分类号： Q939.92 单位代码： 10720

密 级： 公开 学 号 ： 1107100103



硕 士 学 位 论 文

**甘油合成关键酶基因的克隆表达及其应用**

**Cloning, Expression and Application of Key Enzyme Genes for Glycerol Synthesis from *Candida glycerinogenes* and *Saccharomyces cerevisiae***

**论 文 作 者： 刘小红**

**指导教师、职称： 陈文强 教授 诸葛斌 教授**

**学科、专业名称：**  **植物学**

**研** 究 方 向**：**  **植物生物技术**

二 〇 一 四 年 五 月

**陕西理工学院学位论文独创性声明**

本人声明所呈交的学位论文是我在导师的指导下进行的研究工作及取得的研究成 果。尽我所知，除文中已经注明引用的内容外，论文中不包含其他个人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得陕西理工学院或其它教育机构的学位或证书而使用过的材料。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中作了明确说明并表示谢意。

**作者签名： 年 月 日**

**陕西理工学院学位论文使用授权声明**

本人同意研究生在校攻读学位期间论文工作的知识产权单位属陕西理工学院。本人保证毕业离校后，发表本论文或使用本论文成果时署名单位仍为陕西理工学院。学校有权保留学位论文并向国家主管部门或其它指定机构送交论文的电子版和纸质版；本人授权陕西理工学院可以将本学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存和汇编本学位论文。

本学位论文属于

1、保密□，在 年解密后适用本授权书。

2、不保密□。（请在以上相应方框内打―√‖）

**作者签名： 年 月 日**

摘要

甘油不仅是生物中重要的功能物质，而且是一种重要的三碳醇类平台工业化合物，具有广泛的应用价值，在国防，医药，食品等行业都有重要的作用。近年来，甘油作为生产高附加值化合物的原料，如1, 3-丙二醇、3-羟基丙酸、环氧氯丙烷、聚羟基脂肪酸酯(PHA)等，而备受关注，其中1, 3-丙二醇是世界公认的12种最有潜力的重要工业材料，可与对苯二甲酸聚合形成新型的聚酯材料PTT，是国际研究热点。本文在江南大学工业微生物与生物工程反应中心获得的产甘油假丝酵母基础上对甘油合成关键酶基因进行克隆和不同宿主的表达，并对其在1, 3-丙二醇生物合成中的应用进行探索。

本研究利用PCR方法，分别以产甘油假丝酵母和酿酒酵母染色体DNA为模板，克隆获得3-磷酸甘油脱氢酶编码基因*CgGPD*和3-磷酸甘油酯酶编码基因*ScGPP2*，在对这两个关键基因的生物学信息进行了一系列分析的基础上，构建表达重组质粒pE*tac*-*CgGPD*，pE*tac*-*ScGPP2*和pE*tac*- *CgGPD* -*tac*- *ScGPP2*。

将所构建的表达重组质粒pE*tac*- *CgGPD* -*tac*- *ScGPP2*转入*E. coli* JM109，获得重组菌*E. coli* JM109(pE*tac*- *CgGPD* -*tac*- *ScGPP2*)；经IPTG的诱导，SDS-PAGE电泳检测，表明重组蛋白表达正确；酶活性测定表明：与野生菌株中没有检测到相应的酶活相比，重组大肠杆菌中3-磷酸甘油脱氢酶酶活力为0.06 U/mg蛋白，3-磷酸甘油酯酶酶活力为

0.01 U/mg蛋白；重组菌胞外被检测到甘油说明来源于酵母的甘油合成途径已成功构建于原核生物大肠杆菌中。

以此研究结果为基础，将所获得的甘油合成关键基因*CgGPD*和*ScGPP2*转入产1,3-丙二醇的克雷伯氏菌株中，构建可利用葡萄糖为底物的产1,3-丙二醇的克雷伯氏工程菌(*K. pneumoniae* /pE*tac*-*CgGPD*-*tac*-*ScGPP2*)，经SDS-PAGE检测和酶活测定，结果表明，两个甘油合成基因在克雷伯氏菌中都成功表达，重组菌3-磷酸甘油脱氢酶酶活力为0.1

U/mg总蛋白，3-磷酸甘油酯酶酶活力为0.02 U/mg总蛋白；野生对照菌株中没有这两个蛋白的酶活性，表明该甘油途径在克氏工程菌中有效存在。

对所构建的克雷伯氏重组菌株(*K. pneumoniae* /pE*tac*-*CgGPD*-*tac*-*ScGPP2*)发酵生产1, 3-丙二醇的性能进行了初步的考察。结果表明在以葡萄糖为底物发酵时，发酵液中一

定量的甘油积累，可以诱导1,3丙二醇合成途径的启动。对克雷伯氏重组菌株生产1, 3-

丙二醇的发酵性能进行优化，表明糖浓度提高1%，1, 3-丙二醇的产量增加了2.15倍。

i

补加1%的甘油发酵结果表明，在以葡萄糖为唯一碳源的一步法生产1, 3-丙二醇的发酵中，一定浓度的甘油，可以快速启动1, 3-丙二醇的合成途径，缩短发酵周期，节省成本。

通过对重组菌*K. pneumoniae* (pE*tac*-*CgGPD*-*tac*-*ScGPP2*)和野生克雷伯氏菌碳流代谢分析进一步证实：3-磷酸甘油脱氢酶基因（*CgGPD*）和3-磷酸甘油酯酶基因（*ScGPP2*）的加入，在克雷伯氏菌中搭建了一座桥梁，使磷酸二羟丙酮转化为克雷伯氏菌可以利用的底物甘油，成功的完成了葡萄糖到甘油的代谢转化，从而为葡萄糖到1, 3-丙二醇的合成提供了一种潜在的工艺路线。

关键词：3-磷酸甘油脱氢酶； 3-磷酸甘油酯酶；克隆；肺炎克雷伯氏菌； 1； 3-丙二醇

**Abstract**

Glycerol, not only the important biological function material, but also the industrial alcohol compounds for three-carbon platform, had wide applications in defense, medicine, food and other industries. In recent years, glycerol as a raw material compounds has been paid more attention to the production of high value-added, such as 1,3 - propanediol, 3 - hydroxy acid, epoxy chloropropane, polyhydroxyalkanoate etc.. Among which, 1,3 - propanediol is worldwidkly recognized as the 12 most important industrial materials. It is an international hotspot that 1,3 - propanediol has the potential to be polymerized with terephthalic acid to form a new type of polyester material polytrimethylene terephthalate (PTT). This study is based on the *Candida glycerinogenes* stored by jiangnan University and cloned glycerol synthesis key enzyme gene, expressed the genes in different hosts. Then the glycerol synthesis pathway was converted to explore the application in 1,3 - propanediol biosynthesis in *Klebsiella pneumoniae*.

This research cloned the *CgGPD* gene encoding glycerol 3-phosphate dehydrogenase from *C. glycerinogenes* and *ScGPP2* gene encoding glycerol 3-phosphatase from *Saccharomyces cerevisiae* to build a glycerol synthesis pathway. On the basis of

Bioinformatic analysis, built the plasmids of pE*tac*-*CgGPD*, pE*tac*-*ScGPP2* and pE*tac*-

*CgGPD* -*tac*- *ScGPP2*.

To investigate the glycerol pathway, the plasmids were transformed into *E. coli* JM109. To determine the effects of expression of *CgGPD* and *ScGPP2* in *E. coli*, the SDS-PAGE and enzyme activity were analyzed. The results confirmed that the glycerol synthesis pathway was successfully introduced in *E. coli*.

On the basis of above research, the glycerol synthesis pathway was constructed in the 1,3-propanediol production host *K. pneumoniae*. SDS-PAGE and enzyme activities analysis confirmed that recombinant *K. pneumoniae* possessed a metabolic pathway of glucose to 1,3-PDO, and could be utilized to produce 1,3-PDO from glucose instead of glycerol.

In the fermentration process, the results confirmed that the certain glycerol accumulation could activate 1,3-PDO synthesis pathway. Moreover, adding the amount of glycerol could quick start the 1,3-PDO synthesis pathway which could shorten the fermentation cycle and

Save costing. These results have important implications for further studies involving use of one strain for bioconversion of glucose to 1,3-PDO.

Analyzing the carbon flow metabolism of the recombinant and wild strain confirmed that the introduction of glycerol synthesis pathway built a bridge between glucose and glycerol, which could successfully convert glucose to 1,3-PDO in *K. pneumoniae*. From the results, a potential process route to product 1,3-PDO was provided by the insertion of glycerol synthesis pathway in *K. pneumoniae*.

**Key Words:** glycerol-3-phosphatedehydrogenase; Glycerol-3-phosphatase; Cloning; 1; 3-PDO;

*K. pneumoniae*

目 录

[摘要](#_Toc686916920) 2

**[Abstract](#_Toc686916921)** 3

[第](#_Toc686916922)**[1](#_Toc686916922)**[章 绪论](#_Toc686916922) 6

**[1.1](#_Toc686916923)** [酵母甘油合成关键酶概况](#_Toc686916923) 6

**[1.1.1](#_Toc686916924)** [甘油的性质及其用途](#_Toc686916924) 6

**[1.1.2](#_Toc686916925)****[3-](#_Toc686916925)**[磷酸甘油脱氢酶和](#_Toc686916925)**[3-](#_Toc686916925)**[磷酸甘油酯酶](#_Toc686916925) 6

**[1.1.3](#_Toc686916926)** [酵母产甘油机制及其代谢过程](#_Toc686916926) 6

**[1.2](#_Toc686916927)** [甘油合成关键酶基因的应用](#_Toc686916927) 8

**[1.2.1](#_Toc686916928)****[1,3-](#_Toc686916928)**[丙二醇概况](#_Toc686916928) 8

**[1.2.2](#_Toc686916929)****[1,3-](#_Toc686916929)**[丙二醇的Th产方法](#_Toc686916929) 8

**[1.2.3](#_Toc686916930)** [微](#_Toc686916930)**[Th](#_Toc686916930)**[物法合成](#_Toc686916930)**[1, 3-](#_Toc686916930)**[丙二醇研究状况](#_Toc686916930) 8

**[1.2.4](#_Toc686916931)****[1,3-](#_Toc686916931)**[丙二醇Th产菌株](#_Toc686916931) 8

**[1.2.5](#_Toc686916932)** [克雷伯氏菌](#_Toc686916932)**[1, 3-](#_Toc686916932)**[丙二醇合成途径](#_Toc686916932) 8

**[1.2.6](#_Toc686916933)** [克雷伯氏菌产](#_Toc686916933)**[1, 3-](#_Toc686916933)**[丙二醇研究进展](#_Toc686916933) 9

**[1.3](#_Toc686916934)** [产](#_Toc686916934)**[1, 3-](#_Toc686916934)**[丙二醇基因工程菌的研究](#_Toc686916934) 9

**[1.4](#_Toc686916935)** [一步法产](#_Toc686916935)**[1, 3-](#_Toc686916935)**[丙二醇](#_Toc686916935) 9

**[1.5](#_Toc686916936)** [本课题的研究意义及主要研究内容](#_Toc686916936) 9

**[1.5.1](#_Toc686916937)** [研究意义](#_Toc686916937) 9

**[1.5.2](#_Toc686916938)** [主要研究内容](#_Toc686916938) 9

[第](#_Toc686916939)**[2](#_Toc686916939)**[章 甘油合成关键酶基因的克隆及Th物信息学分析](#_Toc686916939) 9

**[2.1](#_Toc686916940)** [材料与仪器设备](#_Toc686916940) 9

**[2.1.1](#_Toc686916941)** [菌株与质粒](#_Toc686916941) 9

**[2.1.2](#_Toc686916942)** [工具酶与试剂](#_Toc686916942) 9

**[2.1.3](#_Toc686916943)** [培养基](#_Toc686916943) 10

**[2.1.4](#_Toc686916944)** [主要仪器设备](#_Toc686916944) 10

**[2.2](#_Toc686916945)** [方法](#_Toc686916945) 11

**[2.2.1](#_Toc686916946)** [培养方法](#_Toc686916946) 11

**[2.2.2](#_Toc686916947)** [分析方法](#_Toc686916947) 11

**[2.2.3](#_Toc686916948)** [酵母基因组](#_Toc686916948)**[DNA](#_Toc686916948)**[的提取](#_Toc686916948) 11

**[2.2.4](#_Toc686916949)****[PCR](#_Toc686916949)**[引物设计合成及反应体系](#_Toc686916949) 11

**[2.2.5](#_Toc686916950)****[PCR](#_Toc686916950)**[产物胶回收及载体连接](#_Toc686916950) 13

**[2.2.6](#_Toc686916951)** [大肠杆菌感受态细胞的制备](#_Toc686916951) 13

**[2.2.7](#_Toc686916952)** [转化大肠杆菌](#_Toc686916952) 14

**[2.2.8](#_Toc686916953)** [验证与保菌](#_Toc686916953) 14

**[2.3](#_Toc686916954)** [结果与分析](#_Toc686916954) 14

**[2.3.1](#_Toc686916955)** [关键酶基因](#_Toc686916955)***[CgGPD](#_Toc686916955)***[及](#_Toc686916955)***[ScGPP2](#_Toc686916955)***[的克隆](#_Toc686916955) 14

**[2.3.2](#_Toc686916956)*****[CgGPD](#_Toc686916956)***[及](#_Toc686916956)***[ScGPP2](#_Toc686916956)***[基因的序列及遗传密码分析](#_Toc686916956) 16

**[2.3.3](#_Toc686916957)*****[CgGPD](#_Toc686916957)***[和](#_Toc686916957)***[ScGPP2](#_Toc686916957)***[基因的遗传进化及结构分析](#_Toc686916957) 21

**[2.4](#_Toc686916958)** [小结与讨论](#_Toc686916958) 22

[第](#_Toc686916959)**[3](#_Toc686916959)**[章 甘油合成关键酶基因的表达分析](#_Toc686916959) 23

**[3.1](#_Toc686916960)** [材料与仪器](#_Toc686916960) 23

**[3.1.1](#_Toc686916961)** [菌株](#_Toc686916961) 23

**[3.1.2](#_Toc686916962)** [工具酶与试剂](#_Toc686916962) 23

**[3.1.3](#_Toc686916963)** [培养基](#_Toc686916963) 23

**[3.1.4](#_Toc686916964)** [主要仪器设备](#_Toc686916964) 23

**[3.2](#_Toc686916965)** [方法](#_Toc686916965) 24

**[3.2.1](#_Toc686916966)** [培养方法](#_Toc686916966) 24

**[3.2.2](#_Toc686916967)** [重组质粒的构建](#_Toc686916967) 24

**[3.2.3](#_Toc686916968)** [大肠杆菌感受态细胞的制备](#_Toc686916968) 25

**[3.2.4](#_Toc686916969)** [转化大肠杆菌](#_Toc686916969) 28

**[3.2.5](#_Toc686916970)** [大肠杆菌质粒](#_Toc686916970)**[DNA](#_Toc686916970)**[的提取](#_Toc686916970) 28

**[3.2.6](#_Toc686916971)** [克雷伯氏菌电转化感受态细胞的制备](#_Toc686916971) 28

**[3.2.7](#_Toc686916972)** [电转化克雷伯氏菌](#_Toc686916972) 28

**[3.2.8](#_Toc686916973)** [粗酶液的制备方法](#_Toc686916973) 28

**[3.2.9](#_Toc686916974)** [酶活测定方法](#_Toc686916974) 28

**[3.2.10](#_Toc686916975)** [蛋白含量测定](#_Toc686916975) 29

**[3.2.11](#_Toc686916976)****[SDS-PAGE](#_Toc686916976)**[检测](#_Toc686916976) 29

**[3.3](#_Toc686916977)** [结果与分析](#_Toc686916977) 29

**[3.3.1](#_Toc686916978)** [重组质粒](#_Toc686916978)**[pEtac-](#_Toc686916978)*[CgGPD](#_Toc686916978)*[, pEtac-](#_Toc686916978)*[ScGPP2](#_Toc686916978)***[和](#_Toc686916978)**[pEtac-](#_Toc686916978)*[CgGPD](#_Toc686916978)*[-tac-](#_Toc686916978)*[ScGPP2](#_Toc686916978)***[的构建](#_Toc686916978) 29

**[3.3.2](#_Toc686916979)** [关键酶基因在大肠杆菌中的表达](#_Toc686916979) 30

**[3.3.3](#_Toc686916980)** [甘油合成途径在克雷伯氏菌株的构建及关键酶基因的表达](#_Toc686916980) 32

**[3.4](#_Toc686916981)** [小结与讨论](#_Toc686916981) 33

[第](#_Toc686916982)**[4](#_Toc686916982)**[章 甘油关键酶基因在克雷伯氏菌产](#_Toc686916982)**[PDO](#_Toc686916982)**[发酵中的应用](#_Toc686916982) 34

**[4.1](#_Toc686916983)** [材料与仪器设备](#_Toc686916983) 34

**[4.1.1](#_Toc686916984)** [菌株](#_Toc686916984) 34

**[4.1.2](#_Toc686916985)** [主要试剂](#_Toc686916985) 34

**[4.1.3](#_Toc686916986)** [培养基](#_Toc686916986) 34

**[4.1.4](#_Toc686916987)** [主要仪器设备](#_Toc686916987) 34

**[4.2](#_Toc686916988)** [方法](#_Toc686916988) 35

**[4.2.1](#_Toc686916989)** [培养方法](#_Toc686916989) 35

**[4.2.2](#_Toc686916990)** [测定方法](#_Toc686916990) 35

**[4.3](#_Toc686916991)** [结果与分析](#_Toc686916991) 35

**[4.3.1](#_Toc686916992)** [含甘油关键基因克雷伯氏菌的摇瓶发酵分析](#_Toc686916992) 35

**[4.3.2](#_Toc686916993)** [产](#_Toc686916993)**[PDO](#_Toc686916993)**[发酵培养基的优化](#_Toc686916993) 37

**[4.3.3](#_Toc686916994)** [葡萄糖](#_Toc686916994)**[-](#_Toc686916994)**[甘油](#_Toc686916994)**[-PDO](#_Toc686916994)**[在克雷伯氏菌代谢途径的分析](#_Toc686916994) 39

**[4.4](#_Toc686916995)** [小结与讨论](#_Toc686916995) 39

[结](#_Toc686916996)[论](#_Toc686916996) 39

[参考文献](#_Toc686916997) 39

[攻读硕士学位期间学术成果](#_Toc686916998) 42

viii

# 第**1**章 绪论

## **1.1** 酵母甘油合成关键酶概况

### **1.1.1** 甘油的性质及其用途

甘油（glycerol），学名丙三醇，是一种含有3个羟基的多元醇类物质，为一种无色透明、无毒无臭、粘稠、具有甜味的液体[1]。它是一种广泛应用的重要的轻化工原料，目前，已用于医药，化工，纺织，食品，国防等1700个行业[2]，具有巨大的市场前景和潜力。甘油生产方法主要有油脂的皂化与水解法、化学合成法和微生物发酵法[3]。

### **1.1.2** **3-**磷酸甘油脱氢酶和**3-**磷酸甘油酯酶

产甘油假丝酵母是江南大学工业微生物与生物工程反应中心的研究者从自然界中分离筛选获得的一株高产甘油的酵母，能利用葡萄糖，蔗糖，乙醇生长。在发酵过程中，能利用葡萄糖产生110-130 g/L甘油[4]。在产甘油假丝酵母细胞中，甘油的合成代谢是从糖酵解途径中的二羟丙酮磷酸（DHAP）开始的，DHAP在3-磷酸甘油脱氢酶（CgGPD）的催化下，DHAP 被还原为3-磷酸甘油（G3P），然后在3-磷酸甘油酯酶（GPP）的作用下，G3P去磷酸化生成甘油。在产甘油假丝酵母合成甘油的反应中，3-磷酸甘油脱氢酶催化的酶促反应是高产甘油的限速反应，是甘油合成的关键酶。它的合成以及酶活性大小会直接影响到葡萄糖代谢中控制向甘油合成方向的物质流，决定了在整个代谢过程中甘油的合成量。

产甘油假丝酵母NAD+依赖的3-磷酸甘油脱氢酶基因（*CgGPD*）是由本中心研究人员利用简并PCR的方法克隆获得。该基因含有1167 bp的开放阅读框，编码蛋白分子量为42 kDa，包含有388个氨基酸。*CgGPD*基因在gpd1/gpd2和gpd1酿酒酵母突变株中表达，能够显著提高细胞耐渗透压能力和甘油合成能力，一方面表明*CgGPD*基因能够渗透压条件下完全功能性互补酿酒酵母*GPD1* 基因的缺失[5]，另一方面也证明了

*CgGPD*基因在细胞耐渗透压能力和甘油合成能力方面的优异特性。

在甘油的合成过程中，最后一步反应由3-磷酸甘油酯酶（GPP）脱磷酸来完成。GPP的一定程度的高效表达，为在高浓度葡萄糖时高产甘油奠定了基础。相关研究表明，细胞内稳定高表达GPD以及一定的GPP酶活性是高产甘油的根本[6]。而酿酒酵母的GPP含有两个同工酶，GPP1和GPP2，编码的基因分别为*GPP1*和*GPP2*。据相关研究表明，*GPP1*基因的表达受到厌氧条件的诱导，与*GPD2*的诱导条件对应；然而*GPP2*基因的表达需要

外界环境高渗透压条件的诱导，与*GPD1*的表达情况相一致。当将酵母细胞置于一个渗透压胁迫环境中时，*GPDl*和*GPP2*基因被在短时间内诱导表达，迅速促使葡萄糖代谢流转向甘油合成途径，并开始在胞内大量积累甘油用来平衡外界渗透压，从而保护细胞免受渗透脱水的破坏[7]。

### **1.1.3** 酵母产甘油机制及其代谢过程

在图1 -1的甘油合成途径中，第一个反应为限速步骤，CgGPD为限速酶。*GPD*基因过量表达则可使甘油生产能力大幅度增强，而*GPP*基因过量表达对甘油合成没有影响[6]。在酿酒酵母催化两步反应的酶ctGPD 与GPP 均存在两个同工酶，分别为

Gpd1p、Gpd2p和Gpp1p、Gpp2p，它们分别由*GPD1*、*GPD2*和*GPP1*、*GPP2*基因编码。

产甘油假丝酵母中，也具有同样的甘油代谢过程，其产甘油关键酶基因*CgGPD*不仅能够在高渗透压胁迫条件下过量快速合成甘油以调节渗透平衡，而且能够在厌氧培养下，功能性互补酿酒酵母的*GPD2*基因的缺失，说明产甘油假丝酵母的*CgGPD*基因可以功能性互补酿酒酵母的*GPD*基因；而在高葡萄糖渗透压条件下，产甘油假丝酵母具有超高产甘油的能力。据我们所知，在相同条件下，比起酿酒酵母的*ScGPD*基因，产甘油假丝酵母的CgGPD具有更高更有效的催化DHAP还原为G3P的能力[8, 9, 10]。

三酰基甘油

细胞膜

细胞质

Fps1p

Gpp1p Gpp2p

Ayr1p

NADPH

葡萄糖

1-酰基-3-磷酸甘油 酰基磷酸二羟基丙酮



Gat1p

Gat2p

1, 6-二磷酸果糖

甘油

Gut1p



Gcy1p Gcy2p

酰基辅酶A 3-磷酸甘油

O2

Gpd1p Gpd2p

ETC

Gut2p

FADH2

NADH

酰基辅酶A

磷酸二羟丙酮3-磷酸甘油醛

Tpi1p

Tdh1p Tdh2p Tdh3p

1, 3-二磷酸甘油酸

NADPH

二羟丙酮

ATP

H2O线粒体

Dak1p Dak2p

NADH

丙酮酸

**图1-1** **酵母甘油代谢途径[11]**

**Fig.** **1-1** **Glycerol metabolic pathway of yeast**

当酵母细胞处于一个高渗透压环境中时，甘油被诱导合成，以提高胞内渗透压，这一过程受HOG途径的控制[11, 12, 13]。在酵母细胞中，合成1 M甘油，理论上需要消耗0.5

M葡萄糖，1 M NADH和1 M ATP[14]。这种消耗由实际代谢过程中，这些物质在不同代谢途径之间的分配流来决定的。葡萄糖代谢流、能量流与还原力源，相互关联、相互影响。为此，如果需要对甘油生产进行优化，可从葡萄糖代谢流、还原力（与能量流偶联）和HOG途径三个方面着手，而具体的优化方法可以在生理控制和基因工程两方面进行[15]。生理控制主要是通过在发酵过程中添加某些物质，例如木糖，蔗糖等，提高细胞合成甘油的能力。基因工程主要是对糖酵解途径、甘油合成途径等过程中的一些关键基因进行改造，以增加用于甘油合成的DHAP和NADH的量[16,17,18,19]。

## **1.2** 甘油合成关键酶基因的应用

### **1.2.1** **1,3-**丙二醇概况

1, 3-丙二醇(1,3-propandediol, 1,3-PDO)，是一种重要的工业用平台化合物，有重要的市场应用价值。1, 3-丙二醇是一种无色无味的透明液体，具有良好的粘性和吸湿性，无毒，易溶于水、乙醇、醚类，微溶于氯仿和苯[20,21]，密度与水的接近，熔点-27°C，沸点211°C，自燃温度为400°C [22,23]。

在工业上有很多重要的用途：可被用作防冻剂，也可作为很多工业合成的原料物质，例如日化工业中常用的增塑剂、洗涤剂、防腐剂和乳化剂等；同时也用于食品、化妆品和制药等行业[24, 25, 26]。

1, 3-丙二醇最重要的性质就是与对苯甲二酸在高温下，反应聚合反应，生成聚酯类物质聚对苯二甲酸丙二醇酯(PTT)，在合成纤维行业有广泛的应用前景。新型聚酯材料

PTT上色容易，回弹性高，静电低、有非常好的柔软性和一定的悬坠性，而且可以被生物性降解，减少对环境的污染。由于PTT具有这么多优良的特点，其被越来越多的应用于纤维纺织生产行业中，比如毯类、衣裤、等一些常用纺织品中。这些特性和市场需求导致PTT成为目前研发合成新型纤维材料的研究热点，考虑到优良的特性，PTT成为目前纤维纺织行业的朝阳聚酯类材料，具有非常广泛的发展与市场应用前景[27, 28]。

### **1.2.2** **1,3-**丙二醇的Th产方法

目前，1, 3-丙二醇的生产方法有两种，化学法和微生物法。就目前来看，已经取得工业化生产工艺路线的1, 3-丙二醇的生产方法包括3种：丙烯醛水合法，环氧乙烷羰基化法和微生物发酵法。但是，目前国际上的研究焦点则是以微生物发酵法为主[29, 30]。

1, 3-丙二醇化学法生产中比较常见的合成途径是丙烯醛法和环氧乙烷法，它们在合成过程中都会有3-羟基丙醛这种中间代谢产物产生，从而进一步合成得到1, 3-丙二醇。丙烯醛法：以丙烯醛为原料，通过水合作用制备获得3-羟基丙醛，3-羟基丙醛经催

化加氢制得1, 3-丙二醇。然而，这种方法有许多缺点，丙烯醛本身具有强烈的刺激性，对身体有损伤，而且与尼古丁一样，是有害的成分。同时属于高毒易燃易爆物品，不易储存，而且价格较高。反应中很多副产物产生，对于1, 3-丙二醇的质量有较大的影响。对环境也有较大的污染。

环氧乙烷法：该方法以环氧乙烷为原料，与CO和H2通过氢甲酰化反应获得3-羟基丙醛，然后加氢得到1, 3-丙二醇。该方法可采用一步法或两步法来直接合成1, 3-丙二醇。但是，环氧己烷具有致癌性，属于易燃易爆类危险品，这也增加了环氧乙烷法生产1, 3-丙二醇的技术难度和成本压力，尤其是其制备催化剂的过程复杂，选择较为困难。由于化学合成方法积累了较成熟的合成路线和工艺流程，其依然是当前生产1,3-

丙二醇主要的方法，但其合成过程所出现的一系列环境、成本和工艺等问题也是不容忽视的。在化学合成法生产1, 3-丙二醇过程中，例如丙烯醛，环氧己烷等本身就是易燃易爆的危险品，同时生产中也消耗了大量不可再生资源，对环境和资源造成的极大污染和浪费。化学合成法对工艺有较高的要求，资金设备投资大、高纯度产品提取困难，从而使得生产成本偏高。生产过程产出的副产物2, 3-丁二醇、乙酸、乙醇比较多、增加了下游的分离、提取、纯化的压力，无形中也提高了生产的各项成本。这一系列的问题极大的制约了1, 3-丙二醇的规模化生产和市场化应用的需求和前景。

然而与化学合成法相比，微生物法生产1, 3-丙二醇具有许多优点：反应条件比较温和、设备相对来说简单。反应过程所需原料对对环境污染较小、可利用的原材料来源广泛，价格廉价。同时，随着基因工程技术的不断发展和提高，可以对产1, 3-丙二醇的菌株进行目的导向明确的一系列改造，例如，过量表达主产物1, 3-丙二醇合成基因，增加产量；利用敲除技术，降低合成过程中一系列副产物的产生等，从而为下游分离提取到更多更高纯度1, 3-丙二醇提供了一种新方法。这一系列的优势因素使得微生物法生产1, 3-丙二醇成为未来的主要研究及生产趋势，也给该过程提供了必要的有利客观条件。

已有许多学者对此方法进行了不断探索和研究，从而使微生物法生产1, 3-丙二醇的技术不断完善，产量也不断提高。

据了解，微生物法中产1, 3-丙二醇产量最高的菌是杜邦和杰能科国际公司改进的大肠杆菌工程菌，该工程菌是通过基因工程的手段，构建大肠杆菌工程菌，实现1, 3-丙二醇合成途径在模式菌株中的成功高效表达与生产。该方法已经应用于工业化生产，也进一步说明采用微生物生产工业化学品的目标是可以实现的。然而，与原有的化学合成法相比较，微生物发酵法合成1, 3-丙二醇，在生产成本方面并没有特别明显的优势。在规模化生产过程的发酵液中，1, 3-丙二醇浓度不高，副产物产量相对较高，副产物种类比较多，并且，由甘油这种底物到1, 3-丙二醇的转化率并不高等一系列原因，导致了微生物发酵法生产成本一直偏高。而随着全球石油资源的有限与急剧下降以及市场需求急剧增加的紧迫形势，各国学者都在积极开展研究工作，致力于提高1, 3-丙二醇的产量，降低副产物的含量和种类，为发酵液中1, 3-丙二醇纯产品的提取减轻纯化成本压力。同时，不懈寻找更加廉价和来源广泛的发酵底物，例如葡萄糖，蔗糖，木糖等来作为底物，减轻底物成本以及对环境资源的过大压力。

本国学者研究微生物法生产1, 3-丙二醇的工作比较晚，就目前的研究成果来看，依然未能达到国际较高水平，但在大连理工大学、江南大学等单位的研究人员也做了很多研究。目前，我国微生物法生产1, 3-丙二醇的最高产量为104.4 g/L[43]，江南大学学者已进行了副产物2, 3-丁二醇的敲除研究，进一步提高1, 3-丙二醇的产量。然而想达到更高的水平，取得更大的研究成果，还需要研究人员继续探索和发现。

### **1.2.3** 微**Th**物法合成**1, 3-**丙二醇研究状况

目前，微生物法生产l，3-丙二醇有两种不同底物原料的发酵方法：以甘油为底物在肠道细菌中厌氧条件下发酵获得1, 3-丙二醇[31]；以葡萄糖为底物在不同类型的基因工程菌发酵生产，葡萄糖先转化为甘油，进而代谢合成1, 3-丙二醇[32]。

自然界中的肺炎克雷伯氏杆菌、弗氏柠檬菌、成团肠杆菌等，可以在厌氧条件下以甘油作为发酵原料，代谢生产1, 3-丙二醇。然而在发酵过程中，菌体生长和氧化代谢支路所需的ATP和还原力都要消耗部分甘油，这在一定程度上影响了1, 3-丙二醇的产量

[33]. 微生物法生产1, 3-丙二醇有以下几种常见的策略。

双菌发酵生产1, 3-丙二醇，是先在甘油生产菌株将葡萄糖转化为甘油，再用1, 3-

丙二醇产生菌将甘油转化为1, 3-丙二醇，由两种菌共同培养发酵，实现葡萄糖到1,3-

丙二醇的直接转化。有学者用酿酒酵母和克雷伯氏菌或弗劳地枸椽酸盐杆菌[34]进行双菌发酵实验，1, 3-丙二醇积累的浓度为4.78g/L。然而，在实际研究中往往由于两种混合的菌株的培养条件，例如温度、pH、厌氧好氧等条件差异比较大，实际操作中很难真正实现双菌发酵，因此需要进一步深入研究更合理的培养方法。

混合底物发酵，发酵液有葡萄糖和甘油两种底物，葡萄糖来提高发酵前期菌体的生物量，从而为后期提高甘油转化率和增加产率奠定基础，其代谢途径如图1-2所示。有学者进行混合底物发酵1, 3-丙二醇研究表明，由于葡萄糖的加入甘油转化率达到90%[35]。但是这种混合底物发酵，流加终浓度较低的葡萄糖，一定程度上提高了底物的转化率，发酵页中1, 3-丙二醇的浓度却受到了影响。



**图1-2 克雷伯氏菌代谢途径[72]**

**Fig.** **1-2** **Metabolic pathway of*K. pneumoniae***

自然界野生菌株只可以甘油为底物产1, 3-丙二醇，而不能利用更廉价的底物葡萄糖、蔗糖等碳源。杜邦公司和杰能科公司利用基因工程技术，以大肠杆菌为宿主菌，将来自酿酒酵母的产甘油基因和来自克雷伯氏菌的产1, 3-丙二醇基因插入大肠杆菌中，构

建了一条由葡萄糖到甘油这种中间产物再到1, 3-丙二醇的合成途径，将葡萄糖转化为甘油，再将甘油进一步转化为1, 3-丙二醇，此法即为一步法生产1, 3-丙二醇的技术手段，非常有效的提高了1, 3-丙二醇的产率，让生产效率提高了近500倍[36]。

### **1.2.4** **1,3-**丙二醇Th产菌株

1881年Frennd发现巴斯德梭菌（*Clostridium pasteurianum*）能发酵甘油产生1, 3-丙二醇以来，至今所发现的1, 3-丙二醇生产菌，主要有肺炎克雷伯杆菌（*Klebsiella*

*pneumoniae*）、短乳杆菌（*Lactobacillus brevis*）、弗氏柠檬菌（*Citrobacter freudii*）、成团肠杆菌（*Enterobacter agglomerans*）、布氏乳杆菌（*Lactobacillus buchneri*）、丁酸梭状芽孢杆菌（*Clostridium butyricum*）和巴斯德梭菌（*Clostridium pasteurianum*）等[37,38]，这些菌株都均为细菌类，只能以甘油为发酵底物来产生1, 3-丙二醇，而无法利用葡萄糖，蔗糖等廉价的碳源来转化合成1,3-丙二醇。*K. pneumoniae*和*C. freundii*是优良的产1, 3-丙二醇菌株，因可能会产生一定的致病性[39]，故在实际应用中需要注意安全等问题。

通过基因工程的手段，对一些模式菌株改造，实现了非1,3-丙二醇生产菌株产1,3-丙二醇。例如在大肠杆菌中插入酿酒酵母的产甘油的*GPD*，*GPP*基因和克雷伯氏菌产1,3-丙二醇的*dha*B、*dha*T基因，成功获得一步法产1, 3-丙二醇的菌株[40]。

### **1.2.5** 克雷伯氏菌**1, 3-**丙二醇合成途径

克雷伯氏菌产1, 3-丙二醇的甘油代谢途径见图1-3所示：1, 3-丙二醇合成途径以甘油为底物开始发酵，代谢过程包括氧化途径和还原途径。氧化途径产物与糖酵解途径产物相同，经过三羧酸循环，产生包括2, 3-丁二醇、乙酸、乙醇等副产物，在此过程中产生了大量供细胞生长所必需的能量ATP和一些还原力；而在1, 3-丙二醇合成的还原途径则利用氧化途径中产生的还原力生成1, 3-丙二醇，具体过程如下：

氧化途径：生成能量ATP和还原力NADH，并伴随着细胞的生长。

(1)菌体内的甘油在甘油脱氢酶(dhaD)催化下，以NAD+为辅酶生成二羟丙酮

（DHA）；

(2)二羟丙酮在ATP及二羟丙酮激酶(dhaK)的作用下，生成磷酸二羟丙酮(DHAP)；

(3)磷酸二羟丙酮进一步代谢生成丙酮酸，丙酮酸是代谢过程中很重要的中间产物，通过TCA循环进一步代谢生成各类小分子代谢副产物物质，如乙酸、乙醇、乳酸、甲醇等。

还原途径：利用NADH。

(1)外源甘油在甘油脱水酶(dhaB)有辅酶B12的存在下，转化为3-羟基丙醛(3-HPA)；

(2)在NADH存在下，3-羟基丙醛经1, 3-丙二醇氧化还原酶(dhaT)催化生成1, 3-丙二醇。



**图1-3 克雷伯氏菌甘油代谢途径[46]**

**Fig.** **1-3** **Glycerol metabolic pathway of*Klebsiella pneumoniae***

### **1.2.6** 克雷伯氏菌产**1, 3-**丙二醇研究进展

目前，克雷伯氏菌发酵产1,3-丙二醇的研究主要有：（1）不同的诱变方法筛选高产1,3-丙二醇菌种[41,42]。（2）基因敲除工程，敲除代谢过程中的支路代谢途径关键酶基因，降低副产物的含量，增加主产物的产量[43]。（3）优化高产菌株发酵条件，进行发酵动力学研究[44,45]。（4）代谢工程研究，通过单个过量表达或组合表达1,3-丙二醇合成途径中的甘油脱水酶基因(*dha*B)和1, 3-丙二醇氧化还原酶基因(*dha*T)提高1, 3-丙二醇产量[46,47,48]。

## **1.3** 产**1, 3-**丙二醇基因工程菌的研究

产1, 3-丙二醇基因工程菌的研究主要有：（1）以甘油生产菌为宿主菌株，利用产1,3-丙二醇的*dha*B, *dha*T基因在宿主菌中构建合成途径，得到将能利用葡萄糖产1, 3-丙二醇的基因工程菌[49]。（2）以基因工程的方法阻断或抑制2, 3-丁二醇，乙醇等产物的合成途径，同时加强还原途径中关键酶的表达，增加1, 3-丙二醇的产量[50, 51]。（3）以模式菌株大肠杆菌为宿主菌，转化1, 3-丙二醇合成途径到大肠杆菌中，此基因工程菌株以甘油为底物发酵生成1, 3-丙二醇[52]。（4）以大肠杆菌为宿主菌，在其中构建甘油合成途径

（*GPD1, GPP2*）和1, 3-丙二醇合成途径(*dha*B*, dha*T)，构建得到以葡萄糖为原料生产1,3-丙二醇的基因工程菌[53]。（5）将甘油生产菌的*GPD1, GPP2*克隆到1, 3-丙二醇生产菌中，获得可以将葡萄糖转化为1, 3-丙二醇的基因工程菌[54]。

## **1.4** 一步法产**1, 3-**丙二醇

由于葡萄糖作为一种来源广泛，价格低廉的原料物质，但是却无法被自然界产1,3-丙二醇野生菌株利用来合成1, 3-丙二醇[50,55,56,]。为了直接将底物葡萄糖转化为1, 3-丙二醇，有关学者实现了克雷伯氏菌和毕赤酵母混合培养的实验室规模上的两阶段法发酵

[57]. 但是由于培养条件的差异等原因，两阶段发酵法在实际中不能满足工业生产的需求。

于是，深入研究找出了基于基因工程技术的一步法生产1, 3-丙二醇。在甘油合成菌株中引入1, 3-丙二醇合成途径关键基因，高效表达此类关键基因来有效的合成1, 3-丙二醇。纳卡穆拉[58]等人通过在酿酒酵母中高表达来自克雷伯氏菌的甘油脱水酶基因和1,3-丙二醇氧化还原酶基因，成功的在甘油生产宿主菌中引入1, 3-丙二醇代谢途径，获得了

0.53 g/L的1, 3-丙二醇。而本研究中心的马正[59]等通过在酿酒酵母中过表达1, 3-丙二醇合成基因，1, 3-丙二醇的产量提高到1.2 g/L。梁泉峰[53]等学者在大肠杆菌中构建了一个从葡萄糖到1,3-丙二醇的渗透压诱导代谢途径，通过表达来自酿酒酵母的*GPD1*和*GPP2*基因以及来自克雷伯氏菌的*dha*操纵子，实现葡萄糖到1,3丙二醇的一步法生产。

## **1.5** 本课题的研究意义及主要研究内容

### **1.5.1** 研究意义

来自优良产甘油菌株的甘油合成关键酶基因，因其可以利用糖酵解途径的中间产物

DHAP来产甘油。近年来，甘油作为生产高附加值化合物如1, 3-丙二醇、3-羟基丙酸等工业化合物的原料，备受关注，其中1, 3-丙二醇是世界公认的12种最有潜力的重要工业材料，可与对苯二甲酸聚合形成新型的聚酯材料PTT，是国际研究热点。由于1,3-丙二醇有广泛的工业用途，如工业合成材料，各类工程塑料，聚酯类以及纺织类物质。其中最重要的就是一种新型的高分子聚酯材料(PTT)，由于其广泛的应用前景，使得市场对于1, 3-丙二醇的需求急剧增加。然而，目前化学法合成1, 3-丙二醇需要的原料来自石油衍生物例如丙烯醛或环氧己烷，随着全球石油资源的有限和紧缺状况，使得这种生产路线需要很大的成本和大量的资源，同时会对环境造成较大的破坏和污染。近年来，微生物法越来越受到国内外学者的研究热点，但是自然界存在的菌株只能利用甘油来作

为原料生产1, 3-丙二醇，迄今为止，没有报道有野生型1, 3-丙二醇生产菌株可以利用来源广泛，廉价的糖类物质作为原料来转化得到1, 3-丙二醇[60, 61]。产甘油假丝酵母是一株从自然界植物环境中，分离筛选获得的超高产甘油的耐渗透压酵母菌株，可以利用葡萄糖合成大量的甘油，该菌株高产甘油是由于代谢途径中的3-磷酸甘油脱氢酶(CgGPD)，该酶的高效表达，对高产甘油起到了关键的限速作用[5,62,63,]。为此，本课题致力于克隆获得甘油合成途径关键基因，并对其应用价值做了进一步的考察。

作为来源广泛，价格低廉的葡萄糖，可以被甘油合成途径转化为甘油，进而本课题考虑到，一步法合成1, 3-丙二醇受到越来越多的研究者的亲睐，同时本研究中心已做了很多关于1, 3-丙二醇的研究工作[42,43,64,65,66]，再结合本中心所特有的产甘油假丝酵母的利用高浓度葡萄糖高产甘油的特性，以及选育获得的利用甘油高产1, 3-丙二醇的肺炎克雷伯氏菌，本课题进一步对获得的甘油途径的应用价值做了考察，致力于在克雷伯氏菌株中插入高产甘油的甘油合成途径，获得产1, 3-丙二醇的基因工程重组菌，希望实现1,3-丙二醇生产菌株可以利用甘油合成途径将葡萄糖合成1, 3-丙二醇的代谢途径，该研究也为进一步提高以葡萄糖为底物发酵生产1, 3-丙二醇奠定了研究基础。

### **1.5.2** 主要研究内容

本研究克隆编码3-磷酸甘油脱氢酶的基因*CgGPD* 及编码3-磷酸甘油酯酶基因

*ScGPP2*。构建甘油合成途径，并在大肠杆菌JM109中实现代谢通路。为了进一步研究甘油关键酶代谢途径的应用，将构建的甘油合成途径通过电转化转入产1, 3-丙二醇肺炎克雷伯氏菌中，构建克雷伯氏重组菌株。研究在克雷伯氏重组菌中甘油关键酶基因的表达和生物活性，考察其葡萄糖发酵性能，同时对克雷伯氏重组菌株产1, 3-丙二醇的代谢流分析，为进一步的研究利用甘油合成途径一步法以葡萄糖产1, 3-丙二醇奠定了基础。

根据本实验室已有的研究成果，本研究主要做了以下工作：

(1)串联表达来源于产甘油假丝酵母（*C. glycerinogenesis*）编码3-磷酸甘油脱氢酶的基因*CgGPD*以及来源于酿酒酵母（*S. cerevisiae*）编码3-磷酸甘油酯酶的基因*ScGPP2*，对其生物学信息进行分析。

(2)构建重组菌*E. coli* JM109(pE*tac*-*CgGPD*-*tac*- *ScGPP2*)，分析甘油关键基因的表达和活性，并考察其转化葡萄糖的能力。利用本实验室已改造获得的*K. pneumoniae*[42]，电转化获得*K. pneumoniae* (pE*tac*-*CgGPD*-*tac*-*ScGPP2*)，研究甘油关键基因在克氏菌中的表达情况。

(3)对重组菌*K. pneumoniae* (pE*tac*-*CgGPD*-*tac*-*ScGPP2*)发酵条件进行初步研究考察，分析重组克氏菌中1, 3-丙二醇合成代谢途径的代谢流。此研究结果对于进一步研究甘油代谢途径在克雷伯氏菌中利用糖类等非甘油物质产1, 3-丙二醇具有一定的参考价值。

# 第**2**章 甘油合成关键酶基因的克隆及Th物信息学分析

## **2.1** 材料与仪器设备

### **2.1.1** 菌株与质粒

产甘油假丝酵母（*Candida glycerinogenesis* CGMCC No. 6830）、酿酒酵母

(*Saccharomyces cerevisiae* W303-1A)、大肠杆菌（*Escherichia coli* JM109）、pMD18-T

vector：江南大学工业微生物与生物反应工程研究中心保藏。

### **2.1.2** 工具酶与试剂

#### 2.1.2.1 工具酶

限制性内切酶*Hind*Ⅲ、*Sac*Ⅰ；*EcoR*Ⅰ、*Xho*Ⅰ；*Taq* DNA聚合酶，T4 Ligase; pMD18-T vector: 宝生物工程（大连）有限公司。

#### 2.1.2.2 主要试剂

蛋白胨和酵母粉：英国Oxiod公司；

DNA凝胶回收试剂盒、B型小量质粒快速提取试剂盒：北京博大泰克生物基因技术有限公司；

引物合成和测序：上海生工生物工程有限公司；

氨苄青霉素(Amp)、卡那霉素(Kan)：上海朝瑞生物技术有限公司；

1×TE缓冲液pH8.0; 10%SDS溶液；消解酶溶液：10μ/mL，-20℃保存；溶液Ⅰ，

4℃保存；Amp，Kan等-20℃保存；苯酚，氯仿，无水乙醇等均为分析纯；ddH2O灭菌分装，-20℃保存；国药集团化学试剂有限公司。

### **2.1.3** 培养基

培养基及配方见表2-1。

**表2-1** **培养基及配方**

Tab. 2-1 Formula of media used in this research

| 培养基名称 | 配方 |
| --- | --- |
| LB 培养基 | Tryptone 10.0g;Yeast extract 5.0g;NaCl 10.0g; H2O 1000mL ;pH 7.0 |
| YEPD 培养基 | Glucose 20.0g ;Tryptone 20.0g ;Yeast extract 10.0g ; agar  15.0G ;H2O 1000mL; pH 7.2-7.4 |

培养基置于高压蒸汽灭菌锅中，121°C灭菌30min，含有葡萄糖的培养基121°C灭菌

15min. 自然冷却55-60°C，需要时加入Amp (100μg/mL)、Kan (50μg/mL)。

### **2.1.4** 主要仪器设备

主要仪器设备见表2-2。

**表2-2** **主要仪器与设备**

Tab. 2-2 Instruments and equipments used in this study

| 仪器名称 | 公司 |
| --- | --- |
| PCR 仪 | 美国 BIO-RAD 公司 |
| UVP 凝胶成像仪 | 英国 UVP 公司 |
| DYY-5 型稳压电泳仪 | 北京市六一仪器厂 |
| 320-S pH 计 | METTLER TOLEDO 公司 |
| 小型离心机 | Eppendorf 公司 |
| 分光光度计 | 尤尼柯仪器有限公司 |
| AB204 型电子天平 | 上海第二天平仪器厂 |
| 立式压力蒸汽灭菌锅 | 上海博迅实业有限公司 |
| HYG-A-组合式摇床 | 太仓市强乐实验设备有限公司 |
| 超净工作台 | 苏州净化设备有限公司 |

## **2.2** 方法

### **2.2.1** 培养方法

斜面培养：LB斜面培养基，37°C 恒温培养16 h。

种子培养：装液量为50 mL于250 mL三角瓶，接种量为1%，37°C, 150 r/min

振荡培养8 h。

### **2.2.2** 分析方法

关键基因生物学信息分析：DNA man分析基因及氨基酸序列信息，MEGA 4.0.2分析基因遗传信息，P[DB(http:](http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do)%E6%95%B0%E6%8D%AE%E5%BA%93%E5%92%8C) //[ww](http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do)%E6%95%B0%E6%8D%AE%E5%BA%93%E5%92%8C)w[. rcsb. org/pdb/home/home. do)数据库和](http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do)%E6%95%B0%E6%8D%AE%E5%BA%93%E5%92%8C)Swiss-Model建模蛋白结构。

### **2.2.3** 酵母基因组**DNA**的提取

（1）接种于250 mL YEPD培养基中，摇瓶培养18-19h（30℃,220r/min）；

（2）把培养液倒入1.5mL离心管，8000rpm离心5 min，弃上清；

（3）加入600μLTE液，吹匀；

（4）加入10μg/mL消解酶溶液30μL，37℃水浴3-5 h；

（5）加入100μL的SDS，65℃，水浴30 min；

（6）8000 rpm离心5 min；

（7）取上清，加700μL苯酚，上下颠倒混匀，静置5 min, 8000 rpm离心10 min；

（8）取上清，加600μL苯酚，上下颠倒混匀，静置5 min, 8000 rpm离心10 min；重复三次；

（9）取上清，加入2.5倍体积100%乙醇，置于-20℃冰箱保存1h；

（10）离心8000 rpm, 5 min，弃上清；

（11）加入70%的乙醇400μL，离心8000 rpm, 5 min；弃上清，自然晾干或烘干；

（12）加已灭过菌的ddH2O 30μL，吹吸混匀；-20℃保存备用。

### **2.2.4** **PCR**引物设计合成及反应体系

根据GenBank中*CgGPD*基因序列（登录号EU186536.1）和*ScGPP2*基因序列（登录号NC-001137.3）设计引物。

PCR反应体系如表2-3所示：

**表2-3** **PCR反应体系**

Tab. 2-3 Reaction system of the PCR

| 反应物 | 体积（μL） |
| --- | --- |
| 模板 DNA | 2.0 |
| 10× rTaqBuffer | 5.0 |
| dNTP | 4.0 |
| 上游引物 | 1.0 |
| 下游引物 | 1.0 |
| rTaq DNA 聚合酶 | 1.0 |
| ddH2O | 36.0 |
| 总体积 | 50.0 |

PCR扩增条件如表2-4所示

**表2-4** **PCR扩增反应条件**

Tab. 2-4 Reaction conditions of the PCR

| 流程 | 温度 | 时间 |
| --- | --- | --- |
| 预变性 | 94°C | 4 min |

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  |  |  |  |  |
|  | 变性 | 94°C | 1 min |  |
|  | 退火 | 59°C( *CgGPD*)  57°C( *ScGPP2*) | 30 s  30 s |  |
|  | 延伸 | 72°C | 70 s |  |
|  | 后延伸 | 72°C | 10 min |  |
|  | 保存 | 4°C | ∞ |  |

### **2.2.5** **PCR**产物胶回收及载体连接

PCR 产物胶回收：1%琼脂糖凝胶电泳切胶回收获得目的大小PCR 产物后，与

pMD18-T vector 16℃连接过夜。

连接pMD18-T vector: 反应体系如表2-5:

**表2-5** **pMD18-T连接体系**

Tab. 2-5 Reaction system of the pMD18-T vector

| 组分 | 体积(μL) |
| --- | --- |
| PCR 产物 | 4.8 |
| PMD18-T vector | 0.2 |
| Solution I | 5.0 |

### **2.2.6** 大肠杆菌感受态细胞的制备

（1）从甘油管里取200μL菌液到10 mL LB培养基37℃摇6-7 h，从其中取200μL

菌液接入到一个新的10 mLLB培养基1-1.5 h；

（2）在超净台中把1.0 mL的菌液转入已预冷的1.5mL离心管中；

（3）4℃,6000 rpm离心5 min，收集细胞，倒掉上清；

（4）以0.6 mL冰预冷的0.1mol/LCaCl2悬浮细胞，冰上放置20-25 min（重复此步骤3次）；

（5）4℃,6000 rpm，离心回收细胞；

（6）倒出上清，加入预冷的80μL CaCl2+40μL50%甘油悬浮细胞，-40℃保存备用；

### **2.2.7** 转化大肠杆菌

（1）冰上融化感受态细胞；

（2）无菌条件下，冰上加入待转化的连接产物（10μL体系）；

（3）冰水浴40min；

（4）42℃热激90s；

（5）加入1mL LB液体培养基，37℃震荡培养1h；

（6）涂布含氨苄青霉素的LB平板（氨苄：培养基=1: 2000体积比）；

（7）37℃培养10h左右，挑取单菌落，到10mL LB液体培养基中（含有5μL的氨苄青霉素），过夜培养。提取质粒DNA，酶切电泳验证；

### **2.2.8** 验证与保菌

将验证正确的转化子培养，保藏甘油管备用。

## **2.3** 结果与分析

### **2.3.1** 关键酶基因***CgGPD***及***ScGPP2***的克隆

本研究以产甘油假丝酵母和酿酒酵母为研究对象，根据江南大学工业微生物与反应工程研究室学者筛选获得的产甘油假丝酵母基因组DNA为模板，克隆3-磷酸甘油脱氢酶基因（*CgGPD*），以酿酒酵母的基因组NDA 为模板，克隆3-磷酸甘油酯酶基因

（*ScGPP2*）。在GenBank中*CgGPD*和*ScGPP2*基因序列的登录号分别为EU186536.1和NC-001137.3，基因的大小分别为1167 bp 和753 bp。分析其基因序列，利用软件DNA man，设计一系列引物，用于PCR扩增*CgGPD*和*ScGPP2*。本研究中所使用的引物如表2-6所示：

**表2-6** **PCR扩增所用引物**

Tab. 2-6 PCR primers used for amplification

| 引物 | 序列(5’→3’) | 酶切位点 |
| --- | --- | --- |
| Primer1 | GACGAATTCATGGTGTCCCCTGCTGAAAGATT | EcoRI |
| Primer2 | GCCAAGCTTTTAATCTTCCACAGGTTCAAGG | HindIII |
| Primer3 | CGACGAGCTCATGGGATTGACTACTAAACC | SacI |
| Primer4 | CGCGCTCGAGTTACCATTTCAACAGATCG | XhoI |
| Primer5 | TACAAGCTTGGAGCTTATCGACTGCACGG | HindIII |

利用引物Primer1和Primer2，经过30个循环，完成基因*CgGPD*的扩增。用引物

Primer3和Primer4扩增得到基因*ScGPP2*。在0.8%的琼脂糖凝胶电泳进行检测，结果如图2-1所示：图（a）中可看到大小约1100 bp的片段，与基因库中公布的产甘油假丝酵母3-磷酸甘油脱氢酶基因的大小一样，说明*CgGPD*基因克隆成功。图（b）中可看到在750 bp大小的位置，有一条清晰的条带，与报道的酿酒酵母3-磷酸甘油酯酶大小一致，说明*ScGPP2*基因成功获得。

M 1 M 1

1000

bp

750



bp

**(A) *CgGPD*** **(b) *ScGPP2***

**M. DL2000 Marker 1. PCR条带**

**图2-1** ***CgGPD*和*ScGPP2*的PCR产物琼脂糖凝胶电泳分析**

**Fig.** **2-1** **Agarose gel electrophoresis of*CgGPD* and *ScGPP2* genes**

胶回收*CgGPD*和*ScGPP2*基因片段，先与pMD18-T vector过夜16℃连接，连接产物转化入大肠杆菌JM109感受态细胞中，将转化体系在LB液体培养基中前培养1 h后，涂布到含有100μg/mL氨苄抗生素的平板上，8h后挑取单菌落培养，收集菌体提取质粒DNA，质粒DNA被引物中含有的对应的酶切位点的限制性内切酶酶切。pMD18T-*CgGPD*质粒DNA用*EcoR*I和*Hind*III来酶切验证，pMD18T- *ScGPP2*质粒用

*Sac*I和*Xho*I来酶切验证，酶切图谱如2-2所示：在相应的位置可以释放出约1100 bp和750 bp大小的*CgGPD*和*ScGPP2*基因片段，说明这两个基因片段已分别有效的连接到pMD18-T vector。将构建好的pMD18T-*CgGPD*和pMD18T- *ScGPP2*质粒送由上海生工生物工程有限公司测序。测序结果显示，克隆所获得的两个基因片段序列完全正确，没有发生碱基突变或缺失等，可用于后续的表达载体构建实验。

M 1 2

M 1 2

1000

bp

750

bp



**(a) pMD18T–*CgGPD*** **(b) pMD18T–*ScGPP2* M: DL2000 Marker 1, 2：双酶切**

**图2-2** **pMD18T*–CgGPD*和pMD18T–*ScGPP2*的酶切验证图谱分析**

**Fig.** **2-2** **Enzymatic digestion of the plasmid pMD18T*–CgGPD* and pMD18T–*ScGPP2***

### **2.3.2** ***CgGPD***及***ScGPP2***基因的序列及遗传密码分析

1 ATGGTGTCCCCTGCTGAAAGATTATCTACTATTGCGTCCACAATCAAGCCAAACAGAAAA

1 M V S P A E R L S T I A S T I K P N R K

61 GATTCCACATCATTACAACCAGAAGACTATCCGGAACATCCGTTCAAGGTGACGGTTGTT

21 D S T S L Q P E D Y P E H P F K V T V V

121 GGTTCCGGTAACTGGGGGTGTACAATTGCCAAGGTTATAGCGGAAAACACCGTTGAGAGA

41 G S G N W G C T I A K V I A E N T V E R

181 CCTCGTCAATTTCAAAGAGATGTTAATATGTGGGTCTATGAAGAATTGATTGAAGGCGAA

61 P R Q F Q R D V N M W V Y E E L I E G E

241 AAGTTGACTGAAATCATAAATACCAGACACGAAAACGTCAAGTACTTGCCAGGTATCAAG

81 K L T E I I N T R H E N V K Y L P G I K

301 TTGCCAGTTAACGTTGTTGCAGTTCCAGACATTGTTGAGGCTTGTGCAGGCTCAGACTTG

101 L P V N V V A V P D I V E A C A G S D L

361 ATTGTCTTTAATATTCCTCACCAATTTTTACCAAGAATTTTGTCCCAATTAAAGGGTAAG

121 I V F N I P H Q F L P R I L S Q L K G K

421 GTGAATCCAAAGGCTAGAGCAATTTCTTGTTTGAAAGGTTTGGATGTCAATCCTAATGGA

141 V N P K A R A I S C L K G L D V N P N G

481 TGTAAGTTGCTCTTCACTGTTATTACTGAAGAGTTGGGTATTTATTGTGGTGCCTTATCA

161 C K L L F T V I T E E L G I Y C G A L S

541 GGTGCTAATTTAGCTCCTGAAGTTGCACAATGTAAATGGTCGGAAACAACTGTTGCATAT

181 G A N L A P E V A Q C K W S E T T V A Y 601 ACAATTCCGGACGATTTCAGAGGTAAAGGCAAGGATATTGACCATCAAATTCTAAAGAGT

201 T I P D D F R G K G K D I D H Q I L K S 661 TTGTTCCATAGACCTTATTTCCGTGTTCGTGTTATTAGTGATGTTGCAGGTATTTCCATT

221 L F H R P Y F R V R V I S D V A G I S I 721 GCCGGTGCACTCAAGAATGTCGTTGCTATGGCTGCTGGATTTGTCGAAGGTTTAGGTTGG

241 A G A L K N V V A M A A G F V E G L G W 781 GGTGATAATGCAAAGGCTGCAGTCATGAGAATAGGTTTGGTGGAAACCATTCAATTTGCC

261 G D N A K A A V M R I G L V E T I Q F A 841 AAGACTTTTTTCGATGGCTGTCATGCTGCAACCTTTACTCATGAATCTGCAGGTGTTGCC

281 K T F F D G C H A A T F T H E S A G V A 901 GACCTAATTACTACCTGTGCCGGCGGCCGTAACGTTAGAGTTGGTAGATATATGGCACAA

301 D L I T T C A G G R N V R V G R Y M A Q 961 CATTCTGTCTCTGCAACGGAGGCTGAAGAAAAGTTGTTGAATGGCCAATCCTGTCAAGGT

321 H S V S A T E A E E K L L N G Q S C Q G 1021 ATCCACACAACTAGGGAAGTTTACGAGTTCCTCTCCAACATGGGCAGGACAGATGAGTTC

341 I H T T R E V Y E F L S N M G R T D E F 1081 CCACTATTTACCACCACCTACCGTATCATCTACGAAAACTTCCCAATTGAGAAGCTGCCA

361 P L F T T T Y R I I Y E N F P I E K L P 1141 GAATGCCTTGAACCTGTGGAAGATTAA

381 E C L E P V E D \*

A

*CgGPD*和*ScGPP2*基因的测序后，全序列分析如图2-2（A、B）所示，*CgGPD*基因包含有1167 bp的阅读框，不含内含子，编码388个氨基酸，其编码蛋白分子量为42.58 kDa，理论等电点为6.12。*ScGPP2*基因包含753 bp的阅读框，不含内含子，编码250个氨基酸，蛋白分子量为27.57 kDa，理论等电点是5.93。

1 ATGGGATTGACTACTAAACCTCTATCTTTGAAAGTTAACGCCGCTTTGTTCGACGTCGAC

1 M G L T T K P L S L K V N A A L F D V D

61 GGTACCATTATCATCTCTCAACCAGCCATTGCTGCATTCTGGAGGGATTTCGGTAAGGAC

21 G T I I I S Q P A I A A F W R D F G K D

121 AAACCTTATTTCGATGCTGAACACGTTATCCAAGTCTCGCATGGTTGGAGAACGTTTGAT

41 K P Y F D A E H V I Q V S H G W R T F D

181 GCCATTGCTAAGTTCGCTCCAGACTTTGCCAATGAAGAGTATGTTAACAAATTAGAAGCT

61 A I A K F A P D F A N E E Y V N K L E A

241 GAAATTCCGGTCAAGTACGGTGAAAAATCCATTGAAGTCCCAGGTGCAGTTAAGCTGTGC

81 E I P V K Y G E K S I E V P G A V K L C

301 AACGCTTTGAACGCTCTACCAAAAGAGAAATGGGCTGTGGCAACTTCCGGTACCCGTGAT

101 N A L N A L P K E K W A V A T S G T R D

361 ATGGCACAAAAATGGTTCGAGCATCTGGGAATCAGGAGACCAAAGTACTTCATTACCGCT

121 M A Q K W F E H L G I R R P K Y F I T A

421 AATGATGTCAAACAGGGTAAGCCTCATCCAGAACCATATCTGAAGGGCAGGAATGGCTTA

141 N D V K Q G K P H P E P Y L K G R N G L

481 GGATATCCGATCAATGAGCAAGACCCTTCCAAATCTAAGGTAGTAGTATTTGAAGACGCT

161 G Y P I N E Q D P S K S K V V V F E D A

541 CCAGCAGGTATTGCCGCCGGAAAAGCCGCCGGTTGTAAGATCATTGGTATTGCCACTACT

181 P A G I A A G K A A G C K I I G I A T T 601 TTCGACTTGGACTTCCTAAAGGAAAAAGGCTGTGACATCATTGTCAAAAACCACGAATCC

201 F D L D F L K E K G C D I I V K N H E S 661 ATCAGAGTTGGCGGCTACAATGCCGAAACAGACGAAGTTGAATTCATTTTTGACGACTAC

221 I R V G G Y N A E T D E V E F I F D D Y

B

阴影部分为序列中的保守区域

**图2-2** ***CgGPD*及*ScGPP2*基因编码序列**

**Fig.** **2-2** **Nucleotide sequences of the*CgHOG1*and *ScGPP2* gene**

不同的生物在使用密码子的选择上，具有一定的偏爱性。在基因表达优化的过程中，事先对该生物选择使用各种密码子的程度进行分析，是一个必要的步骤。为此，本研究对*CgGPD*基因的密码子进行了分析，如表2-7所示，在*C. glycerinogenes*的*CgGPD*中，利用了61个有义密码子中的54个。*CgGPD*中未发现AGC和CGC密码子（表2-7），与*S. cerevisiae*中AGC和CGC的利用情况十分相似。*CgGPD*基因密码子第三位碱基

中嘧啶碱基占58%，相比而言，稍微偏好于嘧啶。密码子第三位是嘌呤碱基时，A和G分别为52%和48%，两碱基的比例基本平衡。而当第三位碱基是嘧啶时，胸腺嘧啶T具有较高的频率，达到66%，而C只占34%. *ScGPP2*基因的密码子分析如表2-8所示，在*S. cerevisiae*的*ScGPP2*中，61个有义密码子使用了49个。密码子第三位碱基中嘧啶碱基占59%，密码子相对来说，比较偏好嘧啶碱基。对*CgGPD*和*ScGPP2*密码子分析表明，这两个基因密码子第三位碱基的选择都比较偏好于嘧啶碱基，这对于后续串联表达*CgGPD*和*ScGPP2*基因表达提供了有用的信息，奠定一定的理论基础。

**表2-7** **产甘油假丝酵母GPD基因密码子使用分析**

**Fig.** **2-7** **codon usage in*C. glycerinogenes***

氨*CgGPD*氨

*CgGPD*氨

*CgGPD*

| 基 | 密码子 | 个数 | R | 基 | 密码子 | 个数 | R | 基 | 密码子 | 个数 | R |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 酸 |  |  |  | 酸 |  |  |  | 酸 |  |  |  |

Asp

GAC 6 0.28

--

TAA 1 1.00

Tyr

TAT 6 0.60

GAT 10 0.63 TAG 0 0 TAC 4 0.40

Phe

TTC 9 0.53

Glu

GAG 7 0.23

Leu

TTA -- 0.24

TTT 8 0.47 GAA 23 0.77 TTG -- 0.48

Cys

TGT 0 0

--

-- -- --

His

CAT 6 0.67

TGC 1 0.10 -- -- -- CAC 3 0.33

Asn

AAT 10 0.56

Gln

CAG 0 0

Lys

AAG 17 0.81

AAC 8 0.44 CAA 11 1.00 AAA 4 0.19

TTA -- 0.24 Trp TGG 1 1.00

TTG -- 0.48 Met ATG 1.00

Ile

ATT 19 0.68

ATA 3 0.11

Leu

CTG 1 0.03

ACT 9 0.35 ATC 6 0.21

CTC 3 0.10 ACA 7 0.27

Thr

GCG 2 0.06

CTA 3 0.10 ACG 2 0.08 GCT 11 0.34

Ala

CTT 3 0.10 ACC 8 0.31 GCA 13 0.41

GGG 2 0.07 GTG 5 0.15 GCC 6 0.19

Gly

GGT 18 0.62 GTC 8 0.24

Val

CGC 0 0

GGC 8 0.28 GTT 21 0.62 CGG 0 0

GGA 2 0.07 GTA 0 0 CGA 0 0

Arg

CCG 3 0.15 AGT 2 0.11 CGT 5 0.26

Pro

CCT 7 0.35 AGC 0 0 AGA 12 0.63

CCA 10 0.50

Ser

TCT 5 0.26 AGG 2 0.11

CCC 0 0 TCA 3 0.16 -- TGA -- 1.00

Ser TCC 8 0.42 TCG 1 0.05 -- -- -- --

**表2-8** **酿酒酵母*GPP2*基因密码子使用分析**

**Fig.** **2-8** **codon usage in*S. cerevisiae***

氨*ScGPP2*氨

*ScGPP2*氨

*ScGPP2*

| 基 | 密码子 | 个数 | R | 基 | 密码子 | 个数 | R | 基 | 密码子 | 个数 | R |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 酸 |  |  |  | 酸 |  |  |  | 酸 |  |  |  |

Asp

GAC 13 0.68

--

TAA 1 1.00

Tyr

TAT 5 0.56

GAT 6 0.32 TAG 0 0 TAC 4 0.44

Phe

TTC 4 0.29

CTT 0 0.00

Glu

GAG 4 0.24

TTT 10 0.71 CTC 0 0.00 GAA 13 0.76

Leu

Cys

TGT 2 0.67 CTA 3 0.43

His

CAT 3 0.60

TGC 1 0.33 CTG 4 0.57 CAC 2 0.40

Asn

AAT 5 0.50

Gln

CAG 1 0.20

Lys

AAG 11 0.44

AAC 5 0.50 CAA 4 0.80 AAA 14 0.56

TTA 3 0.19 Trp TGG 5 1.00

TTG 6 0.37 Met ATG 1.00

Ile

ATT 11 0.58

ATA 0 0.00

Leu

CTG 4 0.25

ACT 5 0.50 ATC 8 0.42

CTC 0 0.00 ACA 1 0.10

Thr

GCG 0 0.00

CTA 3 0.19 ACG 1 0.10 GCT 12 0.44

Ala

CTT 0 0.00 ACC 3 0.30 GCA 5 0.19

GGG 0 0.00 GTG 1 0.06 GCC 10 0.37

Gly

GGT 10 0.53 GTC 6 0.38

Val

CGC 0 0.00

GGC 5 0.26 GTT 6 0.38 CGG 0 0.00

GGA 4 0.21 GTA 3 0.18 CGA 0 0.00

Arg

CCG 2 0.14 AGT 0 0.00 CGT 1 0.14

Pro

CCT 4 0.29 AGC 0 0.00 AGA 3 0.43

CCA 8 0.57

Ser

TCT 3 0.38 AGG 3 0.43

CCC 0 0 TCA 0 0.00 -- TGA 0 0.00

Ser TCC 4 0.50 TCG 1 0.12 -- -- -- --

### **2.3.3** ***CgGPD***和***ScGPP2***基因的遗传进化及结构分析

根据NCBI数据库公布的GPD的序列，选择了9个与*CgGPD*的氨基酸序列相似性较高的序列，利用Neighbor-Joining算法建立系统进化树，建立结果如图2-4所示。由构建的系统进化树分析*C. glycerinogenes* CGMCC *CgGPD*与其他蛋白的基因的亲缘关系，其中与*Millerozyma farinosa* CBS 7064的*GPD*亲缘关系最近，二者在同一簇中。而与*Scheffersomyces stipitis* CBS 6054和*Saccharomycopsis fibuligera*的亲缘关系次之，与其他菌株来源的*GPD*亲缘关系较远。根据NCBI数据库里面搜索的结果，与*ScGPP2*的氨基酸序列相似性排序的前10个序列中，有8个都是来自不同酿酒酵母的，说明与

*ScGPP2*亲缘关系较近的都属于酵母属。

100

43

20

44

100

*Candida glycerinogenes* glycerol-3-phosphate dehydrogenase

*Millerozym a farinosa* CBS 7064 glycerol-3-phosphate dehydrogenase

*Scheffersom yces stipitis* CBS 6054 glycerol-3-phosphate dehydrogenase

*Saccharom ycopsis fibuligera* glycerol-3-phosphate dehydrogenase

*Dekkera bruxellensis* AWRI1499 glycerol-3-phosphate dehydrogenase

*Debaryom yces hansenii* CBS767 glycerol-3-phosphate dehydrogenase

*Ogataea angusta* glycerol-3-phosphate dehydrogenase

*Ogataea parapolymorpha* DL-1 glycerol-3-phosphate dehydrogenase

34 100

*Candida tropicalis* glycerol-3-phosphate dehydrogenase

*Candida tropicalis* MYA-3404 glycerol-3-phosphate dehydrogenase

0.2

**图2-4** ***CgGPD*的系统发育树**

**Fig.** **2-4** **Phylogenetic tree of*CgGPD***



2

2

1

1

A: CgGPD B: ScGPP2

**1，2分别代表氨基酸N端和C端图2-5 CgGPD和ScGPP2 3D模拟图**

**Fig.** **2-5** **3D mimic diagram of CgGPD and ScGPP2**

由图2-2中所获得的*CgGPD*中存在着典型的结构域，蛋白质N-端-NAD+结合域和催化活性结合域。NAD+结合域中有一个GNGNNG（N可以使任何氨基酸）的保守序列，此保守序列是与腺嘌呤环结合相关的。还有一个与烟酰胺指环相关的区域。*CgGPD*中存在着高度保守的序列Gly-Ser-Gly-Asn-Trp-Gly。而其氨基酸His-127, Asn-183和Pro-186是高度保守，并作为底物的特异性结合位点，在酶促催化反应中发挥着重要作用。根据DNAman里面翻译出来的*CgGPD*的氨基酸序列，采用Swiss-Model的Alignment

Mode进行蛋白建模，模拟结果如图2-5所示，氨基酸N端存在着NAD+结合域以及催

化活性中心。结构分析表明克隆所获得*CgGPD*和*ScGPP2*具有了蛋白质的基本功能结构。

## **2.4** 小结与讨论

1、本节在之前学者研究的基础上，利用PCR方法，以产甘油假丝酵母基因组DNA为模板，克隆获得1167 bp的3-磷酸甘油脱氢酶编码基因*CgGPD*，同时以酿酒酵母基因组DNA为模板，克隆得到753 bp的3-磷酸甘油酯酶编码基因*ScGPP2*；

2、克隆所得的片段测序后，对*CgGPD*和*ScGPP2*两个基因序列分析，*CgGPD*基因包含1167 bp的阅读框，编码388个氨基酸，编码蛋白分子量为42.58 kDa，理论等电

点为6.12。*ScGPP2*基因包含753 bp的阅读框，编码250个氨基酸，蛋白分子量为27.57 kDa，理论等电点是5.93，并对其遗传进化及蛋白质进行分析。

3、对*CgGPD*和*ScGPP2*两个基因的密码子分析，结果显示，二者密码子第三位碱基都对嘧啶碱基较偏爱，研究结果对于后期的基因表达及甘油途径的构建提供了一定理论支持。

# 第**3**章 甘油合成关键酶基因的表达分析

## **3.1** 材料与仪器

### **3.1.1** 菌株

大肠杆菌重组菌株（*E. coli* JM109/ pE*tac-CgGPD-tac-ScGPP2*）、肺炎克雷伯氏菌

（*Klebsiella* pn*eumonia*e CICIM B0057）、pE*tac* vector: 江南大学工业微生物与生物反应工程研究中心保藏。

### **3.1.2** 工具酶与试剂

#### 3.1.2.1 工具酶

限制性内切酶*Hind*Ⅲ、*Xho*Ⅰ；购自宝生物工程（大连）有限公司。

#### 3.1.2.2 主要试剂

磷酸二羟丙酮和3-磷酸甘油：sigma公司分装，分别配制成0.2 mol/L和33.5 mmol/L

的溶液贮存备用；

考马斯亮蓝染色液G250：上海朝瑞生物技术有限公司；

### **3.1.3** 培养基

培养基及配方见表3-1。

**表3-1** **培养基及配方**

Tab. 3-1 Formula of media used in this research

| 培养基名称 | 配方 |
| --- | --- |
| LB 培养基 | Tryptone 10.0g;Yeast extract 5.0g;NaCl 10.0g; H2O 1000mL ;pH 7.0 |

所有培养基置于高压蒸汽灭菌锅中，121°C灭菌30min，需要时加入Kan (50μg/mL)。

### **3.1.4** 主要仪器设备

主要仪器设备见表3-2。

**表3-2** **主要仪器与设备**

Tab. 3-2 Instruments and equipments used in this study

| 仪器名称 | 公司 |
| --- | --- |
| UVP 凝胶成像仪 | 英国 UVP 公司 |
| DYY-5 型稳压电泳仪 | 北京市六一仪器厂 |
| 320-S pH 计 | METTLER TOLEDO 公司 |

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  |  |  |  |
|  | 小型离心机 | Eppendorf 公司 |  |
|  | 分光光度计 | 尤尼柯仪器有限公司 |  |
|  | VCX750 超声破碎仪 | 美国 SONICS 公司 |  |
|  | 电转化仪 | 德国 Eppendorf 公司 |  |
|  | 酶标仪 | Eppendorf 公司 |  |

## **3.2** 方法

### **3.2.1** 培养方法

斜面培养：接种于LB斜面培养基上，37°C 恒温培养16 h。

种子培养：装液量为50 mL于250 mL三角瓶，接种量为1%，37°C, 150 r/min

振荡培养6-7 h。

摇瓶发酵：装液量为50 mL于250 mL三角瓶，接种量为4%，30°C, 150 r/min

振荡培养48 h。

### **3.2.2** 重组质粒的构建

连接pE*tac*载体：pMD18T-*CgGPD*用*EcoR*I和*Hind*III限制性内切酶双酶切，同时将pE*tac*质粒DNA双酶切；连接pE*tac*载体；pMD18T-*ScGPP2*用*Sac*I, *Xho*I双酶切，与酶切的pE*tac*连接。T4连接酶16℃过夜连接。

连接体系如表3-3所示：

**表3-3** **pEtac连接体系**

Tab. 3-3 Reaction system of the pEtac vector

| 组分 | 体积(μL) |
| --- | --- |
| 目的片段 | 2.0-3.0 |
| pEtac 质粒 DNA | 6.0-7.0 |
| T4 连接酶 | 1.0 |
| T4 连接酶 Buffer | 1.0 |

利用*HindIII*和*XhoI*限制性内切酶切出*tac*-*ScGPP2*目的片段，同时将pE*tac*-*CgGPD*质粒双酶切，连接形成pE*tac*-*CgGPD*-*tac*-*ScGPP2*。连接体系如上所示。构建方法参照分子生物学方法[70]，质粒构建过程如图3-4所示：

### **3.2.3** 大肠杆菌感受态细胞的制备

具体方法如第二章2.2.6操作。

SacI

ScGPP2

XhoI

**MCS**



**F1 prigin**

**1**

**P**

1 753

70bp

SacI

CgGPD

HindIII

**Kan**

**PEtac 5612bp**

**lacI**

1 1167

100bp

**ori**

**Kan**

**F1 prigin**

**SacI**

**1**

**CgGPD**

**HindIII**

**F1 prigin**

**SacI**

**1**

**ScGPP2**

**XhoI**

**ori**

**PEtac-CgGPD 6779bp**

**P**

**lacI**

**Kan**

**ori**

**PEtac-ScGPP2 6365bp**

**P**

**lacI**

**Kan**

**F1 prigin**

**XhoI**

**1**

**ScGPP2**

**HindIII**

1 1006

**HindIII**

**XhoI**

**tac-ScGPP2**

**pEtac-CgGPD-tac-ScGPP2**

**CgGPD**

**ori**

**7785bp**

**P** **SacI**

**lacI**

**图3-4** **重组质粒pE*tac*-*CgGPD*-*tac*-*ScGPP2*的构建**

**Fig.** **3-4** **Construction of the plasmid of pE*tac*-*CgGPD*-*tac*-*ScGPP2***

### **3.2.4** 转化大肠杆菌

方法如第二章2.2.7进行。

### **3.2.5** 大肠杆菌质粒**DNA**的提取

参照试剂盒说明书（B型质粒快速提取试剂盒）。

### **3.2.6** 克雷伯氏菌电转化感受态细胞的制备

(1)将甘油管保存的克雷伯氏菌接种至LB培养基中，37 oC、150 r/min培养10 h；

(2)按1%的种子液接种至50 mL的LB培养基中，37 oC 200 rpm培养至OD600 为

0.6时，倒入预冷的50 mL无菌离心管中；

(3) 4 oC, 8000 rpm离心10 min，弃上清；

(4)加20 mL预冷的无菌水悬浮，4 oC, 8000 rpm离心10 min；弃上清，此过程重复共三次；

(5)冰浴的无菌水重悬细胞，1.5mL离心管中分装90μL，用于后续实验。

### **3.2.7** 电转化克雷伯氏菌

(1)预冷的2μL目标质粒DNA加入到90μL感受态细胞中，轻轻混匀；

(2)吸入到1 mm已预冷4 h的电击杯中；

(3)电击转化目标质粒DNA。电击条件：电压1800 v，时间约4.5-5 s[61]；

(4)把混合液吸到已灭菌1.5mL离心管；

（5）加入1 mL LB培养基；

（6）37 oC后培养1 h，吸取菌液涂布含卡纳抗性的LB平板，37 oC培养10-12 h。挑取单菌落，在有相应抗生素的LB液体培养基中重新培养8 h，获得重组菌，进行下一步鉴定。

### **3.2.8** 粗酶液的制备方法

CgGPD粗酶液的制备方法[67]：过夜诱导表达的重组菌株菌液，4℃离心10 min, 8000 rpm，收集的菌体用细胞洗涤液洗涤三遍，悬于10 mL破壁缓冲液中采用超声波法破壁细胞。工作条件为：300W，工作1s隔3 s，工作3 min30 s，4℃离心10 min, 8000 rpm，上清即为粗酶液。

ScGPP2粗酶液的制备方法[68]：将过夜诱导的重组菌菌液4℃离心10 min, 8000 rpm，收集菌体洗涤，菌体悬浮于0.5 mL破壁缓冲液中超声波破壁法破碎细胞。工作条件：300W，工作1 s隔3 s，工作3 min30 s，4℃离心10 min, 8000 rpm，上清为粗酶液。

### **3.2.9** 酶活测定方法

胞浆3-磷酸甘油脱氢酶酶活测定[17,67]：工作体系调整为：咪唑-HCl：400μL；DTT：200μL；MgCl2: 10μL；DHAP：200μL；NADH：200μL；粗酶液：50μL。酶标板中蛋白质的浓度为0.05-0.5 mg/mL范围内。一个单位酶活定义为一分钟消耗1μmol/LNADH所需的酶量。

3-磷酸甘油酯酶酶活活力测定[68]：反应体系（0.1 mL）：1 mg/mL的酶液：50μL；

0.2 mol/L DL-磷酸甘油：10μL；1 mol/L咪唑-HCl(pH7.0)：10μL；0.25 mol/L MgCL2: 10μL，补超纯水至0.1 mL。一个单位酶活定义为：在30℃，pH7.0的条件下，每分钟催化3-磷酸甘油产生1μmol磷酸根所需要的酶量。

测定3-磷酸甘油酯酶活性过程中无机磷含量用钼蓝比色法测定（参照国家标准物质网的方法）：利用磷标准溶液获得标准曲线：

Y=8.89x + 0.01 (R2=0.998)

### **3.2.10** 蛋白含量测定

蛋白质含量测定：使用Bradford方法[69]，以牛血清蛋白为标样制作标准曲线，测定595 nm下测定OD，得到蛋白浓度。标准蛋白溶液：牛血清白蛋白0.1 mg/mL。考马斯亮蓝G-250: 100 mg考马斯亮蓝G-250溶于50 mL 90%乙醇，加入85%的磷酸100 mL，蒸馏水定容至1000 mL，常温下可放置一个月。

绘制标准曲线：配制不同浓度梯度的标准蛋白，加入5 mL G-250，混匀后放置2 min，在595 nm下测定OD。制作标准曲线。在测定3-磷酸甘油脱氢酶的活性时，蛋白浓度需控制在0.05-0.5 mg/mL的范围内。测定3-磷酸甘油酯酶的蛋白浓度需调整到1mg/mL。

牛血清白蛋白为标准蛋白，获得标准曲线：

Y=0.187x - 0.029 (R2=0.997)

### **3.2.11** **SDS-PAGE**检测

重组菌株的诱导表达：挑取阳性转化子37℃220 rpm过夜培养，2%的接种量转接培养至OD600值在0.6~0.8时，加入IPTG至终浓度为0.5mmol/L，过夜诱导表达。

5%的浓缩胶和12%的分离胶的不连续垂直平板电泳分离蛋白，考马斯亮蓝R-250

染色。

## **3.3** 结果与分析

### **3.3.1** 重组质粒**pEtac-*CgGPD*, pEtac-*ScGPP2***和**pEtac-*CgGPD*-tac-*ScGPP2***的构建

提取测序正确的质粒pMD18T*–CgGPD*和pMD18T–*ScGPP2*，用*EcoR*I和*Hind*III酶切出*CgGPD*基因片段，同时将pE*tac*表达载体以相同的酶切位点酶切，胶回收基因片段和酶切过的pE*tac*表达载体；用*Sac*I和*Xho*I酶切出*ScGPP2*基因片段和pE*tac*表达载体。基因片段*CgGPD*和*ScGPP2*与与各自酶切位点一致的pE*tac*表达载体进行连接，连接体系及连接条件如方法中所示。连接产物转化到大肠杆菌JM109感受态细胞中，进行验证，提取质粒DNA后，用相应的酶切，酶切图谱如图3-5所示：由图（a）中可知，大小约为为5800 bp和1100 bp大小的pE*tac*载体片段和*CgGPD*片段在图中可清晰看到，说明*CgGPD*片段已成功与pE*tac*载体连接，此质粒命名为pE*tac-CgGPD*。由图（b）中可知，5800 bp和750 bp大小的载体片段和基因*ScGPP2*已有效连接，此质粒将其命名为pE*tac- ScGPP2*。

M1 1 2 M2

M1 1 2 3 M2

6577

bp

1000

bp

1000



6557

bp

bp

**M1. λ-*Hind* III digest DNA Marker** M2. DL2000 **DNA Marker** 1**、2: pE*tac-CgGPD* 的**

***EcoR*I, *Hind*III双酶切**

***(a)* pE*tac*-*CgGPD***

**M1. DL2000 DNA Marker M2. λ-*Hind* III digest DNA Marker 1、2. pE*tac-ScGPP2* 的*Sac*I, *Xho*I**

**双酶切3. pE*tac-ScGPP2*的*Sac*I单酶切**

**(b) pEtac-ScGPP2**

**图3-5** **pE*tac-CgGPD*和pE*tac-ScGPP2*的酶切验证**

**Fig.** **3-5** **The enzymatic digestion of the plasmid pEtac-CgGPD and pEtac-ScGPP2**

为构建甘油合成串联表达载体，以构建好的pE*tac- ScGPP2*质粒DNA为模板，以本实验具有的*tac*启动子的序列设计上游引物Primer5，以*ScGPP2*基因片段的序列设计下游引物Primer4, PCR获得带有tac启动子的基因片段*tac*- *ScGPP2*，胶回收验证PCR产物，结果如图3-6所示，*tac*启动子的大小为253 bp，所以基因片段*tac*- *ScGPP2*的大小为1006 bp。在图中1000 bp大小的位置可看到明显的条带，即获得了*tac*- *ScGPP2*片段。

M 1

1000



bp

**Tac- *ScGPP2***

**图3-6** **tac-*ScGPP2*的琼脂糖凝胶电泳分析**

**Fig.** **3-6** **Agarose gel electrophoresis of tac- ScGPP2/M. DL2000 Marker 1. PCR条带**

基因片段tac- *ScGPP2*先连接到pMD18-T vector上，然后用*Hind*III和*Xho*I限制性内切酶切pMD18-T-tac- *ScGPP2*和pE*tac-CgGPD*质粒DNA，基因片段*tac*- *ScGPP2*与pE*tac-CgGPD*载体进行连接，连接产物进行最后一步的酶切验证，如图3-7所示，由

DNA 标准Marker 比对可知，目的基因片段已与目标载体连接，将这个质粒命名为

pE*tac-CgGPD*-*tac-ScGPP2*.

M1 1 2 3 M2

1000

bp

6577

bp



**M1. DL2000 DNA Marker** M2. λ-***Hind* III digest DNA Marker** 1**、2. pUC19*-tac-ScGPP2* 的**

***Hind*III, *Xho*I双酶切3. pE*tac-CgGPD*-*tac-ScGPP2*的*Sac*I, *Xho*I双酶切**

**图 3-7** pE***tac-CgGPD*-*tac-ScGPP2*的酶切验证**

**Fig.** **3-7** **The enzymatic digestion of the plasmid pE*tac-CgGPD*-*tac-ScGPP2***

自此，本研究所构建的三种质粒全部成功获得，如图3-8所示：





A B C

**图3-8** **构建的质粒图谱**

**A, B, C分别为pE*tac*-*CgGPD*, pE*tac*- *ScGPP2*和pE*tac*-*CgGPD*-*tac*-*ScGPP2***

**Fig.** **3-8** **Maps of constructed plasmids. A, B and C represented the plasmids of pE*tac*-*CgGPD*, pE*tac*-**

***ScGPP2* and pE*tac*-*CgGPD*-*tac*-*ScGPP2*, respectively**

### **3.3.2** 关键酶基因在大肠杆菌中的表达

重组菌株*E. coli* (pE*tac*-*CgGPD*-*tac*-*ScGPP2*) 37℃220 rpm过夜培养，按2%的接种量转接至新鲜的LB培养基，37℃培养至OD600值在0.6~0.8时，加入IPTG至终浓度为

0.5 mmol/L，进行不同温度的优化，分别在25℃，30℃，37℃过夜诱导表达。收集菌体后超声波破碎细胞，分别将上清与用0.8M尿素溶解的沉淀进行SDS-PAGE。结果显示，在30℃下，两个蛋白表达效果更好。如图3-9所示，已知3-磷酸甘油脱氢酶基因与3-

磷酸甘油酯酶基因在DNAman等分析软件中，分析其氨基酸序列及蛋白分子大小，GPD的大小为42 kDa, ScGPP2的大小为27 kDa，也有文献中报道了大小一致的蛋白分子量。图中在约42 kDa和27 kDa的位置有明显的条带，说明这两个来自真核生物的基因在大肠杆菌原核生物中成功表达，但表达的蛋白是否具有一定的活性，还需进一步验证。

97.2

44.3

29.0

kDa

M 1 2 3

GPD GPP



**M. 蛋白质分子质量标准1. *E. coli*** **2、3. *E. coli/*pEtac-CgGPD-tac-ScGPP2破壁上清**

**SDS—PAGE检测**

**图3-9** **pE*tac-CgGPD*-*tac-ScGPP2*的SDS-PAGE检测**

**Fig.** **3-9** **SDS-PAGE analysis of the plasmid pE*tac-CgGPD*-*tac-ScGPP2***

由SDS-PAGE结果可知，在大肠杆菌重组菌中有相应大小的甘油合成关键酶蛋白，但是这些蛋白是否具有一定的酶学活性，需进一步的测定。为此，分别测定了*E. coli* (pE*tac*-*CgGPD*)，*E. coli* (pE*tac*-*ScGPP2*)和*E. coli* (pE*tac*-*CgGPD*-*tac*-*ScGPP2*)三种重组菌株中酶活性的大小。按照文献中的方法[67, 68]，依次测定三种重组大肠杆菌中的3-磷酸甘油脱氢酶和3-磷酸甘油酯酶的活性。

**表3-4** **酶活及甘油浓度测定**

Tab. 3-4 Specific activity of CgGPD and ScGPP2

| Strains | Enzyme activities (U/mg) | | Glycerol concentration |
| --- | --- | --- | --- |
| CgGPD ScGPP2 | | (g/L) |
| E. coliJM109  E. coli(pEtac-CgGPD)  E. coli(pEtac-ScGPP2)  E. coli(pEtac-CgGPD-tac-ScGPP2) | 0.00  0.12±0.005  0.00 | 0.00  0.00  0.03±0.001 | 0.00  0.00  0.00 |
| 0.06±0.003 | 0.01±0.005 | 2.52 |

测定结果如表3-4，在*E. coli* (pE*tac*-*CgGPD*)和*E. coli* (pE*tac*-*CgGPD*-*tac*-*ScGPP2*)菌株中，CgGPD酶活分别为0.12 U/mg和0.06 U/mg. 在*E. coli* (pE*tac*-*ScGPP2*)和*E. coli* (pE*tac*-*CgGPD*-*tac*-*ScGPP2*)菌株中ScGPP2酶活分别是0.03 U/mg和0.01 U/mg.3-磷酸甘油脱氢酶是甘油合成途径中的关键酶基因，其酶活的高低直接影响着甘油的合成，本

研究中CgGPD具有相对较高的酶活，对DHAP转化合成甘油有着重要作用。

摇瓶发酵结果显示如图3-10，在1%，2%，3%，4%葡萄糖浓度下，经48 h后，*E. coli* (pE*tac-CgGPD-tac-ScGPP2*)发酵液中有一定量的甘油存在，其胞外甘油分别累积到1.35，1.87，2.52, 2.25 g/L，在对照野生菌株中却没有检测到甘油。实验结果说明甘油合成途径已被成功引入到原核生物大肠杆菌中。

2.5

甘油含量(g/L) Glycerol concentration (g/L)

2.0

1.5

1.0

0.5

0.0

10 20 30 40

葡萄糖含量(g/L) Glucose concentration (g/L)

**图3-10 不同葡萄糖浓度下甘油含量**

**Fig.** **3-10** **Concentration of glycerol under different conditions**

### **3.3.3** 甘油合成途径在克雷伯氏菌株的构建及关键酶基因的表达

为了研究甘油合成关键酶基因在产1, 3-丙二醇的克雷伯氏菌中的的潜在应用价值，将构建好的pE*tac*-*CgGPD*-*tac*-*ScGPP2*质粒DNA，电转化进事先准备好的克雷伯氏菌感受态细胞，并进行酶切验证，如图3-11可知，质粒DNA pE*tac*-*CgGPD*-*tac*-*ScGPP2*大小与之前在大肠杆菌中构建的相一致，即表明重组质粒已成功电转化入肺炎克雷伯氏菌中，此菌株命名为*K. pneumoniae* (pE*tac*-*CgGPD*-*tac*-*ScGPP2*)。

M1 1 2 M2



6557

bp

1000

bp

**M1. DL2000 DNA Marker** M2. λ-***Hind* III digest DNA Marker** 1**、2. pE*tac-CgGPD*-*tac-ScGPP2***

**的*Hind* III, *Xho*I双、单酶切**

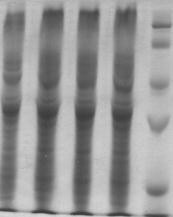
**图3-11** **pE*tac-CgGPD*-*tac-ScGPP2*的酶切验证**

**Fig.** **3-11** **Enzymatic digestion of the plasmid pE*tac-CgGPD*-*tac-ScGPP2***

SDS-PAGE对甘油合成关键酶基因在重组克雷伯氏菌中的表达情况进行考察，在重组菌株OD值0.6-0.8时，加入诱导剂IPTG，在不同温度下培养12 h。收集菌体，超声波破碎细胞，上清进行聚丙烯酰胺凝胶电泳。考马斯亮蓝染色，脱色液脱色后，结果如图3-12所示，可以看出，在42 kDa和27 kDa的位置颜色相对加深了，说明3-磷酸甘油脱氢酶和3-磷酸甘油酯酶基因在克雷伯氏菌株中表达了目标蛋白。

1 2 3 4 M

97.2



GPD

GPP

44.3

29.0

kDa

**1: *K. penumoniae*. 2: *K. penumoniae* (pE*tac*-*CgGPD-tac-ScGPP2*) with the IPTG induction in 25°C. 3: *K. penumoniae* (pE*tac*-*CgGPD-tac-ScGPP2*) with the IPTG induction in 30°C. 4: *K. penumoniae* (pE*tac*-*CgGPD-tac-ScGPP2*) with the IPTG induction in 30°C. M: protein marker**

**图3-12 全细胞蛋白的聚丙烯酰胺凝胶电泳分析图**

**Fig.** **3-12** **SDS–PAGE analysis of proteins in whole cells**

而克雷伯氏重组菌株中的产甘油关键酶基因所指导合成的蛋白，其生物活性需进一步测定。为此，对重组菌株中的酶活性进行分析，测定结果如下表3-5所示：由表中测定结果可知，克雷伯氏野生菌株中没有两种酶的活性，而在克雷伯氏重组菌中，CgGPD和ScGPP2的酶活分别为0.1 U/mg和0.02 U/mg。说明甘油合成关键酶基因已在克雷伯氏野生菌中表达并具有活性。同时将重组菌经过48 h的摇瓶发酵，如表所示，在克氏野生菌中未检测到甘油，而在重组菌中检测到0.45 g/L的甘油，更进一步的证明了甘油合成途径已经成功构建到克雷伯氏野生菌中。

**表3-5** **重组菌株的酶活测定**

Tab. 3-5 Enzyme activities of the recombinant strains and hosts in flask cultures

| Strains | Enzyme activities (U/mg) | Glycerol concentration |
| --- | --- | --- |
| CgGPD ScGPP2 | (g/L) |
| K. pneumoniae  K. pneumoniae (pEtac-CgGPD-tac-ScGPP2) | 0.00 0.00 0.00  0.10±0.001 0.02±0.001 0.45 | |

## **3.4** 小结与讨论

1、构建重组质粒pE*tac*-*CgGPD*, pE*tac*- *ScGPP2*和pE*tac*-*CgGPD* -*tac*- *ScGPP2*。重组菌*E. coli* JM109(pE*tac*-*CgGPD* -*tac*- *ScGPP2*)经IPTG的诱导，分别表达出有活性的重组蛋白。酶活测定得出重组大肠杆菌中3-磷酸甘油脱氢酶酶活力为0.06 U/mg蛋白，3-磷酸甘油酯酶酶活力为0.01 U/mg蛋白，表明甘油合成基因在大肠杆菌中正确表达。

2、对*E. coli* JM109(pE*tac*)、重组菌*E. coli* JM109(pE*tac*- *CgGPD* -*tac*- *ScGPP2*)发酵生产甘油的性能进行了初步的考察。结果表明，野生大肠杆菌未能产生甘油，而*E. coli* JM109(pE*tac*- *CgGPD* -*tac*- *ScGPP2*)菌株，在1%，2%，3%，4%葡萄糖浓度下甘油分别累积到1.35, 1.87，2.52, 2.25 g/L，说明甘油合成途径已成功存在于原核生物大肠杆菌中。

3、电转化获得*K. pneumoniae* (pE*tac*-*CgGPD*-*tac*-*ScGPP2*)重组菌株，并对其进行聚丙烯酰胺凝胶分析，两种甘油合成基因在克雷伯氏菌中都成功表达。重组菌*K. pneumoniae* (pE*tac*-*CgGPD*-*tac*-*ScGPP2*)酶活性分析结果显示，CgGPD和ScGPP2的酶活力分别为0.1 U/mg总蛋白和0.02 U/mg总蛋白。由此，将甘油途径引入到了克雷伯氏菌株中，对其是否能够应用于产1, 3-丙二醇，将进行发酵性能的考察。

# 第**4**章 甘油关键酶基因在克雷伯氏菌产**PDO**发酵中的应用

## **4.1** 材料与仪器设备

### **4.1.1** 菌株

肺炎克雷伯氏菌(*K.* pneumoniae )；克雷伯氏重组菌(*K.* pneumoniae

/pE*tac*-*CgGPD*-*tac*-*ScGPP2*)

### **4.1.2** 主要试剂

甘油、2, 3-丁二醇：上海国药集团化学试剂有限公司；

1,3-丙二醇：Sigma分装；

其余试剂：分析纯，国药集团化学试剂有限公司。

### **4.1.3** 培养基

培养基及配方见表4-1。

**表4-1** **培养基及配方**

Tab. 4-1 Formula of media used in this research

| 培养基名称 | 配方 |
| --- | --- |
| LB 培养基  发酵培养基  微量元素 | Tryptone 10.0g;Yeast extract 5.0g;NaCl 10.0g; H2O 1000mL ;pH 7.0  Glucose30.0; K2HPO4, 7.5; (NH4)2SO4, 2.0; MgSO4·7H 2O, 2.0;  FeSO4·7H 2O, 0.005; yeast extract, 10.0; vitamin B12, 0.015 and 1 mL trace element solution. H2O 1000mL ;pH 8.5  ZnCl2 0.7; MnCl2·4H 2O 1.0; H3BO3 0.6; CoCl2·6H 2O 2.0; CuCl2 0.2;  NiCl2·6H 2O 0.25; Na2MoO4·2H 2O 0.35. H2O 1000mL |

所有培养基置于高压蒸汽灭菌锅中，121°C灭菌30 min或121°C灭菌15 min需要时加入Kan (50μg/mL)。

### **4.1.4** 主要仪器设备

主要仪器设备见表4-2。

**表4-2** **主要仪器与设备**

Tab. 4-2 Instruments and equipments used in this study

| 仪器名称 | 公司 |
| --- | --- |
| 320-S pH 计 | METTLER TOLEDO 公司 |
| 回转式恒温调速瓶柜 | 上海新星自动化控制设备厂 |
| Allegra X-15R 离心机 | Beckman 公司 |
| 分光光度计 | 尤尼柯仪器有限公司 |
| 超净工作台 | 苏州净化设备有限公司 |
| HPLC 高效液相色谱仪 | 美国戴安公司 |
| 液相色谱柱  SBA-40E 生物传感分析仪 | Aminex HPX-87H column  ft东省科学院生物研究所 |

## **4.2** 方法

### **4.2.1** 培养方法

种子培养：装液量50 mL于250 mL三角瓶，接种量1%，37°C, 150 r/min培养

6-7 h。

摇瓶发酵：装液量50 mL于250 mL三角瓶，接种量4%，30°C, 150 r/min培养

48 h。

### **4.2.2** 测定方法

#### 4.2.2.1 生物量的测定

比浊法，测定菌液在600 nm处的吸光值。

#### 4.2.2.2 产物测定方法

葡萄糖测定：SBA-40E生物传感分析仪。

1, 3-丙二醇、2, 3-丁二醇、乙醇、乙酸、甘油等Dionex高效液相色谱仪测定。色谱柱为Amines HPX-87H有机酸离子交换柱，柱温60℃，流动相为5 mmol/L H2SO4，流速为0.6 mL/min，进样量10μL使用示差折光及紫外检测器，使用外标法定量[75]。

## **4.3** 结果与分析

### **4.3.1** 含甘油关键基因克雷伯氏菌的摇瓶发酵分析

培养克雷伯氏野生菌和重组菌株，对其形态进行观察，发现重组菌株和野生菌株的形态并无明显变化，呈短杆状，单独、成对或短链式存在。结果如图4-1所示。



**图4-1** **克雷伯氏野生菌株和重组菌株形态（100×）**

**Fig.** **4-1** **Morphological characteristics of wild and recombinant strain**

克雷伯氏重组菌株(*K. pneumoniae* /pE*tac*-*CgGPD*-*tac*-*ScGPP2*)经活化后，接种在LB液体培养基中，经过8h后，转接到250 mL的摇瓶中，装液量50 mL，接种量4%，OD600达到0.6-0.8时，加入IPTG诱导剂，150 rpm，30℃培养48 h，间隔取样，菌体生长情况通过测定OD600值，葡萄糖含量由生物传感分析仪测定，1, 3-丙二醇，2, 3-丁二醇，甘油，乙醇，乙酸等通过高效液相色谱分析。摇瓶发酵的数据如图4-2所示，以野生克雷伯氏菌作为对照菌株，在图中A图可以看出，在整个发酵过程中，克雷伯氏重组菌株菌体生长情况表现出了与野生菌相同的生长模式，但是在全程取样时段，重组菌株的OD600值却始终整体低于野生菌株，即构建的基因工程菌的生长不如野生菌的，这或许是因为外源基因的表达给宿主菌株施加了一定的代谢压力。

然而，正如所期待的，克雷伯氏重组菌株在摇瓶发酵过程中确实积累了1, 3-丙二醇。重组菌株经过48 h的发酵，在只含有30 g/L的葡萄糖的培养基中，1, 3-丙二醇的最大积累量达到7.64 g/L，同时在野生菌株中，却没有检测到1, 3-丙二醇。这表明含有*CgGPD*和*ScGPP2*的克雷伯氏菌拥有了一套的甘油合成途径，可以将葡萄糖转化为甘油进一步代谢转化为1, 3-丙二醇的完整代谢通路。经过20h的发酵，重组菌中1, 3-丙二醇的产量出现一定幅度的下降，这种下降情况已被孙[77]等学者在克雷伯氏野生菌中发现，并描述为1, 3-丙二醇产量的一种周期性振幅特性。在重组菌株中副产物，例如2, 3-丁二醇和乙酸，相比野生菌而言，都有一个明显的增加。这是由于甘油合成途径的加入，使得中间产物DHAP增多，部分的DHAP进入了TCA循环，从而使乙酸，乙醇等小分子物质的含量增加。由数据可知，重组菌中2, 3-丁二醇的含量在12 h之后，开始持续下降，而1, 3-丙二醇的产量在12 h后开始直线上升到一个最大值，然后又有所下降。乙醇在重组菌株中发酵中期，出现一段迅速下降至零又直线上升的时段，有研究证明，在1, 3-丙二醇的合成过程中，乙醇和2, 3-丙二醇作为竞争者，与1, 3-丙二醇竞争还原力NADH，这

也有力的说明了以上实验现象。同时，在以后的研究工作中，如何获得更多的还原力值得思考与探索。

12 32

*K.pneumoniae* (glucose/OD) recombinant *K.pneumoniae*(glucose/OD)

10

24

8

6 16

OD

600

4

8

2

0 0

0 10 20 30 40

time(h)

0.6

0.4

glucose(g/L)

glycerol (g/L)

0.2

0.0

*K.pneumoniae*

recombinant *K.pneumoniae*

0 10 20 30 40

time(h)

A B

*K. pneumoniae*

recombinant *K. pneumoniae*

12

*K. pneumoniae*

recombinant *K. pneumoniae*

8

10

6 8

1,3-PDO (g/L)

2,3-BDO(g/L)

4 6

2 4

2

0

0

0 10 20 30 40

Time (h)

C

*K. pneumoniae*

recombinant *K. pneumoniae*

5

0 10 20 30 40

Time (h)

D

4

*K. pneumoniae*

recombinant *K. pneumoniae*

4

3

ethanol (g/L)

3

acetic acid (g/L)

2

2

1 1

0

0 10 20 30 40

Time (h)

0

0 10 20 30 40

Time (h)

E F

**图4-2** **克雷伯氏重组菌株的摇瓶发酵**

**Fig.** **4-2** **Time course of fermentation of wild type strain and the recombinant*K. pneumoniae***

**A: OD600 (optical density at 600 nm) and glucose, B: glycorol, C: 1,3-PDO, D: 2,3-BDO, E: ethanol and F: acetic acid. The strains cultivated in the fermentation medium under anaerobic condition at 30 oC, 80 rpm. 0.5 mmol/L IPTG was added to the culture medium.**

一个明显的不同存在于野生菌株和重组菌株之间，就是在含有葡萄糖的液体培养基

重组菌株发酵液中可检测到0.45 g/L甘油，而野生菌株在整个发酵过程都没有检测到甘油的存在，这个结果与先前的蛋白表达情况分析以及酶学活性测定的结果相一致，共同证明甘油合成途径已成功在克雷伯氏菌中启动。在发酵的前10 h，重组克氏菌中甘油浓度低于0.25g/L，并且1, 3-丙二醇的浓度也非常低，然而2, 3-丁二醇的含量却达到了最大值然后开始其浓度开始降低。这表明在甘油浓度较低时，碳流主要偏转向去合成丙酮酸，从而去合成2, 3-丁二醇和乙醇等氧化途径的代谢产物。当甘油积累浓度高于0.25 g/L时，代谢途径中的碳流，立即凭借加入的甘油合成途径偏转到1, 3-丙二醇合成方向，此结果表明在以葡萄糖为唯一底物的发酵中，一定量浓度的甘油积累对于启动1, 3-丙二醇途径是十分必要的。这些结果也说明来自产甘油假丝酵母的3-磷酸甘油脱氢酶基因和来自酿酒酵母的3-磷酸甘油酯酶基因在克雷伯氏野生菌中的成功表达，对克氏菌代谢途径中碳流产生了较大的影响，使得原本的葡萄糖代谢途径合成丙酮酸，进一步去进入TCA循环，转变为由二羟丙酮磷酸进而转化为甘油，用于1, 3-丙二醇的合成。

### **4.3.2** 产**PDO**发酵培养基的优化

在30 g/L的葡萄糖发酵培养基中，重组菌株中1, 3-丙二醇的最高含量为7.64 g/L。为了进一步的研究葡萄糖浓度对1, 3-丙二醇产量的影响，尝试对培养基进行优化。在含有40 g/L的葡萄糖的培养基中，在30 oC，80 rpm发酵48 h后，1, 3-丙二醇的最大含量为16.93 g/L，与之前在30 g/L的培养基中的产量相比，1, 3-丙二醇的产量增加了2.15

倍。甘油的最高积累量为3.69 g/L，比以30 g/L葡萄糖作为底物时增加了1.17 g/L。如图4-3中B图所示，底物葡萄糖经过12h的发酵完全耗尽，这时副产物2, 3-丁二醇的含量开始逐步增加，同时，1, 3-丙二醇的含量在厌氧条件下缓慢上升。经过20h的发酵，2, 3-丁二醇的含量达到峰值并出现下降，此时1, 3-丙二醇含量开始迅速增加，在40h时其含量达到最大，为16.9g/L，同时，2, 3-丁二醇的含量降到了0.8g/L。说明，一定程度上提高葡萄糖浓度，可以增加底物的转化利用率，提高1, 3-丙二醇的产量。

基于一定浓度的甘油可以启动1, 3-丙二醇合成途径这一特点，在保持碳源总量一致的条件下，加入10 g/L的甘油研究其对1,3-丙二醇合成的影响，将重组菌株培养在含有30 g/L的葡萄糖和10 g/L的甘油的培养基中，发酵结果显示，经过24 h的发酵，1,3-丙二醇的产量为17.6 g/L，在整个发酵周期中，与只有40g/L葡萄糖的发酵结果相比，1, 3-丙二醇的总产量几乎没有提高，然而，加入一定含量的甘油，1, 3-丙二醇目标产物的最高产值的发酵时间却缩短了16 h，进一步说明一定浓度的甘油可以快速启动以葡萄

糖为底物发酵中1, 3-丙二醇的合成途径。这对于发酵过程的控制，缩短发酵周期都是有效的，也为今后上罐发酵也提供一定的理论和实践指导。

OD (a)

600

OD (b)

600

glucose(a) glucose(b)

5 40

4 32

3 24

OD

600

2 16

1

8

0

0

0 10 20 30 40 50

time(h)

12

8

a b

glucose(g/L)

glycerol (g/L)

4

0

0 10 20 30 40 50

Time (h)

A B

20 a 24

a

b

16 b 20

16

1,3-PDO (g/L)

2,3-BDO (g/L)

12

12

8 8

4 4

0

0 10 20 30 40 50

Time (h)

0

0 10 20 30 40 50

Time (h)

C D

a

b

6 4

a

b

3

4

ethanol (g/L)

acetic acid (g/L)

2

2

1

0

0 10 20 30 40 50

Time (h)

0

0 10 20 30 40 50

Time (h)

E F

**图4-3** **克雷伯氏重组菌株的摇瓶优化**

**Fig.** **4-3** **Optimization fermentation of the recombinant*K. pneumoniae***

**A: OD600 and glucose, B: glycerol, C: 1,3-PDO, D: 2,3-BDO, E: ethanol and F: acetic acid. The strains cultivated in the fermentation medium under anaerobic condition at 30 oC, 80 rpm. 0.5 mmol/L IPTG was added to the culture medium. a: the medium with 30 g/L glucose and 10 g/L glycerol. b: the medium with**

**40 g/L glucose.**

### **4.3.3** 葡萄糖**-**甘油**-PDO**在克雷伯氏菌代谢途径的分析

野生克雷伯氏菌，以甘油作为唯一的碳源和能源物质，它伴随着氧化途径和还原途径发生歧化反应，氧化途径中由甘油脱氢酶（dhaD）和二羟丙酮激酶（dhaK）来完成催化反应，将甘油代谢转化为二羟丙酮磷酸（DHAP），磷酸二羟丙酮进一步代谢生成丙酮酸，丙酮酸是代谢过程中很重要的中间产物，其进一步代谢生成各类小分子物质，如乙酸、乙醇、乳酸、2, 3-丁二醇等代谢副产物[74]，代谢产物与糖酵解代谢途径的产物相一致，同时也提供细胞所需的能量ATP和释放一些还原力。克雷伯氏重组菌中氧化途径与野生菌有一些区别，碳源和能源物质为单一葡萄糖，一部分的碳流和野生菌中一样，沿着氧化途径，产生生物能量ATP和还原力，同时发生细胞的生长，如图4-3所示。还原途径则利用氧化途径中产生的还原力，将甘油转化生成1, 3-丙二醇[72, 73]，此途径则由甘油脱水酶(dhaB)和1, 3-丙二醇氧化还原酶(dhaT)在微氧或厌氧条件下激活反应

[40,75]。



**图4-4** **克雷伯氏重组菌株代谢图**

**Fig.** **4-4** **Metabolic pathway of recombinant strain**

本研究中，野生克雷伯氏重组菌可以利用唯一的葡萄糖一步法产1,3-丙二醇，由图4-4可知，我们利用野生菌可以以糖酵解途径代谢葡萄糖而产生磷酸二羟丙酮这个中间

产物，以此为切入点，通过加入3-磷酸甘油脱氢酶基因（*CgGPD*）和3-磷酸甘油酯酶基因（*ScGPP2*），从而使磷酸二羟丙酮转化为克雷伯氏菌可以利用的底物甘油，进一步发生还原反应。外源基因指导合成的甘油，被菌体内甘油脱水酶(dhaB)，在辅酶B12存在下将甘油转化为中间产物3-羟基丙醛(3-HPA)；在NADH存在下，3-羟基丙醛在1,3-丙二醇氧化还原酶(dhaT)催化下生成1,3-丙二醇。*CgGPD*基因和*ScGPP2*基因在克雷伯氏菌中搭建了一座桥梁，将甘油合成途径成功的引入了克雷伯氏菌中，使其完成了葡萄糖到甘油的转化，从而为1, 3-丙二醇的合成提供了一种有效的工艺路线。

## **4.4** 小结与讨论

1、克雷伯氏重组菌株(*K. pneumoniae* /pE*tac*-*CgGPD*-*tac*-*ScGPP2*)产1, 3-丙二醇的发酵性能进行了初步的考察，在含葡萄糖30 g/L的发酵培养基中，克雷伯氏重组菌株经诱导后，1, 3-丙二醇的产量为7.64 g/L，碳源转化率为26%，结果表明，克雷伯氏菌拥有了一套完整的甘油合成途径，可将该途径产生的甘油进一步代谢为1, 3-丙二醇，同时也证明一定量甘油的积累，可启动1, 3-丙二醇合成途径。

2、克雷伯氏重组菌株(*K. pneumoniae* /pE*tac*-*CgGPD*-*tac*-*ScGPP2*)发酵生产1, 3-丙二醇的性能优化考察，在含有40 g/L的葡萄糖的培养基中摇瓶发酵，1, 3-丙二醇的产量为

16.93 g/L，碳源转化率26%提高到了42.2%，转化率提高了62.3%。甘油含量积累到了

3.69 g/L，增加了46.4%。同时发现，在以葡萄糖作为碳源和能源物质的一步法生产1,3-丙二醇的发酵中，加入一定浓度的甘油，可提前快速启动1, 3-丙二醇的合成途径，缩短发酵周期，节省成本。

3、对重组菌*K. pneumoniae* (pE*tac*-*CgGPD*-*tac*-*ScGPP2*)和野生克雷伯氏菌的碳流代谢与走向进行比较，3-磷酸甘油脱氢酶基因（*CgGPD*）和3-磷酸甘油酯酶基因（*ScGPP2*）的加入，在克雷伯氏菌中搭建了一座桥梁，使磷酸二羟丙酮转化为克雷伯氏菌可以利用的底物甘油，成功的完成了葡萄糖到甘油的代谢转化，从而为葡萄糖到1, 3-丙二醇的合成提供了一种潜在的工艺路线。

结 **论**

1、利用PCR方法从产甘油假丝酵母中克隆1167 bp的3-磷酸甘油脱氢酶编码基因

*CgGPD*, *CgGPD*基因包含1167 bp的阅读框，编码388个氨基酸，编码蛋白分子量为

42.58 kDa，理论等电点为6.12。同时从酿酒酵母中克隆753 bp的3-磷酸甘油酯酶的编码基因*ScGPP2*, *ScGPP2*基因包含753 bp的阅读框，编码250个氨基酸，蛋白分子量为27.57 kDa，理论等电点是5.93。并对二者密码子使用情况及蛋白质进行分析，结果表明，二者密码子第三位碱基都对嘧啶碱基较偏爱，这对于后期的基因表达研究提供了一定的理论支持。

2、构建重组质粒pE*tac*-*CgGPD*, pE*tac*-*ScGPP2*和pE*tac*-*CgGPD*-*tac*-*ScGPP2*，并获得*E. coli* JM109(pE*tac*-*CgGPD*-*tac*-*ScGPP2*)重组菌，经IPTG诱导，SDS-PAGE检测有相应大小的目的重组蛋白。酶活性测定得出重组大肠杆菌中3-磷酸甘油脱氢酶和3-磷酸甘油酯酶酶酶活力分别为0.06 U/mg总蛋白和0.01 U/mg总蛋白。重组菌*E. coli* JM109(pE*tac*-*CgGPD*-*tac*-*ScGPP2*)发酵生产甘油的性能进行了初步的考察，结果表明，真核生物甘油合成途径已成功存在于原核生物大肠杆菌中。

3、电转化获得*K. pneumoniae* (pE*tac*-*CgGPD*-*tac*-*ScGPP2*)重组菌株，并对其进行聚丙烯酰胺凝胶分析，说明甘油合成关键酶基因在克雷伯氏菌中表达了相应重组蛋白。重组克氏菌进行酶活分析，3-磷酸甘油脱氢酶和3-磷酸甘油酯酶酶酶活力分别是0.1 U/mg总蛋白和0.02 U/mg总蛋白，同时摇瓶发酵检测到甘油，说明克雷伯氏菌拥有了完整的甘油合成代谢途径。

4、甘油合成途径在克雷伯氏菌株(*K. pneumoniae* /pE*tac*-*CgGPD*-*tac*-*ScGPP2*)发酵生产1, 3-丙二醇的性能考察结果表明，在葡萄糖30 g/L的发酵培养基中，克雷伯氏重组菌株(*K. pneumoniae* /pE*tac*-*CgGPD*-*tac*-*ScGPP2*)经诱导后，1, 3-丙二醇的产量为7.64

g/L，底物转化率为26%。在含有40 g/L的葡萄糖的培养基中摇瓶发酵，1, 3-丙二醇的产量为16.93 g/L，碳源转化率由26%提高到了42.2%，转化率提高了62.3%。甘油含量积累到了3.69 g/L，增加了46.4%。进一步研究发现，在以葡萄糖为唯一碳源时，一定量的甘油积累可以诱导启动1,3丙二醇合成途径。同时，一定浓度的甘油，可以快速启动1, 3-丙二醇的合成途径，缩短发酵周期。

5、对重组菌*K. pneumoniae* (pE*tac*-*CgGPD*-*tac*-*ScGPP2*)和野生克雷伯氏菌的碳流代

谢进行分析，阐释了重组菌株中的1, 3-丙二醇碳流代谢。3-磷酸甘油脱氢酶基因

（*CgGPD*）和3-磷酸甘油酯酶基因（*ScGPP2*）的加入，使得甘油合成途径成功在克雷伯氏菌中构建并启动。该途径利用葡萄糖将磷酸二羟丙酮转化为克雷伯氏菌可以利用的底物甘油，进而通过1, 3-丙二醇合成途径，一步法以葡萄糖转化得到1,3-丙二醇。*CgGPD*基因和*ScGPP2*基因在克雷伯氏菌中搭建了一座桥梁，完成了葡萄糖到甘油的转化，从而为1, 3-丙二醇的合成提供了一种可能。

参考文献

[1] 陈献忠, 王正祥, 诸葛健. 酵母细胞甘油代谢与生理功能研究进展[M]. 中国生物工程杂志, 2010, 30 (05): 140-148

[2] 诸葛健, 方慧英. 微生物好氧发酵法生产甘油[J]. 精细与化工专用品, 2001, 20

[3] Xie T, Fang H, Zhuge B, and Zhuge J. Promotional mechanism of high glycerol productivity in the aerobic batch fermentation of *Candida glycerinogenes* after feeding several amino acids [J]. Appllied Biochemistry and Microbiology, 2009, 45: 303-308

[4] 王正祥, 诸葛健, 方慧英. 耐高渗压高产甘油的一个假丝酵母新种—产甘油假丝酵母[J]. 微生物学报, 1999, 39(1): 68-74

[5] 陈献忠, 方慧英, 沈微, 等. 产甘油假丝酵母甘油合成关键酶编码基因的克隆[J]. 遗传, 2008, 30(4): 508-514

[6] 王正祥, 方慧英, 诸葛健. 耐高渗压是产甘油假丝酵母甘油高产的基础[J]. 微生物学报, 1999, 26(1): 24-26

[7] 陈献忠, 饶志明, 诸葛斌, 等. 产甘油假丝酵母与酿酒酵母 3-磷酸甘油脱氢酶基因的功能比较[J]. 微生物学报, 2009, 36(2): 198-205

[8] 陈献忠, 方慧英, 诸葛健, 等. 产甘油假丝酵母胞浆3-磷酸甘油脱氢酶基因（*CgGPD*）功能分析[J]. 微生物学报, 2008, 48(12): 1602-1608

[9] 陈君, 王正祥, 诸葛健. 产甘油假丝酵母胞浆 3 磷酸甘油脱氢酶在甘油形成中的作用[J]. 无锡轻工大学学报: 食品与生物技术, 1999, 3: 1-6

[10] 张君胜, 饶志明, 诸葛健, 等. 根癌农杆菌介导工业化产甘油假丝酵母的遗传转化[J]. 食品与生物技术学报, 2006, 25(3): 37-40

[11] 王晨莹, 诸葛斌, 方慧英, 等. 产甘油假丝酵母 *HOG1* MAPK 同源基因 *CgHOG1* 的克隆及特征分析[J]. 微生物学报, 2013, 53(10): 1103-1110

[12] Xiaona G, Zhuge B, Huiying F, *et al*. The Construction of a New Integrative Vector with a New Selective Marker of Copper Resistance for Glycerol Producer *Candida glycerinogenes*[J]. Current microbiology, 2012, 64, 354-367

[13] 王 正祥, 诸葛 健, 曹钰. 产甘油 假丝酵 母甘 油代谢关 键酶的研究 [J]. 微生物 学报, 2000, 40(2): 180-187

[14] 万里, 田朝光. 酿酒酵母HOG途径中*Rck2*结构与功能的研究进展[J]. 生命科学, 2013, 25(3): 280-284

[15] 赵有玺, 饶志明, 沈微, 等. 产甘油假丝酵母产甘油关键酶基因在酿酒酵母中的表达[J]. 中国生物工程杂志, 2006, 26(1): 38-41

[16] 赵有玺, 饶志明, 诸葛健, 等. 产甘油假丝酵母产甘油关键酶基因的克隆, 测序及植物表达载体的构建[J]. 江西农业大学学报, 2005, 27(4): 491-495

[17] 王震, 饶志明, 诸葛斌, 等. 产甘油假丝酵母甘油合成关键酶基因 *CgGPD1* 多拷贝表达载体的构建及其在大肠杆菌中的表达[J]. 食品与生物技术学报, 2008, 27(5): 50-57

[18] 谢涛, 方慧英, 诸葛斌, 等. 产甘油假丝酵母稳定期酸胁迫耐受性研究[J]. 食品与发酵工业, 2009, 35(6): 28-31

[19] 谢涛, 方慧英, 饶志明, 等. 产甘油假丝酵母细胞回用对甘油生产的影响[J]. 化工学报, 2007, 58(1): 195-199

[20] 陈庆玲, 李星云. 1, 3-丙二醇研发状况及工业化展望[J]. 化工中间体, 2009, 7: 19-23

[21] 杨佳庆, 黄象安, 顾利霞. 1, 3-丙二醇合成新进展[J]. 合成纤维工业, 1999, 22(1): 26-28

[22] Jang Y S, Kim B, Shin J H, et al. Bio-based production of C2-C6 platform chemicals[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2012, 109(10): 2437-2459

[23] Kurian J V. A new polymer platform for the future—Sorona®from corn derived 1, 3-propanediol[J]. Journal of Polymers and the Environment, 2005, 13(2): 159-167

[24] Zeng A P, Biebl H. Bulk chemicals from biotechnology: the case of 1, 3-propanediol production and the new trends [J]. Advance Biochemistry and Biotechnology, 2002, 74: 239-259

[25] Biebl H, Menzel K, Zeng A P, et al. Microbial production of 1, 3-propanediol[J]. Appllied Microbiology and Biotechnology, 1999, 52: 289-297

[26] Chotani G, Dodge T, Hsu A, et al. The commol / Lercial production of chemicals using pathway engineering [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2000, 1531: 434-455

[27] 刘银乾, 段启伟. 1, 3-丙二醇的制备方法[J]. 合成纤维工业, 2002, 25(2): 42-45

[28] Liu H, Ou X, Zhou S, et al. Microbial 1, 3-propanediol, its copolymerization with terephthalate, and application[J]. [Microbiology Monographs,](http://www.springerlink.com/content/1862-5576/) 2010, 14: 405-425

[29] Saxena R K, Anand P, Saran S, et al. Microbial production of 1, 3-propanediol: recent developments and emerging opportunities[J]. [Biotechnology Advances,](http://www.sciencedirect.com/science/journal/07349750) 2009, 27(6): 895-913

[30] Deckwer W D. Microbial conversion of glycerol to 1, 3-propanediol[J]. FEMS Microbiology Reviews, 1995, 16: 143-149

[31] Gottschalk G, Averhoff B. Process for the microbiological preparation of 1, 3-propanediol from

Glycerol[P]. European patent, 0373230.1988

[32] 崔小明. 国内外1, 3-丙二醇生产技术研究进展[J]. 精细化工原料及中间体, 2006, 3: 33-37

[33] 孙晓东, 吕伟峰. 1, 3-丙二醇的生产与应用[J]. 化学工程师, 2004, 3: 21-22

[34] Haynie, etc. Process of making 1, 3-propanediol from carbonhydrates using mixed microbial culture[J].

1997, US Pantent 5599689

[35] Biebl H and Marten S, Fermentation of glycerol to 1, 3-propanediol: use of cosubstrates [J]. Appllied Microbiology and Biotechnology, 1995, 44: 15-19

[36] Balthuis B A. Method for the production of glycerol by recombinant organisms [P]. World patent, 9821340.1998

[37] Huang H, Gong C S, Tsao G T. Production of 1, 3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae* [J]. Appl-lied Biochemistry and Biotechnology, 2002, 98: 687-698

[38] Boenigk R, Bowien S, Gottschalk G. Fermentation of glycerol to 1, 3-propanediol in continuous cultures of *Citrobacter freundii* [J]. Appllied Microbiology and Biotechnology, 1993, 38: 453-457

[39] Cameron D C, Altaras N E, Hoffman M L, et al. Metabolic engineering of propanediol pathways [J]. Biotechnology Progress, 1998, 14: 116-125

[40] Nakamura CE, Whited G M. Metabolic engineering for the microbial production of 1, 3-propanediol[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2003, 14(5): 454-459

[41] 唐广明, 徐佳杰, 徐卫涛, 等. 高产1, 3-丙二醇菌株的诱变与筛选[J]. 化学与生物工程, 2010, 27(003): 46-50

[42] 聂玲燕, 方慧英, 诸葛斌, 等. 克雷伯氏菌产1, 3-丙二醇菌株选育及甘油脱水酶基因转录分析[J]. 应用于环境生物学报, 2013, 19(1): 25-29

[43] Xinkun G, Huiying F, Bin Zhuge, et al. *BudC* knockout in *Klebsiella pneumonia* for bioconversion from glycerol to 1, 3-propanediol[J]. Biotechnology and Biotechnology and Appllied Biochemistry, 2013, 60(6): 557-563

[44] Zheng P, Wereath K, Sun J B, et al. Overexpression of genes of the *dha* regulon and its effects on cell growth, glycerol fermentation to 1, 3-propanediol and plasmid stability in *Klebsiella pneumoniae*[J]. Process Biochemistry, 2006, 41(10): 2160-2169

[45] Hao J, Wang W, Tian J S, et al. Decrease of 3-hydroxypropionaldehyde accumulation in 1, 3-propanediol production by over-expressing *dhaT* gene in *Klebsiella pneumoniae* TUAC01[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2008, 35(7): 735-741

[46] Zhuge B, Zhang C, Fang H, et al. Expression of 1, 3-propanediol oxidoreductase and its isoenzyme in *Klebsiella pneumoniae* for bioconversion of glycerol into 1, 3-propanediol[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2010, 87(6): 2177-2184

[47] Zhao L, Zheng Y, Ma X Y, et al. Effects of over-expression of glycerol dehydrogenase and1, 3-propanediol oxidoreductase on bioconversion of glycerol into 1, 3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae* under micro-aerobic conditons[J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2009, 32(3): 313-320

[48] Fang, H., C. Zhang, et al. Construction of novel recombinant strains capable of producing 1, 3-propanediol[J]. Chinese Journal of Appllied Environmental Biology, 2009, 15(5): 708-712

[49] Oh, B. -R., et al. Efficient production of 1, 3-propanediol from glycerol upon constitutive expression of the 1, 3-propanediol oxidoreductase gene in engineered *Klebsiella pneumoniae* with elimination of by-product formation[J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2013, 36(6): 757-763

[50] Seo, J. W., et al. Identification and utilization of a 1, 3-propanediol oxidoreductase isoenzyme for production of 1, 3-propanediol from glycerol in *Klebsiella pneumoniae*. Appllied Microbiology and Biotechnology, 2010, 85(3): 659-66

[51] Zhu, J. -G., et al. Enhanced 1, 3-propanediol production in recombinant *Klebsiella pneumoniae* carryingthe gene *yqhD* encoding 1, 3-propanediol oxidoreductase isoenzyme[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2009, 25(7): 1217-1223

[52] Tang X M, Tan Y S, Zhu H, et al. Microbial conversion of glycerol to 1, 3-propanediol by an engineered strain of *Escherichia coli*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(6): 1628-1634

[53] Liang, Q. et al. Construction of stress-induced metabolic pathway from glucose to 1, 3-propanediol in*Escherichia coli*[J]. Appllied Microbiology and Biotechnology, 2011, 89(1): 57-62

[54] Zheng, Y. et al. Production of glycerol from glucose by coexpressing glycerol-3-phosphate dehydrogenase and glycerol-3-phosphatase in *Klebsiella pneumoniae*[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2008, 105(5): 508-512

[55] Kumar, V., et al. Co-production of 3-hydroxypropionic acid and 1, 3-propanediol from glycerol using resting cells of recombinant *Klebsiella pneumoniae* J2B strain overexpressing aldehyde dehydrogenase[J]. Appllied Microbiology and Biotechnology, 2012, 96(2): 373-383

[56] Ashok, S., et al. Development of recombinant *Klebsiella pneumoniae dhaT* strain for the co-production

Of 3-hydroxypropionic acid and 1,3-propanediol from glycerol[J]. Appllied Microbiology and Biotechnology, 2011,90(4): 1253-1265

[57] Hartlep, M., et al. Study of two-stage processes for the microbial production of 1, 3-propanediol from glucose[J]. Appllied Microbiology and Biotechnology, 2002, 60(1-2): 60-66

[58] Nakamura, C. E., et al. Method for the production of 1, 3-propanediol by recombinant microorganisms[J]. Google Patents, 2000

[59] Ma, Z., et al. Construction of recombinant *Saccharomyces cerevisiae* producing 1, 3-propanediol by one step method[J]. Acta microbiologica Sinica, 2007, 47(4): 598-603

[60] Nakamura, C. E. and G. M., Whited, Metabolic engineering for the microbial production of 1, 3-propanediol[J]. Current opinion in biotechnology, 2003, 14(5): 454-459

[61] Saxena, R. K., et al. Microbial production of 1, 3-propanediol: Recent developments and emerging opportunities[J]. Biotechnology Advance, 2009, 27(6): 895-913

[62] Zhuge, J., et al. Glycerol production by a novel osmotolerant yeast *Candida glycerinogenes*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2001, 55(6): 686-692

[63] Zhiming, R., et al. Transformation of industrialized strain *Candida glycerinogenes* with resistant gene zeocin via *Agrobacterium* tumefaciens[J]. Current Microbiology, 2008, 57(1): 12-17

[64] Zhang, X., et al. Construction of a novel recombinant *Escherichia coli* strain capable of producing 1, 3–propanediol and optimization of fermentation parameters by statistical design[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2006, 22(9): 945-952

[65] Zhang, X., et al. Optimization of 1, 3-propanediol production by novel recombinant *Escherichia coli* using response surface methodology[J]*.* Journal of Chemical Technology & Biotechnology, 2006, 81(6): 1075-1078

[66] Zhuge, B., et al. Expression of 1, 3-propanediol oxidoreductase and its isoenzyme in *Klebsiella pneumoniae* for bioconversion of glycerol into 1, 3-propanediol[J]*.* Appllied Microbiology and Biotechnology, 2010, 87(6): 2177-2184

[67] Albertyn, J., A. van Tonder, et al. Purification and characterization of glycerol-3-phosphate dehydrogenase of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. FEBS Letters, 1992, 308(2): 130-132

[68] Norbeck, J., A. -K. Påhlman, et al. Purification and Characterization of Two Isoenzymes of DL-Glycerol-3-phosphatase from *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Journal of Biology and Chemistry, 1996, 271(23): 13875-13881

[69] Marion M. Bradford. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72(1-2): 248-254

[70] 萨姆布鲁克J, 拉塞尔DW. 分子克隆实验指南[M]. 第3版. 北京: 科学出版社, 2002

[71] Khan, N. H., T. S. Kang, et al. Isolation and characterization of novel 1, 3-propanediol-producing *Lactobacillus panis* PM1 from bioethanol thin stillage[J]. Appllied Microbiology and Biotechnology, 2013, 97(1): 417-428

[72] Zhao, Y. -N., G. Chen, and S. -J. Yao, Microbial production of 1, 3-propanediol from glycerol by encapsulated *Klebsiella pneumoniae*[J]. Biochemical Engineering Journal, 2006, 32(2): 93-99

[73] Huang H, Gong C S, Tsao G T. Production of 1, 3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae* [J]. Appllied Biochemistry and Biotechnology, 2002, 98: 687-698

[74] Mendes, F. S., et al. 1, 3-Propanediol production in a two-step process fermentation from renewable feedstock[J]. Appllied Microbiology and Biotechnology, 2011, 92(3): 519-527

[75] Zhang, Y., Y. Li, et al. Inactivation of aldehyde dehydrogenase: a key factor for engineering 1, 3-propanediol production by *Klebsiella pneumoniae*[J]*.* Metabolic Engineering, 2006, 8(6): 578-586

[76] Prasertsan, P., S. Sattayasamitsathit, and P. Methacanon. Enhance 1, 3-propanediol production from crude glycerol in batch and fed-batch fermentation with two-phase pH-controlled strategy[J]. Electronic Journal of Biotechnology, 2011, 14(6)

[77] Sun, L. -H., et al. Dynamic behavior of glycerol–glucose co-fermentation for 1, 3-propanediol production by *Klebsiella pneumoniae* DSM 2026 under micro-aerobic conditions[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2010, 26(8): 1401-1407

# 攻读硕士学位期间学术成果

学术论文：

1.**生产食品级甘油的安全酵母*Candida glycerinogenesis*甘油合成关键基因的研究**[J].食品与机械,2014, 30 (1):11-14.

2.**虎杖内生放线菌的分离鉴定及抗菌活性**[J].福建农林大学学报（自然科学版）,2012, 41（6）：

616-621.

3.**药用植物虎杖内生放线菌的分离及抑菌活性的研究**[J].陕西理工学院学报（自然科学版）,2012, 28(6)：61-67.

4.**三尖杉属植物内生真菌及此生代谢产物活性研究进展**[J]. 江苏农业科学,2013,41

（8）:11-14.

5. **Construction of glycerol synthesis pathway in *Klebsiella pneumoniae* for bioconversion of glucose into 1,3-Propanediol**[J]. Bioresource Technology. (under review)

科研项目：

1. 本课题受到国家自然科学基金项目―*Candida glycerinogenes*过量合成甘油过程中渗透压对EMP/HMP途径代谢偏转的调控研究‖（编号: 31270080）的支持；

2. 本课题受到国家高技术研究发展计划（863计划）重点项目―生物制造反应过程技术与装备‖（编号: 2012AA021201）的支持；

3. 本课题受到国家高技术研究发展计划（863计划）重点项目―基于生物质可再生资源的化工多元醇生物炼制技术‖（编号: 2011AA02A207）的支持；

4. 参与陕西省―13115‖重大科技专项―陕西省食药用菌工程技术研究中心‖建设（编号: ZDGC-04）；

5. 参与陕西省教育厅重点实验室科研专项―秦巴ft区虎杖内生真菌代谢产白藜芦醇苷‖

（编号：2010JS045）。

致 **谢**

三年时光，匆匆而过，我的硕士研究生生活即将结束，回首过去的三年，不禁感慨万千。求学路上，得到了很多人的帮助、支持和鼓励。

本课题是在两位导师陈文强教授和江南大学诸葛斌教授指导下完成的。陈文强教授科研上严谨认真，生活上为人亲和。硕士期间，陈教授在课题上给了我很多的建议，生活上给予了我很多的关心和照顾。在这里衷心的祝愿陈文强教授身体康健，工作顺利！

特别感谢江南大学诸葛斌教授，对我课题上的精心指导和关键性的建议。诸葛斌教授，博学多才，勇于创新。科研工作中，诸葛斌教授要求严格，一丝不苟。生活中，亦友更亦父，两年来的帮助，让我的硕士生活完满结束。在此，衷心祝愿诸葛斌教授身体健康，工作愉快，桃李满天下。

诸葛健教授，学之大者。让我学到了一种对科学认真执着，脚踏实地的务实态度和精神；方慧英老师，为人随和，豁达开朗，尽心尽力为学生考虑；宗红老师、宋健老师在我的课题细节和论文撰写上给予我很多建议；张晓梅老师在我困难时帮我排忧解难。感谢他们无私的帮助，祝愿他们工作顺利，生活愉快！

感谢张成，嵇豪两位博士对师妹的帮助和照顾。感谢上一届的霍孝雨、郭伟、郝大利、王晨莹、马俊阳等师兄师姐们的热情指导，谢谢你们！感谢同一届的星星、丹子、孙文龙、世源、冠一和吴金鑫，与你们一起分享了硕士这段宝贵的人生经历，谢谢有你们相伴！感谢苏江伟，季广建，王旭昌，路丽君，付晓萌，王帅楠，朱佳莉这些可爱的师弟师妹，有你们的研究室欢乐无限，也希望你们科研顺利！

感谢陕西理工学院的彭浩老师，我们班的各位同学以及同门同学刘兆迪，曲佳，郭庆兰的帮助。再次感谢所有帮助过我的亲朋好友及老师、同学，祝愿他们身体健康，工作顺利！

感谢家人对我求学路上物质和精神支持，使我取得今天的成绩。双亲的不易，我铭记在心。祝愿父亲母亲健康长寿，幸福安康！在这里，也感谢我的男朋友，是他的支持，鼓励和包容，让我坚持到现在！

最后，祝愿江南大学工业微生物与生物工程反应中心的发展越来越好！祝愿陕西理工学院的明天更美好！

2014年5月于陕西汉中