



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104520433 A

(43) 申请公布日 2015. 04. 15

(21) 申请号 201380019207. 7

(22) 申请日 2013. 04. 11

(30) 优先权数据

12163787. 0 2012. 04. 11 EP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2014. 10. 09

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2013/057630 2013. 04. 11

(87) PCT国际申请的公布数据

W02013/153180 EN 2013. 10. 17

(83) 生物保藏信息

DSM26225 2013. 04. 09

DSM26224 2013. 04. 09

(71) 申请人 赫姆霍尔兹传染病研究中心有限责
任公司

地址 德国下萨克森州布伦瑞克市

(72) 发明人 萨格拉里奥·阿里亚斯
莫尼卡·巴萨斯

加布里埃尔·莫里纳瑞

肯尼思·奈杰尔·蒂莫斯

(74) 专利代理机构 北京柏杉松知识产权代理事
务所(普通合伙) 11413

代理人 王春伟 刘继富

(51) Int. Cl.

C12P 7/62(2006. 01)

C12N 9/10(2006. 01)

C12N 9/18(2006. 01)

C12N 1/20(2006. 01)

权利要求书2页 说明书22页

序列表6页 附图4页

按照条约第19条修改的权利要求书2页

(54) 发明名称

产生 PHA 的基因工程微生物

(57) 摘要

本发明的目的在于一种天然产生 PHA 的微生物的基因工程形式,其与具有编码聚羟基烷酸酯(PHA)合成酶的至少一个基因的野生型微生物相比具有增加的拷贝数,并最终引起在 24 小时后微生物以与野生型相比至少 1.2 倍的量来过量产生中链长度的 PHA 或长链长度的 PHA,其中用于评估过量产生的参考条件是含有 15mM 辛酸钠的经修改的 MM 培养基。另外,在微生物中 PHA 的产生可以被编码 PHA 降解中涉及的蛋白质的基因的失活有利地影响,这导致微生物的化合物增加的生产而没有随着时间的 PHA 含量的下降。本发明的微生物可用于 PHA 的商业生产。本发明还涉及用于产生 PHA 的方法。

1. 一种天然产生 PHA 的微生物的基因工程形式,其与具有编码聚羟基烷酸酯 (PHA) 合成酶的至少一个基因的野生型微生物相比具有增加的拷贝数,其中所述增加的拷贝数提供所述 PHA 合成酶的均衡性过量产生,并且其中所述基因工程使所述微生物在 24 小时后与所述野生型相比以至少 1.2 倍的量来过量产生中链长度的 PHA 或长链长度的 PHA,其中用于评估所述过量产生的参考条件为含有 15mM 辛酸钠的经修改的 MM 培养基。

2. 权利要求 1 中所述的基因工程微生物,其中所述基因编码 PhaC2 合成酶或其同系物。

3. 权利要求 1 或 2 中所述的基因工程微生物,其中所述 PHA 合成酶的表达由启动子系统调节,所述启动子系统优选为基于蛋白质的,更优选为 T7 聚合酶 /T7 聚合酶启动子系统。

4. 权利要求 1 至 3 中任一项所述的基因工程微生物,其还在编码所述微生物中的 PHA 降解中涉及的蛋白质的至少一个基因中具有至少一个修饰,其中所述修饰使编码所述 PHA 降解中涉及的蛋白质的基因完全或部分失活,更优选地使所述基因完全失活。

5. 权利要求 4 中所述的基因工程微生物,其中所述 PHA 降解中涉及的蛋白质是 PHA 解聚酶,优选地是 phaZ 和其同系物。

6. 权利要求 1 至 5 中任一项所述的基因工程微生物,其中所述基因修饰在经繁殖和 / 或培养的所述微生物中被维持,优选地在不存在或存在抗生素的两种情况下均被维持。

7. 前述权利要求中任一项所述的基因工程微生物,其中所述基因工程使所述微生物在 24 小时后与野生型相比优选地以至少 1.5 倍的量、更优选以至少 2 倍的量来过量产生中链聚羟基烷酸酯 PHA,其中用于评估所述过量产生的参考条件为含有 15mM 辛酸钠的经修改的 MM 培养基。

8. 前述权利要求中任一项所述的基因工程微生物,其中所述微生物选自恶臭假单胞菌、绿脓假单胞杆菌、丁香假单胞杆菌、荧光假单胞杆菌、嗜酸假单胞菌、Pseudomonas olevarans、热液海源菌、泊库岛食烷菌、不动杆菌属、新月柄杆菌、真养产碱菌属、肥大产碱杆菌、棕色固氮菌、富养红球菌、青紫色素杆菌或酒色着色菌,优选为恶臭假单胞菌菌株,更优选为恶臭假单胞杆菌 U。

9. 前述权利要求中任一项所述的基因工程微生物,其中所述微生物能够在没有添加诱导物分子的情况下产生 PHA。

10. 前述权利要求中任一项所述的基因工程微生物,其中所述微生物能够产生为单个细胞内颗粒形式的 PHA。

11. 前述权利要求中任一项所述的基因工程微生物,其中所述微生物在暴露于含有辛酸钠的经修改的 MM 培养基 24 小时后能够生产最大的 PHA 含量,并且优选地也能够将在所述最大的 PHA 含量 ± 20 重量%范围内的 PHA 含量维持至少 48 小时的时间。

12. 一种用于产生 PHA 的方法,其包括以下步骤:

a. 培养权利要求 1 至 11 中任一项所述的微生物;和

b. 从培养基中回收 PHA。

13. 根据权利要求 12 所述的方法,其中所述方法不涉及或不需要添加用以引发所述微生物中的 PHA 过量产生和 / 或 PHA 合成酶过量产生的诱导物分子,和 / 或不涉及或不需要添加用以防止丢失基因修饰的抗生素。

14. 根据权利要求 12 或 13 所述的方法,其中所述 PHA 是利用具有 3 至 8 个碳原子的酮、优选丙酮在 60℃或更低的温度下、优选地在 20℃至 40℃的温度下通过提取来回收的。

15. 权利要求 1 至 11 中任一项所述的基因工程微生物用于过量产生中链长度 PHA 和 / 或长链长度 PHA 的用途。

产生 PHA 的基因工程微生物

[0001] 本发明涉及聚羟基烷羧酸酯 (PHA) 的生物合成领域。本发明尤其涉及具有编码 PHA 合成酶的至少一种基因的基因工程微生物,与野生型微生物相比,其繁殖稳定且增加拷贝数,其中,基因工程使微生物过量产生中链长度或长链长度的 PHA。

[0002] PHA 属于聚合物类型,其为由可再生资源生产的生物可降解的和生物相容性的塑性材料(3-羟基脂肪酸的聚酯),可广泛的用于工业和生物医学应用(Williams&Peoples, 1996, Chemtech 26:38-44)。PHA 通过多种细菌合成,并且由于其替代常规的基于石油化学的塑料以保护环境免受塑料废物的有害影响的潜在用途而已经被广泛地研究。

[0003] 根据 PHA 的侧链长度和其生物合成途径,可将其分为两类。具有短的侧链的那些是结晶热塑性塑料,例如 PHB、(R)-3-羟基丁酸的均聚物,而具有长的侧链的 PHA 更具弹性。前者已经知道约 70 年了(Lemoigne&Roukhelman, 1925, Ann Des Fermentation, 527-536),而后者是相对近期发现的(deSmet 等人, 1983, J. Bacteriol. 154:870-78)。然而,在该命名之前,已经识别了包含具有 5 至 16 个碳原子的较长侧链 (R)-3-羟基酸单元和 (R)-3-羟基丁酸单元二者的生物来源的 PHA(Wallen&Roweder 1975, Environ. Sci. Technol. 8:576-79)。已经识别了产生含有 5 至 16 个碳原子的一种或更多种长侧链羟基酸单元和 (R)-3-羟基丁酸的共聚物的多种细菌(Steinbuchel&Wiese, 1992, Appl. Microbiol. Biotechnol. 37:691-97; Valentin 等人, 1992, Appl. Microbiol. Biotechnol. 36:507-14; Valentin 等人, Appl. Microbiol. Biotechnol. 1994, 40:710-16; Abe 等人, 1994, Int. J. Biol. Macromol. 16:115-19; Lee 等人, 1995, Appl. Microbiol. Biotechnol. 42:901-09; Kato 等人, 1996, Appl. Microbiol. Biotechnol. 45:363-70; Valentin 等人, 1996, Appl. Microbiol. Biotechnol. 46:261-67 和美国专利号 4876331)。这些共聚物可以被称为 PHB-co-HX(其中 X 为具有 6 个或更多个碳原子的烯羧酸酯(alkenoate)或 3-羟基烷羧酸酯)。特定的二元共聚物的一个有用例子为 PHB-co-3-羟基己酸酯(PHB-co-3H H)(Brandl 等人, 1989, Int. J. Biol. Macromol. 11:49-45; Amos&McInerney, 1991, Arch. Microbiol. 155:103-06; 美国专利号 5292860)。

[0004] 尽管由于 PHA 作为可再生资源用于生物可降解的热塑性塑料和生物聚合物(如上述的)的潜在用途而已经对其进行广泛地研究,并且已经商业开发和销售(Hrabak, 1992, FEMS Microbiol. Rev. 103:251-256),但是其生产成本远高于常规的基于石油化学的塑料的生产成本。这对其更为广泛的应用构成了主要障碍(Choi&Lee, 1997, Bioprocess Eng. 17:335-342)。如上所述,许多细菌产生 PHA,例如,真养产碱杆菌(*Alcaligenes eutrophus*)、肥大产碱杆菌(*Alcaligenes latus*)、棕色固氮菌(*Azotobacter vinlandii*)、嗜酸假单胞菌(*Pseudomonas acitophila*)、*Pseudomonas oleovarans*、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、富养红球菌(*Rhodococcus eutropha*)、紫色色素杆菌(*Chromobacterium violaceum*)、酒色着色菌(*Chromatium vinosum*)、泊库岛食烷菌(*Alcanivorax borcumensis*)等。在现有技术中已知所有这些产生 PHA 的细菌产生细胞内 PHA 并且将其累积在 PHA 颗粒中(Steinbuchel, 1991, Biomaterials, 第 123-213 页)。

[0005] 与基于石油化学的塑料相比,使得 PHA 生产昂贵且因此不利的主要方面在于难以高产率来生产材料和难以从累积 PHA 的细菌细胞中回收所产生的 PHA。为了降低 PHA 的总生产成本,据认为有效回收工艺的开发通常是必要的:其通常目的在于通过 i) 适当的溶剂, ii) PHA 的次氯酸盐提取和 / 或 iii) 非 PHA 细胞材料的消化进行的细胞破碎 (Lee, 1996, Biotech, Bio-eng. 49:1-14)。

[0006] 在工业规模上,可获得的微生物仍提供相对少的 PHA,这使得利用这些微生物产生 PHA 在经济上是不可行的。例如,在将恶臭假单胞菌 U (*Pseudomonas putida* U) 的野生型细胞在经修改的包含辛酸钠 (15mM) 作为碳源的 MM 培养基中培养,在第一个 24 小时期间,在微生物中仅累积了 24.4% 的 PHA。现有技术中已知的用于基于 PHA 生产的微生物的所有方法在生产期间需要大量水,以及用于 PHA 回收的化学试剂和 / 或酶,这是对降低生产成本的障碍。因此,迫切需要用于 PHA 生产的替代策略。

[0007] 除了整体低的微生物的 PHA 生产之外,在特定培养阶段所累积的 PHA 的量开始减少。这种减少的原因可以追溯至以下事实:微生物产生 PHA 作为食物储存材料,其在变化的环境中作为快速能量来源和还原能力提供给细菌。所有独立生存的微生物实行某种碳源管理到了可能的程度,而许多动物和植物通常调节碳源摄取以满足代谢需求,其他生物,尤其是经受过可用碳源大幅波动的机会性环境微生物能够捕获过量的碳源并管理其利用,如一方面通过消耗和生长,另一方面通过转化保存以储存聚合物。在可容易代谢的储存产品和更加惰性的细胞内储存产品,在某种程度上还有细胞外存储产品之间的相互转化是该机制的核心。甚至调节碳源摄取的生物体也利用这种相互转化用于微调它们的碳源管理以最优化其细胞代谢网络和机体生理生态过程。

[0008] 如以上所提及的,PHA 是微生物界中广泛利用的储存产品。为了允许微生物中以 PHA 储存的碳源的利用,对生物而言至关重要是在微生物需要额外的碳源时能够将 PHA 转化成羟基烷羧酸酯 (即,单体)。负责将聚合物转化为单独的单体单元的是 PHA 解聚酶。

[0009] 由于微生物含有负责 PHA 产生和降解的两种类型蛋白质,生物体确保其生存和发展的关键问题是调节 PHA 合成酶与 PHA 解聚酶的相对量,这是通过酶的调节生成来确定的 (Uchino 等人,2007;Ren 等人,2009a;以及 de Eugenio 等人,2010a,2010b)。然而,迄今为止,对控制聚合与解聚合过程的因子知之甚少。例如,仅敲除假单胞菌菌株中的 PHA 解聚酶并不导致提高的 PHA 累积 (Huisman 等人,1991;Solaiman 等人,2003)。因此,事实证明仅消除负责 PHA 解聚的基因来有效地增加微生物中 PHA 的含量是不够的。

[0010] 增加微生物中 PHA 生成的不同途径是操控在微生物中负责 PHA 生成的 PHA 合成酶。例如,已发现 PHA 基因的代谢工程是用于提高中链长度的 PHA 生成的良好策略。之前的研究试图通过 phaC1 的过表达来增加恶臭假单胞菌中的 PHA 产率 (Kraak 等人,1997;Prieto 等人,1999;Conte 等人,2006;Kim 等人,2006;Ren 等人,2009b)。然而,这些研究遇到了以下问题:含有 PhaC 的质粒在其对于生长不重要时丢失并且在细胞中施加不利影响。结果,经修改的微生物经繁殖后不稳定,且丢失了负责 PHA 过量产生的遗传信息。在其他情况中,得到了较少的 PHA 累积,因为启动子的高诱导性并不总是必然伴有高活性的基因产物 (Diederich 等人,1994;Ren 等人,2009)。

[0011] 这些尝试不成功的原因可以在涉及微生物中 PHA 的生成、存储和降解的许多不同蛋白质中找到。多数微生物具有多于一个的 PHA 合成酶,因此,增加一种合成酶的基因拷

贝数会使微生物耗尽对生成其他 PHA 合成酶重要的代谢物,这导致微生物中仅中等提高的 PHA 合成。

[0012] 此外,颗粒结合蛋白 (phasin) 在微生物中对 PHA 颗粒稳定起重要作用。例如,颗粒结合蛋白控制 PHA 颗粒的数量和大小 (Grage 等人,1999),其生成介于细胞质与 PHA 颗粒疏水核心之间的中间相,由此防止各个颗粒聚结 (Steinbuechel 等人,1995;York 等人,2002)。还已经提出颗粒结合蛋白 PhaF 以及一些球形转录因子 (如 Crc) 对 PhaC 活性的调节是重要的 (Prieto 等人,1999b;Castaneda 等人,2000;essler&Witholt,2001;Hoffmann&Rehm,2005;Ren 等人,2010)。P. putida KT2440 (Galan 等人,2011) 中的最近研究已经证明 PhaF 在颗粒分离中起重要作用,而甚至缺少这种颗粒结合蛋白使得细胞质中的这些包含体结块。

[0013] 因此,这对修饰微生物提出了相当大的挑战:所述修饰使得微生物以显著程度过量产生 PHA,且同时确保导致过量产生的该修饰在微生物经繁殖后稳定,并且确保在 PHA 微生物的操作中涉及的蛋白质都不被严重地影响以使得过度补偿期望的结果。对于目前所尝试的多数途径,另外还难以找到 PHA 累积处于其峰值的精确时间点,且难以在 PHA 分解前回收 PHA。

[0014] 在 WO 2007/017270 A1 中已经描述了一种途径,就这方面而言其在一定程度上已经成功,其中泊库岛食烷菌已经通过消除类 tesB 基因而被修饰。该基因编码硫酯酶,硫酯酶将 (R)-3-羟基-酰基-CoA 中间体转化成相应的酸。这是重要的副反应,其使微生物耗尽对 PHA 合成而言重要的中间体。虽然这种途径由于实现较高的 PHA 累积而已经被证明在一定程度上是成功的,但是有待观察是否经修饰的微生物具有需要的稳定性以允许成功实施进入工业规模的 PHA 生产。

[0015] 另一个途径为过表达 PHA 合成酶如已经由 Kim 等人 (2006, Biotechnol. Prog. 22:1541-1546) 描述的在 p. putida KCTC1639 中的 phaC1 和 phaC2。在该研究中,将另外的 phaC1 和 phaC2 基因的拷贝通过质粒引入微生物中,其中,所述基因不受启动子控制。Kim 等人描述了在经修饰的微生物中 PHA 合成酶的活性多于野生型的活性的 1.6 倍。虽然在过表达 phaC1 的微生物的情况下可以观察到增加的 PHA 生产 (至多约 0.8g/l),但是过表达 phaC2 的微生物并未表现出相对于野生型而言增加了 PHA 产生。该观察可能是由于 phaC2 合成酶的非活性形式的形成引起的。

[0016] 另外一个途径是将 PHA 合成酶基因插入微生物中,这在其野生型形式中不产生 PHA。例如,WO 99/14313、DE 44 17 169 A1 或 Qi 等人 (1997, FEMS Microbiol. Lett. 157:155-162) 描述了将 PHA 合成酶基因引入大肠杆菌 (E coli.) 中。然而,在这些经改造的微生物中,所生产的 PHA 的产率非常低,使得它们不适合 PHA 的工业生产。

[0017] 最后, Cat 等人 (2009, Biores. Technol. 100:2265-2270) 已经报道了通过敲除 P. putida KT 2442. 中的 PHA 解聚酶基因提高 PHA 生产。在该研究中,在将微生物在高碳源浓度例如 12g/l 存在下培养时,可以观察到 PHA 生产的增加。

[0018] 尽管有这些进步,但是仍存在对基因修饰的微生物的需求,所述基因修饰的微生物具有增加的 PHA 过量产生且同时经繁殖后是稳定的,因为它们不会丢失为此目的而插入的遗传信息。本申请满足这个需求。

[0019] 发明的简要说明

[0020] 本申请的一个目的是提供基因工程微生物,其中在微生物中负责中链长度的 PHA 或长链长度 PHA 的过量产生的遗传信息经繁殖后是稳定的。本发明的另一个目的是修饰微生物,使得避免暴露于培养基一定时间后 PHA 下降,并且同时增加 PHA 累积的百分比。另外,本申请的另一目的是修饰微生物,使得防止在已经累积 PHA 之后发生显著的 PHA 降解。

[0021] 本发明基于以下发现:通过修饰产生 PHA 的微生物以使得它们与具有编码 PHA 合成酶的至少一个基因的野生型微生物相比增加的拷贝数可以实现这些目标。优选地,在另外的拷贝中存在的基因编码 phaC2 或其同系物。当在本申请中使用该术语时,野生型微生物是指当微生物在自然界中出现时的典型形式。优选地,天然形式的野生型微生物包含编码 PHA 合成酶的至少一种基因。

[0022] 术语“同系物”在本申请的实践中定义为基本上具有相同的功能但是具有不同(尽管相似)的亲本肽序列和结构的蛋白质或肽。本申请的上下文中,术语“同源百分比”和“序列相似度”可互换地使用。在本申请的实践中,优选同系物相对于亲本肽应当具有至少 40%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、最优选至少 95% 的序列一致性。用于比较两个序列的数学算法的一个优选非限制性实例是 Karlin 等人的算法(1993, PNAS 90:5873-5877)。将该算法引入 NBLAST 程序中,该程序可以用于识别相对于本发明的核酸序列具有期望的一致性的序列。

[0023] 因此,本申请的一个主要方面是天然的产生 PHA 的微生物的基因工程形式,其与具有编码 PHA 合成酶的至少一种基因的野生型微生物相比具有增加的拷贝数,其中所述增加的拷贝数提供均衡性的所述 PHA 合成酶的过量产生,并最终使微生物在 24 小时后以与野生型相比至少 1.2 倍的量过量产生中链长度的 PHA 或长链长度的 PHA,其中用于评估过量产生的参考条件是含有 15mM 辛酸钠的经修改的 MM 培养基。在一个优选实施方案中,基因工程微生物经繁殖后是稳定的且优选地与具有编码 PHA 合成酶的至少一个基因的野生型微生物相比具有另一个拷贝。

[0024] 已经出乎意料地发现,这些基因修饰的微生物允许由便宜且容易获得的原料高成本效率地产生 PHA,所述原料包括来源于植物脂肪和植物油的脂肪酸。已经观察到本发明微生物提供高的 PHA 峰值浓度,根据培养条件,甚至在一些情况下在仅 24 小时后达到峰值浓度。此外,本发明微生物表现出高的遗传稳定性并且融合微生物中的多个 PHA 颗粒以形成单个 PHA 颗粒。这进而大大地简化了从微生物中回收 PHA,因为它们可以用非氯化溶剂如丙酮提取,并具有与用氯化溶剂提取相当的产率。

[0025] 术语“基因工程的”(或基因修饰的)是指人工操控本发明的微生物、其基因和/或基因产物(多肽)。

[0026] 优选地,本发明微生物经繁殖后是稳定的。“经繁殖后稳定”(如该术语在本申请的实践中应当被理解的)是指,生物体在经过多倍(例如 5 或更高倍数)繁殖周期后保持遗传信息且不丢失遗传信息。

[0027] 如以上所述的,本发明微生物优选经繁殖后是稳定的,这意味着在繁殖和/培养的微生物中保持了基因修饰。除了这种稳定性之外,优选的是微生物不需要抗生素的压力来保存基因修饰。这种微生物对于 PHA 生产是高度有利的,因为可以省略抗生素的添加,从而消除了抗生素污染 PHA 的风险。在本申请的一个优选实施方案中,本发明微生物由此在

繁殖和 / 或培养期间保持其基因修饰,而与受抗生素的存在或不存在无关。

[0028] 术语“均衡性过表达”是指过表达为使得以小于由增加的拷贝数可预期的量产生由过表达产生的蛋白质。例如,如果野生型包含基因的一个拷贝而基因修饰的微生物包含两个拷贝,可以预期基因修饰的微生物产生与野生型相比约两倍的蛋白质。蛋白质的量可以由生长期的微生物中的固有 PHA 合成酶的活性来估算。术语均衡性过表达意思是:过表达优选地仅导致 24 小时生长期中的固有 PHA 合成酶活性相对于野生型微生物而言增加至多 0.6 倍,优选至多 0.5 倍,更优选至多 0.35 倍,最优选至多 0.2 倍。

[0029] 通过使用“均衡性过表达”,确保了没有大量无活性蛋白质形成。例如,蛋白质的大量的(或不均衡的)过表达可导致形成包涵体,其以非活性形式并作为不溶解的蛋白质包含蛋白质。因此,尽管过表达了蛋白质,但观察不到增加的蛋白质活性。确保均衡性过表达的一种方法是利用渗漏启动子(leaky promoter)系统,其即使在诱导物不存在的情况下也使蛋白质产生受抑制。

[0030] 在本申请的一个优选实施方案中,过量产生至少部分是由增加的编码 PHA 合成酶的至少一个基因的拷贝数引起的。在另一个优选实施方案中,微生物含有多于一个拷贝的基因是编码 PhaC2 合成酶的基因。在本发明的实践中已经发现,插入 phaC2 基因或其同系物的多拷贝与有益效果相关,特别地 phaC2 的超表达涉及 PHA 颗粒的形态变化,其看上去聚结在一起,尤其在对数生长期期间如此。

[0031] 此外,据认为在渗漏启动子控制下的 PhaC2 合成酶基因的多拷贝的插入影响 PHA 代谢中涉及的其他蛋白质,以使得微生物的整体 PHA 生产和存储系统不受负面影响。

[0032] 在另一个优选实施方案中,PHA 合成酶基因的表达因此受渗漏启动子系统调节。渗漏启动子系统允许启动子控制的基因的转录,但是与系统中启动子用相应活化剂激活的系统相比具有被抑制的效率。渗漏启动子系统优选是基于蛋白质的启动子系统,更优选是 T7 聚合酶 /T7 聚合酶启动子系统。在一个甚至更优选的实施方案中,在 T7 聚合酶 /T7 聚合酶启动子系统中 T7 聚合酶的产生包含能够在暴露于小分子后诱导形成 T7 聚合酶的诱导物。这种系统具有增加的益处:其通过添加导致诱导 T7 聚合酶形成的小分子可以选择性触发 T7 聚合酶的产生。然后这进而触发 PHA 合成酶产生。在一个特定的优先实施方案中,小分子是 3- 甲基 - 苯甲酸酯。

[0033] 天然地产生 PHA 的微生物的一个高度优选的创造性基因工程形式是在莱布尼兹研究所 DSMZ 德国微生物和细胞培养物保藏中心以 DSM 26224 保藏(保藏日期为 2013 年 4 月 9 日)的假单胞菌属的基因工程形式,其在下文中将被指定为 PpU10-33。

[0034] 在本申请的实践中进一步优选的是,其与具有编码 PHA 合成酶的至少一个基因的野生型微生物相比,除了增加的拷贝数之外,基因工程微生物还在编码 PHA 降解中涉及的蛋白质的至少一个基因中含有至少一个修饰。已经发现在微生物中这样的修饰组合导致对所观察的 PHA 累积的协同效应。在一个优选的实施方案中,在所述微生物中编码 PHA 降解中涉及的蛋白质的至少一个基因中的至少一个修饰导致所述基因完全或部分失活,优选地导致所述基因完全失活。这种微生物也称为敲除相应基因的微生物。

[0035] 基因敲除突变体可以通过本领域技术人员已知的任意合适的方法制备。然而,优选的是基因的完全或部分失活是通过双重交换事件途径实现的。

[0036] 在一个特定优选的实施方案中,PHA 降解中涉及的蛋白质是 PHA 解聚酶,优选地是

PhaZ 或其同系物。另外,优选的,基因工程微生物中编码 PHA 降解中涉及的蛋白质的基因含有至少一个修饰,其仅含有在所述微生物中编码 PHA 降解中涉及的蛋白质的单个基因,其即,仅修饰该基因。换言之,优选的是微生物不含有可以取代所述微生物中 PHA 降解中涉及的酶的任何其他酶。

[0037] 天然地产生 PHA 的微生物的一个高度优选的创造性基因工程形式是在莱布尼兹研究所 DSMZ 德国微生物和细胞培养物保藏中心以 DSM 26225 保藏(保藏日期为 2013 年 4 月 9 日)的假单胞菌属的基因工程形式,其中所述的天然地产生 PHA 的微生物包含编码 PHA 合成酶的基因的多拷贝和失活的 phaZ 基因二者。该微生物在下文中将被指定为 PpU 10-33- Δ phaZ。

[0038] 典型的羧基酸单元聚酯(PHA)含有具有 5 至 6 个碳原子的侧链羧基酸单元 [(R)-3-羧基酸单元]。在本发明的实践中,术语“长链长度的 PHA”意在涵盖每个单体(分子)含有至少 12 个碳原子、优选地至少 14 个碳原子的 PHA,而 5 至 12 个碳原子的意在用“中链长度的 PHA”表示。在一个优选的实施方案中,基因工程微生物过量产生中链长度的 PHA。

[0039] 在本发明的一个特别优选实施方案中,基因工程微生物是由基因工程引起的,即,例如,插入与具有编码 PHA 合成酶的至少一个基因的野生型相比增加的拷贝数,和/或在编码所述微生物中的 PHA 降解中涉及的蛋白质的至少一个基因中插入至少一个修饰,以在 24 小时后与野生型相比以至少 1.2 倍(重量)、优选至少 1.5 倍(重量)以及特别地至少 2 倍(重量)的量过量产生 PHA,其中用于评估过量产生的参考条件是含有 15mM 辛酸钠的修改 MM 培养基。

[0040] 形成本申请的基因工程微生物的基础的微生物不受任何方式限制,只是该微生物必须具有编码 PHA 合成酶的至少一个基因。优选地,微生物还应当具有编码在所述微生物中 PHA 降解中涉及的至少一个基因、更优选单个基因。

[0041] 根据本发明的创造性微生物优选地选自产生 PHA 的细菌,特别地选自恶臭假单胞菌、绿脓假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、丁香假单胞菌(*Pseudomonas syringae*)、荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)、嗜酸假单胞菌(*Pseudomonas acidophila*)、*Pseudomonas oleovorans*、热液海源菌(*Idiomarina loihiensis*)、泊库岛食烷菌、不动杆菌属(*Acinetobacter* sp.)、新月柄杆菌(*Caulobacter crescentus*)、真养产碱杆菌(*Alcaligenes eutrophus*)、肥大产碱杆菌(*Alcaligenes latus*)、棕色固氮菌、富养红球菌(*Rhodococcus eutropha*)、青紫色素杆菌(*Chromobacterium violaceum*)或酒色着色菌(*Chromatium vinosum*)。根据本发明的一个特别地优选的微生物是恶臭假单胞菌菌株,更优选地是恶臭假单胞杆菌 U。

[0042] 已经观察到,本发明的微生物在不存在诱导物分子的情况下表现出 PHA 合成酶的过量产生。出乎意料地,通过非诱导的微生物的 PHA 产生匹配或甚至超过用诱导物处理的相同微生物的 PHA 产生。这表明经诱导的微生物可以超越过表达的 PHA 合成酶的最佳量,这导致形成合成酶的非活性形式例如包涵体或不溶解的形式。因此,本发明的另一方面是如上所述的基因工程微生物,其中所述微生物能够在没有添加诱导物分子的情况下产生 PHA。这对于工业规模的 PHA 生产具有优势,因为可以省去昂贵的诱导物和来自生产工艺的潜在污染风险。

[0043] 还已经出乎意料地观察到,本申请的微生物生产与野生型相比具有不同形貌的 PHA,因为各个细胞均产生减少的 PHA 数目或者甚至仅单个 PHA 颗粒。因此,本申请的另一方面是如上所述的基因工程微生物,其中所述微生物与野生型细胞相比每个微生物能够产生减少数目的细胞内 PHA 颗粒,优选地为单个细胞内 PHA 颗粒的形式。据认为单个颗粒的形成与减少的 PHA 稳定化酶的量相关,这简化了 PHA 分离与纯化。

[0044] 还出乎意料地观察到本申请的微生物产生 PHA 更快且在某些情况下在长的时间内维持高水平的累积 PHA。因此,本申请的另一方面是如上所述的基因工程微生物,其中所述微生物在暴露于含有辛酸钠的经修改 MM 培养基 24 小时后能够产生最大含量的 PHA,并且优选地也能够最初 24 小时累积期后至少 48 小时的时间内将 PHA 含量维持在最大 PHA 含量的 ± 20 重量%范围内,其中用于评估 PHA 产生的参考条件是含有 15mM 辛酸钠的修改 MM 培养基。

[0045] 本发明的另一方面涉及用于产生 PHA 的方法,其包括以下步骤:

[0046] a. 培养本发明的微生物或细胞和

[0047] b. 从培养基中回收 PHA。

[0048] 用于在合适的条件下培养微生物或细胞的标准方法是现有技术中众所周知的。例如,参见以下实施例、材料以及 Sambrook&Russell (2001)。PHA 可以通过常规程序从培养基中回收,所述程序包括通过离心或过滤从培养基中分离细胞,沉淀或过滤成分 (PHA),随后纯化,例如通过层析程序如离子交换、层析、亲和层析或相似的本领域认可的程序来纯化。

[0049] 优选的是在上述过程中的 PHA 是利用具有 3 至 8 个碳原子的酮、优选用丙酮提取的。与提取溶剂无关,提取优选在 60°C 或更低的温度下、优选在 20 至 40°C 进行。

[0050] 在本申请的一个特别优选的实施方案中,方法不涉及或不需要添加诱导物分子来引发 PHA 过量产生和 / 或过量产生 PHA 合成酶。此外,在本申请的实践中不必要在抗生素存在下培养本发明的微生物,原因是已经出乎意料地发现所微生物中所引入的修饰是稳定的,即使在不存在抗生素的情况下也是如此。这种抗生素包括但不限于亚碲酸盐 (Tellurite)、利福平 (Rifampicin) 和卡那霉素 (Kanamycin)。

[0051] 作为用于上述过程的碳原料,可以利用容易获得的且便宜的可得自植物脂肪和植物油的脂肪酸。这种脂肪酸的优选实施例包括饱和羧酸例如己酸、庚酸、辛酸和癸烯酸,以及不饱和脂肪酸例如 1- 十一碳烯酸、油酸或亚油酸。此外可以将多元醇用作原料,例如优选甘油。

[0052] 本发明的另一方面涉及本发明的微生物、核酸、载体和 / 或细胞用于过量产生 PHA、尤其是中链长度 PHA 和 / 长链长度 PHA 的用途。

[0053] 附图简要说明

[0054] 图 1. 以下细胞的电子显微照片: PpU (a-c); 未诱导的 PpU 10-33 细胞 (d-f) 和经诱导的 PpU 10-33 细胞 (g-i); 未诱导的 (j-l) 和经诱导的 (m-o) Δ phaZ-PpU10-33 细胞。培养物在含有 35mM 辛酸钠作为碳源的修改 MM 培养基中生长 (以 15mM 和 20mM 两次给予) 并在 31 小时 (a、d、g、j、m)、48 小时 (b、e、h、k、n) 和 72 小时 (c、f、i、l、o) 取样。

[0055] 图 2. pha 基因的表达和 P. Putida U 中 PHA 的累积。各柱状图显示 PpU (各个编号的第一列)、非诱导的 PpU 10-33 ((a) 和 (c) 中各个编号的第二列)、经诱导的 PpU10-33 ((a) 和 (c) 中各个编号的第三列)、非诱导的 Δ phaZ-PpU10-33 ((b) 中各个编号的第二列) 和经

诱导的 $\Delta phaZ$ -PpU 10-33(b) 中各个编号的第二列) 中 pha 基因表达的归一化倍数增长。在图(c)中, 还以带圆点的直线(PpU)、下方的带三角形的虚线(经诱导的 PpU 10-33)、圆点(非诱导的 PpU 10-33)、上方的带三角形的虚线(非诱导的 $\Delta phaZ$ PpU 10-33) 以及带矩形的虚线(经诱导的 $\Delta phaZ$ PpU10-33) 显示 PHA 浓度。

[0056] 图 3. *P. putida* U 中用于超表达 phaC2 的基因组织的两部分系统。该图显示被整合进染色体的两个载体:pCNB1mini-Tn5xylS/Pm::T7pol 和 pUTminiTn5-Tel-T7phaC2。

[0057] 图 4. 以下微生物中随着时间的 PHA 产生: 野生型 PpU(方形) 以及非诱导的基因工程构造 PpU10-33(实心环形)、经诱导的 PpU(空心环形)、非诱导的 $\Delta phaZ$ -PpU 10-33(实心矩形) 和经诱导的 $\Delta phaZ$ -PpU 10-33(空心矩形)。

[0058] 图 5. 在存在和不存在相应抗生素的情况下, 当在作为底物的辛酸盐(20mM) 和 MM+0.1% YE 培养基中培养时, PpU 和 PpU 10-33- $\Delta phaZ$ 的生物量和 PHA 产率。结果是指复制数。

[0059] 在下文中, 通过实施例的方式进一步说明本申请, 但是所述实施例无意于以任何方式限制本申请的范围。

实施例

[0060] 实验步骤

[0061] 在本工作中所使用的微生物和载体、细菌菌株、突变体和质粒汇总于附录 1 中。

[0062] 培养基条件

[0063] 除非另有说明, 大肠杆菌和恶臭假单胞菌在 Luria Miller Broth(LB) 中培养并分别在 37°C 和 30°C 下孵育。在需要的情况下, 向培养基中加入的抗生素如下: 利福平(Rf, 固体培养基中 20 $\mu\text{g ml}^{-1}$, 液体培养基中 5 $\mu\text{g ml}^{-1}$)、卡那霉素(Km, 固体培养基中 25 $\mu\text{g ml}^{-1}$, 液体培养基中 12.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$)、氨苄青霉素(Ap, 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$)、亚碲酸盐(Tel, 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$)、庆大霉素(Gm, 30 $\mu\text{g ml}^{-1}$)、氯霉素(Cm, 30 $\mu\text{g ml}^{-1}$)、异丙基- β -D- 硫代半乳糖苷(IPTG, 70 μM) 和 5- 溴代-4- 氯代-3- 吡啶基- β -D- 半乳糖苷(XGal, 34 $\mu\text{g ml}^{-1}$)。

[0064] DNA 操控

[0065] 所有的基因程序按 Sambrook&Russell(2001) 所描述的进行。利用相应的 Qiagen 试剂盒(德国)按照制造商的使用说明进行基因组和质粒 DNA 的提取、琼脂糖凝胶纯化和 PCR 清洗。在本工作中使用的所有 DNA 修饰酶(限制性内切酶、DNA 连接酶、碱性磷酸酶等)均购自 NEB(美国马萨诸塞州)。聚合酶链式反应(PCR) 在 Eppendorf vapo. protect Thermal Cycler(德国)中进行。50 μl PCR 反应混合物由以下成分组成: 2 μl 经稀释的染色体 DNA(50 $\mu\text{g ml}^{-1}$)、1 $\times$ PCR 缓冲液和 2mM MgCl_2 (PROMEGA Co., USA)、0.2 μM 的各引物(Eurofins mgw 操纵子)、0.2mM dNTPs(Amersham, GE Healthcare, 英国)、1.25U Go-Taq 热启动聚合酶(PROMEGA Co., 美国)。PCR 循环条件为: 起始步骤 96°C /10 分钟, 随后为 96°C /30 秒至 60°C /30 秒、72°C /1 分钟的 30 个循环, 最后补充 72°C /5 分钟。通过三亲本杂交实验将质粒转移到假单胞菌菌株(Selvaraj&Iyer, 1983; Herrero 等人, 1990) 完成。简单地说, 将带有自杀质粒 pCNB1mini-Tn5xylSPm::T7pol 或 pUTminiTn5-Tel-phaC2 的 *E. coli* CC 18 λ pir 供体菌株、*E. coli* RK600 辅助菌株以及假单胞杆菌受体菌株分别培养 8 小时, 以 0.75:1:2 的比例混合, 用 LB 清洗两次。在硝化纤维素滤器上收集悬浮液, 并于 30°C 在

LB 板上孵育过夜。然后将在滤器上生长的细菌重悬于 3ml 无菌盐溶液 (NaCl 0.9%) 中, 并将连续稀释液接种于补充以相应选择抗生素的 LB 琼脂。将板于 30℃ 孵育过夜, 通过 PCR 确认在板上生长的转化结合子克隆。

[0066] DNA 测序

[0067] 利用一组特定的寡核苷酸或通用引物 M13F 和 M13R 进行用于测序的 PCR 反应 (附录 3)。10 μl 反应混合物由 6-12ng 纯化的 PCR 产物 (或 200-300ng 质粒)、2 μl BigDye Ready Reaction Mix、1 μl BigDye 测序缓冲液和 1 μl 特异性引物 (25 μM) 组成。循环条件包括: 起始步骤 96℃ /1 分钟, 随后 96℃ /20 秒 -52℃ -58℃ /20 秒 -60℃ /4 分钟的 25 个循环, 和 60℃ /1 分钟的最后补充步骤。用双脱氧链终止法确定核苷酸序列 (Big Dye Terminator v3.1 试剂盒, Applied Biosystems, 美国福斯特市)。用 Qiagen DyeEx 2.0Spin Kit (德国) 纯化 PCR 产物。将团粒重悬于 20 μl 水中, 然后加载到 ABI PRISM 3130 遗传分析仪 (Applied Biosystems, 美国加利福尼亚州)。将所获得的部分序列与非冗余核苷酸数据库中的已知序列比对 (www.ncbi.nlm.nih.gov)。利用 Softberry (<http://linux1.softberry.com/cgi-bin/programs/gfindb/bprom.pl>)、Prom-Scan (<http://molbiol-tools.ca/promscan/>) 和 PDBG 在线 http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html; 以及 Arnold (<http://rna.igmors.u-psud.fr/toolbox/amold/index.php#Results>) 生物信息学工具来识别潜在的转录启动子区域和端子。

[0068] phaC2 超表达菌株 PpU10-33 的设计和构造

[0069] PpU10-33 是恶臭固氮菌 U 衍生的, 其中用 T7 聚合酶启动子: T7 聚合酶系统来驱动 phaC2 基因表达的额外拷贝。T7 聚合酶系统由两个染色体整合的盒组成: 一个含有从 T7 聚合酶启动子表达的 phaC2 基因, 另一个含有 T7 聚合酶基因, 该基因从 Pm 启动子表达且受来源于 TOL 质粒的同源苯甲酸酯 / 苯甲酸酯可诱导的 XylS 调节因子调节。phaC2 盒构造如下: 将 P. putida U 的 phaC2 基因从 pBBR1MCS-3-phaC2 质粒中切除 (Arias 等人, 2008), 克隆进 pUC18NotI/T7 载体 (Herrero 等人, 1993), 并通过测序确认基因的正确取向。然后将 phaC2 基因和 T7 启动子作为盒转移进入 pUTminiTn5-Tel 载体中 (Sanchez-Romero 等人, 1998)。首先, 通过滤膜接合法将 miniTn5 衍生物 pCNB 1xylS/Pm::T7pol 转移至 P. putida U, 然后通过 Km 选择标记物进行选择 (Harayama 等人 1989; Herrero 等人, 1993)。由于转座子在基因组中的整合基本上是随机的, 并且不同插入位点可显著地影响被插入的基因的转录水平, 所以准备了约 100 个转移结合子的池用于第二次转移。将该池的 5mL LB 培养物孵育 3 小时 (30℃, 180rpm), 并使用受体的池用于 pUTmini-Tn5-Tel-T7phaC2 构造的转移。通过当转移结合子转化亚硝酸盐 (选择标记物) 时其显示的颜色容易地对转移结合子计分, 随后通过 PCR 确认。随后针对 PhaC2 和 PHA (结果) 的水平对两个盒的插入位点不同的最终受体计分, 选择最好的并将其指定为 PpU 10-33。

[0070] PpU 10-33 中 phaZ 的敲除与互补

[0071] 通过利用 1983 年 Quant&Hynes 和 1991 年 Donnenberg&Kaper 描述的方法完成 phaZ 基因的删除, 其涉及双重重组事件和通过致死 sacB 基因的表达来选择所需要的突变体。首先, 通过 GENERT AG (德国) 合成在 phaZ 基因附近含有 ORFs 的 DNA, 其编码 PHaC1 和 PhaC2 合成酶; 随后将该基因克隆进含有 Gm 和 SacB 选择标记物的 pJQ200SK 载体。然后将杂交质粒通过三亲本杂交引入 PpU10-33 菌株。在含有 Gm+km 和 Tel 的板上选择其中质粒通过单交换

整合进入染色体中的转移结合子,并通过 PCR 确认。随后在有 10%蔗糖的 LB 板上选择来源于第二次重组的删除突变体,对针对 Gm 的敏感度计分,并通过 PCR 进一步分析以确认删除的位置和程度。为此,使用了在用于同源重组的片段之外或之内退火的两个不同启动子组,名称分别为 PhaC1-check-F/PhaC2-check-R 和 RT-phaZ F_PpU/RT-phaZ R_PpU。选择了一个删除突变体并指定为 Δ phaZ PpU10-33。为了删除突变体的互补,通过 PCR(phaZ-F-KpnI 1phaZ-R-XbaI) 将 phaZ 基因 (921bp) 扩增,然后克隆进入 pBBR1MCS-5 载体中。针对其 Gm 抗性选择转移结合子并进一步通过 PCR 确认。

[0072] 荧光显微镜法

[0073] 在 1.5ml 微量离心管中将 1 毫升培养物与 2 滴尼罗红二甲亚砷 (0.25mg/ml) 溶液混合,于 4℃ 以 6500 转每分钟离心 5 分钟。用 2ml $MgCl_2$ (10mM) 洗沉淀物两次,重悬于 500 μ l 溶液中,将 5-10 μ l 细胞悬浮液放置在显微镜载玻片上。利用装备有 Cy3 滤镜 (EX BP 550/25, BS FT 570, EM BP 605/70) (ZEISS, Jena, 德国) 和 AxioVision rel 4.6.3 软件的 ZEISS Axio Imager A1 落射荧光显微镜可以看到 PHA 颗粒的存在和形貌。以 1.1 秒的曝光时间使细胞成像 (Bassas 等人, 2009)。

[0074] 透射电子显微镜法

[0075] 在 4℃ 下,在生长培养基中用 2%戊二醛和 5%甲醛固定细菌,用二甲砷酸盐缓冲液 (0.1M 二甲砷酸盐, 0.01M $CaCl_2$, 0.01M $MgCl_2$, 0.09M 蔗糖, pH6.9) 冲洗,在室温下用 1%锇水溶液锇化 1 小时。然后将样品在分级系列丙酮 (10%、30%、50%、70%、90%、和 100%) 中脱水,每个步骤 30 分钟。70%丙酮脱水步骤包括 2%醋酸双氧铀,并且执行过夜。利用根据用于固体树脂的 Spurr 配方的环氧树脂浸润样品,所述环氧树脂为一种用于电镜的低粘度环氧树脂包埋介质 (Spurr, 1969)。用纯树脂的浸润进行数天。用金刚石刀切成超薄切片,用醋酸双氧铀和柠檬酸铅复染,在 TEM910 透射电子显微镜 (Carl Zeiss, 德国) 中以 80kV 加速电压检查。利用线复制品以带刻度的放大倍率拍摄图像,并用具有 ITEM- 软件 (Olympus Soft Imaging Solutions, 德国) 的慢速扫描 CCD-Camera (ProScan, 1024x1024, Scheuring, 德国) 数字化地记录。

[0076] RNA 操控

[0077] 从生长阶段过程中 (4h、7h、24h、27h、31h、48h 和 55h) 的培养物中取样品 (3ml) 并立即与等体积的 RNA 保护缓冲液 (Qiagen, 德国) 混合。室温下孵育 5 分钟后,将悬浮液以 13000 转每分钟离心,弃去上清液,将沉淀物在 -80℃ 保存。利用包括脱氧核糖核酸酶处理的 RNeasy 迷你试剂盒 (Qiagen, 德国) 按照制造商的使用说明提取总 RNA。最后,在 100 μ l 不含核糖核酸酶的水中洗脱 RNA 并保存在 -80℃。RNA 的完整度通过甲醛琼脂糖凝胶电泳评估,浓度和纯度通过分光光度计确定 (分光光度计 ND-100, peQlab-biotechnologie GmbH, 德国)。

[0078] cDNA 利用 10 μ g 总 RNA 和随机引物在 20 μ l 反应体系中进行。所有试剂 (包括 Superscript III RT) 购自 Invitrogen (USA) 且反应根据制造商的方案进行。将其中未添加 Superscript III RT 的样品用作阴性对照。在 cDNA 合成后,用 1M NaOH 将残留的 RNA 沉淀,以 65℃ 孵育 10 分钟,随后在 25℃ 孵育 10 分钟。立即用 KCl 1M 平衡反应。然后利用 PCR 纯化试剂盒 (Qiagen) 将产生的 cDNA 纯化,用分光光度计测量浓度和纯度。用 DEPC 水将 cDNA 稀释至 100ng/ μ l 并在 4℃ 保存。

[0079] 相对 RT-PCR 分析

[0080] 借助于引物 3(<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) 和 Oligo Calc(<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>) 生物信息工具设计用于 RT-PCR 分析 (Eurofins mgw Operon, 德国) 的寡核苷酸, 该寡核苷酸汇总于附录 2。各个组设计成具有相似的 G+C 含量, 因此具有相似的退火温度 (约 60°C), 并具有大小不长于 300bp 的扩增子, 不存在预测的发夹环、双链体或引物-去引物 (dimer) 结构。按照用于实验设计的 MIQE 指南 (Bustin 等人, 2009)。首先, 分析各组引物的最佳 PCR 条件, 利用标准组样品 (染色体 DNA) 作为模板确定退火温度和引物浓度。通过熔点曲线分析和扩增条带的凝胶可视化确定引物特异性。用 cDNA 池确定引物有效性并在五个点上进行连续的 4 倍稀释序列以执行标准曲线。执行标准 PCR 方案, 对每次稀释执行三次。在所有情况下, 所测量的有效性在 89% 至 100% 之间。对于该分析, 使用了 CFX96™ 实时 PCR 检测系统 (Bio-Rad, 美国) 和 CFX 管理软件 (版本 1.5.534.0511, Bio-Rad)。鉴于良好的变异系数值和约 0.5-1 的 M 值, 利用存在于 CFS 软件中的 geNorm 法并且考虑到在不同实验条件之间和时间点之间的目标稳定性来选择用于数据归一化的适宜参考基因。测试了数个候选基因, 包括“管家”基因 (rpsL)、在一般代谢中涉及的其他基因 (gltA、gap-1、proC1、proC2)、细胞分裂 (mreB、ftsZ) 或信号功能 (ffH), 最后选择 gltA 和 proC2 作为参考基因。对于相对 RT-PCR, 为了数据归一化, 执行实验的三个重复, 包括总是在各个板中的内部校准器。将没有 cDNA 的样品用作阴性对照。PCR 反应含有 12.5 μ l 的 iQ™ SYBR Green Supermix (2 $\times$) (Bio-Rad, 美国)、1 μ l 正向引物 (10 μ M)、1 μ l 逆向引物 (10 μ M)、2 μ l cDNA (1/10 稀释), 并用至多 20 μ l 的 milliQ 水进行反应。PCR 循环条件为: 50°C / 2 分钟和 95°C / 10 分钟, 随后 95°C / 15 秒 - 60°C / 30 秒 - 72°C / 30 秒, 40 个循环, 最后补充 72°C / 10 分钟。在各个循环结束时测量荧光。对于熔点曲线, 设定初始变性步骤在 95°C / 10 分钟, 随后以 0.5°C / 5 秒从 65°C 增加到 95°C, 然后继续信号采集。用采用均数的标准偏差和归一化表达方法 ($\Delta\Delta(Ct)$) 的 CFX 软件 (Bio-Road, 美国) 计算目标基因的相对表达比例。以表达的归一化倍数增长来表示数值。

[0081] 用于 PHA 产生的培养条件

[0082] 将 3- 苯甲酸甲酯 (3-MB) 作为用于通过 Pm 启动子激活 Xy1S 转录激活因子的诱导物, 所述 Pm 启动子驱动 T7 聚合酶基因, 其进而触发 phaC2 合成酶的表达。为了确定用于 PpU 10-33 中 phaC2 表达 / PHA 合成的最佳条件, 在不同条件下提高 3-MB (从 0.2 至 3mM)、诱导次数 (OD_{550nm} 0.4-1.5) 和碳源浓度。用在具有 20mM 琥珀酸盐的 MM 琼脂板上 30°C 下培养过夜的细胞悬浮液接种于含有 400ml MM 修改培养基 (Martinez-Bianco 等人, 1990) 加上 0.1% 酵母提取物、15mM 辛酸钠以及合适的抗生素的锥形瓶。然后将锥形瓶以 180 转每分钟在旋转振荡器 (INFORS AG, 瑞士) 于 30°C 下孵育。一旦培养物 OD_{550nm} 达到约 0.8, 将培养物分成两份 (1 升锥形瓶中含有 200ml), 然后向锥形瓶中的一个添加 3-MB 至最终浓度 0.5mM。同时, 第二次加入辛酸钠 (20mM)。对于野生型对照菌株, 程序是相同的但是没有诱导。每 24 小时收集一次样品并测定生物量 (CDW, 细胞干重)、PHA、 OD_{550nm} 、尼罗红染色和 NH_4^+ 浓度。对于 CDW 测定, 样品在 80°C 干燥 24 小时, 并以原始培养物的 g/l 表示。

[0083] PHA 提取和纯化

[0084] 将培养样品于 4°C 以 6500xg 离心 15 分钟 (Allegra 25R, Beckman Coulter, 美

国),在蒸馏水中清洗沉淀物两次,然后在 -59°C 和 0.140mbar 下冻干 (Lyophilizer alpha 1-4 LSC, Christ, 德国)。从生长期取 5ml 样品以监测 PHA 产生并按如上所述冻干。如前所述的,用 10ml 氯仿于 80°C 提取经冻干的生物量 3 小时 (Basas-Galia 等人,2012)。PHA 含量 (重量%) 被定义为由 PHA 表示的 CDW 百分比。

[0085] NMR 分析

[0086] 对于 ^1H -NMR 分析,将 5-10mg 聚合物溶解于 0.7ml 的 CDCl_3 ,使用 5-10mg 的聚合物用于记录 ^{13}C 谱。在 300K 下在 Bruker DPX-300NMR 波谱仪上记录 ^1H 谱和 ^{13}C 谱,所述波谱仪锁定于溶剂 CDCl_3 的氘共振。以相对于溶剂信号的 ppm 给出化学位移 (^1H :7.26, ^{13}C 77.3),以 Hz 给出耦合常数。全部使用标准 Bruker 脉冲程序。

[0087] 检测 PHA 的分子量

[0088] 在具有色谱柱 Styragel HR5E 并装备有 2414 示差检测器 (Waters, 美国) 的 HPLC 系统中 (Waters 2695Alliance separations Module),通过凝胶渗透色谱法测定平均分子量。在 45°C ,以流速 0.5ml/ 分钟 (等度的),用四氢呋喃 (THF) 作为洗脱剂。样品浓度和进样体积分别为 0.5mg/ml 和 50 μl 。利用聚苯乙烯标准物试剂盒获得分子量范围在 10000-700000g/mol 的标准曲线。

[0089] PHA 的热性能

[0090] 利用 10-20mg 用于分析的经纯化的聚合物,通过差示扫描量热法 (DSC) 测定微生物聚酯的热性能,用 DSC-30 (Mettler Toledo Instruments, 美国) 执行 DSC 分析。将样品放置在铝盘上,在氮气条件下 (80ml/ 分钟) 以 10°C / 分钟从 -100°C 加热至 400°C 。所有数据是通过 STARe 系统采集和处理软件 (Mettler Toledo) 获得。

[0091] 实施例 1:恶臭假单胞菌 U 中 phaC2 的超表达

[0092] 设计了两部分的用于 PpU PhaC2 合成酶的基于微型转座子的超表达系统,其由以下两部分构成:(i) 特殊化的 mini-Tn5, pCNB1xylS/Pm::T7pol,其由 XylS-3- 苯甲酸甲酯 (3-MB)- 调节的启动子 Pm 表达 T7 聚合酶;和 (ii) 杂交 pUT-miniTn5-Tel 衍生物,其由 T7 聚合酶启动子表达 phaC2 (见图 3)。两个微型转座子组件单独并随机地插入 P. putida U (下文中为“PpU”) 染色体中。在两轮筛选后选出最佳的 PHA 生产者,所述两轮筛选涉及通过细胞蛋白的 SDS-PAGE 分离来半定量 PhaC2 生产,和通过尼罗红染色的细胞的荧光显微镜法检查 PHA 颗粒形成。该菌株被指定为 PpU10-33。

[0093] 在下文中,将非诱导培养物称作 NI,将用 0.5mM 的 3-MB 诱导的细胞成为 I。分析 phaC2 基因的剂量对重组菌株 PpU10-33 中 PHA 浓度的影响。培养物分别在具有辛酸钠的修改的 MM 中生长,所述辛酸钠以 15mM 和 20mM 分两次给予 (第二次是在诱导时给予)。对于两个菌株 PpU 和 PpU10-33 均在 48 小时后达到峰值生物量生产 (分别为 3.1 和 3.2g 1^{-1}CDW)。结果示于表 1 中:

[0094] 表 1:菌株 PpU、PpU10-33 和 PpU10-33- Δ phaZ 的生物量产率

[0095]

时间 (小时)	CDW (g l ⁻¹)				
	PpU	PpU 10-33 (NI)	PpU 10-33 (I)	PpU 10-33- $\Delta phaZ$ (NI)	PpU 10-33- $\Delta phaZ$ (I)
24	1.31	1.36	1.09	1.49	1.20
48	3.07	2.52	3.16	1.83	3.10
72	2.50	2.42	2.39	3.11	3.29
96	2.13	2.16	2.68	3.20	3.25

[0096] 与野生型和非诱导细胞 (24.4% 和 34.6%) 相比,暴露于 3-MB 的细胞在培养的第一个 24 小时期间能够累积更高的 PHA 量 (44%)。结果示于以下表 2 和图 4 中:

[0097] 表 2:未诱导的 (NI) 和经诱导的 (I) PpU10-33- $\Delta phaZ$ 、PpU 和 PpU10-33 的 PHA 产率

[0098]

时间 (小时)	^a PHA (g l ⁻¹)					^b PHA (%wt)				
	PpU	PpU 10- 33 (NI)	PpU 10- 33 (I)	PpU 10-33 $\Delta phaZ$ (NI)	PpU 10-33 $\Delta phaZ$ (I)	PpU	PpU 10- 33 (NI)	PpU 10- 33 (I)	PpU 10-33 $\Delta phaZ$ (NI)	PpU 10-33 $\Delta phaZ$ (I)
24	0.32	0.47	0.48	0.88	0.75	24.4	34.6	44.0	59.1	62.5
48	1.08	1.14	1.08	1.20	1.56	35.2	45.2	34.2	65.6	50.3
72	0.53	0.76	0.63	1.67	2.03	21.2	31.4	26.5	53.7	61.7
96	0.14	0.48	0.39	1.67	1.80	6.6	20.5	14.6	52.2	54.5

[0099] 培养物在具有 35mM 辛酸钠 (以 15mM 和 20mM 分两次给予) 的修改 MM 中生长,并用 0.5mM 的 3-MB 以 0.8 的 OD_{550nm} 诱导 (I) 或不诱导 (NI)。

[0100] 在 24 小时时,超表达菌株中的 PHA 水平比亲本菌株中的 PHA 水平高约 50%,但在 48 小时时比亲本菌株中的 PHA 水平低约 25%,在 72 小时时二者相似,这表明 PhaC2 的增加导致 PHA 的短暂增加,这进而驱使解聚化活性增加直至水平正常化。重要地,在 PpU 的情况下,细胞干重的 PHA 百分比 (重量%) 在 48 小时后突然从 35 重量%降至 7 重量%,在经诱导的 PpU 10-33 培养物的情况下,从 39%降至 15%。

[0101] 没有对在 24 小时时在 PHA 累积方面 PpU10-33 的非诱导型培养物还显示高于野生型菌株的 50% 增加的原因作进一步研究,但假设为反应了 T7 启动子的渗漏 (也通过 RT-PCR 结果表明)。用两个菌株培养 48 小时时,在 PpU 的情况下获得 3.07g/l 的最高生物量水平、在 PpU10-33 的情况下获得 2.67g/l (未诱导型,NI) 和 2.73g/l (诱导型,I) 的最高生物量水平 (图 1A,表 1),和获得分别为 1.08g/l、0.74g/l 以及 1.07g/l 的 PHA 累积 (图 4,表 2)。在 48 小时后,生物量和 PHA 水平下降,PHA 水平比生物量水平更显著地减少或降低。在几乎所有取样时间,PpU10-33 菌株给出以生物量百分比表示的更高的 PHA 产率。与 PpU 中产率 24 重量%和在未诱导的 PpU10-33 细胞中的产率 35 重量%相比 (表 2),在该实验中测得的最高 PHA 产率 44 重量%是在 24 小时时 PpU10-33 诱导细胞中获得的。在 48 小时时,与 PpU 中 35 重量%和 PpU10-33 培养物中 40 重量%相比,PHA 的最高绝对产率,41%

的细胞干重 (CDW) 是在未诱导 10-33 细胞中获得的。因此,诱导的影响主要在相对初期的培养物中看到。重要地,在 PpU 的情况下,PHA 的百分比 (重量%) 在 48 小时后突然降至 7 重量%,在 PpU 10-33 的情况下降至 15% -22%。

[0102] 实施例 2 : Δ phaZ 突变对 PHA 产生的影响

[0103] 建立 PpU10-33 菌株的 phaZ 删除突变,其被指定为 PpU10-33- Δ phaZ,随后对其 PHA 累积进行评估。如在图 4 中和表 2 中可以看到,突变体的培养物显示更高的 PHA 水平 (62 重量%),且与产生 PhaZ 的菌株相比,这些水平被维持直到至少 96 个小时的培养。因此, Δ phaZ 敲除的表现型表明 PhaZ 解聚酶是细胞中 PHA 累积和维持的主要决定子。

[0104] 参考实施例 : Δ phaZ-PpU10-33 突变体的互补

[0105] 为了使 phaZ 基因与所观察的表现型有因果关系,以及为了排除对 pha 群表达的任何间接影响,将 phaZ 基因 PCR 扩增,克隆进 pBB1MCS-5 质粒载体中,然后引入 PpU 10-33- Δ phaZ 菌株。然后评估被在互补的突变体 PpU10-33- Δ phaZ pMC-phaZ 中的 PHA 产生和维持,该突变体被指定为菌株 pMC-phaZ。表 3 示出了 PpU10-33 菌株、其 phaZ 删除突变体及互补衍生物在具有辛酸钠 (20mM) 的修改 MM 中生长 44 小时后的生物量和 PHA 产率。

[0106] 表 3 :对 PHA 累积产率的影响。缺陷的互补和 PhaZ 构造

[0107]

菌株	^a CDW (g l ⁻¹)	^b PHA (g l ⁻¹)	^c PHA (%重量)
PpU 10-33 (NI)	2.11	0.45	21.0
Δ phaZ-PpU10-33 (NI)	2.18	0.90	41.0
pMC-PhaZ (NI)	1.98	0.10	5.0

[0108] 三种菌株的生物量产率相似,为约 2g/l,而 PpU10-33 菌株的 PHA 产率为 21 重量%,其突变体为 41 重量%,互补菌株为 5 重量%。据推测,在互补菌株中低于野生型 PHA 水平反映出较高的细胞解聚酶水平,所述较高的细胞解聚酶水平来源于位于多拷贝载体上的互补基因。

[0109] 聚合物特征

[0110] 因为 PhaC2 聚合酶的超表达和 PhaZ 解聚酶的失活可能带来正常细胞化学计量和 PHA 蛋白及相关蛋白质的活性中的变化,其他表现型的变化可能来源于这些基因操纵。为了分析这个可能性,通过透射电子显微镜 (TEM) 比较不同构造的细胞中 PHA 颗粒的超微结构。图 1 示出了 PpU 野生型菌株 (图 1A-C) 每个细胞含有一个或两个限定的 PHA 颗粒,其均匀地分布在细胞质内,而 PpU10-33phaC2 超表达菌株 (图 1D-F) 倾向于含有一个主要的颗粒,其形貌提示为较小颗粒的聚结。在经诱导的培养物中这特别地明显,尤其在中间对数生长期期间。phaZ 删除突变体倾向于具有多个颗粒,其中一些颗粒具有提示颗粒融合的不规则边界 (图 1G-I)。显微镜分析还确认了图 4 中示出的结果,即在 PpU 和 PpU10-33 菌株中累积的细胞内 PHA 在培养 48 小时后开始减少,而缺少解聚酶的突变体维持累积的 PHA 直至实验终点。

[0111] 假设 PpU 的两个 PHA 合成酶具有略微不同的底物特异性 :PhaC2 显示偏好 3- 羟基乙酰基 -CoA 而 PhaC1 偏向于 3- 羟基辛酰基 -CoA (Arias 等人,2008),可能的是 PpU10-33

中 PhaC2 聚合酶的超表达会改变单体组成和 / 或所生产聚合物的物理化学性质。表 4 示出了由 PpU、PpU10-33 及其 phaZ 删除突变体在辛酸钠上生长期间所生产的 PHA 具有相似的组成,如通过 NMR 确定的,为 P(3- 羟基辛酸酯-co-3- 羟基己酸酯) 的共聚物,所述 P 由 3- 羟基辛酸酯 (91.4-92.5%) 和 3- 羟基己酸酯 (7.5-8.6%) 组成。

[0112] 表 4:来自不同菌株的 PHA 的物理化学性质

[0113]

菌株	^a Mn (kDa)	^b Mw (kDa)	^c PI	^d Tg (°C)	^e Tm (°C)	^f Td (°C)	单体组成 (%mol)	
							3-HHx	3-HO
PpU	76.6	126.3	1.65	-35.90	61.40	294.03	8.6	91.4
PpU 10-33 NI	75.7	132.9	1.76	-35.92	59.68	294.93	7.5	92.5
PpU10-33 I	74.9	141.1	1.88	-37.16	59.21	294.04	8.4	91.6
PpU10-33 Δ phaZ NI	52.1	95.6	1.83	-40.82	59.60	293.84	8.6	91.4
PpU10-33 Δ phaZ I	50.1	96.2	1.92	-36.09	61.57	293.65	8.7	91.3

[0114] 聚合物是从由修改 MM 辛酸盐 35mM(以 15mM 和 20mM 分两次给予)中培养的 PpU、PpU10-33 以及 PpU10-33- Δ phaZ 未诱导的 (NI) 和经诱导的 (I) 细胞获得的。

[0115] ^a数量平均分子量; ^b重量平均分子量;

[0116] ^c多分散系数 (Mw/Mn); ^d熔融温度; ^e熔化焓;

[0117] ^f分解温度; 3-HHx = 3- 羟基己酸酯; 3-HO = 3- 羟基辛酸酯

[0118] 另外,三种聚合物的玻璃转化温度, Tg-35.9°C 至 -40.8°C (表 4),与之前对中链长度 (mc1)-PHA 所描述的 Tg 一致,且它们具有相似的熔化温度 (Tm, 59-61°C),这表明相似的结晶度等级。

[0119] 然而,长度不同的聚合物:来自 PpU 亲本菌株和 PpU10-33 (PhaC2 聚合酶超表达构造) 的聚合物的分子量 (Mw 和 Mn 值) 是相似的,分别为 126-142kDa 和 74-77kDa,而来自 PhaZ 敲除的菌株的分子量更低的多,分别为 96kDa 和 50kDa。

[0120] PpU、PpU10-33 和 PpU10-33- Δ phaZ 中,通过相对 RT-PCR 的 pha 操纵子的转录分析

[0121] 为了研究 PHA 转化和 phaC2 超表达及 phaZ 失活之间的关系,在三种菌株中,通过 pha 簇的相对 RT-PCR(图 2) 进行转录分析。用于 RT-PCR 数据归一化的参考基因为 gltA 和 proC2。

[0122] 在野生型中,培养的第一个 24 小时期间,两种 PHA 聚合酶 PhaC1 和 PhaC2 在转录水平上没有检测到大的变化 ($P > 0.1$),且伴随着 PHA 累积的稳定增加。但是在 4 小时时,测量到 phaZ 转录的两倍增加 ($P < 0.001$),这对应于开始 PHA 产生,然后该转录回落至较低水平。在 48 小时时,与 PHA 累积的最大水平相关地,观察到 phaC1 转录的快速和实质性的增加 (4.5 倍, $P < 0.0001$),以及并行地 phaZ 转录活性的六倍增加 ($P < 0.001$)。随后为 PHA 含量 (图 2)、和 phaC1 和 phaZ 转录水平的快速降低。这些结果表明:一方面,phaC1 转录和 PHA 累积的微调偶联,另一方面,phaZ 转录和 PHA 转移的微调偶联。

[0123] 在 PpU10-33 菌株的情况下,如所预期的,发现 phaC2 基因的表达在培养期间整个过程中高于 PpU 亲本菌株中的表达 ($P < 0.008$),尤其在其峰值 48 小时时如此 (3.5 倍, $P < 0.0001$)。令人关注地,该菌株中 phaC1 的表达通常低于 PpU 中的表达,尤其在 7 小时、24 小时和 48 小时时经诱导的菌株中,这表明 phaC2 的超表达负面地影响 phaC1 的表达 (图

2)。但是,尽管 phaC2 的超表达导致 phaC1 降低表达,但是联合的细胞合成酶活性还是导致增加的 PHA 产生。PpU10-33 中 phaZ 的转录水平趋向于与亲本菌株中的转录水平相似,除了在 24 小时之外,其为更高,这与 phaC2 的更高表达相关,且在大于 48 小时的培养物中其也是更高的,这与更高水平的 PhaC2 和 PHA 一致。因此,PhaC2 聚合酶和解聚酶合成也有强的偶联。

[0124] 在 PpU10-33-D phaZ 菌株中,当与野生型相比时,培养期间全过程中观察到显著地更高的 phaC2 转录水平 ($P = 0.0005-0.017$),这与所获得的更高的 PHA 产率一致 (60 重量%至 66 重量%,见图 4)。在 phaC1 的情况下,在 24 小时和 38 小时时也测量到更高的水平,但仅在 phaC2 是经诱导的时候时如此 ($P < 0.0017$)。

[0125] 因此,phaZ 的失活不仅防止已合成的 PHA 的转化和回收,还允许更高的 PHA 聚合酶的转录水平。

[0126] 用于从 PpU 菌株回收 PHA 的溶剂提取方法

[0127] 在不同溶剂系统中研究用于经修饰的 PpU 菌株中产生 PHA 的提取条件,所述溶剂系统选自氯仿、二氯甲烷和丙酮。提取在两个不同的温度下进行,即室温 (RT) 和 80°C,并使用三次提取 (30 分钟、1 小时、3 小时和 18 小时)。在本实验中所使用的冻干细胞是按照对于 *P. putida* U 及其衍生物的标准培养条件获得的:在含有 200ml 培养基并用辛酸 (10+20mM) 作为底物的 1L 玻璃瓶中,以温度 30°C,转速 200 转每分钟,将三种菌株在 MM+0.1YE 中培养 72 小时。突变体菌株 (PpU10-33 和 PpU10-33- Δ phaZ) 不是经诱导的。将 40mg 冻干的生物量样品放置在提取管中,重悬于相应溶剂并在上述不同条件下提取。PHA 回收百分比是参考起始的 40mg 冻干生物量而言的 (表 5)。将典型的用氯仿提取 (3 小时 80°C) 作为对照。

[0128] 表 5 使用不同溶剂、提取时间和温度的 PHA 回收 (重量%)

[0129]

PpU		3 h-80°C	1 h-RT	3 h-RT	18 h-RT
	CHCl ₃	33.1±0.9	30.6±0.1	32.4±2.3	30.6±4.7
PpU 10-33	CH ₂ Cl ₂	34.4±2.0	31.5±0.7	30.7±0.6	31.6±2.5
	丙酮			21.3±1.5	25.1±0.5
		3 h-80°C	1 h-RT	3 h-RT	18 h-RT
PpU 10-33 Δ phaZ	CHCl ₃	36.4±0.8	33.6±1.2	34.0±1.1	33.2±1.7
	CH ₂ Cl ₂	30.0±2.8	34.3±3.2	34.1±1.9	34.4±2.3
	丙酮			26.8±2.5	27.9±1.7
PpU 10-33 Δ phaZ		3 h-80°C	1 h-RT	3 h-RT	18 h-RT
	CHCl ₃	58.8±3.2	56.2±2.0	58.0±0.2	56.9±2.3
	CH ₂ Cl ₂	59.5±1.2	58.7±4.3	56.6±2.6	58.3±0.1
PpU 10-33 Δ phaZ	丙酮			57.3±1.1	57.4±2.2

[0130] 结果是三次重复的均数 ± 标准偏差。CH₂Cl₂: 二氯甲烷 CHCl₃: 氯仿

[0131] 在 PpU10-33- Δ phaZ 中,没有观察到条件之间的显著区别,PHA 回收百分比范围为 56 重量%至 59 重量%。然而,在 PpU (野生型) 和单一体变体中,当使用丙酮作为溶剂时,PHA 回收百分比为 21 重量%至 28 重量%,而对于其他溶剂,回收百分比为约 31 重量%至

34 重量%。

[0132] 为了评价菌株之间是否存在区别,假设对于对照条件(氯仿,3 小时 80℃)PHA 回收为最大值(100%),计算 PHA 回收相对百分比。在氯仿作为提取溶剂的情况下,在任何菌株中都没有观察到显著区别。但是,在 Δ phaZ 突变体中 PHA 回收相对百分比略微较高(96-98 相对%),而对于野生型和单突变体回收为约 91-93 相对%。

[0133] 当用二氯甲烷作为溶剂时观察到相似的行为。 Δ phaZ 突变体显示 PHA 回收相对百分比为 96-100 相对%,而另外两个菌株显示 PHA 回收值为 93-96 相对%。

[0134] 当用丙酮作为溶剂时,可以观察最显著的区别。在所测试的试剂之间,丙酮是最环境友好的一个,但同时也可能是具有最低提取能力的溶剂。后一方面可能是阐明双突变体(PpU10-33- Δ phaZ)和另外两个菌株(PpU 和 PpU10-33)之间 PHA 回收百分比的差别的关键。

[0135] Δ phaZ 突变体为显示最高回收产率为 97-98 相对%的突变体。出乎意料地,在提取 3 小时或 18 小时后,没有观察到区别,这表明 3 小时的提取已经足够。相比之下,在另外两个菌株(PpU 和 PpU10-33)中,提取 3 小时后,PHA 回收相对百分比分别急剧地下降为 64 相对%和 74 相对%。对于野生型和单突变体,在提取 18 小时后,这些百分比在一定程度上分别增加到至多 76 相对%和 78 相对%。

[0136] 值得注意的是,用丙酮作为溶剂并短时间提取(30 分钟)所获得的结果显示相对 PHA 回收百分比的最高差别,即对于野生型(PpU)和单突变体(PpU10-33)为 50-55 相对%,在双突变体(PpU 10-33- Δ phaZ)中为 86 相对%。因此,丙酮是其中菌株显示最为明显的差别的溶剂,其中双突变体(PpU10-33- Δ phaZ)为表现出最高的相对 PHA 回收产率的菌株。

[0137] 因此,对于菌株 PpU10-33- Δ phaZ,丙酮表示取代 PHA 回收工艺中的氯仿的同样好的且环境友好的替代溶剂。此外,结果表明,效果很大程度上受细胞形貌即 PHA 颗粒聚结促进。

[0138] PpU10-33- Δ phaZ 的底物依赖性 PHA 产生的优化

[0139] 工程菌株最初在三种不同培养基(E2,MM+0.1% YE 和 C-Y(2N))中培养,测试了八种不同的底物(己酸盐(C6)、庚酸盐(C7)、辛酸盐(C8)、癸酸盐(C10)、10-十一碳烯酸盐(C11:1)、油酸、亚油酸和甘油)。培养基具有以下组成:

[0140] 1. Vogel&Borner(1956, J, Biol. Chem. 218:97-106)所描述的 E2 培养基。

[0141] 2. Martinez-Blanco 等人(1990, J, Biol. Chem, 265 ;7084-7090)所描述的 MM 培养基 +0.1%酵母提取物。

[0142] 3. Choi 等人(1994, Appl, Environ, Microbiol. 60:3245-3254)所描述的 C-Y 培养基,其具有常规或两倍(C-Y(2N))的氮源浓度(0.66 和 1.32g/l (NH₄)₂SO₄)。

[0143] 在 MM+0.1% YE 和 C-Y(2N)培养基中获得了最佳结果,因此,在这两种培养基中使用八种底物和使用 P. putida U 野生型(PpU)作为对照进行动态生产研究。在所有菌株/培养基/底物组合中每 24 小时进行取样以测定生物量和 PHA 生产。在表 6 中编辑了所测试的不同培养条件中关于 PHA 生产的最好的生产率以及收获时间。

[0144] 表 6 用 P. putida U(PpU)和工程菌种 PpU 10-33- Δ phaZ 在两种不同培养基 MM+0.1% YE 和 C-Y(2N)中培养所获得的生物量和 PHA 生产产率

[0145]

PpU					PpU 10-33- Δ phaZ			
MM+0.1%YE								
底物	时间 (小时)	CDW (g/L)	PHA (g/L)	PHA (%重量)	时间 (小时)	CDW (g/L)	PHA(g/L)	PHA (%重量)
C6 (10+20mM)	72	1.69	0.04	2.4	72	1.65	0.15	9.1
C7 (10+20mM)	72	1.38	0.23	16.7	72	2.04	0.67	32.8
C8 (10+20mM)	48	2.56	1.05	41.0	48	3.25	1.82	56.0
C10 (10+20mM)	72	3.40	1.14	33.5	72	2.49	1.21	48.6
C11:1 (27 mM)	72	0.46	0.26	56.5	72	0.42	0.23	54.8
甘油 (3%)	96	6.68	1.00	15.0	96	6.44	1.35	21.0
甘油 (4%)	120	6.09	0.78	12.8	120	6.31	1.44	22.8
油酸 (1%)	96	5.90	2.09	35.4	96	5.73	2.33	40.7
亚油酸 (1%)	72	4.75	1.28	26.9	72	5.78	2.47	42.7

C-Y (2N)								
底物								
C6 (10+20mM)	72	0.69	0.11	15.9	72	0.15	0.07	46.6
C7 (10+20mM)	72	2.19	0.57	26.0	72	1.53	0.74	48.4
C8 (10+20mM)	24	1.91	0.91	47.6	48	3.37	1.86	55.2
C10 (10+20mM)	24	2.83	1.27	44.9	24	4.68	2.48	53.0
C11:1 (27 mM)	96	3.75	0.94	25.1	96	3.83	1.68	43.8
甘油 (3%)	120	3.97	0.31	7.8	120	4.09	0.64	21.0
甘油 (4%)	120	4.94	0.55	11.1	120	6.31	1.18	23.0
油酸 (1%)	72	5.18	1.48	28.6	96	4.82	1.99	41.2
亚油酸 (1%)	96	5.68	1.72	30.3	96	4.21	1.51	35.7

[0146] C6 :己酸盐 ;C7 :庚酸盐 ;C8 :辛酸盐 ;C10 :癸酸盐 ;C11 :1 :10- 十一碳烯酸盐

[0147] 在所测的多数底物中,工程菌中 PHA 产生比野生型的高,其获得 6%至 300%的增量。当在以己酸盐或 10- 十一碳烯酸盐为碳源的两个培养基中培养时,PpU-10-33- Δ phaZ 显示差的聚合物产生。相比之下,当 PpU-10-33- Δ phaZ 在利用十一碳烯酸盐作为底物的 C-Y (2N) 中生长时,观察到 PHA 产生的显著增加,且 PHA 产率比用相同碳源在 MM+0.1 % YE 中所获得的 PHA 产率大。当在 C-Y (2N) 中培养时,双突变体在 24 小时内能够累积达 2.48g/L (53.0 重量%) 的 PHA,而在 MM+0.1 % YE 中其用了 72 小时来生产 1.21g/L (48.6 重量%) 的 PHA。相比之下,当 PpU-10-33 Δ phaZ 用辛酸盐培养时,获得相似的生产水平,其在两个培养基中均达到 1.82-1.86g/L (55.0-56.0 重量%) 的 PHA 产生。

[0148] 总之,在甘油、油酸和亚油酸中 PHA 峰值生产需要更长的培养时间。在甘油的情况下,突变体的 PHA 累积比野生型高 (分别为 21-23 重量%,8-15 重量%)。用油酸和 (部分地) 亚油酸观察到相似的模式,尽管二者允许更高的 PHA 累积百分比 (35-42 重量%),即使对于野生型 (8-15 重量%) 有显著增加,PHA 生产与其他所测底物相比也更低。

[0149] 当在 MM+0.1 % YE/ 辛酸盐、MM+0.1 % YE/ 油酸和 C-Y (2N) / 癸酸盐中培养时,菌株 PpU-10-33 Δ phaZ 显示最高的 PHA 产率。为了提高 PHA 生产,这三种培养基 / 底物组合物中的任何一个是按比例放大至小规模 (5L) 台式生物反应器的好的候选。

[0150] 不存在抗生素压力下 PHA 产生的研究

[0151] 为了促进按比例放大工艺和减少发酵成本,研究了在抗生素压力下突变菌株的维持。工程菌种通常在利福平 (Rf)、卡那霉素 (Km) 和亚碲酸盐 (Te11) 下保存。亚碲酸盐 (Te11) 的存在及其在培养物中的氧化使得液体培养基变暗,这影响生物量测量和回收。因此,在以下研究中从培养物中省略抗生素。将有和没有亚碲酸盐的培养物进行评价其对生产产率的影响。研究显示没有变化可以被检测到。此外,为了研究存在利福平和卡那霉素在生物量和聚合物生产中的影响,在用辛酸盐为底物,分别地对野生型具有和没有利福平 (Rf) 对于工程菌具有和没有组合利福平-卡那霉素 (Rf+Km) 的无机物培养基 MM+0.1% YE 中,培养野生型和工程菌株。这些研究的结果示于图 5 中。

[0152] 在生物量和聚合物生产中没有观察到区别,这意味着抗生素存在与否不影响生产产率。另外,被证实的是工程菌种的基因型不因没有抗生素而改变。两种菌株均如前所述的在没有抗生素下培养。在 48 小时和 72 小时时,将各个培养物的稀释液放在没有抗生素的 LB 板中,于 30℃ 孵育 24 小时后,挑选 50 个克隆在具有抗生素的 LB 板上划线,于 30℃ 孵育 24 小时以核实各个菌株中耐受模式的维持。孵育后,所有克隆在具有抗生素的板上生长,这表明不存在抗生素不影响耐药表现型,因此,在工程菌株中应当保存了耐受基因型。

[0153] 所获得的结果表明双突变体 PpU-10-33 Δ phaZ 的培养,没有抗生素 (Rf+Km) 压力和亚碲酸盐不影响 PHA 生产。

[0154] 参考文献:

[0155] Arias S., Sandoval, A., Arcos, M., Canedo, M. L., Naharro, G., and Luengo, J. M. (2008) *Micro Biotech* 1:170-176.

[0156] Bassas, M. (2010) Isolation and Analysis of Storage Compounds. In *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology: Experimental Protocols and Appendices*. Timmis K. N. (ed.). Berlin: Springer Verlag, pp. 3725-3741.

[0157] Castaneda, M., Guzman, J., Moreno, S., and Espin, G. (2000) *J Bacteriol* 182: 2624-2628.

[0158] Choi J., Lee, S. Y. (1997) *Bioprocess Eng.* 17:335-342.

[0159] Conte, E., Catara, V., Greco, S., Russo, M., Alicata, R., Strano, L., Lombardo, A., Di Silvestro, S., and Catara, A. (2006) *Appl Microbiol Biotechnol* 72:1054-1062.

[0160] de Eugenio, L. I., Escapa, I. F., Morales, V., Dinjaski, N., Galan, B., Garcia, J. L., Prieto, M. A. (2010a). *Environ Microbiol* 12:207-221.

[0161] de Eugenio, L. I., Galan, B., Escapa, I. F., Maestro, B., Sanz, J. M., Garcia, J. L., Prieto, M. A. (2010b) *Environ Microbiol* 12:1591-1603.

[0162] Diederich, L., Roth, A., and Messer, W. (1994) *Bio Techniques* 16:916-923.

[0163] Donnenberg, M. S., and Kaper, J. B. (1991) *Infect Immun* 59:4310-4317.

[0164] Galan, B., Dinjaski, N., Maestro, B., de Eugenio, L. I., Escapa, I. F., Sanz, J. M., Garcia, J. L., Prieto, M. A. (2011) *Mol Microbiol* 79:402-418.

[0165] Grage, K., Jahns, A. C., Parlange, N., Palanisamy R., Rasiah, I. A., Atwood, J. A., Rehm, B. H. (2009) *Biomacromolecules* 10:660-669.

[0166] Harayama, S., Rekik, M., Wubbolts, M., Rose, K. R., Leppik, R. A. and Timmis, K. N. (1989). *J Bacteriol* 171:5048-5055.

- [0167] Herrero, M., de Lorenzo, V., and Timmis, K. N. (1990) J Bacteriol 172 : 6557-6567.
- [0168] Herrero, M., de Lorenzo, V., Ensley, B., and Timmis, K. N. (1993) Gene 134 : 103-106.
- [0169] Hoffmann, N., and Rehm, B. H. (2005) Biotechnol Lett 27 : 279-282.
- [0170] Hrabak, O. (1992) FEMS Microbiol. Rev. 103 : 251-256.
- [0171] Huisman, G. W., Wonink, E., Meima, R., Kazemier, B., Terpstra, P., and Witholt, B. (1991) J Biol Chem 266 : 2191-2198.
- [0172] Kessler, B., and Witholt, B. (2001) J Biotechnol 86 : 97-104.
- [0173] Kraak, M. N., Kessler, B., and Witholt, B. (1997) Eur J Biochem 250 : 432-439.
- [0174] Luengo, J. M., Garcia, B., Sandoval, A., Naharro, G., Olivera, E. R. (2003) Curr Opin Microbiol 6 : 251-260.
- [0175] Madison, L. L., and Huisman, G. W. (1999) Microbiol Mol Biol Rev 63 : 21-53.
- [0176] Martinez-Blanco, H., Reglero, A., Rodriguez-Aparicio, L. B., and Luengo, J. M. (1990). J Biol Chem. 265 : 7084-7090.
- [0177] Prieto, M. A., Bühler, B., Jung, K., Witholt, B., and Kessler, B. (1999a) J Bacteriol 181 : 858-868.
- [0178] Prieto, M. A., Kellerhals, M. B., Bozzato, G. B., Radnovic, D., Witholt, B., and Kessler, B. (1999b) Appl Environ Microbiol 65 : 3265-3271.
- [0179] Quant, J., and Hynes, M. P. (1983) Gene 127 : 15-21.
- [0180] Ren, Q., de Roo, G., Ruth, K., Witholt, B., Zinn, M., ~~Thöny~~-Meyer, L. (2009a) Biomacromolecules 10 : 916-22.
- [0181] Ren, Q., de Roo, G., Witholt, B., Zinn, M., and ~~Thöny~~-meyer, L. (2010) BMC Microbiol 10 : 254.
- [0182] Sambrook, J., and Russell, D. W. (2001) Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor, N. Y : CSHL Press.
- [0183] Sanchez-Romero, J. M., Diaz-Orejas, R., and de Lorenzo, V. (1998) Appl Environ Microbiol 64 : 4040-4046.
- [0184] Selvaraj, J., and Iyer, V. N. (1983) J Bacteriol 156 : 1292-1300.
- [0185] Solaiman, D. K., Ashby, R. D., and Foglia, T. A. (2003) Appl Microbial Biotechnol 62 : 536-543.
- [0186] Spurr, A. R. (1969) J. Ultrastruct Res 26 : 31-43.
- [0187] Steinbüchel, A. Polyhydroxyalkanoic acids in Biomaterials, D. Byrom, ed., MacMillan Publishers, Basingstoke (1991), p. 123 ff.
- [0188] Steinbüchel, A., Aerts, K., Babel, W., Follner, C., Liebergesell, M., Madkour, M. H., et al, (1995) Can J Microbiol 41 : 94-105.
- [0189] Uchino, K., Saito, T., Gebauer, B., Jendrossek, D. (2007) J Bacteriol 189 : 8250-8256.
- [0190] Williams and Peoples (1996) Chemtech 26, 38-44.

[0191] York, G. M., Stubbe, J., and Sinskey, A. J. (2002) J Bacteriol 184 :59-66.

[0192] 附录 1: 所使用的菌株、突变体和质粒

[0193]

载体和构造	说明	参考
RK600	Cm^R , $oriColE1$, $oriV$, $RK2mob^{tra^+}$. 三亲本接合事件中的辅助质粒	Herrero 等人, 1990
pUC18NotI/T7	Ap^R , $oriColE1$, $lacZa^+$, 启动子 lac , pUC18NotI 衍生的载体, 其中已经从多聚接头的EcoR位点引入了合成的T7引物	Herrero 等人, 1993
pCNB1mini-Tn5xylS/Pm::T7pol	Km^R , tnp^+ , $xylSPm$ 启动子, T7 RNA 聚合酶	Harayama 等人, 1989; Herrero 等人, 1993
pUTminiTn5-Tel	Tel^R , tnp^+	Sanchez-Romero 等人, 1998
pGEM®-T Easy	Ap^R , $oriColE1$, $lacZa^+$, SP6 T7, lac 启动子	PROMEGA
pJQ200 (KS/SK)	Gm^R , $ori15A$, Mob^+ , $lacZa^+$, $sacB$, 用于通过双重重组事件形成删除的载体	Quandt & Hynes, 1993
pBBR1MCS-5	Gm^R , $oriBBR1$, Mob^+ , $lacZa^+$, 启动子 lac 广宿主范围的克隆和表达载体	Kovach 等人, 1995
pBBR1MCS-3- <i>phaC2</i>	利用限制位点 $SacII$ - $SacI$. 将来自 <i>phaC1</i> 的ATG的-26至+1832位置的pGEM简单插入片段克隆进入pBBR1MCS-3载体 Tc^R	Arias 等人, 2008
pUC18NotI/T7- <i>phaC2</i>	pUC18NotI/T7, 其含有从pBBR1MCS-3- <i>phaC2</i> 构造切除的 <i>phaC</i> 并 利用限制位点 $EcoRI$ 克隆	本研究
pUTminiTn5-Tel-T7 <i>phaC2</i>	含有作为NotI盒从pUC18NotI/T7- <i>phaC2</i> 切除的 T7启动子- <i>phaC2</i> 的Mini-Tn5-Tel.	本研究
pMS- <i>phaC1C2</i> -0941347	含有编码PhaC1和PhaC2合成酶的合成DNA盒的pMS载体 并克隆进入HindIII和KpnI限制位点 Sm^R	本研究 (GENEART AG)
pJQ200SK- <i>phaC1C2</i>	利用限制位点NotI克隆进入pJQ200SK的来自 <i>phaC1</i> 的ATG的 -106至+3383位置的合成DNA插入片段	本研究
pBBR1MCS-5- <i>phaZ</i>	克隆进入pBBR1MCS-5的KpnI-XbaI位点的来自 <i>phaZ</i> 的ATG的 -27至+890位置的pGEM简单插入片段	本研究
菌株		
<i>E. coli</i> DH10B	F^- , $mcrA$, $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$ Ø80dialZ1M15, $\Delta lacX74$, $deoR$, $recA1$, $endA1$, $araD139$, $\Delta(ara, leu)7697$, $galU$ $galK$, λ^- , $rpsL$, $nupG$.	Invitrogen
<i>E. coli</i> CC18λpir	F^- , $\Delta(ara-leu)$, $araD$, $\Delta lacX74$, $galE$, $galK$, $phoA20$, $thi-I$ $rps-1$, $rpoB$, $argE(Amp)$, $recA$, thi pro $hsdRM^+$, RP4-2-Tc (用λpir噬菌体溶源化的CC18)	Herrero 等人, 1990
PpU	<i>P. putida</i> U 菌株. (CECT4848), Rf^R .	Martínez- Blanco 等人, 1990
PpU-pCNB1mini-Tn5xylS/Pm::T7pol	含有 pCNB1mini-Tn5xylS/Pm::T7pol 的 <i>P. putida</i> U Km^R Rf^R	本研究
PpU 10-33	含有 pCNB1mini-Tn5xylS/Pm::T7pol 和 pUTminiTn5-Tel- <i>phaC2</i> . 的 <i>P. putida</i> U Km^R Tel^R Rf^R .	本研究
Δ <i>phaZ</i> -PpU 10-33	删除PhaZ的 PpU 10-33 Km^R Tel^R Rf^R .	本研究
pMC-PhaZ	由 <i>phaZ</i> 基因 (pBBR1MCS-5- <i>phaZ</i> -1-Δ <i>phaZ</i> -PpU 10-33) 补足的 Δ <i>phaZ</i> PpU 10-33. Gm^R Km^R Tel^R Rf^R	本研究

[0194] 附录 2 本研究中用于 PT-PCR 分析的寡核苷酸列表。编号 (^{1,2}) 分别指示使用来自 *P. putida* KT2440 或 *P. putida* U 的 DNA 是否被用作模板。

[0195]

基因	正向引物 (5' 3')	逆向引物 (5' 3')
¹ 16S核糖体 DNA (16s rDNA)	ACGATCCGTAAGTGGTCTGA	TTCGCACCTCAGTGTCACTA
¹ 柠檬酸合成酶 (<i>glpA</i>) PP_4194	CCCAGTTTCATCCAGCATGGTC	TGGACCGGATCTTCATCCTCCA
¹ 核糖体蛋白 S12 (<i>rpsL</i>) PP_0449	GGCAACTATCAACCAGCTGGT	GCTGTGCTCTTGCAAGTTGTG
¹ 3-磷酸甘油醛脱氢酶 (<i>gap-1</i>) PP_1009	CTTGAGGTTGACGGTGAGGTC	AGGTGCTGACTGACGTTTACCA
¹ 信号识别颗粒蛋白 Ffh (ffh) PP_1461	CGGTAGTCAAGGATTTCGTCAAC	CACCATCACGCTCTTTTCTTG
¹ 杆状-检测蛋白 MreB (<i>mreB</i>) PP_0933	CGTGAAGTGTTCCTGATCGAAG	CCGATTTCCTGCTTGATACGTT
¹ 细胞分裂蛋白 FtsZ (<i>ftsZ</i>) PP_1342	CGGTATCTCCGACATCATCAAG	GAGTACTCACCCAGCGACAGGT
¹ 吡咯啉-5-羧酸还原酶1 (<i>proC1</i>) PP_3778	GCATTTACCAGCCCTTTGAAGC	CAATGACGAAAGGCAAATCGAC
¹ 吡咯啉-5-羧酸还原酶2 (<i>proC2</i>) PP_5095	CTCCCAACTGACCTTGACAGAC	GCTCCTTATTTGCCAGTTGTTC
² PHA 合成酶1 (<i>phaC1</i>)	GCATGTGGCCCACTTTGGC	CCCAGTTCTTGCCACIT
² PHA 解聚酶 (<i>phaZ</i>)	AGCAGTTTGCCACGACTACC	GGTGGATCTTGTGCAGCCAGT
² PHA 合成酶2 (<i>phaC2</i>)	GGCAACCCCAAGGCCTACTAC	CCGAGCGGTGGATAGGTACTG
² 颗粒结合蛋白 PhaF (<i>phaF</i>)	GTCAGCTTCTCGATCTGCTTGGT	GAAGAAGACGGCTGAAGATGTAGC
² 颗粒结合蛋白 PhaI (<i>phaI</i>)	CTCTTTGTCGATGCGTITCTTG	CATGCCCAAAGTGATTGTGAAG
² PhaD 转录调节因子 (<i>phaD</i>)	GAACGTATCCACCCTGGAGATT	ATAAGGTGCAGGAACAGCCAGTAG
² 长链脂肪酸-CoA连接酶1 (<i>fadD1</i>)	CGTGATCAAGTACGTGAAGAAGATG	GTGAAGGCGTAGATGTGGTACAG
² 长链脂肪酸-CoA连接酶2 (<i>fadD2</i>)	GCTGTACCACATCTATGCCCTTAC	GCCGGAGTTGGTGACTTTCAAG

[0196] 附录3:所使用的其他寡核苷酸的列表

[0197]

引物	序列 (5' 3')
M13F	GTAAAACGACGGCCAG
M13r	AGGAAACAGCTATGAC
PhaC1-check-F	GAATCGGTTGTGAACTCATGCTC
PhaC2-check-R	CCTTGCCATGGAAGTGGTAGTACAG
RT - phaZ F_PpU	AGCAGTTTGCCACGACTACC
RT-phaZ R_PpU	GGTGGATCTTGTGCAGCCAGT
phaZ-F-KpnI	GGGGTACCCCACTTTTTCACGACAGAGTCGAACG
phaZ-R-XbaI	GCTCTAGAGCGCAACACTCCCTCGTCTTACC

[0001]

PP142491PF, 序列表

SEQUENCE LISTING ?Rule 13ter

<110> 赫姆霍尔兹传染病研究中心有限责任公司
<120> 产生PHA的基因工程微生物

<140> EP 12163787.0-1212
<141> 2012-04-11

<160> 42

<210> 1
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 正向引物 (5'3' 的16s核糖体RNA作为恶臭假单胞菌KT2440的模板

<400> 1
acgatacgtgta actggtctga 20

<210> 2
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 逆向引物 (5'3' 的16s核糖体RNA作为恶臭假单胞菌KT2440的模板

<400> 2
ttcgacacctc agtgtcagta 20

<210> 3
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 正向引物 (5'3' 的柠檬酸合成酶(glpA) PP_4194 作为恶臭假单胞菌KT2440的模板

<400> 3
gccgatttca tccagcatgg tc 22

<210> 4
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 逆向引物 (5'3' 的柠檬酸合成酶(glpA) PP_4194 作为恶臭假单胞菌KT2440的模板

<400> 4
tggaccggat cttcatcctc ca 22

<210> 5
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 正向引物 (5'3' 的核糖体蛋白S12 (rpsL) PP_0449 作为恶臭假单胞菌KT2440的模板

<400> 5
ggcaactatc aaccagctgg t 21

<210> 6
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 逆向引物 (5'3' 的核糖体蛋白S12 (rpsL) PP_0449 作为恶臭假单胞菌KT2440的模板

<400> 6
gctgtgctct tgcaggttgt g 21

<210> 7
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>

[0002]

<223> 正向引物 (5'3' 的3-磷酸甘油醛脱氢酶(gap-1) PP_1009 作为恶臭假单胞菌KT2440的模板
 <400> 7
 cttgaggttg acggtgaggt c 21
 <210> 8
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 逆向引物 (5'3' 的3-磷酸甘油醛脱氢酶(gap-1) PP_1009 作为恶臭假单胞菌KT2440的模板
 <400> 8
 aggtgctgac tgacgtttac ca 22
 <210> 9
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 正向引物 (5'3' 的信号识别颗粒蛋白 Ffh (ffh) PP_1461 作为恶臭假单胞菌KT2440的模板
 <400> 9
 cggtagtcaa ggatttcgtc aac 23
 <210> 10
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 逆向引物 (5'3' 的信号识别颗粒蛋白 Ffh (ffh) PP_1461 作为恶臭假单胞菌KT2440的模板
 <400> 10
 caccatcacg ctttttttct tg 22
 <210> 11
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 正向引物 (5'3' 的杆状检测蛋白MreB (mreB) PP_0933 作为恶臭假单胞菌KT2440的模板
 <400> 11
 cgtgaagtgt ttctgatcga ag 22
 <210> 12
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 逆向引物 (5'3' 的杆状检测蛋白MreB (mreB) PP_0933 作为恶臭假单胞菌KT2440的模板
 <400> 12
 ccgatttctc gcttgatacg tt 22
 <210> 13
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 正向引物 (5'3' 的细胞分裂蛋白FtsZ (ftsZ) PP_1342 作为恶臭假单胞菌KT2440的模板
 <400> 13
 eggtatctcc gacatcatca ag 22
 <210> 14
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 逆向引物 (5'3' 的细胞分裂蛋白FtsZ (ftsZ) PP_1342 作为恶臭假单胞菌KT2440的模板
 <400> 14
 gagtactcac ccagcgacag gt 22

[0003]

<210> 14
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 正向引物 (5'3' 的吡咯啉-5-羧酸还原酶1 (proC1) PP_3778 作为恶臭假单胞菌KT2440的模板

 <400> 15
 gcattttacca gcccittgaa gc 22

 <210> 16
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 逆向引物 (5'3' 的吡咯啉-5-羧酸还原酶1 (proC1) PP_3778 作为恶臭假单胞菌KT2440的模板

 <400> 16
 caatgacgaa aggcaaactg ac 22

 <210> 17
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 正向引物 (5'3' 的吡咯啉-5-羧酸还原酶2 (proC2) PP_5095 作为恶臭假单胞菌KT2440的模板

 <400> 17
 ctcccaactg accttgcaga c 21

 <210> 18
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 逆向引物 (5'3' 的吡咯啉-5-羧酸还原酶2 (proC2) PP_5095 作为恶臭假单胞菌KT2440的模板

 <400> 18
 gtccttatt tgcccagttg ttc 23

 <210> 19
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 正向引物 (5'3' 的PHA合成酶1 (phaC1) 作为恶臭假单胞菌U 的模板

 <400> 19
 gcatgtggcc cactttggc 19

 <210> 20
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 逆向引物 (5'3' 的PHA合成酶1 (phaC1) 作为恶臭假单胞菌U 的模板

 <400> 20
 cccaggttct tgcccactt 19

 <210> 21
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 正向引物 (5'3'的PHA解聚酶(phaZ) 作为恶臭假单胞菌U 的模板

 <400> 21
 agcagtttgc ccacgactac c 21

 <210> 22
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>

[0004]

<223>	逆向引物 (5'3'的PHA解聚酶 (phaZ) 作为恶臭假单胞菌U 的模板		
<400>	22		
	ggtggatctt gtgcagccag t	21	
<210>	23		
<211>	21		
<212>	DNA		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	正向引物 (5'3' 的PHA合成酶2 (phaC2) 作为恶臭假单胞菌U 的模板		
<400>	23		
	ggcaacccca aggcctacta c	21	
<210>	24		
<211>	21		
<212>	DNA		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	逆向引物 (5'3' 的PHA合成酶2 (phaC2) 作为恶臭假单胞菌U 的模板		
<400>	24		
	ccgagcggtg gataggtact g	21	
<210>	25		
<211>	23		
<212>	DNA		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	正向引物 (5'3' 的颗粒合成蛋白 PhaF (phaF) 作为恶臭假单胞菌U 的模板		
<400>	25		
	gtcagcttct cgatctgctt ggt	23	
<210>	26		
<211>	24		
<212>	DNA		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	逆向引物 (5'3' 的颗粒合成蛋白 PhaF (phaF) 作为恶臭假单胞菌U 的模板		
<400>	26		
	gaagaagacg gctgaagatg tagc	24	
<210>	27		
<211>	22		
<212>	DNA		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	正向引物 (5'3' 的颗粒合成蛋白 PhaI (phaI) 作为恶臭假单胞菌U 的模板		
<400>	27		
	ctctttgtcg atcgctttct tg	22	
<210>	28		
<211>	22		
<212>	DNA		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	Reverse Primer (5'3' 的颗粒合成蛋白 PhaI (phaI) 作为恶臭假单胞菌U 的模板		
<400>	28		
	catggccaaa gtgattgtga ag	22	
<210>	29		
<211>	22		
<212>	DNA		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	Forward Primer (5'3' 的PhaD转录调节因子(phaD) 作为恶臭假单胞菌U 的模板		
<400>	29		
	gaacgtatcc accctggaga tt	22	

[0005]

<210> 30
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 反向引物 (5'3' 的PhaD转录调节因子(phaD) 作为恶臭假单胞菌U 的模板

 <400> 30
 ataaggtgca ggaacagcc agtag 24

 <210> 31
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 正向引物 (5'3' 的长链脂肪酸CoA连接酶1 (fadD1) 作为恶臭假单胞菌U 的模板

 <400> 31
 cgtgatcaag tacgtgaaga agatg 25

 <210> 32
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 反向引物 (5'3' 的长链脂肪酸CoA连接酶1 (fadD1) 作为恶臭假单胞菌U 的模板

 <400> 32
 gtgaaggcgt agatgtgga cag 23

 <210> 33
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 正向引物 (5'3' 的长链脂肪酸CoA连接酶2 (fadD2) 作为恶臭假单胞菌U 的模板

 <400> 33
 gctgtaccac atctatgcct tcac 24

 <210> 34
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 反向引物 (5'3' 的长链脂肪酸CoA连接酶2 (fadD2) 作为恶臭假单胞菌U 的模板

 <400> 34
 gccggagtig gtgactttca g 21

 <210> 35
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 正向引物 (5'3' M13F

 <400> 35
 gtaaacgac ggccag 16

 <210> 36
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 反向引物 (5'3' M13r

 <400> 36
 aggaacagc tatgac 16

 <210> 37
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>

[0006]

<223> 正向引物 (5'3' PhaC1-check-F
 <400> 37
 gaatcgggttg tgaaactcat gctc 24 24
 <210> 38
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 逆向引物 (5'3' PhaC2-check-R
 <400> 38
 ccttgccatg gaagtggtag tacag 25
 <210> 39
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 正向引物 (5'3' RT-phaZ F_PpU
 <400> 39
 agcagtttgc ccacgactac c 21
 <210> 40
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 逆向引物 (5'3' RT-phaZ R_PpU
 <400> 40
 ggtggatctt gtgcagccag t 21
 <210> 41
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 正向引物 (5'3' phaZ-F-KpnI
 <400> 41
 ggggtacccc cactttttca cgacagagtc gaacg 35
 <210> 42
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 逆向引物 (5'3' phaZ-R-XbaI
 <400> 42
 gctctagagc gcaacactcc ctcgtcttac c 31

3

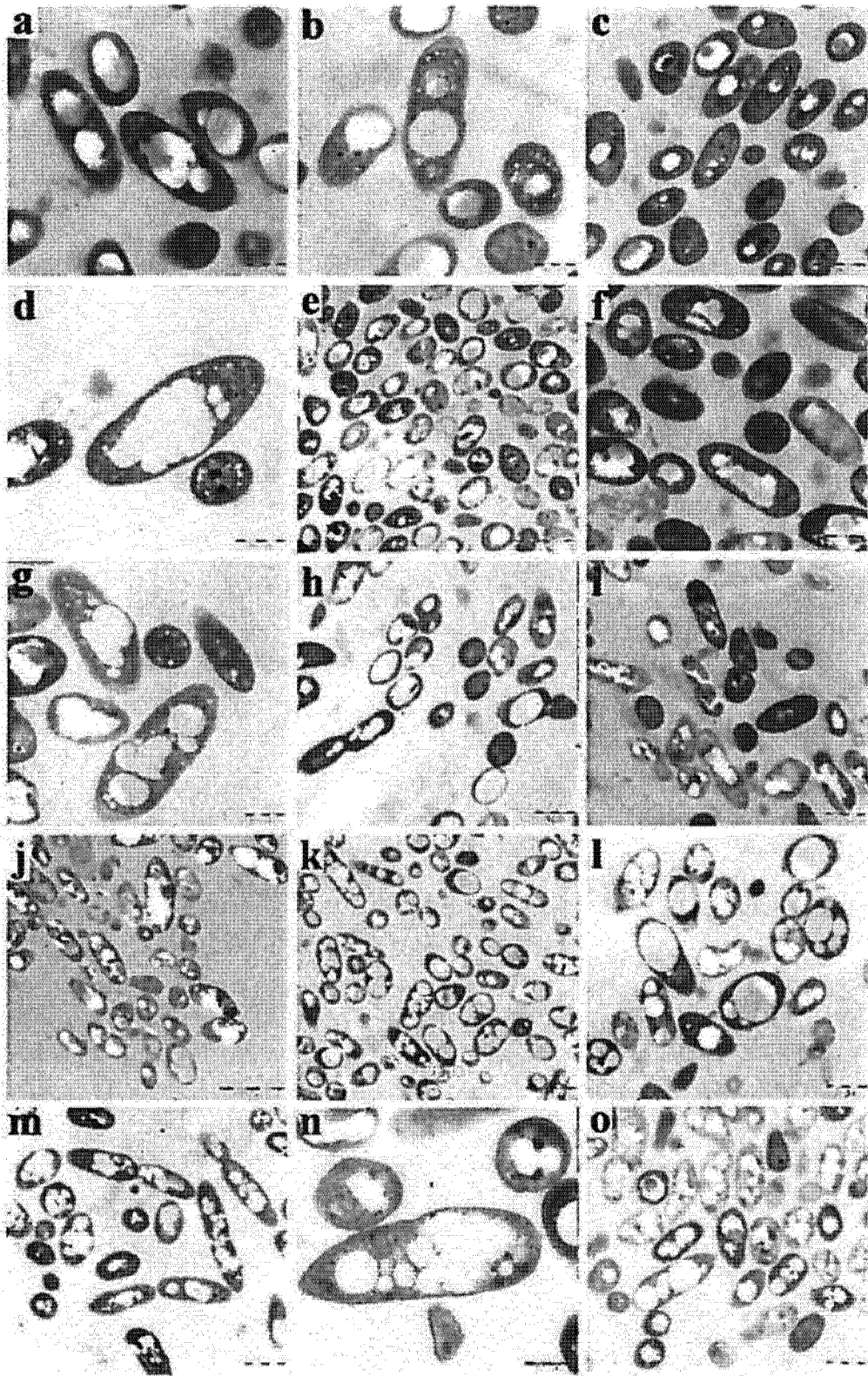


图 1

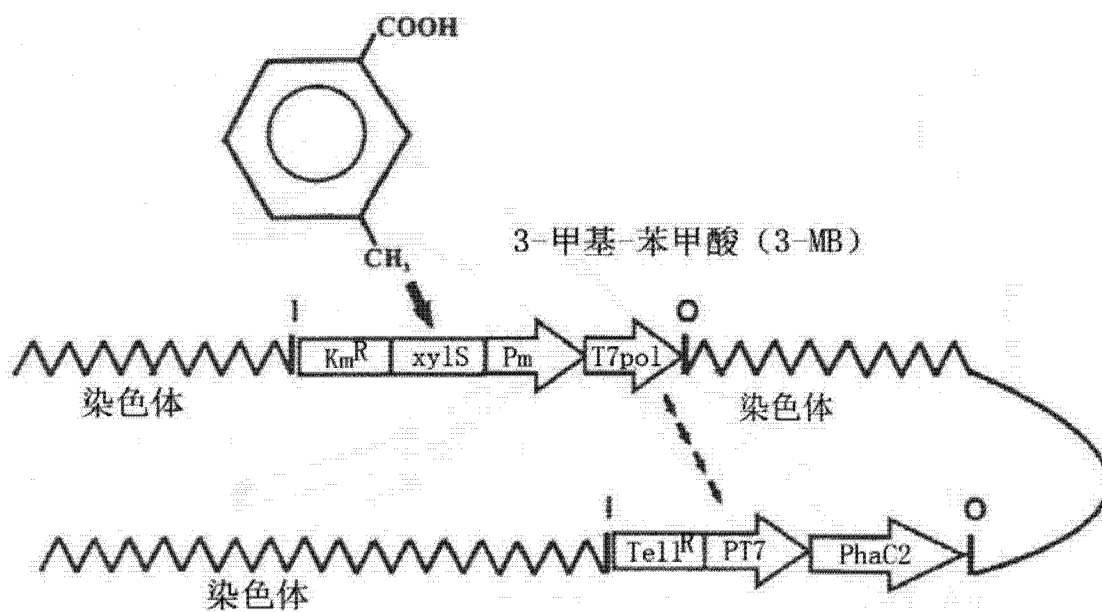


图 3

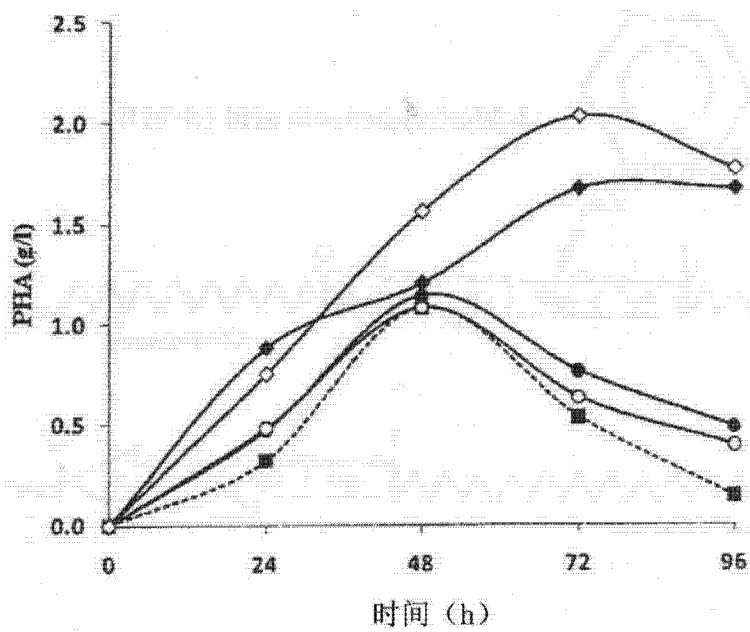


图 4

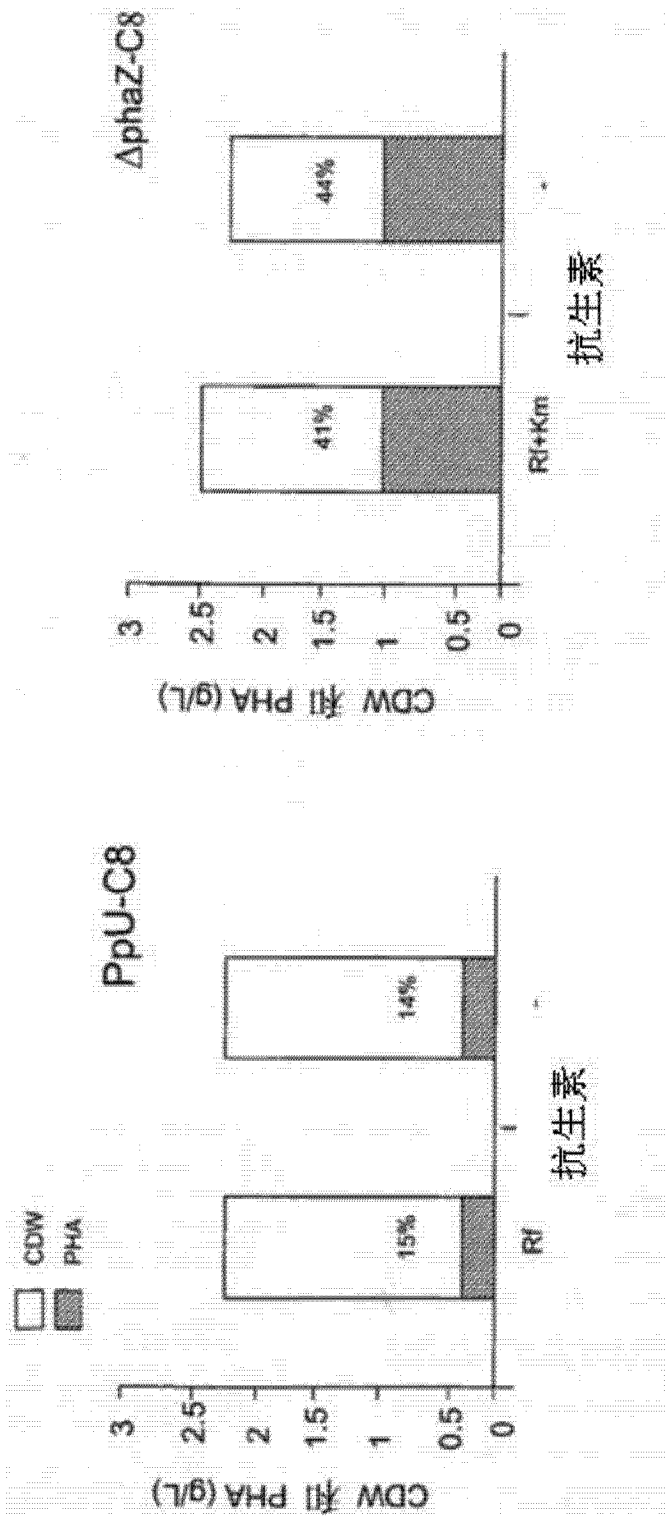


图 5

1. 一种天然产生 PHA 的微生物的基因工程形式, 其与具有编码聚羟基烷酸酯 (PHA) 合成酶的至少一个基因的野生型微生物相比具有增加的拷贝数, 其中所述增加的拷贝数提供所述 PHA 合成酶的均衡性过量产生, 并且其中所述基因工程使所述微生物在 24 小时后与所述野生型相比以至少 1.2 倍的量来过量产生中链长度的 PHA 或长链长度的 PHA, 其中用于评估所述过量产生的参考条件为含有 15mM 辛酸钠的经修改的 MM 培养基, 并且所述基因工程形式在编码所述微生物中的 PHA 降解中涉及的蛋白质的至少一个基因中具有至少一个修饰, 其中所述修饰使编码所述 PHA 降解中涉及的蛋白质的基因完全或部分失活, 更优选地使所述基因完全失活, 其中形成所述基因工程微生物的基础的所述微生物拥有编码 PHA 合成酶的基因。

2. 权利要求 1 中所述的基因工程微生物, 其中所述基因编码 PhaC2 合成酶或其同系物。

3. 权利要求 1 或 2 中所述的基因工程微生物, 其中所述 PHA 合成酶的表达由启动子系统调节, 所述启动子系统优选为基于蛋白质的, 更优选为 T7 聚合酶 /T7 聚合酶启动子系统。

4. 权利要求 1 至 3 中任一项所述的基因工程微生物, 其中所述 PHA 降解中涉及的蛋白质是 PHA 解聚酶, 优选地是 phaZ 和其同系物。

5. 权利要求 1 至 4 中任一项所述的基因工程微生物, 其中所述基因修饰在经繁殖和 / 或培养的所述微生物中被维持, 优选地在不存在或存在抗生素的两种情况下被维持。

6. 前述权利要求中任一项所述的基因工程微生物, 其中所述基因工程使所述微生物在 24 小时后与野生型相比优选地以至少 1.5 倍的量、更优选以至少 2 倍的量来过量产生中链聚羟基烷酸酯 PHA, 其中用于评估所述过量产生的参考条件为含有 15mM 辛酸钠的经修改的 MM 培养基。

7. 前述权利要求中任一项所述的基因工程微生物, 其中所述微生物选自恶臭假单胞菌、绿脓假单胞杆菌、丁香假单胞杆菌、荧光假单胞杆菌、嗜酸假单胞菌、Pseudomonas olevarans、热液海源菌、泊库岛食烷菌、不动杆菌属、新月柄杆菌、真养产碱菌属、肥大产碱杆菌、棕色固氮菌、富养红球菌、青紫色素杆菌或酒色着色菌, 优选为恶臭假单胞菌菌株, 更优选为恶臭假单胞杆菌 U。

8. 前述权利要求中任一项所述的基因工程微生物, 其中所述微生物能够在没有添加诱导物分子的情况下产生 PHA。

9. 前述权利要求中任一项所述的基因工程微生物, 其中所述微生物能够产生为单个细胞内颗粒形式的 PHA。

10. 前述权利要求中任一项所述的基因工程微生物, 其中所述微生物在暴露于含有辛酸钠的经修改的 MM 培养基 24 小时后能够生产最大的 PHA 含量, 并且优选地也能够将在所述最大的 PHA 含量 ± 20 重量%范围内的 PHA 含量维持至少 48 小时的时间。

11. 一种用于产生 PHA 的方法, 其包括以下步骤:

- a. 培养权利要求 1 至 10 中任一项所述的微生物; 和
- b. 从培养基中回收 PHA。

12. 根据权利要求 11 所述的方法, 其中所述方法不涉及或不需要添加用以引发所述微生物中的 PHA 过量产生和 / 或 PHA 合成酶过量产生的诱导物分子, 和 / 或不涉及或不需要添加用以防止丢失基因修饰的抗生素。

13. 根据权利要求 11 或 12 所述的方法, 其中所述 PHA 是利用具有 3 至 8 个碳原子的

酮、优选丙酮在 60℃或更低的温度下、优选地在 20℃至 40℃的温度下通过提取来回收的。

14. 权利要求 1 至 10 中任一项所述的基因工程微生物用于过量产生中链长度 PHA 和 / 或长链长度 PHA 的用途。