



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104130967 A

(43) 申请公布日 2014. 11. 05

(21) 申请号 201410393768. X

(22) 申请日 2014. 08. 11

(71) 申请人 南京林业大学

地址 210037 江苏省南京市龙蟠路新庄 9 号

(72) 发明人 郑兆娟 赵明月 周影 徐艳冰

姜婷 欧阳嘉

(74) 专利代理机构 南京苏高专利商标事务所

(普通合伙) 32204

代理人 肖明芳

(51) Int. Cl.

C12N 1/21 (2006. 01)

C12N 15/70 (2006. 01)

C12P 7/40 (2006. 01)

C12R 1/19 (2006. 01)

权利要求书1页 说明书5页 附图2页

(54) 发明名称

一株共表达 L- 乳酸脱氢酶和甲酸脱氢酶的大肠杆菌及其构建方法与应用

(57) 摘要

本发明公开了一株共表达 L- 乳酸脱氢酶和甲酸脱氢酶的大肠杆菌, 其特征在于, 它是导入了来源于凝结芽孢杆菌的 L- 乳酸脱氢酶基因 *ldhL* 和来源于博伊丁假丝酵母的甲酸脱氢酶基因 *fdh* 的大肠杆菌; 其中, 所述的 L- 乳酸脱氢酶基因 *ldhL*, 其核苷酸序列的 GenBank 登记号为 KF386111; 所述的甲酸脱氢酶基因 *fdh*, 其核苷酸序列的 GenBank 登记号为 AJ011046。本发明还公开了上述重组大肠杆菌的构建方法和应用。本发明方法具有操作简单, 成本低, 产物合成效率高, 光学纯度高的特点, 为生物合成 L- 苯乳酸提供了有效途径。

1. 一株共表达 L- 乳酸脱氢酶和甲酸脱氢酶的大肠杆菌,其特征在于,它是导入了来源于凝结芽孢杆菌的 L- 乳酸脱氢酶基因 ldhL 和来源于博伊丁假丝酵母的甲酸脱氢酶基因 fdh 的大肠杆菌;

其中,所述的 L- 乳酸脱氢酶基因 ldhL,其核苷酸序列的 GenBank 登记号为 KF386111; 所述的甲酸脱氢酶基因 fdh,其核苷酸序列的 GenBank 登记号为 AJ011046。

2. 权利要求 1 所述的共表达 L- 乳酸脱氢酶和甲酸脱氢酶的大肠杆菌的构建方法,其特征在于,将来源于凝结芽孢杆菌的 L- 乳酸脱氢酶基因 ldhL 和来源于博伊丁假丝酵母的甲酸脱氢酶基因 fdh 分别克隆到大肠杆菌表达载体 pETDuet-1 的多克隆位点 1 和多克隆位点 2 处,得到重组质粒 pETDuet-ldhL-fdh,将该质粒转化大肠杆菌 *Escherichia coli* BL21,利用氨苄青霉素平板筛选得到阳性转化子,即得到重组大肠杆菌 *E. coli* BL21 (pETDuet-ldhL-fdh)。

3. 权利要求 1 所述的共表达 L- 乳酸脱氢酶和甲酸脱氢酶的大肠杆菌在催化制备 L- 苯乳酸中的应用。

4. 根据权利要求 3 所述的应用,其特征在於,它包括如下步骤:

(1) 细胞的准备:将重组大肠杆菌按体积比为 0.1 ~ 3% 的量转接到发酵培养基中,当细胞 OD₆₀₀ 达到 0.4 ~ 0.8 后,加入终浓度为 0.1 ~ 1mmol/L 的 IPTG,在 16 ~ 30°C 继续培养 1 ~ 12h,培养结束后,收集重组大肠杆菌;

(2) 催化方法:将步骤 (1) 中得到的重组大肠杆菌加入含有苯丙酮酸和甲酸钠的反应体系中,在 20 ~ 70°C 条件下反应 5min ~ 10h 催化制备 L- 苯乳酸。

5. 根据权利要求 4 所述的应用,其特征在於,步骤 (1) 中,所述的发酵培养基为蛋白胨 10g/L,酵母粉 5g/L,氯化钠 10g/L,氨苄青霉素 100mg/L。

6. 根据权利要求 4 所述的应用,其特征在於,步骤 (2) 中,重组大肠杆菌的干菌添加量为 1 ~ 36g/L。

7. 根据权利要求 4 所述的应用,其特征在於,步骤 (2) 中,所述的反应体系,其苯丙酮酸的初始浓度为 1 ~ 100mmol/L。

8. 根据权利要求 4 所述的应用,其特征在於,步骤 (2) 中,所述的反应体系,其甲酸钠的初始浓度为 1 ~ 200mmol/L。

9. 根据权利要求 4 所述的应用,其特征在於,步骤 (2) 中,所述的反应体系,其初始 pH 值为 5 ~ 7.5。

一株共表达 L- 乳酸脱氢酶和甲酸脱氢酶的大肠杆菌及其构建方法与应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物工程技术领域,具体涉及一株共表达 L- 乳酸脱氢酶和甲酸脱氢酶的大肠杆菌及其构建方法与应用。

背景技术

[0002] 苯乳酸 (phenyllactic acid, PLA), 即 2- 羟基 -3- 苯基丙酸, 又名 3- 苯基乳酸或 β - 苯乳酸, 是近年来发现的一种新型天然防腐剂, 它具有较广的抑菌谱, 不仅能够抑制革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌, 对引起食物腐败的多种霉菌等真菌也有明显的抑制作用, 且安全性能高, 在食品工业中具有较好的应用前景。此外, 苯乳酸还是多种药物的前体, 苯乳酸的衍生物丹参素 (3, 4- 二羟基苯基乳酸) 具有抑制血小板凝集和扩张冠状动脉的作用, 因而具有重要的医药应用价值。苯乳酸 α 位的碳原子是手性碳原子, 故有两种对映体, L- 苯乳酸和 D- 苯乳酸。L- 苯乳酸和 D- 苯乳酸具有不同的光学性质, 也具有不同的生物活性。

[0003] 苯乳酸合成方法有化学合成法和生物转化法两种。由于化学合成法具有技术复杂、污染环境等缺点, 目前更多的是采用生物转化法, 主要包括乳酸菌发酵和酶催化。乳酸菌发酵合成苯乳酸过程中, 不仅同时有 L- 苯乳酸和 D- 苯乳酸生成, 还往往伴随乳酸等有机酸的生成, 难以获得高光学纯度的 L- 苯乳酸。体外酶催化反应过程中酶易受外界环境影响, 底物耐受性差, 活力损失快, 同时需要外源添加价格昂贵的辅酶 NADH, 也不适宜工业应用。目前尚未有简单高效的 L- 苯乳酸合成技术相关报道。

发明内容

[0004] 本发明需要解决的技术问题是提供一株共表达 L- 乳酸脱氢酶和甲酸脱氢酶的大肠杆菌。

[0005] 本发明还要解决的技术问题是提供上述大肠杆菌的构建方法。

[0006] 本发明最后要解决的技术问题是提供上述大肠杆菌在催化合成 L- 苯乳酸中的应用。

[0007] 为解决以上技术问题, 本发明采用的技术方案如下:

[0008] 一株共表达 L- 乳酸脱氢酶和甲酸脱氢酶的大肠杆菌, 其特征在于, 它是导入了来源于凝结芽孢杆菌的 L- 乳酸脱氢酶基因 *ldhL* 和来源于博伊丁假丝酵母的甲酸脱氢酶基因 *fdh* 的大肠杆菌;

[0009] 其中, 所述的 L- 乳酸脱氢酶基因 *ldhL*, 其核苷酸序列的 GenBank 登记号为 KF386111; 所述的甲酸脱氢酶基因 *fdh*, 其核苷酸序列的 GenBank 登记号为 AJ011046。

[0010] 以上所述的共表达 L- 乳酸脱氢酶和甲酸脱氢酶的大肠杆菌的构建方法, 其特征在于, 将来源于凝结芽孢杆菌的 L- 乳酸脱氢酶基因 *ldhL* 和来源于博伊丁假丝酵母的甲酸脱氢酶基因 *fdh* 分别克隆到大肠杆菌表达载体 pETDuet-1 的多克隆位点 1 和多克隆位点 2 处, 得到重组质粒 pETDuet-*ldhL*-*fdh*, 将该质粒转化大肠杆菌 *Escherichia*

coli BL21, 利用氨苄青霉素平板筛选得到阳性转化子, 即得到重组大肠杆菌 E. coli BL21 (pETDuet-ldhL-fdh)。

[0011] 以上所述的共表达 L- 乳酸脱氢酶和甲酸脱氢酶的大肠杆菌在催化制备 L- 苯乳酸中的应用。

[0012] 其中, 所述的应用包括如下步骤:

[0013] (1) 细胞的准备: 将重组大肠杆菌按体积比为 0.1 ~ 3% 的量转接到发酵培养基中, 当细胞 OD₆₀₀ 达到 0.4 ~ 0.8 后, 加入终浓度为 0.1 ~ 1mmol/L 的 IPTG, 在 16 ~ 30°C 继续培养 1 ~ 12h, 培养结束后, 收集重组大肠杆菌;

[0014] (2) 催化方法: 将步骤 (1) 中得到的重组大肠杆菌加入含有苯丙酮酸和甲酸钠的反应体系中, 催化制备 L- 苯乳酸。

[0015] 其中, 步骤 (1) 中, 所述的发酵培养基为蛋白胨 10g/L, 酵母粉 5g/L, 氯化钠 10g/L, 氨苄青霉素 100mg/L。

[0016] 其中, 步骤 (2) 中, 反应的温度为在 20 ~ 70°C, 优选为 35 ~ 55°C, 最优选 37°C。

[0017] 其中, 步骤 (2) 中, 反应的时间为 5min ~ 10h, 优选为 0.5 ~ 2h。

[0018] 其中, 重组大肠杆菌的干菌添加量为 1 ~ 36g/L, 优选为 10 ~ 30g/L。

[0019] 其中, 步骤 (2) 中, 所述的反应体系, 其苯丙酮酸的初始浓度为 1 ~ 100mmol/L, 优选为 50 ~ 100mmol/L。

[0020] 其中, 步骤 (2) 中, 所述的反应体系, 其甲酸钠的初始浓度为 1 ~ 200mmol/L, 优选为 100 ~ 200mmol/L。

[0021] 其中, 步骤 (2) 中, 所述的反应体系, 其初始 pH 值为 3 ~ 9, 优选为 5 ~ 7。

[0022] 有益效果:

[0023] 本发明具有如下显著的特征和效果:

[0024] (1) 所得 L- 苯乳酸光学纯度高, 产率高, 合成效率高, 同时全细胞催化法反应体系成分简单, 有较大的工业化生产、应用潜力和经济价值。

[0025] (2) 不需要添加辅酶, 而且增加了酶的稳定性, 生物转化过程操作简单, 成本低, 产物光学纯度高, 副产物少, 后续分离简单。

附图说明

[0026] 图 1pETDuet-ldhL-fdh 质粒的图谱。

[0027] 图 2L- 乳酸脱氢酶 (L-LDH) 和甲酸脱氢酶 (FDH) 共表达后的 SDS-PAGE 图谱。

[0028] 图 3 利用共表达 L- 乳酸脱氢酶和甲酸脱氢酶的大肠杆菌细胞催化制备 L- 苯乳酸所得产物光学纯度检测液相色谱图。A 为 D- 苯乳酸标准品, B 为 L- 苯乳酸标准品, C 为细胞转化液样品。

具体实施方式

[0029] 根据下述实施例, 可以更好地理解本发明。然而, 本领域的技术人员容易理解, 实施例所描述的内容仅用于说明本发明, 而不应当也不会限制权利要求书中所详细描述的本发明。

[0030] 以下实施例中 L- 苯乳酸产量的检测方法如下: 将反应混合物离心除去菌体, 稀

释上清液并用 0.22 微米滤膜过滤,采用 Agilent 1200 液相色谱仪,配备 ZORBAX 300 SB C₁₈(4.6×250mm) 分离柱,流动相为 85% 的 1mmol/L 硫酸和 15% 的乙腈,流速为 0.7mL/min,进样量 5 μL,紫外检测器,检测波长为 210nm,柱温箱温度为 30℃。

[0031] 以下实施例中 L- 苯乳酸纯度的检测方法如下:将反应混合物离心除去菌体,稀释上清液并用 0.22 微米滤膜过滤,采用 Agilent 1200 液相色谱仪,配备 MCI GEL CRS10W(4.6×50mm) 手性分离柱,流动相为 85% 的 2mmol/L 硫酸铜和 15% 的乙腈,流速为 0.7mL/min,进样量 10 μL,紫外检测器,检测波长为 254nm,柱温箱温度为 25℃。

[0032] 实施例 1:大肠杆菌基因工程菌株 E. coli BL21(pETDuet-ldhL-fdh) 的构建。

[0033] (1) 甲酸脱氢酶基因 fdh 基因的获得与重组质粒 pETDuet-fdh 的构建。

[0034] 大肠杆菌表达质粒 pETDuet-1(Novagen) 有两个多克隆位点,可以同时表达两个目的基因。首先通过化学合成法合成编码本发明中博伊丁假丝酵母的甲酸脱氢酶基因 fdh(GenBank 登记号为 AJ011046),并在序列两端引入能插入 pETDuet-1 质粒多克隆位点 2 处的 Nde I 和 Xho I 酶切位点,将其双酶切后连接到 pETDuet-1 质粒中,转化到大肠杆菌感受态细胞,经过氨苄青霉素抗性筛选,提取阳性克隆质粒并酶切图谱分析,验证得到载有 fdh 基因的重组质粒 pETDuet-fdh。

[0035] (2) L- 乳酸脱氢酶 ldhL 基因的获得与重组质粒 pEasy-Blunt-ldhL 的构建。

[0036] 设计引物,引入能插入 pETDuet-1 质粒多克隆位点 1 处的的 BamH I 和 Sac I 酶切位点,序列如下:

[0037] ldhL. f :5' -GGATCCGATGAAAAAGGTCAATCGTATTGCAG-3'

[0038] ldhL. r :5' -GAGCTCTTACAATACAGGTGCCATCGTTTC-3'

[0039] 以凝结芽孢杆菌基因组 DNA 为模板,采用上述引物进行 PCR 扩增。PCR 扩增总体体系为 100 μL,含超纯水 64 μL,5×FastPfu PCR Buffer 20 μL, dNTPs 0.25 mmol/L,引物各 0.2 ~ 0.4 μmol/L,模板 50 ~ 200ng, TransGen 公司的 FastPfu DNA Polymerase 5 U。PCR 扩增条件为:95℃预变性 2 分钟,按如下参数 30 个循环(95℃变性 20 秒,60℃退火 20 秒,72℃延伸 30 秒),循环结束后 72℃延伸 5 分钟。PCR 反应产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳分析结果。将 PCR 反应获得的产物回收后连接到 TransGen 公司的 pEasy-Blunt 克隆载体,转化大肠杆菌 Mach1-T1 感受态细胞,经过氨苄青霉素抗性筛选,提取阳性克隆质粒并酶切图谱分析,验证得到载有 ldhL 基因的重组质粒 pEasy-Blunt-ldhL。

[0040] (3) pETDuet-ldhL-fdh 质粒的构建。

[0041] 将重组质粒 pETDuet-fdh 和 pEasy-Blunt-ldhL 分别用 BamH I 和 Sac I 双酶切处理,酶切产物经琼脂糖凝胶电泳分离纯化后采用 NEB 公司的 T4 DNA 连接酶 22℃连接 1 小时后转化大肠杆菌 Mach1-T1 感受态细胞,经过氨苄青霉素抗性筛选,提取阳性克隆质粒并酶切图谱分析,验证得到载有 ldhL 基因和 fdh 基因的重组质粒 pETDuet-ldhL-fdh,随后将重组质粒 pETDuet-ldhL-fdh 转化导入大肠杆菌 BL21(DE3),经氨苄青霉素筛选获得的阳性克隆菌株命名为 E. coli BL21(pETDuet-ldhL-fdh)。

[0042] 实施例 2:L- 乳酸脱氢酶和甲酸脱氢酶在 E. coli BL21(pETDuet-ldhL-fdh) 中的偶联表达。

[0043] 将实施例 1 筛选到的正确重组菌株 E. coli BL21(pETDuet-ldhL-fdh) 接种于 50mL 含 100 μg/mL 氨苄青霉素的 LB 液体培养基,37℃摇床培养 12 小时,转接于 1L 含 100 μg/mL

氨苄青霉素的 LB 液体培养基, 37℃ 摇床培养, 当培养液 OD_{600nm} 达到 0.4 ~ 0.8 后加入终浓度为 1mmol/L 的 IPTG 诱导表达, 25℃ 继续培养 5 小时。诱导培养结束后, 于 12,000 转 / 分钟离心 5 分钟, 获得细胞沉淀, 生理盐水洗涤两次后, 重悬于 100mL pH7.4、50mmol/L 的磷酸盐缓冲液中。在冰水混合物中利用超声波破碎细胞壁, 破碎时间为 30 分钟, 破壁后的溶液以 16,000 转 / 分钟离心 60 分钟, 分别取上清和沉淀, SDS-PAGE 检测蛋白表达情况 (图 2)。

[0044] 实施例 3 :E. coli BL21 (pETDuet-ldhL-fdh) 在不同 pH 条件下生产 L- 苯乳酸。

[0045] 在 10mL 反应体系中, 分别加入 50mmol/L 底物苯丙酮酸、100mmol/L 辅助底物甲酸钠, 干重为 7g/L 的重组大肠杆菌湿菌体, 混匀后在 37℃ 恒温摇床上振荡反应, 反应体系的 pH 分别为 5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5, 1 小时后将反应混合物离心除去菌体, 取上清液检测生成的 L- 苯乳酸产量和光学纯度, 结果显示 (表 1), 反应体系 pH 在 5.5 ~ 6.0 时, L- 苯乳酸产量最高, 为 40.1mmol/L, L- 苯乳酸光学纯度大于 99.9%。

[0046] 表 1 不同 pH 条件下 L- 苯乳酸产量

[0047]

pH	5.0	5.5	6.0	6.5	7.0	7.5
L- 苯乳酸产量 (mmol/L)	36.3	40.1	39.5	34.8	27.8	17.6

[0048] 实施例 4 :E. coli BL21 (pETDuet-ldhL-fdh) 在不同苯丙酮酸浓度条件下生产 L- 苯乳酸。

[0049] 在 10mL 反应体系中, 分别加入浓度为 50mmol/L、60mmol/L、70mmol/L、80mmol/L、90mmol/L 和 100mmol/L 的底物苯丙酮酸、相应分别加入浓度为 100mmol/L、120mmol/L、140mmol/L、160mmol/L、180mmol/L 和 200mmol/L 的辅助底物甲酸钠, 干重为 7g/L 重组大肠杆菌湿菌体, 混匀后在 37℃ 恒温摇床上振荡反应, 反应体系的 pH 为 6.0, 1 小时后将反应混合物离心除去菌体, 取上清液检测生成的 L- 苯乳酸产量和光学纯度, 结果显示 (表 2), 苯丙酮酸浓度低于 90mmol/L 时, L- 苯乳酸产量随苯丙酮酸浓度升高而升高, L- 苯乳酸最高产量为 56.7mmol/L, 光学纯度大于 99.9%。当苯丙酮酸浓度继续增加时, L- 苯乳酸产量出现下降。

[0050] 表 2 不同苯丙酮酸浓度条件下 L- 苯乳酸产量

[0051]

苯丙酮酸浓度 (mmol/L)	50	60	70	80	90	100
L- 苯乳酸产量 (mmol/L)	42.2	47.9	51.8	53.8	56.7	55.5

[0052] 续表 2

[0053]

L- 苯乳酸产量 (mmol/L)	42.2	47.9	51.8	53.8	56.7	55.5
-------------------	------	------	------	------	------	------

[0054] 实施例 5 :E. coli BL21 (pETDuet-ldhL-fdh) 在不同菌体浓度条件下生产 L- 苯乳酸。

[0055] 在 10mL 反应体系中, 分别加入 60mmol/L 底物苯丙酮酸、120mmol/L 辅助底物甲酸钠, 干重分别为 9g/L、18g/L、27g/L 和 36g/L 的重组大肠杆菌湿菌体, 混匀后在 37℃ 恒温摇床上振荡反应, 反应体系的 pH 为 6.0, 0.5 小时后将反应混合物离心除去菌体, 取上清液检测生成的 L- 苯乳酸产量和光学纯度, 结果显示 (表 3), 干重为 18g/L、27g/L 和 36g/L 的重

组大肠杆菌湿菌体生产的 L- 苯乳酸产量高于干重为 9g/L 的重组大肠杆菌湿菌体生产的 L- 苯乳酸产量,但三者差别不大,L- 苯乳酸最高产量为 53.1mmol/L,光学纯度大于 99.9%。

[0056] 表 3 不同菌体浓度条件下 L- 苯乳酸产量

[0057]

菌体干重 (g/L)	9	18	27	36
L- 苯乳酸产量 (mmol/L)	31.8	50.4	53.1	53.0

[0058] 实施例 6 :E. coli BL21(pETDuet-ldhL-fdh) 在优化后的条件下生产 L- 苯乳酸。

[0059] 在 10mL 反应体系中,分别加入 90mmol/L 底物苯丙酮酸、180mmol/L 辅助底物甲酸钠,干重为 18g/L 的重组大肠杆菌湿菌体,混匀后在 37℃恒温摇床上振荡反应,反应体系的 pH 为 6.0,分别在反应 0、6、12、18、24、30 和 40 分钟后取样检测生成的 L- 苯乳酸产量和光学纯度,结果显示,L- 苯乳酸产量随时间延长而升高,L- 苯乳酸最高产量为 80mmol/L,光学纯度大于 99.9% (图 3)。

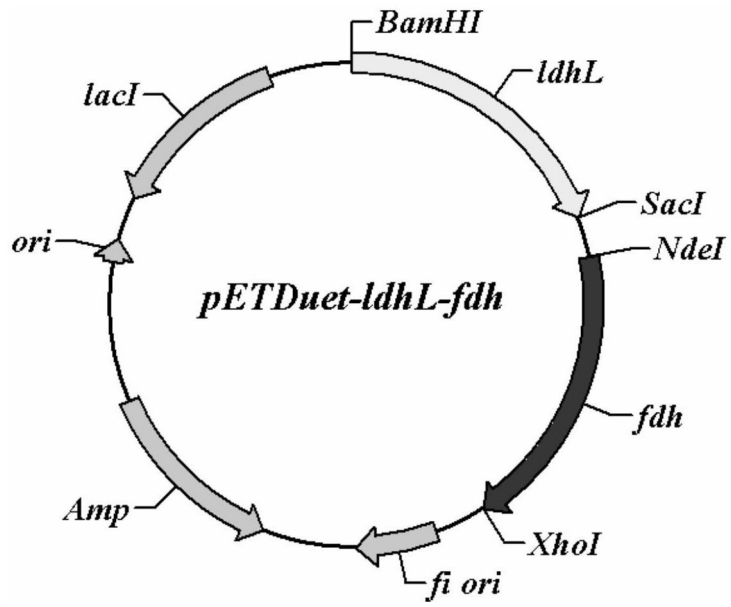


图 1

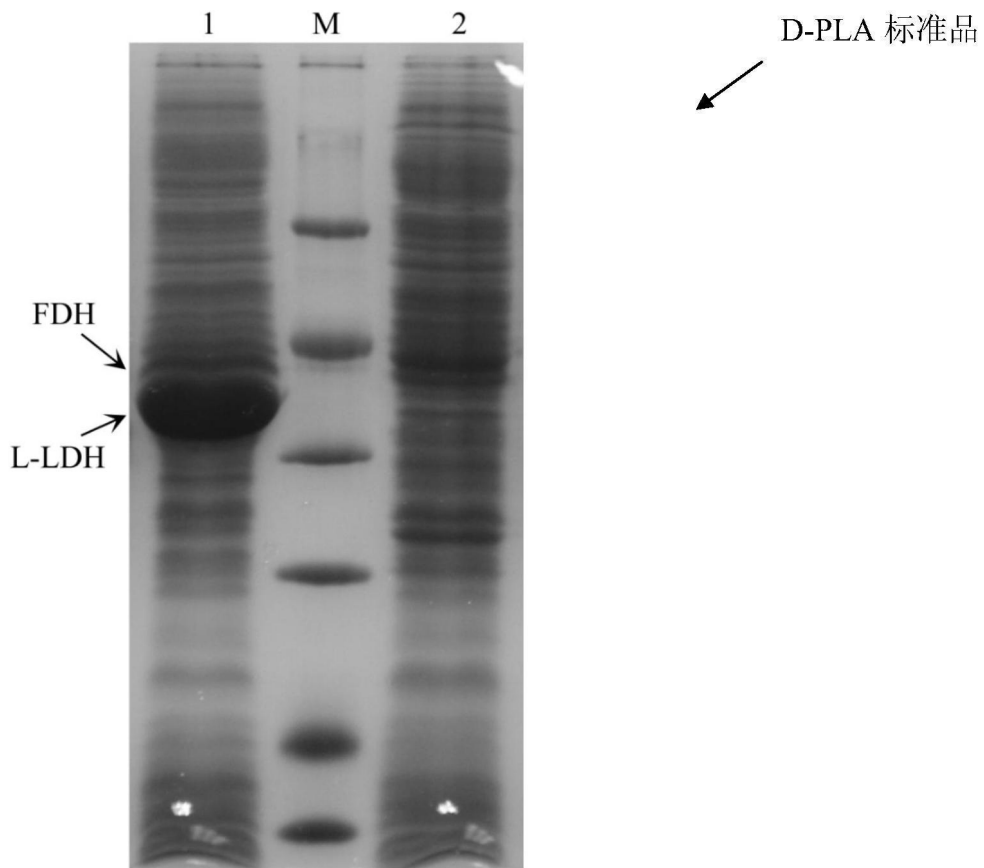
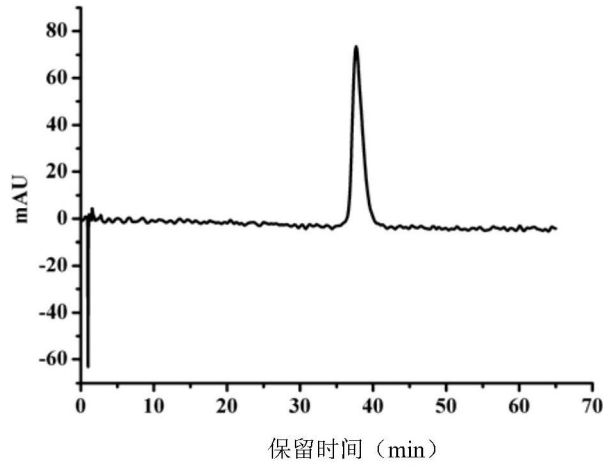
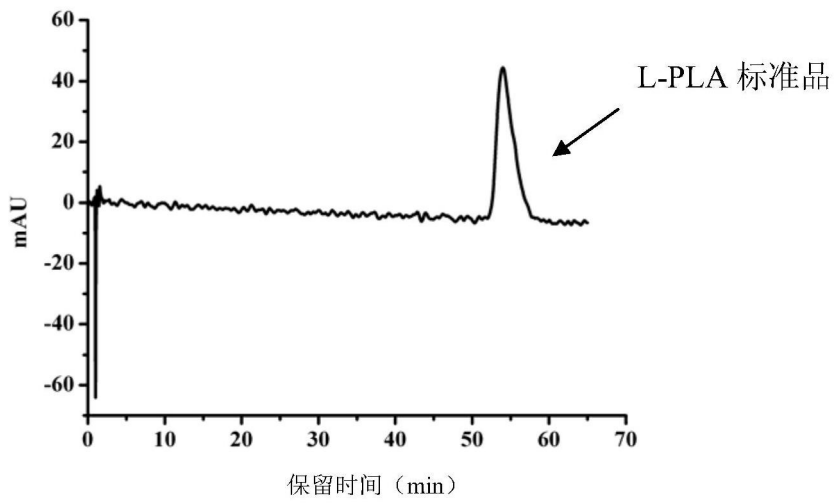


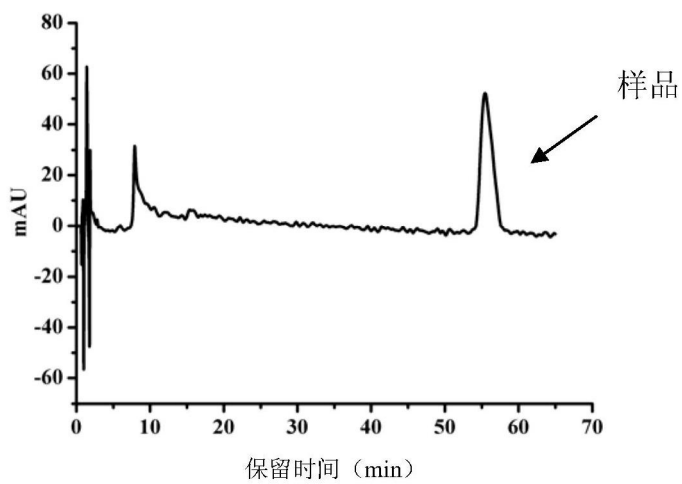
图 2



A



B



C

图 3