

## 真养产碱杆菌聚羟基烷酸合成 酶基因在欧文氏菌中的表达

田杰生 李季伦

(中国农业大学生物学院微生物系 北京 100094)

**摘 要** 将含有真养产碱杆菌(*Alcaligenes eutrophus*)合成聚羟基烷酸(PHA)基因(*phaCA3*)的质粒 pTZ18U-PHB 改造成为具有卡那霉素抗性的质粒 pJMC1,并以电击法将 pJMC1 引入利用碳源广泛的胡萝卜软腐欧文氏菌(*Erwinia carotovora*)非致病菌株(Ecc13B)中,*phaCAB*可获得高效表达,膨大的转基因菌[Ecc13B(pJMC1)]细胞内几乎充满 PHA 颗粒。以蔗糖为碳源,初步在 5L 发酵罐中对转基因菌进行分批补料培养 35h,菌体干重达 28g/L,PHA 占菌体干重的 68%,具有生产潜力。将该菌合成的 PHA 提取纯化(纯度达 99%)后,进行核磁共振分析,发现它只有单一的聚- $\beta$ -羟基丁酸(PHB)组分。

**关键词** 聚- $\beta$ -羟基丁酸,PHA 合成酶基因,转基因欧文氏菌,电击转化

由于化学合成塑料的废弃物在自然界中很难被降解,人类大量使用这些塑料的同时,造成了自然界严重的“白色污染”,人们迫切期待可降解塑料制品早日问世。目前,以聚羟基烷酸(PHA)为原料制造塑料,成为最受重视的研究课题之一<sup>[1]</sup>。

许多细菌都可产生大量的 PHA,尤其是聚- $\beta$ -羟基丁酸(PHB)<sup>[2]</sup>。英国帝国化学工业公司(ICI)早在八十年代就率先完成了用发酵法培养真养产碱杆菌(*Alcaligenes eutrophus*)生产 PHB 的工艺,并建厂投产<sup>[3]</sup>,从此掀起了研究生物塑料的高潮。

尽管用 PHA 制造塑料有许多优点,但由于其生产成本较高,难以大量应用。为此,国际上很多实验室都在开展降低生产成本的研究,除进一步改进工艺和选育高产菌株外,有些实验室已开始研究用人工构建 PHA 基因工程细菌和工程植物生产 PHA 的可能性<sup>[4]</sup>。当前,国外学者已将指导真养产碱杆菌合成 PHA 的基因(*phaCAB*)\*引入大肠杆菌(*Escherichia coli*)<sup>[5]</sup>、产气克氏杆菌(*Klebsiella aerogenes*)、催婉克氏杆菌(*Klebsiella oxytoca*)<sup>[6]</sup>和食油假单胞菌(*Pseudomonas oleovorans*)<sup>[7]</sup>中。我们选用了胡萝卜软腐欧文氏菌(*Erwinia carotovora*)非致病菌株 Ecc13B,作为转基因受体,将 *phaCAB* 导入其中,也能高效表达。初步试验结果显示,该基因工程菌可以大量合成 PHB,并可利用多种碳源,和已有的同类基因工程菌相比,具有较大的竞争潜力;但也有质粒分配不均的问题,有待进一步研究解决。

国家“八五”重点科技攻关项目。

\* *phaCAB* 是由 *phaA*、*phaB* 和 *phaC* 3 个基因组成的操纵元(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。

本文于 1996 年 5 月 23 日收到。

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

Strain and plasmid	Genotype	Source and reference
Strains		
<i>Escherichia coli</i> JM107	[8]	Our laboratory stock Wirth R <sup>(9)</sup>
<i>Erwinia carotovora</i> (Ecc13B)	Amp <sup>r</sup>	
Plasmids		
pUC4K	Amp <sup>r</sup> , Kan <sup>r</sup>	Our laboratory stock Dennis D E <sup>(5)</sup>
pTZ18U-PHB	Amp <sup>r</sup> , phaCAB	
pJMC1	Amp <sup>r</sup> , Kan <sup>r</sup> , phaCAB	This paper

Amp<sup>r</sup>(Ampicillin resistant gene), Kan<sup>r</sup>(Kanamycin resistant gent)

1.2 培养基和培养条件

1.2.1 培养基: LB 培养基按《分子克隆实验手册》配制<sup>[8]</sup>;糖类发酵指示培养基、可溶性淀粉琼脂培养基、柠檬酸盐利用培养基、七叶灵分解培养基、胨水基础培养基(测定能否分解纤维素),按《一般细菌常用鉴定方法》配制<sup>[10]</sup>;聚果胶酸钠结晶紫培养基按《植病研究方法》配制<sup>[11]</sup>;发酵种子培养基、发酵罐培养基按 Ramsay 教授的方法配制<sup>[12]</sup>,种子培养基加卡那霉素 0.1g/L,发酵培养基加卡那霉素 0.5g/L。

1.2.2 培养条件:大肠杆菌于 37℃ 培养;欧文氏菌于 30℃ 培养。摇床培养时,500ml 三角瓶中装 100ml 培养基,摇床转速 220r/min。发酵罐培养用日本丸菱公司 MD-300 型 5L 自控发酵罐,实际装量 3.0L,接种量 10%。在发酵过程中温度控制在 30℃,用 10mol/L KOH 溶液调节 pH 值为 6.8±0.02,糖浓度维持在 1.0%~4.0%,铵离子初始浓度为 140mmol/L。当细菌处于对数生长期时,若铵离子浓度不足 60mmol/L,可适量添加 25%(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,溶氧(DO)控制在 50%左右;当细菌生长速度明显下降时,将溶氧降到 30%左右,停止加入(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,至细菌生长处于平稳期时下罐,周期为 30~35h。

1.3 方法

1.3.1 DNA 操作技术:质粒 DNA 的分离、纯化、限制酶酶解、DNA 片段连接,琼脂糖凝胶电泳均按常规方法<sup>[8]</sup>进行,所用酶及试剂购于华美公司。

转化大肠杆菌用常规的 CaCl<sub>2</sub> 法<sup>[8]</sup>,转化 Ecc13B 用电转化法。电转化用 Bio-Rad 公司的电击仪,以磷酸缓冲液为电击缓冲液<sup>[9]</sup>,受体细胞浓度为 10<sup>11</sup>/ml,装于 0.4cm 电击杯中。电击电压为 2.5kV,电容为 25μF,电阻无穷大。

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 糖浓度测定:总糖测定采用酚硫酸法<sup>[13]</sup>。

1.3.4 铵离子浓度测定:采用靛酚蓝比色法<sup>[14]</sup>。

1.3.5 PHA 的检测和提取:细菌菌体中的 PHA 颗粒,经 0.25% 的苏丹黑 B 乙醇溶液染色后,用显微镜观察<sup>[10]</sup>。PHA 的组分分析用氢谱核磁共振法<sup>[15]</sup>。PHB 在干细胞中的

含量用硫酸降解法测定<sup>[16]</sup>。PHA 的提取方法为用沸腾氯仿将 PHA 从菌体中溶出,再用 3 倍体积冷正己烷使之沉淀<sup>[17]</sup>。

## 2 试验结果

### 2.1 Ecc13B 碳源利用情况

实验证明, Ecc13B 可以利用葡萄糖、果糖、木糖、甘露糖、蔗糖、乳糖、麦芽糖、甘露醇、水杨苷、柠檬酸钠,淀粉作为唯一碳源生长,可以水解七叶灵。但该菌不能分解纤维素和果胶,也不能引起白菜组织块,胡萝卜块和马铃薯块的腐烂,因此, Ecc13B 是一株非致病突变株。

### 2.2 质粒构建和转化

美国的 Dennis 教授将真养产碱杆菌 *phaCAB* 克隆于载体质粒 pTZ18U 上,构成质粒 pTZ18U-PHB。该质粒的抗性选择标记为  $Amp^r$ ,而本实验的受本菌 Ecc13B 对氨卞青霉素不敏感,因此  $Amp^r$  在 Ecc13B 中不能作为选择标记。由于 Ecc13B 对卡那霉素敏感,所以需在原质粒上加  $Kan^r$  片段。pUC4K 含  $Kan^r$ ,用 BamHI 将其切下,同时将 pTZ18U-PHB 也用 BamHI 切开,然后用 T4 噬菌体 DNA 连接酶将  $Kan^r$  片段与线状的 pTZ18U-PHB 连接,构成质粒 pJMC1 (见图 1)。用此质粒转化大肠杆菌 JM107 并在其中扩增以

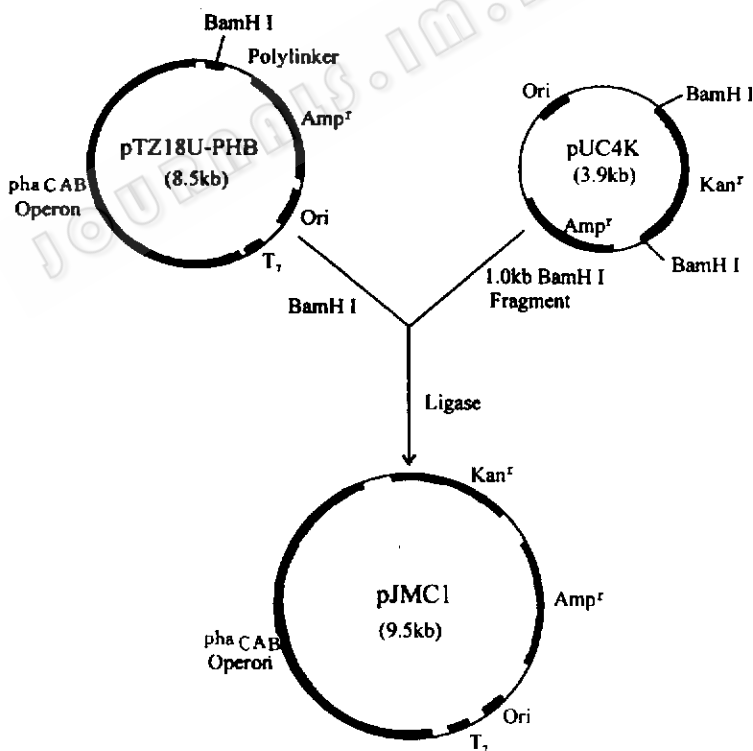


图 1 质粒 pJMC1 的构建

Fig.1 Construction of plasmid pJMC1

获得大量质粒 DNA,再用电转化法将其引入 Ecc13B 中,在含卡那霉素(0.05g/L)平板上挑选具有抗性转化子,每  $1\mu\text{g}$  DNA 可获得  $10^4$  个转子。

### 2.3 真养产碱杆菌 PHA 合成操纵元在欧文氏菌中的表达

将 Ecc13B (pJMC1) 接种于含 0.05g/L 卡那霉素的 LB 培养液中,摇床培养,当其  $\text{OD}_{600} = 0.68$  时,从中取 10ml 菌液接种分别两组含 2% 葡萄糖的 LB 培养液 (100ml): 其中一组含 0.05g/L 卡那霉素,而另一组不含抗生素。摇床培养 20h 后,在含卡那霉素的培养液中,菌体所积累的 PHA 可达细胞干重的 49.6%;而不含卡那霉素的培养液中,菌体所积累的 PHA 仅为细胞干重的 39.4%。这说明,在没有选择压时, pJMC1 在 Ecc13B 中不够稳定,有些基因工程菌的细胞会失去 pJMC1,而不能合成 PHA。此外,经核磁共振检测, Ecc13B(pJMC1) 所积累的 PHA 只有 PHB 一种成分。

### 2.4 Ecc13B(pJMC1) 发酵实验

Ecc13B(pJMC1) 种子  $\text{OD}_{600} = 4.6 (0.46 \times 10)$  时接种发酵罐,按上述的条件进行培养。以 50% 的蔗糖溶液作为碳源补料。35h 后,  $\text{OD}_{600}$  达 79 ( $0.79 \times 100$ ), 此时菌体干重为 28.2g/L, PHB 在干菌体中含量为 68%, 糖对 PHB 的转化率 ( $Y_{\text{HB/S}}$ ) 为 0.17 (见图 2)。

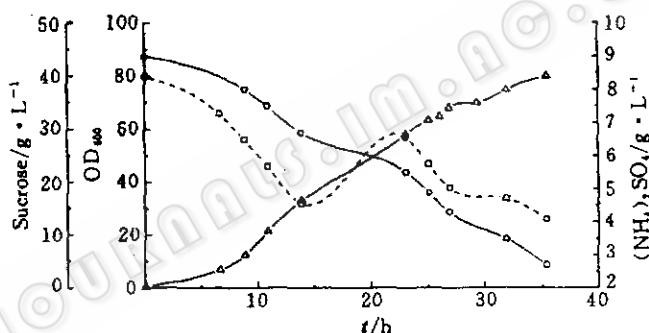


图2 Ecc13B(pJMC1)以蔗糖为碳源进行的分批补料培养

Fig.2 Fed-batch culture of Ecc13B(pJMC1) with sucrose

as carbon source

$\nabla \text{OD}_{600}$ ,  $\square$  Sucrose,  $\circ (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

在发酵后期,随着铵离子浓度的降低和溶氧的减少, Ecc13B(pJMC1) 开始大量积累 PHB, 菌体也被逐渐胀大,当细胞干重达 20g/L 时, Ecc13B(pJMC1) 细胞的大小约  $3.0 \sim 8.0\mu\text{m} \times 13 \sim 36\mu\text{m}$ , 而菌龄较长的 Ecc13B 细胞只有  $1.5 \sim 2.0 \times 2.5 \sim 3.0\mu\text{m}$ , 这是该菌较为突出的特点之一(见图 3)。

但当培养液中菌体干重大于 23g/L 以后,会出现少数体积没有增大的细胞。这些细胞中没有 PHB 颗粒,说明它们已失去了合成 PHB 的质粒(见图 3)。由此可见,在菌体密度较大时,卡那霉素也不能完全抑制那些丢失质粒的细胞。所以,尚须向 Ecc13B 中引入质粒主动分配机制,以增加质粒在 Ecc13B 中的稳定性。

在发酵过程中,溶氧控制比较关键。当 Ecc13B(pJMC1) 处于对数生长期时,溶氧宜控制在 50% 左右;当细菌进入 PHB 积累阶段时,溶氧宜控制在 30% 左右。如果在对数

生长期时,溶氧低于 40%,PHB 将过早地在菌体内大量积累。而 PHB 在菌体内积累过多,将会抑制细菌的生长,使最终菌体密度下降。如果溶氧在对数生长期时大于 60%,则 Ecc13B(pJMC1) 生长过快,发酵后期会使不积累 PHB 的细胞比例有所增加,从而导致 PHB 表观产量下降(见表 2)。

## 2.5 PHB 的提取

发酵结束后,6000g 离心收集菌体,用丙酮脱去细胞中水分。干菌体在沸腾氯仿(每克干菌体用 70ml 氯仿)中,回馏 4h,则 PHB 溶于热氯仿中。抽滤除去细胞残渣,收集氯仿,冷却后加入 3 倍体积预冷的正己烷,沉淀出 PHB。PHB 的提取率为 92%,经核磁共振检测,PHB 纯度为 99%。

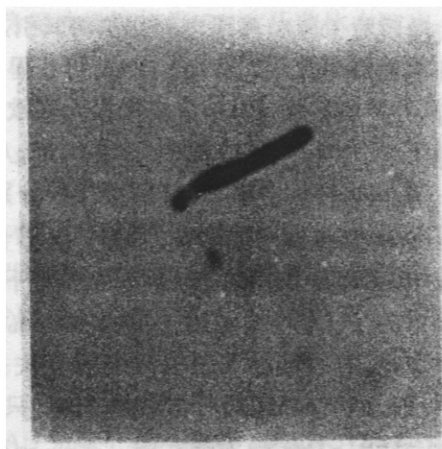


图 3 发酵后期 Ecc13B(pJMC1) 细胞的显微照片  
Fig. 3 Photomicrograph of Ecc13B(pJMC1) cells during the PHB accumulation period  
Cells were dyed in red with safranin, PHB granules were dyed in black with Sudan black, the upper cell is the cell of Ecc13B(pJMC1), the lower is the cell of Ecc13B. Magnification, ca.  $\times 1500$

表 2 溶氧对 Ecc13B(pJMC1) 生长和积累 PHB 的影响

Table 2 Growth and PHB synthesis of Ecc13B(pJMC1) in relation to dissolved oxygen concentration

Dissolved oxygen concentration in exponential phase/%	Incubation time/h	Final DCW <sup>a</sup> /g·L <sup>-1</sup>	PHB content of DCW/%
30~40	33	19.0	62.5
45~55	35	28.2	68.2
60~70	30	34.3	40.0

<sup>a</sup>DCW, dry cell weight.

致 谢 美国 James Madison 大学的 Douglas E. Dennis 教授和德国 Munchen 大学的 Reinhard Wirth 教授分别为实验提供了有关基因和受体菌株,本系的马荣才博士、阎大来博士、吴柏和副教授也对我们的工作给予很大的帮助,在此一并致谢。

## 参 考 文 献

- [1]Homes P A, Phys Technol, 1985, 16:32~36.
- [2]Steinbüchel A. Valetin H E. FEMS Microbiol Lett, 1995, 128:219~228.
- [3]Byrom D. Trends Biotechnol., 1987, 5:246~250.
- [4]Poirier Y, Nawrath C, Somervall C. Bio/Technology, 1995, 13:142~150.
- [5]Slater S C, Vogte W H, Dennis D E. J Bacteriol, 1988, 170(10):4431~4436.
- [6]Zhang H, Obias V, Gongyer K *et al.* Appl Environ Microbiol, 1994, 60(2):1198~1205.
- [7]Steinbüchel A, Schubert P, Arch Microbiol, 1989, 153:101~104.
- [8]Sambrook S, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd ed., Cold Spring Harbor Labora-

tory Press, New York, 1989.

[9] Wirth R, Friesenegger A, Fieldler S. *Mol Gen Genet*, 1989, 216:175~177.

[10] 中国科学院微生物研究所细菌分类组编著,《一般细菌常用鉴定方法》,北京:科学出版社,1978, pp. 98~193.

[11] 方中达,《植物研究方法》,北京:农业出版社,1979, pp. 169.

[12] Ramsay B A, Lomaliza K, Charaie C *et al.* *Appl Environ Microbiol*, 1990, 56(7):2093~2098.

[13] Dubois M, Gilles K A, Hamilton J K *et al.* *Anal Chem*, 1956, 28:350~356.

[14] 李西开主编,《土壤农业化学常规分析方法》,北京:科学出版社,1983, pp. 86~88.

[15] Doi Y, Segawa A, Knuiaika M. *Appl Environ Microbiol*, 1989, 55(11):2932~2932.

[16] Williamson D H, Wilkinson, J. F. *J Gen Microbiol* 1958, 19:198~209.

[17] 伏见隆夫:现代化学, 1989, 12:22~23.

## Expression of phaCAB Genes in Transgenic *Erwinia carotovora* 13B

Tian Jiesheng Li Jilun

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

**Abstract** A derived plasmid, pJMC1, containing polyhydroxyalkanoate (PHA) synthetic genes (phaCAB) from *Alcaligenes eutrophus* was successfully introduced into a non-pathogenic strain of *Erwinia carotovora* (Ecc13B) by electroporation. The phaCAB genes were expressed well in the transgenic bacteria, Ecc13B (pJMC1). Fed-batch cultures of the transgenic *Erwinia* were conducted in a 5L automatic control fermentor with sucrose as the carbon source, and it showed that the final cell mass and PHB content of dry cell weight were 28g/L and 68% respectively within 35 hours.

**Key words** Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate(PHB), phaCAB, transgenic *Erwinia*, electroporation