

嗜水气单胞菌 WQ 中 PHBHH_x 的合成及其分子基础研究

甘智雄¹ 张 广² 莫晓燕¹ 陈国强² 吴 琼^{2*}

(¹ 西安交通大学生命科学与技术学院生物工程系 西安 710049)

(² 清华大学生物科学与技术系 北京 100084)

关键词 聚羟基脂肪酸酯 3-羟基丁酸与 3-羟基己酸共聚酯 嗜水气单胞菌 豚鼠气单胞菌

中图分类号: Q591 文献标识码: A 文章编号: 1001-6209(2003)06-0809-04

聚羟基脂肪酸酯(Polyhydroxyalkanoate, PHA)是一系列生物合成的高分子材料,其单体可由多种 3-羟基脂肪酸(3-hydroxyalkanoate, 3HA)构成^[1]。PHA 物理和机械性能的变化很大,从高脆性到弹性体,这跟它们的单体成分有很大关系^[2]。短链和中长链单体共聚的 PHA 比短链单体或中长链单体聚合得到的 PHA 有着更好的性能^[3]。在 1994 年,豚鼠气单胞菌(*Aeromonas caviae*) FA440 被发现能以偶数碳原子数脂肪酸或植物油作为碳源在体内积累 PHBHH_x^[4]其 PHA 生物合成基因被成功克隆^[5]。根据亚基数目和底物特异性,PHA 合成的关键酶,即 PHA 合酶或 PhaC,被分成了 3 种类型。*A. caviae* 的 PHA 合酶属于第 I 类 PHA 合酶^[6]。PHA 合酶的一些类型含有一些保守的基因序列,该特征可被用于克隆,特别是第 II 类 PHA 合酶^[7,8]。嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*) WQ 和 *A. hydrophila* 4AK4 是能够合成 PHBHH_x 的另外两种菌株,其中 *A. hydrophila* 4AK4 已被用作大规模生产 PHBHH_x。就目前来说,不管生长条件怎么改变,其合成的 PHBHH_x 中 3-羟基己酸单体(3-hydroxyhexanoate, 3HH_x)的含量始终在 12%~17% 之间变化^[9]。而 *A. hydrophila* WQ 合成的 PHBHH_x 中则含有 6%~14% 3HH_x。本论文研究了 *A. hydrophila* WQ 的 PHA 生物合成及其分子基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 菌株 WQ 从水中分离出来,经中国科学院微生物研究所鉴定,属于 *A. hydrophila* WQ。

1.1.2 培养基和菌的培养 矿物盐培养基组成:1.0g (NH₄)₂SO₄, 0.2g MgSO₄, 9.65g Na₂HPO₄·12H₂O, 2.65g KH₂PO₄, 1mL 微量元素溶液,去离子水定容至 1000mL。微量元素溶液组成:0.218g CoCl₂, 9.79g FeCl₃, 7.89g CaCl₂, 0.118g NiCl₂, 0.105g CrCl₃·6H₂O, 0.156g CuSO₄·5H₂O 和 0.1g ZnSO₄·7H₂O, 5 mol/L HCl 定容至 1000mL。将菌接种到含有 100mL 矿物盐培养基的 500mL 摇瓶中,在往复摇床(NBS, Series 25D, New Brunswick, USA)上 200r/min 培养。72h 后离心(5000g)收集菌体,将收集到的菌体冷冻干燥。

1.1.3 主要试剂和仪器 葡萄糖(Glucose)购于北京国华化学试剂厂分析纯有限公司,分析纯;月桂酸(Lauric acid)购于北京化工厂,分析纯;Taq 酶 TaKaRa 公司原装;T4 DNA 连接酶 Promega 原装;GFX PCR DNA 和胶回收纯化试剂盒 Amersham Pharmacia Biotech 原装;Mastercycler gradient PCR 仪 Eppendorf 公司。

1.2 PHA 分析方法

称取 20~30 mg 干细胞样品于酯化管中,加入适量氯仿及酯化液(纯甲醇中含 3%(V/V)的浓硫酸及 1g/L 癸酸作内标),加盖密封后高温下酯化数小时。冷却后加入少量蒸馏水,充分震荡后静置,待氯仿相

基金项目 国家自然科学基金(30170017, 20074020);清华大学 985 基金部分资助项目

* 通讯作者。Tel: 86-10-62771664; Fax: 86-10-62788784; E-mail: wuqiong@mail. tsinghua. edu. cn

作者简介:甘智雄(1976-)男,重庆人,硕士,主要从事微生物发酵的研究。E-mail: gzx98521@sina.com

收稿日期 2003-01-31, 修回日期 2003-08-23

与水相完全分层后,取下层氯仿相注入气相色谱仪(HP6890)中进行色谱分析^[10]。

1.3 DNA 操作和质粒构建

按照产品说明书,进行细菌染色体 DNA 提取,质粒的提取,限制性核酸内切酶的酶切以及琼脂糖凝胶电泳。通过使用 GFX PCR DNA 和胶回收纯化试剂盒(Amersham Pharmacia Biotech),将 DNA 酶切片段和 PCR 扩增产物片段进行纯化。

1.4 PCR 扩增和序列分析

根据已知的 *A. caviae pha* 基因序列设计引物。引物 5'-AAGGAAGCTTGCCGCATGAGCGACA-3'和 5'-GATTGGATCCGCCGTGCTTAAGG-3'用于进行 *Enoyl-CoA* 水合酶基因(*phaJ*)的扩增,扩增条件为:94℃ 1min,55℃ 2min,72℃ 1min,进行 30 个循环。ORF1-*phaC* DNA 片段通过引物 5'-ACGGGCCTTCTG-GTCGACTTCCAGGGATTGT-3'和 5'-GCAGTCTGAATAAGCTTCCAGCCTAT CAGCG-3'进行扩增,扩增条件为:94℃1min,60℃ 1min,72℃ 2min,进行 30 个循环。这两个扩增的 DNA 片段被克隆到 pGEM-T Easy 载体(Promega, USA)中,由上海博亚生物技术有限公司进行测序。克隆到的 DNA 序列及蛋白序列分析使用 ClustalW 软件进行。

2 结果

2.1 碳源对 *A. hydrophila* WQ 生长和积累 PHA 的影响

多种与 PHA 结构相关或不相关碳源被用于 *A. hydrophila* WQ 的培养,研究表明(表 1),*A. hydrophila* WQ 不能在柠檬酸钠、丁酸和辛酸钠等一些碳源上生长。葡萄糖、蔗糖和葡萄糖酸钠均可被细胞利用生长,但是当嗜水气单胞菌 WQ 在这些碳源上培养时,只有痕量的 PHA 能被检测到。月桂酸和油酸则是积累 PHBHHx 最合适碳源,PHBHHx 含量能达到约 50%,3HHx 在 PHBHHx 中的含量约占 5%~6%。

当月桂酸和葡萄糖用作混合碳源时,细胞生长和 PHA 的积累与葡萄糖浓度相关(表 2)。混合碳源中较低的葡萄糖浓度(1~5g/L)有利于获得较高的 3HHx 含量(6%~14%)。当葡萄糖浓度大于 10g/L 时,细胞生长被明显抑制。

表 1 *A. hydrophila* WQ 在多种碳源上的生长和积累 PHA 的情况

Carbon source	Concentration /(g/L)	CDW /(g/L)	PHA content / %	3HHx fraction / %
Glucose	10	0.77	Trace	ND
Sucrose	20	0.63	ND	-
Sodium gluconate	10	1.25	Trace	ND
Sodium citrate	10	NG	-	-
Butyric acid	4	NG	-	-
Sodium octanoate	4	NG	-	-
Lauric acid	10	2.24	49	5.9
Oleic acid	10	0.52	43.0	5.0

NG: No growth; ND: Not detected.

表 2 以 10 g/L 月桂酸和不同浓度的葡萄糖为碳源, *A. hydrophila* WQ 的生长和积累 PHA 的情况

c (Glucose) /(g/L)	CDW /(g/L)	PHA/CDW / %	HHx/PHA / %
0	2.24	49	5.9
1	2.19	59	6.3
3	2.58	68	12.8
5	2.27	42	14.3
10	0.87	3.5	ND
15	0.80	4.9	ND
20	0.80	3.6	ND

ND: Not detected.

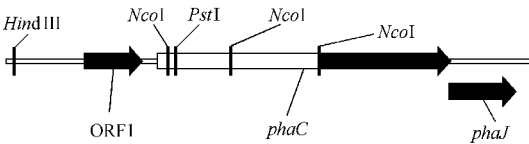


图 1 *A. hydrophila* WQ 的 PHA 生物合成基因图(2920 bp)

2.2 *A. hydrophila* WQ 的 PHA 生物合成基因的获得和序列同源性分析

A. hydrophila 4AK4、*A. hydrophila* WQ 和 *A. caviae* 是用来生产 PHBHHx 的 3 株菌,但 *A. hydrophila* WQ 与 *A. hydrophila* 4AK4 及 *A. caviae* 的合成行为有所差异。主要表现在 *A. hydrophila* WQ 在以月桂酸为单一碳源时合成的 PHBHHx 中 HHx 的含

量只有 6% 左右, 所以对比它们 PHA 合成的相关基因的异同是重要的。因此, 通过聚合酶链反应 (PCR) 的方法对 *A. hydrophila* WQ 的 PHA 生物合酶基因进行了克隆, 扩增得到的 DNA 片段经上海博亚生物技术有限公司测序。根据测序得到的 *phaJ* 基因的 N 末端重叠序列 (图 1) 将这两个片段连接到一起, 得到一个完整的序列, 该序列在 GenBank 中的编号为 AF468057。在克隆得到的 DNA 序列中, 可辨认出 1 个开放阅读框和两个基因序列, 即是 ORF1, *phaC* 和 *phaJ*。分析结果表明, *A. hydrophila* WQ 和 *A. caviae* 在 PHA 基因序列有着较高的同源性, ORF1, *phaC* 和 *phaJ* 的同源性分别为 100%、97% 和 97.5%。

3 讨论

对于 PHA 生物合成来说, *A. hydrophila* WQ 以长链脂肪酸为碳源更为合适, 葡萄糖、蔗糖或葡萄糖酸钠不能被利用来合成 PHA, 柠檬酸钠、丁酸或辛酸钠则不利于细胞生长 (表 1)。在 *A. hydrophila* WQ 的培养中, 葡萄糖对细胞生长和 PHA 积累有着明显的影响。低的葡萄糖浓度能为 PHA 的合成提供更多的前体, 从而得到更多量的 PHA 和提高 3HHx 的含量, 而高的葡萄糖浓度则抑制细胞生长和 PHA 的积累 (表 2)。该实验中, 葡萄糖能被用来调节 PHA 中 3HHx 组分的含量。*A. hydrophila* 4A4 生产得到的 PHBHHx 中 3HHx 含量为 12% ~ 17%^[9], 而 *A. hydrophila* WQ 生产得到的该共聚物中 3HHx 含量为 6% ~ 14% (表 1 和表 2)。这两株菌生产的 PHBHHx 组分含量的不同, 可能的原因在于 PHA 合酶或者 3-HA 前体生成途径的差异。然而, 考虑到这两株菌 PHA 合酶有着较高的相似性, 所以 PHA 合酶可能不是调节该共聚物组分含量的决定性因素, 那么提供 3-HA 前体的代谢途径则可能是决定 PHA 的组分含量的关键因素。

同 *A. caviae* 相比较, 这两株 *A. hydrophila* 的 *pha* 基因簇有着相同的 ORF1 基因, *phaC* 和 *phaJ* 有较高的同源性, 分别高达 97% 和 97.5%。这表明 *Aeromonas* 菌株具有基本相同的 PHA 生物合成基因序列。因此, 根据这种同源性, 套式 PCR 克隆方法是一种识别能合成 PHA 的气单胞菌的简便易行的方法^[7]。

根据底物特异性和亚基数目, *A. caviae* 的 PHA 合酶被认为是第 I 类 PHA 合酶^[6]。然而, *A. caviae* 的 PHA 合酶不仅聚合短链 3HA 前体, 也聚合中长链的 3HA 前体, 如 3HHx^[4]。此外, *A. caviae* 的 *pha* 基因簇含有烯酰辅酶 A 水合酶基因, 该基因将脂肪酸氧化途径和 PHA 的生物合成连接了起来^[11]。这种基因排列顺序与顺次含有 *phaA* 和 *phaB* 基因的 *Ralstonia eutropha* 中 *pha* 基因簇的排列是不同的。*A. hydrophila* 与 *A. caviae* 中 *pha* 基因簇排列的相似性提示了 *A. caviae* 和 *A. hydrophila* 的 PHA 合酶可被划分为 PHA 合酶的一种新的类型, 可被称为第 IV 类 PHA 合酶。这一基因类型的划分对发现 PHA 合酶基因簇的组织 and 发现其它 PHA 代谢途径中的相关基因是有帮助的。

总之, 研究表明了 *A. hydrophila* WQ 能合成不同 3HHx 含量的 PHBHHx。其生产的 PHA 的组分含量可通过前体合成途径进行调节。*A. caviae* 和 *A. hydrophila* 的 PHA 合酶可被划分为第 IV 类 PHA 合酶。

参 考 文 献

- [1] Anderson A J, Dawes E A. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiol Rev*, 1990, **54**: 450 ~ 472.
- [2] Lee S Y. Bacterial polyhydroxyalkanoates. *Biotech Bioeng*, 1996, **49**: 1 ~ 14.
- [3] Sudesh K, Abe H, Doi Y. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Prog Polym Sci*, 2000, **25**: 1503 ~ 1555.
- [4] Shimamura E, Kasuya K, Kobayashi G, et al. Physical properties and biodegradability of microbial poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate). *Macromolecules*, 1994, **27**: 878 ~ 880.
- [5] Fukui T, Doi Y. Cloning and analysis of the poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) biosynthesis genes of *Aeromonas caviae*. *J Bacteriol*, 1997, **179**(5): 4821 ~ 4830.
- [6] Steinbüchel A, Hein S. Biochemical and molecular basis of microbial synthesis of polyhydroxyalkanoates in microorganisms

Adv Biochem Eng , 2001 , **71** : 81 ~ 123.

- [7] Zhang G , Hang X , Green P , *et al* . PCR cloning of type II polyhydroxyalkanoates biosynthesis genes from two *Pseudomonas* strains. *FEMS Microbiol Lett* , 2001 , **198** : 165 ~ 170.
- [8] Hang X , Zhang G , Wang G , *et al* . PCR cloning of polyhydroxyalkanoate biosynthesis genes from *Burkholderia caryophylli* and their functional expression in recombinant *Escherichia coli* . *FEMS Microbiol Lett* , 2002 , **210** : 49 ~ 54.
- [9] Chen G Q , Zhang G , Park S J , *et al* . Industrial scale production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate). *Appl Microbiol Biotechnol* , 2001 , **57** : 50 ~ 55.
- [10] He W N , Tian W D , Zhang G , *et al* . Production of novel polyhydroxyalkanoates by *Pseudomonas stutzeri* 1317 from glucose and soybean oil. *FEMS Microbiol Lett* , 1998 , **169** : 45 ~ 49.
- [11] Fukui T , Shiomi N , Doi Y . Expression and characterization of (*R*)-specific enoyl coenzyme A hydratase involved in polyhydroxyalkanoate biosynthesis by *Aeromonas caviae* . *J Bacteriol* , 1998 , **180** : 667 ~ 673.

Synthesis of Copolyesters Consisting of 3-hydroxybutyrate and 3-hydroxyhexanoate by *Aeromonas hydrophila* WQ and its Molecular Basis

Gan Zhixiong¹ Zhang Guang² Mo Xiaoyan¹ Chen Guoqiang² Wu Qiong^{2*}

(¹ School of Life Science and Technology , Xi 'an Jiaotong University , Xi 'an 710049 , China)

(² Department of Biological Sciences and Biotechnology , Tsinghua University , Beijing 100084 , China)

Abstract : *Aeromonas hydrophila* WQ isolated from lake water was found to be able to synthesize polyhydroxyalkanoates (PHA) copolymer consisting of 3-hydroxybutyrate (HB) and 3-hydroxyhexanoate (HHx) (PHBHHx). Lauric acid was found to be the most suitable carbon source for cell growth and PHBHHx accumulation. The bacteria accumulated 49% PHBHHx containing 6% HHx in terms of cell dry weight when grown on lauric acid for 72 h. 42% PHBHHx consisting of 14% HHx was obtained with 5 g/L glucose and 10 g/L lauric acid as co-substrate. Higher glucose concentration greatly reduced the cell concentration and PHA content. The PHA biosynthesis genes from *A. hydrophila* WQ was successfully cloned using a two-step PCR cloning strategy based on PHA biosynthesis genes organization of *Aeromonas caviae* . *A. hydrophila* WQ and *A. caviae* shared high identities in the PHA gene loci , namely , ORF1 , *phaC* and *phaJ* had 100% , 97% and 97.5% identities respectively. PHA synthases of *A. caviae* and *A. hydrophila* were proposed to contain type IV PHA synthases which are different compared with type I PHA synthases on the substrate specificity and location arrangement of PHA metabolic genes.

Key words : Polyhydroxyalkanoates , PHA , PHBHHx , *Aeromonas hydrophila* , *Aeromonas caviae*

Foundation item : Chinese National Natural Science Foundation (30170017 , 20074020)

* Corresponding author. Tel : 86-10-62771664 ; Fax : 86-10-62788784 ; E-mail : wuqiong@mail.tsinghua.edu.cn

Received date : 01-28-2003