

基因重组菌质粒稳定性的提高与苯丙氨酸发酵的研究

梁世中

(华南理工大学生物工程研究所, 广州)

高河泳 关 达治

(日本大阪大学生物工学国际交流中心, 大阪)

本研究用具有苯丙氨酸生产抗反馈抑制基因 $pheA^{FR}$ 、 $aroF^{FR}$ 及温度敏感型阻遏基因 CI_{857} 的质粒 pSY130-14 和具有分配机能的低拷贝质粒 pSY16, 重组构建了具有苯丙氨酸生产基因系统的质粒 pSY200-14, 然后使其转化到大肠杆菌 AT2471 中, 育成了基因重组菌株 AT2471/pSY200-14。试验表明, 该菌株质粒稳定性比原菌株 AT2471/pSY130-14 有较大的提高, 当存在选择压时, 在 30—42℃ 范围内维持 100% 的高稳定性。应用此重组菌株, 在 2.5 L 通气搅拌罐进行发酵试验, 在搅拌转速 850 rpm, 通气速率 1.0 vvm, 38.5℃ 和 pH 7.0 的条件下, 发酵 48 h 苯丙氨酸生成量达 14.2 g/L, 比原株增产 11.8%。

关键词 基因重组; 质粒稳定性; 基因工程菌株; 苯丙氨酸发酵

苯丙氨酸(Phe)是必须氨基酸之一, 是医药和食品工业原料。近年来, 以它和天门冬氨酸为原料制成的甜味素, 即天门冬酰苯丙氨酸甲酯(Asparton)^[1], 其甜味比蔗糖高 200 倍, 而发热量只有 16.7 kJ/g, 与蛋白质相仿, 适于肥胖症及糖尿病患者食用, 其用量将急速上升^[2,3]。

Phe 生产方法有化学合成法、酶法、前体物发酵和直接发酵法等四种。直接发酵法可应用价廉易得的糖为原料, 且在常温常压的温和条件下进行。但是, 野生菌株存在 Phe 生物合成的反馈抑制和反馈阻遏作用, 其 Phe 生产能力往往很低, 所以必须采用诱变或基因重组等技术选育其高产菌株。大肠杆菌芳香族氨基酸的合成途径存在复杂的反馈抑制系统^[4], 为解除或减缓此反馈抑制, 杉本等^[5]应用体外基因重组技术, 构建成具有抗反馈抑制基因 $pheA^{FR}$ 、 $aroF^{FR}$ (FR: Feedback in-

hibition resistant) 及温度敏感型阻遏基因 CI_{857} 的质粒 pSY130-14, 转化到大肠杆菌 AT2471 上, 育成了有较高产 Phe 水平的工程菌株。但是, 在基因适宜表达温度下, 质粒的稳定性差, 导致了 Phe 产酸水平的下降。

本研究用具有分配机能的 pSC101 系列低拷贝质粒 pSY16 和上述的 pSY130-14, 重组构建新的质粒, 转化 *E. coli* AT 2471 后, 研究所育成的基因工程菌株质粒的稳定性和 Phe 发酵能力。

材料与方法

(一) 使用菌株及质粒

1. 质粒扩增用菌株: *E. coli* RR1

本文于 1990 年 8 月 14 日收到。

本研究在日本大阪大学生物工学国际交流中心完成。

(hsds20 ara14 proA2 lacY1 galk2 rpsL 20 xy15 λ^-)

2. 苯丙氨酸生产菌株: *E. coli* AT 2471(tyrA4 thi-1 relA1 spoT1)

3. 质粒: pSY130-14 (cI857 P_R -aroF^{PR} P_L -pheA^{PR} K_m^+) 和 pSY16 (K_m^+ T_m^+), 两者均为杉本构建^[5]。

(二) 培养基

1. LB培养基: 用于种子培养和质粒转化等。

2. Phe发酵培养基(g/L): 葡萄糖 20, 柠檬酸钠 10, 谷氨酸钠 0.4, 酪氨酸 0.4, $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 29.8, KH_2PO_4 6, NH_4Cl 2, $NaCl$ 1, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 3, K_2SO_4 13; 以下成分(mg/L): 盐酸硫胺素 40, $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 7, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 30, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 25, $AlCl_3 \cdot 6H_2O$ 7, $Co(NO_3)_2$ 3, $ZnCl_2 \cdot 7H_2O$ 2, $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$ 2, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 1, H_3BO_3 0.5, pH 7.4。

(三) 质粒pSY200-14的构建

选用Phe生产用质粒pSY130-14和具有分配机能的低拷贝质粒pSY16, 构建新的质粒。DNA的分离、纯化与质粒的构建按杉本^[5]和Biroboim^[6]的方法进行。把构建的重组质粒定名为pSY200-14。

(四) 质粒pSY200-14在*E. coli* AT 2471的转化

质粒pSY200-14在*E. coli* AT 2471转化参考Lederberg等的方法^[7]进行。具体地, 就是在试管LB培养基(3ml)中接种一环斜面菌种, 30℃、120rpm振荡培养过夜, 吸2ml接入100ml LB培养基中, 30℃、120rpm通气培养至 $OD_{600nm} \approx 0.6$, 用日立(18PR-52型)离心机4℃、15000rpm离心5min, 无菌水洗净后往沉淀菌体中加入20ml预冷的0.1mol/L $MgCl_2$, 摇匀。

置冰浴30min, 4℃、6000rpm离心5min。往沉淀菌体中加入冰冷的0.1mol/L $CaCl_2$ 4.25ml, 摇匀, 然后加入甘油(15%), 于-80℃低温冰箱中存放, 即为感受态细胞。进行转化时, 取此感受态细胞液0.1ml与浓度为15 μ g/ml的pSY200-14质粒液0.01ml混合, 置冰浴30min, 42℃热冲击2min, 加入37℃的LB培养基0.5ml, 37℃下静置1h。最后涂布于(LB+Tc)培养基平皿, 30℃培养过夜。从中选出单菌落进行质粒的提取与鉴定, 以确认目的基因重组菌株AT2471/pSY200-14。

(五) 工程菌株AT2471/pSY200-14的Phe发酵及质粒稳定性试验

1. 种子培养: LB培养基添加四环素(12.5mg/L)作选择压, 对照菌株AT 2471/pSY130-14则添加卡那霉素 25 mg/L。30℃振荡培养24h。

2. 摇瓶发酵: 于Phe发酵培养基中添加25mg/L Tc, 但亲本菌株AT2471/pSY130-14的发酵则添加25mg/L K_m 。500ml三角瓶装培养基50ml, 接种量2%, 在38.5℃, 120rpm条件下振荡通气发酵24h。

3. 通气搅拌罐发酵: 培养基与摇瓶发酵相同, 2.5L发酵罐装1.5L培养基。搅拌转速850rpm, 恒温38.5℃, 通气1.0vvm, 使用28%的氨水控制pH为7.0 \pm 0.2。采用分批加糖工艺, 利用溶氧电极连续在线测量发酵液的DO值, 当DO值突然升高时, 意味基质糖耗尽, 即投加30g葡萄糖。发酵时间为48h。

(六) 分析方法

1. 菌体浓度: 使用分光光度计测定 OD_{600nm} 。

2. 质粒稳定性: 发酵液用生理盐水稀释 10^6 — 10^8 倍, 取0.1ml涂布于LB培养基平板上(菌落数控制在100—300个),

30℃培养24h,从中选100个单菌落移植到(LB+Tc)培养基平板上,30℃培养24h后计算菌落数(设为A),则质粒稳定性为A%。

3. Phe浓度测定:取适量发酵液,离心除菌体,上清液用蒸馏水适当稀释后作试样。于磨砂塞试管中,加入此试样10μl,0.6mol/L TCA(三氯乙酸)10μl,30mmol/L茚三酮 80μl,5mmol/L L-亮氨

酰丙氨酸40μl以及0.3mol/L琥珀酸缓冲液(pH5.8)200μl,充分混匀后,置60℃水浴恒温反应120min,于冷水中速冷至常温后,加入新鲜配制的铜试剂(酒石酸钾钠65mg/L, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 60mg/L, Na_2CO_3 1.6g/L)2ml,混匀,室温下反应10—15min。然后用荧光分光光度计测定荧光,激发波长为365nm,测定波长为515nm,最后从标准曲线查出试样浓度,标准苯丙

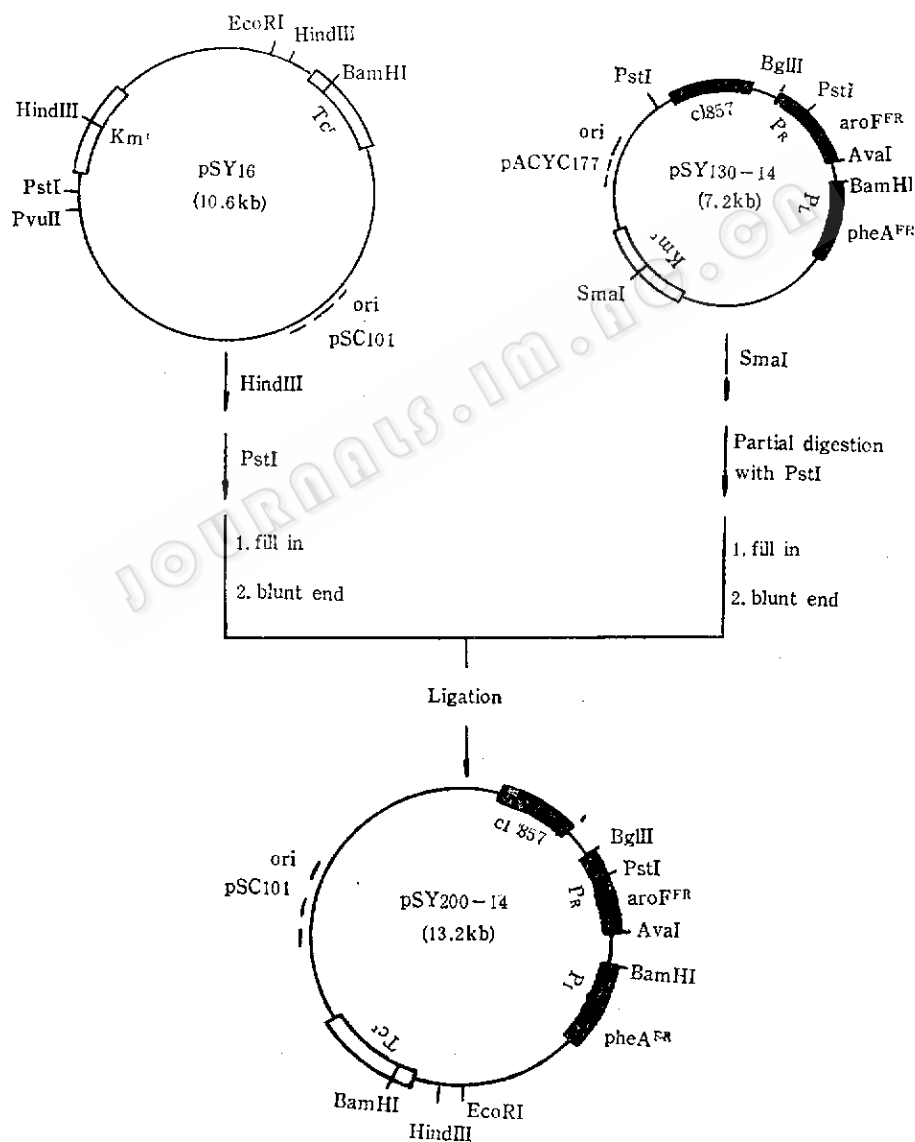


图1 质粒pSY200-14的构建

Fig.1 Construction of plasmid pSY200-14

氨酸溶液浓度为 0、10、20、30、40 $\mu\text{g/ml}$ 。

结果与讨论

(一) 质粒 pSY200-14 的构建

用质粒 pSY130-14 和 pSY16 构建质粒 pSY200-14 的过程如图 1 所示。

由图 1 可知, pSY200-14 质粒保留了 pSY130-14 的 *cI*857、*aroF*^{PR}、*pheA*^{PR} 温度调节型 Phe 生产基因系统, 又吸取了质粒 pSY16 的分配机能和低拷贝数、Tc 抗性的特点, 因此可预期重组质粒 pSY200-14 比亲本质粒 pSY130-14 的转化子更稳定。

(二) 无选择压时质粒稳定性与 Phe 发酵

在不添加抗菌素时的摇瓶发酵试验中, 经 48h 发酵, 在 30—38.5 $^{\circ}\text{C}$ 范围内, 重组菌株 AT2471/pSY200-14 均具有 100% 的稳定性, 而对照的 AT2471/pSY130-14 在 38.5 $^{\circ}\text{C}$ 只有 69% 的稳定性。但是在 40 $^{\circ}\text{C}$ 时, 两者的稳定性都明显降低, 如图 2 所示。根据杉本等^[6]的研究, 由于

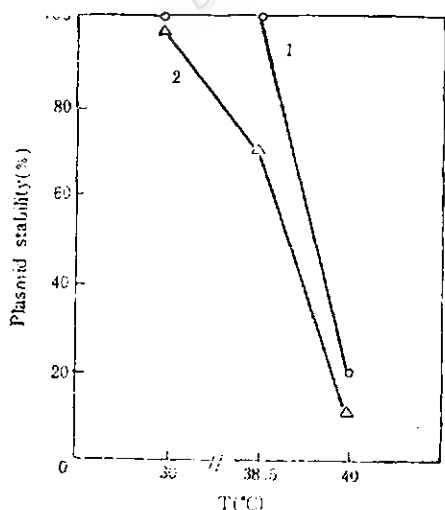


图2 不加选择压时质粒的稳定性

Fig.2 Stability of plasmids without selective pressure

1. AT2471/pSY200-14; 2. AT2471/pSY130-14

受 *cI*857 温度敏感型阻遏基因的控制, 温度达 40 $^{\circ}\text{C}$ 或以上时, *pheA*^{PR} 基因高水平表达, 由此导致特异的 mRNA 过量合成, 妨碍了转化子的生长增殖, 其结果表现为重组菌株的稳定性降低。实验表明, 38.5 $^{\circ}\text{C}$ 是单槽 Phe 发酵的最佳温度。

尽管 AT2471/pSY200-14 转化子的稳定性比 AT2471/pSY130-14 高得多, 但在 38.5 $^{\circ}\text{C}$ 条件下 Phe 的积累稍有提高, 如图 3 所示, 其原因可能是前者的质粒复制数较低。

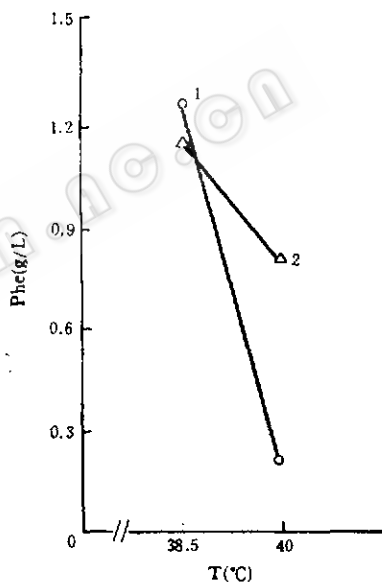


图3 不加选择压时苯丙氨酸发酵结果

Fig.3 Phenylalanine production without selective pressure

1. AT2471/pSY200-14; 2. AT2471/pSY130-14

(三) 施加选择压时质粒稳定性与 Phe 发酵

重组菌株 AT2471/pSY200-14 应用含 12.5mg/L 四环素 (Tc) 的发酵培养基, 而原菌株 AT2471/pSY130-14 使用含卡那霉素 (K_m) 25mg/L 的培养基, 在不同温度下摇瓶发酵的质粒稳定性及 Phe 生产结果如图 4 和图 5 所示。由此可见, 施加选择压时, 重组菌株 AT2471/pSY200-14 的稳定

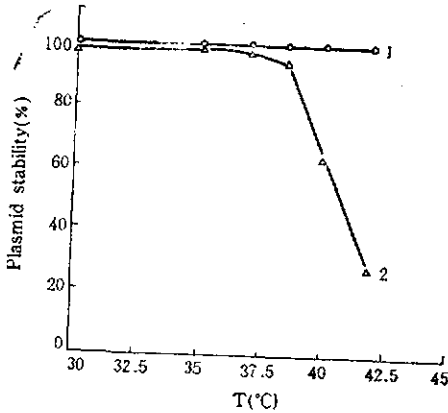


图4 选择压存在下质粒的稳定性

Fig.4 Stability of plasmids under selective pressure

1. AT2471/pSY200-14(12.5mg T_c /L)
2. AT2471/pSY130-14(25mg K_m /L)

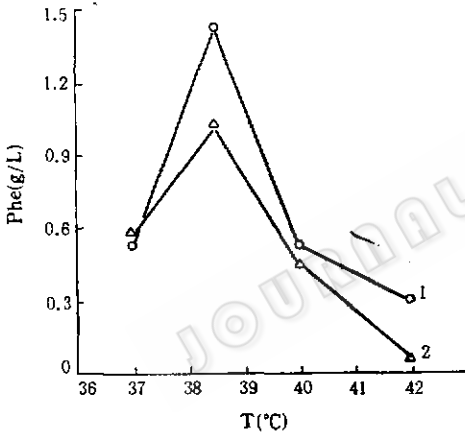


图5 选择压存在下苯丙氨酸发酵结果

Fig.5 Phenylalanine production under selective pressure

1. AT2471/pSY200-14(12.5mg T_c /L)
2. AT2471/pSY130-14(25mg K_m /L)

性高,在30—42°C范围内经48h发酵后仍保持100%高稳定性。但原菌株在40°C时质粒的丢失率达到38%,42°C时只保留27%的稳定性。由于本研究所重组的菌株质粒稳定性高,故在38—42°C范围内,Phe生产水平平均比原株高,在38.5°C最佳产酸温度下,发酵24h产酸1.41g/L,比后者高38%。

(四) 通气搅拌发酵罐Phe发酵

由于摇瓶发酵存在溶氧速率低、发酵过程pH难于控制等缺点,限制了产酸水平的提高,所以应用2.5L通气搅拌反应器进行重组菌株的Phe发酵试验。采用38.5°C最佳发酵温度,并添加抗菌素作选择压力,添加量与摇瓶相同。发酵结果如图6所示。

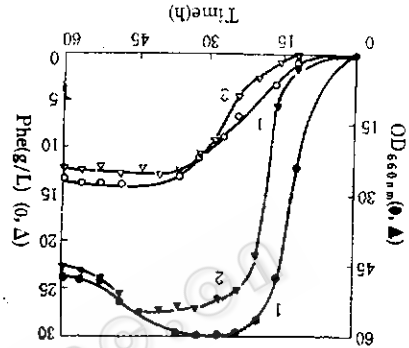


图6 重组菌株AT2471/pSY200-14(1)与AT2471/pSY130-14(2)Phe发酵过程

Fig.6 Time course of cell growth and phenylalanine production by the strain AT2471/pSY200-14(1) and the AT2471/pSY130-14(2)

条件: 2.5L通气搅拌罐, 850rpm, 1.0vvm, pH7.0
Condition: 850rpm, 1.0vvm, pH 7.0 in a 2.5L jar fermentor

从图6可知,无论是菌体增殖或是苯丙氨酸生成,AT2471/pSY200-14均比原株高。前者在发酵48h后产酸达最高值的14.2g/L,比后者的最高值12.7g/L增产11.8%。此外,新构建的菌株培养24h后菌体浓度即达60g/L,比亲株在培养过程的最高细胞浓度55g/L还高近10%。

研究结果表明,通过基因重组,使低拷贝质粒pSY16具有分配机能的基因片段插入到苯丙氨酸生产质粒pSY130-14中所构建成的质粒pSY200-14具有分配机能和低拷贝的特点,其大肠杆菌AT2471的转化子有较高的稳定性,这结果和Sauruger^[8]和Austin^[9]等的研究结果相吻合,其综合影响使构建成的工程菌株AT2471/

pSY200-14具有更高的Phe生产能力。如在发酵工程上采用二级培养法, 进一步优化发酵工艺, 可望实现Phe发酵生产的实用化。

参 考 文 献

- [1] Mayer, R. H. et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 91:2684—2691, 1969.
- [2] 轻工业部食品工业司的通知, 中国食品, 5:46, 1990.
- [3] *Bio Industry*, 2:315—320, 1985.
- [4] Herrman, K. M. and Somerville, R. L., *Amino acids biosynthesis and genetic regulation*. Addison-Wesley publishing company, MA, 1983.
- [5] 杉本俊二郎, 温度调节型发现ベクターを利用しに大腸菌による α -ニルアウニン生産, 大阪大学博士論文, 日本大阪, 1986.
- [6] Biroboim, H. C. and Doly, J., *Nucleic Acids Res.*, 7:1513, 1979.
- [7] Lederberg, E. M. and Cohen, S. N., *J. Bacteriol.*, 119:1072, 1974.
- [8] Saurugger, P. N. et al., *J. Biotechnol.*, 4:333, 1986.
- [9] Austin, S. et al., *J. Bacteriol.*, 168:1010, 1986.

Stability Improvement of Plasmid Harboured in Genetically Engineered Strain and Production of Phenylalanine

Liang Shizhong

(Institute of Biotechnology, South China University of Technology, Guangzhou)

Gao Heyong Tatsuji Seki

(ICBiotech., Faculty of Engineering, Osaka University, Japan)

In this study, a new plasmid pSY200-14 was constructed by gene-recombination technology, which has a genetic system of phenylalanine production, by using plasmid pSY130-14 and pSY16. The pSY130-14 contains $pheA^{FR}$ and $aroF^{FR}$, the feedback inhibition resistant phenylalanine-production genes, and a temperature-sensitive repressor cl_{857} , whereas pSY16 possesses a partition system and is a low copy plasmid. Subsequent experiments have shown that the recombinant AT2471/pSY200-14 constructed is more stable than original strain AT2471/pSY130-14, in other words, the former kept the stability as high as 100% under selective pressure in 30—42°C. In a 2.5L jar fermentor, the production of phenylalanine after 48h cultivation reached 14.2g/L that was 11.8% higher than old strain under the conditions of impeller speed 850 rpm, aeration rate 1.0 vvm, temperature 38.5°C and pH7.0.

Key words

Gene recombination, plasmid stability, genetically engineered strain, phenylalanine fermentation