

# 需钠弧菌(*Vibrio natriegens*)合成聚羟基丁酸的研究

刘双江

(中国科学院微生物研究所,北京 100080)

**摘要** 研究表明,*V. natriegens* 可以利用葡萄糖、果糖、以及糖蜜为碳源合成聚羟基丁酸 [Poly(3HB)]。当以糖蜜为碳源时,积累的 Poly(3HB) 达到细胞干重的 28.4%。实验结果还表明, Poly(3HB) 的积累滞后于细胞生长,在培养前加入过量的碳源,不仅没有 Poly(3HB) 积累,还抑制细胞的生长。测定了与 Poly(3HB) 合成相关的 PHA 聚合酶、 $\beta$ -酮硫解酶和乙酰乙酰 CoA 还原酶的活性。结果表明,伴随 Poly(3HB) 合成,PHA 聚合酶活性从无到有, $\beta$ -酮硫解酶活性提高了 10 倍以上。进一步通过利用脂肪酸合成代谢抑制物——浅蓝菌素(cerulenin),研究了脂肪酸从头合成途径与 Poly(3HB) 合成途径的关系,发现浅蓝菌素能够明显降低细胞 Poly(3HB) 的累积。根据以上结果,推测在 *V. natriegens* 中可能存在有两条代谢途径参与 Poly(3HB) 的合成。

**关键词** 弧菌,聚羟基烷酸,合成途径

中图分类号 TQ920.1 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2002)05-0614-05

就合成聚羟基烷酸 Poly(hydroxyalkanoic acids), PHAs 而言,人们对弧菌属(*Vibrio*)的认识和了解非常有限,有时文献中给出互相矛盾的结论。例如,20 世纪 70 年代的文献中指出多数弧菌属的菌种不能合成 PHAs<sup>[1,2]</sup>,在伯杰氏手册(Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 9<sup>th</sup> edition)记载的 37 个种和亚种中,只有需钠弧菌(*V. natriegens*)和海螵弧菌(*V. nereis*)能够合成 PHAs。但是,Kitase 对包括霍乱弧菌(*V. cholerae*)、副溶血弧菌(*V. parahaemolyticum*)在内的 10 种弧菌研究表明,他们都能合成 PHAs<sup>[3]</sup>,说明合成 PHA 是弧菌属的一个比较普遍的特性。哈氏弧菌(*V. harveyi*)曾经被认为是不能合成 PHAs,现已经被证明能够合成 PHA<sup>[4]</sup>。我们曾经对 DSMZ Deutsche Sammlung vom Mikroorganismen und Zellkulturen 保藏中心的部分弧菌菌株和分离自某海湾污泥样品中的弧菌进行了研究,发现多数弧菌具有合成 PHA 的能力(未发表资料)。尽管受生产成本等因素的影响,PHAs 作为普通塑料推广应用受到了限制,但作为重要高附加产值而应用于医学组织工程,仍然受到广泛重视。寻找新的 PHA 合成菌种和发现新的 PHA 种类<sup>[5-7]</sup>,获得新的基因资源,是当前本领域的研究热点之一。

对 PHA 合成代谢途径和分子生物学研究比较

清楚的菌种包括 *R. eutropha*, *P. putida*, *P. aeruginosa*, *Chromatium vinosum* 等<sup>[8]</sup>。但对弧菌属细菌合成 PHA 的特性以及其合成途径还知之甚少。本文以需钠弧菌为对象,考察了它合成 PHA 的特性并对其合成 PHA 的代谢途径进行了探讨。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种和培养条件

需钠弧菌 DSM759 购买于 DSMZ 保藏中心。液体培养使用海水培养基 2216 号(Difco Lab., Detroit, USA)称取 37.4 g 培养基溶解于 1000 mL 水中。琼脂培养基中加入 15 g/L 琼脂。30℃,260 r/min 振荡培养。依据试验设计,在培养前或培养对数期加入 10 g/L 葡萄糖或其他碳水化合物作为合成 PHA 的碳源。

### 1.2 酶活性分析和测定

5~15 mL 培养液经离心,收集细胞重新悬浮在 1 mL 的磷酸-甘油缓冲液(10 mmol/L  $K_2PO_4$ , 10% 甘油, pH 7.0)。超声波破碎 2 min,取 10~20  $\mu$ L 做酶活性测定。

PHA 合成酶活性测定参考文献 [9]

$\beta$ -酮硫解酶和乙酰乙酰 CoA 还原酶活性测定分别参照文献 [10] 和文献 [11]

### 1.3 浅蓝菌素 (Cerulein) 对累积 PHA 的影响

培养 12 h 后加入 0.1 mg/L 的浅蓝菌素,同时加入 10 g/L 的葡萄糖,继续培养 24 h 后收集细胞,并测定 PHA 含量。

### 1.4 测定项目和和方法

PHA 测定采用气相色谱法<sup>[12]</sup>。称取 3~5 mg 干细胞,加入 2 mL 甲醇 (15%) 硫酸 (85%) 混合液和 2 mL 氯仿,105℃ 酯化 2 h。待冷却后加入 0.5 mL 水,充分震荡,混匀,取氯仿层测定。

细胞生长采用测定 600 nm 的光密度 ( $OD_{600}$ ) 表示。细胞干重 (CDW) 采用恒重法<sup>[13]</sup>。

蛋白质浓度采用 Bradford 法测定<sup>[14]</sup>。

## 2 结果

### 2.1 细胞生长、碳源补加与 PHA 合成的关系

微生物积累 PHA 是在营养不平衡例如碳源过量的条件下作出的一种生理反应,其结果是 PHA 作为能源和碳源在细胞内存储起来。因此,我们开始培养需钠弧菌时在培养基中加入了 10 g/L 的葡萄糖,结果表明,不但细胞内没有 PHA 累积,而且细胞生长很差,测定分析发现,培养基在接种后 pH 下降很快 (海水培养基 2216 号的缓冲能力很差),从开始的 7.5 迅速下降到 4.5 左右,抑制了细胞的进一步生长。在没有补加葡萄糖的情况下,菌株在 2216 号海水培养基上生长良好,12 h 后接近对数生长末期,但没有 PHA 累积,继续培养 12 h 也同样 (图 1)。进一步研究发现,接种后当细胞生长到一定程度时补加葡萄糖,PHA 合成被诱导和启动 (图 1 和表 1)。从表 1 中还可以看出,在细胞进入对数生长期后补加葡萄糖的时间对最终 PHA 的积累影响不大。

表 1 不同时间补加葡萄糖对细胞生长和累积 poly(3HB) 的影响\*

Table 1 Effect of glucose feed-up on the accumulation of poly(3HB) in *V. natriegens*.\*

Feeding time/h	CDW (mg/mL)	Poly(3HB) (mg/mL)	Poly(3HB) %
2	12.1	1.49	12.3
4	11.1	1.69	15.2
8	10.4	1.71	16.4
20	10.8	1.53	14.2
30	10.3	1.69	16.4

\* (10% of glucose was fed at different times after inoculation. Experiments were conducted in 300 mL flasks containing 50 mL marine broth, incubated at 30℃, 260 r/min.)

色谱分析表明,*V. natriegens* 以葡萄糖为碳源合成的 PHA 是单一组分 (3-羟基丁酸) 组成的聚羟基丁酸同聚物 [poly(3-hydroxybutyrate), poly(3HB)], poly(3HB) 是目前了解最多的一种聚羟基烷酸生物多聚酯。

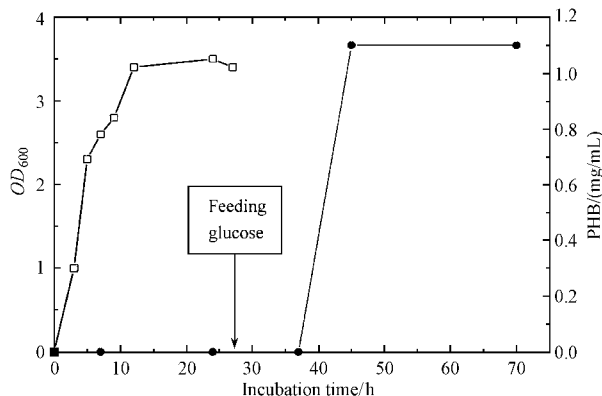


图 1 需钠弧菌细胞生长与 PHA 累积的关系

Fig. 1 The relationship between cell growth and accumulation of poly(3HB) in *V. natriegens*.

Experiments were conducted in 300 mL flasks containing 50 mL marine broth. 10 g/L glucose (final concentration) was fed after 28 h incubation.

□ Cell growth as indicated by  $OD_{600}$  ;

● Poly(3HB) accumulation

### 2.2 需钠弧菌利用不同碳源合成 poly(3HB)

如表 2 所示,需钠弧菌可以利用包括葡萄糖、果糖、葡萄糖酸钠和糖蜜在内的多种碳源合成 poly(3HB),糖蜜最好,最终占细胞干重的 28.4%。葡萄糖酸钠是良好的生长碳源,但不适合积累 poly(3HB),其最终 poly(3HB) 仅占细胞干重的 3.5%。

表 2 需钠弧菌利用不同碳源合成 poly(3HB)

Table 2 Accumulation of poly(3HB) by *V. natriegens* from different carbon sources

	Poly(3HB) (mg/mL)	CDW (mg/mL)	Contents/%
Glucose (10 g/L)	3.60	15.2	24.0
Gluconate (10 g/L)	0.71	20.4	3.5
Fructose (10 g/L)	4.32	19.4	22.3
Molasses (12 g/L)	4.20	14.8	28.4

(For details of the experiments, refer to the notes of Table 1.)

### 2.3 与 PHA 合成代谢相关酶活性测定

PHA 聚合酶、 $\beta$ -酮硫解酶和乙酰乙酰 CoA 还原酶是 *R. eutropha* 从乙酰 CoA 开始合成 PHA 代谢途径中的关键酶<sup>[11]</sup>。因此通过测定这些酶的活性,可以初步判定这一代谢途径是否存在。从表 3 结果可以看出,在需钠弧菌培养过程中补加碳源对 PHA 聚合酶和  $\beta$ -酮硫解酶诱导作用十分明显,在补加之前,测不出 PHA 聚合酶活性,补加葡萄糖 2 h 之后,PHA

聚合酶活性和  $\beta$ -酮硫解酶活性显著提高,其中  $\beta$ -酮硫解酶活性提高 10 倍以上。

表 3 需钠弧菌细胞中与 PHA 合成相关的酶活性\*

Table 3 Activities of PHA polymerase,  $\beta$ -ketothiolase and acetoacetyl-CoA reductase of *V. natriegens* during incubation and poly(3HB) accumulation\*

Activities (mmole/mg of proteins)	Samples after glucose addition /h			
	0	2	4	6
PHA polymerase	0.0	1.35	1.41	1.09
$\beta$ -ketothiolase	17.5	185.0	121.0	167.0
Acetoacetyl-CoA reductase	12.6	17.9	64.8	37.2

\*(Cells were cultivated the same as described in Table 1. After 8 h cultivation (Sample 0), glucose (10 g/L) was fed to the culture. Samples were obtained after further cultivation for 2, 4, 6 h.)

表 4 浅蓝菌素对需钠弧菌合成 poly(3HB) 的影响

Table 4 Effects of cerulenin on poly(3HB) accumulation in *V. natriegens*

	Exp. No.	CDW (mg/mL)	Poly(3HB) (mg/mL)	Poly(3HB) contents (%)
Control (no cerulenin)	1	11.5	2.60	21.7
	2	12.3	3.02	24.5
	3	15.9	2.57	23.5
0.1 mg/L of cerulenin	1	6.7	0.92	13.9
	2	7.1	0.91	12.8
	3	6.4	1.10	17.2
Average differences	(mg/mL)	-5.1	-1.75	-8.6
	(%) <sup>*</sup>	-96	-179.5	-37

[0.1 mg/L of cerulenin and 10 g/L glucose (both are final concentrations) were added into the cultural broth after 12 h cultivation.]

\* (实验值-对照值)/对照值  $\times$  100%

### 3 讨 论

本项研究表明,需钠弧菌累积 poly(3HB) 滞后于细胞生长,当培养开始时加入过量的碳源会严重影响细胞生长和 poly(3HB) 合成。Sun 等人曾经报道哈氏弧菌合成 PHA 需要培养液中细胞达到一定的密度,而多数弧菌当培养达到一定细胞密度后即开始合成一种信号物质 [N-(3-hydroxybutanyl)homoserine lactone], Sun 等人进一步证明了在 *V. harveyi* 中 poly(3HB) 的合成受这种信号物质的调节<sup>[16]</sup>。

PHA 的合成代谢途径包括从乙酰 CoA 开始的 *R. eutropha* 途径、与脂肪酸合成或  $\beta$ -氧化的途径相偶联的假单胞菌途径等。采用特异性的代谢抑制剂研究 PHA 合成途径的类型已有报道。Huijberts 等人利用包括浅蓝菌素在内的多种脂肪酸代谢抑制剂研

### 2.3 浅蓝菌素对合成 poly(3HB) 的影响

浅蓝菌素是脂肪酸从头合成途径的抑制剂,它通过抑制  $\beta$ -酮脂酰-ACP (acyl carrier protein, 脂酰载体蛋白) 合成酶而抑制脂肪酸的合成。在一些细菌如 *P. aeruginosa* 中,已经证明 PHA 的合成是与脂肪酸合成相偶联的<sup>[15]</sup>。因此,向培养液中加入浅蓝菌素后,如果其代谢途径与脂肪酸合成相偶联,PHA 的合成将会受到抑制。如表 4 所示,加入浅蓝菌素后细胞内 poly(3HB) 累积较对照降低了 37%,说明该菌 poly(3HB) 合成途径成与脂肪酸从头合成途径密切相关。但浅蓝菌素并不能完全(100%)抑制 poly(3HB) 的合成,表明需钠弧菌合成 poly(3HB) 还存在其他途径。

究表明, *P. putida* 合成 PHA 与  $\beta$ -氧化以及脂肪酸合成相偶联<sup>[17]</sup>。最近, Lee 等人采用类似的方法证明 *P. fluorescens* BM07 合成 PHA 途径与脂肪酸合成途径有关<sup>[18]</sup>。本项研究结果证明了浅蓝菌素这一脂肪酸合成抑制剂有效地抑制了 *V. natriegens* 累积 poly(3HB), 说明需钠弧菌合成 poly(3HB) 的代谢途径与其脂肪酸从头合成途径有关。同时,本项研究的酶活测定结果表明在过量葡萄糖(碳源)诱导下, PHA 聚合酶、 $\beta$ -酮硫解酶、乙酰乙酰 CoA 还原酶的活性都有不同程度的提高,尤以前二者提高极其显著;在最近完成的 *V. cholerae* 基因组中<sup>[19]</sup>, 我们通过同源性分析发现了在 2 号染色体上存在有与 *R. eutropha* 的 PHA 聚合酶、 $\beta$ -酮硫解酶、和乙酰乙酰 CoA 还原酶同源性较高的 ORFs, 并且这些 ORFs 构成一个基因簇。以上这些结果表明, *V. natriegens* 可能

存在有两条途径与 PHA 合成相关。如图 2 假设的那样,一方面可以通过  $\beta$ -酮硫解酶、乙酰乙酰 CoA 还原酶提供合成 PHA 的前体 3-羟基丁酰 CoA;另一方面 3-羟基丁酰 CoA 也可以由脂肪酸合成途径的羟基酰基-ACP 在转移酶(3-hydroxyacyl-carrier protein:CoA transferase)<sup>[15]</sup>催化下生成。

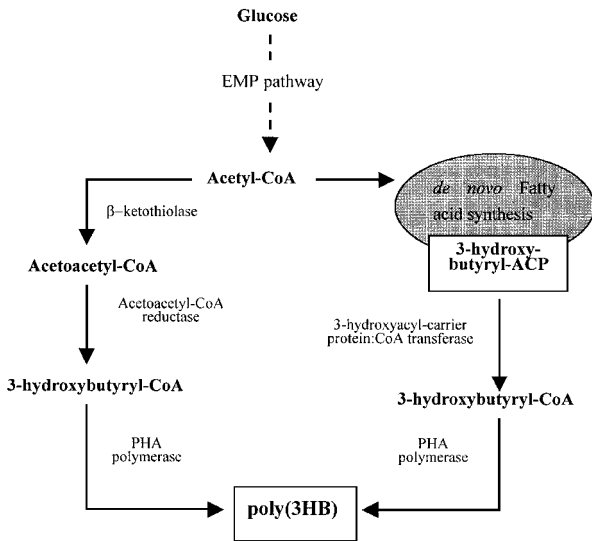


图 2 需钠弧菌合成 poly(3HB) 的假设途径

Fig.2 Proposed pathway of poly(3HB) synthesis in *V. natriegens*

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的支持。研究工作主要在美国 James Madison 大学完成并得到了 D. Dennis 教授的指导和支 持。特此致谢!

## REFERENCES(参考文献)

- [ 1 ] Baumann P, Baumann L, Mandel M. Taxonomy of marine bacteria: the genus *Beneckeia*, 1971, **107** :268 ~ 294
- [ 2 ] Reichelt, J L, Baumann P. Taxonomy of the marine, luminous bacteria. *Arch Mikrobiol*, 1973, **94** :283 ~ 330
- [ 3 ] Kitase T. Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate (PHB) accumulation in genus *Vibrio*. *J of the Osaka City Medical Center*, 1984, **33** :21 ~ 26
- [ 4 ] Sun W, Teng K, Meighen E. Detection of poly(3-hydroxybutyrate) granules by electron microscopy of *Vibrio harveyi* stained with malachite green. *Can J Microbiol*, 1995, **41** (suppl. 1) :131 ~ 137
- [ 5 ] CAI Y B(蔡以滨), LIU M Q(刘墨青) *et al.* High level production of poly(3-hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) by fed-batch culture of *Alcaligenes eutrophus*. *Chin J Biotechnol(生物工程学报)*, 2001, **17** :510 ~ 514

- [ 6 ] XI J Z, WU Q *et al.* Hyperproduction of polyesters consisting of medium-chain-length hydroxyalkanoate monomers by strain *Pseudomonas stutzeri* 1317. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2000, **78** :43 ~ 49
- [ 7 ] ZHAO L Q(赵良启), TIAN J S(田杰生) *et al.* Studies on the fermentation of synthesizing poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) by *Xanthobacter autotrophicus*. *Acta Microbiol Sinica(微生物学报)*, 1996, **36** :351 ~ 359
- [ 8 ] Steinbüchel A, Fuchtenbusch B, Bacterial and other biological synthesis for polyester production. *Trends in Biotechnol*, 1988, **16** :419 ~ 427
- [ 9 ] Liu S J, Steinbüchel A. Exploitation of butyrate kinase and phosphotransbutyrylase from *Clostridium acetobutylicum* for the *in vitro* biosynthesis of poly(hydroxyalkanoic acid). *Appl Microbiol Biotech*, 2000, **53** :545 ~ 552
- [ 10 ] Senior P J, Dawes E A, The regulation of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate metabolism in *Azotobacter beijerinckii*. *Biochem J*, 1973, **134** :225 ~ 238
- [ 11 ] Slater S C, Voice W H, Dennis D E. Cloning and expression in *Escherichia coli* of the *Alcaligenes eutrophus* H16 poly- $\beta$ -hydroxybutyrate biosynthetic pathway. *J Bacteriol*, 1988, **170** :4431 ~ 4436
- [ 12 ] Liu S J, Steinbüchel A. A novel genetically engineered pathway for synthesis of poly(hydroxyalkanoic acid) in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*, 2000, **66** :739 ~ 743
- [ 13 ] Zhang H, Obias V, Gonyer K, Dennis D E. Production of poly( $\beta$ -hydroxyalkanoates) in sucrose-utilizing recombinant *Escherichia coli* and *Klebsiella strains*. *Appl Environ Microbiol*, 1994, **60** :1198 ~ 1205
- [ 14 ] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Ana Biochem*, 1976, **72** :248 ~ 254
- [ 15 ] Rehm B H A, Krüger N, Steinbüchel A. A new metabolic link between fatty acid *de novo* synthesis and polyhydroxyalkanoic acid synthesis. *J Biol Chem*, 1998, **273** :24044 ~ 24051
- [ 16 ] Sun W, Cao J G, Meighen E A. Biosynthesis of poly-3-hydroxybutyrate in the luminescent bacterium *Vibrio harveyi* and regulation by the autoinducer, N-(3-hydroxybutanyl)homoserine lactone. *J Biol Chem*, 1994, **269** :20785 ~ 20790
- [ 17 ] Huijberts G N, de Rijk T C, de Waard P, Eggink G. <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance studies of *Pseudomonas putida* fatty acid metabolic routes involved in poly(3-hydroxyalkanoate) synthesis. *J Bacteriol*, 1994, **176** :1661 ~ 1666
- [ 18 ] Lee H J, Choi M H, Kim T U, Yoon S C. Accumulation of polyhydroxyalkanoic acid containing large amounts of unsaturated monomers in *Pseudomonas fluorescens* BM07 utilizing saccharides and its inhibition by 2-bromooctanoic acid. *Appl Environ Microbiol*, 2001, **67** :4963 ~ 4974
- [ 19 ] Heidelberg, J F, Eisen J A *et al.* DNA sequence of both chromosomes of the cholera pathogen *Vibrio cholerae*, *Nature*, 2000, **406** :477 ~ 484

## Biosynthesis and Accumulation of Poly( 3-hydroxybutyrate ) in *Vibrio natriegens*

LIU Shuang-Jiang\*

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

**Abstract** Accumulation of poly( 3-hydroxybutyrate ) [ poly( 3HB ) ] by *V. natriegens* was studied. Results indicated that *V. natriegens* used glucose , gluconate , fructose and molasses as carbon sources for poly( 3HB ) synthesis. When molasses was used , up to 28.4% of poly( 3HB ) to cellular dry weight was accumulated. The accumulation of poly( 3HB ) followed , was not simultaneously to , the cell growth. Analysis of the PHA polymerase ,  $\beta$ -ketothiolase , and acetoacetyl-CoA reductase showed that the poly( 3HB ) accumulation was correlated to the increase of their activities in cells. Poly( 3HB ) accumulation was also related to the *de novo* fatty acid synthesis , as revealed by the results that cerulenin , a specific inhibitor to the *de novo* fatty acid synthesis , significantly reduced accumulation of poly( 3HB ). Based on the results from this study , the synthetic pathway of poly( 3HB ) was proposed.

**Key words** *V. natriegens* , poly( 3-hydroxybutyrate ) , synthetic pathway.

**Acknowledgements** : This work was conducted in the James Madison University ( USA ). The valuable suggestions from Prof. D. Dennis at the biology department and the financial support from the University are highly appreciated. The financial support from the Young Talent Project of the Chinese Academy of Sciences ( 2000 ) makes this publication possible.

Received : 04-05-2002

\* Corresponding author. Tel/Fax : 86-10-62652317 ;E-mail : shuangjiang@hotmail.com

## 面向 21 世纪的农业生物技术

2002 年 8 月 12 日中国工程院在北京举行了第 19 场“工程技术论坛”,中心议题是“面向 21 世纪的农业生物技术”。中外科学家在大会上将自己的研究成果向大会作了报告。范云六院士和旭日干院士分别主持上下午的报告会,并进行研讨,出席会议者踊跃发言,提出了自己感兴趣的问题,报告者一一作解答。报告的内容有: <1> 转基因植物及其基础科学发现和应用中的作用( Pau Christou 教授,德国法兰克福分子生物技术及应用生态研究所所长); <2> 通过 T-DNA 标签技术研究水稻功能基因组( Gynheung An 教授,韩国 Pohang 科技大学生物技术学院院长); <3> PEAMT 基因沉默导致拟南芥温敏雄性不育( 李家洋教授,中国科学院遗传与发育生物学研究所所长); <4> 棉纤维发育过程中特异表达基因的大规模克隆与功能分析( 朱玉贤教授,北京大学蛋白质工程及植物基因工程重点实验室); <5> 提高卵母细胞体外培养成熟质量的生理基础( 夏国良教授,中国农业大学生物学院); <6> 真核生物反应器生产植酸酶( 姚斌教授,中国农业科学院饲料研究所); <7> 植物对非生物逆境的反应( 陈受宜教授,中国科学院遗传与发育生物学研究所); <8> 转基因植物的发展与生物安全( 黄大昉教授,中国农业科学院生物技术研究所所长); <9> 动物克隆技术研究的历史现状与展望( 谭景和教授,山东农业大学动物科技学院); <10> 动物基因组学研究进展( 李宁教授,中国农业大学生物技术国家重点实验室副主任)。上述这些报告均有中英文摘要,供与会者参阅。

( 柯为 供稿 )