

# 响应面法优化重组谷氨酸棒杆菌 G-BC 产脂肪酸的培养条件

杨青, 孙子羽, 满都拉, 王佳, 刘瑾, 金晶晶, 陈忠军

(内蒙古农业大学食品科学与工程学院, 呼和浩特 010018)

**摘要:**乙酰辅酶 A 羧化酶是谷氨酸棒杆菌中调控脂肪酸合成的关键酶。为了研究乙酰辅酶 A 羧化酶  $\alpha$  亚基 (accBC) 基因对脂肪酸合成的影响, 以 accBC 表达的菌株重组谷氨酸棒杆菌 G-BC 为材料, 研究了诱导剂异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 浓度、培养时间、培养温度对重组谷氨酸棒杆菌 G-BC 脂肪酸产量的影响, 并通过响应面法优化了重组谷氨酸棒杆菌 G-BC 产脂肪酸的培养条件, 同时与原始菌株脂肪酸产量进行了对比。结果表明: 重组谷氨酸棒杆菌 G-BC 产脂肪酸的最佳条件为诱导剂浓度 1 mmol/L、培养时间 20 h、培养温度 32 °C, 在此条件下脂肪酸产量为 34.56 mg/g (以菌体干质量计), 比原始菌株提高了 1.68 倍。说明乙酰辅酶 A 羧化酶  $\alpha$  亚基对于谷氨酸棒杆菌合成脂肪酸有促进作用。

**关键词:** 重组谷氨酸棒杆菌; 培养条件; 脂肪酸; 乙酰辅酶 A 羧化酶  $\alpha$  亚基

中图分类号: Q814; Q812

文献标识码: A

文章编号: 1003-7969(2022)07-0121-05

## Optimization of culture conditions for fatty acid production of recombinant *Corynebacterium glutamicum* G-BC by response surface methodology

YANG Qing, SUN Ziyu, Mandlaa, WANG Jia, LIU Jin, JIN Jingjing, CHEN Zhongjun

(College of Food Science and Engineering, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, China)

**Abstract:** Acetyl-CoA carboxylase is a key enzyme regulating fatty acid synthesis in *Corynebacterium glutamicum*. In order to study the effect of acetyl-CoA carboxylase  $\alpha$  subunit (accBC) gene on fatty acid synthesis, the recombinant *Corynebacterium glutamicum* G-BC (expression strain of accBC) was used as raw material, the effects of inducer (isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside, IPTG) concentration, culture time and culture temperature on the yield of fatty acid were studied. Moreover, the culture conditions for fatty acid production of recombinant *Corynebacterium glutamicum* G-BC were optimized by response surface methodology. The fatty acid yield of the original strain and the recombinant strain was also compared. The results showed that the optimal culture conditions were obtained as follows: inducer concentration 1 mmol/L, culture time 20 h, and culture temperature 32 °C. Under these conditions, the yield of fatty acid was 34.56 mg/g (based on dry weight of bacteria), which was 1.68 times higher than original strain. The accBC can promote the synthesis of fatty acid by *Corynebacterium glutamicum*.

**Key words:** recombinant *Corynebacterium glutamicum*; culture condition; fatty acid; acetyl-CoA carboxylase  $\alpha$  subunit

收稿日期: 2021-06-28; 修回日期: 2022-02-28

基金项目: 国家自然科学基金 (31860439); 高等院校质量与教学改革——研究生科研创新资助项目 (DC2000002104)

作者简介: 杨青 (1994), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品微生物与生物技术 (E-mail) 2078493387@qq.com。

通信作者: 陈忠军, 教授 (E-mail) nmndchen@163.com。

食用油的主要成分为脂肪酸甘油三酯, 脂肪酸是生物体内必需的有机物之一<sup>[1]</sup>, 是机体的重要供能物质。另外, 脂肪酸作为一种重要的平台化合物, 可进一步合成高能比生物燃料及高附加值油脂化学品<sup>[2-4]</sup>。目前, 微生物法合成脂肪酸因具有代谢产

物易分解、脂肪酸含量高优点,而被越来越多地用来生产特种脂肪酸,如 EPA 和 DHA<sup>[5-6]</sup>等。

目前,用于脂肪酸合成的微生物主要有酵母<sup>[7-8]</sup>、霉菌<sup>[9]</sup>、细菌<sup>[10-12]</sup>和藻类<sup>[13]</sup>等。但这些微生物合成脂肪酸的机制研究尚不成熟,因此探索高效环保的生物合成路线是今后脂肪酸合成的发展趋势<sup>[14]</sup>。谷氨酸棒杆菌作为一种重要的工业模式菌株,具有底物范围广、遗传背景清楚、易于工程调控、可高密度发酵等特点,已经成为微生物催化合成化学品和燃料的理想受体菌<sup>[15-16]</sup>,且其细胞壁不含脂多糖,有利于产物脂肪酸的分离纯化。但对谷氨酸棒杆菌的脂肪酸合成及转运调控机制研究尚不深入。

脂肪酸的合成主要包括 3 个过程:第一个过程是从葡萄糖出发,经糖酵解作用和三羧酸循环,为机体脂肪酸合成提供底物乙酰辅酶 A;第二个过程是苹果酸酶催化苹果酸脱羧转化生成丙酮酸,并释放 NADPH,是脂肪酸合成的主要动力来源;第三个过程是经脂肪酸从头合成,乙酰辅酶 A 在脂肪酸合成酶系(FAS)的催化下转化生成脂酰辅酶 A,脂酰辅酶 A 在硫酯酶 TesA 的水解作用下,释放出游离脂肪酸<sup>[17]</sup>。乙酰辅酶 A 羧化酶  $\alpha$  亚基是编码脂肪酸合成途径中乙酰辅酶 A 羧化酶的关键基因之一<sup>[18]</sup>,但目前对于该基因的研究较少。本实验室在前期的研究工作中已经构建了乙酰辅酶 A 羧化酶  $\alpha$  亚基(*accBC*)的表达菌株重组谷氨酸棒杆菌 G-BC,本研究通过响应面法优化该重组菌株产脂肪酸的培养条件,通过对比其与原始菌株脂肪酸产量的差异确定 *accBC* 基因对脂肪酸合成的影响,从而为后续通过基因优化构建脂肪酸高产菌株奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

#### 1.1.1 供试菌种

含 pXMJ19-*accBC* 重组质粒的重组谷氨酸棒杆菌菌株 G-BC,谷氨酸棒杆菌 ATCC 13032 (*Corynebacterium glutamicum*),均由本实验室构建和保存。

#### 1.1.2 培养基及试剂

LB 培养基:酵母提取粉(5 g/L)、胰蛋白胨(10 g/L)、氯化钠(10 g/L),必要时添加 25 ng/ $\mu$ L 的氯霉素抗生素,购自广东环凯微生物科技有限公司。十一烷酸甲酯,购自美国 Sigma 公司。

#### 1.1.3 仪器与设备

H3018DR 高速冷冻离心机,上海知信实验仪器

技术有限公司;LGJ-18S 冷冻干燥机,河南兄弟仪器设备有限公司;Clams680 气相色谱仪,珀金埃尔默仪器有限公司;NanoDrop 2000 超微量分光光度计,美国 Thermo Fisher Scientific 公司。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 重组谷氨酸棒杆菌 G-BC 的培养

取重组谷氨酸棒杆菌 G-BC 甘油保藏菌,在含氯霉素的抗性平板上划线培养。提取单菌落于含 25 ng/ $\mu$ L 氯霉素的 LB 液体培养基中,30℃、180 r/min 条件下过夜培养。取上述培养液作为种子培养液,按照 4% 的接种量转接至 LB 液体培养基(含氯霉素 25 ng/ $\mu$ L)中,30℃ 振荡培养至 OD<sub>600</sub> 约为 0.6,分别添加诱导剂异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷(IPTG)至一定终浓度,于一定温度下诱导培养一定时间,离心收集菌体,冷冻干燥,测定菌体中脂肪酸产量。

#### 1.2.2 脂肪酸产量的测定

采用气相色谱内标(十一烷酸甲酯)法测定菌体的脂肪酸产量。

甲酯化:称取约 0.12 g 菌粉,加入 4 mL 正己烷-异丙醇(体积比 3:2)溶液、2 mL 6.25% 的 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 溶液,室温、5 300 r/min 下离心 20 min。取上清液于 20 mL 水解管中,用氮气吹干。加入 2 mL 2% 氢氧化钠甲醇溶液,在 50℃ 水浴 15 min,冷却后加入 2 mL 10% 盐酸甲醇溶液,在 80℃ 水浴 1.5 h。冷却到室温,加入 3 mL 超纯水和 6 mL 正己烷,振荡,静置或离心分层。吸取上层液体(尽量吸净),定容至 10 mL,加无水 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 干燥后,待气相色谱分析。

色谱条件:DB-WAX 石英毛细管色谱柱(30 m  $\times$  0.32 mm  $\times$  0.25  $\mu$ m);柱箱升温程序为起始温度 120℃,保持 5 min,以 5℃/min 的速率升到 225℃,保持 1 min,以 8℃/min 的速率升到 240℃,保持 5 min;氢火焰离子化检测器(FID)温度 260℃;进样口汽化温度 260℃;载气(N<sub>2</sub>)流速 1.0 mL/min;氢气流速 45 mL/min;空气流速 450 mL/min;进样量 1.0  $\mu$ L。

## 2 结果与讨论

### 2.1 单因素试验

#### 2.1.1 诱导剂浓度对重组谷氨酸棒杆菌 G-BC 脂肪酸产量的影响

在培养温度 30℃、培养时间 20 h 条件下对重组谷氨酸棒杆菌 G-BC 进行培养,分析不同诱导剂浓度(0.5、1、1.5、2、2.5 mmol/L)对重组谷氨酸棒杆菌 G-BC 脂肪酸产量的影响,结果见图 1。

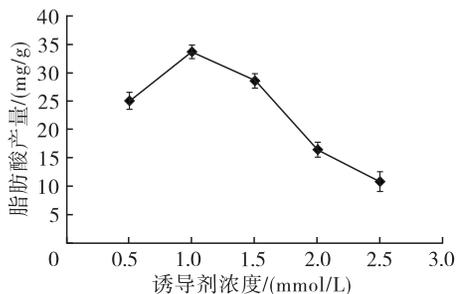


图1 诱导剂浓度对重组谷氨酸棒杆菌 G-BC 脂肪酸产量的影响

由图1可知,在0.5~1 mmol/L范围内,随着诱导剂浓度的增加,脂肪酸产量提高,诱导剂浓度为1 mmol/L时脂肪酸产量达到最高,随着诱导剂浓度的继续提高,脂肪酸产量大幅度降低。诱导剂浓度的提高并不对应着脂肪酸产量的提高,这是由于IPTG对微生物细胞有一定的毒性作用,IPTG终浓度过高和过低均不利于脂肪酸的积累。因此,选择诱导剂浓度为1 mmol/L。

### 2.1.2 培养时间对重组谷氨酸棒杆菌 G-BC 脂肪酸产量的影响

在诱导剂浓度1 mmol/L、培养温度30℃条件下对重组谷氨酸棒杆菌 G-BC 进行培养,分析不同培养时间(12、16、20、24、28 h)对重组谷氨酸棒杆菌 G-BC 脂肪酸产量的影响,结果见图2。

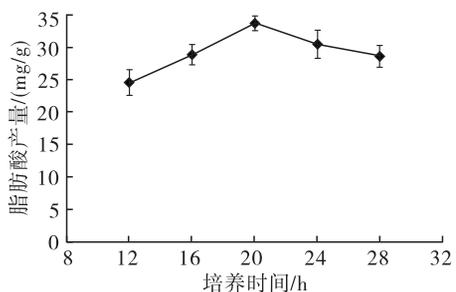


图2 培养时间对重组谷氨酸棒杆菌 G-BC 脂肪酸产量的影响

由图2可知,随着培养时间的延长脂肪酸产量呈线性增加,在20 h时达到最高,随后略微降低。这是由于在微生物生长的稳定期后期脂肪酸作为一种营养物质而被消耗。因此,选择培养时间为20 h。

### 2.1.3 培养温度对重组谷氨酸棒杆菌 G-BC 脂肪酸产量的影响

在诱导剂浓度1 mmol/L、培养时间20 h条件下对重组谷氨酸棒杆菌 G-BC 进行培养,分析不同培养温度(26、28、30、32、34℃)对重组谷氨酸棒杆菌 G-BC 脂肪酸产量的影响,结果见图3。

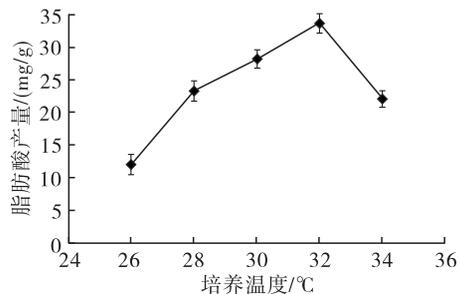


图3 培养温度对重组谷氨酸棒杆菌 G-BC 脂肪酸产量的影响

温度是影响微生物生长最重要的因素之一,在微生物的代谢过程中也会影响相关酶的活力,从而改变功能酶的作用,影响脂肪酸的合成。从图3可知,培养温度升高,脂肪酸产量增加,在培养温度为32℃时脂肪酸产量最大,之后脂肪酸产量直线下降,这可能是由于过高的温度降低了酶的活性,最终降低了脂肪酸产量。因此,选择培养温度为32℃。

### 2.2 响应面试验

根据单因素试验结果,以诱导剂浓度(A)、培养时间(B)、培养温度(C)为自变量,脂肪酸产量(Y)为响应值,采用Box-Behnken法进行三因素三水平的响应面试验设计,对重组谷氨酸棒杆菌 G-BC 产脂肪酸的培养条件进行优化。响应面试验因素及水平见表1,响应面试验设计及结果见表2。

表1 响应面试验因素及水平

水平	诱导剂浓度/(mmol/L)	培养时间/h	培养温度/°C
-1	0.5	16	30
0	1.0	20	32
1	1.5	24	34

表2 响应面试验设计及结果

试验号	A	B	C	Y/(mg/g)
1	1	-1	0	29.79
2	0	0	0	33.78
3	0	1	1	29.88
4	0	-1	1	29.23
5	1	0	1	29.88
6	0	0	0	33.56
7	1	1	0	29.07
8	0	0	0	33.91
9	-1	1	0	26.89
10	0	0	0	33.69
11	-1	0	1	27.17
12	-1	0	-1	27.42
13	1	0	-1	28.98
14	0	-1	-1	29.99
15	0	0	0	33.47
16	0	1	-1	29.54
17	-1	-1	0	27.86

利用 Design - Expert 8.0 软件,对表 2 中 3 个因素进行二次多项回归拟合,得到多元二次回归方程: $Y = 33.68 + 1.05A - 0.19B + 0.029C + 0.063AB + 0.29AC + 0.27BC - 3.29A^2 - 1.99B^2 - 2.03C^2$ 。对回归模型进行方差分析,结果见表 3。

表 3 方差分析

方差来源	平方和	自由度	均方	F	p
模型	97.90	9	10.88	106.60	<0.000 1
A	8.78	1	8.78	86.02	<0.000 1
B	0.28	1	0.28	2.72	0.143 1
C	6.61E-003	1	6.61E-003	0.07	0.806 4
AB	0.02	1	0.02	0.15	0.707 2
AC	0.33	1	0.33	3.24	0.114 9
BC	0.30	1	0.30	2.96	0.128 8
A <sup>2</sup>	45.53	1	45.53	446.22	<0.000 1
B <sup>2</sup>	16.69	1	16.69	163.57	<0.000 1
C <sup>2</sup>	17.37	1	17.37	170.20	<0.000 1
残差	0.71	7	0.10		
失拟项	0.59	3	0.20	6.51	0.051 1
误差	0.12	4	0.03		
总和	98.61	16			

注: $p < 0.05$  为显著, $p < 0.01$  为极显著

该方程复相关系数( $R^2$ )为 0.992 8,校正决定系数( $R_{Adj}^2$ )为 0.983 4,因此该方程能够明确地描述独立变量对脂肪酸产量的影响。由表 3 可知,模型 F 值为 106.60, $p < 0.000 1$ ,表示模型极显著,可以用来分析影响脂肪酸产量的因素。二次项  $A^2$ 、 $B^2$ 、 $C^2$  对于脂肪酸产量的影响极显著;交互项 AB、AC、BC 均不显著;一次项 A 影响极显著,B、C 影响不显著,3 个因素对于脂肪酸产量的影响大小依次为诱导剂浓度 > 培养时间 > 培养温度。

通过响应面模型优化,得到重组谷氨酸棒杆菌 G - BC 产脂肪酸的最优培养条件为诱导剂浓度 1.04 mmol/L、培养时间 19.83 h、培养温度 32.03 °C,在此条件下模型预测脂肪酸产量为 33.76 mg/g。为了便于操作,修正培养条件为诱导剂浓度 1 mmol/L、培养时间 20 h、培养温度 32 °C,在此条件下进行 3 组平行验证试验,平均脂肪酸产量可达 34.56 mg/g,与模型的预测值接近,说明该模型可靠。

前期试验得到谷氨酸棒杆菌 ATCC 13032 的脂肪酸产量为 12.88 mg/g,而在最优培养条件下重组谷氨酸棒杆菌 G - BC 的脂肪酸产量为 34.56 mg/g,比原始菌株增加了 1.68 倍,说明 *accBC* 基因的引入能够增加谷氨酸棒杆菌脂肪酸产量。

### 3 结论

本研究探究了诱导剂浓度、培养时间、培养温度对于重组谷氨酸棒杆菌 G - BC 脂肪酸产量的影响,然后通过响应面法得到重组谷氨酸棒杆菌产脂肪酸的最佳培养条件为诱导剂 IPTG 浓度 1 mmol/L、培养时间 20 h、培养温度 32 °C,在此条件下重组菌株的脂肪酸产量为 34.56 mg/g(以菌体干质量计),比原始菌株提高了 1.68 倍。说明乙酰辅酶 A 羧化酶  $\alpha$  亚基基因对于谷氨酸棒杆菌中脂肪酸的合成起到促进作用。本研究为后续通过共表达脂肪酸合成途径中的多基因(如脂肪酸合酶、硫酯酶等)来构建脂肪酸高产菌株提供了理论依据。

### 参考文献:

- [1] 张静. 高山被孢霉发酵生产多不饱和脂肪酸的初步研究[D]. 江苏 无锡:江南大学,2011.
- [2] 余永红,马建荣,王海洪. 细菌脂肪酸合成多样性的研究进展[J]. 微生物学杂志,2016,36(4):76-83.
- [3] LENNEN R M, BRADEN D J, WEST R M, et al. A process for microbial hydrocarbon synthesis: overproduction of fatty acids in *Escherichia coli* and catalytic conversion to alkanes[J]. Biotechnol Bioeng,2010,106(2):193-202.
- [4] 刘天罡. 微生物脂肪酸合成系统的潜能挖掘与释放[C]//第七届中国工业生物技术发展高峰论坛论文集. 天津:中国生物工程学会科技部,2013.
- [5] UKEY R, HOLMES W E, BAJPAI R, et al. Evaluation of thioesterases from *Acinetobacter baylyi* for production of free fatty acids[J]. Can J Microbiol, 2017, 63(4):321-329.
- [6] REIS A, GOUVEIA L, VELOSO V, et al. Eicosapentaenoic acid - rich biomass production by the microalga *Phaeodactylum tricornutum* in a continuous - flow reactor[J]. Bioresour Technol, 1996,55(1):83-88.
- [7] RATLEDGE C, WYNN J P. The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms [J]. Adv Appl Microbiol, 2002,51:1-52.
- [8] 施安辉,周波. 粘红酵母 GLR513 生产油脂最佳小型工艺发酵条件的探讨[J]. 食品科学,2003,24(1):48-51.
- [9] PAPANIKOLAOU S, KOMAITIS M, AGGELIS G. Single cell oil (SCO) production by *Mortierella isabellina* grown on high - sugar content media [J]. Bioresour Technol, 2004,95(3):287-291.
- [10] UEFENG L, HARMIT V, CHAITAN K. Overproduction of free fatty acids in *E. coli*: implications for biodiesel production[J]. Metab Eng, 2008, 10: 333-339.
- [11] ZHANG F Z, CAROTHERS J M, KEASLING J D. Design of a dynamic sensor - regulator system for production of chemicals and fuels derived from fatty acids [J]. Nat Biotechnol, 2012, 30: 354-359.

(下转第 131 页)

