



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103725718 B

(45)授权公告日 2017.05.24

(21)申请号 201410007345.X

C12N 15/70(2006.01)

(22)申请日 2014.01.08

C12P 7/18(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

审查员 高赟

申请公布号 CN 103725718 A

(43)申请公布日 2014.04.16

(73)专利权人 中国科学院青岛生物能源与过程研究所

地址 266101 山东省青岛市崂山区松岭路189号

(72)发明人 咸漠 姜兴林 刘炜 徐鑫 刘辉

(74)专利代理机构 北京爱普纳杰专利代理事务所(特殊普通合伙) 11419

代理人 何自刚 王玉松

(51)Int.Cl.

C12P 7/26(2006.01)

权利要求书1页 说明书5页 附图3页

(54)发明名称

一种生物法合成乙偶姻及其衍生物的方法

(57)摘要

本发明公开了一种生物法合成乙偶姻及其衍生物的方法,属于分子生物学技术领域。本发明将丙酮酸脱羧酶基因、具有乙偶姻合酶活性基因,导入宿主菌得到重组菌,利用重组菌发酵生产乙偶姻,进一步在乙偶姻基础上生产2,3-丁二醇。本发明成功利用重组后菌株发酵生成乙偶姻和2,3-丁二醇,解决了天然生产途径中间产物乙酰乳酸消耗影响乙偶姻和2,3-丁二醇产量的问题。

1. 一种生物法合成乙偶姻的方法,其特征在于,步骤如下:
 - (1) 分别克隆丙酮酸脱羧酶基因PDC基因和YerE酶yerE基因;
 - (2) 将步骤(1)所得的基因连接到质粒载体上,分别构建含有丙酮酸脱羧酶基因和乙偶姻合酶基因的重组质粒;
 - (3) 将步骤(2)中的重组质粒导入大肠杆菌,获得重组大肠杆菌;
 - (4) 利用步骤(3)得到的重组大肠杆菌发酵生产乙偶姻。
2. 根据权利要求1所述方法,其特征在于,具体步骤如下:
 - (1) 分别克隆丙酮酸脱羧酶基因PDC基因和YerE酶yerE基因;
 - (2) 将步骤(1)所得的基因,丙酮酸脱羧酶基因连接到pET28a质粒上,制成重组质粒pJXL65,具有乙偶姻合酶活性基因连接到pACYduet1质粒上,制成重组质粒pJXL63;
 - (3) 将步骤(2)得到的两个重组质粒导入到大肠杆菌中,得到重组大肠杆菌;
 - (4) 利用步骤(3)得到的重组大肠杆菌发酵生产乙偶姻。
3. 根据权利要求1-2所述任一方法,其特征在于,所述丙酮酸脱羧酶基因来源于运动发酵单胞菌或丙酮丁醇梭杆菌。
4. 根据权利要求1-2所述任一方法,其特征在于,具体步骤如下:
 - (1) 分别克隆运动发酵单胞菌的丙酮酸脱羧酶基因PDC基因和细菌*Yersinia pseudotuberculosis*的yerE基因;
 - (2) 将步骤(1)所述PDC基因连接到pET28a质粒上,得到的新质粒pJXL65,将yerE基因连接到pACYduet1质粒载体上,得到的新质粒pJXL63;
 - (3) 将步骤(2)所述的质粒载体pJXL65和pJXL63一起电激转化入大肠杆菌BL21 (DE3)中,得到重组菌;
 - (4) 利用步骤(3)中的重组菌发酵生产乙偶姻。
5. 一种合成2,3-丁二醇的方法,其特征在于,具体步骤如下:
 - (1) 分别克隆丙酮酸脱羧酶PDC基因,YerE酶yerE基因和2,3-丁二醇脱氢酶bdhA基因;
 - (2) 将丙酮酸脱羧酶PDC基因,YerE酶yerE基因和2,3-丁二醇脱氢酶bdhA基因分别连接到可在同一宿主细胞中相容的两个质粒上;
 - (3) 将步骤(2)所获重组质粒转化入大肠杆菌得到重组菌;
 - (4) 利用步骤(3)中的重组菌发酵生产2,3-丁二醇。
6. 根据权利要求5所述方法,其特征在于,具体步骤如下:
 - (1) 克隆发酵单胞菌的丙酮酸脱羧酶PDC基因和枯草芽孢杆菌的2,3-丁二醇脱氢酶bdhA基因;
 - (2) 将yerE基因连接到pACYduet1质粒载体得到重组质粒pJXL63,将步骤(1)所得PDC基因连接到pJXL63质粒得到重组质粒pJXL78,将bdhA基因连接到pET28a质粒得到的重组质粒pJXL79;
 - (3) 将步骤(2)所获重组质粒pJXL78和pJXL79电激转化入大肠杆菌BL21 (DE3)中,得到重组菌;
 - (4) 利用步骤(3)中的重组菌发酵生产2,3-丁二醇。

一种生物法合成乙偶姻及其衍生物的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种合成乙偶姻的方法,具体而言是对大肠杆菌进行分子生物学改造使其合成乙偶姻,并在乙偶姻基础上进一步合成2,3-丁二醇,属于分子生物学技术领域。

背景技术

[0002] 乙偶姻(别名:甲基乙酰甲醇,3-羟基-2-丁酮)具有强烈的奶油、脂肪样香气,高度稀释后有令人愉快的奶香气,主要用于配置香精,是重要的食品添加剂和药物合成原料。传统上乙偶姻可由2,3-丁二酮与锌在酸性条件下反应获得,或者由碳水化合物用曲霉属菌或青霉菌等真菌发酵制备。2,3-丁二醇主要用作香料和有机合成试剂,还是潜在的生物燃料,可由碳水化合物经枯草杆菌类发酵而得。

[0003] 从碳水化合物出发,通过工程改造过的微生物生产乙偶姻和2,3-丁二醇的方法虽有报道,但这些方法都基于一种天然的合成代谢路径:乙酰乳酸合酶催化两个丙酮酸缩合成乙酰乳酸;乙酰乳酸脱羧酶催化乙酰乳酸脱羧生成乙偶姻;乙偶姻还原酶催化乙偶姻还原生成2,3-丁二醇。这一天然途径以乙酰乳酸为关键代谢中间物,但乙酰乳酸在微生物代谢中也被用于合成氨基酸、萜类等,因此会被大量消耗,从而会影响乙偶姻和2,3-丁二醇的生产。

发明内容

[0004] 本发明提供一种合成乙偶姻方法,通过将丙酮酸脱羧酶基因、具有乙偶姻合酶活性基因,导入宿主菌得到重组菌,利用重组菌发酵生产乙偶姻,进一步在乙偶姻基础上生产2,3-丁二醇的方法。

[0005] 本发明技术方案如下:

[0006] (1)克隆丙酮酸脱羧酶基因和具有乙偶姻合酶活性基因;

[0007] (2)将步骤(1)所得的基因连接到质粒载体上,分别构建含有丙酮酸脱羧酶基因和乙偶姻合酶基因的重组质粒;

[0008] (3)将步骤(2)中的重组质粒导入宿主菌,获得重组菌;

[0009] (4)利用步骤(3)中重组菌发酵生产乙偶姻。

[0010] 上述方法的具体步骤如下:

[0011] (1)分别克隆丙酮酸脱羧酶基因和具有乙偶姻合酶活性基因;

[0012] (2)将步骤(1)所得的基因,丙酮酸脱羧酶基因连接pET28a质粒,具有乙偶姻合酶活性基因连接pACYduet1质粒;

[0013] (3)将步骤(2)得到的两个重组质粒导入到大肠杆菌中,得到重组大肠杆菌;

[0014] (4)利用步骤(3)得到的重组大肠杆菌发酵生产乙偶姻。

[0015] 上述乙偶姻的生产中在所述丙酮酸脱羧酶基因来源于运动发酵单胞菌或丙酮丁醇梭杆菌;所述具有乙偶姻合酶活性基因为乙偶姻脱氢酶acoABCL,丙酮酸脱氢酶E1亚基PDHA1基因和LOC100516695基因,乙酰乳酸合酶ILV2基因或YerE酶yerE基因中任一种。

[0016] 根据上述方法,利用丙酮酸脱羧酶PDC基因和细菌*Yersinia pseudotuberculosis*的yerE基因生产乙偶姻,具体步骤如下:

[0017] (1) 分别克隆运动发酵单胞菌的丙酮酸脱羧酶PDC基因和细菌*Yersinia pseudotuberculosis*的yerE基因;

[0018] (2) 将步骤(1)所述PDC基因连接到pET28a质粒上,得到的新质粒pJXL65,将yerE基因连接到pACYduet1质粒上,得到的新质粒pJXL63;

[0019] (3) 将步骤(2)所述的质粒载体pJXL65和pJXL63一起电激转化入大肠杆菌BL21(DE3)中,得到重组菌;

[0020] (4) 利用步骤(3)中的重组菌发酵生产乙偶姻。

[0021] 上述重组菌优选葡萄糖为原料发酵生产乙偶姻。

[0022] 本发明还提供了一种合成2,3-丁二醇的方法,是将丙酮酸脱羧酶基因、具有乙偶姻合酶活性基因和具有乙偶姻还原酶活性基因,导入宿主菌得到重组菌,利用重组菌发酵生产2,3-丁二醇,主要步骤如下:

[0023] (1) 分别克隆丙酮酸脱羧酶基因,具有乙偶姻合酶活性基因和具有乙偶姻还原酶活性基因;

[0024] (2) 将具有乙偶姻合酶活性基因、丙酮酸脱羧酶基因和乙偶姻还原酶活性基因分别连接到可在同一宿主细胞中相容的两个质粒上;

[0025] (3) 将步骤(2)所获重组质粒转化入大肠杆菌得到重组菌;

[0026] (4) 利用步骤(3)中的重组菌发酵生产2,3-丁二醇。

[0027] 上述方法的具体步骤如下:

[0028] (1) 分别克隆丙酮酸脱羧酶基因,具有乙偶姻合酶活性基因和具有乙偶姻还原酶活性基因;所述丙酮酸脱羧酶基因来源于运动发酵单胞菌或丙酮丁醇梭杆菌;所述具有乙偶姻合酶活性基因为乙偶姻脱氢酶acoABCL,丙酮酸脱氢酶E1亚基PDHA1基因和LOC100516695基因,乙酰乳酸合酶ILV2基因或YerE酶yerE基因中任一种;所述具有乙偶姻还原酶活性基因为2,3-丁二醇脱氢酶bdhA基因或醇脱氢酶adh基因中任一种;

[0029] (2) 将具有乙偶姻合酶活性基因连接到pACYduet1质粒得到质粒pJXL63,将步骤(1)所得丙酮酸脱羧酶基因连接到pJXL63质粒得到重组质粒pJXL78,将具有乙偶姻还原酶活性基因连接到pET28a质粒载体得到的重组质粒pJXL79;

[0030] (3) 将步骤(2)所获重组质粒pJXL78和pJXL79转化入大肠杆菌得到重组菌;

[0031] (4) 利用步骤(3)中的重组菌发酵生产2,3-丁二醇。

[0032] 根据上述方法,利用丙酮酸脱羧酶PDC基因和2,3-丁二醇脱氢酶bdhA基因合成2,3-丁二醇的具体步骤如下:

[0033] (1) 克隆发酵单胞菌的丙酮酸脱羧酶PDC基因和枯草芽孢杆菌的2,3-丁二醇脱氢酶bdhA基因;(2) 将yerE基因连接到pACYduet1质粒载体得到的新质粒pJXL63,将步骤(1)所得PDC基因连接到pJXL63质粒得到重组质粒pJXL78,将bdhA基因连接到pET28a质粒载体得到的重组质粒pJXL79;

[0034] (3) 将步骤(2)所获重组质粒pJXL78和pJXL79电激转化入大肠杆菌BL21(DE3)中,得到重组菌;

[0035] (4) 利用步骤(3)中的重组菌发酵生产2,3-丁二醇。

[0036] 上述重组菌优选葡萄糖为原料发酵生产2,3-丁二醇。本发明还提供了用于生物法生产乙偶姻和2,3-丁二醇的方法和材料。具体地说,本发明提供了用于生产乙偶姻和2,3-丁二醇的核酸分子、多肽、宿主细胞和方法。此处提到的核酸分子可用于对宿主细胞进行基因工程改造,使其具有生产乙偶姻和2,3-丁二醇的能力。此处提到的多肽可用在无细胞体系中生产乙偶姻和2,3-丁二醇。此处提到的宿主细胞可用在培养体系中生产乙偶姻和2,3-丁二醇。

[0037] 本发明提供了具有丙酮酸脱羧酶活性和/或乙偶姻合酶活性和/或甲基乙偶姻还原酶活性的细胞,以及通过培养这些细胞来生产如本文所述的那些产物的方法。在一些实施方案中细胞本身含有所需酶活性如运动发酵单胞菌、酵母菌。在另一些实施方案中,细胞含有编码这些酶的外源核酸。

[0038] 在一些实施方案中,所述的细胞还含有二醇脱水酶活性和/或醇脱氢酶活性这些细胞可以将2,3-丁二醇进一步转化为丁酮和2-丁醇。

[0039] 本发明成功利用重组后菌株发酵生成乙偶姻和2,3-丁二醇,解决了天然生产途径中中间产物乙酰乳酸消耗影响乙偶姻和2,3-丁二醇生产的问题。

附图说明

[0040] 图1本发明中提到的各化合物的结构式;

[0041] (1.乙酰乳酸,2.乙醛,3.丙酮酸,4.乙偶姻,5.2,3-丁二醇)。

[0042] 图2生物法生产乙偶姻的合成代谢路径示意图;

[0043] (1.丙酮酸脱羧酶,2.乙偶姻合酶)。

[0044] 图3生物法生产2,3-丁二醇的合成代谢路径示意图;

[0045] (1.丙酮酸脱羧酶,2.乙偶姻合酶,3.乙偶姻还原酶)。

[0046] 图4质粒pJXL65的结构示意图。

[0047] 图5质粒pJXL63的结构示意图。

[0048] 图6质粒pJXL78的结构示意图。

[0049] 图7质粒pJXL79的结构示意图。

[0050] 图8产生的乙偶姻用气相色谱质谱联用仪检测产生的TIC图。

[0051] 图9产生的乙偶姻用气相色谱质谱联用仪检测产生的质谱图。

具体实施方式

[0052] 图1-3描述了生物法合成甲基乙偶姻及其衍生物的路径:丙酮酸脱羧酶催化丙酮酸脱羧生成乙醛;一种具有乙偶姻合酶活性的酶催化乙醛和丙酮酸反应生成乙偶姻;乙偶姻还原酶催化乙偶姻还原生成2,3-丁二醇。这里所说的脱羧酶、合酶、还原酶活性广泛存在于各种细胞中。可以利用细胞中固有的这些酶活性。也可以从另外的物种中克隆这些酶然后转入到细胞中去。这些酶也可以是通过改造的酶。这种改造可以通过诱变筛选或定向进化来实现。

[0053] 目前人们已经发现的多种以硫胺素焦磷酸为辅酶的蛋白具有图1-3中所示的乙偶姻合酶活性。比如乙偶姻脱氢酶的E1亚基,动物的丙酮酸脱氢酶的E1亚基,乙酰乳酸合酶,转酮酶,YerE酶。这些蛋白都可以应用于本发明。这些蛋白及编码他们的核酸的来源举例如

下:

[0054] 表1具有乙偶姻合酶活性的蛋白及其基因

[0055]

蛋白名称	基因名称	GenBank	来源
乙偶姻脱氢酶	<i>acoABCL</i>	NP_388687.1	枯草芽孢杆菌
		NP_388688.1	
		NP_388689.1	
		NP_388690.1	
丙酮酸脱氢酶 E1 亚基	<i>PDHAI</i> 和 LOC100516695	CAA37180.1 XP_003132328.1	猪
乙酰乳酸合酶	<i>ILV2</i>	EDN64495.1	酿酒酵母

[0056]

蛋白名称	基因名称	GenBank	来源
YcrE 酶	<i>yerE</i>	HC194701.1	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>

[0057] 目前人们已经发现的多种蛋白具有图1-3所示的丙酮酸脱羧酶活性。这些蛋白及编码它们的核酸来源举例如下

[0058] 表2丙酮酸脱羧酶及其基因

[0059]

蛋白名称	基因名称	GenBank	来源
丙酮酸脱羧酶	<i>PDC</i>	GeneID:13321194	运动发酵单胞菌
丙酮酸脱羧酶	<i>PDC</i>	GeneID:10848725	丙酮丁醇梭杆菌

[0060] 目前人们已经发现的多种蛋白具有图1-3所示的乙偶姻还原酶活性。这些蛋白及编码它们的核酸来源举例如下:

[0061] 表3具有乙偶姻还原酶活性的蛋白及其基因

[0062]

蛋白名称	基因名称	GenBank	来源
2,3-丁二醇脱氢酶	<i>bdhA</i>	NP_388505.1	枯草芽孢杆菌
醇脱氢酶	<i>adh</i>	YP_261165.1	荧光假单胞菌

[0063] 编码这些酶的核酸可以构建在合适的载体上比如pET28a,pACYduet1上,转入细胞。也可以利用细胞本身就有的酶活性,比如枯草芽孢杆菌的2,3-丁二醇脱氢酶活性。在后一种情况下可以通过提高基因的拷贝数增加酶的催化活性。构建所说的这些细胞的方法都是生物学中常用的方法,具体步骤可参照Sambrook et al.,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,Third Ed.,Cold Spring Harbor Laboratory,New York(2001);and Ausubel et al.,Current Protocols in Molecular Biology,John Wiley and Sons,Baltimore,Md.(1999)。

[0064] 酶的表达被传统的northren杂交法验证。细胞生产乙偶姻、2,3-丁二醇等产物的能力通过检测发酵产物证明。这些产物的检测采用气相色谱和质谱技术。

[0065] 实施例1

[0066] 将运动发酵单胞菌的PDC基因克隆在pET28a(购自Novagen)质粒载体的NdeI和BglIII位点之间,得到的新质粒称为pJXL65(图4)。图4中Zm6PDC为运动发酵单胞菌的丙酮酸脱羧酶编码基因。将细菌Yersinia pseudotuberculosis的yerE基因克隆在pACYduet1(购自Novagen)质粒载体的NdeI和KpnI酶切位点之间,得到的新质粒称为pJXL63(图5)。将pJXL65和pJXL63一起电激转化入大肠杆菌BL21(DE3)(购自Invitrogen)中。构建好的细胞,在100ml LB葡萄糖培养基中培养(0.5L水溶解10g氯化钠、10g胰蛋白粉和5g酵母粉蒸汽灭菌,0.5L水溶解20g葡萄糖蒸汽灭菌,灭菌并冷却后两者等比例混合)。培养温度稳定在30摄氏度。当细胞生长到一定阶段,通常是指指数生长阶段,加入IPTG(终浓度为50mg/L)诱导外源酶的表达,使细胞生产乙偶姻,利用气相色谱质谱联用仪检测合成的乙偶姻(见图8,9)。图8中7.049分的峰为乙偶姻的峰,图9中质谱碎片模式与乙偶姻的分子结构相吻合。乙偶姻的浓度为10.2g/L。

[0067] 实施例2

[0068] 将运动发酵单胞菌的PDC基因克隆在pJXL63质粒的NcoI和BamHI酶切位点之间,得到的新质粒称为pJXL78(图6)。将枯草芽孢杆菌的bdhA基因克隆在pET28a(购自Novagen)质粒载体的NcoI和BamHI酶切位点之间,得到的新质粒称为pJXL79(图7)。将pJXL78和pJXL79一起电激转化入大肠杆菌BL21(DE3)(购自Invitrogen)中。构建好的细胞,在100ml LB葡萄糖培养基中培养(0.5L水溶解10g氯化钠、10g胰蛋白粉和5g酵母粉蒸汽灭菌,0.5L水溶解20g葡萄糖蒸汽灭菌,灭菌并冷却后两者等比例混合)。培养温度稳定在30摄氏度。当细胞生长到一定阶段,通常是指指数生长阶段,加入IPTG(终浓度为50mg/L)诱导外源酶的表达,使细胞生产2,3-丁二醇。2,3-丁二醇的浓度为9.5g/L。

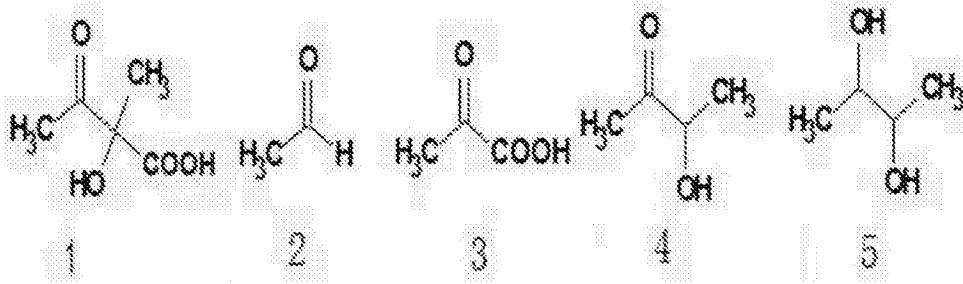


图1

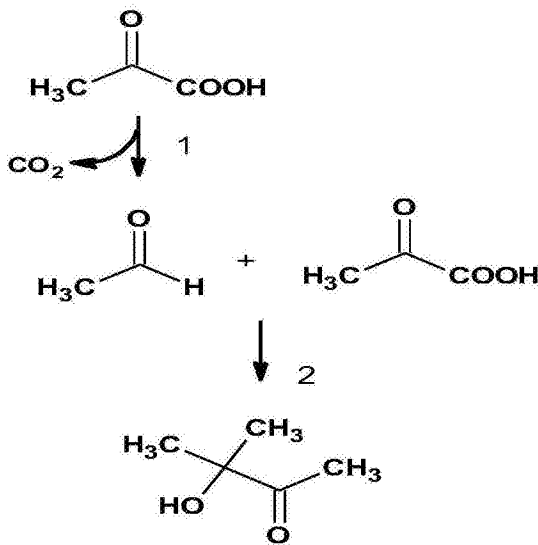


图2

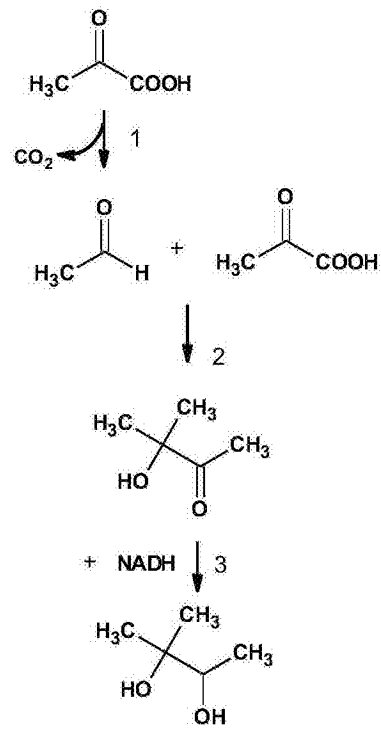


图3

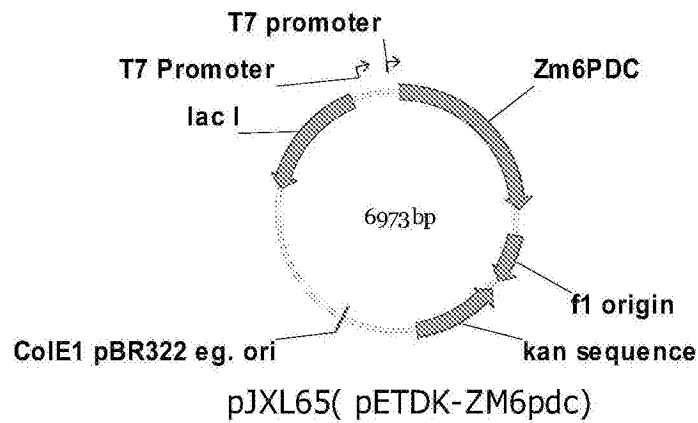


图4

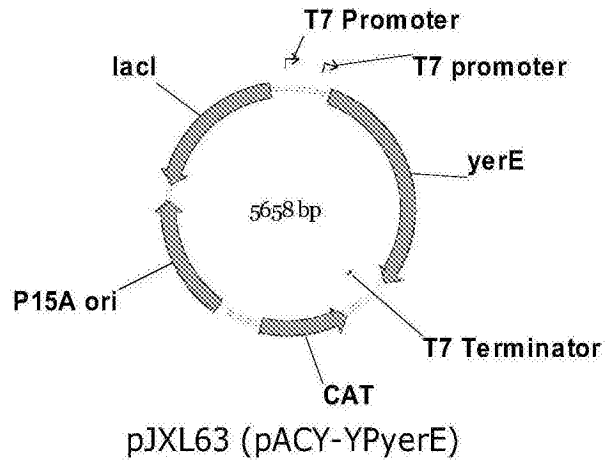


图5

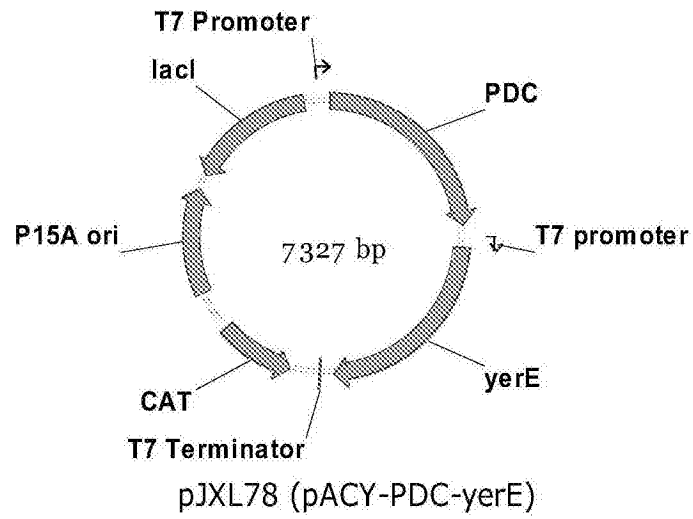


图6

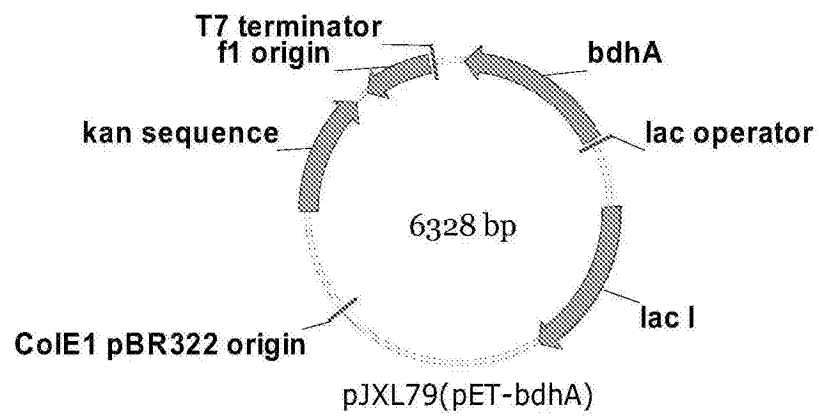


图7

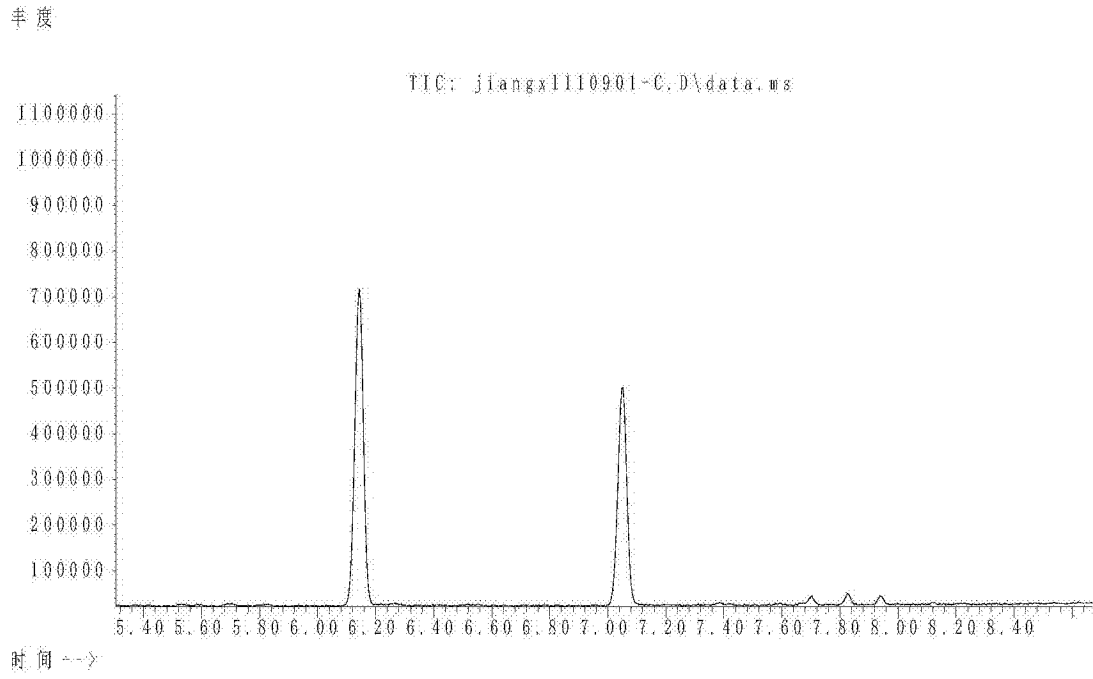


图8

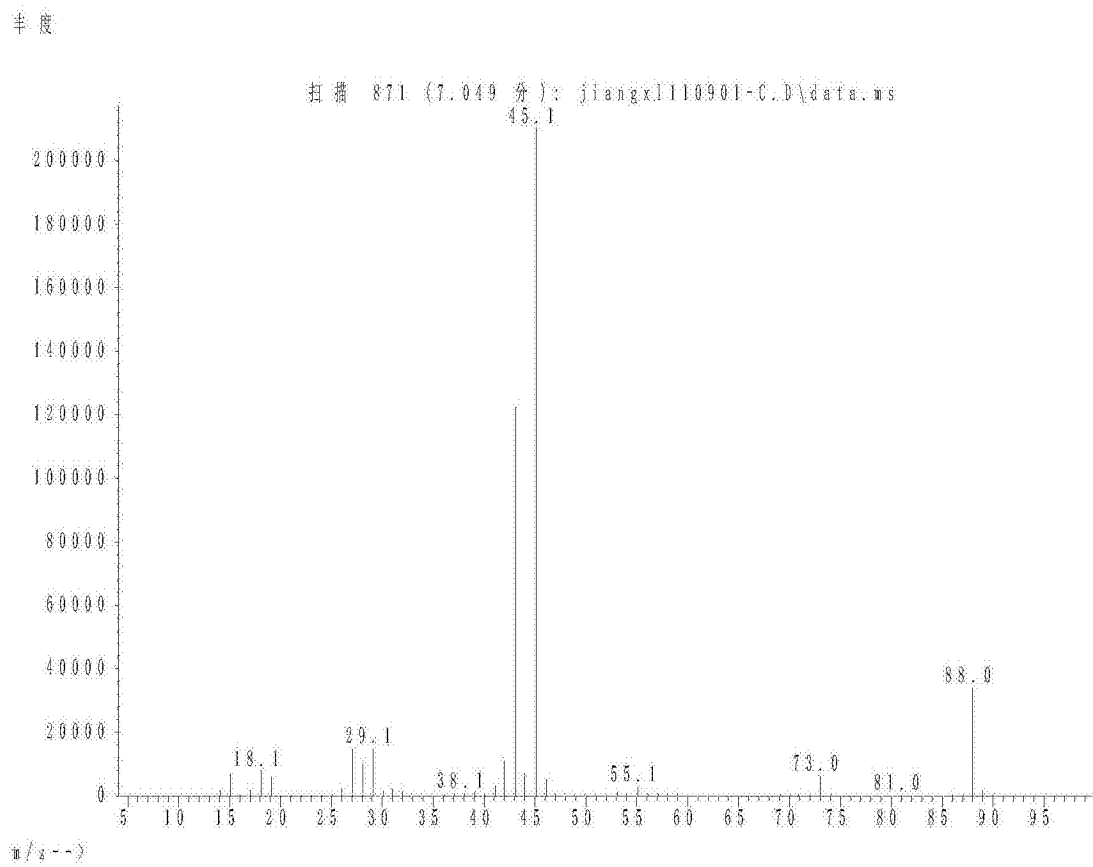


图9