

利用大肠杆菌工程菌廉价高效生产聚羟基丁酸酯

魏国清^{1,2}, 陈泉¹, 康振¹, 祁庆生¹

1 山东大学 微生物技术国家重点实验室, 济南 250100

2 江西农业大学理学院, 南昌 330045

摘要: 利用大肠杆菌生产聚羟基脂肪酸酯是近来国际上生物可降解塑料的研究热点, 本研究通过对适宜于聚羟基脂肪酸酯生产的大肠杆菌菌株的选择和碳源利用试验, 初步确立了大肠杆菌代谢工程改造生产聚羟基脂肪酸酯的基础。并在此基础上, 通过对大肠杆菌磷酸烯醇式丙酮酸葡萄糖转移酶系统的改造和工程菌环境诱导系统的应用, 解决了大肠杆菌工程菌无法同时利用多种碳源合成聚羟基脂肪酸酯的难题。发酵试验证明, 工程化改造的大肠杆菌利用廉价底物在 5 L 发酵罐中分批培养 32 h 后, 菌体终浓度能够达到 8.24 g/L, 聚羟基脂肪酸酯占细胞干重的 84.6%。

关键词: 大肠杆菌, 聚羟基脂肪酸酯, 可降解塑料, 发酵

Efficient polyhydroxybutyrate production from cheap resources by recombinant *Escherichia coli*

Guoqing Wei^{1,2}, Quan Chen¹, Zhen Kang¹, and Qingsheng Qi¹

1 State Key Laboratory of Microbial Technology, Shandong University, Jinan 250100, China

2 College of Science, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China

Abstract: Based on the fermentation analysis of *Escherichia coli* strains and cheap renewable resources suitable for polyhydroxybutyrate (PHB) production, we constructed a *ptsG* mutant of *Escherichia coli* DH5 α . Application of *E. coli* DH5 α mutant together with stress-induced system, we could produce PHB efficiently from cheap renewable sugar mixture by the simultaneous consumption of different sugars. Batch fermentation at lab scale (5 liter) showed that *E. coli* DH5 α Δ *ptsG*/pQKZ103 produced PHB from sugar mixture up to 84.6% of cell dry weight in 32 hours; meanwhile, the cell dry weight reached 8.24 g/L.

Keywords: *Escherichia coli*, PHB, biodegradable plastics, fermentation

聚羟基脂肪酸酯 (Polyhydroxyalkanoates, PHA) 是微生物在不平衡生长条件下形成的一类功能性生物聚酯。由于 PHA 具有生物可降解性、生物相容性、气体阻隔性、压电性、非线性光学活性以及由官能团引起的其他特殊性能, 因此它是一种优良的生物

可降解塑料, 具有广泛的应用前景, 受到国际上的普遍关注^[1]。目前, 由于石化原料的缺乏和环境问题, 生物可降解塑料领域已经吸引了越来越多的关注, 成为国际上研究的热点。

利用微生物发酵生产聚酯类可降解塑料是目前

Received: November 17, 2009; **Accepted:** February 25, 2010

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 30870022), National Basic Research and Development Program of China (973 Program) (No. 2007CB707803).

Corresponding author: Qingsheng Qi. Tel: +86-531-88365628; Fax: +86-531-88565610; E-mail: qiqingsheng@sdu.edu.cn

国家自然科学基金 (No. 30870022), 国家重点基础研究发展计划 (973 计划) (No. 2007CB707803) 资助。

生产生物可降解塑料的主要途径之一。自然界中许多属、种的细菌在细胞内都能积累 PHA 作为能量和碳源的储备,如产碱杆菌、甲基营养菌及鞘细菌等^[2-3]。微生物合成的 PHA 含量可以达到细胞干重的 70%~80%,因此微生物是生产生物可降解塑料的良好宿主。但是,自然微生物中 PHA 的合成都是在碳源过量,限制氮、磷等生长条件下产生的。在这种培养条件下,微生物的生长不均衡影响了细胞的代谢和生长,使得最终的产物产率并不高。而大肠杆菌作为一种研究得最为清楚的微生物,具有生长快、培养简单、可以利用木糖等多种碳源、遗传操作体系清楚等特点^[4],非常适合于用作微生物的细胞工厂生产能源和生物基化学品。并且,大肠杆菌不含有聚酯的降解酶,合成的 PHB 不会被降解;易于破碎,有利于 PHA 的提取纯化^[5]。

但是,野生大肠杆菌在利用混合糖生长的时候会出现碳源代谢阻遏现象 (Carbon catabolite repression, CCR),在生长曲线上表现为菌体的二次生长^[6-7]。本课题组在前期的研究中通过改造编码磷酸烯醇式丙酮酸葡萄糖转移酶系统 (Carbohydrate phosphotransferase system, PTS) 中的葡萄糖转移酶的 *ptsG* 基因,消除了 CCR 的影响,提高了大肠杆菌糖代谢的效率,为大肠杆菌同时利用多种糖的混

合物提供了基础^[8]。另外,在传统的基因工程菌的发酵培养中都使用异丙基-β-D-硫代半乳糖苷 (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside, IPTG) 作为诱导剂诱导外源蛋白的表达。该方法具有一定的局限性:1) IPTG 价格昂贵,生产成本低;2) IPTG 对细胞具有一定毒性,会抑制菌体生长;3) 加入诱导剂的时机不好掌握^[9-10]。本实验室构建的一种依靠外界环境自发诱导的质粒克服了上述缺点,能够用于工业生产^[11]。

因此,在以上分析和研究的基础上,试图建立一种适宜于工业化生产聚酯类生物可降解塑料的微生物菌株和方法,为生物可降解塑料的生产提供基础。本研究以聚羟基丁酸酯 (PHB) 作为前期目标,以工业生产木糖醇的废液浓缩得到的“糖蜜”作为廉价的混合碳源,初步进行了 PHB 的发酵试验。“糖蜜”是玉米芯水解液在生产木糖醇之后的废液经浓缩后得到的,其总糖含量约为 60%。糖蜜中主要成分为木糖,约占总糖含量的 65%以上,其次是葡萄糖,占总糖含量 25%左右,另外还有少量的阿拉伯糖等。

1 材料与方法

1.1 菌种与质粒

本研究中用到的菌种和质粒见表 1。

表 1 菌种与质粒

Table 1 Strains and plasmids

Strains and plasmids	Genotype	Sources or references
Strains		
MG1655	<i>F</i> λ <i>ilvG- rfb-50 rph-1</i>	Lab stock
W3110	<i>F</i> λ <i>rph-1 INV(rrnD, rrnE)</i>	Lab stock
DH5α	<i>F</i> <i>endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG</i> Φ80 <i>dlacZAM15</i> <i>Δ(lacZYA-argF)U169, hsdR17(r_K⁻ m_K⁺), λ⁻</i>	Lab stock
DH5α Δ <i>ptsG</i>	<i>E. coli</i> DH5α derivative, Δ <i>ptsG::cat</i>	This work
Plasmids		
pBHR68	pBluescript II SK ⁻ , <i>phbC</i> and <i>phbAB</i> gene from <i>Ralstonia eutropha</i>	[12]
pQKZ103	pBluescript SK ⁻ , containing SIR fragment upstream of <i>rpoS</i> gene, <i>phbC</i> and <i>phbAB</i> gene from <i>Ralstonia eutropha</i>	[11]

1.2 培养基

种子培养基: 蛋白胨 10 g, 酵母粉 5 g, NaCl 10 g, 加水定容至 1 000 mL, 调 pH 为 7.0。

发酵培养基: Na₂HPO₄·12H₂O 17.1 g, KH₂PO₄ 3 g, NaCl 0.5 g, NH₄Cl 1 g, 1 mol/L 的 MgSO₄ 2 mL,

0.1 mol/L 的 CaCl₂ 1 mL, 10 mmol/L 的硫酸素 5 mL, 加水至 1 000 mL, 调 pH 为 7.2。

1.3 主要仪器和试剂

生物反应摇瓶柜 (上海欣蕊自动化设备有限公司), Gene Pulser Xcell 电穿孔系统 (Bio-Rad), 高

效液相色谱仪 LC-VP (Shimadzu), 气相色谱仪 GC2010 (Shimadzu), 5 L 玻璃发酵罐 (上海保兴生物设备工程有限公司), PCR 仪 (Bio-Rad)。DNA 工具酶购自 Fermentas 公司, 实验中用到的引物由 Invitrogen 公司合成。其他试剂均为国产分析纯。

1.4 培养方法

种子培养: 从平板挑取单菌落至装有 50 mL 种子培养基的 300 mL 三角瓶中, 置于 37°C 摇床中, 240 r/min 培养 10 h。

发酵培养: 将种子液以 5% 接种量接入装有 300 mL 培养基的 1 000 mL 三角瓶中, 置于 37°C 摇床, 240 r/min 培养。

限氧培养: 限氧培养实验在生物反应摇瓶柜中进行。在装有 500 mL 发酵培养基的反应瓶中按 5% 的接种量接入种子液。通过打开和关闭通入各瓶的空气阀门实现不同阶段的限氧控制。

发酵罐分批培养: 分批发酵在 5 L 发酵罐中进行。用 5 mol/L 的 NaOH 溶液控制 pH 在 6.8 左右; 通过调节搅拌转速维持发酵前 12 h 溶氧在 30% 以上, 从第 12 h 开始到发酵结束控制溶氧在 30% 以下。

1.5 基因敲除

本研究采用 Red 重组系统敲除大肠杆菌 DH5 α 中的 *ptsG* 基因, 具体操作方法参见文献[13]。敲除过程中用到的引物见表 2。

表 2 引物序列

Table 2 Primers designed for gene knockout

Primer name	Primer sequence (5'-3')
<i>ptsG</i> -pKD3-F	ACGTAAAAAAGCACCCATACTCAGGAGC ACTCTCAATTGTGTAG GCTGGAGCTGCTTC
<i>ptsG</i> -pKD3-R	AGCCATCTGGCTGCCTTAGTCTCCCCAACG TCTTACGGAATGGGA ATTAGCCATGGTCC
<i>ptsG</i> -test-F	CCTGTACACGGCGAGGCTCT
<i>ptsG</i> -test-R	AATAACACCTGTAAAAAAGGCAGCC

1.6 检测方法

1.6.1 PHB 检测

准确称取 15 mg 冻干的菌体放入反应瓶中, 向其中加入 1 mL 氯仿、850 μ L 甲醇和 150 μ L 浓硫酸, 密封后沸水浴 1 h 后, 向反应瓶中加入 1 mL 蒸馏水, 剧烈混匀后, 静置分层。抽取有机层过滤后用气相色谱仪分析。气相色谱分析方法参见文献[14]。

1.6.2 糖浓度检测

菌液室温下 12 000 r/min 离心 2 min, 取上清, 然后用孔径为 0.22 μ m 的无菌滤膜过滤, 用高效液相色谱检测发酵产物。检测器为视差折光检测器 RID-10A, 色谱柱为 HPX-87H (300 mm \times 7.8 mm), 流动相为 5 mmol/L 的硫酸溶液, 流速为 0.6 mL/min。

2 结果与分析

2.1 大肠杆菌生产菌株的选择

各种大肠杆菌的代谢能力和代谢水平不同。例如 *E. coli* W3110 适宜于发酵, 而 *E. coli* MG1655 适宜于好氧生长。为了考察常用的大肠杆菌工程菌适宜于 PHB 合成的情况, 分别对 *E. coli* DH5 α /pBHR68、*E. coli* MG1655/pBHR68 和 *E. coli* W3110/pBHR68 进行了初步发酵试验 (图 1)。*E. coli* DH5 α /pBHR68 无论从最终菌体浓度还是胞内 PHB 含量上, 都要优于其他两种菌。因此, 本实验选用 DH5 α /pBHR68 作为 PHB 生产的出发菌株。

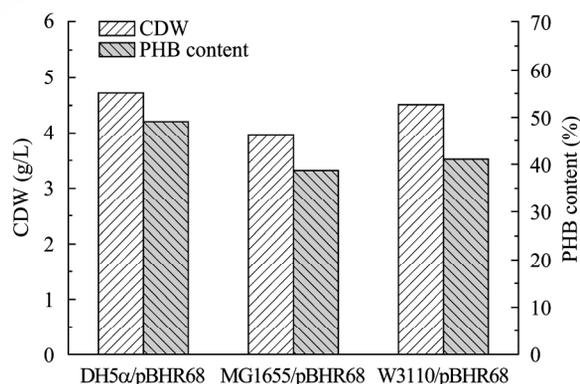


图 1 不同大肠杆菌菌株生产 PHB 的情况比较

Fig. 1 Production of PHB with different *E. coli* strains.

2.2 大肠杆菌利用各种碳源合成 PHB 的比较

PHB 作为生物基产品, 其生产原料的价格对其生产成本影响很大。因此, 选择了几种常用廉价碳源的单糖, 分析大肠杆菌工程菌利用这几种糖生产 PHB 的能力 (表 3)。从表中可以看出重组大肠杆菌以葡萄糖为碳源时, 菌体终浓度最高, 可达到 4.31 g/L, 胞内 PHB 含量也可达到 46% 左右; 以木糖为碳源时, 其菌体终浓度略低于葡萄糖, 但其胞内 PHB 含量却是最高, 可达到 49%; 以乳糖和

L-阿拉伯糖为碳源时, 菌体浓度和 PHB 含量相对要低一些。这说明大肠杆菌工程菌可以利用各种碳源合成 PHB, 特别是木糖在生产 PHB 方面并不逊于葡萄糖, 并且其转化为 PHB 的转化率为 0.19, 比葡萄糖要高。因此, 木糖是生产 PHB 的一种良好碳源。

表 3 不同碳源合成 PHB 结果比较

Table 3 Comparison of PHB accumulation in *E. coli* from different carbon sources

Carbon sources	CDW (g/L)	PHB content (%)	Sugar consumption (g/L)	PHB yield
Glucose	4.31	46	11.7	0.17
Xylose	3.95	49	10.2	0.19
L-arabinose	2.62	39	6.8	0.15
Lactose	3.44	30	8.6	0.12

2.3 多种碳源同时利用的工程化大肠杆菌的构建

从上面的研究结果中可以看出, 多种碳源都可以用于 PHB 的生产, 而且许多廉价碳源都是多种糖

的混合物, 例如半纤维素的水解物就是葡萄糖、木糖等的混合物。因此, 研究了重组 *E. coli* DH5 α 利用糖混合物生产 PHB 的情况 (图 2A)。由图可以看出, *E. coli* DH5 α /pBHR68 可以利用多种碳源, 但是 CCR 的存在, 导致大肠杆菌在利用混合碳源生长时, 会优先利用葡萄糖, 等葡萄糖耗尽之后才会利用木糖。这将导致大肠杆菌生长过程出现停滞期, 降低糖利用效率, 延长发酵周期。为了消除大肠杆菌 CCR 的影响, 利用本实验室建立的方法在 *E. coli* DH5 α 中敲除了 *ptsG* 基因^[8]。通过发酵试验, 发现 *E. coli* DH5 α Δ *ptsG*/pBHR68 菌株能够同时利用葡萄糖、木糖, 而且生长速度明显变快, PHB 也能够快速积累, 只需 30 h 左右菌体和 PHB 的浓度均达到最高 (图 2B)。并且, *E. coli* DH5 α Δ *ptsG*/pBHR68 菌株产生的 PHB 占细胞干重的含量较初始菌株 DH5 α 有较大提高, 可以达到 60% 以上。

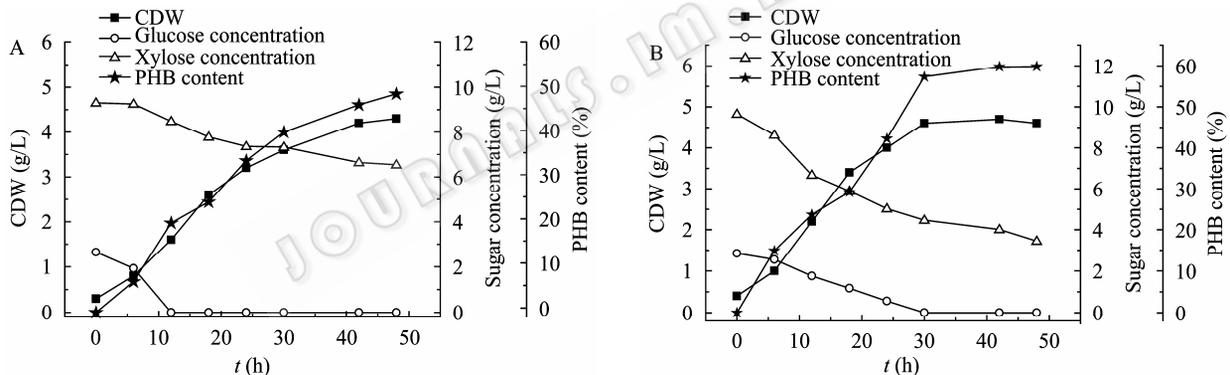


图 2 大肠杆菌在混合碳源中的生长和 PHB 的积累

Fig. 2 Growth and PHB accumulation of *E. coli* in sugar mixture. (A) *E. coli* DH5 α /pBHR68. (B) *E. coli* DH5 α Δ *ptsG*/pBHR68.

2.4 工程化大肠杆菌在发酵过程中诱导和培养的优化

利用大肠杆菌工程菌生产 PHB 存在一定的局限性。为此, 本实验室在前期的研究中构建了一种能够通过环境压力变化诱导 PHB 合成的系统^[11]。本实验将该系统用在 *E. coli* DH5 α Δ *ptsG* 中, 并和 IPTG 诱导系统中 PHB 积累的能力作了比较 (表 4)。在环境诱导系统中 PHB 产量和菌体生长都得到了大幅提高, 菌体终浓度可达到 6.24 g/L, 比含 pBHR68 质粒的菌株提高了近 20%。推测环境诱导系统导致菌体和 PHB 产量提高的原因在于该调控系统的启动

强度。GFP 表达检测结果表明, 该系统的启动迅速并且强度大于 Lac 启动子^[11]。同时, 该系统的应用可以消除 IPTG 对菌体生长的抑制作用, 也能从一定程度上提高菌体和 PHB 的产量。

表 4 比较重组大肠杆菌在 IPTG 和环境诱导系统中 PHB 的积累

Table 4 Comparison of PHB production in IPTG induced system with that in stress-induced system

Plasmids	CDW (g/L)	PHB content (%)	Sugars utilization (g/L)
pBHR68	5.22	55	11.7
pQKZ103	6.24	73	18.8

除了诱导, 通气也是影响发酵生产中成本的关键因素。文献报道, 限氧有利于大肠杆菌中 PHB 的合成^[15]。因此, 在摇瓶柜上初步优化了氧气的条件, 为发酵罐发酵培养提供了基础。在 4 个平行培养的摇瓶中, 分别按 4 种不同的培养方式供氧: 全程供氧、全程限氧、0~24 h 限氧和 24~48 h 限氧。如图 3 所示, 在菌体生长阶段的 24~48 h 限氧既能保证菌体生长速度, 又能提高胞内 PHB 的含量。这一培养模式符合 Wang 等的 PHB 二阶段生产模型^[15]。因此, 选择该培养方式作为发酵培养控制溶氧的依据。

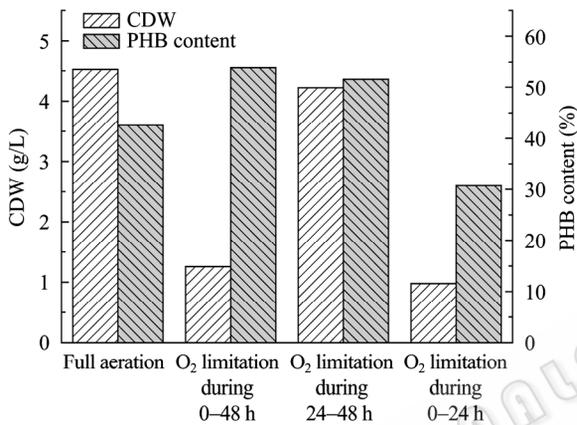


图 3 通气对重组大肠杆菌 PHB 合成的影响
Fig. 3 Effect of oxygen limitation on PHB synthesis in recombinant *E. coli*.

2.5 实验室中利用廉价底物分批发酵试验

以 *E. coli* DH5 α Δ ptsG/pQKZ103 作为发酵菌株, 以“糖蜜”为原料, 在 5 L 发酵罐中进行了 PHB 发酵试验。初始总糖浓度约为 30 g/L, 发酵过程中通过 5 mol/L 的 NaOH 控制 pH 在 6.8 左右; 从第 12 h 开始到发酵结束控制溶氧在 30% 以下。在发酵 32 h 后, 糖基本耗尽, 大肠杆菌 DH5 α Δ ptsG/pQKZ103 的菌体终浓度达到 8.24 g/L, PHB 占细胞干重的 84.6% (图 4)。从图上可以看出, 发酵的前 16 h 菌体快速生长, 16 h 之后 PHB 得到大量积累, 这与第 12 h 开始限氧基本相符; 本批发酵糖代谢较为彻底, 糖转化为 PHB 的转化率约为 0.243。图 5 为培养 48 h 时的菌体在透射电镜下的照片。从照片上可以看出, 大肠杆菌胞内已经被 PHB 颗粒充满, 并且产生的 PHB 颗粒较大, 有利于 PHB 的提取。

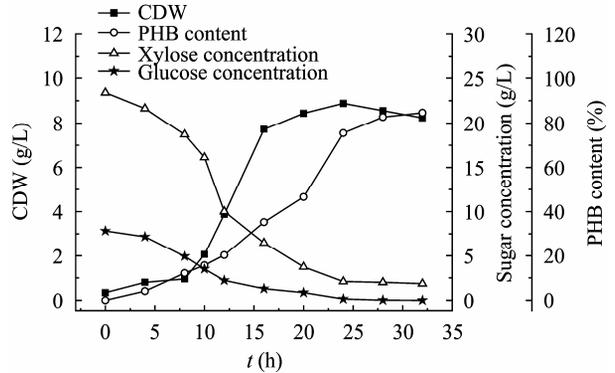


图 4 重组大肠杆菌分批培养菌体生长、糖消耗及 PHB 含量曲线

Fig. 4 Time profiles of cell concentration, sugars concentration and PHB content of recombinant *E. coli* in batch culture.

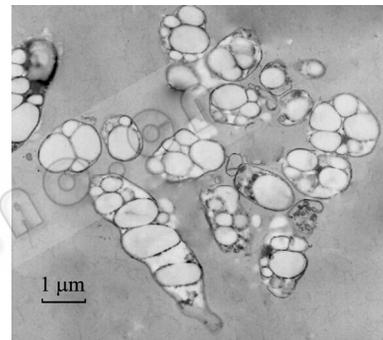


图 5 重组大肠杆菌 DH5 α Δ ptsG/pQKZ103 透射电镜照片
Fig. 5 Transmission electron microscopy photo of recombinant *E. coli* DH5 α Δ ptsG/pQKZ103.

3 结论

由于大肠杆菌拥有许多优势, 利用工程化大肠杆菌生产生物可降解塑料一直是人们追求的一个方向。但是, 大肠杆菌作为细胞工厂也有一定的缺点, 本研究通过对大肠杆菌 *E. coli* DH5 α 的初步改造使之适宜于多种碳源的利用, 并通过非 IPTG 环境诱导系统的应用, 初步解决了大肠杆菌应用于 PHB 生产过程中的一些问题。实验室发酵结果证明该菌利用玉米芯水解浓缩液作原料能够很好地实现大肠杆菌的快速生长和 PHB 的高效积累, 具有良好的前景。

REFERENCES

- [1] Steinbuechel A, Aerts K, Babel W, *et al.* Considerations on the structure and biochemistry of bacterial polyhydroxyalkanoic acid inclusions. *Can J Microbiol*, 1995, **41**: 94-105.
- [2] Byrom D. Polymer synthesis by micro-organisms:

- technology and economics. *Trends Biotechnol*, 1987, **5**: 246–250.
- [3] Wallen LL and Rohwedder WK. Poly-b-hydroxyalkanoate from activated sludge. *Environ Sci Technol*, 1974, **8**: 576–579.
- [4] Li R, Zhang H, Qi Q. The production of polyhydroxyalkanoates in recombinant *Escherichia coli*. *Bioresour Technol*, 2007, **98**(12): 2313–2320.
- [5] Aldor I, Keasling JD. Metabolic engineering of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) composition in recombinant *Salmonella enterica serovar typhimurium*. *Biotechnol Bioeng*, 2001, **76**(2): 108–114.
- [6] Stulke J, Hillen W. Carbon catabolite repression in bacteria. *Curr Opin Microbiol*, 1999, **2**: 195–201.
- [7] Bruckner R, Titgemeyer F. Carbon catabolite repression in bacteria: choice of the carbon source and autoregulatory limitation of sugar utilization. *FEMS Microbiol Lett*, 2002, **209**: 141–148.
- [8] Li R, Chen Q, Wang PG, *et al.* A novel-designed *Escherichia coli* for the production of various polyhydroxyalkanoates from inexpensive substrate mixture. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, **75**(5): 1103–1109.
- [9] Mnaimneh S, Davierwala AP, Haynes J, *et al.* Exploration of essential gene functions via titratable promoter alleles. *Cell*, 2004, **118**: 31–44.
- [10] Siegele DA, Hu JC. Gene expression from plasmids containing the *araBAD* promoter at subsaturating inducer concentrations represents mixed populations. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94**: 8168–8172.
- [11] Kang Z, Wang Q, Zhang HJ, *et al.* Construction of a stress-induced system in *Escherichia coli* for efficient polyhydroxyalkanoates production. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2008, **79**(2): 203–208.
- [12] Spiekermann P, Rehm BH, Kalscheuer R, *et al.* A sensitive, viable-colony staining method using Nile red for direct screening of bacteria that accumulate polyhydroxyalkanoic acids and other lipid storage compounds. *Arch Microbiol*, 1999, **171**: 73–80.
- [13] Datsenko KA, Wanner BL. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97**: 6640–6645.
- [14] Wong MS, Thomas B, Nikos M, *et al.* Engineering poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) composition in *E. coli*. *Biotechnol Bioeng*, 2008, **99**(4): 919–928.
- [15] Wang FL, Lee SY. Production of poly(3-Hydroxybutyrate) by fed-batch culture of filamentation-suppressed recombinant *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*, 1997, **63**(12): 4765–4769.