

# 乳糖诱导丙酮酸羧化酶基因在大肠杆菌中的表达及对丁二酸产量的影响

王丹<sup>1,2</sup>, 毛雨<sup>3</sup>, 马兰<sup>3</sup>, 李强<sup>1,2</sup>, 李望良<sup>1</sup>, 邢建民<sup>1</sup>, 苏志国<sup>1</sup>

1 中国科学院过程工程研究所 生化工程国家重点实验室, 北京 100190

2 中国科学院研究生院, 北京 100049

3 中国矿业大学北京化学与环境工程学院生物工程系, 北京 100083

**摘要:** 大肠杆菌 DC1515 是敲除葡萄糖磷酸转移酶(*ptsG*)、乳酸脱氢酶(*ldhA*)、丙酮酸甲酸裂解酶(*pflA*)基因的菌株, 具有发酵生产丁二酸的潜力。为进一步提高菌株 DC1515 的丁二酸生产能力, 将枯草芽孢杆菌丙酮酸羧化酶(*pyc*)基因转入其中。用乳糖代替 IPTG 诱导 *pyc* 表达, 确定了最佳乳糖加入时间、乳糖浓度及诱导温度。在此基础上, 考察了补加乳糖对丁二酸产量的影响。结果表明: 由于 *ptsG* 基因缺失, 当培养基中葡萄糖浓度达到 15 g/L 时, 乳糖诱导作用并不受葡萄糖抑制。优化诱导条件后, *pyc* 过表达菌株的丁二酸产量达 15.17 g/L, 为对照菌株的 1.78 倍。间歇补加乳糖 2 次至浓度为 1 g/L, 丁二酸产量可进一步增至 17.54 g/L。研究结果为以葡萄糖为底物生产丁二酸的过程中乳糖诱导外源基因在大肠杆菌中的表达奠定了基础。乳糖诱导降低了成本, 有利于实现丁二酸发酵生产的工业化。

**关键词:** 丙酮酸羧化酶, 大肠杆菌, 丁二酸, 乳糖诱导, 葡萄糖磷酸转移酶

## Expression of heterogenous pyruvate carboxylase in *Escherichia coli* with lactose as inducer and its effect on succinate production

Dan Wang<sup>1,2</sup>, Yu Mao<sup>3</sup>, Lan Ma<sup>3</sup>, Qiang Li<sup>1,2</sup>, Wangliang Li<sup>1</sup>, Jianmin Xing<sup>1</sup>, and Zhiguo Su<sup>1</sup>

1 National Key Laboratory of Biochemical Engineering, Institute of Process Engineering, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China

2 Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

3 Department of Bioengineering, School of Chemical and Environmental Engineering, China University of Mining and Technology (Beijing), Beijing 100083, China

**Abstract:** *Escherichia coli* strain DC1515, deficient in glucose phosphotransferase (*ptsG*), lactate dehydrogenase (*ldhA*) and pyruvate:formate lyase (*pflA*), is a promising candidate for the fermentative production of succinate. To further improve the succinate producing capability of DC1515, we constructed plasmid pTrchisA-*pyc* with heterogenous pyruvate carboxylase (*pyc*) from *Bacillus subtilis* 168 under the Trc promoter and introduced it into DC1515. We used lactose as a substitute of IPTG to induce *pyc*. We optimized the culture conditions such as the lactose addition time, the lactose concentration and the culture temperature after induction for succinate production. We also explored the effect of lactose supplement during the fermentation. The results showed

**Received:** April 30, 2009; **Accepted:** June 23, 2009

**Supported by:** Knowledge Innovation Program of Chinese Academy of Sciences (No. KSCX2-YW-G-021).

**Corresponding author:** Jianmin Xing. Tel/Fax: +86-10-62550913; E-mail: jmxing@home.ipe.ac.cn

中科院知识创新工程项目(No. KSCX2-YW-G-021)资助。

that *pyc* can be expressed under lactose induction in the fermentative medium with 15 g/L glucose due to the deficient of *ptsG* in DC1515. Under optimized conditions, the final succinate concentration reached to 15.17 g/L, which was 1.78-fold higher than that of control strain. If complementing lactose twice to the concentration of 1 g/L during the fermentation, the final succinate concentration could further reach to 17.54 g/L. This work might provide valuable information for gene expression in *E. coli* strains using lactose as inducer for succinate production in a glucose-medium. Due to the reduced cost, *E. coli* is becoming a more promising strain for succinate production through fermentation.

**Keywords:** pyruvate carboxylase (*pyc*), *Escherichia coli*, succinate, lactose induction, glucose phosphotransferase (*ptsG*)

丁二酸(Succinate)是一种重要的“C4 平台化合物”, 广泛应用于食品、医药、农业领域, 可作为合成 1, 4-丁二醇、四氢呋喃、N-甲基吡咯烷酮及可降解生物高分子材料聚丁二酸丁二醇酯(PBS)等的原料。微生物发酵法生产丁二酸可以摆脱常规化学合成法对石油的依赖, 且开辟了温室气体二氧化碳利用的新途径, 具有广阔的应用前景<sup>[1]</sup>。

野生型大肠杆菌厌氧发酵主要生成乳酸、甲酸、乙酸、乙醇, 只产少量的丁二酸。在代谢工程思想的指导下, 通过基因敲除及基因扩增, 大肠杆菌的丁二酸生产能力得到提高, 乳酸、甲酸等副产物减少<sup>[2]</sup>。大肠杆菌 DC1515 是敲除葡萄糖磷酸转移酶(*ptsG*)、乳酸脱氢酶(*ldhA*)、丙酮酸甲酸裂解酶(*pflA*)的菌株。其厌氧发酵主要产物为丁二酸, 几乎不产乳酸和甲酸, 是发酵生产丁二酸的潜力菌株。在 DC1515 中扩增异源丙酮酸羧化酶基因(*pyc*), 可以增加一条由丙酮酸(PYR)到丁二酸前体草酰乙酸(OAA)的代谢通路, 有利于进一步提高其丁二酸产量<sup>[3-4]</sup>。

目前大肠杆菌产丁二酸的基因扩增研究大都是采用 Lac 及其衍生启动子控制下的诱导策略<sup>[3-6]</sup>。该诱导系统受异乳糖调节。异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷(IPTG)是异乳糖类似物诱导物, 能够通过扩散作用进入菌体迅速发挥作用, 且不被菌体代谢, 是该类启动子最常用的诱导剂。但其价格昂贵, 不适于工业大规模制备丁二酸; 且其毒性大, 不利于产品应用于医药和食品市场。乳糖无毒、价廉, 是理想的 IPTG 替代诱导物。以蛋白生产为目标的领域, 已有不少乳糖诱导外源基因表达的报道<sup>[7-8]</sup>。但大肠杆菌产丁二酸的代谢工程领域, 还没有乳糖诱导外源基因表达的研究。因为葡萄糖是大肠杆菌发酵研究最常用的碳源, 而发酵液中葡萄糖的存在会抑制乳糖

的诱导作用。乳糖不能被转运到菌体内, 同时菌体也缺乏 $\beta$ -半乳糖苷酶, 不能分解乳糖为异乳糖发挥诱导作用<sup>[9-11]</sup>。单纯蛋白生产往往是在菌体消耗完葡萄糖后再添加乳糖诱导, 葡萄糖支持菌体生长和乳糖诱导外源基因表达是分开的两个阶段, 从而避免了葡萄糖对乳糖诱导的抑制作用<sup>[7-8]</sup>。而大肠杆菌产丁二酸的过程中, 葡萄糖消耗和外源基因表达, 丁二酸生产是同时进行的, 乳糖诱导不可行。但 Chatterjee 的实验结果表明: *ptsG* 缺失的大肠杆菌解除了葡萄糖的分解代谢物阻遏作用和糖类调节的诱导剂排斥效应。菌体能同时利用葡萄糖和乳糖<sup>[12]</sup>。因此, 在含葡萄糖的发酵培养基中添加适量乳糖, 就有可能诱导外源基因在 *ptsG* 敲除的大肠杆菌中表达, 从而达到调节代谢网络流量的目的。

本研究首先构建了枯草芽孢杆菌丙酮酸羧化酶(*pyc*)的原核表达载体, 并将其转入大肠杆菌 DC1515; 其次, 以 15 g/L 葡萄糖为碳源, 探索了乳糖诱导 Lac 衍生启动子 Trc 在大肠杆菌 DC1515 中合成异源 *pyc* 的可行性; 最后, 优化了乳糖诱导条件, 提高了丁二酸产量。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株、质粒

大肠杆菌 DC1515 (*pflA::Cam ldhA::Tn10 ptsG::Kan* in wild type W1485)由美国南伊利诺伊州大学 P. Clark 教授惠赠。枯草芽孢杆菌 168 菌株, Top 10 菌株由本实验室保存。pTrchisA 质粒购于 Invitrogen 公司, 4.4 kb, Trc 启动子。pMD-T 载体购于 TaKaRa 公司。

### 1.2 *pyc* 基因的克隆与序列分析

#### 1.2.1 *pyc* 基因的 PCR 扩增

根据 GenBank 公布的枯草芽孢杆菌 168 的 *pyc*

基因序列设计一对引物 P1 和 P2, 引物序列分别为: P1: 5'-AGGGGTACCAAAGTTTGTCTCAG-3' (下划线处为 *Kpn* I 位点); P2: 5'-GGCGGTACCCCTATAATCTCTGAAGT-3' (下划线处为 *Kpn* I 位点)。以提取的枯草芽孢杆菌 168 的基因组 DNA 为模板进行 PCR 反应。反应在 100  $\mu$ L 体系中进行, 扩增条件为: 94°C 30 s, 52°C 40 s, 72°C 3.7 min, 30 个循环后, 72°C 延伸 10 min。

### 1.2.2 *pyc* 基因的克隆

将 *pyc* 的 PCR 产物连接到 pMD-T 载体上, 反应体系: 回收的 *pyc* 基因的 PCR 产物 3  $\mu$ L, pMD-T 载体 1  $\mu$ L, 高效连接液 (TaKaRa 公司) 4  $\mu$ L, 于 16°C 连接过夜。将 8  $\mu$ L 连接产物转化到感受态细胞 Top 10 中, 经 IPTG/X-gal 琼脂平板蓝白菌落筛选, 随机挑选白色菌落, 提取质粒后进行 *Kpn* I 酶切鉴定。

### 1.2.3 *pyc* 基因的序列分析

将克隆的 *pyc* 基因片段送上海生工生物技术有限公司进行序列测定, 并采用 DNASTar LaserGene v.5 软件 (DNASTAR 公司) 对基因序列进行同源性分析。

## 1.3 *pyc* 基因原核表达载体的构建和表达

### 1.3.1 *pyc* 基因原核表达载体的构建

将 pMD-*pyc* 载体和 pTrchisA 载体分别进行 *Kpn* I 酶切, 回收 *pyc* 基因片段和 pTrchisA 载体片段, pTrchisA 载体去磷酸化。将 *pyc* 基因连接到 pTrchisA 载体上, 连接体系: 回收的 *pyc* 基因 2.8  $\mu$ L, pTrchisA 载体 1.2  $\mu$ L, 高效连接液 4  $\mu$ L, 于 16°C 连接过夜。将连接物转化感受态细胞 Top 10, 在氨苄平板上 37°C 培养过夜, *Kpn* I、*Eco*R I 和 *Hind* III 酶切鉴定含重组质粒的阳性克隆。用 *Kpn* I 酶切鉴定基因片段插入, 用 *Eco*R I (酶切片段应为 2.6 kb 和 5.3 kb 左右) 和 *Hind* III (酶切片段应为 2.3 kb 和 5.6 kb 左右) 酶切鉴定基因插入方向。质粒测序后再将阳性重组质粒转化感受态细胞 DC1515, 涂布于含有氨苄、卡那霉素、氯霉素和四环素的平板。

### 1.3.2 *pyc* 基因的诱导表达

重组菌接种于含有氨苄、卡那霉素、氯霉素和四环素的 LB 液体培养基中, 37°C 活化过夜后, 按 5% 接种于含有氨苄、卡那霉素、氯霉素和四环素的

新鲜 LBG (LB+15 g/L 葡萄糖) 培养基, 培养至对数生长期 ( $OD_{600}=0.8$ ), 分作 3 份。一份加 IPTG 至终浓度为 0.5 mmol/L 诱导 *pyc* 的表达; 一份加乳糖至终浓度为 5 g/L 诱导 *pyc* 的表达; 一份作为对照, 于 25°C 下继续培养 5 h。收集 1 mL 菌体, 重悬于 100  $\mu$ L 的 PBS (0.02 mmol/L, pH 7.0), 并加入等量的 5 $\times$  蛋白 buffer, 煮沸 5 min 后, 进行 SDS-PAGE 分析。

## 1.4 大肠杆菌的培养和厌氧发酵

培养: 所有大肠杆菌均为 37°C、LB 培养基培养。从含有抗生素的 LB 平板上筛选阳性克隆。在必要的时候加入抗生素: 50  $\mu$ g/mL 氨苄; 50  $\mu$ g/mL 卡那霉素; 10  $\mu$ g/mL 四环素; 30  $\mu$ g/mL 氯霉素。发酵: 从过夜生长的 5 mL 培养基中取 200  $\mu$ L 接种到新鲜的 LB 培养基中, 添加合适的抗生素有氧培养。待菌体  $OD_{600}$  达到 1, 取 1 mL 菌液接种到 50 mL 血清瓶。血清瓶里含 20 mL LB 培养基, 0.4 g  $MgCO_3$  (维持 pH 并提供  $CO_2$ ), 合适的抗生素, 大约 15 g/L 葡萄糖, 初始 pH 调为 7.0。血清瓶密封, 37°C、150 r/min 厌氧培养 48 h。菌体生长及 SDS-PAGE 实验, 采用 1:1 的 LB 和 M9 培养基 (维持 pH) 厌氧培养, 添加葡萄糖和抗生素, 不加  $MgCO_3$ 。

## 1.5 菌株生长及发酵产物的高效液相分析

检测  $OD_{600}$  的吸光值来监控细胞生长, 细胞干重 (g/L) =  $0.48 \times OD_{600}^{[12]}$ 。葡萄糖、乳糖消耗和发酵产物 (丁二酸、乳酸、甲酸、乙酸和乙醇) 采用高效液相检测。色谱柱为 Bio-Rad Aminex HPX-87H (7.8 mm $\times$ 300 mm), HP1200 工作站, 二极管阵列及示差检测器。厌氧发酵样品于 10 000  $\times$  g 离心 10 min, 0.22  $\mu$ m 滤膜过滤, 稀释 5 倍, 上样 20  $\mu$ L。流动相为 5 mmol/L 硫酸, 0.6 mL/min, 55°C。

## 1.6 乳糖诱导表达条件的优化

### 1.6.1 菌株最佳诱导起始生长量的确定

重组菌分别培养至  $OD_{600}$  值为 0.3、0.9、1.8 时向培养液中加入终浓度为 5 g/L 的乳糖进行诱导, 发酵未测定菌体  $OD_{600}$  值及发酵产物。

### 1.6.2 最适乳糖浓度的确定

在重组菌生长至最佳诱导起始量时, 分别向 6 个摇瓶中添加不同量的乳糖, 使其终浓度分别为 0、0.5、1、2、4、8 g/L, 37°C 继续培养, 24 h 及发酵

未测定葡萄糖消耗及发酵产物。

### 1.6.3 最佳乳糖诱导温度的确定

在重组菌生长至最佳诱导起始量并添加乳糖至最适浓度后, 分别在 25°C、30°C、37°C 继续培养, 发酵未测定发酵产物。

### 1.6.4 补加乳糖的影响

在重组菌生长至最佳诱导起始量时, 分别一次性添加乳糖至最佳诱导浓度, 或每间隔 16 h 补加乳糖至最佳诱导浓度(共加 3 次), 发酵未测定发酵产物。

## 2 结果

### 2.1 *pyc* 基因的克隆及原核表达载体的构建

以枯草芽孢杆菌 168 的基因组为模板, 利用设计的引物进行 PCR 反应。PCR 产物在 3.6 kb 左右有一明显的条带(图 1), 且非特异性扩增不明显。PCR 产物经纯化回收后和克隆载体 pMD-T 连接, 质粒测序结果表明 *pyc* 基因序列基本正确, 和基因库中基因序列同源性 99.5%, 蛋白质同源性 100%。

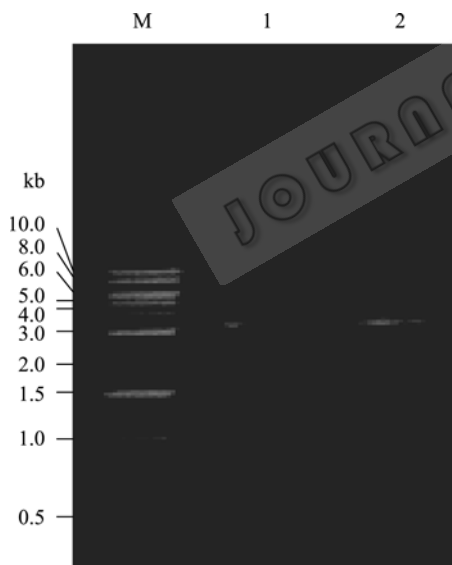


图 1 *pyc* 基因的 PCR 扩增结果

Fig. 1 Amplification of *pyc* gene by PCR. M: DNA kb marker; 1, 2: PCR product.

将 pTrchisA-*pyc* 转化大肠杆菌 DC1515, 提取的质粒分别用 *Kpn* I、*Eco*R I 和 *Hind* III 酶切分析, 电泳验证酶切产物大小和预测基本相同(图 2)。质粒测序结果表明 *pyc* 基因的读码框正确。

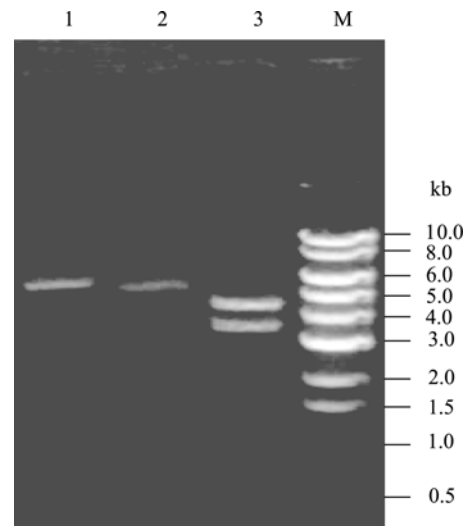


图 2 重组质粒 pTrchisA-*pyc* 的酶切鉴定

Fig. 2 Identification of recombinant plasmid pTrchisA-*pyc*. 1: digested products with *Hind* III; 2: digested products with *Eco*R I; 3: digested products with *Kpn* I; M: DNA marker.

### 2.2 *pyc* 基因的诱导表达

如图 3 所示, 用 0.5 mmol/L IPTG 和 5 g/L 的乳糖均能诱导重组大肠杆菌 DC1515/pTrchisA-*pyc* 中 *pyc* 的表达。全菌体蛋白电泳可见 120 kD 左右的目的条带, 这与预期的枯草芽孢杆菌 168 的 *pyc* 基因表达蛋白的相对分子量一致。表明 *ptsG* 基因敲除不仅使菌体可以共利用葡萄糖和乳糖, 乳糖也能作为诱导剂诱导外源基因表达, 起到类似 IPTG 的作用。

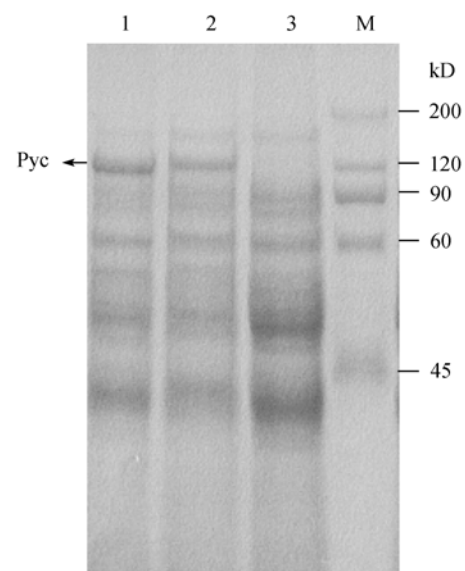


图 3 重组菌诱导表达的全菌体蛋白 SDS-PAGE 电泳

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of DC1515/pTrchisA-*pyc* after induction. 1: with 0.5 mmol/L IPTG; 2: with 5 g/L lactose; 3: control strain; M: protein marker.

## 2.3 乳糖诱导条件优化

### 2.3.1 在菌体生长不同阶段进行诱导对菌体生长及丁二酸合成的影响

分别在菌体生长至  $OD_{600}$  为 0.3、0.9、1.8 时, 向培养基中加入乳糖至终浓度为 5 g/L 诱导 *pyc* 在 DC1515 中表达, 检测发酵末期的生物量和丁二酸产量。以携带有空质粒的菌株 DC1515/pTrchisA 作为对照菌株。由图 4 可以看出, 加入乳糖诱导 *pyc* 表达, 丁二酸产量比对照菌株有很大提高。在不同生长阶段加入乳糖诱导表达, 均能在一定程度上提高菌体的生物量。这说明添加的乳糖除一部分作为诱导剂外, 另一部分也作为碳源供给菌体生长和代谢。在对数生长中期加入乳糖诱导 *pyc* 的表达, 最利于目的产物丁二酸的生成。

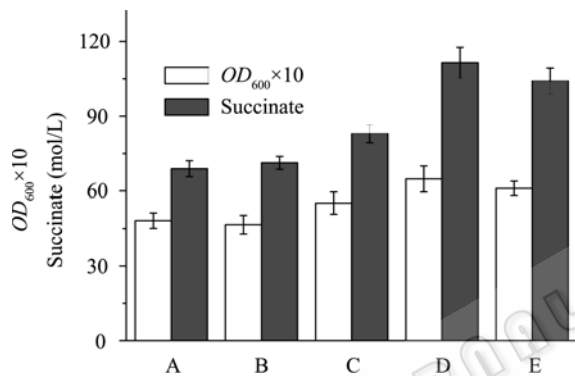


图 4 乳糖加入时间对菌体生物量及丁二酸产量影响

Fig. 4 Effect of lactose addition time on the cell mass and succinate concentration at the end of the fermentation of DC1515/pTrchisA-*pyc*. A: DC1515/pTrchisA; B: DC1515/pTrchisA-*pyc* without lactose; C-E: DC1515/pTrchisA-*pyc* with 5 g/L lactose added at early log phase (C), middle log phase (D) and late log phase (E).

### 2.3.2 乳糖浓度对葡萄糖消耗及丁二酸合成的影响

根据 2.3.1 的结果, 在菌体对数生长中期加入不同浓度的乳糖进行诱导, 检测菌体葡萄糖消耗及发酵未产物分布。如图 5 所示, 在一定范围内, 乳糖浓度愈高, 菌体消耗葡萄糖愈快, 最终丁二酸产量愈高。1 g/L 终浓度乳糖的诱导可以促进菌体消耗葡萄糖加快, 且最终丁二酸产量达 122 mmol/L (14.40 g/L), 比对照菌株 72.22 mmol/L (8.52 g/L) 提高了 69%。但当乳糖浓度大于 1 g/L 时, 菌体消耗葡萄糖速率减慢, 且最终丁二酸产量降低。4 g/L 及 8 g/L 乳糖诱导下最终葡萄糖有残留。

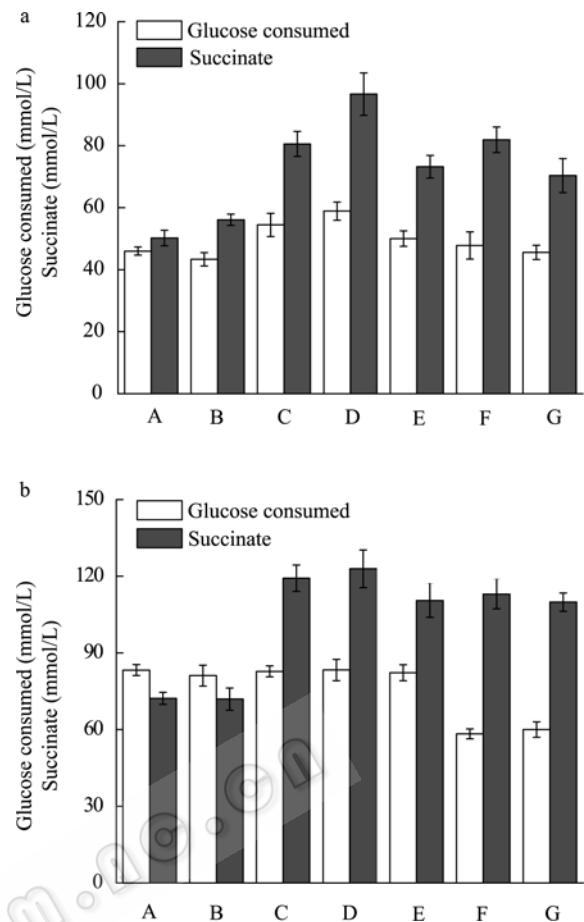


图 5 不同浓度乳糖诱导对重组菌葡萄糖消耗和丁二酸产量的影响

Fig. 5 Effect of different concentration of lactose on glucose consumption and succinate production. (a) 24 h. (b) 48 h. A: DC1515/pTrchisA; B-G: DC1515/pTrchisA-*pyc* induced with different concentration of lactose (B: 0 g/L lactose; C: 0.5 g/L lactose; D: 1 g/L lactose; E: 2 g/L lactose; F: 4 g/L lactose; G: 8 g/L lactose).

### 2.3.3 不同诱导温度对丁二酸合成的影响

诱导温度是影响重组蛋白表达的一个重要因素, 即温度会影响过表达基因的酶活。同时, 温度也影响菌株的生长和代谢。根据实验 2.3.1 和 2.3.2 的结果, 在 37°C 下培养工程菌至对数生长中期 ( $OD_{600}$  约为 0.9), 加入乳糖至终浓度为 1 g/L 进行诱导。而后将菌体分别在 25°C、30°C、37°C 下厌氧培养。结果如图 6 所示, 重组菌在 30°C 下丁二酸产量最高, 可达 128.59 mmol/L (15.17 g/L)。因为实验的最终目的是提高丁二酸的产量, 因此在今后的实验中选择 30°C 厌氧培养。

### 2.3.4 补加乳糖对丁二酸合成的影响

IPTG 是半乳糖苷的类似物, 不被菌体代谢, 能

持续发挥诱导作用。乳糖与 IPTG 不同, 它在作为诱导剂的同时也作为碳源和能源物质被利用。因此考虑用间歇补料方式添加乳糖, 以确保整个厌氧发酵阶段乳糖能持续诱导 *pyc* 表达。以一次性添加乳糖至最佳浓度的样品作为对照。如图 7, 可以看出每间歇 16 h 添加乳糖至最佳诱导浓度(共加 3 次)有利于外源基因的持续表达, 丁二酸产量最高可达 148.62 mmol/L (17.54 g/L)。

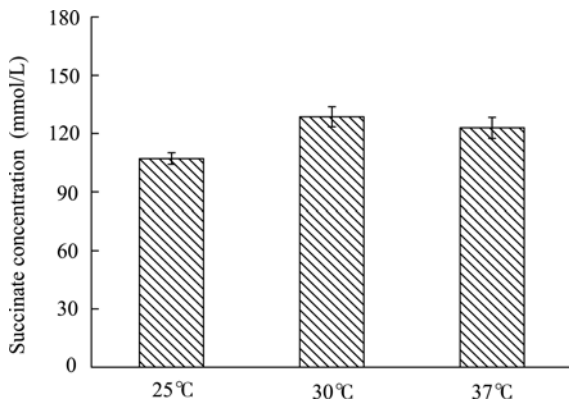


图 6 不同诱导温度对重组菌丁二酸产量的影响  
Fig. 6 Effect of different culture temperature after induction on succinate production of DC1515/pTrchisA-*pyc*.

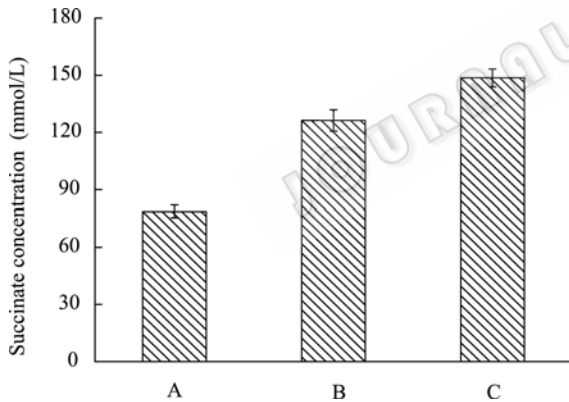


图 7 补加乳糖对丁二酸产量的影响  
Fig. 7 Effect of lactose supplementation on succinate production of DC1515/pTrchisA-*pyc*. A: without lactose; B: added lactose once; C: supplemented lactose every 16 h.

### 3 讨论

在大肠杆菌 DC1515 中表达异源 *pyc* 基因, 增加了从丙酮酸到草酰乙酸的代谢通路<sup>[4-5]</sup>。草酰乙酸作为丁二酸的前体, 其增加导致了最终目标产物丁二酸的增加。丙酮酸的羧化利用, 也使菌体原本由丙酮酸产生的副产物乙酸、乙醇减少。诱导 *pyc* 基因

在大肠杆菌体内表达, 是有效地提高菌体丁二酸产量的策略。

在大肠杆菌 DC1515 中成功实现了乳糖对 *pyc* 基因的诱导。由于 DC1515 是 *ptsG* 敲除菌株, 培养基中的葡萄糖不会抑制乳糖的利用和诱导外源基因表达。优化诱导条件后, 丁二酸产量由对照菌株的 72.22 mmol/L (8.52 g/L) 提高到 128.59 mmol/L (15.17 g/L), 为对照菌株的 1.78 倍。乳糖的加入时间、乳糖浓度及诱导温度均影响丁二酸的生成。在对数生长中期加入乳糖诱导, 高活力的菌体细胞能够克服蛋白表达的负担, 外源基因的作用也能得到充分发挥, 因此菌体能大量生产目标产物。合适的诱导温度能够提供菌体生长代谢的良好条件和合适的过表达基因的酶活, 有利于菌体生产目标代谢物。合适的乳糖浓度对目标产物的生成至关重要。如图 5, 当乳糖浓度小于 1 g/L 时, 丁二酸的产量随着乳糖浓度的增加而增加; 当乳糖浓度大于 1 g/L 时, 丁二酸的产量随着乳糖浓度的增加反而减少。因此推断: 一方面, 高浓度的乳糖会诱导外源基因的高表达, 过高的酶活会加重菌体生长和基础代谢负担, 反而不利于目标代谢物的生产; 另一方面, 对 *ptsG* 敲除菌株来说, 葡萄糖和乳糖均通过半乳糖渗透酶转运到胞内<sup>[9]</sup>, 因此, 高浓度的乳糖会竞争性抑制葡萄糖转运, 从而减少葡萄糖消耗, 减少目标产物生成。实验中应该根据“目标产物产量最大化”的原则选择合适的乳糖浓度, 从而保证外源基因的酶活水平适当, 且不影响葡萄糖的消耗。本研究探索到最利于丁二酸生成的 *pyc* 基因乳糖诱导的最佳条件为: 在对数生长中期添加乳糖至终浓度 1 g/L 于 30°C 条件下诱导 *pyc* 基因表达。

乳糖除作为诱导剂外, 本身也是一种碳源, 可以被菌体代谢利用。因此, 以乳糖为诱导剂, 增加了菌体可再生碳源的利用, 有助于菌体量的提高及产生更多的目标代谢产物。但因其被代谢消耗, 间歇补加乳糖对外源基因的诱导及产物生成要优于一次性添加。本实验也证明补加乳糖实现 *pyc* 的持续诱导对提高发酵末期丁二酸的产量是有利的。在发酵过程中补加乳糖 2 次至最佳诱导浓度, 丁二酸产量可达 148.62 mmol/L (17.54 g/L)。

在大规模发酵生产中,以乳糖代替 IPTG 诱导外源基因表达,可以提高菌体自身生产目标代谢物的经济性,从而提高整个生产过程的经济性,极大地降低生产成本。本研究在大肠杆菌 DC1515 中成功实现了乳糖诱导 *pyc* 基因的表达,为以葡萄糖为底物生产丁二酸的过程中乳糖诱导外源基因的表达奠定了基础。乳糖诱导降低了生产成本,有利于实现丁二酸发酵生产的工业化。

## REFERENCES

- [1] McKinlay JB, Vieille C, Zeikus JG. Prospects for a bio-based succinate industry. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, **76**: 727–740.
- [2] Zhan XB, Chen S, Zheng ZY. Recent development in metabolic engineering for production of succinic acid by *Escherichia coli*. *Chin J Process Eng*, 2007, **7**(4): 840–846.  
詹晓北, 陈设, 郑志永. 大肠杆菌生产琥珀酸的代谢工程研究进展. *过程工程学报*, 2007, **7**(4): 840–846.
- [3] Lin H, San KY, Bennett GN. Effect of *Sorghum vulgare* phosphoenolpyruvate carboxylase and *Lactococcus lactis* pyruvate carboxylase coexpression on succinate production in mutant strains of *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2005, **67**: 515–523.
- [4] Wang QZ, Wu CY, Chen T, et al. Expression of galactose permease and pyruvate carboxylase in *Escherichia coli ptsG* mutant increases the growth rate and succinate yield under anaerobic conditions. *Biotechnol Lett*, 2006, **28**: 89–93.
- [5] Vemuri GN, Eiteman MA, and Altman E. Succinate production in dual-phase *Escherichia coli* fermentations depends on the time of transition from aerobic to anaerobic conditions. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2002, **28**: 325–332.
- [6] Kwon YD, Kwon OH, Lee HS, et al. The effect of NADP-dependent malic enzyme expression and anaerobic C4 metabolism in *Escherichia coli* compared with other anaerobic enzymes. *J Appl Microbiol*, 2007, **103**: 2340–2345.
- [7] Kim M, Elvin C, Brownlee A, et al. High yield expression of recombinant pro-resilin: Lactose-induced fermentation in *E. coli* and facile purification. *Protein Express Purif*, 2007, **52**: 230–236.
- [8] Li ZP, Zhang X, Xu B, et al. Expression of Hblys in the *E. coli* high cell density culture using lactose as an inducer. *Chin J Process Eng*, 2005, **5**(4): 446–449.  
李兆鹏, 张栩, 徐斌, 等. 重组大肠杆菌高密度发酵中乳糖诱导表达 hBLyS. *过程工程学报*, 2005, **5**(4): 446–449.
- [9] Deutscher J, Francke C, Postma PW. How phosphotransferase system-related protein phosphorylation regulates carbohydrate metabolism in Bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2006, **70**(4): 939–1031.
- [10] Adhys S. The lac and gal operons today//Lin ECC and Lynch AS (ed.), Regulation of gene expression in *Escherichia coli*. Austin, Tex: RG Landes Company, 1996: 1181–1200.
- [11] Zhang Y, Qu XM, Yang SL. The influences of lactose as an inducer on the expression of the recombinant proteins in *Escherichia coli* BL21 (DE3). *Chin J Biotech*, 2000, **16**(4): 464–468.  
张毅, 屈贤铭, 杨胜利. 乳糖作为诱导剂对重组目的蛋白表达的影响. *生物工程学报*, 2000, **16**(4): 464–468.
- [12] Chatterjee R, Millard CS, Champion K, et al. Mutation of the *ptsG* gene results in increased production of succinate in fermentation of glucose by *Escherichia coli*. *Appl Environ Microb*, 2001, **67**: 148–154.