bioengineering**,2000,90(5):522-525.

[8] YU B J,SUNG B H,JU Y L,et al. *sucAB* and *sucCD* are mutually essential genes in *Escherichia coli* [J]. **Fems Microbiology Letters**,2006,254(2):245-250.

[9] PARK S J,CHAO G,GUNSALUS R P. Aerobic regulation of the *sucABCD* genes of *Escherichia coli*,which encode alpha-ketoglutarate dehydrogenase and succinyl coenzyme A synthetase:roles of *ArcA*,*Fnr*,and the upstream sdhCDAB promoter[J]. **Journal of Bacteriology**,1997,179(13):4138-4142.

[10] GREEN L S,LI Y,EMERICH D W,et al. Catabolism of alpha-ketoglutarate by a *sucA* mutant of *Bradyrhizobium japonicum*:evidence for an alternative tricarboxylic acid cycle[J]. **Journal of Bacteriology**,2000,182(10):2838-2844.

[11] ZHANG L,LI Y,WANG Z,et al. Recent developments and future prospects of *Vitreoscilla* hemoglobin application in metabolic engineering[J]. **Biotechnology Advances**,2007,25(2):123-136.

[12] ZHAO Yalan,XU Chunyan,MA Yue,et al. *Vitreoscilla* hemoglobin and construction of the hypoxia-tolerant antibiotic-producing strains[J]. **Life Science Research**,2015,19(4):347-352.(in Chinese)

[13] YIN Guohua,LIU Nan,SUN Zhaonan,et al. Konck-out the mc gene of *E. coli* using Red-mediated recombination for

construction of dsRNA prokaryotic expression system [J]. **Journal of Shandong Agricultural University:Natural Science**, 2009,40(3):461-464.(in Chinese)

[14] EDYTA S,TANIA N,C ELIZABETH O,et al. Fusion PCR and gene targeting in *Aspergillus nidulans* [J]. **Nature Protocols**, 2006,1(6):3111-3120.

[15] CHEN Guoliang,BAI Xingjun,ZHAO Rong,et al. Establishment and optimization of PCR methods for constructing fusion gene [J]. **Biotechnology Bulletin**,2010,8:209-213.(in Chinese)

[16] DATSENKO K A,WANNER B L. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products[J]. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**,2000,97(12):6640-6645.

[17] BABA T,ARA T,HASEGAWA M,et al. Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame,single-gene knockout mutants:the Keio collection[J]. **Molecular Systems Biology**,2006,2(1):1-11.

[18] ZHOU Li,NIU Dandan,LI Ning,et al. Multiple gene inactivation approach in *Escherichia coli* mediated by a combination of Red recombination and Xer recombination[J]. **Microbiology China**,2010,37(6):923-928.(in Chinese)

[19] PENG Yafeng,ZHOU Yaobin,XUE Feng,et al. Determination of hydroxyproline content in soy-bean sauce by colorimetric method[J]. **China Condiment**,2010,35(2):100-101.(in Chinese)

[20] ZUO Ying,ZHANG Ping,ZHANG Hui. Effect of corn steep liquor in the amino acid fermentation industry [J]. **China Brewing**, 2013,32(11):18-22.(in Chinese)

[21] WANG Zhixin,CAI Yujie,LI Yanyan,et al. Effect of fermentation medium and conditions on laccase production by *Pycnoporus* sp. SYBC-L1[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2009,28(6):832-839.(in Chinese)

会 议 消 息

2018(第 3 届)抗菌科学与技术论坛

会议时间:2018-11-24 至 2018-11-25

会议地点:北京

官方网址:http://www.kjj.com.cn/html/2018/xiehuidongtai_0508/3929.html

会议注册:请填写参会回执并提交至 ciaa2001@126.com。请注明“ASTF2018 注册参会”。

抗菌科学技术论坛是全国卫生产业企业管理协会抗菌产业分会主办的学术会议,每两年举办一届,旨在探讨和交流前瞻性的抗菌技术及发展趋势,展示中国抗菌产业的最新学术成果,是抗菌行业最具知名度和影响力的学术交流大会。

2018(第 3 届)抗菌科学与技术论坛将于 2018 年 11 月 24 日-25 日在北京西郊宾馆召开。本次大会由全国卫生产业企业管理协会抗菌产业分会、北京化工大学生命科学与技术学院、生物医用材料北京实验室共同主办,将邀请一批国内外相关领域的知名学者,包括两院院士、千人计划专家、长江学者、国家杰出青年基金获得者等进行大会报告和主题报告,并设有口头报告和墙报展讲,交流在抗菌表面与界面、无机抗菌材料、有机抗菌材料、其他抗菌材料、微生物检测及分析等方面取得的最新进展。诚挚邀请和热忱欢迎您参加本次大会!

会议咨询:

(一)曾雅晶,010-82543499/15652838082,ciaa2001@126.com

(二)论文及报告:王 兴,13911527186@163.com

(三)会议合作、赞助及现场展位:李明忠,010-82543777/18814881688,ciaa2001@126.com