

以葡萄糖为唯一碳源合成聚-4-羟基丁酸的重组大肠杆菌的构建

宋水山^{1,2} 马 宏¹ 高振贤¹ 贾振华¹ 张 霞¹

(¹河北省生物研究所 石家庄 050051)

(²河北农业大学生命科学院 保定 071001)

摘 要:为实现重组大肠杆菌以葡萄糖为唯一碳源合成均聚的 P(4HB),PCR 扩增大肠杆菌编码谷氨酸:琥珀酰半缩醛转氨酶基因(*gabT*),谷氨酸脱羧酶基因(*gadA*)以及富养罗斯通氏菌(*Ralstonia eutropha*)H16 的 4-羟基丁酸脱氢酶基因(*gadB*)并组装到携带富养罗斯通氏菌(*Ralstonia eutropha*)H16 的 PHA 聚合酶基因(*phaC*)和克氏梭菌(*Clostridium kluyveri*)中编码 4-羟基丁酸:CoA 转移酶基因(*orfZ*)的重组质粒 pKES5.3 上,形成一个大的操纵元。携带重组质粒的大肠杆菌获得从三羧酸循环的中间物—— α -酮戊二酸到 P(4HB)的代谢途径。结果表明,重组大肠杆菌可以以葡萄糖为唯一碳源合成均聚的 P(4HB),当向以葡萄糖为唯一碳源的无机培养基添加蛋白胨、酵母提取物、酪蛋白水解物时,P(4HB)的含量可以高达菌体干重的 30%。

关键词:聚羟基烷酸,聚-4-羟基丁酸,代谢工程,重组大肠杆菌

中图分类号:Q93 文献标识码:A 文章编号:0001-6209(2005)03-0382-05

聚羟基烷酸(Polyhydroxyalkanoate,简称 PHA)是一类由许多原核生物在非平衡生长条件(如缺氮、磷、氧、铁等)下在胞内积累的碳源和能源储存物质,在自然界中可被微生物完全降解,并具有热可塑性,生物相容性,光学活性,和压电特性等。因此,PHA 作为生物全降解塑料被认为是解决由大量废弃塑料造成的环境污染的希望,而且 PHA 作为一种新型生物工程材料,在医学、药学、精细化工中也极具应用前景^[1]。

聚-3-羟基丁酸(Poly-3-hydroxybutyric acid,简称 P(3HB))是 PHA 中最常见的一种,在工业上已有小批量生产。但由于 P(3HB)的某些理化加工性能不尽人意,如质地脆、发硬,难于加工,其应用范围和价值受到了很大的限制^[2]。Mukai 等^[3]发现,若 P(3HB)聚合物中引入 4-羟基丁酸(简称 4HB)形成聚-3-羟基丁酸-co-4-羟基丁酸共聚物[P(3HB-co-4HB)],则可以改良聚合物的特性。初步研究表明,与 P(3HB)均聚物相比,均聚的聚-4-羟基丁酸(简称 P(4HB))除具有 P(3HB)的优良特性外,还具有韧性强[断裂伸长强度为 P(3HB)的 200 倍],溶点低(仅为 50℃),易进行后期加工等优点。另外,P(4HB)更容易被生物体内的脂肪酶或酯酶降解,可用于制造医学工程塑料。因此,P(4HB)比 P(3HB)更具有应用前景和开发价值。Hein 等^[6]构建了携带富养罗斯通氏菌

(*Ralstonia eutropha*)H16 的 PHA 聚合酶基因(*phaC*)和克氏梭菌(*Clostridium kluyveri*)中编码 4-羟基丁酸:CoA 转移酶基因(*orfZ*)的重组质粒 pKES5.3,并转化大肠杆菌 *E. coli* XL1-Blue。该重组大肠杆菌在以葡萄糖和 4HB 为共碳源的 LB 或无机培养基中培养,可以合成均聚的 P(4HB)。Song 等^[7]在 20L 发酵罐规模上分批补料培养该重组大肠杆菌获得一定量的 P(4HB)。

但是,这种培养须在培养基中加入 P(4HB)的前体物质,即 4-羟基丁酸。而 4-羟基丁酸又非常昂贵,由此导致 P(4HB)的生产成本过高,严重阻碍了 P(4HB)的生产和利用。本研究旨在构建从三羧酸循环的中间物—— α -酮戊二酸到 P(4HB)的代谢途径(图 1),克隆所有必需的基因,将其组装在一起,转化大肠杆菌,实现使重组大肠杆菌以葡萄糖为唯一碳源和底物合成均聚的 P(4HB)的目的,从而大大降低 P(4HB)的生产成本。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒:本研究所用微生物菌株和质粒列于表 1,质粒 pKES5.3 及携带质粒 pKES5.3 的重组大肠杆菌(*Escherichia coli*)XL1-Blue 由德国明斯特大学微生物所 Alexander Steinbüchel 教授提供。

基金项目 河北省自然科学基金资助项目(303610)

作者简介 宋水山(1963-),男,河北隆尧人,研究员,主要从事微生物分子生物技术研究。Tel:86-311-3014618, E-mail:shuishans@hotmail.com

收稿日期 2004-10-11,修回日期 2005-01-10

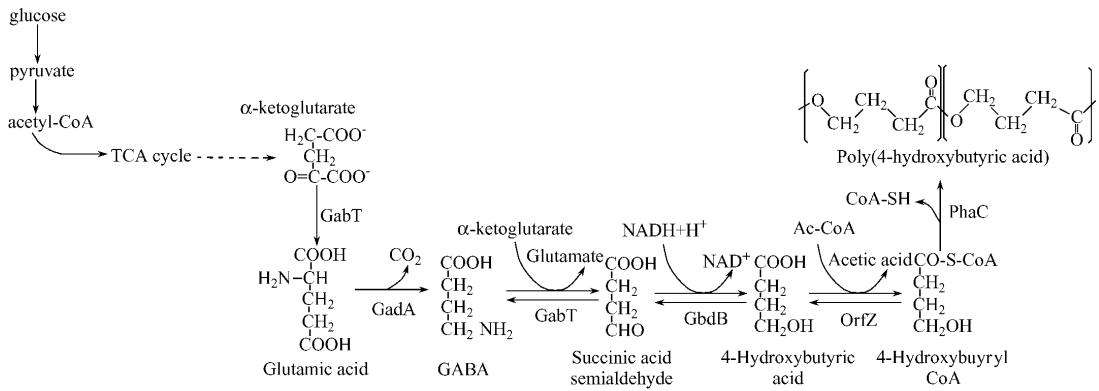


图 1 利用葡萄糖合成均聚 P(4HB) 的代谢途径

Fig. 1 Metabolic pathway for formation of P(4HB) from glucose

Abbreviations : GABA γ -aminobutyrate ; GbdB , 4-hydroxybutyrate dehydrogenase ; GadA , *E. coli* glutamate decarboxylase ; GabT , *E. coli* glutamate succinic semidehyde transaminase ; OrfZ_{CK} , acetyl-CoA 4-hydroxybutyrate CoA transferase from *Clostridium kluyveri* ; PhaC_{AE} , PHA synthase from *Ralstonia eutropha* .

表 1 实验所用菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study

Strains and plasmids	Genotype	Source
Strain		
<i>E. coli</i> DH5 α	F ϕ 80d , <i>lacZ</i> (<i>lacZYA-argF</i>) , U169 , <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>phoA</i> , <i>hsdR17</i> (r ^{-k} , m _k +) <i>supE44</i> λ - <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i>	Lab collection
<i>E. coli</i> XL1-Blue	<i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi</i> , <i>hsdR17</i> (r ^{-k} , m _k +) <i>supE44</i> , <i>recA</i> , <i>lac</i> , [F ⁺ , <i>proAB</i> + , <i>lac1qZ</i> Δ M15 , :Th1Q(Tet ^r)]	Lab collection
Plasmid		
pKSSK5.3	Amp ^r , <i>phaC</i> , <i>orfZ</i> , both	Hein <i>et al.</i> (1997)
pKSBB3.6	Amp ^r , a 3.6kb <i>Bam</i> HI fragment containing <i>gbdB</i>	Song <i>et al.</i> (1999)
pA1	Amp ^r , <i>gadA</i> inserted into pKSS5.3 , co-linear to <i>lacZ</i> promoter	This study
pA2	Amp ^r , <i>gadA</i> inserted into pKSS5.3 , anti-linear to <i>lacZ</i> promoter	This study
pA1T1	Amp ^r , <i>gabT</i> inserted into pA1 , co-linear to <i>lacZ</i> promoter	This study
pA1T2	Amp ^r , <i>gabT</i> inserted into pA1 , anti-linear to <i>lacZ</i> promoter	This study
pA2T1	Amp ^r , <i>gabT</i> inserted into pA2 , co-linear to <i>lacZ</i> promoter	This study
pA2T2	Amp ^r , <i>gabT</i> inserted into pA2 , anti-linear to <i>lacZ</i> promoter	This study
pA1T1B1	Amp ^r , <i>gbdB</i> inserted into pA1T1 , co-linear to <i>lacZ</i> promoter	This study
pA1T1B2	Amp ^r , <i>gbdB</i> inserted into pA1T1 , anti-linear to <i>lacZ</i> promoter	This study
pA1T2B1	Amp ^r , <i>gbdB</i> inserted into pA1T2 , co-linear to <i>lacZ</i> promoter	This study
pA2T2B2	Amp ^r , <i>gbdB</i> inserted into pA2T2 , anti-linear to <i>lacZ</i> promoter	This study
pA2T1B1	Amp ^r , <i>gbdB</i> inserted into pA2T1 , co-linear to <i>lacZ</i> promoter	This study
pA2T1B2	Amp ^r , <i>gbdB</i> inserted into pA2T1 , anti-linear to <i>lacZ</i> promoter	This study
pA2T2B1	Amp ^r , <i>gbdB</i> inserted into pA2T2 , co-linear to <i>lacZ</i> promoter	This study
pA2T2B2	Amp ^r , <i>gbdB</i> inserted into pA2T2 , anti-linear to <i>lacZ</i> promoter	This study

1.1.2 培养基 :LB 培养基和 M9 培养基按文献 [7] 配制。需要时培养基中加入氨苄青霉素(终浓度 100 μ g/mL)。诱导时 培养基中加入 IPTG(终浓度为 1mmol/L),除非特殊说明,细菌一般培养于装有 20mL 培养基的 100mL 三角瓶中,37 $^{\circ}$ C、250r/min 振荡培养 48h。

1.2 基因的 PCR 扩增和序列测定

为完成从 α -酮戊二酸到 P(4HB)的代谢途径,共需要 5 个基因编码的酶。由于 pKSS5.3 上已经携

带了 2 个,因此我们还需要克隆另外 3 个所需的基因。根据大肠杆菌编码谷氨酸琥珀酰半缩醛转氨酶的基因(*gabT*)^[8],谷氨酸脱羧酶基因(*gadA*)^[9],以及 *Ralstonia eutropha* H16 的 4-羟基丁酸脱氢酶基因(*gbdB*)^[10]的核苷酸序列设计引物,分别以大肠杆菌 DH5 α 基因组 DNA 和质粒 pKSS3.6(含有 *Ralstonia eutropha* H16 的 *gbdB* 基因)为模板,利用聚合酶链式反应(PCR)扩增所需要的 3 个基因,并且在扩增基因的 5'和 3'端分别引入 *Bam*HI 和 *Bla*I 位点。

扩增 *gabT* 的上、下游引物分别为 5'-GAAGATCTAG-GAGGCCATGGGCATGCACAGCAATAAAGAGTTAATGCAG-3' 和 5'-GGGGTACCGGATCCGCGGCGCTACTGCTTCGCCTCATC-3' ; 扩增 *gadA* 的上、下游引物分别为 5'-GAAGATCTAGGAGGCCATGGGCATGCACAGAAGCTGTAAACGGATTTTC-3' 和 5'-GGGGTACCGGATCCTTATCAGGTGTGTTAAAGCTGTT-3' ; 扩增 *gadB* 的上、下游引物分别为 5'-GGCAGATCTCGGAAGGA GGTG-CATGCTCAGACGTTTATCTACTATCTGA-3' 和 5'-CGG-GATCCCCTGYGYGCTACATGGAC-3'。20 μ L PCR 反应体系 : 2 μ L 10 \times PCR 缓冲液 , 1 μ L 25mmol/L MgCl₂ , 2 μ L 5mmol/L dNTP , 上、下游引物各 1 μ L (终浓度为 2ppmol/L) , 2U *Taq* 酶 0.5 μ L 模板 (20ng DNA) , 用双蒸水补足至 20 μ L。PCR 反应条件 : 94 $^{\circ}$ C 2min ; 94 $^{\circ}$ C 30s , 50 $^{\circ}$ C 30s , 72 $^{\circ}$ C 1min , 30 个循环 , 72 $^{\circ}$ C 10min。

PCR 产物均用 DNA 凝胶回收试剂盒回收后与 pGEM-T 载体连接过夜。连接产物用热激法转化大肠杆菌 *E. coli* DH5 α , 挑白色菌落摇瓶培养 , 提取质粒酶切鉴定。从阳性克隆中提取质粒 , 由上海 Sangon 公司进行核苷酸序列测定。

1.3 分析方法

1.3.1 菌体干重的测定 : 取发酵液 5mL , 400 r/min 离心 15min , 水洗 2 次 , 冷冻真空干燥后称重。

1.3.2 R (4HB) 含量的测定 : 采用气相色谱法^[11]。

2 结果和讨论

2.1 基因的克隆

由于质粒 pKES5.3 上已经携带编码 4-羟基丁酸 :CoA 转移酶的基因 *orfZ* 和 *phaC*。为完成从 α -酮戊二酸到 R (4HB) 的合成途径尚需要另外 3 个分别编码谷氨酸 琥珀酰半缩醛转氨酶、谷氨酸脱羧酶、4-羟基丁酸脱氢酶的基因 *gabT* (Accession No. M88334) *gadA* (Accession No. M84024) 和 *gadB* (Accession No. L36817)。根据已知基因序列 , 我们分别设计引物 , 利用 PCR 方法从重组大肠杆菌 DH5 α 基因组 DNA 中扩增出 *gabT* 和 *gadA* , 从携带含有 *Ralstonia eutropha* H16 部分基因组 DNA 的质粒 pKS-BB3.6 中扩增出 *gadB*。经核苷酸序列测定和基因库中已知基因序列比对后证实扩增基因的正确性。为方便重组质粒的构建 , 在每个基因的 5' 和 3' 端引入 *Bam*H I 和 *Bgl* II 酶切位点。

2.2 重组质粒和重组菌的构建

用 *Bam*H I 和 *Bgl* II 双酶切含有 *gadA* 的重组质粒 , 回收基因片段 , 插入经 *Bam*H I 切开的质粒

pKES5.3 的 *Bam*H I 位点。由于 *Bam*H I 和 *Bgl* II 为同尾酶 , 因此 *gadA* 两端可与 pKES5.3 的 *Bam*H I 的粘性末端连接 , 并且只留下一个可再被 *Bam*H I 酶切开的位点。由于 *gadA* 可以不同方向插入 pKES5.3 , 因此产生两个子重组质粒。当 *gadA* 的转录方向与 *phaC* 的相同时 , 即与 *LacZ* 启动子的方向相反时 , 新产生的 *Bam*H I 位于位点 *gadA* 的末端 , 当 *gadA* 的转录方向与 *phaC* 的相反时即与 *LacZ* 启动子的方向相同时 , 新产生的 *Bam*H I 位于 *gadA* 和 *phaC* 之间 , 再用 *Bam*H I 酶切这两个重组质粒 , 将含有 *gabT* 的 *Bam*H I 和 *Bgl* II 片段插入重组质粒的 *Bam*H I 位点 , 之后再以同样的策略将 *gadB* 组装进重组质粒 , 这样最终得到携带全部 5 种基因且其中基因转录方向不同的 8 种重组质粒。重组质粒 p5.3A2T1B2 的图谱见图 2 , 其中只有 *gabT* 的转录方向与 *LacZ* 启动子的转录方向相同 , 而其它 4 种基因的转录方向均与 *LacZ* 启动子的相反。其它重组质粒各基因的排列和转录方向见表 1。

将 8 种重组质粒分别转化大肠杆菌 DH5 α 和 XL1-Blue , 得到 16 种重组大肠杆菌 (表 1)。

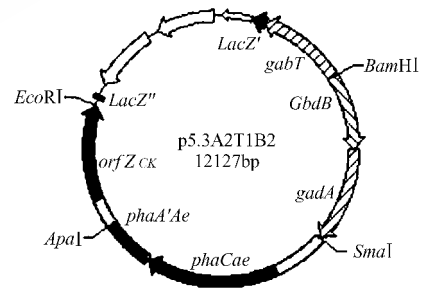


图 2 重组质粒 p5.3A2T1B2 的图谱

Fig. 2 Map of Recombinant plasmid p5.3A2T1B2

Abbreviations : Amp^r , β -lactamase ; *gdb* , 4-hydroxybutyrate dehydrogenase ; *gadA* , *E. coli* glutamate decarboxylase ; *gabT* , *E. coli* glutamate succinic semidehyde transaminase ; *orfZ_{CK}* , acetyl-CoA 4-hydroxybutyrate CoA transferase from *Clostridium kluyveri* ; *phaCAE* , PHA synthase from *Ralstonia eutropha* .

2.3 重组菌利用葡萄糖为唯一碳源合成 R (4HB)

首先在含有 2% 葡萄糖的 LB 培养基中培养 16 种重组大肠杆菌 , 结果发现所有重组菌均可以不同程度的积累 R (4HB) (表 2) , 表明在所引入的 5 个基因的共同作用下部分葡萄糖可能是经 α -酮戊二酸进而合成 R (4HB) , 并且基因的转录方向和宿主菌可能影响菌种合成 R (4HB) 的能力。重组菌 *E. coli* DH5 α (p5.3A2T1B2) 合成 R (4HB) 的能力最好 , 可以积累约占菌体干重 12% 的 R (4HB)。研究还表明 , 培养基中加入或不加入诱导剂 IPTG 对菌体生长和积累

对 4HB 无显著影响。

表 2 不同重组菌菌株生长和利用葡萄糖为唯一碳源合成 P(4HB) 的比较

Strains	CDW(g/L)		P(4HB) content(% CDW)	
	With IPTG	Without IPTG	With IPTG	Without IPTG
<i>E. coli</i> DH5 α				
p5.3A1T1B1	1.61	2.01	4.69	5.87
p5.3A1T1B2	1.77	1.98	5.69	6.31
p5.3A1T2B1	1.88	1.96	6.15	5.48
p5.3A2T1B1	2.49	2.49	4.67	6.02
p5.3A2T1B2	2.01	1.91	11.88	12.14
p5.3A2T2B1	2.33	2.31	5.11	3.84
p5.3A2T2B2	2.29	2.32	5.63	5.52
<i>E. coli</i> XL1-Blue				
p5.3A1T1B1	1.76	1.90	7.67	7.58
p5.3A1T1B2	1.74	1.96	4.23	4.75
p5.3A1T2B1	1.78	1.84	6.06	3.98
p5.3A2T1B1	1.85	2.23	4.85	4.82
p5.3A2T1B2	2.17	2.30	6.03	4.08
p5.3A2T2B1	2.62	2.47	5.87	4.83
p5.3A2T2B2	2.72	2.81	4.08	3.85

All of the recombinant strains of *E. coli* were cultivated in LB medium at 37°C with 2% glucose as sole carbon. There are two group sample. When cultures were grown to an optical density of 0.6 at a wavelength of 600nm. IPTG was added(1mmol/L final concentration) in one group sample to induce gene expression. The other was not added IPTG. CDW, cell dry weight.

2.4 复合营养成分对重组菌菌株生长和 P(4HB) 合成的影响

为促进重组菌菌株生长和 P(4HB) 合成, 我们用 M9 培养基作基础, 向其中分别添加复合营养成分如

表 3 复合营养成分对重组菌菌株生长和 P(4HB) 合成的影响

Strains and carbon sources	CDW(g/L)	P(4HB) content(% CDW)
<i>E. coli</i> DH5 α (pKSE5.3)		
2% glucose	1.47	0
2% glucose + 0.4% 4HB	1.44	66.17
<i>E. coli</i> DH5 α (p5.3A2T1B2)		
2% glucose	1.35	15.83
2% glucose plus 1% casein acid hydrolate	2.31	31.47
2% glucose plus 1% yeast extract	2.61	30.19
2% glucose plus 1% tryptone	2.51	30.24
2% glucose plus 1% Ala	1.19	12.79
2% glucose plus 1% Gly	1.11	13.96
2% glucose plus 1% Leu	1.11	15.64
2% glucose plus 1% Cys	0.38	8.3

Cells of *E. coli* were cultivated at 37°C in LB medium over night. The cells were harvested by centrifugation at 4°C and washed twice with MSM medium. Then the cells were cultivated at 37°C in MSM medium with 2% glucose and different nutrient substances. CDW, cell dry weight.

蛋白胨、酵母提取物、酪蛋白水解物、几种氨基酸来培养 *E. coli* DH5 α (p5.3A2T1B2)。结果表明, 添加蛋白胨、酵母提取物、酪蛋白水解物可以显著提高重组菌菌株生长和 P(4HB) 的积累量, P(4HB) 占菌体干重的比例可以高达 30% (表 3)。而添加不同种类的氨基酸对菌体生长和 P(4HB) 合成无显著的促进作用, 相反添加 1% 的半胱氨酸严重抑制菌体生长和 P(4HB) 的合成, 这可能是由于半胱氨酸对菌体的毒性作用 (表 3)。

3 讨论

在以前的研究中, 我们利用葡萄糖为碳源, 同时添加 4-羟基丁酸培养重组大肠菌 *E. coli* XL1-Blue (pKES5.3), 可以获得均聚物的 P(4HB)。但 4-羟基丁酸价格昂贵, 利用其做底物微生物合成 P(4HB) 是不现实的。本研究构建从三羧酸循环中间产物 α -酮戊二酸到 P(4HB) 的代谢途径, 将所需的全部 5 个基因组装成一个大的操纵元。这样葡萄糖经糖酵解产生乙酰 CoA, 乙酰 CoA 进入三羧酸循环, 从 α -酮戊二酸分出一支流, 经过几步酶促反应, 最后可以合成 P(4HB) (图 1)。结果表明这一策略是成功的, 所有携带全部 5 个基因组转录方向有所不同的重组菌均可以利用葡萄糖为唯一碳源合成 P(4HB)。利用葡萄糖为唯一碳源合成 P(4HB), 无需添加价格昂贵的前体 4-羟基丁酸, 无疑会大大降低 P(4HB) 的生产成本, 为规模化生产 P(4HB) 奠定基础。

由于存在三羧酸循环和 P(4HB) 合成途径共同竞争 α -酮戊二酸, 以及 P(4HB) 合成途径的琥珀酰半缩醛可能被琥珀酰半缩醛脱氢酶催化转化为琥珀酸-CoA, 进而再进入三羧酸循环, 因此流向 P(4HB) 的代谢流将是重组菌合成 P(4HB) 的关键限制因素, 这也可能是本研究中重组菌 P(4HB) 积累量不高的原因之一。这一问题有可能通过采用编码琥珀酰半缩醛脱氢酶基因缺失突变株, 或在细菌培养的适当时期添加琥珀酸半缩醛脱氢酶复合物抑制剂或其他能够促进流向 P(4HB) 合成途径的物质来解决。

参 考 文 献

- [1] Lee S Y, Choi J, Wong H H, et al. Recent advances in polyhydroxyalkanoate production by bacterial fermentation. *Inter J Biol Macromol*, 1999, **25**: 31-36.
- [2] Hrabak O. Industrial production of poly-B- hydroxybutyrate. *FEMS Microbiol Rev*, 1992, **103**: 251-256.
- [3] Mukai K, Doi Y, Sema Y, et al. Substrate specificities in hydrolysis of polyhydroxyalkanoates by microbial esterases. *Biotechnol Lett*, 1993, **15**: 601-604.

- [4] Steinb chel A , Valentin H E , Schönebaum A . Application of recombinant gene technology for production of polyhydroxyalkanoic acids : biosynthesis of poly (4-hydroxybutyric acid) homopolyester . *J Environ Polym Degrad* , 1994 , **2** : 67 - 74 .
- [5] Jager K , Steinb chel A , Jendrosseck D , et al . Substrate specificities of bacterial polyhydroxyalkanoate depolymerases and lipases : bacterial lipases hydrolyze poly(omega-hydroxyalkanoates) . *Appl Environ Microbiol* , 1995 **61** : 3113 - 3118 .
- [6] Hein S , Soehling B , Gottschalk K , et al . Biosynthesis of poly(4-hydroxybutyric acid) by recombinant *Escherichia coli* . *FEMS Microbiol Lett* , 1997 **153** : 411 - 418 .
- [7] Song S , Hein S , Steinb chel A . Production of poly(4-hydroxybutyric acid) by fed-batch cultures of recombinant strains of *Escherichia coli* . *Biotechnol Lett* , 1999 **21** : 193 - 197 .
- [8] Bartsch K , von John-Marteville A , Schulz A . Molecular analysis of two genes of *Escherichia coli* *gab* cluster : nucleotide sequence of the glutamate :succinate semialdehyde transaminase gene (*gabT*) and characterization of the succinic semialdehyde dehydrogenase gene (*gabD*) . *J Bacteriol* , 1990 **172** : 7035 - 7042 .
- [9] Smith D K , Kassam T , Singh B , et al . *Escherichia coli* has two homologous glutamate decarboxylase genes that map to distinct loci . *J Bacteriol* , 1992 **174** : 5820 - 5826 .
- [10] Valentin H E , Zwingmann G , Schonbaum A , et al . Metabolic pathway for biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) from 4-hydroxybutyrate by *Alcaligenes eutrophus* . *Eur J Biochem* , 1995 **227** : 43 - 60 .
- [11] Braunneg G , Sonnleiter G , Lafferty R M , et al . A rapid gas chromatographic method for the determination of poly- -hydroxybutyric acid in microbial biomass . *Eur J Appl Microbiol Biotechnol* , 1978 **6** : 29 - 37 .

Construction of recombinant *Escherichia coli* strains producing poly (4-hydroxybutyric acid) homopolyester from glucose

SONG Shui-shan^{1,2*} MA Hong¹ GAO Zhen-xian¹ JIA Zhen-hua¹ ZHANG Xia¹

(¹ Biology Institute of Hebei Province , Shijiazhuang 050051 , China)

(² School of Life Science , Hebei Agriculture University , Baoding 071001 , China)

Abstract : The aim of this study is to construct recombinant *Escherichia coli* strains capable of producing poly(4-hydroxybutyric acid) homopolyester from glucose as sole carbon source. A glutamate :succinate semialdehyde transaminase gene from *Escherichia coli* , a glutamate decarboxylase gene from *E. coli* , and a 4-hydroxybutyrate dehydrogenase gene from *Ralstonia eutropha* were cloned by PCR and assembled onto the plasmid pKSSE5.3 which harboured the PHA synthase gene from *Ralstonia eutropha* and 4-hydroxybutyrate :CoA transferase from *Clostridium kluveri* . The resulting plasmids were transformed into *E. coli* and the pathway for biosynthesis of poly(4-hydroxybutyric acid) from glucose via α -ketoglutarate , an intermediate in TCA cycle was established in recombinant *E. coli* strains. Recombinant strains synthesized the homopolyester (P(4HB)) , when cells were cultivated in Luria-Bertani broth with glucose as carbon source. (P(4HB)) accumulation was enhanced up to 30% of cell dry weight , when cells were cultivated in mineral salts M9 medium plus glucose as sole carbon source with addition of yeast extract , tryptone , casein hydrolyate into medium respectively.

Key words : Polyhydroxyalkanoate , Poly(4-hydroxybutyric acid) , Metabolic engineering , Recombinant *Escherichia coli*

Foundation item : Natural Science Foundation of Hebei Province (303610)

* Corresponding author . Tel 86-311-3014618 ; E-mail : shuishansong@hotmail.com

Received date : 10-11-2004