

利用基因工程菌 VG1(pTU14)产聚 β -羟基丁酸酯的研究*

于慧敏¹ 尹 进¹ 李红旗¹ 杨胜利² 沈忠耀¹

(¹ 清华大学化工系 生物化工研究所 北京 100084)

(² 中国科学院上海生物工程研究中心 上海 200233)

摘 要 本文对透明颤菌血红蛋白基因(*vgb*)和 λ 噬菌体裂解基因(*SRRz*)在不同宿主大肠杆菌中的外源表达及其在聚 β -羟基丁酸酯(PHB)生产中的应用进行了研究。实验结果表明,同时携带 *vgb*、*SRRz* 和 *phbCAB* 三种基因的产 PHB 基因工程菌 VG1(pTU14)经过 82h 的摇瓶补料分批培养,菌体浓度可以高达 25.9g/L,PHB 百分含量则可在 52h 时达到 95% 以上,此外,该菌株不仅可以实现摇瓶高密度发酵培养和 PHB 产品的大量积累,还可以同时实现菌体细胞的可诱导裂解破壁,因此是一株具有潜在工业应用价值的多功能 PHB 生产菌株。

关键词 透明颤菌血红蛋白基因, λ 噬菌体裂解基因, 聚 β -羟基丁酸酯, 高密度发酵, 可诱导裂解

中图分类号: Q939.9 文献标识码: A 文章编号: 1001-6209(2000)03-0284-89

近年来,世界各国政府、科研机构和环保部门越来越密切关注由塑料垃圾引起的“白色污染”问题。聚 β -羟基丁酸酯(Poly- β -hydroxybutyrate, PHB)正是在这种情况下发展起来的一类由微生物合成的新型可降解高分子材料。然而,PHB 产品的高成本却限制了它的大规模生产和广泛应用^[1,2]。

革兰氏阴性专性好氧菌—透明颤菌(*Vitreoscilla*)于微氧条件下可以合成一种类似于血红蛋白的胞内可溶物质,即为透明颤菌血红蛋白(*Vitreoscilla* Hemoglobin, VHb)。它能够从分子水平上提高 VHb 基因(*vgb*)克隆菌对氧气的利用能力,在限氧条件下促进细胞生长和产物合成,从而大幅度提高发酵过程中目的产物的产量和收率,且不需要附加的设备投资^[3~5]。因此,利用 VHb 在其它菌种中进行外源表达这一基因策略来解决好氧生物发酵过程中的供氧问题具有极大的科研意义,并可能带来巨大的经济效益。此外,要应用 PHB,首先必须将它从细胞内分离提取出来。随着基因工程技术的日益发展,利用生物技术破壁的方法越来越受到人们的重视^[6,7]。本所尹进博士成功地克隆了 λ 噬菌体裂解基因(*SRRz*),构建出 PHB 合成基因(*phbCAB*)以及 λ 噬菌体裂解基因(*SRRz*)能够同时有效表达的新质粒 pTU14,从而实现了在大量收获 PHB 产品基础上的菌体细胞可诱导裂解破壁。

本文将上游的基因工程技术与下游的发酵和后处理技术结合起来,成功地构建了同时表达透明颤菌血红蛋白合成基因(*vgb*)和 λ 噬菌体裂解基因(*SRRz*)的产 PHB 新菌

* 国家“九五”攻关项目(96-C03-03-02),国家自然科学基金重点项目(29834103),国家自然科学基金面上资助项目(29876021)

作者简介: 于慧敏(1973-),女(满族),辽宁,清华大学博士研究生,主要从事生物化工研究

收稿日期: 1999-01-25,修回日期: 1999-06-25

株 ,并对其细胞生长和 PHB 积累特性及其诱导裂解特性进行了研究。

1 材料和方法

1.1 菌株和质粒

实验用菌株和质粒见表 1^[8] :

表 1 菌株和质粒
Table 1 Plasmids and strains

Plasmid/Strain	Relevant genotype	Source
Plasmids		
pUC18- <i>SRRz</i>	<i>SRRz</i> <i>Ap</i> ^r	This lab.
pTZ18u-PHB	<i>phbCAB</i> <i>Ap</i> ^r	Prof. Li Jilun
pTU14	<i>phbCAB SRRz</i> <i>Ap</i> ^r	This lab.
<i>E. coli</i> strains		
JM105	<i>supE endA sbcB15 hsdR4 rpsL thiΔ (lac-proAB)</i>	This lab.
JM109	<i>F[traD36 proAB⁺ lacI^q lacZΔM15]</i> <i>RecA1 supE44 endA1 hsdR17 gyrA96 relA1 thi</i>	This lab.
VG1	<i>Δ(lac-proAB) F[traD36 proAB⁺ lacI^q lacZΔM15]</i> <i>endA1 hsdR supE sbcB15 Δlac thr⁻ vgb⁺</i>	Prof. Yang Shengli

1.2 分析方法

菌体培养液浊度测定 ,采用分光光度法 ;PHB 含量定量测定 ,采用硫酸降解法^[9] ;定性检测则用结晶紫染色法 ,菌液中葡萄糖含量的测定 ,采用 3 ,5-二硝基水杨酸法^[10]。

1.3 试剂和培养基

实验中所用培养基均为 LB 培养基或含葡萄糖的 LBG 培养基(LB 培养基 + 20g/L 葡萄糖) ,相应抗生素(氨苄青霉素 ,*Ap*)浓度为 100μg/mL ;在补料分批培养过程中 ,补料用单独灭菌葡萄糖浓度为 500g/L ,补料时加入培养基中的相应糖浓度为 10g/L。

1.4 培养条件

试管培养为在 5mL 含抗生素 *Ap*(100μg/mL)的 LB 或 LBG 培养基中接入一个单菌落 ,在 250r/min 37℃ 摇床上培养 10h。摇瓶培养时把前面的试管培养液作为种子培养液 ,以 1% 的接种量接种于含相应抗生素(*Ap* ,100μg/mL)的 100mL LBG 培养基中 ,摇瓶容积为 300mL ;在 250r/min 37℃ 的摇床上培养。

1.5 菌体细胞的收获及裂解

培养到稳定期的细胞培养液 ,以 4000~6000r/min 的转速离心 10min ,收集细胞。将收获的细胞重悬于诱导剂 EDTA(2mmol/L ,pH8.0)溶液中 ,250r/min 37℃ 振荡混合一定时间 ,6000r/min 离心 10min ,再次收集沉淀 ,即得纯度较高的 PHB 产品。

2 结果和讨论

2.1 质粒 pTU14、pTZ18u-PHB 和 pUC18-*SRRz* 在不同宿主菌中的表达

为验证裂解基因在不同宿主菌中的表达效果以及裂解基因、透明颤菌血红蛋白基因和 PHB 基因的同时表达对菌体生长和 PHB 积累的影响 ,本文选取了三种宿主大肠杆菌进行比较培养 ,分别 *E. coli* JM105 ,*E. coli* JM109 和通过同源基因交换法在 *E. coli* JM105 染色体中

插入透明颤菌血红蛋白基因(*vgb*)的整合型宿主 $VG1^{[11]}$ 。

经过 24h 的摇瓶培养 ,分别在菌株 *E. coli*JM105(pUC18 - *SRRz*) ,*E. coli*JM109 (pUC18 - *SRRz*)和 $VG1$ (pUC18 - *SRRz*)的菌液中加入 2mmol/L ,pH8.0 的 EDTA 溶液 ,改变细胞膜的通透性 ,诱导菌体裂解。诱导裂解后的细胞用结晶紫染色法显微观察 ,结果表明 ,各菌株的细胞均大量破碎 ,说明裂解基因在上述三种菌株中均能成功表达。通过对质粒 pTZ18u-PHB 和质粒 pTU14 在宿主 $VG1$ 中的表达效果进行比较 ,我们发现 ,裂解基因与 PHB 合成基因在质粒 pTU14 中的同时表达不仅能够实现菌体细胞的可诱导裂解 ,而且还可以大大促进重组菌的生长(图 1)。当质粒 pTZ18u-PHB 和质粒 pTU14 分别在宿主 *E. coli*JM105 及 *E. coli*JM109 中表达时 ,可以得到类似的结果。此外 ,同时携带 *phbCAB* 和 *SRRz* 的质粒 pTU14 在三种宿主菌中分别进行表达时 ,其生长情况的对比则进一步表明 ,宿主菌 $VG1$ 较之 *E. coli*JM109 和 *E. coli*JM105 具有较大的生长优势(图 2) ,这说明当菌体密度达到一定水平 ,从而使菌体细胞处于贫氧状态时 ,透明颤菌血红蛋白的表达将从分子水平上促进菌体细胞对氧气的利用率 ,从而促进菌体细胞的生长乃至 PHB 在细胞中的积累。

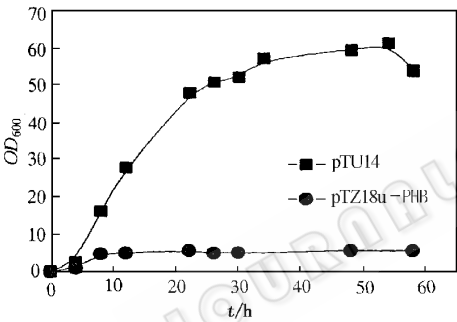


图 1 质粒 pTU14 和 pTZ18u-PHB 在宿主菌 *E. coli*VG1 中表达时的生长比较

Fig.1 Growth comparison of host VG1 harboring plasmid pTU14 and pTZ18u-PHB

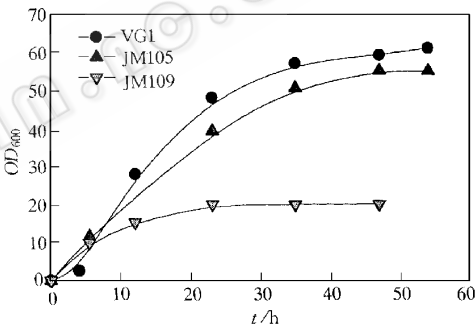


图 2 质粒 pTU14 在宿主菌 $VG1$,*E. coli*JM105 和 *E. coli*JM109 中表达时的生长比较

Fig.2 Growth comparison of pTU14 expressed in host $VG1$,*E. coli*JM105 and *E. coli*JM109

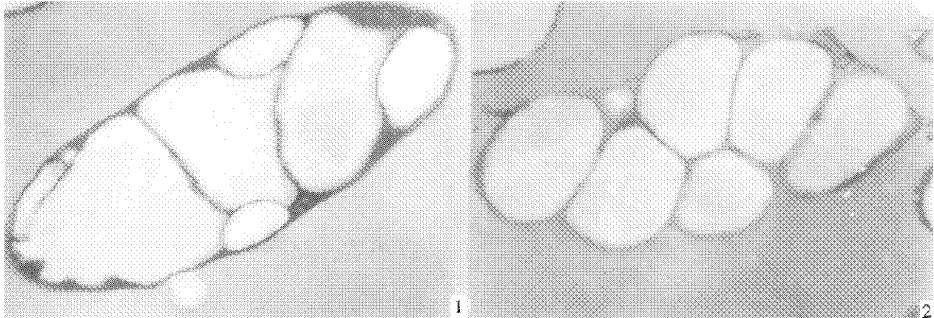


图 3 基因工程菌 $VG1$ (pTU14)裂解前后的电镜观察

Fig.3 Transmission electron micrograph of $VG1$ (pTU14) cell before and after lysis

1. Before lysis ; 2. After lysis.

2.2 重组菌 VG1(pTU14)在 LBG 培养基中的分批培养

由上述讨论可知, VG1(pTU14)是一株三种外源基因 *vgb*, *phb*CAB 和 *SRRz* 能够同时有效表达且具有极大生长潜力的优势菌株。按照 1.4 所述的培养条件在摇瓶中对其进行 58h 的分批培养, 其细胞浓度可达到 10.2g/L, PHB 浓度, PHB 百分含量及其产率则分别为 8.54g/L, 83.76% 和 0.15g/L/h, 此外, PHB 对葡萄糖的转化率高达 0.43(理论值为 0.48)。将收获的细胞用 EDTA 诱导裂解, PHB 纯度可从 83.76% 提高到 94.6%。图 3-1 给出了 VG1(pTU14)经过 22h 培养后其细胞形态的电镜观察, 其中, 白色的 PHB 颗粒已经大量积累。图 3-2 则给出了诱导裂解后细胞的电镜观察, 其中, 菌体的细胞壁几乎已经全部破碎, 白色的 PHB 颗粒被释放出来。

2.3 重组菌 VG1(pTU14)在 LBG 培养基中的补料分批培养

为进一步验证重组菌 VG1(pTU14)的生长能力及 PHB 颗粒的积累能力, 本文对其在 LBG 培养基中进行了补料分批培养。其中, 在每次补料时, 均将菌液的 pH 值调到 7.0。当补料糖浓度为 10g/L 时, 补料分批培养与分批培养的结果比较如图 4 所示; 由图 3 可见, 相对于分批培养, 补料分批培养更适合菌体细胞的生长。

对 VG1(pTU14)的补料分批培养过程进行重复实验, 并对其中一批补料分批培养过程中不同时刻取样的样品进行菌浓和 PHB 含量分析, 得到如表 2 所示的结果, 其中, 每隔 12h 补料一次, 补入的糖浓度相当于 10g/L。由表可见, 重组菌 VG1(pTU14)的菌体浓度可高达 25.9g/L, 这是迄今为止报道的利用大肠杆菌生产 PHB 过程中的摇瓶最高值, 此外, 经过 52h 的培养, 收获的 PHB 产品纯度可高达 95% 以上。

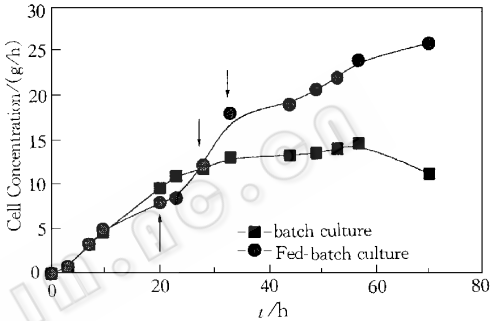
表 2 VG1(pTU14)在补料分批培养中的细胞生长和 PHB 积累

Table 2 Cell growth and PHB accumulation of VG1(pTU14) in fed-batch culture				
<i>t</i> /h	Cell conc./ (g/L)	PHB content/%	PHB conc./ (g/L)	PHB prod./ (g/L/h)
52	18.05	95.7	17.3	0.33
58	19.25	97.6	18.8	0.33
71	24.1	96.2	23.2	0.34
82	25.9	98.6	25.5	0.32

对不同时刻的菌体细胞进行超薄切片电镜观察, 结果如图 5 所示。由图版中还可看到, 当菌体细胞中 PHB 的含量达到一定水平后, 菌体细胞可自动裂解破壁, 将胞内的 PHB 颗粒释放出来, 而不需采用诱导剂 EDTA 溶液。这也是表 2 中当菌体培养时间较长后测得的 PHB 纯度很高的原因之一, 但 VG1(pTU14)细胞具有的强积累 PHB 的能力, 主要还是由其基因特性决定的。

图 4 VG1(pTU14)在 LBG 培养基中的补料分批培养与分批培养的比较

Fig. 4 Growth comparison of VG1(pTU14) between batch culture and fed-batch culture in LBG medium



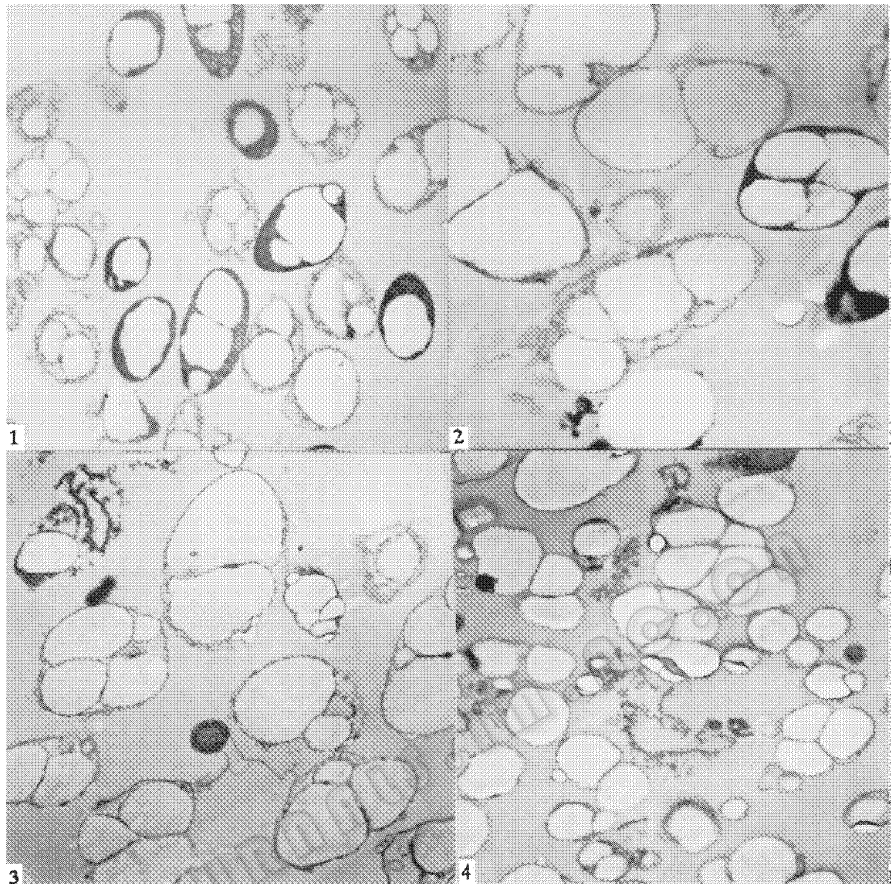


图 5 基因工程菌 VG1(pTU14)在补料分批培养过程中的电镜观察

Fig. 5 Transmission electron micrograph of VG1(pTU14) cell in process of fed-batch culture
1. 20K(6 000×) 2. 34K(8 000×) 3. 45K(6 000×) 4. After lysis(5 000×).

总之,利用本文构建的能同时有效表达透明颤菌血红蛋白合成基因(*vgb*) λ 噬菌体裂解基因(*SRR λ*)以及 PHB 合成基因(*phbCAB*)的多功能基因工程菌,不仅可实现菌体细胞的自动裂解破壁,还可以从分子水平上提高菌体细胞对氧气的利用率,从而可以实现菌体的高密度发酵培养和 PHB 产品的大量积累。因此,利用透明颤菌血红蛋白基因(*vgb*)的分子克隆实现 PHB 的高密度发酵培养,同时利用 λ 噬菌体裂解基因(*SRR λ*)的表达实现菌体细胞自动裂解破壁的方法是可行的,并将在发酵工业中具有广阔的推广和应用前景。

参 考 文 献

[1] Fidler S , Dennis D . *FEMS Microbiol Rev* ,1992 ,**103** :231~236.
[2] Lee S Y . *Biotechnol Bioeng* ,1995 ,**49** :1~14.
[3] Dikshit K L , Dikshit R P , Webster D A , *et al .* *Gene* ,1988 ,**70** :377~386.
[4] Khosla C , Bailey J E . *Mol Gen Genet* ,1988 ,**214** :158~161
[5] Khosla C , Bailey J E . *J Bacteriol* ,1989 ,**171** :5995~6004.
[6] Garrett J , Fusselman R , Hise J , *et al .* *Mol Cell Physiol Biochem* ,1981 ,**182** :326~331

中国科学院微生物研究所微生物综合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

- [7] Tarahovsky Y S , Ivanitsky G R , *et al.* *FEMS Microbiol Lett* ,1994 ,**122** :195~200.
- [8] J 萨姆布鲁克 ,E F 弗里奇 ,T 曼尼阿蒂斯著 .金冬雁 ,黎孟枫等译 .分子克隆实验指南(第二版).北京 :科学出版社 ,1996.
- [9] Ward A C , Dawes E A. *Anal Biochem* ,1973 ,**52** :607~613.
- [10] Miller G L. *Anal Chem* ,1959 ,**31** :426.
- [10] 吴 奕 ,杨胜利.生物工程学报 ,1996 ,**12** (3) :276~283.

STUDY ON PRODUCTION OF POLY- β -HYDROXYBUTYRATE BY RECOMBINANT STRAIN VG1(pTU14)*

Yu Huimin¹ Yin Jin¹ Li Hongqi¹ Yang Shengli² Shen Zhongyao¹

(¹ Department of Chemical Engineering , Institute of Biochemical Engineering
Tsinghua University , Beijing 100084)

(² Shanghai Research Center of Biotechnology , Academic Sinica , Shanghai 200233)

Abstract : Cloning and expression of *Vitreoscilla* hemoglobin gene (*vgb*) and λ phage lytic genes (*SRRz*) in production of Poly- β -hydroxybutyrate(PHB) was studied in different *Escherichia coli* hosts such as *E. coli* JM105 , *E. coli* JM109 and VG1. In the recombinant strains , VG1(pTU14) was a superior one which simultaneously contained three exogenes including *vgb* , *SRRz* and PHB biosynthesis genes(*phbCAB*). The experimental results showed that after 82 hours fed-batch culture in LBG medium in shaking flask , cell concentration of VG1(pTU14) could reach 25.9 g/L , which was the highest PHB production ever reported , and till 52h PHB content could be higher than 95% . Additionally , inducible cell lysis was also attained successfully in recombinant VG1(pTU14) accompanying with its high cell density culture. Therefore , VG1(pTU14) is a novel potential strain with promising prospect in industrial production of PHB.

Key words : *Vitreoscilla* hemoglobin gene (*vgb*) , λ phage lytic genes(*SRRz*) , Poly- β -hydroxybutyrate(PHB) , High cell density culture , Inducible cell lysis

* This work was granted by National Nine-Five Key Task Project (96-C03-03-02) ; Major Item of National Natural Science Foundation (29834103) ; General Item of National Natural Science Foundation (29876021)