

文章编号 :1009-038X(2003)01-0021-04

有效利用木糖的肠道细菌的筛选及转化

孙金凤, 诸葛健, 王正祥

(江南大学 工业微生物研究中心, 江苏 无锡 214036)

摘要:以木糖为惟一碳源筛选得到了 32 株能利用木糖快速生长的肠道细菌,初步鉴定结果表明,有效利用木糖的菌株多为肺炎克雷伯氏杆菌,其次是大肠杆菌.选择合适的质粒对其中的 947 菌株、1569 菌株及 *E. coli* JM109 进行转化,检验转化子中的质粒在无选择压力条件下的传代稳定性,结果野生型菌株的转化率均明显低于 *E. coli* JM109,质粒 pET-28a 在所试验的几株菌中稳定性相对较差,pKK223-3 能在 947 菌株中稳定存在.

关键词:木糖;肠道细菌;质粒稳定性

中图分类号:Q 933

文献标识码:A

Screening and Transformation of Enteric Bacteria Utilizing Xylose Efficiently

SUN Jin-Feng, ZHUGE Jian, WANG Zheng-Xiang

(Research Center of Industrial Microorganisms, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: Thirty two strains of enteric bacteria were isolated using xylose as sole carbon source. Identification was carried out and the results indicated that most of these strains were *Klebsiella pneumoniae* and then *Escherichia coli*. Appropriate plasmids were selected to transform 947, 1569 and *E. coli* JM109 strains. Plasmid stability of the transformants without selective pressure was also tested. The results indicated that transformation ratio of the wild type strains was much lower than that of *E. coli* JM109. Plasmid pET-28a was relatively easier to be lost in the test strains while pKK223-3 was very stable in strain 947.

Key words: xylose; enteric bacteria; plasmid stability

利用木质纤维素水解液发酵生产燃料酒精,是开发新型可再生能源的一条有效途径.自然界中最充裕的太阳能资源通过光合作用以碳水化合物形式储存于植物中,其中 90% 以上是木质纤维素^[1,2].但是木质纤维素的组成复杂,包括多种不同的己糖和戊糖.传统的酒精发酵菌种酿酒酵母和运动发酵单胞菌都只能代谢有限的糖类,均不能有效代谢木质纤维素降解产生的木糖、阿拉伯糖等五碳

糖^[3].人们设想,将运动发酵单胞菌中编码产乙醇途径的两个关键酶基因丙酮酸脱羧酶编码基因 *pdh*、乙醇脱氢酶编码基因 *adh* 导入能够发酵多种糖类的细菌中,构建乙醇生物合成途径^[4].

一些肠道细菌如欧文氏杆菌、克雷伯氏杆菌、大肠杆菌等由于其宽广的底物利用范围等特征,常常作为构建产乙醇基因工程菌的宿主菌^[2,4,5],构建得到的工程菌如 *E. coli* KO11、*K. oxytoca* P2^[6]等

收稿日期 2002-08-29; 修回日期 2002-10-14.

基金项目 教育部骨干教师资助计划 (No. 1696).

作者简介 孙金凤(1972-),女,江苏淮阴人,发酵工程硕士研究生,讲师.

能够有效代谢木质纤维素降解产生的多种己糖及戊糖,发酵产生酒精。但是,由于不同的肠道细菌利用各种糖的能力存在很大的差异^[7],所以本研究旨在通过大量的菌种筛选希望得到能够有效利用木糖的肠道细菌,并对筛选得到的菌株进行鉴定,从中选择出合适的宿主菌,构建底物利用范围广泛的产乙醇基因工程菌。根据这些菌株的抗生素抗性特征,选择合适的载体进行转化,并初步检验质粒的传代稳定性。

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒和培养基

E. coli JM109 由本实验室保存;质粒 pUC18 购自上海生工生物工程技术有限公司;质粒 pET-28a, pKK223-3 由本校邵蔚蓝教授馈赠。

LB 培养基、SS 琼脂培养基、惟一碳源培养基^[8]等。

1.2 方法

1.2.1 菌种的筛选 由于木质纤维素水解液中的五碳糖主要是木糖,所以菌种筛选时,以木糖为惟一碳源筛选能有效利用木糖的菌株。

1) 菌种的分离采集:采样途径为人体的肠道细菌,从无锡市卫生防疫站搜集;从自然界筛选,主要取样草食性动物的粪便及其圈所的土壤、造纸厂的排污口水样等。采集的样品经适当处理后划线或涂布于 SS 琼脂培养基,37℃培养 24 h,挑取其中的特征红色菌落^[8]进行下一步筛选。

2) 以木糖为惟一碳源筛选生长迅速的菌株:用无菌牙签将 SS 琼脂培养基上的特征红色菌落点种于木糖惟一碳源固体培养基,37℃培养 24 h,挑选其中生长较快的菌株。

1.2.2 菌种的鉴定^[8,9] 步骤:显微镜镜检菌体形态→革兰氏染色→生化特征试验。

此外,还测试了被检菌株对常用抗生素即氨苄青霉素(Amp)、卡那霉素(Kan)的抗性, LB 固体培养基中的 Amp, Kan 最终质量浓度分别为 100 μg/mL, 50 μg/mL。

1.2.3 转化 采用常规 CaCl₂ 转化法。根据菌种鉴定结果,以质粒 pUC18, pKK223-3, pET-28a 转化筛选得到的大肠杆菌,以 pET-28a 转化筛选到的肺炎克雷伯氏杆菌,同时用 *E. coli* JM109 作为对照。

1.2.4 质粒稳定性测定^[10] 将转化子接种于添加了抗生素的 LB 液体培养基中,37℃,200 r/min 培养 12 h,以此作为种子液。按体积分数 2% 接种量接种于不含抗生素的 LB 液体培养基中,37℃,200

r/min 培养,每 12 h 转接一次,共转接 10 次。每培养 24 h 的菌液以适当的稀释度涂布于不含抗生素的 LB 平板上,37℃培养 16~20 h。随机挑取该平板上的 50 个菌落,点种于含有抗生素的 LB 平板上,37℃培养 16~20 h,观察平板上长出的菌落数,计算保持质粒的菌株占点种菌株总数的百分比(质粒保持率)。

2 结果与分析

2.1 菌种筛选结果

从 2 730 株菌中筛选得到了 32 株能在木糖为惟一碳源的培养基上快速生长的菌株。

2.2 菌种鉴定

2.2.1 菌落形态及显微镜镜检结果 LB 平板上,201,202,203,229,256,257,258,259,262,262',492,493,494,495,529,530,542,543,787,790,1010,1192,1193,1567,1569 菌落圆形隆起,边缘整齐,呈粘液状;显微镜下呈短杆菌。1569 菌株的透射电镜照片见图 1。901,902,911,947,1510,2143,2198 菌落低突起,透明,表面闪光。显微镜下呈直杆菌。947 菌株透射电镜照片见图 2。



图 1 1569 菌株透射电镜照片(25 500 ×)

Fig. 1 Transmission electron microscope photo of the strain 1569



图 2 947 菌株透射电镜照片(25 500 ×)

Fig. 2 Transmission electron microscope photo of the strain 947

2.2.2 革兰氏染色 筛选到的所有菌株均为革兰氏阴性杆菌。

2.2.3 生化特征试验 32 株菌生化特征见表 1。

表 1 菌株的生化特征

Tab.1 Biochemical identification of the strains

反 应	菌 株					反 应	菌 株				
	1569 等*	947 等**	<i>E. coli</i> JM109	<i>Klebsiella</i> <i>pneumoniae</i> ^[9]	<i>Escherichia</i> <i>coli</i> ^[9]		1569 等*	947 等**	<i>E. coli</i> JM109	<i>Klebsiella</i> <i>pneumoniae</i> ^[9]	<i>Escherichia</i> <i>coli</i> ^[9]
吲哚试验	-	+	+	-	+	肌醇	+	-	-	+	-
甲基红试验	-	+	+	[-]	+	D-山梨醇	+	+	+	+	+
V-P 试验	+	-	-	+	-	L-阿拉伯糖	+	+	+	+	+
西蒙氏柠檬酸盐	+	-	-	+	-	L-鼠李糖	+	+	+	+	[+]
硫化氢试验	-	-	-	-	-	D-木糖	+	+	+	+	+
尿素酶试验	+	-	-	+	-	纤维二糖	+	-	-	+	-
苯丙氨酸脱氨酶	-	+	+	-	-	α-甲基-D-葡糖苷	-	-	-	[+]	-
动力(鞭毛染色)	-	-	-	-	[+]	蜜二糖	+	+	+	+	[+]
明胶液化(20℃)	-	-	-	-	-	DNA 酶(37℃)	-	-	-	-	-
丙二酸钠利用	+	-	-	+	-	硝酸盐试验	+	+	+	+	+
D-葡萄糖产酸	+	+	+	+	+	氧化酶,Kovas'	-	-	-	-	-
D-葡萄糖产气	+	+	+	+	+	ONPG	+	+	+	+	+
乳糖	+	+	+	+	+	Yellow pigment	-	-	-	-	-
蔗糖	+	+	+	+	d	甘露糖	+	+	+	+	+
D-甘露醇	+	+	+	+	+	葡萄糖氧化试验	+	+	+	+	+

注 :+ 表示 90% ~ 100% 的菌株为阳性 [+] 表示 76% ~ 89% 的菌株为阳性 ;d 表示 26% ~ 75% 的菌株为阳性 [-] 表示 11% ~ 25% 为阳性 ;- 表示 0% ~ 10% 为阳性^[1]. * 表示 201 ,202 ,203 ,229 ,256 ,257 ,258 ,259 ,262 ,262' ,492 ,493 ,494 ,495 ,529 ,530 ,542 ,543 ,787 ,790 ,1010 ,1192 ,1193 ,1567 ,1569 菌株 ;** 表示 901 ,902 ,911 ,947 ,1510 ,2143 ,2198 菌株 .

抗生素抗性试验结果表明 ,所有菌株都没有 Kan 抗性 .901 ,902 ,911 ,947 ,1510 ,1469 ,2143 没有 Amp 抗性 ,其余菌株都能在含 100 μg/mL Amp 的 LB 平板上正常生长 .

根据以上鉴定结果 ,对照伯杰斯细菌分类学手册^[9] ,初步确定 201 ,202 ,203 ,229 ,256 ,257 ,258 ,259 ,262 ,262' ,492 ,493 ,494 ,495 ,529 ,530 ,542 ,543 ,787 ,790 ,1010 ,1192 ,1193 ,1567 ,1569 为肺炎克雷伯氏杆菌 ;901 ,902 ,911 ,947 ,1510 ,2143 ,2198 为大肠杆菌 .比较发现 :筛选得到的肺炎克雷伯氏杆菌利用多种糖作碳源的能力均较大肠杆菌强 ,尤其是 1192 ,1193 ,1567 ,1569 菌株利用多种糖作为碳源的能力均很强 ,且产酸较少 .

2.3 质粒转化及其稳定性

分别以质粒 pUC18 ,pKK223-3 ,pET-28a 转化 *E. coli* JM109 及筛选到的几株野生菌 ,结果表明 ,在其他条件相同的情况下 ,野生型菌株的转化率均明显低于 *E. coli* JM109 ,且同一菌株对不同质粒的转化率不同 ,有些野生型菌株无法实现转化 .质粒

pET-28a 转化菌株 1192 ,1193 经多次试验均得不到转化子 ;pET-28a 转化菌株 1567 ,1569 ,947 ,2198 的转化率比 *E. coli* JM109 低 10⁵ ~ 10⁶ 倍 ;质粒 pUC18 ,pKK223-3 转化菌株 947 的转化率分别是 pET-28a 转化的 10 倍和 5 倍 ;质粒 pUC18 ,pKK223-3 转化 2198 菌株的转化率分别是 pET-28a 转化的 10 倍和 5 倍 .

质粒稳定性实验结果见表 2 .从表 2 可以看出 ,同一菌株中不同质粒的稳定性不同 ,同一质粒在不同菌株中的稳定性也有一定差异 .在 *E. coli* JM109 中 pUC18 能稳定存在 ,不易发生丢失 ,pKK223-3 ,pET-28a 的稳定性其次 .相对而言 ,pET-28a 在所选的几株菌中的稳定性较差 ,转接 10 次以后 ,菌株 947 质粒保持率只有 70% .菌株 947(pUC18)在转接 4 次以后 ,点种到含有 Amp 的 LB 平板上能生长的菌株中有 5 个菌落生长较其他慢 ,转接 6 次以后 ,点种含有 Amp 的 LB 平板能够生长的菌株均生长微弱 .对于 947 菌株 ,根据以上结果可以采用 pKK223-3 作为载体构建重组质粒 .

表 2 质粒稳定性
Tab.2 Plasmid stability

转接次数	转 化 子						
	JM109 (pUC18)	JM109 (pKK223-3)	JM109 (pET-28a)	947 (pUC18)	947 (pKK223-3)	947 (pET-28a)	1569 (pET-28a)
2	100	100	96	100	100	96	100
4	100	100	100	100	100	92	100
6	100	100	98	86	100	92	94
8	100	100	100	86	100	88	92
10	100	98	94	82	100	70	84

3 讨 论

研究发现有些野生型菌株无法实现转化,这与文献报道相一致^[7].这是由于野生型菌株自身的限制修饰系统的作用,在限制性内切酶的作用下将外源 DNA 降解所致.如果外源 DNA 没有被完全降解,残留的 DNA 在复制时会受到 DNA 甲基化酶的修饰作用而不会再被降解^[11],因此有些野生型菌株能够实现转化,但同样条件下的转化率明显低于限制修饰系统缺陷的工程菌.在质粒的传代稳定性研究中,菌株 947(pUC18)出现微弱的生长现象.分析其原因,可能是由于质粒拷贝数下降,使得菌株对

抗生素的抗性降低,并且这种保持低拷贝质粒的菌株在生长过程中占优势.

肠道细菌由于其底物利用范围广,能有效利用运动发酵单胞菌和酿酒酵母所不能利用的五碳糖,而作为基因工程宿主菌被广泛研究应用.但是,不同的肠道细菌利用木糖的能力存在很大差异.研究中筛选得到的能高效利用木糖的菌株,经鉴定多数为肺炎克雷伯氏杆菌,其利用多种碳源的能力均比大肠杆菌强,且产酸少.由于肺炎克雷伯氏杆菌的乙醇耐受性较其他肠道细菌强^[12],所以上述筛选到的菌种为进一步构建产乙醇基因工程菌打下了基础.

参考文献:

- [1] Sheehan J, Himmel M. Enzymes, energy, and the environment: a strategic perspective on the U. S. department of energy's research and development activities for bioethanol[J]. *Biotechnol Prog*, 1999, 15: 817 - 827.
- [2] Ingram L O, Aldrich H C, Borges A C C, et al. Enteric bacterial catalysts for fuel ethanol production[J]. *Biotechnol Prog*, 1999, 15: 855 - 866.
- [3] Zhang M, Eddy CH, Deabda K, et al. Metabolic engineering of a pentose metabolism pathway in ethanologenic *Zymomonas mobilis*[J]. *Science*, 1995, 267: 240 - 243.
- [4] Ingram L O, Conway T, Clark D P, et al. Genetic engineering of ethanol production in *Escherichia coli*[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1987: 2420 - 2425.
- [5] Ohta K, Beall D S, Merjia J P, et al. Genetic improvement of *Escherichia coli* for ethanol production: chromosomal integration of *Zymomonas mobilis* genes encoding pyruvate decarboxylase and alcohol dehydrogenase II[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1991: 893 - 900.
- [6] Doran J B, Ingram L O. Fermentation of crystalline cellulose to ethanol by *Klebsiella oxytoca* containing chromosomally integrated *Zymomonas mobilis* genes[J]. *Biotechnol Prog*, 1993, 9: 533 - 538.
- [7] Alterthum F, Ingram L O. Efficient ethanol production from glucose, lactose, and xylose by recombinant *Escherichia coli*[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1989: 1943 - 1948.
- [8] 何晓青. 卫生防疫细菌检验——兼论医学细菌分类学基础[M]. 北京: 新华出版社, 1989.
- [9] Williams, Wilkins. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Volume I[M]. USA, 1984.
- [10] Dien B S, Nichols N N, Patricia J O 'B, et al. Development of new ethanologenic *Escherichia coli* strains for fermentation of lignocellulosic biomass[J]. *Appl Biochem Biotechnol* 2000, 84 - 86: 181 - 196.
- [11] 郝福英, 朱玉贤, 朱圣庚, 等. 分子生物学实验技术[M]. 北京: 北京大学出版社, 1998.
- [12] Bräu B, Sahm H. Cloning and expression of the structural gene for pyruvate decarboxylase of *Zymomonas mobilis* in *Escherichia coli*[J]. *Arch Microbiol*, 1986, 144: 296 - 301.