



一株降解 PET 单体对苯二甲酸的施氏假单胞菌的筛选和基因组分析

刘盼, 张彤, 郑义, 李庆宾, 梁泉峰, 祁庆生*

山东大学微生物技术研究院, 山东 青岛 266237

刘盼, 张彤, 郑义, 李庆宾, 梁泉峰, 祁庆生. 一株降解 PET 单体对苯二甲酸的施氏假单胞菌的筛选和基因组分析. 微生物学报, 2022, 62(1): 200–212.

Liu Pan, Zhang Tong, Zheng Yi, Li Qingbin, Liang Quanfeng, Qi Qingsheng. Screening and genome analysis of a *Pseudomonas stutzeri* that degrades PET monomer terephthalate. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(1): 200–212.

摘要: 【目的】筛选和鉴定能够降解聚对苯二甲酸乙二醇酯(PET)单体的微生物, 并分析代谢途径。【方法】从青岛小涧西固体废弃物综合处置厂采集样品, 以 PET 单体对苯二甲酸为唯一碳源筛选获得能够代谢对苯二甲酸的菌株 TPA3; 16S rRNA 序列分析确定 TPA3 菌株的分类地位; 采用二代和三代高通量测序技术进行基因组 *de novo* 测序和分析; 通过氨基酸序列比对分析 TPA3 菌株代谢对苯二甲酸和乙二醇的途径和基因; 验证 TPA3 菌株的可遗传操作性。【结果】TPA3 菌株被鉴定为施氏假单胞菌(*Pseudomonas stutzeri*); 它能够在 30 °C、220 r/min 培养条件下, 在 30 h 内消耗 10.60 g/L 对苯二甲酸; 经过驯化培养, 也能够代谢乙二醇; 其基因组由 1 条染色体和 3 个质粒组成, 总大小约为 4.55 Mb; 推测该菌株具有经典的对苯二甲酸代谢途径以及与 *Pseudomonas putida* KT2440 相似的乙二醇代谢途径; 采用假单胞菌遗传操作技术可对 TPA3 菌株进行遗传改造。【结论】TPA3 菌株能够降解 PET 单体对苯二甲酸和乙二醇, 并具有可遗传操作性, 在 PET 废物生物处理技术中具有潜在的应用价值。

关键词: 塑料污染; 聚对苯二甲酸乙二醇酯; *de novo* 测序; 代谢途径; 遗传操作技术

基金项目: 国家自然科学基金(31961133014); 国家重点研发计划(2019YFA0706900)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31961133014) and by the National Key Research and Development Program of China (2019YFA0706900)

*Corresponding author. Tel: +86-532-58632580; E-mail: qiqingsheng@sdu.edu.cn

Received: 22 March 2021; Revised: 15 May 2021; Published online: 31 May 2021

Screening and genome analysis of a *Pseudomonas stutzeri* that degrades PET monomer terephthalate

LIU Pan, ZHANG Tong, ZHENG Yi, LI Qingbin, LIANG Quanfeng, QI Qingsheng*

State Key Laboratory of Microbial Technology, Shandong University, Qingdao 266237, Shandong, China

Abstract: [Objective] To screen and identify microorganisms capable of metabolizing polyethylene terephthalate monomer terephthalate and analyze the catabolic pathways. [Methods] Collected samples from Qingdao Xiaojianxi solid waste comprehensive disposal plant and screened strains capable of metabolizing terephthalate using the medium with terephthalate as the sole carbon source; 16S rRNA phylogenetic tree analysis was used to determine the taxonomic status of TPA3 strain; *de novo* sequencing was implemented using the second-generation and the third-generation high-throughput sequencing technologies; the terephthalate and ethylene glycol catabolic pathways and the related genes of TPA3 were analyzed through amino acid sequence alignment; the genetic manipulability of TPA3 was verified by the reported genetic manipulative techniques. [Results] TPA3 was identified as *Pseudomonas stutzeri*; it can metabolize 10.60 g/L terephthalate within 30 hours at 30 °C. After culture and domestication, it could also catabolize ethylene glycol. The complete genome was composed of one chromosome and three plasmids for a total genome size of 4.55 Mb. It was speculated that TPA3 strain catabolized terephthalate in a classic way, and the ethylene glycol catabolic pathway should be similar to *Pseudomonas putida* KT2440. The genetic manipulation technology of *Pseudomonas* could be used for TPA3. [Conclusion] TPA3 strain could degrade polyethylene terephthalate monomers terephthalate and ethylene glycol, and could be genetically modified, showing potential application value in polyethylene terephthalate waste biological treatment technology.

Keywords: plastic pollution; polyethylene terephthalate; *de novo* sequencing; metabolic pathway; genetic manipulation technique

塑料污染成为日益严重的环境问题。聚对苯二甲酸乙二醇酯(PET)是最常用的塑料之一, 年需求量约 3 300 万 t^[1]。常用的塑料废物治理策略包括填埋、焚烧和回收, 分别具有浪费土地资源、易造成二次污染和回收成本高、难度大的缺点。

近年来, 利用微生物降解和回收 PET 的研究越来越引起人们的关注。作为一种聚酯型聚合物, PET 可以被一些角质酶和酯酶等微生物水解酶水解产生单体对苯二甲酸(TPA)和乙二醇(EG)^[2-4]。2016 年, 一种食用 PET 的细菌 *Ideonella sakaiensis* 被发现, 从中鉴定出 1 种偏好 PET 底物的水解酶 PETase^[5]。随后, 人们进

行了大量的酶工程研究, 以提高这些 PET 水解酶的催化效率^[6-8]。

PET 水解产物对苯二甲酸会抑制包括鱼类和藻类在内的水生生物的生长, 并对动物产生致畸和致突变作用。它们甚至可能通过食物链富集而损害人类健康^[9]。酸化和氧化是处理对苯二甲酸废水的常用方法, 但这些方法都存在成本高、易产生有毒中间体造成二次污染的局限性。因此, 除了优化 PET 水解酶, 开发能够降解和转化 PET 水解产物的微生物也至关重要。

能够降解对苯二甲酸的微生物主要包括丛毛单胞菌(*Comamonas*)、红球菌(*Rhodococcus*)

和假单胞菌(*Pseudomonas*)等^[10-12]。对苯二甲酸的代谢途径已经研究得比较清楚:首先通过对苯二甲酸双加氧酶(TPADO)催化产生 1,2-二羟基-3,5-环己二烯-1,4-二羧酸(DCD), DCD 进一步在脱氢酶 TphB 的作用下转化为原儿茶酸(PCA)进行代谢^[13-14]。其中 TPADO 由氧化酶大亚基(TphA2)、氧化酶小亚基(TphA3)和还原酶(TphA1) 3 个组件组成。TphA2A3BA1 的编码基因相邻,被称为 *tph* 基因簇,已经在 *Rhodococcus* sp. strain DK17^[12]、*Comamonas testosteroni* YZW-D^[10]和 *Comamonas* sp. strain E6^[13]中得到鉴定。上述途径的产物原儿茶酸是多种芳香化合物(如邻苯二甲酸、羟基苯甲酸以及木质素衍生的香草酸和阿魏酸)代谢途径中关键的中间代谢产物。在不同微生物中, PCA 可由 PCA 3,4-双加氧酶、PCA 4,5-双加氧酶或者 PCA 2,3-双加氧酶催化开环反应(cleavage),形成不同的代谢途径。*C. testosterone*、*C. thiooxydans* 和 *R. tataouinensis* 等 β 变形杆菌拥有 PCA 4,5-cleavage 途径^[15], *I. sakaiensis*、*Pseudomonas* 和 *R. opacus* 则拥有 PCA 3,4-cleavage 途径^[5], 而 *Paenibacillus* 则利用 PCA 2,3-cleavage 途径进行代谢^[16]。目前报道的 TPA 降解菌株利用 PCA 3,4-cleavage 途径或者 PCA 4,5-cleavage 途

径降解 PCA, 尚未有报道 TPA 降解菌株利用 PCA 2,3-cleavage 途径降解 PCA。

很多微生物能够转化乙二醇生成乙醛酸进行代谢。在 *Pseudomonas putida* KT2440 中, 乙二醇通过功能冗余的周质吡咯喹啉酮依赖的醇脱氢酶(PedE/H)和胞质醛脱氢酶(PedI/aldB)催化产生乙醇酸, 后者被乙醇酸氧化酶(GlcDEF)催化产生乙醛酸。乙醛酸可经不同的途径进入中心代谢途径^[17]。

本研究从青岛小涧西固体废弃物综合处置厂采集样品, 筛选出 1 株能够高效降解对苯二甲酸的菌株。经过驯化培养, 它也能够代谢乙二醇。通过 16S rRNA 基因序列比对, 将其归为施氏假单胞菌(*Pseudomonas stutzeri*)。通过全基因组 *de novo* 测序和分析, 预测了该菌株代谢对苯二甲酸和乙二醇的途径和相关基因。该菌株适用假单胞菌遗传操作技术, 具有改造转化 PET 水解产物合成高附加值化合物的潜力, 提供了一种生物技术处理 PET 废物循环经济的策略。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株和质粒

本研究用到的菌株和质粒如表 1 所示。

表 1 菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids

Strains and plasmids	Relevant properties	Sources
Strains		
<i>E. coli</i> DH5 α	F ⁻ <i>endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96deoRnupGΦ80 dlacZAM15Δ(lacZYA-argF)U169 hsdR17 (rK⁻ mK⁻)λ⁻</i>	Trans Gen
<i>P. stutzeri</i> TPA3	WT	This study
<i>P. stutzeri</i> TPA3- Δ tph	<i>P. stutzeri</i> TPA3 deleted <i>tphA2A3BA1</i>	This study
<i>P. stutzeri</i> TPA3::phbCAB	<i>P. stutzeri</i> TPA3 expressed <i>phbCAB</i>	This study
Plasmids		
pK18mobSacB	Allelic exchange vector, <i>oriColE1 Mob+</i> , <i>lacZα</i> , <i>sacB</i> , <i>Kana</i> (<i>r</i>)	Lab Stock
pBBR1MCS-2	<i>Kana</i> (<i>r</i>); broad host range; <i>lacPOZ</i> '	Lab Stock
pBHR68	pBluescript II SK ⁻ , <i>phbCAB</i> gene from <i>Ralstonia eutropha</i>	This study
pK18mobSacB- Δ tph	A pK18mobsacB derivative for deletion of <i>tphA2A3BA1</i> , <i>Kana</i> (<i>r</i>)	This study
pBBR68	Expression vector for <i>phbCAB</i> in <i>P. stutzeri</i> TPA3	This study

1.1.2 引物

本研究用到的引物如表 2 所示。

1.1.3 LB 培养基

10 g/L 蛋白胨、5 g/L 酵母粉、10 g/L NaCl。

1.1.4 无机盐培养基

1 g/L NH₄Cl, 1 g/L KH₂PO₄, 0.8 g/L K₂HPO₄·3H₂O, 0.05 g/L MgSO₄·7H₂O, 1.2 mL/L 金属离子混合液, 1 mL/L CaCl₂ 母液(5 g/L), 调 pH 至 7.0, 蒸馏水配制。金属离子混合液(g/L): 50 Na₂EDTA, 20 ZnSO₄·7H₂O, 1.61 CoCl₂·5H₂O, 5 MnCl₂·4H₂O, 5.5 CaCl₂, 1.0 (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O, 5.0 FeSO₄·7H₂O, 1.5 CuSO₄·5H₂O。

1.1.5 电转缓冲液(g/L)

0.238 4-羟乙基哌嗪乙磺酸(HEPES), 100 甘油, 102.6 蔗糖, 超纯水配置。

1.1.6 试剂和仪器

对苯二甲酸和乙二醇购自 Sigma 公司; 酵母粉和蛋白胨购自 OXOID 公司; 琼脂糖、卡那霉素和异丙基 β-D-1-硫代半乳糖吡喃糖苷(IPTG)购自 Solarbio 公司; 无缝组装预混液购自 ABclonal 公司; 基因组、质粒提取试剂盒和琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒(离心柱型)购自天根生化科技有限公司(TIANGEN); PCR 仪购自杭州博日科技有限公司; DYY-8C 电泳仪购自北京六一仪器厂; AB104-S 型电子分析天平购自瑞士梅特勒公司; 液相色谱仪、气相色谱仪购自日本岛津。

1.2 菌株筛选

从青岛小涧西固体废弃物综合处置厂采集填埋的塑料垃圾样品及周围土壤样品。取适量样品于 5 mL 无菌水中充分振荡, 制备菌悬液。将菌悬液适当稀释后, 接入含有 5 g/L 对苯二甲酸和 0.5 g/L 酵母粉的无机盐培养基中, 30 °C、220 r/min 条件下进行富集培养。取富集培养物在以对苯二甲酸为唯一碳源的培养基中进行传代培养。将传代的培养物在以对苯二甲酸为唯一碳源的固体培养基上连续划线, 分离得到单菌。将分离出的菌株用 20% 甘油于 -20 °C 保藏。

1.3 菌株鉴定

用天根基因组提取试剂盒提取基因组, 用 16S rRNA 基因通用引物 27F 和 1492R 进行扩增和测序。将测序得到的 TPA3 菌株的 16S rRNA 基因序列(GenBank 序列号: MW711720.1)在 NCBI 上进行 BLAST 分析, 确定菌属。下载其中不同菌种的 16S rRNA 基因序列, 使用 MEGA 软件, 采用 ClustalW 方法进行序列比对。根据比对结果, 采用 neighbor-joining 方法构建系统进化树^[18]。

1.4 细菌基因组 *de novo* 测序和分析

收集培养至对数初期的菌体, 送至华大基因科技有限公司进行基因组提取和测序。利用

表 2 本研究用到的引物

Table 2 Primers in this study

Primer names	Primer sequences (5'→3')
A2F	AATTCGAGCTCGGTACCCATGAACATTGTTACCGAC
A2R	ATCCTGCCAGCACCCCTTGGTACGTCATCCGAGAAG
A1F	CTTCTCGGATGACGTACCAAGGGGTGCTGGCAGGAT
A1R	TGCCTGCAGGTCGACTCTAGAGGATCCCCCTAGATTTT
68F	ATATCGAATTCCTGCAGCCCGGGCAAGTACCTTGCCGACA
68R	CTAGAACTAGTGGATCCCCCTTCTGAATCCATGACCAGC
27F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG
1492R	GGTTACCTTGTTACGACTT

Qubit 荧光定量仪检测 DNA 样品的浓度,用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 样品的完整性。检测合格的样品方可用于文库制备。分别用华大基因 DNBSEQ 平台和牛津 Nanopore 平台进行基因组测序。对各测序平台的原始下机数据进行低质量过滤,获得 clean data 用于基因组组装。获得组装序列后,对基因组中各功能元件和编码基因进行预测,并对预测的基因进行数据库比对注释,通过序列相似性给予各基因功能及描述信息。

1.5 假单胞菌感受态的制备和电转化

用 50 mL LB 液体培养基培养菌体至对数初期,立即冰浴 10 min。然后 4 °C、5 000 r/min 离心 10 min 收集菌体,用预冷的电转缓冲液洗涤菌体 2 次,最后用 600 μ L 电转缓冲液重悬,制备成电转感受态,140 μ L/管分装。每管感受态加 5–10 μ L 质粒(浓度约 100 ng/ μ L)进行电转,电转化条件为:1.2 kV/mm、200 Ω 、25 μ F。电转后加入 900 μ L LB 培养基,恢复培养 45 min,涂布添加相应抗生素的 LB 固体平板。

1.6 *tphA2A3BA1* 基因敲除

以 TPA3 菌株基因组为模板,分别用引物对 A1F/R 和 A2F/R 扩增出 *tph* 基因簇两端各 500 bp 同源臂,通过重组 PCR 获得 1 000 bp 重组片段 Δ *tph*,构建自杀质粒 pK18mobSacB- Δ *tph* 用于基因敲除。经过 2 次同源重组,删除 *tph* 基因簇中间约 2 745 bp 的碱基,达到失活基因的目的。

1.7 表达外源基因 *phbCAB*

以实验室保藏的 pBHR68 质粒为模板,用引物对 68F/R 扩增来源于真氧产碱杆菌 (*Ralstonia eutropha*)的 *phbCAB* 基因^[19],构建至广宿主表达载体 pBBR1MCS-2 中得到 pBBR68 质粒。将 pBBR68 电转化至 TPA3 菌株中进行诱导表达。

1.8 底物和产物的检测

采用高效液相色谱法(HPLC)定量检测对苯

二甲酸和乙二醇。取培养液 1 mL,13 400 r/min 离心 5 min,保留上清。用 0.22 μ m 滤膜过滤后进行 HPLC 检测。对苯二甲酸采用岛津 C₁₈ 色谱柱和紫外检测器(240 nm)检测。流动相为含 1% 三氟乙酸和 20% 乙腈的水溶液,流速为 0.5 mL/min,柱温为 40 °C;乙二醇采用 Aminex HPX-87H 离子交换柱和示差折光检测器检测,流动相为 5 mmol/L H₂SO₄,流速为 0.6 mL/min,柱温为 65 °C;聚羟基丁酸酯(PHB)采用气相色谱法检测。称取 10–20 mg 冻干菌体于反应瓶中,依次加入 150 μ L 浓硫酸、850 μ L 甲醇和 1 mL 三氯甲烷,扭紧瓶盖后于 100 °C 油浴反应 1 h,向反应瓶中加入 1 mL 蒸馏水,剧烈混匀后静置分层。分层后吸取下层有机相进行气相色谱分析。色谱柱为 Rtx-5 毛细管柱,固定相为交联键合的 5% 二苯基、95% 二甲基聚硅氧烷,检测器为火焰离子化检测器,进样量 1 μ L。分析条件:80 °C 保留 1 min;10 °C/min 升温至 120 °C,保留时间 0 min;45 °C/min 升温至 160 °C,保留时间 5 min;进样口温度 250 °C,分流模式,分流比为 30–100;检测器温度为 300 °C,氢气流量为 40 mL/min,空气流量为 400 mL/min。

2 结果与分析

2.1 菌株的筛选和鉴定

经过富集和分离纯化,筛选得到 13 株能够代谢对苯二甲酸的菌株,其中 2 株为假单胞菌,7 株为节杆菌,4 株为红球菌。TPA3 菌株代谢对苯二甲酸的能力最强。16S rRNA 基因进化树分析显示,TPA3 菌株与施氏假单胞菌的进化关系最近,因此将其归类于施氏假单胞菌(图 1)。

2.2 TPA3 菌株代谢对苯二甲酸和乙二醇的能力

从 LB 培养基接种 TPA3 菌株至对苯二甲酸培养基时,菌体生长有约 6 h 的延迟期,在 20 h 内消

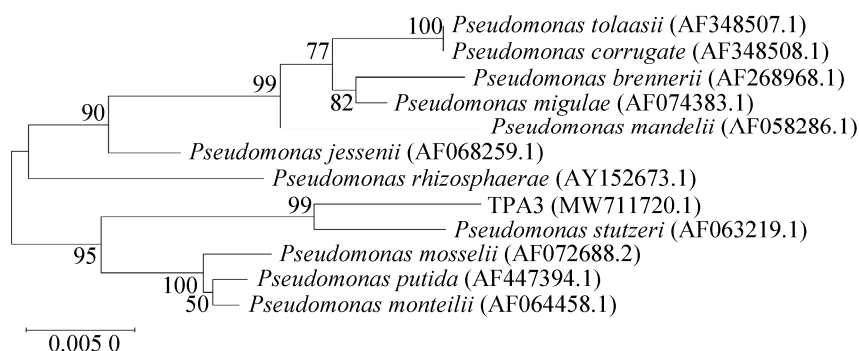


图 1 基于 neighbor-joining 方法的 16S rRNA 系统进化树分析

Figure 1 Topology of a neighbor-joining tree containing representative 16S rRNA sequences of various *Pseudomonas* strains. The tree is based on nucleotide sequence homologies. Overall, 16S rRNA sequences of TPA3 and 11 known *Pseudomonas* strains were included in this alignment. The alignment was calculated using ClustalW. The tree was calculated with molecular evolutionary genetics analysis version X (MEGA-X).

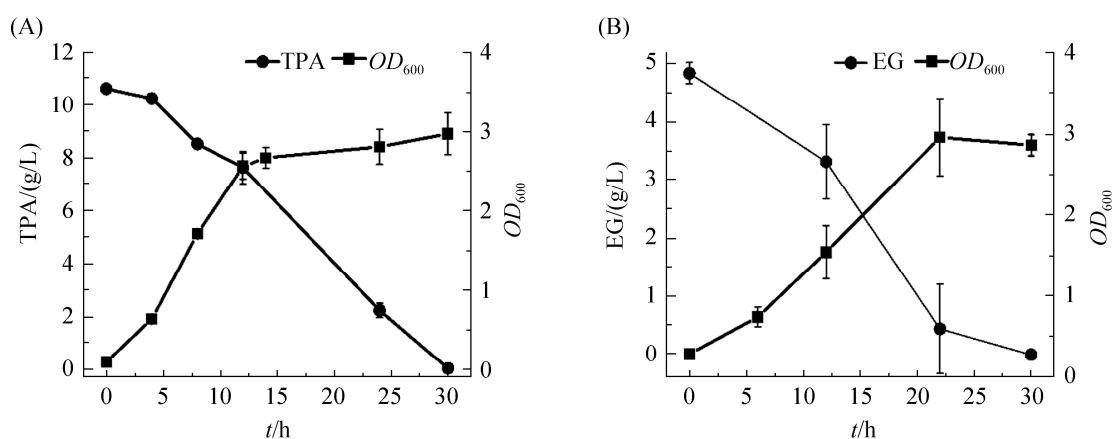


图 2 TPA3 菌株在对苯二甲酸(A)和乙二醇(B)培养基中的生长和降解曲线

Figure 2 Growth and degradation curves of TPA3 strain in TPA (A) and EG (B) medium. Error bars represent the standard deviation of three independent experiments.

耗约 5.18 g/L 的对苯二甲酸, 代谢速率约为 0.26 g/(L·h) (图 2)。用对数期的对苯二甲酸培养物接种则可以缩短延迟期。这种情况下, TPA3 菌株能够在 30 h 内消耗 10.60 g/L 的对苯二甲酸, 代谢速率达到 0.35 g/(L·h) (图 2 A)。TPA3 菌株在乙二醇培养基中生长非常缓慢, 经过传代驯化后, 代谢能力增强, 可在 30 h 内降解约 4.86 g/L 的乙二醇, 代谢速率约为 0.16 g/(L·h) (图 2 B)。

2.3 TPA3 菌株基因组分析

2.3.1 基因组特征分析

使用 Unicycler^[20] 软件进行基因组组装, 得到 4 550 314 bp 大小的基因组, 其中 BGISEQ 数据量和 Nanopore 数据量分别为 1 153 Mb 和 3 529 Mb, 测序深度分别达到 253×和 775×。TPA3 菌株基因组由 1 条染色体和 3 个质粒组成, 大小分别为 4 415 884、82 083、50 192 和 2 155 bp, 它们在 GenBank 中的登录号分别为

CP071899、CP071900、CP071901 和 CP071902。其中，染色体 DNA 的 GC 含量为 63.58%，这与已报道的 *P. stutzeri* 基因组 GC 含量(60.3%–64.0%) 相似^[21]。

2.3.2 基因功能分析

采用 Glimmer^[22] 软件进行基因预测，TPA3 菌株基因组中包含 4 247 个编码基因，总长度为 4 025 004 bp，占基因组总长度的 88.46%。其中，功能基因有 3 760 个，487 个为假定蛋白。各数据库中比对到的基因数量见表 3，其中比对到 COG 数据库中的 3 410 个基因被归类为 25 个直系同源基因簇(表 4)。另外，基因组中含有 60 个 tRNA 基因和 12 个 rRNA 基因。KEGG 分析结果显示，分别有 165 个基因、41 个基因、268 个基因参与膜运输、糖的生物合成和代谢以及碳水化合物代谢。TPA3 菌株拥有完整的需氧异养细菌所需的糖酵解、戊糖磷酸途径、氧化磷酸化和柠檬酸循环途径基因。此外，与其他施氏假单胞菌一样，TPA3 菌株基因组具有完整的鞭毛合成、反硝化和细菌趋化性的基因。值得注意的是，TPA3 菌株基因组中存在多个与重金属(如铜、汞、砷、钴、锌、镉)抗性相关的基因簇，表明它在生物修复方面具有潜在的应用前景。

2.3.3 对苯二甲酸代谢途径分析

以序列和功能研究最为清楚的 *Comamonas* sp. strain E6 来源的对苯二甲酸代谢基因为参考进行氨基酸序列比对分析(图 3)，发现在 TPA3 菌株中，*J4H94_21250*、*J4H94_21265*、*J4H94_21260* 和 *J4H94_21255* 基因编码的蛋白分别与 TphA1、TphA2、TphA3 和 TphB 具有较高的序列相似性(表 3)。这些基因在基因组中的排列与 *tph* 基因簇相似，对该基因簇进行敲除，TPA3 菌株失去代谢对苯二甲酸的能力(图 3)，因此推测上述基因是 TPA3 菌株代谢对苯二甲酸的关键基因。对苯二甲酸经过上述途径转

表 3 TPA3 菌株基因组注释统计表

Table 3 Genome statistics for TPA3 strain

Attributes	Value	% of total
Genome size/bp	4 550 314	100
Gene total length/bp	4 025 004	88.46
Gene number	4 247	100
Annotation number	4 171	98.21
VFDB	382	8.99
ARDB	19	0.44
CAZY	98	2.3
IPR	3 747	88.22
SWISSPROT	2 071	48.76
COG	3 410	80.29
CARD	3	0.07
GO	2 698	63.52
KEGG	2 802	65.88
NR	4 155	97.83
T3SS	503	11.84
ncRNA number	97	
Repeat number	202	
Prophage number	10	
CRISPR number	3	

VFDB, virulence factors of pathogenic bacteria database; ARDB, antibiotic resistance genes annotation database; CAZY, carbohydrate-active enzymes database; Swiss-Port is a database created by UniProt consortium in 2002; COG, cluster of orthologous groups of proteins; CARD, the comprehensive antibiotic resistance database; GO, gene ontology; KEGG, Kyoto encyclopedia of genes and genomes; NR, non-redundant protein database; T3SS, type III secretion system effector protein.

化为原儿茶酸。经过氨基酸序列比对推测，TPA3 菌株可能通过 3,4-cleavage 途径代谢原儿茶酸(表 5)。原儿茶酸在 PCA 3,4-双加氧酶(PcaGH)的作用下发生开环反应，进入 β -酮己二酸途径进行代谢。该途径包括环化异构酶(PcaB)、脱羧酶(PcaC)、3-氧代己二酸烯醇内酯酶(PcaD)、3-氧代己二酸辅酶 A 转移酶(PcaIJ)以及 β -酮己二酰辅酶 A 硫解酶(PcaF)，最终产物为琥珀酰辅酶 A 和乙酰辅酶 A 流入 TCA 循环(图 3)。相关基因与来源于 *P. putida* KT2440 的 PCA 代谢基因进行了序列比对(表 5)。

表 4 COG 功能类别相关的基因数量统计

Table 4 Number of genes associated with the general COG functional categories

Code	Value	Description
A	1	RNA processing and modification
B	1	Chromatin structure and dynamics
C	267	Energy production and conversion
D	54	Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning
E	306	Amino acid transport and metabolism
F	88	Nucleotide transport and metabolism
G	188	Carbohydrate transport and metabolism
H	179	Coenzyme transport and metabolism
I	199	Lipid transport and metabolism
J	253	Translation, ribosomal structure and biogenesis
K	267	Transcription
L	137	Replication, recombination and repair
M	222	Cell wall/membrane/envelope biogenesis
N	143	Cell motility
O	177	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones
P	244	Inorganic ion transport and metabolism
Q	113	Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism
R	361	General function prediction only
S	254	Function unknown
T	326	Signal transduction mechanisms
U	86	Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport
V	86	Defense mechanisms
W	36	Extracellular structures
X	25	Mobilome: prophages, transposons
Z	1	Cytoskeleton

2.3.4 乙二醇代谢途径分析

KEGG 数据库中显示, 乙二醇在乳醛还原酶(FucO)和乳醛/乙醇醛脱氢酶(AldA)的作用下催化生成乙醇酸。比对分析发现, TPA3 菌株中没有这两个酶, 它与 *P. putida* KT2440 具有相似的乙二醇代谢途径。乙二醇通过功能冗余的周质吡咯喹啉酮依赖的醇脱氢酶(PedE/H)和胞质醛脱氢酶(PedI/aldB)催化转化产生乙醇酸。乙醇酸经膜固定乙醇酸氧化酶(GlcDEF)催化产生乙醛酸进行代谢。除了乙醛酸循环, 乙醛酸还可通过乙醛酸醛连接酶(Gcl)催化产生酒石酸半醛进行代谢。酒石酸半醛直接或者被异构酶

(Hyi)催化转化为羟基丙酮酸后, 经还原酶(GlxR)催化产生甘油酸。甘油酸在甘油酸激酶(TtuD)催化作用下产生 2-磷酸甘油酸, 随后进入中心代谢途径完成代谢(图 4)。Gcl、hyi、glxR、ttuD 和 pyk 被证明共转录, 称为 gcl 操纵子。研究发现, 必须增强 gcl 操纵子的表达强度, *P. putida* KT2440 才能利用乙二醇作为唯一碳源进行生长^[17]。相关基因比对结果见表 6。

2.4 TPA3 菌株的可遗传操作性

研究发现, 已有的假单胞菌遗传操作技术适用于 TPA3 菌株, 可进行基因敲除和外源基因表达。

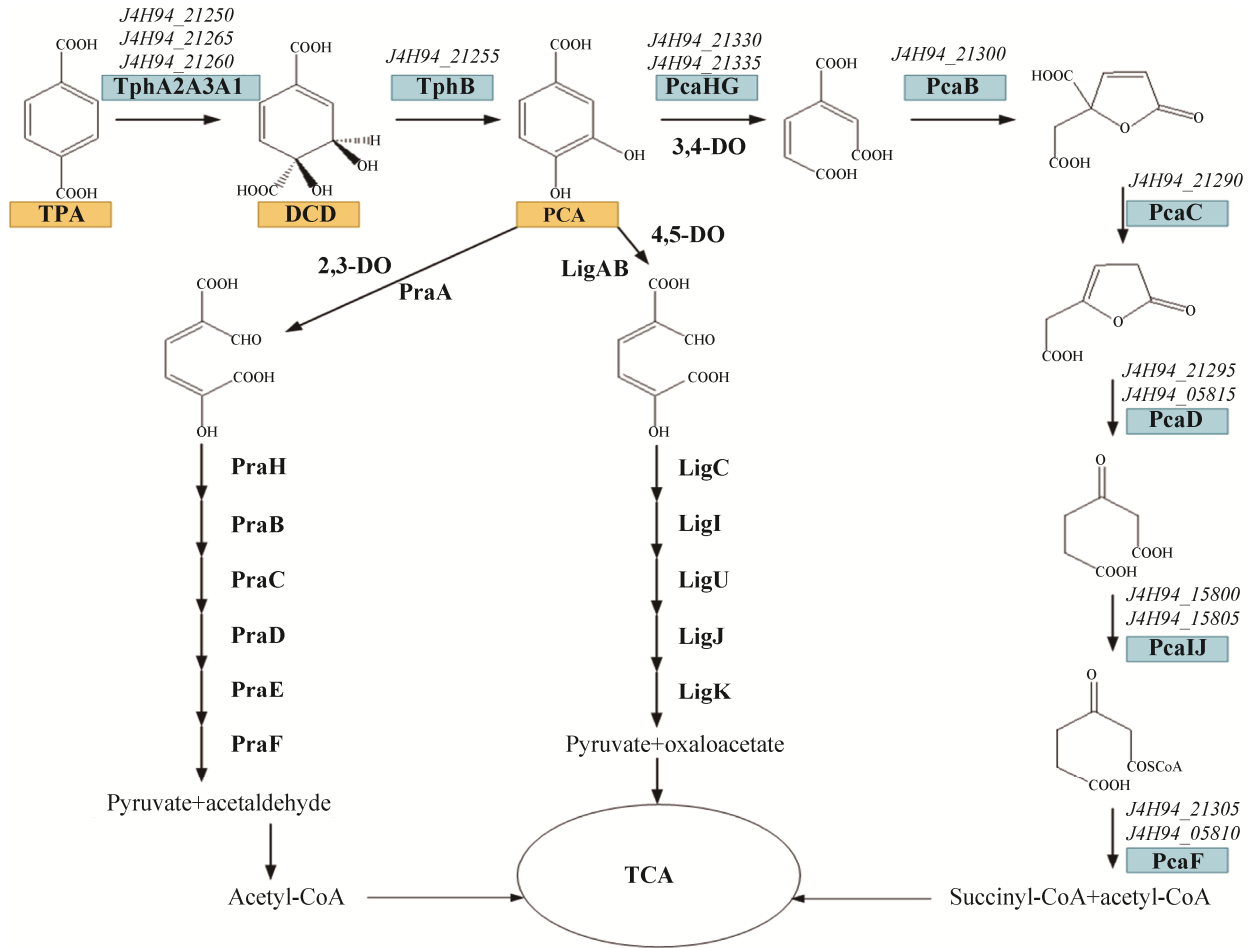


图 3 对苯二甲酸分解代谢途径

Figure 3 The catabolic pathway of TPA.

表 5 *P. stutzeri* TPA3 中对苯二甲酸代谢相关基因氨基酸序列比对分析Table 5 Alignment of the genes encoding enzymes involved in the terephthalate metabolism of *P. stutzeri* TPA3

Genes	Locuses	Functions	Query cover/%	Identity AA/%	Reference genes
<i>tphA1</i>	J4H94_21250	TPA 1,2-dioxygenase reductase component	98	39.07	BAE47088.1 ^a
<i>tphA2</i>	J4H94_21265	TPA 1,2-dioxygenase α subunit	95	68.08	BAE47085.1 ^a
<i>tphA3</i>	J4H94_21260	TPA 1,2-dioxygenase β subunit	94	50.34	BAE47086.1 ^a
<i>tphB</i>	J4H94_21255	DCD dehydrogenase	96	48.60	BAE47087.1 ^a
<i>pcaG</i>	J4H94_21330	PCA 3,4-dioxygenase α subunit	99	83.08	PP_RS24250 ^b
<i>pcaH</i>	J4H94_21335	PCA 3,4-dioxygenase β subunit	99	88.66	PP_RS24255 ^b
<i>pcaB</i>	J4H94_21300	3-carboxy-cis,cis-muconate cycloisomerase	99	78.62	PP_RS07125 ^b
<i>pcaC</i>	J4H94_21290	4-carboxymuconolactone decarboxylase	99	92.97	PP_RS07135 ^b
<i>pcaD</i>	J4H94_21295	3-oxoadipate enol-lactonase	100	70.99	PP_RS07130 ^b
	J4H94_05815	3-oxoadipate enol-lactonase	99	68.08	
<i>pcaI</i>	J4H94_15800	CoA-transferase α subunit	93	51.15	PP_RS20550 ^b
<i>pcaJ</i>	J4H94_15805	CoA-transferase β subunit	98	54.59	PP_RS20555 ^b
<i>pcaF</i>	J4H94_21305	3-oxoadipyl-CoA thiolase	99	79.15	PP_RS07115 ^b
	J4H94_05810	3-oxoadipyl-CoA thiolase	99	80.95	

a, reference genes from *Comamonas* sp. strain E6; b, reference genes from *P. putida* KT2440.

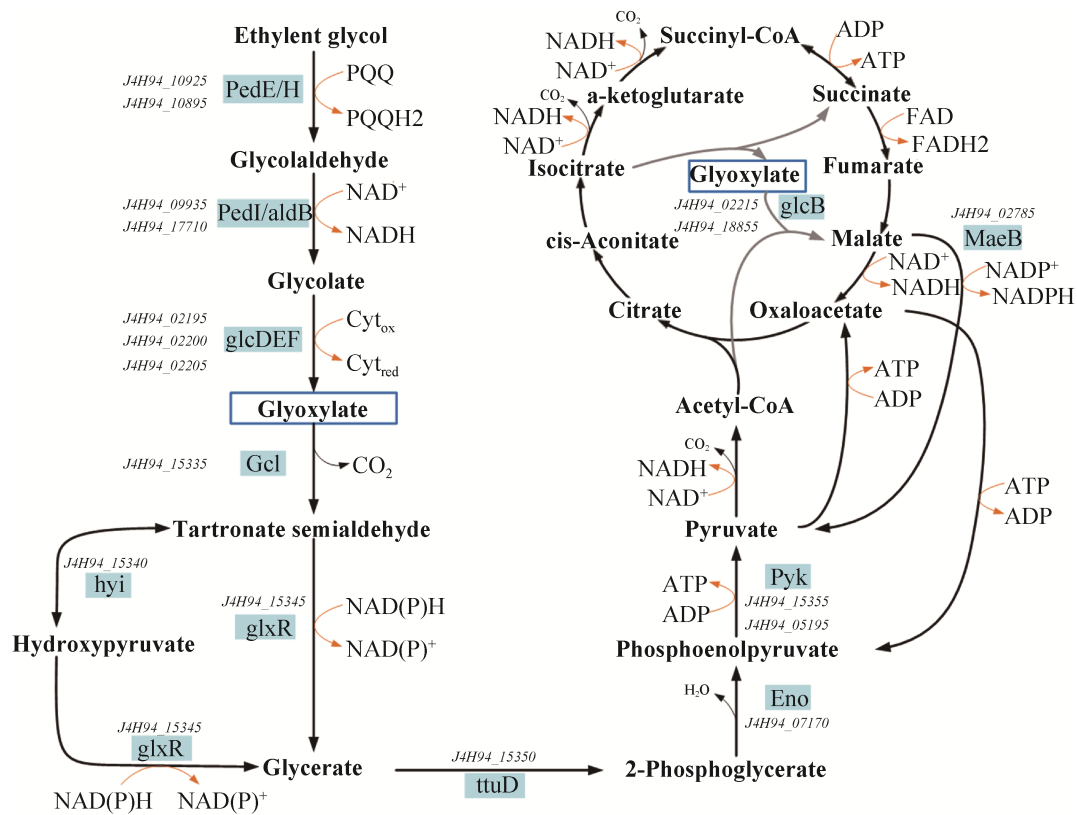


图 4 乙二醇分解代谢途径

Figure 4 The catabolic pathway of EG.

表 6 *P. stutzeri* TPA3 中乙二醇代谢相关基因氨基酸序列比对分析

Table 6 Alignment of the genes encoding enzymes involved in the ethylene glycol metabolism of *P. stutzeri* TPA3

Gene	Locus	Function	Query cover/%	Identity AA/%	Reference gene
<i>pedE</i>	J4H94_10925	PQQ dependent dehydrogenase	100	84.83	PP_RS13925
<i>pedH</i>	J4H94_10895	Quinoprotein ethanol dehydrogenase	99	80.75	PP_RS13950
<i>pedI</i>	J4H94_09935	Aldehyde dehydrogenase	100	89.97	PP_RS13955
<i>aldB</i>	J4H94_17710	Aldehyde dehydrogenase	100	88.17	PP_RS02880
<i>glcC</i>	J4H94_02190	Glc operon transcriptional regulator	95	81.71	PP_RS19490
<i>glcD</i>	J4H94_02195	Glycolate oxidase FAD-linked subunit	100	87.80	PP_RS19495
<i>glcE</i>	J4H94_02200	Glycolate oxidase FAD-binding subunit	98	71.55	PP_RS19500
<i>glcF</i>	J4H94_02205	Glycolate oxidase Fe-S subunit	99	72.64	PP_RS19505
<i>gcl</i>	J4H94_15335	Carboxylate ligase	100	78.11	PP_RS22315
<i>hyi</i>	J4H94_15340	Hydroxypyruvate isomerase	100	80.46	PP_RS22320
<i>glxR</i>	J4H94_15345	2-hydroxy-3-oxopropionate reductase	99	85.14	PP_RS22325
<i>ttuD</i>	J4H94_15350	Glycerate kinase	99	79.86	PP_RS22330
<i>eno</i>	J4H94_07170	Phosphopyruvate hydratase	100	92.33	PP_RS08310
<i>pyk-1</i>	J4H94_15355	Pyruvate kinase	99	79.57	PP_RS22335
<i>pyk-2</i>	J4H94_05195	Pyruvate kinase	99	80.87	PP_RS07040
<i>glcB</i>	J4H94_18855	Malate synthase	100	81.57	PP_RS01890
	J4H94_02215		99	67.08	
<i>maeB</i>	J4H94_02785	Malate dehydrogenase/malic enzyme	100	90.78	PP_RS26505

2.4.1 基因敲除

利用自杀质粒 pK18mobSacB 系统, 经过 2 次同源重组成功删除预测的对苯二甲酸代谢关键基因簇 *tph* 中间约 2 745 bp 的碱基(图 5A)。基因敲除菌株在 LB 培养基中正常生长, 在以对苯二甲酸为唯一碳源的培养基中不能生长(图 5B)。将野生菌和基因敲除菌株的 LB 培养物用无菌水洗涤后, 转接至以对苯二甲酸为唯一碳源的培养基中培养, 野生菌能够正常生长和代谢对苯二甲酸, 敲除菌不能生长、不能降解对苯二甲酸(图 5C)。该结果同时表明, 该基因簇确实是 TPA3 菌株代谢对苯二甲酸的关键基因。

2.4.2 外源基因表达

聚羟基脂肪酸酯(PHA)是细菌在碳源过剩, 生长不利的条件下合成的细胞内碳和能量存储物质。PHA 具有热塑性特性, 被视为石化塑料的替代材料。许多细菌可将可再生底物用于生产 PHA, 其中就包括假单胞菌。然而研究发现, TPA3 菌株不能合成 PHA。考虑到对苯二甲酸代谢产生

乙酰辅酶 A, 研究尝试引入来源于 *Ralstonia eutropha* 的聚羟基丁酸酯(PHB)合成的关键基因 *phbCAB* (图 6), 构建能够转化 TPA 合成 PHB 的工程菌 *P. stutzeri* TPA3::*phbCAB*。用含有 10 g/L TPA 的无机盐培养基培养 *P. stutzeri* TPA3::*phbCAB* 菌株, 在菌体生长的对数初期添加 1 mmol/L IPTG 诱导 *phbCAB* 基因表达, 继续培养至 30 h, 收集、冻干菌体, 检测 PHB 的合成情况。结果显示, 表达 *phbCAB* 基因的菌株能够合成 PHB, 积累量约占细胞干重的 11%。虽然 PHB 积累量仍然较低, 但该结果表明通过基因工程改造将 TPA3 菌株应用于化合物生产是可行的。

3 讨论

本研究从青岛小涧西固体废弃物综合处置厂采集填埋的塑料废物和土壤样品, 以对苯二甲酸为唯一碳源筛选得到 1 株能够快速降解对苯二甲酸的施氏假单胞菌, 它能够在 30 °C 条件下, 在 30 h 内代谢 10.60 g/L 的对苯二甲酸。

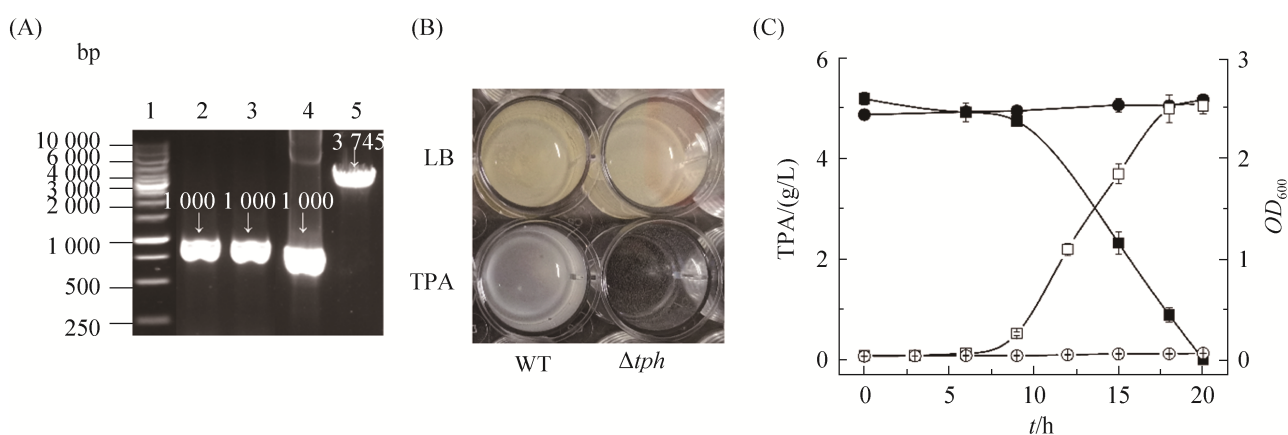


图 5 *tphA2A3BA1* 基因的敲除和验证

Figure 5 The deletion of *tphA2A3BA1*. A: agarose gel electrophoresis assay: lane 1: DNA ladder; lane 2–3: PCR products of deletion mutants; lane 4: PCR product of the deletion type gene; lane 5: PCR product of wild type gene. B: growth of TPA3 wild strain (WT) and deletion mutant (Δtph) in LB and medium with TPA as the only carbon source. C: growth curves (hollow) and TPA degradation curves (filled) of TPA3 wild strain (square) and deletion mutant (circle) in medium with TPA as the only carbon source. Error bars represent the standard deviation of three independent experiments.

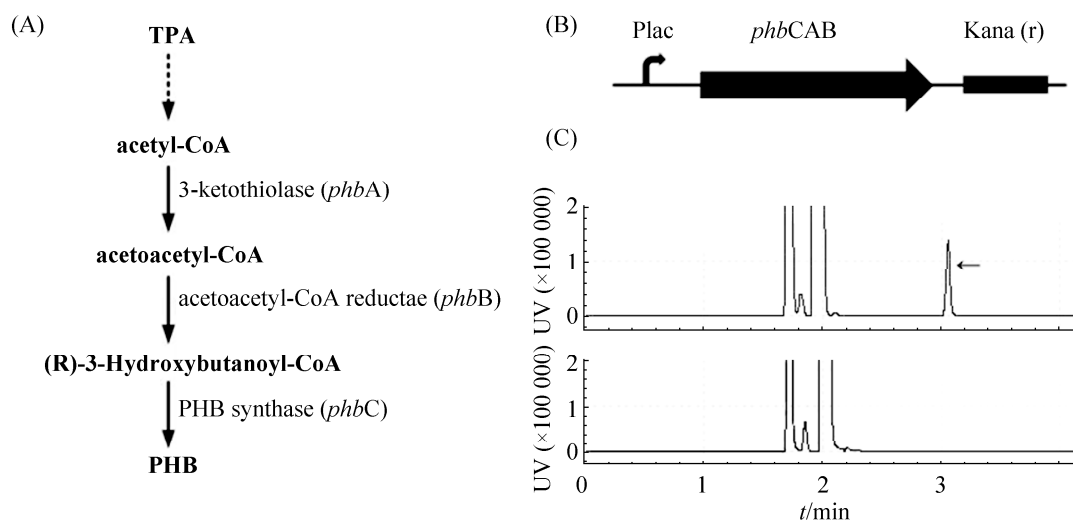


图 6 *phbCAB* 基因的表达

Figure 6 The expression of *phbCAB*. A: metabolic pathway from TPA to PHB; B: schematic diagram of *phbCAB* gene expression vector pBBR68; C: GC map of PHB product by TPA3 wild strain (lower) and *phbCAB* gene expressing strain (upper).

经过驯化后,也能够代谢乙二醇。通过基因组 *de novo* 测序获得该菌株的基因组序列,基因组大小约为 4.55 Mb,由 1 条染色体和 3 个环状质粒组成。经过氨基酸序列比对分析,推测了 TPA3 菌株降解对苯二甲酸和乙二醇的代谢途径。对苯二甲酸经原儿茶酸进入 β -酮己二酸途径,该途径通常被用于硝基酚和多氯芳烃等有毒和顽固芳香族化合物的代谢,连接到细菌的中心代谢途径^[23]。它也是木质纤维素废料降解产物的重要代谢途径,可以用于合成其他感兴趣的化合物^[24]。乙二醇氧化代谢最终流向 TCA 循环,也可用于合成琥珀酸、PHB 等高值化合物。该菌株适用已有的假单胞菌遗传操作技术,可以进行常规的基因敲除和外源基因表达。TPA3 菌株可以作为使用 PET 水解产物作为原料进行生物转化的底盘宿主,与分泌 PET 水解酶的微生物构建群体感应系统,开发基于菌群的生物技术塑料回收策略^[25]。另外,除了代谢 TPA 的基因,TPA3 菌株基因组中还存在多个与重金属(如铜、汞、砷、钴、锌、镉)抗性相关的基因簇,表明其在重金属污染的生物修

复方面具有潜在的应用前景。

参考文献

- [1] Geyer R, Jambeck JR, Law KL. Production, use, and fate of all plastics ever made. *Science Advances*, 2017, 3(7): e1700782.
- [2] Ronkvist ÅM, Xie WC, Lu WH, Gross RA. Cutinase-catalyzed hydrolysis of poly(ethylene terephthalate). *Macromolecules*, 2009, 42(14): 5128–5138.
- [3] Roth C, Wei R, Oeser T, Then J, Föllner C, Zimmermann W, Sträter N. Structural and functional studies on a thermostable polyethylene terephthalate degrading hydrolase from *Thermobifida fusca*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014, 98(18): 7815–7823.
- [4] Shirke AN, White C, Englaender JA, Zwarycz A, Butterfoss GL, Linhardt RJ, Gross RA. Stabilizing leaf and branch compost cutinase (LCC) with glycosylation: mechanism and effect on PET hydrolysis. *Biochemistry*, 2018, 57(7): 1190–1200.
- [5] Yoshida S, Hiraga K, Takehana T, Taniguchi I, Yamaji H, Maeda Y, Toyohara K, Miyamoto K, Kimura Y, Oda K. A bacterium that degrades and assimilates poly(ethylene terephthalate). *Science*, 2016, 351(6278): 1196–1199.
- [6] Then J, Wei R, Oeser T, Barth M, Belisário-Ferrari MR,

- Schmidt J, Zimmermann W. Ca²⁺ and Mg²⁺ binding site engineering increases the degradation of polyethylene terephthalate films by polyester hydrolases from *Thermobifida fusca*. *Biotechnology Journal*, 2015, 10(4): 592–598.
- [7] Son HF, Cho IJ, Joo S, Seo H, Sagong HY, Choi SY, Lee SY, Kim KJ. Rational protein engineering of thermo-stable PETase from *Ideonella sakaiensis* for highly efficient PET degradation. *ACS Catalysis*, 2019, 9(4): 3519–3526.
- [8] Tournier V, Topham CM, Gilles A, David B, Folgoas C, Moya-Leclair E, Kamionka E, Desrousseaux ML, Texier H, Gavalda S, Cot M, Guémard E, Dalibey M, Nomme J, Cioci G, Barbe S, Chateau M, André I, Duquesne S, Marty A. An engineered PET depolymerase to break down and recycle plastic bottles. *Nature*, 2020, 580(7802): 216–219.
- [9] Zhang XX, Sun SL, Zhang Y, Wu B, Zhang ZY, Liu B, Yang LY, Cheng SP. Toxicity of purified terephthalic acid manufacturing wastewater on reproductive system of male mice (*Mus musculus*). *Journal of Hazardous Materials*, 2010, 176(1/2/3): 300–305.
- [10] Wang YZ, Zhou Y, Zylstra GJ. Molecular analysis of isophthalate and terephthalate degradation by *Comamonas testosteroni* YZW-D. *Environmental Health Perspectives*, 1995, 103(suppl 5): 9–12.
- [11] Schläfli HR, Weiss MA, Leisinger T, Cook AM. Terephthalate 1,2-dioxygenase system from *Comamonas testosteroni* T-2: purification and some properties of the oxygenase component. *Journal of Bacteriology*, 1994, 176(21): 6644–6652.
- [12] Choi KY, Kim D, Sul WJ, Chae JC, Zylstra GJ, Kim YM, Kim E. Molecular and biochemical analysis of phthalate and terephthalate degradation by *Rhodococcus* sp. strain DK17. *FEMS Microbiology Letters*, 2005, 252(2): 207–213.
- [13] Sasoh M, Masai E, Ishibashi S, Hara H, Kamimura N, Miyauchi K, Fukuda M. Characterization of the terephthalate degradation genes of *Comamonas* sp. strain E6. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(3): 1825–1832.
- [14] Kasai D, Kitajima M, Fukuda M, Masai E. Transcriptional regulation of the terephthalate catabolism operon in *Comamonas* sp. strain E6. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(18): 6047–6055.
- [15] Kamimura N, Aoyama T, Yoshida R, Takahashi K, Kasai D, Abe T, Mase K, Katayama Y, Fukuda M, Masai E. Characterization of the protocatechuate 4,5-cleavage pathway operon in *Comamonas* sp. strain E6 and discovery of a novel pathway gene. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(24): 8093–8101.
- [16] Kasai D, Fujinami T, Abe T, Mase K, Katayama Y, Fukuda M, Masai E. Uncovering the protocatechuate 2,3-cleavage pathway genes. *Journal of Bacteriology*, 2009, 191(21): 6758–6768.
- [17] Franden MA, Jayakody LN, Li WJ, Wagner NJ, Cleveland NS, Michener WE, Hauer B, Blank LM, Wierckx N, Klebensberger J, Beckham GT. Engineering *Pseudomonas putida* KT2440 for efficient ethylene glycol utilization. *Metabolic Engineering*, 2018, 48: 197–207.
- [18] Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 2018, 35(6): 1547–1549.
- [19] Liu Q, Ouyang SP, Kim J, Chen GQ. The impact of PHB accumulation on L-glutamate production by recombinant *Corynebacterium glutamicum*. *Journal of Biotechnology*, 2007, 132(3): 273–279.
- [20] Wick RR, Judd LM, Gorrie CL, Holt KE. Unicycler: resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. *PLoS Computational Biology*, 2017, 13(6): e1005595.
- [21] Wu SM, Zheng RK, Sha ZX, Sun CM. Genome sequence of *Pseudomonas stutzeri* 273 and identification of the exopolysaccharide EPS273 biosynthesis locus. *Marine Drugs*, 2017, 15(7): 218.
- [22] Delcher AL, Bratke KA, Powers EC, Salzberg SL. Identifying bacterial genes and endosymbiont DNA with Glimmer. *Bioinformatics*, 2007, 23(6): 673–679.
- [23] Harwood CS, Parales RE. The beta-ketoadipate pathway and the biology of self-identity. *Annual Review of Microbiology*, 1996, 50: 553–590.
- [24] Wells T Jr, Ragauskas AJ Jr. Biotechnological opportunities with the β -ketoadipate pathway. *Trends in Biotechnology*, 2012, 30(12): 627–637.
- [25] 李晓萌, 姜威, 梁泉峰, 祁庆生. 细菌群体感应系统在细胞间通讯中的应用及其合成生物学研究进展. *合成生物学*, 2020, 1(5): 540–555.
- Li XM, Jiang W, Liang QF, Qi QS. Application of bacterial quorum sensing system in intercellular communication and its progress in synthetic biology. *Synthetic Biology Journal*, 2020, 1(5): 540–555. (in Chinese)

(本文责编 张晓丽)