

利用重组大肠杆菌产聚-4-羟基丁酸的研究*

宋水山

(河北省科学院生物研究所 石家庄 050051)

摘要: 重组大肠杆菌 *E. coli* XL-1 Blue (pKSSE5.3) 携带 *Ralstonia eutropha* HI6 的 PHA 聚合酶基因 (*phaC*) 和 *Clostridium kluyveri* 的 4-羟基丁酸: CoA 转移酶基因 (*orfZ*), 可以利用葡萄糖和 4-羟基丁酸为碳源合成均聚的聚-4-羟基丁酸 [P (4HB)]。优化培养基和培养条件后, 进行了补料分批培养。结果表明, 经 68h 左右培养, *E. coli* XL-1 Blue (pKSSE5.3) 的发酵液中菌体干重达 13g/L, P (4HB) 的密度达 5g/L, P (4HB) 百分含量为 36%。从收获的冻干细胞中提纯得到 40g 均聚的 P (4HB), 为进一步分析检测 P (4HB) 生物、理化、加工特性及其应用价值成为可能。

关键词: 聚-4-羟基丁酸, 4-羟基丁酸, 重组大肠杆菌, 聚酯

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2002) 01-0010-05

* 德国教育科研部 (BMBF) 部长基金资助项目

收稿日期: 2000-11-24, 修回日期: 2001-02-15

STUDIES ON PRODUCTION OF POLY (4-HYDROXYBUTYRIC ACID) BY RECOMBINANT STRAIN OF ESCHERICHIA COLI

SONG Shui-Shan

(Biology Institute, Hebei Academy of Sciences, Shijiazhuang 050051)

Abstract: A recombinant *E. coli* XL1-Blue (pKSSE5.3) harbouring PHA synthase gene (*phaC*) of *Ralstonia eutropha* H16 and 4-hydroxybutyric acid: CoA transferase gene (*orfZ*) of *Clostridium kluyveri* was used to produce poly (4-hydroxybutyric acid), P (4HB), homopolymer in M9 salts medium with glucose and 4-hydroxybutyric acid as carbon sources. Optimization of medium type and cultivation conditions and fed-batch culture were carried out. The results showed that the final cell dry weight, P (4HB) concentration and P (4HB) content were 13 g/L, 5g/L, and 36%, respectively in a 27L stirred and aerated fermentor after 68 hours of fed-batch culture. A large amount of P (4HB) was isolated by extraction of lyophilized cells with chloroform and make it possible to further examine the material properties and applications of P (4HB) homopolymer from recombinant *E. coli*.

Key words: Poly (4-hydroxybutyric acid), 4-hydroxybutyric acid, Recombinant *E. coli*, Polyester

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 (如缺氧、磷、氧、铁等) 条件下在胞内积累的碳源和能源贮藏物质, 在自然界中可被微生物降解成水和二氧化碳, 且具有热可塑性、生物相容性、光学活性和压电特性等。随着废弃塑料造成日益严重的环境污染, PHA 做为生物可降解塑料被国际社会公认为极具开发潜力的新型材料。同时, PHA 做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, 也是研究和了解得最透彻的一种。英国 Zeneca 公司和奥地利 Linz 公司早在 80 年代就利用发酵法培养真氧产碱杆菌和肥大产碱杆菌生产 P (3HB)。近年来, 国内已开展利用重组大肠杆菌生产 P (3HB) 的研究^[2,3]。但由于 P (3HB) 的某些理化加工性能不尽人意, 如质地发脆, 发硬, 难于加工, 其应用范围和价值受到了很大的限制^[4]。Mukai 等研究发现, 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^[5]。初步研究表明, 与均聚的 P (3HB) 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], 熔点低 (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^[5-7]。因此, P (4HB) 比 P (3HB) 更具有应用前景和开发价值。

Hein 等构建了携带 *Ralstonia eutropha* H16 的 PHA 聚合酶基因 (*phaC*) 和 *Clostridium kluyveri* 中编码 4-羟基丁酸: CoA 转移酶基因 (*orfZ*) 的重组质粒 pKSSE5.3 和 pSKSE5.3, 并转化大肠杆菌 *E. coli* XL-1 Blue。重组大肠杆菌在以葡萄糖和 4HB 为碳源的 LB 或无机培养基中培养, 可以合成均聚的 P (4HB)^[8]。本文在此基础上优化培养基和培养条件, 进而在 27L 发酵罐中进行补料分批发酵, 并获得 40g 的 P (4HB)。

1 材料与方法

1.1 菌株

E. coli XL-1 Blue (pKSSE5.3), 由 Alexander Steinbüchel 教授提供。

1.2 培养基

LB培养基按文献[8]配制, M9和R培养基分别按文献[8]和[9]配制, 将M9培养基中除碳源外的所有组分的浓度分别提高2倍和4倍, 配制成2xM9和4xM9培养基。

1.3 培养方法

培养温度均为37℃, 接种量均为10%。摇床培养时, 300mL三角瓶中装50mL培养基, 摇床转速为280 r/min, 培养48h。发酵罐培养时, 采用27L搅拌式不锈钢发酵罐(德国Apparate und Behältertechnik Harrislee GmbH), 初始装15L M9培养基, 葡萄糖和4HB的浓度分别为1%和0.4%。补料溶液含60%葡萄糖, 2%硫酸镁和4%酵母提取物。当培养基中葡萄糖浓度低于0.5%时, 补加1%的葡萄糖。当培养基中4HB的浓度低于0.05%时, 用20%的4HB贮液向培养基中补加0.4%的4HB。通气量为1~2vvm, 搅拌速度为600~1000r/min, 以控制溶氧浓度在20%以上。酸碱双向调控维持pH7.0。

1.4 分析方法

1.4.1 菌体干重的测定: 取发酵液5mL, 4000 r/min离心15min, 水洗2次, 冷冻真空干燥, 称重。

1.4.2 P(4HB)含量的测定: 采用气相色谱法^[10]。

1.4.3 葡萄糖浓度的测定: 采用酶试剂盒法(德国宝灵曼公司)。

1.4.4 4HB浓度的测定: 采用液相色谱法。

1.5 P(4HB)的提取和纯化

冻干细胞置于索氏抽提器中, 用氯仿回流抽提P(4HB)。氯仿浓缩液缓慢加入10倍体积的乙醇中, P(4HB)沉淀析出, 过滤风干获得P(4HB)。将P(4HB)重新溶解于氯仿, 在乙醇中沉淀, 得到较高纯度的P(4HB)。

2 结果与讨论

2.1 最适培养基

表1 不同培养基对菌体生长和P(4HB)积累的影响

培养基	M9	2xM9	4xM9	R
菌体干重(g/L)	0.34	0.91	1.85	1.11
P(4HB)密度(g/L)	0.22	0.18	0.18	0.22
P(4HB)含量(% of CDW)	65	20	10	20

CDW: 菌体干重

不同培养基对菌体生长和P(4HB)积累的影响不同。用M9培养基培养, 菌体内P(4HB)的百分含量最高。2xM9, 4xM9和R培养基虽然可以显著提高菌体干重, 但却抑制菌体P(4HB)的合成能力。因此, 选用M9培养基为最适培养基。

2.2 最适初始pH

用初始pH不同的培养基培养重组大肠杆菌, 发现最适初始pH值为6.8~7.1(见图1)。

2.3 最适葡萄糖和4HB的浓度

碳源浓度影响重组大肠杆菌的生长和积累P(4HB)的能力。采用不同的葡萄糖和4HB的浓度组合, 结果表明提高4HB的浓度可以促进P(4HB)的合成。随着4HB的浓度由0.1%提高到0.8%, P(4HB)的百分含量由40%左右增加到95%左右, 然而当4HB的浓度超过0.4%时, 菌体干重降低。当培养基中4HB的浓度一定时, 葡萄糖浓度的提高有利于菌体生长和P(4HB)合成, 但葡萄糖浓度超过1%时, 菌体干重反而略

有下降。因此,最适葡萄糖和4HB的浓度分别为1%和0.4%。

2.4 4-羟基丁酸的最适添加时间

4HB作为细菌合成P(4HB)的前体物质,其加入时间影响菌体生长及其合成P(4HB)的能力。图2所示为在培养过程中于不同时间加入4HB所获得的菌体干重、P(4HB)密度和P(4HB)百分含量。接种时加入4HB,菌体干重和P(4HB)百分含量最高。推迟4HB的加入,菌体干重显著降低,仅为接种时加入4HB的50%,而P(4HB)百分含量在培养8h之前加入4HB未受明显影响,若在培养12h之后加入4HB,P(4HB)百分含量降至10%以下。因此,4HB应在培养开始时加到培养基中。

2.5 添加复合营养成分对菌体生长和P(4HB)合成的影响

为研究添加复合营养成分对菌体生长和P(4HB)合成的影响,用M9培养基做基础分别添加酵母提取物,胰蛋白胨,蛋白胨,酪蛋白水解物和Nutrient broth培养48h。结果表明,添加任何一种复合营养成分均可以显著提高P(4HB)百分含量,而对菌体干重的作用有的明显,有的不明显。添加0.1%酵母提取物可以获得最佳的生物量和P(4HB)百分含量。

2.6 27L发酵罐中的补料分批培养

为验证并探究重组大肠杆菌用于生产的可能性,同时也为了获得足够量的P(4HB)用于检测其材料性能和应用潜力,我们在27L搅拌式发酵罐中以葡萄糖和4HB为碳源按材料和方法中1.3所述对*E. coli* XL-1 Blue (pKSSE5.3)进行了补料分批培养。结果显示(见图3),培养初始菌体生长和P(4HB)合成同步进行。培养21h时,P(4HB)百分含量迅速提高到53%,之后25h内P(4HB)百分含量基本维持恒定,继续培养,P(4HB)百分含量逐渐减少为36%,而菌体干重在整個培养过程中持续增长。补

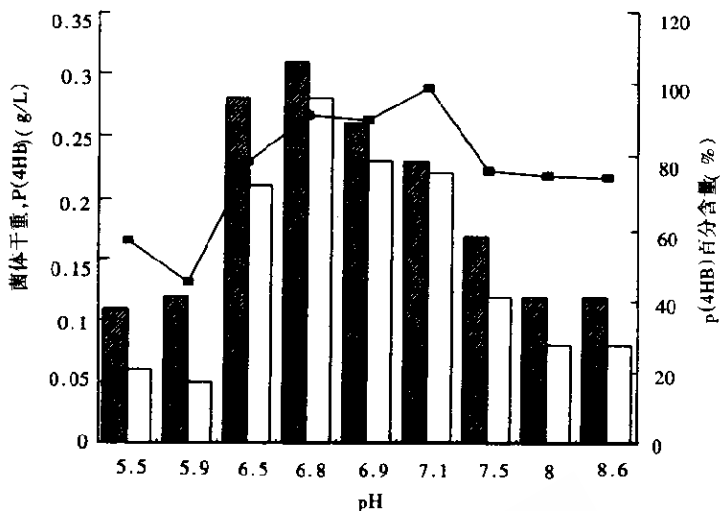


图1 培养基的初始pH对菌体生长和P(4HB)合成的影响

■ 体干重, □ P(4HB)密度, —◆— P(4HB)百分含量

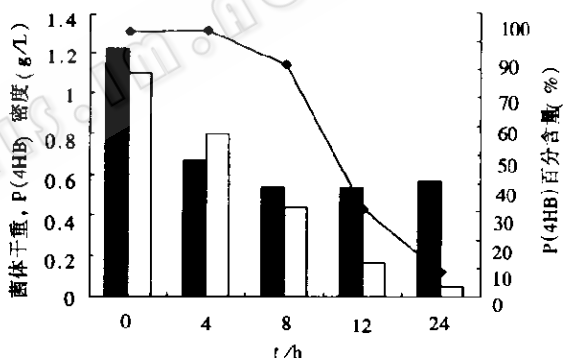


图2 4-羟基丁酸的添加策略对菌体生长和P(4HB)合成的影响

■ 体干重, □ P(4HB)密度, —◆— P(4HB)百分含量

料分批培养后期, 既使不断地补加 4HB, P (4HB) 的含量也不再增加。经 68h 左右培养, *E. coli* XL-1 Blue (pKSSE5.3) 的发酵液中菌体干重达 12.6g, P (4HB) 的密度达 4.4 g, P (4HB) 百分含量为 36%。从收获的冻干细胞中提纯得到 40g 均聚的 P (4HB)。

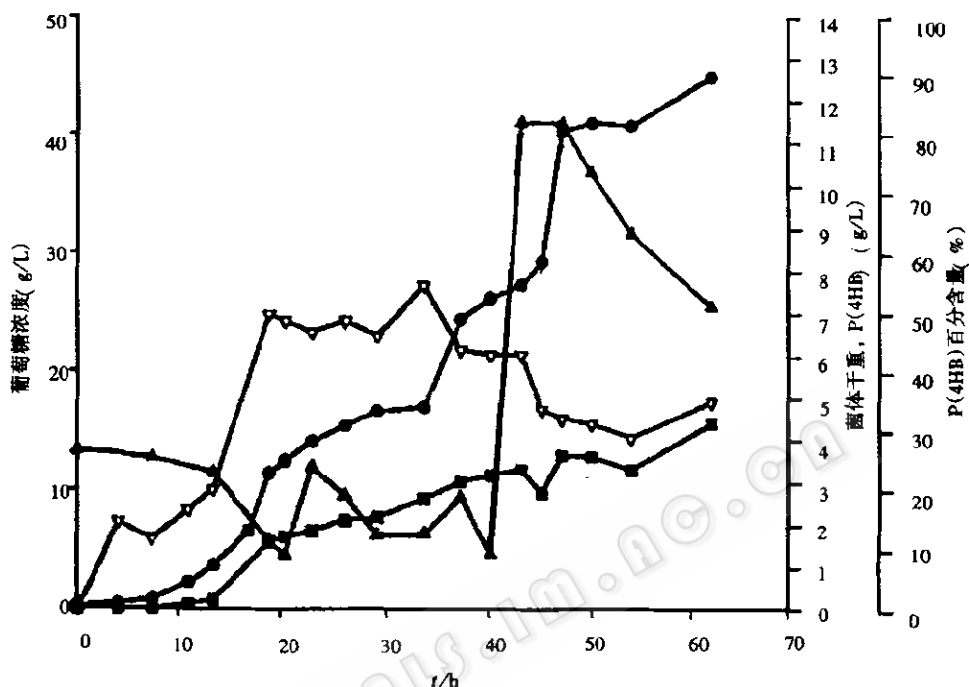


图3 重组大肠杆菌 *E. coli* XL-1-Blue(pKSSE5.3)的补料分批培养

—●—菌体干重, —■—P(4HB)密度, —▲—葡萄糖浓度, —▽—P(4HB)百分含量

综上所述, 携带 PHA 聚合酶基因和 4-羟基丁酸: CoA 转移酶基因的重组大肠杆菌可以利用葡萄糖和 4HB 为碳源高效合成均聚的 P (4HB), 经补料分批培养可以得到大量的 P (4HB) 纯品, 使进一步分析检测 P (4HB) 生物、理化、加工特性及其应用价值成为可能。利用分子生物学技术构建能够利用廉价底物代替昂贵的 4-羟基丁酸生产均聚 P (4HB) 的基因工程菌, 通过优化发酵方式和条件, 实现高密度培养, 这将在发酵工业中具有广阔的推广和应用前景。这一工作正在进行中。

参考文献

- [1] Lee S Y, Choi J, Wong H H, *et al.* Inter J Biol Macromol, 1999, 25: 31~36.
- [2] 田杰生, 宋海琛, 吴柏和, 等. 微生物学报, 2000, 40 (1): 26~31.
- [3] 于慧敏, 尹 进, 李红旗, 等. 微生物学报, 2000, 40 (3): 286~289.
- [4] Hrabak O. FEMS Microbiol Rev, 1992, 103: 251~256.
- [5] Mukai K, Doi Y, Sema Y, *et al.* Biotechnol Lett, 1993, 15: 601~604.
- [6] Steinbuechel A. J Environ Polym Degrad, 1994, 2: 67~74.
- [7] Jaeger K, Steinbuechel A, Jendrosseck D, *et al.* Appl Environ Microbiol, 1995, 61: 3113~3118.
- [8] Hein S, Soehling B, Gottschalk K, *et al.* FEMS Microbiol Lett, 1997, 153: 411~418.
- [9] Lee S Y, Chang H N, Chang Y K, *et al.* Biotechnol Lett, 1993, 15: 971~974.
- [10] Braunegg G, Sonnleitner G, Lafferty R M, *et al.* Eur J Appl Microbiol Biotechnol, 1978, 6: 29~37.