

研究论文

基于 λ 噬菌体裂解基因表达的 PHB分离新工艺

于慧敏 史悦 孙旭东 罗晖 沈忠耀
(清华大学化学工程系, 北京 100084)

摘要 将S基因琥珀突变的 λ 噬菌体裂解基因(S^-RRz)引入产聚 β 羟基丁酸酯(PHB)的重组大肠杆菌VG1(pTU14)中以实现细胞的可控裂解破壁。采用EDTA/Tris(pH值8.0)缓冲液处理结果表明, S^-RRz 在VG1(pTU14)中能够成功表达,且EDTA对细胞裂解的决定性作用是由于它模拟了S基因产物的功能。当细胞内PHB含量为85%~90%时,大量积累的PHB颗粒可以改变细胞膜的通透性,实现重组细胞的自控自裂解。对PHB与细胞进行直接分离的后处理工艺研究表明,在 S^-RRz 成功表达的基础上,采用升温处理模拟S基因产物的功能诱导细胞自裂解,PHB产品纯度可以达到95%以上。

关键词 λ 噬菌体裂解基因 聚 β 羟基丁酸酯 细胞可控裂解

中图分类号 TQ 929

文献标识码 A

文章编号 0438-1157(2004)04-0623-06

NEW TECHNIQUE FOR RECOVERY OF PHB FROM RECOMBINANT *Escherichia coli* BASED ON EXPRESSION OF LYTIC GENES OF PHAGE λ WITH S AMBER MUTATION

YU Huimin, SHI Yue, SUN Xudong, LUO Hui and SHEN Zhongyao

(Department of Chemical Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract The lytic genes of phage λ with S amber mutation (S^-RRz) were introduced into the recombinant *E. coli* VG1 (pTU14) producing poly- β -hydroxybutyrate (PHB) to attain controllable lysis of cells. The results of EDTA/Tris (pH8.0) buffer treatment showed that S^-RRz were successfully expressed in VG1 (pTU14), and cell lysis was realized due to the action of EDTA on cytoplasm membrane. Here the function of EDTA was similar to that of S gene product. When PHB content was 85%—90%, membrane permeability would be increased by the abundantly accumulated in-cell PHB granules, and then the autolysis of recombinant cells occurred. After studies on different projects for direct separation of PHB from fermentation broth, a new technique, in which temperature treatment was introduced to simulate the function of S gene product, was presented, and the autolysis of cells was then easily realized based on the successful expression of S^-RRz . By this simple technique, the final purity of PHB product could be up to 95%.

Keywords lytic genes of phage λ with S amber mutation (S^-RRz), poly- β -hydroxybutyrate (PHB), controllable lysis of cells

2002-12-28 收到初稿, 2003-08-28 收到修改稿。

联系人及第一作者: 于慧敏, 女, 30岁, 副教授, 博士。

基金项目: 国家“九五”攻关项目(No. 96-C03-03-02)、国家自然科学基金重点资助项目(No. 29834103)和国家自然科学基金资助项目(No. 29876021)。

Received date: 2002-12-28.

Corresponding author: Dr. YU Huimin. E-mail: yuhm@mail.tsinghua.edu.cn

Foundation item: supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 29834103, 29876021).

引 言

由于合成塑料制品很难在自然界中降解(长达 20~500 年以上),且废旧塑料的回收利用和运输处理的效率都很低,因此,以石油化工为基础的化学合成塑料在给人们带来便利的同时也带来了许多的问题^[1]。为此,具有生物可降解性、生物相容性、压电性等许多独特优点的聚 β -羟基丁酸酯 (poly- β -hydroxybutyrate, PHB) 开始受到人们的重视。

PHB 是一类由微生物合成的新型可降解高分子材料,它是微生物在不平衡的生长条件下储存于细胞内的能源物质,是一种胞内产物^[2, 3]。为了提取和纯化 PHB,必须先破碎细胞,将它从细胞内分离出来。细胞破碎的传统方法包括机械法和溶剂萃取法、化学试剂法、酶法等非机械法^[4]。其中,溶剂萃取法操作简单,不会对 PHB 分子产生降解,目前仍被大量采用,但成本高,且污染环境。化学试剂法是利用氢氧化钠等强碱、次氯酸钠等氧化剂、SDS 等表面活性剂或 EDTA 等螯合剂的作用,将细胞中的非 PHB 杂质转变成可溶性的成分而除去的方法,操作简单,破壁效果好,但会导致 PHB 分子不同程度的降解,有时也带来环境污染问题。酶法则是用酶(如蛋白裂解酶等)消化细胞中的杂质成分,使之降解成可溶于水的小分子而被除去的方法。酶法作用条件比较苛刻,分离过程比较复杂,因此也限制了广泛使用。机械破壁法一般只能作为一种预处理方法,使 PHB 颗粒从细胞中释放出来。

随着生物技术的日益成熟,利用基因工程技术——可控噬菌体破细胞壁的方法也发展了起来。该法可以归纳为两类,分别为:将噬菌体的 DNA 全部整合到宿主细胞的染色体上形成溶源菌,以及将噬菌体的裂解基因克隆到宿主菌中构建基因工程菌,其中后一种方法更为可行。与上述传统的破壁方法相比较,利用噬菌体破细胞壁的方法具有操作简单、条件温和、可方便控制细胞裂解等许多优点。它不需昂贵的设备,不需外源酶,避免了严重的环境污染和产品降解,因此近年来越来越受到人们的重视^[5~8]。

本课题组通过分子克隆已经成功构建了 PHB 合成基因 (*phbCAB*) 和 λ 噬菌体裂解基因 (*S⁻RRz*) 共表达的新质粒 pTU14 (Ap^+)^[9]。将质

粒导入携带透明颤菌血红蛋白基因 (*vgb*) 的宿主细胞 VG1 中,获得了同时表达 *vgb* 和 *S⁻RRz* 的产 PHB 菌株 VG1 (pTU14)^[9~11]。在对 VG1 (pTU14) 进行细胞培养的基础上,本研究进一步提出了基于 *S⁻RRz* 表达的 PHB 分离新工艺。

1 材料和方法

1.1 菌株、质粒、培养基与试剂

透明颤菌血红蛋白基因整合型宿主 VG1 由中国科学院上海生物工程中心杨胜利院士惠赠;质粒 pTU14 和重组 *E. coli* VG1 (pTU14) 由本所构建^[9];基因 *S⁻RRz* (如图 1) 为本课题组尹进博士从 *S* 基因琥珀突变的 λ 噬菌体 c I 857 sam7 (购自 Promega 公司) 中克隆获得^[4]。种子培养基和发酵培养基配方同文献 [12]。裂解缓冲液 Buffer A: 50 mmol \cdot L⁻¹ Tris, 2 mmol \cdot L⁻¹ EDTA, pH 值 8.0;裂解缓冲液 Buffer B: 50 mmol \cdot L⁻¹ Tris, pH 值 8.0。

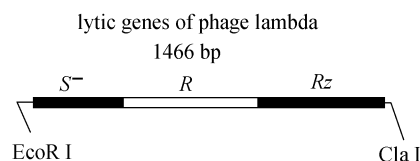


Fig. 1 Schematic gene map of lysis genes of phage λ with *S* amber mutation

1.2 实验方法

摇瓶实验:将收获的一批菌液按相同体积 (100 ml) 分装不同的摇瓶,在不同的处理工艺下进行后处理,分析处理后 PHB 产品的纯度,以考察不同后处理方法的作用效果。

发酵罐实验:上罐结束后,直接在发酵罐上按照不同的后处理工艺进行 PHB 产品的直接分离纯化。放出处理后的菌液离心,洗涤,烘干,称取部分产品进行 PHB 的纯度分析。

细胞裂解能力检测:将离心收获的细胞以 Buffer A 重悬,测定 OD₆₀₀ 值的变化,并分别利用细胞的结晶紫染色法 (电子显微镜) 或超薄切片电镜照相 (电子透射电镜) 考察细胞形态的变化。同时将收获的平行样细胞以 Buffer B 重悬,进行 EDTA 裂解处理的对比。

分析方法:菌体培养液浊度测定,采用分光光度法;菌浓测定,采用干重法;PHB 含量定量测定,采用硫酸降解法^[9]和气相色谱法^[13];细胞结

构分析, 采用超薄切片电镜照相机。

2 结果与讨论

2.1 S 基因产物功能类似物调控 VG1 (pTU14) 细胞的裂解

根据文献 [7] 的分析, λ 噬菌体裂解基因 (S^-RRz) 可以编码裂解细菌细胞壁的几种酶。其中, R 和 Rz 基因产物可以分解细胞壁的肽聚糖及切割肽聚糖寡糖间以及肽聚糖与胞壁外膜间的交联, S 基因产物则可以在细胞膜上形成多孔结构, 增大细胞膜的通透性。由于质粒 pTU14 在构建过程中破坏了 $lac I$ 基因的完整性, 使阻遏蛋白不能合成, 因此 S^-RRz 不需添加诱导剂异丙基硫代- β -D-半乳糖苷 (IPTG) 即可表达。此时若直接引入 S^-RRz 基因, 在细胞培养过程中裂解基因就会表达, 致使细胞在产品积累之前就破裂, 不能获得细胞的高密度培养及产品的高产量。为此, 本研究克隆了 S 基因琥珀突变 (UAG) 的裂解基因, 使 S 基因产物终止编码, 这样 R 和 Rz 基因产物就不能通过细胞膜, 到达细胞壁, 进而裂解细胞壁。要使细胞有效裂解, 需要用其他因素模拟 S 基因产物的功能, 改变细胞膜的通透性, 从而达到细胞可控裂解的目的。

细胞膜是一种动态结构, 它的通透性取决于细胞的生理状态。采用重金属盐、氯仿、乙二胺四乙酸二钠盐 (EDTA) 等化学试剂处理, 或加热、辐射、电流刺激及冻融等物理作用, 均可使细胞发生损伤, 使细胞的通透性增加, 破坏细胞膜的完整性^[14]。为此, 本文首先选用操作方便、用量少的 EDTA 缓冲液作为控制细胞裂解的化学试剂。

将优选菌株 VG1 (pTU14) 在 LBG 培养基 (Ap^+) 中进行 24 h 摇瓶培养, 收获后的细胞分别以 Buffer A 和 Buffer B 重悬处理, 平行测定菌悬液浊度的变化, 结果如图 2 所示。

由图可见, 当 VG1 (pTU14) 细胞以 Buffer A 重悬时, 菌悬液的 OD_{600} 值大幅度下降, 下降的原因是由于细胞的大量裂解, 说明 λ 噬菌体裂解基因在 VG1 (pTU14) 中能够成功表达。但若以 Buffer B 重悬 VG1 (pTU14) 细胞, OD_{600} 值变化却并不显著, 说明对细胞裂解起决定性作用的因素是 Buffer A 中的 EDTA。EDTA 诱导细胞裂解的机理是因为它可以与细胞膜上的 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 等相结合, 从而改变细胞膜的通透性, 进而使 R 和 Rz

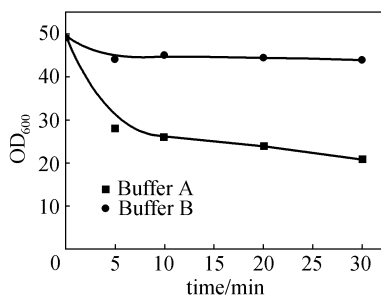


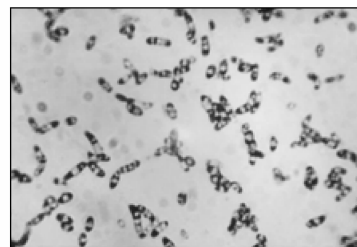
Fig. 2 Optical density changes of VG1 (pTU14) cells after treatment of Buffer A and Buffer B

的基因产物从细胞内渗透出来, 到达细胞壁, 产生裂解作用。因此, EDTA 的作用就相当于 S 基因产物功能类似物。

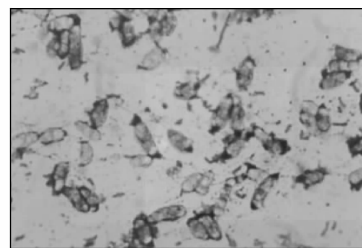
2.2 PHB 颗粒大量积累时 VG1 (pTU14) 细胞的自裂解

进一步研究表明, 在 VG1 (pTU14) 的培养过程中, 当细胞内逐渐积累的 PHB 的百分含量达到细胞干重的 85%~90% 时, 细胞不需 Buffer A 重悬处理, 就会出现自动裂解现象。

如图 3 所示, 培养过程中 VG1 (pTU14) 细胞的显微观察表明, 在 11 h 时, 细胞内的 PHB 颗粒少量积累; 到了 58 h, 细胞内的 PHB 大量积累, 细胞胀成椭圆形, 且相当一部分细胞产生了自裂解, 视野内观察到了很多裂解后的细胞碎片以及一些释放到胞外的 PHB 颗粒。



(a) 11 h

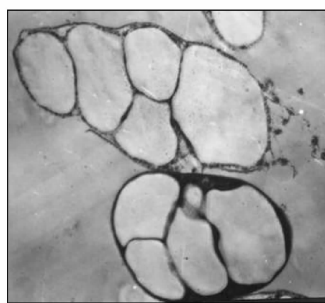


(b) 58 h

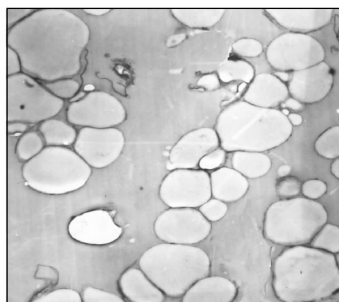
Fig. 3 Autolysis of VG1 (pTU14) cells in process of flask culture (amplification: 1600 \times)

分别收获 48 h 和 72 h 培养的 VG1 (pTU14) 细胞进行超薄切片电镜观察, 结果如图 4 所示。在

图 4 (a) 中, 可以分别看到细胞壁未裂解的细胞和正在裂解的细胞, 而在图 4 (b) 的视野中, 细胞已经完全裂解, PHB 颗粒被释放出来. 而细胞之所以发生自裂解破壁, 是由于 PHB 颗粒在细胞内的高水平积累, 增大了细胞膜的通透性. 在这里, 大量积累的 PHB 颗粒就相当于 S 基因产物的类似物. 由此推论, 在 VG1 (pTU14) 的高密度发酵培养过程中, 通过控制 PHB 在细胞内的积累水平, 就可以控制细胞的自裂解程度, 从而有望简化 PHB 的分离提取步骤.



(a) 48 h, 20000×



(b) 72 h, 5000×

Fig. 4 Cells of VG1 (pTU14) observed by transmission electron microscopy

2.3 PHB 与细胞直接分离的后处理方案的筛选

基于 S^-RRz 基因在 VG1 (pTU14) 细胞内的成功表达, 本研究提出了在发酵罐上直接进行细胞处理和 PHB 分离纯化的新思路, 以进一步简化 PHB 分离提取步骤, 降低 PHB 的分离回收成本. 核心思想就是对 S 基因产物的功能进行模拟.

尹进博士在应用几种化学试剂分离提取 PHB 的研究中提出, 氧化剂 (3% NaClO)、阴离子表面活性剂 ($10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ SDS) 和非离子表面活性剂 ($2.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ Triton X-100) 都对 PHB 的分离纯化具有较好的作用效果, 尤其是当 Triton X-100 与 NaClO 及 SDS 与 NaClO 相结合时, 作用效果更为明显^[4]. 在上述研究的基础上, 本文设计了如表 1 所列的 19 种后处理方案, 对比了 PHB 与细胞直接

分离的新工艺 (奇数方案) 和离心后再分离的原对照工艺 (偶数方案) 的处理效果, 并进一步提出了冻融和升温处理的新思路. 在室温、 $220 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 的摇床上对上述方案进行对比研究, 收获处理后的固相, 再次离心洗涤后烘干测定 PHB 产品纯度, 结果如表 1 所示. 其中, 各方案处理前的细胞内 PHB 的初始纯度均为 87.35%.

由表 1 可见, 当采用先离心洗涤再用化学试剂进行处理的后处理策略时, 方案 12 和方案 14 的效果最好, PHB 产品的纯度都可以达到 100%. 当使用 NaClO、SDS、Triton X-100 等不同的化学试剂对 VG1 (pTU14) 细胞进行 PHB 的直接分离处理时, 相对于离心洗涤后再进行 PHB 分离回收的方法, 其处理效果都较差, PHB 纯度的提高幅度普遍较低. 这是因为培养基中含有尚未消耗完全的碳源、有机氮源及无机盐离子等各种杂质, 因此, 采用化学试剂法 (以及酶法、溶剂萃取法) 都不能很好地实现 PHB 与杂质的分离.

进一步考察方案 17、方案 18 的处理效果可见, 发酵液直接进行冻融处理后, PHB 纯度可以提高到 100% 左右, 高于方案 18 的处理效果, 说明细胞与发酵液直接进行冻融处理的方式更有利于冰晶的形成和细胞的破壁效果. 然而, 在大规模的工业生产中, 对发酵液直接进行冻融处理需要消耗大量的能量, 因此, 冻融法只适合在实验室中使用.

由方案 5 和方案 6, 即用 EDTA-Tris 缓冲液处理细胞的实验结果可以发现, 当 EDTA-Tris 作用于离心洗涤后的菌泥时效果较好, PHB 产品纯度从 87% 提高到了 98%; 然而, 该方法不能用于 PHB 与细胞的直接分离, 此时 PHB 产品纯度只从 87% 提高到 92%.

在方案 19, 即发酵液在调节 pH 值后直接进行升温处理的实验中, 可以发现 PHB 产品的纯度有一定程度的提高, 说明温度的改变增大了细胞膜的通透性, 从而使 λ 噬菌体裂解基因的破壁作用能够体现. 考虑到在工业生产中的易实现性, 本研究选择加热处理来进行 PHB 与细胞直接分离的进一步研究.

2.4 基于裂解基因表达的发酵液升温处理

对发酵液直接进行升温处理, 在大规模生产中极易实现. 因此, 应用发酵液直接升温处理的策略来实现 PHB 分离纯化的研究思路应该具有可行性.

Table 1 Projects and results of PHB recovery

No.	Contents	PHB purity after treatment/%	Purity increase/%
1	3% NaClO, 15 min	96.78	9.43
2	centrifugation and wash; re-suspension; 3% NaClO, 15 min	100.2	12.85
3	10 g · L ⁻¹ SDS, 15 min	87.23	0
4	centrifugation and wash; re-suspension; 10 g · L ⁻¹ SDS, 15 min	92.92	5.57
5	2 mmol · L ⁻¹ EDTA + 50 mmol · L ⁻¹ Tris, 15 min	91.99	4.64
6	centrifugation and wash; re-suspension; 2 mmol · L ⁻¹ EDTA + 50 mmol · L ⁻¹ Tris, 15 min	96.72	9.37
7	2 mmol · L ⁻¹ EDTA + 50 mmol · L ⁻¹ Tris, 10 min; 3% NaClO, 5 min	90.4	3.05
8	centrifugation and wash; re-suspension; 2 mmol · L ⁻¹ EDTA + 50 mmol · L ⁻¹ Tris, 10 min; 3% NaClO, 5 min	92.66	5.31
9	0.5 g · L ⁻¹ Triton X-100, 10 min; 3% NaClO, 5 min	94.54	7.19
10	centrifugation and wash; re-suspension; 0.5 g · L ⁻¹ Triton X-100, 10 min; 3% NaClO, 5 min	94.4	7.05
11	2.5 g · L ⁻¹ Triton X-100, 10 min; 3% NaClO, 5 min	91.88	4.53
12	centrifugation and wash; re-suspension; 2.5 g · L ⁻¹ Triton X-100, 10 min; 3% NaClO, 5 min	100.2	12.85
13	1.0 g · L ⁻¹ SDS, 10 min; 3% NaClO, 5 min	94.14	6.79
14	centrifugation and wash; re-suspension; 1.0 g · L ⁻¹ SDS, 10 min; 3% NaClO, 5 min	100.2	12.85
15	5.0 g · L ⁻¹ SDS, 10 min; 3% NaClO, 5 min	91.14	3.79
16	centrifugation and wash; re-suspension; 5.0 g · L ⁻¹ SDS, 10 min; 3% NaClO, 5 min	99.1	11.75
17	frozen and thawed; shaking, 30 min	100.1	12.75
18	centrifugation and wash; frozen and thawed; re-suspension; shaking, 30 min	98.0	10.65
19	adjusting pH10.0; increasing temperature to 42 °C, 3 min; decreasing back to 37 °C; shaking, 30 min	92.6	5.25

细菌的细胞膜是一种动态结构, 其构造细节和通透性均随环境的变化而改变. 在一定温度下, 细胞膜会出现一种相变, 在这种相变中, 膜的厚度减少, 但面积增加, 此时膜对离子和分子的通透性增加. 有研究表明, 大肠杆菌细胞膜的相变温度约为 42~50 °C^[14].

为此, 在上罐发酵结束后, 首先调节发酵液的 pH 值到 10.0, 再分别将罐温提高到 42、45 和 50 °C, 保持 60 min, 收获细胞, 洗涤烘干后测定发酵罐升温前后的样品中的 PHB 百分含量, 得到如表 2 所示的结果.

Table 2 Effect of temperature-inducing treatment to cell lysis and PHB purity

Experiments	PHB content before lysis/%	Lysis temperature/°C	PHB purity /%
1	89.71	42	95.26
2	90.90	45	96.65
3	92.03	50	98.79

由表可见, 当在调节发酵液 pH 值的基础上再进行升温处理时, 42~50 °C 之间的处理温度均有

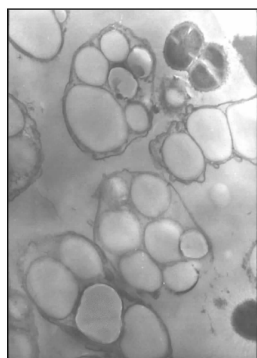
较好的 PHB 分离纯化效果. 此外, 当发酵液温度升高到 42~50 °C 后, 仅保持 3 min, 再降回 37 °C 温育 60 min, 可以得到类似的结果. 说明采用升温处理模拟 S 基因产物的功能具有较好的效果. 如图 5 所示, 当 VG1 (pTU14) 细胞进行升温处理后, 细胞发生裂解现象, 白色的 PHB 颗粒被释放出来.

2.5 基于 λ 噬菌体裂解基因表达的 PHB 分离新工艺

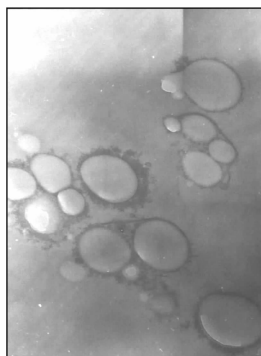
根据上述讨论, 提出如下基于 λ 噬菌体裂解基因表达的 PHB 分离新工艺:

(1) 在发酵后期, 首先通过 PHB 颗粒在细胞内部的大量积累诱发重组细胞的自裂解; (2) 在发酵结束时, 调节发酵液 pH 值约 10.0 后直接进行 42~50 °C 升温处理, 保持 3 min, 降回 37 °C 温育 60 min, 进一步诱导细胞裂解; (3) 离心收获细胞, 洗涤 2 次后烘干, 收获 PHB 产品. 在该工艺条件下, PHB 产品纯度可以达到 95% 以上.

综上所述, 在今后的 PHB 大规模生产中, 基于 λ 噬菌体裂解基因的成功引入, 可以直接采用提



(a) before treatment, 10000 ×



(b) after treatment, 10000 ×

Fig. 5 Cells of VG1 (pTU14) observed by transmission electron microscopy before and after temperature-inducing treatment

高罐温的方法,对重组菌 VG1 (pTU14) 进行简单的后处理,分离 PHB 产品.若要进一步获得高纯度的 PHB 产品,则可选用少量的 SDS 继续进行纯化.

3 结 论

由于 λ 噬菌体裂解基因在细胞内的成功表达,重组大肠杆菌 VG1 (pTU14) 具有可控裂解破壁的独特优点.采用含有 EDTA 的缓冲液处理细胞,改变细胞膜的通透性,可以对重组细胞的裂解程度进行外部调控.细胞内大量积累的 PHB 颗粒同样会增大细胞膜的通透性,诱发细胞的自裂解,因此控制细胞内 PHB 的积累水平即可间接控制细胞的自裂解程度.在调节发酵液 pH 值为 10.0 的基础上进行简单的升温处理,在 42~50 °C 的处理温度下,收获的 PHB 产品纯度可以达到 95% 以上.因此,在 λ 噬菌体裂解基因表达的基础上,通过 PHB 颗粒内积累和外升温处理双重措施共同模拟 S 基因产物的功能,可以成功地裂解重组细胞,获

得 PHB 产品,实现 PHB 与细胞直接分离的新工艺,从而大大简化 PHB 产品的分离回收步骤,降低 PHB 的生产成本.

References

- Huang J C, Shetty A S, Wang M S. Biodegradable Plastics: a Review. *Adv. Polymer Technol.*, 1990, **10** (1): 23—30
- Fidler S, Dennis D. Polyhydroxyalkanoate Production in Recombinant *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Rev.*, 1992, **103**: 231—236
- Lee S Y. Plastic Bacteria? Progress and Prospects for Polyhydroxyalkanoate Production in Bacteria. *Trends in Biotechnol.*, 1996, **14**: 431—438
- Yin Jin (尹进). Recovery of Poly- β -hydroxybutyrate from the Recombinant *Escherichia coli*: [dissertation] (学位论文). Beijing: Tsinghua University, 1998
- Dabora R L, Cooney C L. Intracellular Lytic Enzyme Systems and Their Use for Disruption of *E. coli*. *Adv. Biochem. Eng. / Biotech.*, 1990, **43**: 11—30
- Zagotta M T, Wilson D B. Oligomerization of the Bacteriophage Lambda S Protein in the Inner Membrane of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 1990, **172** (2): 912—921
- Garrett J, Fusselman R, Hise J, Chiou L, Smith-Grillo D, Schulz J, Young R. Cell Lysis by Induction of Cloned Lambda Lysis Genes. *Mol. Gen. Genet.*, 1981, **182**: 326—331
- Crabtree S, Cronan J E. Facile and Gentle Method for Quantitative Lysis of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.*, 1984, **158** (1): 354—356
- Yu H M, Yin J, Li H Q, Yang S L, Shen Z Y. Construction and Selection of the Novel Recombinant *Escherichia coli* Strain for Poly(β -hydroxybutyrate) Production. *J. Biosci. Bioeng.*, 2000, **89** (4): 307—311
- Yu H M, Shi Y, Zhang Y P, Yang S L, Shen Z Y. Effect of *Vitreoscilla* Hemoglobin Biosynthesis in *Escherichia coli* on Production of Poly (β -hydroxybutyrate) and Fermentative Parameters. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2002, **214**: 223—227
- Yu H M, Shi Y, Yin J, Shen Z Y, Yang S L. Simultaneous Expression of *Vitreoscilla* Globin Gene and Lytic Genes of Phage λ in a Novel Recombinant *Escherichia coli* Used for Production of PHB. *Chinese J. Chem. Eng.*, 2001, **9**: 407—411
- Yu Huimin (于慧敏), Zhang Yanping (张延平), Shi Yue (史悦), Yang Shengli (杨胜利), Shen Zhongyao (沈忠耀). Production of Poly- β -hydroxybutyrate by Fed-batch Culture of Novel Recombinant *Escherichia coli* VG1 (pTU14). *J. Chem. Ind. Eng. (China)* (化工学报), 2002, **53** (7): 742—746
- Wu G F, Wu Q Y, Shen Z Y. Accumulation of Poly- β -hydroxybutyrate in Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803. *Bioresource Technol.*, 2001, **76**: 85—90
- Jase A C. Cell Physiology (细胞生理学). Gao Tianli (高天礼), trans. Beijing: Science Press, 1984. 389—444