

利用门多萨假单胞菌 NK-01 合成中长链聚羟基脂肪酸酯(PHA_{MCL})

陶 剑^{1,2} 郑承纲¹ 张 斌¹ 郭文斌¹ 王淑芳² 宋存江^{1,2*}

(1. 南开大学生命科学学院分子微生物学与技术教育部重点实验室 天津 300071)

(2. 南开大学生命科学学院生物活性材料教育部重点实验室 天津 300071)

摘要: 从土壤中分离到 1 株能够合成中长链聚羟基脂肪酸酯(PHA_{MCL})的细菌, 经分类鉴定命名为 *Pseudomonas mendocina* NK-01。对于该菌株在氮源限制的情况下, 利用葡萄糖合成的 PHA_{MCL} 进行了结构分析。同时, 获得了该菌株 PHA 合成酶基因 *phaC1*, 利用大肠杆菌表达载体 pBluescript SK⁻ 构建了重组载体 pBSphaC1, 并在 *E.coli* JM109 中成功表达。以所构建的工程菌株进行了发酵合成。

关键词: 中长链聚羟基脂肪酸酯, 门多萨假单胞菌, PHA 合成酶

Synthesis of Medium-chain-length Polyhydroxyalkanoate (PHA_{MCL}) by *Pseudomonas mendocina* NK-01

TAO Jian^{1,2} ZHENG Cheng-Gang¹ ZHANG Bin¹ GUO Wen-Bin¹ WANG Shu-Fang²
SONG Cun-Jiang^{1,2*}

(1. The Key Laboratory of Molecular Microbiology and Technology, Ministry of Education, Nankai University, Tianjin 300071)

(2. The Key Laboratory of Bioactive Materials, Ministry of Education, Nankai University, Tianjin 300071)

Abstract: A strain which can synthesize medium-chain-length polyhydroxyalkanoate (PHA_{MCL}) was isolated from soil. It was named as *Pseudomonas mendocina* NK-01 through classification and identification. The PHA_{MCL} was synthesized by *P. mendocina* NK-01 from glucose in the condition of limited nitrogen source. The structure of it was characterized. In order to construct a recombinant plasmid pBSphaC1, an expressing plasmid of *E.coli*, after *phaC1* gene encoding PHA synthase was cloned from *Pseudomonas mendocina* NK-01 by PCR amplification, it was linked into pBluescript SK⁻. *PhaC1* gene was expressed successfully in *E.coli* JM109. Fermentation synthesis was also investigated by recombinant *E.coli*.

Keywords: Medium-chain-length polyhydroxyalkanoate (PHA_{MCL}), *Pseudomonas mendocina*, PHA synthase

聚羟基脂肪酸酯(polyhydroxyalkanoate, PHA)是微生物在失去营养平衡的条件下, 即碳源丰富、

氮或磷缺失时, 在体内积累的细胞碳源或能源贮存颗粒, 环境营养条件恢复时这些颗粒可被微生物分

解利用。这些高分子聚合物颗粒就是 PHA。据报道已有 300 余种微生物能够合成和积累 PHA^[1]。由于这类物质具有生物降解性、生物相容性、压电性等特征, 已成为生物材料的研究热点。

PHA 含有不同长度碳链的单体侧链基团, 根据单体碳原子数的不同, PHA 被划分为两个大类, 即: 由 3~5 个碳原子的单体组成短链 PHA (Short-chain-length Polyhydroxyalkanoate, PHA_{SSL})和由 6~18 个碳原子的单体组成中长链 PHA (Medium-chain-length Polyhydroxyalkanoate, PHA_{MCL})^[2]。

PHA_{MCL} 往往以多种单体组成, 使得该类聚合物拥有了独特的高分子性能。基于 PHA_{MCL} 的生物降解性、疏水性和不透氧的特性, PHA_{MCL} 可以用于各种生物降解包装材料。PHA_{MCL} 在一次性清洁用品方面的应用在经济上也是可行的。在海洋环境(可降解渔网等材料)、建材(胶黏剂、泡沫塑料和橡皮)和农业中, 都有新型生物可降解材料的很大的市场潜力。PHA_{MCL} 在生物医药方面的应用潜力更具前景。例如用作医用缝合线、药物释放载体等^[2]。在组织工程中, 需要将细胞接种于骨架材料上, 骨架材料不仅需要良好的生物相容性和生物降解性, 而且还要诱导细胞的吸附及随后的组织生长^[3], 因此, PHA_{MCL} 在组织工程领域应用的潜力也相当巨大。

PHA 合酶是 PHA 合成体系中影响 PHA 合成的关键酶^[4], 它对于 PHA 单体类型和组成起着决定性作用^[2]。PHA 合成途径和相关酶类已经被进行了深入的研究, 目前认为细菌 PHA 合酶分为 3 类, 即: 第 1 类以 *R. eutropha* 为代表的 PHA_{SSL} 合成酶 *phaC*; 第 2 类以 *P. oleovorans* 和 *P. aeruginosa* 为代表的 PHA_{MCL} 的合成酶 *phaC1* 和 *phaC2*^[5-11]; 第 3 类以 *Chromatium vinosum* 和 *Thio-capsia violaceae* 为代表的 PHA 合成酶 *phaC* 和 *phaE*^[3]。

实验规模 PHA 的微生物合成方法包括两类, 即: 一步法是在限制氮源培养基中进行发酵; 两步法是先大量繁殖菌体, 再通过无菌离心, 接种至无氮源的培养基中进行发酵^[12]。

本研究利用所分离的 *P. mendocina* NK-01 进行了 PHA_{MCL} 的发酵合成研究, 确立了产物 PHA_{MCL} 的结构组成, 并对其性质进行了研究。通过 PCR 扩增得到了 *phaC1* 基因, 以 pBluescript SK⁻ 构建表达质粒, 在大肠杆菌中成功表达。以丙烯酸作为基因工

程菌脂肪酸 β 氧化抑制剂^[13] 进行了 PHA_{MCL} 发酵。

1 材料与方 法

1.1 菌种分离鉴定和质粒

实验菌株系本室采用尼尔红(Nile Red) 荧光染色法分离自天津市西青区付村农田土壤。取 0 cm~10 cm 的土壤, 以无菌生理盐水稀释为 $10^1\sim 10^8$, 以不同稀释度的土壤悬浊液 0.5 mL 涂布于 PHA 合成菌分离培养基, 于 30℃ 培养 4 d~5 d, 菌落出现后, 以 ZF-2 型三用紫外分析仪 312 nm 波长照射, 呈现橘红色荧光菌落者即为 PHA 合成菌^[14]。16S rRNA 基因序列分析的方法是: 首先提取细菌总 DNA, 然后利用 16S rRNA 基因的特异扩增引物 27F 和 1492R 进行 PCR 扩增。

大肠杆菌 JM109 购自于商业公司; 质粒 pBluescript SK⁻ 由江南大学王正祥教授提供。

1.2 工具酶和生化试剂

限制性内切酶, Taq 酶, T4 DNA 连接酶均购自大连宝生物公司。其它化学试剂为国产分析纯化学试剂。

1.3 培养基

PHA 合成菌分离培养基: 蒸馏水 1000 mL, 牛肉膏 10 g, 蛋白胨 10 g, NaCl 5 g, 葡萄糖 20 g, 琼脂粉 15 g, pH 7.0, 0.1 MPa 灭菌 15 min。冷却至 45 ~ 50℃, 加入尼尔红(Nile Red) 2 mL/L (0.25 mg Nile Red 溶于 100 mL 二甲基亚砜), 无菌条件下倒入培养皿, 冷却后备用^[15]。

富营养培养基: 蒸馏水 1000 mL, 酵母粉 10 g, 蛋白胨 10 g, 牛肉浸粉 5 g, (NH₄)₂SO₄ 5 g, pH 7.0。

P. mendocina NK-01 一步法发酵培养基 (g/L): 蒸馏水 1000 mL, Na₂HPO₄ 3.8 g, KH₂PO₄ 2.65 g, MgSO₄ 0.2 g, 葡萄糖 10 g, NH₄Cl 0.36g, 微量元素液 1 mL, pH7.0。微量元素液(0.1 mol/L HCl 1000 mL, CoCl₂·6H₂O 0.218 g, CaCl₂ 7.8 g, CrCl₃·6H₂O 0.105 g, NiCl₂ 0.118 g, CuSO₄·5H₂O 0.156 g, FeCl₃ 9.7 g)。

P. mendocina NK-01 培养和发酵温度为 30℃。

P. mendocina NK-01 两步法发酵培养基: 无氮源的一步法发酵培养基。

磷酸盐缓冲液的配制: 蒸馏水 1000 mL, Na₂HPO₄·12H₂O 8.95 g, KH₂PO₄ 1.5 g, pH 7.0; 0.1 MPa 高压蒸汽灭菌, 15 min~20 min, 备用。

基因工程菌富集培养为 LB 培养基, 发酵培养

基为添加 0.25% 辛酸的 LB 培养基, 以丙烯酸作为基因工程菌脂肪酸 β 氧化抑制剂, 必要时加入 50 $\mu\text{g/L}$ 的氨苄青霉素; 培养温度为 37 $^{\circ}\text{C}$ 。

1.4 *P. mendocina* NK-01 发酵及 PHA 的提取

1.4.1 一步法发酵: 前培养是在 L-试管中, 以无菌操作加入 5 mL 富营养培养基, 以无菌牙签接入 NK-01 菌株的单菌落, 30、120 r/min 培养 12 h。将前培养物 0.5 mL 接种至含有 100 mL 富营养培养基的 500 mL 三角瓶中, 30、150 r/min 振荡培养 24 h。4、6000 \times g 无菌离心 10 min, 弃上清, 在离心管中以无菌磷酸盐缓冲液振荡混匀, 然后在 4、6000 \times g 无菌离心 12 min, 弃上清。将不含富营养培养基的菌体无菌接入可控氧搅拌式 1 L 发酵装置, 装置内含有 1L C/N 为 5~40、50、60、70、80、90 的一步法 PHA 发酵培养基, 加入微量元素溶液 1 mL, 30 通气培养 72 h。

1.4.2 两步法发酵: 前培养同 1.4.1, 将前培养物 0.5 mL 接种至含有 100 mL 富营养培养基的 500 mL 三角瓶中, 30、150 r/min 振荡培养 24 h。4、6000 \times g 离心 10 min, 弃上清, 在离心管中以无菌磷酸盐缓冲液振荡混匀, 再次在 4、6000 \times g 离心 12 min, 弃上清。分别将不含富营养培养基的菌体无菌接入 10 瓶含有 100 mL 两步法发酵培养基的 500 mL 三角瓶中, 分别加入微量元素溶液 0.1 mL, 30、150 r/min 振荡培养 36 h。

1.4.3 PHA 的提取: 发酵结束后, 收集菌体, 以无菌水洗涤, 冷冻干燥, 称重。以索式抽提器进行 PHA 提取, 以氯仿作为提取液, 在 80 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中回流 12 h。以旋转蒸发器浓缩回流液, 用冷甲醇沉淀过夜, 白色沉淀即为 PHA, 干燥后称重, 计算 PHA 占菌体干重的百分含量。选择 PHA 百分含量最大的 C/N 来配置 PHA 合成培养基。

1.5 *P. mendocina* NK-01 PHA 合成酶基因 *phaCl* 的获得与重组质粒的构建

通过对中长链 PHA 合成酶 *phaCl* 进行序列分析, 设计了保守引物^[16]: primer-olf: 5'-CCACGACAGCGGCCTGTTACCTG-3', primer-prz: 5'-GTCGTCTCACCAGGCCAGCACCAG-3', 以门多萨假单胞菌基因组 DNA 为模板扩增得到一个大的片段, 从中分析得到 PHA 合成酶基因 1680 bp 大小的开放阅读框, 根据获得的序列设计 PHA 合成酶基因 *phaCl* 的扩增引物, 在上下游分别引入了 *Xba* 和 *EcoR* 位点:

primer-f: 5'-GGGGCTCTAGA_AAGCGACTCAGGACATTGGA-3', primer-r: 5'-CCCCGGAATTCCTCTGCGGTTGAGGTGGATG-3'。对 pBluescript SK⁻ 和 PCR 扩增产物进行 *Xba* 和 *EcoR* 双酶切处理, 回收后在 T4 DNA 连接酶作用下 16 $^{\circ}\text{C}$ 连接过夜, 以备转化。

1.6 大肠杆菌感受态细胞的制备与转化

根据《分子克隆实验指南》钙法制备大肠杆菌感受态细胞并进行转化^[17], 转化后接于 1 mL LB 培养基中 37、150 r/min 振荡培养 1 h, 均匀涂布于含有氨苄青霉素的 LB 平板上筛选重组大肠杆菌。筛选得到的菌株利用菌落 PCR 和限制性内切酶酶切重组质粒验证重组子。

1.7 重组大肠杆菌发酵生产 PHA

-70 $^{\circ}\text{C}$ 保藏的重组大肠杆菌在 LB 培养基平板上活化, 以灭菌牙签挑取单菌落接于 20 mL LB 培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜, 以 2% 的接种量接种于发酵培养基中, 加入 1 mmol/L 的 IPTG 诱导 *phaCl* 的表达, 以 0.2 g/L 丙烯酸抑制脂肪酸 β 氧化, 为 PHA 合成提供 (R)-3-羟基脂肪酸辅酶 A 前体, 发酵培养 72 h。由于该发酵方式中过高的脂肪酸浓度一定程度上影响大肠杆菌的生长, 所以采取补料分批发酵的方式逐次加入辛酸底物, 以期获得更高的菌体量和 PHA 产量。

1.8 PHA 的结构分析

核磁共振分析: PHA 溶解在重氯仿中。用 JEOL Eclipse+400 分光计在 400 MHz 测定 ^1H 谱和 ^{13}C 谱, 同时测定 ^{13}C DEPT 谱, 化学位移以 ppm 记录。

红外光谱测定: 将 PHA 置入圆片模具中, 加入少量 KBr, 加压成型, 得到 KBr 压检测圆片。使用 FT-IR-8300 Shimadzu 在 400 cm^{-1} ~4500 cm^{-1} 记录红外光谱, 进行分析。

气-质联用测定: 用酸水解法将 PHA 水解为单体。将 5 mg PHA 与 2 mL 氯仿混合溶解后加入 1.7 mL 甲醇和 0.3 mL 浓硫酸放入密闭容器中在 100、140 min 使 PHA 水解为单体, 取有机相用气相色谱法检测单体成分。利用质谱 MASPEC II system 对单体进行扫描分析, 在数据库中进行比对, 最终以最终确定各个单体组分。

2 结果与讨论

2.1 菌种的分离及鉴定

从 Nile Red 荧光染色培养平板中挑取了 1 株 312 nm 紫外下呈现桔红色荧光的菌落进行分类鉴

定。以该菌株的总 DNA 为模板, 利用 16S rRNA 序列的特异扩增引物进行 PCR, 将获得的 PCR 产物送商业公司进行测序。序列在 GenBank 进行注册, 获得了序列号 :DQ641475。利用 DNASTar 软件进行数据分析建立了基于 16S rRNA 基因的系统进化树。进而, 以 Biolog 微生物分类鉴定系统进行了鉴定, 该菌株与 *Pseudomonas mendocina* 的 SIM 值为 0.67, 而与其它菌的 SIM 值很小, 所以鉴定此菌为 *Pseudomonas mendocina*, 命名其为 :*Pseudomonas mendocina* NK-01。所构建的 16S rRNA 进化树见图 1。

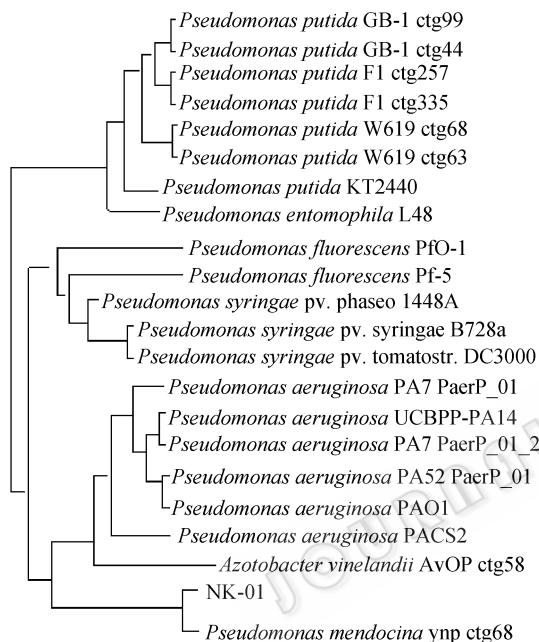


图 1 16S rRNA 基因进化树

Fig. 1 Phylogenetic tree of 16S rRNA

2.2 利用 *Pseudomonas mendocina* NK-01 进行 PHA_{MCL} 的发酵

图 2 是发酵结束后门多萨假单胞菌 NK-01 菌体

切片透射电镜照片。其中白色颗粒就是 PHA, 图中标尺为 500 nm。在不同碳氮比的一步法发酵实验中, 发现 C/N=50 的条件下菌体生长情况和 PHA 产量最好(见表 1)。我们进而对 *Pseudomonas mendocina* NK-01 菌株在以葡萄糖为底物合成 PHA 过程中的菌体干重, PHA 含量和底物消耗等情况进行了研究。结果如图 3 所示。

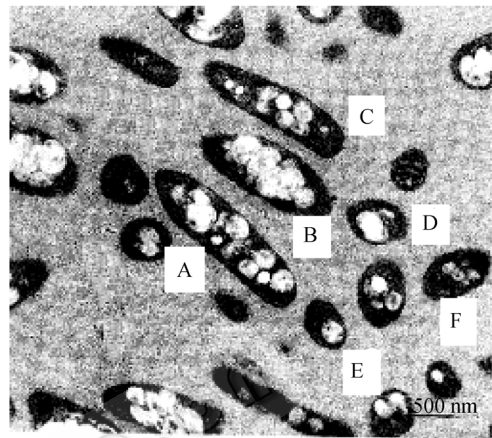


图 2 *P. mendocina* NK-01 菌体内的 PHA_{MCL} 颗粒
Fig. 2 The PHA_{MCL} granules in *P. mendocina* NK-01

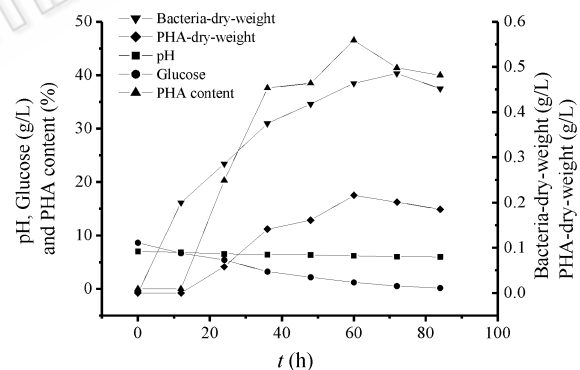


图 3 发酵过程中 PHA 合成与底物的变化情况

Fig. 3 Changes of PHA content, glucose, bacteria-dry-weight and pH during fermentation

表 1 碳氮比对 *Pseudomonas mendocina* NK-01 菌体生长和 PHA 合成的影响
Table 1 Effect of C/N ratio on the growth and PHA synthesis of *Pseudomonas mendocina* NK-01

C/N(mol/mol)	Glucose (g/L)	NH ₄ Cl (g/L)	CDW (g/L)	PHA dry weight (g/L)	PHA content (% W/W)
5~40	10	3.56~0.45	1.894~2.10	0.003~0.09	0.16~6.6
50	10	0.36	1.005	0.540	54.0
60	10	0.30	0.938	0.424	45.2
70	10	0.25	0.974	0.409	41.9
80	10	0.22	0.681	0.081	11.89
90	10	0.20	0.811	0.336	41.2

C/N: C/N ratio; CDW: Cell dry weight; PHA content: PHA dry weight in CDW

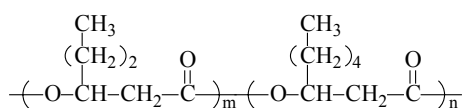


图 6 含质粒 pBsphaC1 的重组大肠杆菌合成的 PHA_{MCL} 的结构

Fig. 6 The structure of PHA_{MCL} synthesized by recombinated *E. coli* harboring pBsphaC1

C8 单体。对于野生菌合成的 PHA 中含有不饱和单体, 分析主要是由于 *Pseudomonas mendocina* NK-01 以葡萄糖作为底物, 以 途径为 PHA 合成提供前体, 由于发酵条件可能形成了不饱和单体, 而重组大肠杆菌的 PHA 底物来自于 途径, 以人工添加的辛酸作为初始底物, 故不会产生不饱和单体。

3 结论

本研究分离得到的 *Pseudomonas mendocina* NK-01 能够在常温下具有良好粘弹性的 PHA_{MCL}, 通过结构分析表明: 该 PHA_{MCL} 由 3-羟基己酸、3-羟基辛酸、3-羟基癸酸、 Δ^7 -3-羟基十六烷酸、3-羟基十八烷酸 5 种单体构成。所合成的 PHA_{MCL} 占菌体干重的 50% 以上。本研究构建的重组大肠杆菌, 通过发酵合成了 PHA_{MCL}, 其结构由 3-羟基己酸和 3-羟基辛酸两种单体构成, 但是产量还较低, 笔者正试图利用基因重组的方法构建组成型表达的重组大肠杆菌, 以期获得高产稳定的 PHA 合成工程菌株。

参 考 文 献

- [1] Steinbüchel A, Hustede E, Liebergesell M, *et al.* Molecular basis for biosynthesis and accumulation of polyhydroxyalkanoic acid in bacteria. *FEMS Microbiol Rev*, 1992, **103**: 217–230.
- [2] 土肥义治, 斯坦因比歇尔. 生物高分子. 第 3a 卷. 北京: 化学工业出版社, 2004, pp. 183–371.
- [3] Buddy D, Allan S, Frederick J, *et al.* Biomaterials Science Second Edition California. USA: Elsevier Academic Press, 2004, pp. 237–293.
- [4] Lee SY. High cell-density culture of *Escherichia coli*,

Trends Biotechnol, 1996, **14**: 98–105.

- [5] Schubert P, Steinbüchel A, Schlegel HG. Cloning of the *Alcaligenes eutrophus* poly- β -hydroxybutyrate synthetic pathway and synthesis of PHB in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 1988, **170**: 5837–5847.
- [6] Lee SY. *Escherichia coli* moves into the plastic age. *Nature Biotechnol*, 1997, **15**: 17–18.
- [7] Kim BS, Lee SY, Chang HN. Production of poly- β -hydroxybutyrate by fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnol Lett*, 1992, **14**: 811–816.
- [8] Lee SY, Chang HN. Effect of complex nitrogen source on the synthesis and accumulation of poly(3-hydroxybutyric acid) by recombinant *Escherichia coli* in flask and fed-batch culture. *J Environ Polymer Degrad*, 1994, **2**: 169–176.
- [9] Lee SY, Chang HN. Characteristic of poly(3-hydroxybutyric acid) synthesis by recombinant *Escherichia coli*. *Ann N Y Acad Sci*, 1996, **782**: 133–142.
- [10] Lee SY, Chang HN. Production of poly(3-hydroxyalkanoic acid). *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 1995, **52**: 27–58.
- [11] Wang F, Lee SY. High cell density culture of metabolically engineered *Escherichia coli* for the production of poly(3-hydroxybutyrate) in a defined medium. *Biotechnol Bioeng*, 1998, **58**: 325–328.
- [12] Sudesh K, Abe H, Doi Y. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polymers. *Progress in Polymer Science*, 2000, **25**: 1503–1555.
- [13] Kazunori T, Yoshihiro A, Hiromi M, *et al.* Co-expression of 3-ketoacyl-ACP reductase and polyhydroxyalkanoate synthase genes induces PHA production in *Escherichia coli* HB101 strain. *FEMS Micro Lett*, 1999, **176**: 183–190.
- [14] Satoh H, Mino T, Matsuo T. Deterioration of enhanced biological phosphorus removal by the domination of microorganisms without polyphosphate accumulation. *Water Sci Technol*, 1994, **3**: 203–211.
- [15] Spiekermann P. A sensitive, viable- colon staining method. Using Nile red for direct screening of bacteria that accumulate polyhydroxyalkanoic acid and ether lipid storage compounds. *Arch Microbiol*, 1999, **171**: 73–80.
- [16] Hang XM, Chen GQ. PCR cloning of type II polyhydroxyalkanoate biosynthesis genes from two *Pseudomonas* strain. *FEMS Microbiology Letters*, 2001, **198**: 165–170.
- [17] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 DW. 分子克隆实验指南. 第三版. 北京: 科学出版社, 2002, pp. 2–137.