

富养罗尔斯通氏菌菌株 PHB“泄漏” 机理的初探

刘双江

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

摘 要 建立了一种分离纯化聚羟基丁酸(Polyhydroxybutyrate, PHB)颗粒的改良方法。采用这种方法从 *Ralstonia eutropha* 菌株 H16(野生型)、SK1489(Tn5 诱变的 PHB 泄漏菌株)、JMP222(野生的 PHB 泄漏菌株)分离了 PHB 颗粒。进一步比较研究了不同菌株的 PHB 解聚酶和 3-羟基丁酸脱氢酶的活性。研究结果表明,菌株 SK1489 的 PHB 解聚酶活性(48h 培养后达 1.82 U/mg)明显高于野生型菌株 H16(48 h 培养后达 0.37 U/mg),菌株 JMP222 的 3-羟基丁酸脱氢酶活性(培养 96 h 后达 165.9 U/mg)比菌株 H16 培养(96 h 后达 64.0 U/mg)高许多。这些结果显示,不同菌株 PHB 的泄漏有不同的原因,突变株 SK1489 导致 PHB 泄漏的原因是解聚酶活性高,而野生型 JMP222 PHB 泄漏的原因主要是 3-羟基丁酸脱氢酶活性高。

关键词 聚羟基烷酸, PHB 解聚酶, 3-羟基丁酸脱氢酶, 富养罗尔斯通氏菌

中图分类号 Q935 **文献标识码** A **文章编号** 1001-6209(2004)01-0111-04

聚羟基丁酸是许多细菌在碳源过剩条件下合成的一种生物多聚酯,贮存于细胞内,当碳源贫乏时可以被重新分解作为细胞生长的碳源和能源^[1]。由于聚羟基丁酸(Polyhydroxybutyrate, PHB)及其它类似物(聚羟基烷酸, Polyhydroxyalkanoates, PHAs)具有生物相容性和生物降解性,它们作为新材料在医学、食品、农业等有重要的应用前景。过去几十年对 PHB、PHAs 的微生物合成途径及机理进行了大量的研究^[2],而对于这类生物大分子在细胞内代谢的另一个方面,即在碳源贫乏时细胞是如何分解利用 PHAs 的研究却关注很少^[3]。

胞内 PHB 解聚酶和 3-羟基丁酸(3-HB)脱氢酶是 PHB 分解代谢过程中十分关键的两个酶^[4-6],前者负责把 PHB 降解为 3-HB 单体或寡聚体,后者把 3-HB 脱氢转化为乙酰乙酸,进入三羧酸循环(图 1)。在过去克隆富养罗尔斯通氏菌(*Ralstonia eutropha*)的 PHB 合成酶基因过程中, Tn5 诱变获得了一株 PHB 积累能力明显降低的突变株,当时称之为 PHB 泄漏株(PHB-leaky mutant)^[7]。对该菌株的遗传学研究表明,该菌株 PHB 合成酶系统没有受到影响^[7]。有趣的是在自然界中也发现了表型为 PHB 泄漏的菌株(*R. eutropha* JMP222),曾经推测该菌株 PHB 泄漏的原因是与某种蛋白质因子相关,但缺乏明确的证据^[8]。本文通过比较 *R. eutropha* 不同菌株的胞内 PHB 解聚酶、3-羟基丁酸脱氢酶活性,从酶学水平阐明了聚羟基丁酸解聚酶和 3-羟基丁酸脱氢酶对菌株 PHB“泄漏”的影响。

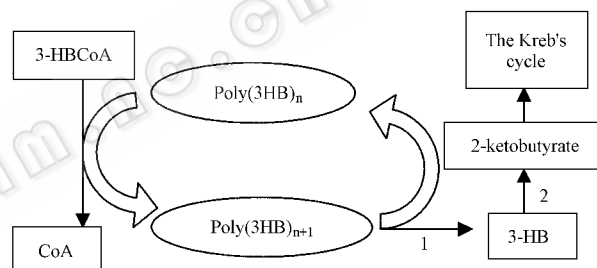


图 1 细胞内 PHB 合成与分解

Fig. 1 Intracellular catabolism and anabolism of PHB

1. Catalyzed by intracellular PHB depolymerase ;
2. Catalyzed by 3-hydroxybutyrate dehydrogenase .

1 材料和方法

1.1 菌种和培养条件

富养罗尔斯通氏菌(*Ralstonia eutropha*)菌株 H16(野生型)、JMP222(从自然环境中分离的 PHB 泄漏型)和 SK1489(由 Tn5 诱变获得的 PHB 泄漏型)为德国明斯特大学微生物研究所实验室储藏菌种。20 mL 的 NB 培养基(3 g Bacto 牛肉膏, 5 g Bacto 蛋白胨, 1 L 蒸馏水, pH 7.0~7.5)接种后, 30℃ 过夜培养, 之后转接到 200 mL 的 NB 培养基中, 培养 24 h 后收集细胞, 转移到 500 mL 的 MM1 培养基上(含 10 g 葡萄糖酸钠和 0.5 g NH₄Cl, 补水到 1 L, pH 7.0~7.5), 继续培养, 在设定的时间内取样(50 mL), 离心收集细胞, -20℃ 保存备

用。

1.2 PHB 颗粒的分离

约 0.5 g 湿细胞悬浮于 10 mL 缓冲液(0.5 mol/L 蔗糖, 5 mmol/L EDTA, 10 mmol/L Tris-HCl, pH 7.6)。加入 10 μg 溶菌酶, 37℃保温 1 h, 5000 r/min 离心 20 min(Minifuge RF, Heraeus, Germany)。弃上清液, 沉淀悬浮于 10 mL 的缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl 和 10 mmol/L MgCl₂, pH 7.6), 室温下缓慢震荡 1 h, 裂解原生质球, 同时加入微量 DNase I。裂解液轻轻加到甘油密度梯度(50% ~ 60% ~ 80% ~ 90%)离心管, 离心(10000 r/min, 1 h, 4℃), 收集 PHB 颗粒(位于 80% 甘油层)。用 10 倍体积蒸馏水洗涤一次, 保存在冰上, 备用。不能冷冻保藏。

1.3 酶活测定

取 0.5mL 上述颗粒悬浮液, 加入到 0.5mL 的 100mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 8.2)之中。30℃保温振荡 30 min, 离心取上清液测定 3-羟基丁酸产量。1 个酶活力单位定义为在上述条件下产生 1 μmol 的 3-羟基丁酸所需要的酶量。

3-羟基丁酸脱氢酶活性通过测定 3-羟基丁酸的减少而测定。反应总体积为 1.3 mL, 组成如下: 0.1 mL 的 0.1mol/L 的 3HB, 0.1mL 的 NAD/diaphorase(试剂盒提供), 0.3mL phosphate/triethanolamine (pH 8.6, 试剂盒提供), 0.8 mL 蒸馏水。加入 15 μL 无细胞提取液开始酶反应。无细胞提取液的制备如下: 0.1 g 湿细胞悬浮在 1.0 mL 的 100 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5) 超声波破碎 1 min, 13000 r/min 离心 10 min。取上清液用于酶活测定。

1.4 测定项目和和方法

细胞生长采用测定 600 nm 的光密度(OD₆₀₀)表示。细胞干重(CDW)采用恒重法。蛋白质浓度采用 Bradford 法测定^[10]。3-羟基丁酸含量的测定采用试剂盒进行(Boehringer Mannheim, Germany)。

2 结果和讨论

2.1 PHB 颗粒的分离及其降解性能

实验中发现, 胞内 PHB 解聚酶对 PHB 颗粒的物理状态有一定的要求, 不能以结晶或有机溶剂如氯仿抽提的 PHB 为底物。PHB 在细胞内以无定形颗粒状态存在, 颗粒上有 PHB 聚合酶、解聚酶和稳定其结构的蛋白质(Phasin)组成。这种无定形颗粒 PHB 也是胞内 PHB 解聚酶的天然底物。无定形 PHB 颗粒离开细胞容易变化, 变化后的 PHB 颗粒不能作为 PHB 解聚酶的底物^[11-12]。反复的高速离心、冻融、结晶、表面活性剂(如 SDS 处理是分离和贮存过程中导致 PHB 结构变化的主要原因。试验过程中还发现经过 French Press (10 000 Pa, 3 次) 或超声波(2 min, 60 循环) 破碎细胞后 PHB 颗粒同样失去了酶解性。经过多次试验, 我们选用溶菌酶处理细胞、低渗透压胀裂的方法破碎细胞, 然后用密度梯度离心收集 PHB 颗粒。采用这种方法制备的 PHB 颗粒很好地保

持了其在细胞内的状态, 是 PHB 解聚酶的良好底物, 容易被附着于表面的解聚酶降解, 降解率(降解的 PHB/初始 PHB) 高于 60%。

2.2 不同培养阶段菌株 H16、SK1489、JMP222 胞内 PHB 解聚酶活性、3-羟基丁酸脱氢酶活性及胞内 3-羟基丁酸含量

三菌株 H16, SK1489, JMP222 培养 48、72、96 h 后分离 PHB 颗粒, 并测定其 PHB 解聚酶活力结果显示(图 2)。三菌株在培养过程中 PHB 解聚酶活力表现出不同的特征。菌株 H16 在培养初期(48 h)解聚酶活力较低(此时培养基中碳源、氮源丰富) 细胞以 PHB 累积为主, 但随着培养过程的进行和营养的消耗, 解聚酶活性逐渐提高, 说明培养基中碳源开始匮乏, 细胞开始动用贮存的 PHB 做碳源供生理代谢的需要, 至培养 96h, 解聚酶活力提高了 10 倍, 同菌株 H16 形成明显对比的是菌株 SK1489 和 JMP222 在培养早期(48 h)PHB 解聚酶的活力就很高(分别为 1.82 和 1.03 U/mg)(图 2)。

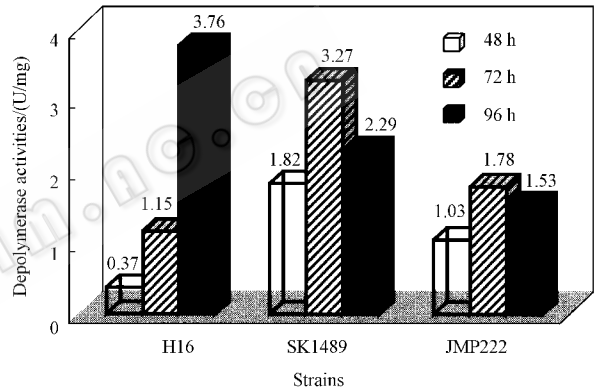


图 2 菌株 H16、SK1489、JMP222 胞内解聚酶在不同培养阶段的活性

Fig. 2 Intracellular depolymerase activities of strain H16, SK1489 and JMP222 at different cultivation stages

根据以上结果分析, 菌株 SK1489 和 JMP222 在培养初期解聚酶活力保持较高的水平, 尤其是菌株 SK1489, 培养 48h 解聚酶活力达到 1.82 U/mg, 是菌株 H16 的近 6 倍, 这无疑导致 PHB 在细胞内的快速降解, 其最终的结果是细胞积累 PHB 水平降低。由此可见, 胞内 PHB 解聚酶活力高是导致 PHB“ 泄漏 ”的原因之一。

在累积 PHB 的培养条件下, 菌株 H16、SK1489、JMP222 分别培养 48、72、96 h 后测定 3-羟基丁酸脱氢酶活力。试验结果(图 3)清楚表明, 菌株 H16 和 SK1489 的 3-羟基丁酸脱氢酶活力变化远不如菌株 JMP222 的变化大, 同培养 48h 相比, 培养 96h 菌株 JMP222 胞内 3-羟基丁酸脱氢酶活力提高 5 倍以上。3-羟基丁酸脱氢酶活力高低与胞内 3-羟基丁酸含量密切相关, 当 3-羟基丁酸脱氢酶活力高时, 胞内 3-羟基丁酸被很快转化, 使得胞内 3-羟基丁酸含量明显降低(表 1)。从以上分析可以看出, 3-羟基丁酸脱氢酶是导致 PHB“ 泄漏 ”的第二个重要原因。

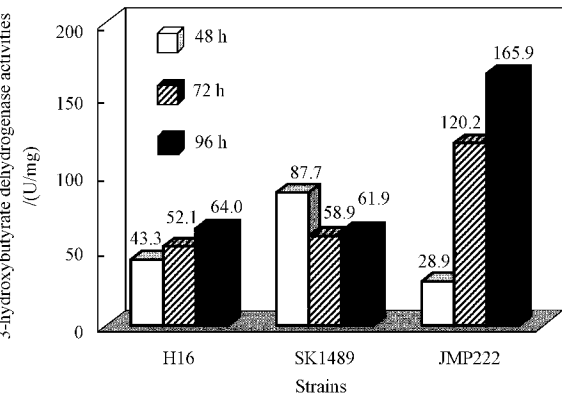


图 3 菌株 H16、SK1489、JMP222 培养过程中 3-羟基丁酸脱氢酶活性

Fig.3 Activities of 3-hydroxybutyrate dehydrogenase in strains H16, SK1489, and JMP222 during cultivation

表 1 培养 96h 后菌株 H16、SK1489 和 JMP222 细胞内 3-羟基丁酸含量

Table 1 3-hydroxybutyrate contents in cells of strains H16, SK1489, and JMP222 after 96 h cultivation

Strains	3-hydroxybutyrate(mg/g)
H16	2.1
SK1489	1.3
JMP222	0.8

3 结论

通过研究比较 *R. eutropha* 不同菌株的解聚酶和 3-羟基丁酸脱氢酶的活性,发现保留在颗粒上的高活性 PHB 解聚酶和细胞内的 3-羟基丁酸脱氢酶均可以导致菌株成为 PHB “泄漏”型。研究结果还表明,导致菌株 SK1489 和菌株 JMP222 呈 PHB“泄漏”型有不同的原因。突变菌株 SK1489 “泄漏”PHB 的原因是解聚酶活性高,而野生型 JMP222 的原因还有 3-羟基丁酸脱氢酶活性较高。

致谢 本文发表得到了中国科学院百人计划和院长青年创新基金经费的支持。研究工作主要在德国明斯特大学微生物研究所 A. Steinbuechel 教授的实验室完成,并得到了德国学术交流中心(DAAD)的支持。特此致谢！

参 考 文 献

[1] Doi Y, Segawa A, Kawaguchi Y, et al. Cyclic nature of poly(3-hydroxyalkanoate) metabolism in *Alcaligenes eutrophus*. *FEMS Microbiol Lett*, 1990, **67** :165 – 170.

[2] Madison L L, Huisman G W. Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): From DNA to plastic. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1999, **63** (1) :21 – 53.

[3] Jendrosseck D, Schirmer A, Schelegel H G. Biodegradation of poly-hydroxyalkanoic acids. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1996, **46** :451 – 463.

[4] Saito T, Takizawa K, Saegusa H. Intracellular poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase in *Alcaligenes eutrophus*. *Can J Microbiol*, 1994, **41** :187 – 191.

[5] Aneja P, Charkes T C. Poly-3-hydroxybutyrate degradation in *Rhizobium* (*Sinorhizobium*) *meliloti* : Isolation and characterization of a gene encoding 3-hydroxybutyrate dehydrogenase. *J Bacteriol*, 1999, **181** :849 – 857.

[6] Tal S, Smirnoff P, Okon Y. Purification and characterization of D- (-)-B-hydroxybutyrate dehydrogenase from *Azotobacter brasilense* Cd. *J Gen Microbiol*, 1990, **136** :645 – 649.

[7] Schubert P, Steinbüchel A, Schlegel H G. Cloning of the *Alcaligenes eutrophus* genes for synthesis of poly-β-hydroxybutyric acid (PHB) and synthesis of PHB in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 1988, **170** : 5837 – 5847.

[8] Pries A, Priefert H, Krüger N, et al. Identification and characterization of two *Alcaligenes eutrophus* gene loci relevant to the poly(β-hydroxybutyric acid)-leaky phenotype which exhibit homology to *pstH* and *pstI* of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 1991, **173** :5843 – 5853.

[9] Brandl H, Gross R A, Lenu R N, et al. *Pseudomonas oleovorans* as source of poly(β-hydroxyalkanoates) for potential applications as biodegradable polymers. *Appl Environ Microbiol*, 1988, **54** :1977 – 1982.

[10] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976, **72** :248 – 254.

[11] Griebel R J, Merrick J M. Metabolism of poly-β-hydroxybutyrate : effect of mild alkaline extraction on native poly-β-hydroxybutyrate granules. *J Bacteriol*, 1971, **108** :782 – 789.

[12] Merrick J M, Steger R, Dombroski D. Hydrolysis of native poly(hydroxybutyrate) granules (PHB), crystalline PHB, and artificial amorphous PHB granules by intracellular and extracellular depolymerases. *Int J Biol Macromol*, 1999, **25** :129 – 134.

Primary Analysis on the Poly(3-hydroxybutyrate)-leaky
Phenotypes of Different *Ralstonia eutropha* Strains

LIU Shuang-Jiang*

(Institute of Microbiology , Chinese Academy of Sciences , Beijing 100080 ,China)

Abstract :*Ralstonia eutropha* accumulates poly(3-hydroxybutyrate)(PHB) as intracellular carbon storage when carbon sources(e.g. gluconate) are in excess in culture medium. It catabolizes the accumulated PHB for energy and carbon when the medium is depleted of carbon sources. Intracellular PHB depolymerase and 3-hydroxybutyrate dehydrogenase catalyze the initial reactions of intracellular PHB catabolism. In this paper , a modified method for isolation of native PHB granules was established. Native PHB granules were isolated from cells of strains H16 , SK1489 , and JMP222. The activities of intracellular PHB depolymerase and of 3-hydroxybutyrate dehydrogenase were determined. Results indicated that the activity of intracellular PHB depolymerase of strain SK1489 was higher than that of strain H16 , and the activity of 3-hydroxybutyrate dehydrogenase of strain JMP222 was much higher than that of strain H16. Based on these results it is concluded that the PHB leaky phenotypes were attributed to the higher activities of intracellular PHB depolymerase and 3-hydroxybutyrate dehydrogenase for strains SK1489 and JMP222 , respectively.

Key words :Polyhydroxyalkanoate , PHB depolymerase , 3-hydroxybutyrate dehydrogenase , *Ralstonia eutropha*

Acknowledgement : The author is grateful to Prof. A. Steinbuechel of the Institute of Microbiology at the University of Muenster(Germany) and to DAAD for supporting this research.

* Corresponding author. Tel 86-10-62527118 ;Fax 862652317 ;E-mail :liusj@sun.im.ac.cn

Received date : 03-14-2003

《微生物学报》综述文章投稿说明

近一时期 ,我刊一些综述类来稿存在一些问题 ,主要表现为 :篇幅庞大 ,罗列文献 ,内容空泛 ,缺乏观点。为使此栏目更加新颖并更具可读性 ,特提出几点说明 ,欢迎大家根据要求 ,踊跃投稿 ,并提出你们对该栏目的建议和想法。

- 1.本刊主要刊登微型综述(Mini review) ,来稿字数最好控制在 5000 字以内(不包括参考文献)。
- 2.综述的选题要有新意 ,对读者及同行确有一定的启发作用和参考价值。
- 3.参考文献应控制在 40 篇以内 ,近 3 年发表的文献不少于 10 篇。
- 4.应结合文献扼要评述国内外学者在本领域的研究进展 ,不要泛泛罗列文献 ,只述不评。
- 5.应结合自己的研究工作 ,就该研究领域存在的问题和解决的途径提出自己的观点。
- 6.欢迎投送“能够反映国际研究热点、对学科发展有指导意义”的述评类文章。