

## 高产稳产聚羟基烷酸的重组大肠杆菌的构建\*

田杰生 宋海琛 吴柏和 王珍芳 李季伦

(中国农业大学生物学院微生物系 北京 100094)

**提 要:**重组大肠杆菌 *Escherichia coli* HMS174(pTZ18U-PHB) 含有携带聚羟基烷酸(PHA)合成基因(*phaCAB*)\*\*的质粒 pTZ18U-PHB, 是很有潜力的 PHA 生产菌, 但存在着质粒不稳定和不能合成 3-羟基丁酸(3HB)与 3-羟基戊酸(3HV)共聚物[P(3HB-co-3HV)]的缺陷。将 RK2 质粒上的 *par DE* 基因引入 pTZ18U-PHB 构成质粒 pJMC2, 该质粒可以在宿主 *E. coli* HMS174 中稳定遗传。将培养基中的磷酸盐浓度降至 18 mmol/L, 发现 *E. coli* HMS174 (pJMC2)能够以丙酸为前体合成 P(3HB-co-3HV), 其中 3HV 在共聚物中的含量为 5%~8%。在 5L 自动发酵罐中分批补料培养 *E. coli* HMS174 (pJMC2), 培养基初始磷酸盐浓度为 15 mmol/L, 30 h 后每升培养液中干菌体可达 42.5 g, P(3HB-co-3HV)占干重的 70%, 其中 3HV 在共聚物中的含量为 4.9%。

**关键词:**聚羟基烷酸, 重组大肠杆菌, 质粒稳定性

**中图分类号:**Q784 **文献标识码:**A **文章编号:**0001-6209(2000)01-0026-31

聚羟基烷酸(PHA)是细菌碳源和能源的贮藏物质<sup>[1]</sup>, 在自然界中可被微生物降解成水和二氧化碳, 且具有热可塑性和生物相容性等特性<sup>[2]</sup>。随着废弃塑料污染的日益严重, 被国际社会公认生物可降解性塑料极具开发潜力<sup>[3]</sup>。

3-羟基丁酸(3HB)的同聚物(PHB)和 3HB 与 3-羟基戊酸(3HV)共聚物[P(3HB-co-3HV)]是两种最常见的 PHA<sup>[1]</sup>。相比之下, PHB 质地硬而脆, 难于加工, 而 P(3HB-co-3HV)则具有较好的强度和韧性, 发展前景优于 PHB<sup>[3]</sup>。

英国帝国化学工业公司(ICI)早在 80 年代就率先用发酵法培养真养产碱杆菌(*Alcaligenes eutrophus*)生产 PHB<sup>[2]</sup>, 至今发酵法仍是 PHA 最主要的生产方法<sup>[3]</sup>。由于 PHA 的生产成本远远高于聚丙烯等化学合成塑料, 所以限制了 PHA 的推广应用<sup>[3]</sup>。为此, 国际上许多实验室都在开展降低生产成本的研究<sup>[3]</sup>, 尝试之一是将指导真养产碱杆菌合成 PHA 的基因 *phaCAB* 装于载体质粒上, 引入大肠杆菌(*Escherichia coli*)<sup>[4]</sup>。与真养产碱杆菌相比, 转基因菌(亦称重组菌)具一些优点<sup>[5]</sup>, 但也有一些不足之处, 其中主要有:(1)由于含 *phaCAB* 的重组质粒在宿主细胞分裂时, 不易平均分配到两个子细胞中, 最终会产生丢失质粒的细胞, 降低 PHA 的产率。(2)目前尚无简便的方法使重组大肠杆菌合成 P(3HB-co-3HV)<sup>[4]</sup>。

\* 国家 863 计划资助项目(715-004-0200)

\*\* *phaCAB* 是由 *phaA*, *phaB* 和 *phaC* 组成的操纵元(operon), 它们分别编码  $\beta$ -酮硫解酶, 乙酰乙酰 CoA 还原酶和 PHA 合成酶<sup>[6]</sup>

作者简介:田杰生(1967-), 北京市人, 中国农业大学生物学院讲师, 硕士, 主要从事微生物学教学和研究工作

收稿日期:1998-09-18, 修回日期:1999-04-26

为了克服重组大肠杆菌的上述缺点,我们利用 RK2 质粒的 *par DE* 区段具有杀伤丢失该质粒的宿主细胞的功能<sup>[6]</sup>,将 *par DE* 引入含 *pha CAB* 的重组质粒,转移到大肠杆菌中,保证了几乎所有宿主细胞中都有重组质粒存在。此外,降低培养基中磷酸盐的浓度,可显著增加工程菌合成 P(3HB-co-3HV)的量,并在 5L 自动发酵罐中成功地合成了一定量的 P(3HB-co-3HV)。

1 材料和方法

1.1 菌株和质粒

所用的菌株和质粒见表 1。

表 1 菌种和质粒  
Table 1 Bacterial strains and plasmids

Strains and plasmids	Genotype	Source and reference
Strains		
<i>Escherichia coli</i> HMS174	<i>recA1 hsdR Rif<sup>r</sup></i>	Peng Xuexian
<i>Escherichia coli</i> JM107	<i>fsupE44 endA1 hsdR17 gyrA96 relal thi(lac-proAB)</i> F' [ <i>traD36 proAB + lacI<sup>q</sup>lacZ</i> △M15]	Our lab stock
Plasmids		
pTZ18U-PHB	Amp <sup>r</sup> , <i>phaCAB</i>	[4]
pMZ101	Amp <sup>r</sup> , <i>parDE</i>	Our lab stock
pGEM-7Zf(-)	Amp <sup>r</sup>	Promega
pGW101	Amp <sup>r</sup> , <i>par DE</i>	This work
pJMC2	Amp <sup>r</sup> , <i>phaCAB</i> , <i>parDE</i>	This work

1.2 培养基和培养条件

1.2.1 培养基:LB 培养基按文献[7]配制,有机种子培养基、摇瓶发酵培养基和发酵罐培养基均按 Ramsay 的方法配制<sup>[8]</sup>,摇瓶发酵培养基中丙酸浓度为 4mmol/L,发酵罐培养基中的丙酸采用流加方式,总加入量为 27mmol/L,在培养 *E. coli* JM107(pTZ18U-PHB)时培养基中还需加入 10 μg/L 的硫酸素。

1.2.2 培养条件:培养温度均为 37℃,接种量均为 10%。摇床培养时,500mL 三角瓶中装 100mL 培养基,摇床转速为 220 r/min。发酵罐培养时,采用日本丸菱公司 MD-300 型 5L 自动发酵罐,实际装量 3.5L,用 14% 的氨水或 10mol/L KOH 溶液调节 pH 值为 6.80±0.02,糖浓度控制在 1.0%~3.0%,在对数生长期,铵离子浓度维持于 60mmol/L;以后逐渐降至 7.5mmol/L。溶氧(D.O.)维持于 30%~50%。整个过程中用蠕动泵流加丙酸。

1.3 方法

1.3.1 DNA 操作技术:质粒 DNA 的提取、纯化、转化、限制性内切酶解、DNA 片段的连接、回收、琼脂糖凝胶电泳,均按常规方法<sup>[7]</sup>进行。所有酶及试剂购于华美生物工程公司。

1.3.2 菌体密度测定:培养液用生理盐水稀释后,在波长 600nm 处测 OD 值或用菌体干重表示。

1.3.3 葡萄糖浓度的测定:采用 3,5-二硝基水杨酸法<sup>[9]</sup>。

1.3.4 铵离子浓度的测定:采用靛酚蓝比色法<sup>[10]</sup>。

**1.3.5 PHA 的检测和提取:**将重组菌的培养液离心收集菌体,制成干细胞粉<sup>[11]</sup>。然后把细胞粉在酸化的甲醇氯仿溶液中 90℃ 回馏 3h,进行甲酯化<sup>[12]</sup>,用毛细管柱气相色谱法测定 PHA 的含量和组分。气相色谱仪为北京分析仪器厂 2305 型,色谱柱为该厂 6643 型毛细管柱(长 25m)。载气为高纯氮气,进样量 0.5μL,P(3HB-co-3HV)标准品为 Aldrich 公司产品,其余条件与参考文献[8]相同。3HB、3HV 和内标(苯甲酸)的保留时间分别为 3.4、4.5 和 6.8min。

PHA 的提取和核磁共振测定参见参考文献[12]。

2 实验结果

2.1 重组质粒和重组菌的构建

**2.1.1 *E. coli* JM107(pTZ18U-PHB)和 *E. coli* HMS174(pTZ18U-PHB)的构建:**美国的 Dennis 等将真养产碱杆菌的 *phaCAB* 克隆于载体质粒 pTZ18U 上,构成质粒 pTZ18U-PHB。该质粒转化进入大肠杆菌后,*phaCAB* 可组成型表达<sup>[5]</sup>。我们将 pTZ18U-PHB 分别转入大肠杆菌 JM107 和 HMS174,形成两株重组大肠杆菌。

**2.1.2 pJMC2 和 *E. coli* HMS174(pJMC2)的构建:** pTZ18U-PHB 不含质粒主动分配机制,欲使其在大肠杆菌中稳定遗传,通常是在培养基中加入一定量的氨苄青霉素(Amp)用以杀伤不含该质粒的宿主细胞,这会增加生产成本。利用 *parDE* 的产物杀伤不含该质粒的宿主细胞,我们采用了将 *parDE* 基因片段与质粒 pTZ18U-PHB 重组的技术路线。由于 *parDE* 两端的酶切位点为 *Kpn* I 和 *Bam* HI,而 *phaCAB* 内也有 *Kpn* I 位点,不便于操作,故我们先将 *parDE* 片段用 *Kpn* I 和 *Bam* HI 切下,转移至质粒 pGEM-7Zf(-)的相应位点上,构成质粒 pGW101。这个质粒在

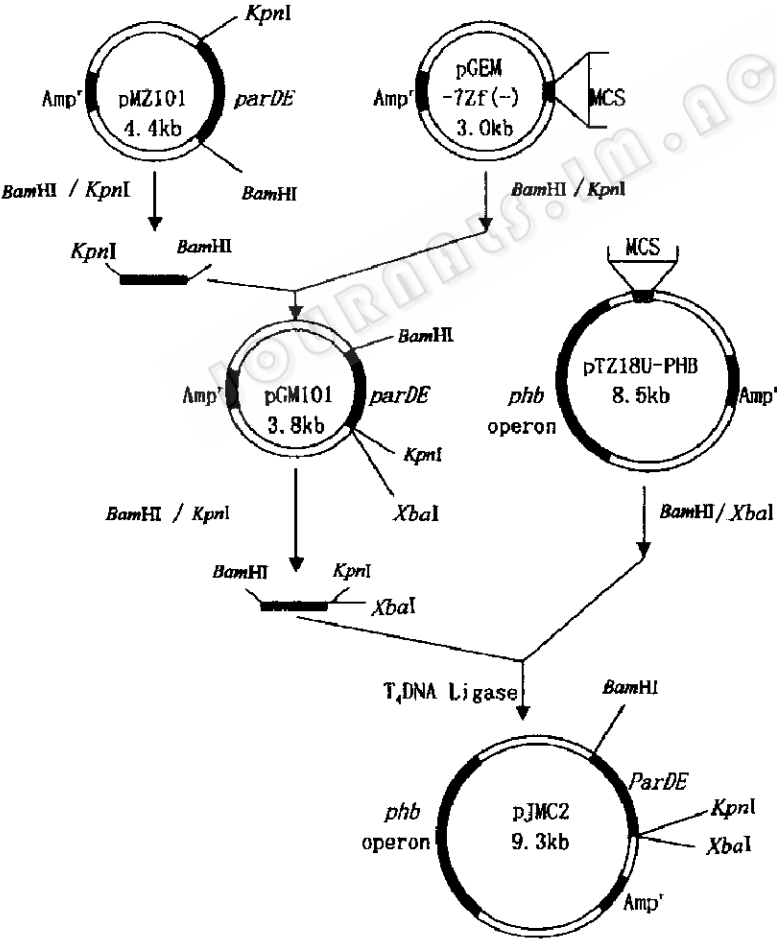


图1 质粒 pJMC2 的构建

Fig. 1 Construction of plasmid pJMC2

*Kpn*I 位点旁又提供了一个 *Xba*I 位点,因此再用 *Bam*HI 和 *Xba*I 切下 *parDE* 片段,转移至质粒 pTZ18U-PHB 的相应位点上,构成质粒 pJMC2(见图 1),将该质粒转化大肠杆菌 HMS174,构成重组菌 *E. coli* HMS174(pJMC2)。

2.1 质粒稳定性测定

2.2.1 在 LB 培养基中质粒稳定性的测定:将 *E. coli* HMS174(pJMC2)和 *E. coli* MS174(pTZ18U-PHB)分别接种于含 50μg/mL Amp 的 5mL 种子培养液中,摇床培养过夜,各取 25μL 接入 5mL LB 培养液中,继续培养,在不同的时间取样,以适当的稀释度涂 LB 平板,培养后,取 100 个菌落点种含 50μg/mL Amp 的 LB 平板上,培养 24h 后,统计生长情况。两株菌测定的结果见表 2。

从以上结果看出,由于 *parDE* 基因的引入,pJMC2 在 *E. coli* HMS174 中的稳定性显著增加。

2.2.2 在摇瓶发酵培养基中质粒稳定性的测定:将新鲜的 *E. coli* HMS174(pJMC2)和 *E. coli* HMS174(pTZ18U-PHB)菌落分别接种于含 50μg/mL Amp 的种子培养液中。摇床培养 8h 后,将 *E. coli* HMS174(pJMC2)接入不含 Amp 的发酵培养基,*E. coli* HMS174(pTZ18U-PHB)分别接入含 100μg/mL Amp 的发酵培养基和不含 Amp 的发酵培养基中。用 2.2.1 中的方法测定质粒的稳定性,重复 3 次后的平均值见表 3。

表 2 pTZ18U-PHB 和 pJMC2 在宿主 *E. coli* HMS174 中的稳定性(在 LB 培养基中)

Table 2 Stability of plasmids pTZ18U-PHB and pJMC2 in LB medium									
<i>t</i> /h	10	20	25	30	35	40	45	50	
pTZ18U-PHB/%	95	73	60	50	30	12	10	5	
pJMC2/%	ND	100	100	100	100	100	95	95	

ND: Not detected.

表 3 pTZ18U-PHB 和 pJMC2 在宿主 *E. coli* HMS174 中的稳定性(在发酵摇瓶培养基中)

Table 3 Stability of plasmids pTZ18U-PHB and pJMC2 in fermentation medium			
Plasmid	Medium	OD <sub>600</sub>	Stability/%
pTZ18U-PHB	100μg/ml Amp	25.0	40
	Without Amp	22.5	32
pJMC2	Without Amp	21.5	100

由表 3 可见,在发酵摇瓶培养基(只含糖和无机盐)中,*parDE* 同样具有使质粒稳定的作用。

2.3 磷酸盐浓度对 P(3HB-co-3HV)合成的影响

通常在培养大肠杆菌的无机培养基(如 M9 培养基)中,重组大肠杆菌不能利用丙酸等前体合成 P(3HB-co-3HV)<sup>[9]</sup>,本实验发现这主要是和其中的磷酸盐浓度过高(70mmol/L)有关。当培养基中的磷酸盐含量降至 36mmol/L 时重组菌便可以合成(3HB-co-3HV),且随着磷酸盐浓度下降,重组菌合成的 P(3HB-co-3HV)中 3HV 的比例也明显增加(表 4)。

2.4 5L 发酵罐中的批式补料培养

为了验证上述结论并探究重组大肠杆菌用于实际生产的可能性,我们在 5L 自动发酵罐中分别对 *E. coli* HMS174(pTZ18U-PHB)和 *E. coli* HMS174(pJMC2)进行了批式补料培养。分别挑取新鲜的 2 个重组菌菌落,接种有机种子培养基,当 OD<sub>600</sub>在 3~5 时,接种发酵罐培养基。其中 *E. coli* HMS174(pTZ18U-PHB)培养基中加 Amp 至 100mg/L。罐中磷酸盐起始浓度为 15.4mmol/L。在培养过程中,按 1.22 中所述要求控制发酵条

表 4 磷酸盐浓度对重组菌合成 P(3HB-co-3HV)的影响\*

Table 4 Effect of Phosphate Concentration on P(3HB-co-3HV) Production

Recombination Strains	Initial phosphate concentration/(mmol/L)	Final DCW /(g/L)	Amt of 3HV /(mg/mg of DCW)**	3HV/P(3HB-co-3HV) /(%)
<i>E. coli</i> JM107 (pTZ18U-PHB)	36	5.07	0.024	2.6
	18	5.33	0.065	7.9
<i>E. coli</i> HMS174 (pTZ18U-PHB)	36	6.37	0.014	2.2
	18	7.83	0.047	5.3
	7.2	7.3	0.099	11.4

\* Amp is added to the medium up to the concentration of 50μg/mL; \*\* Amt: Average miligrams in dry cell weight; DCW: Dry cell weight

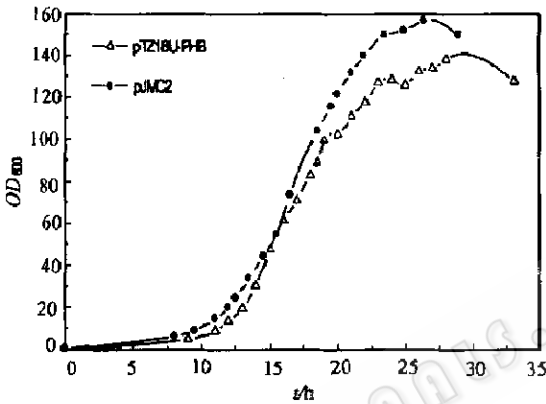


图 2 *E. coli* HMS174(pTZ18U-PHB)和 *E. coli* HMS174(pJMC2)批式补料培养  
Fig.2 Fed-batch culture of *E. coli* HMS174(pTZ18U-PHB) and *E. coli* HMS174(pJMC2)

件。经 30h 左右培养, *E. coli* HMS174(pTZ18U-PHB)的发酵液中干菌体密度达 36g/L, 其中每克干菌体含 P(3HB-co-3HV) 0.64g。在共聚物中, 3HB 占 94.5%, 3HV 占 5.5%; *E. coli* HMS174(pJMC2)的发酵液中干菌体密度达 42.5g/L, 其中每克干菌体含 P(3HB-co-3HV) 0.7g, 在共聚物中 3HB 占 95%, 3HV 约占 5%(见图 2)。

从上述结果中可以看出, *E. coli* HMS174(pJMC2)培养过程中虽然没有加入 Amp, 但其细胞干重和 P(3HB-co-3HV)含量均略高于 *E. coli* HMS174(pTZ18U-PHB), 可见在发酵罐上培养时 *parDE* 基因仍然有稳定作用。

参 考 文 献

[1] Steinbuechel A, Valentin H E. *FEMS Microbiol Lett*, 1995, 128:219~228.  
[2] Homes P A. *Phys Technol*, 1985, 16: 32~36.  
[3] Poirier Y, Nawrath C, Somerville C. *Bio/technol*, 1995, 13:142~150.  
[4] Rhee H G, Dennis D. *Appl Environ Microbiol*, 1995, 61: 2487~2492.  
[5] Steinbuechel A, Schlegel H G. *Microbiol*, 1991, 5(3):535~542.  
[6] Sobecky D A, Easter C L, Bear P D, et al. *J Bacteriol*, 1996, 178: 2086~2093.  
[7] Sambrook S, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Lab, 1989.  
[8] Ramsay B A, Lomaliza K, Chavarie C, et al. *Appl Environ. Microbiol*, 1990, 57(7):2093~2098.  
[9] Miller G L. *Anal Chem*, 1995, 31: 426.  
[10] 李西开. 土壤农业化学常规分析方法. 北京: 科学出版社, 1983. 86~88.  
[11] 田杰生, 李季伦. 生物工程学报, 1997, 13(3):298~303.  
[12] Huijberts G N M, et al. *Appl Environ Microbiol*, 1992, 58(2):536~544.

## THE CONSTRUCTION OF A RECOMBINED *E. COLI* STRAIN WITH STABLE AND HIGH PRODUCTION OF POLY(3- HYDROXYBUTYRATE-CO-3-HYDROXYVALERATE) \*

Tian Jiasheng Song Haichen Wu Baihe Wang Zhenfang Li Jilun

(Department of Microbiology, China Agricultural University, Beijing 100094)

**Abstract:** Plasmid pJMC2 was constructed by cloning the *parDE* fragment of RK2 into pTZ18U-PHB which harbored *phaCAB* from *Alcaligenes eutrophus* and was transferred into *E. coli* HMS174 and *E. coli* JM107 separately. It is very stable in its hosts cultured in medium without ampicillin. *E. coli* HMS 174(pTZ18U-PHB) and *E. coli* JM107(pTZ18U-PHB) produced P(3HB-co-3HB) in a low phosphate concentration medium (18mmol/L). The proportion of 3-hydroxyvalerate(3HV) in the polymer was 5%~8%. A fed-batch culture of *E. coli* HMS174(pJMC2) was conducted in a 5L automatically controlled fermentor, the final dry cell weight, P(3HB-co-3HV) content, and the 3HV proportion were 42.5g/L, 70% and 4.9% respectively.

**Key words:** Polyhydroxyalkanoate, Recombined *E. coli*, Stability of plasmid

\* Project of Chinese National Programs for High Technology Research and development(715-004-0200)

### 《微生物学报》第七届编辑委员会名单

The Seventh Editorial Board of Acta Microbiologica Sinica

顾 问 张树政

主 编 李季伦

副主编 陆德如 朱关福 李阜棣 王敦全 谭华荣

编 委 王修垣 邓子新 田 波 刘志恒 朱庆裴 孙志浩 李焕姿

陈世平 陈永青 杨苏声 周培瑾 范云六 范孝用 钱新民

钱世钧 诸葛健 徐怀恕 翟中和

编 辑 戈苏国 刘玉方