

盐单胞菌利用短链脂肪酸合成聚羟基脂肪酸酯

陈文广, 刘子鹤, 李正军

北京化工大学 生命科学与技术学院, 北京 100029

陈文广, 刘子鹤, 李正军. 盐单胞菌利用短链脂肪酸合成聚羟基脂肪酸酯. 生物工程学报, 2022, 38(4): 1527-1536.
CHEN WG, LIU ZH, LI ZJ. *Halomonas* uses short-chain fatty acids to synthesize polyhydroxyalkanoates. Chin J Biotech, 2022, 38(4): 1527-1536.

摘要: 盐单胞菌 (*Halomonas*) 能够利用多种底物为碳源生长, 由于其能在高盐条件下进行不灭菌的开放发酵, 已被开发用作下一代生物技术的底盘细胞。包括乙酸、丙酸和丁酸在内的短链挥发性脂肪酸能够以生物质为原料制备, 有望成为用于微生物发酵的新型碳源。利用 10–50 g/L 浓度的丁酸为碳源对 *Halomonas* sp. TD01 和 TD08 进行摇瓶培养, 结果发现 *Halomonas* sp. TD01 和 TD08 能够有效利用丁酸合成聚-3-羟基丁酸酯, 20 g/L 丁酸获得的聚酯产量最高, 分别达到 9.12 g/L 和 7.37 g/L; 更高浓度的丁酸抑制了细胞生长, 50 g/L 丁酸条件下的聚酯产量下降至 4.00 g/L 以下。此外, *Halomonas* sp. TD08 可以利用丁酸和丙酸为混合碳源合成 3-羟基丁酸和 3-羟基戊酸共聚酯, 但丙酸对细胞生长具有较大毒性, 2 g/L 丙酸和 20 g/L 丁酸为混合碳源时的细胞干重仅为 0.83 g/L, 聚酯产量仅为 0.15 g/L。通过添加甘油为辅助碳源, 明显改善了细胞生长, 使得共聚酯的产量提高至 3.95 g/L, 其中 3-羟基戊酸单体含量为 8.76 mol%。短链挥发性脂肪酸在盐单胞菌生产聚羟基脂肪酸酯中具有良好的应用前景。

关键词: 盐单胞菌; 乙酸; 丙酸; 丁酸; 聚羟基脂肪酸酯

Halomonas uses short-chain fatty acids to synthesize polyhydroxyalkanoates

CHEN Wenguang, LIU Zihe, LI Zhengjun

College of Life Science and Technology, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China

Abstract: *Halomonas* can grow on diverse carbon sources. As it can be used for unsterile fermentation

Received: October 12, 2021; Accepted: January 19, 2022

Supported by: National Key Research and Development Program of China (2018YFA0900200)

Corresponding author: LI Zhengjun. E-mail: lizj@mail.buct.edu.cn

基金项目: 国家重点研发计划 (2018YFA0900200)

under high-salt conditions, it has been applied as a chassis for next-generation industrial biotechnology. Short-chain volatile fatty acids, including acetate, propionate, and butyrate, can be prepared from biomass and are expected to be novel carbon sources for microbial fermentation. *Halomonas* sp. TD01 and TD08 were subjected to shaking culture with 10–50 g/L butyrate, and they were found to effectively synthesize poly-3-hydroxybutyrate with butyrate as the carbon source. The highest yield of poly-3-hydroxybutyrate was achieved at butyrate concentration of 20 g/L (9.12 g/L and 7.37 g/L, respectively). Butyrate at the concentration >20 g/L inhibited cell growth, and the yield of poly-3-hydroxybutyrate decreased to <4 g/L when butyrate concentration was 50 g/L. Moreover, *Halomonas* sp. TD08 can accumulate the copolymer of 3-hydroxybutyrate and 3-hydroxyvalerate by using propionate and butyrate as carbon sources. However, propionate was toxic to cells. To be specific, when 2 g/L propionate and 20 g/L butyrate were simultaneously provided, cell dry weight and polymer titer were 0.83 g/L and 0.15 g/L, respectively. The addition of glycerol significantly improved cell growth and boosted the copolymer titer to 3.95 g/L, with 3-hydroxyvalerate monomer content of 8.76 mol%. Short-chain volatile fatty acids would be promising carbon sources for the production of polyhydroxyalkanoates by *Halomonas*.

Keywords: *Halomonas*; acetate; propionate; butyrate; polyhydroxyalkanoate

塑料及其制品已经深入到国民经济的各个领域,在包装、建材、汽车、农业和电气等行业都有不可替代的应用,给人们的日常生活带来了极大的便利。由于传统塑料难以降解,其在环境中的累积已经成为日益严重的生态问题^[1]。2021年,被认为是史上最严的“限塑令”在中国正式实施,一次性的不可降解塑料吸管和包装袋等在特定场所严禁使用^[2]。开发生物可降解的绿色环保塑料,成为科学界和产业界广泛关注的热门领域。聚羟基脂肪酸酯(polyhydroxyalkanoates,简称PHA)是一大类生物基的高分子材料,作为微生物(主要是细菌)在特定环境(营养或代谢不平衡)下的碳源和能量储备物质被合成^[3]。PHA有着与传统石油基塑料相似的材料学特征,同时兼具生物可降解性、生物可再生性和生物相容性,被认为是最有希望替代传统石油来源不可降解塑料的生物塑料之一^[4]。根据单体碳原子数的多少,PHA被分为短链PHA聚酯(单体碳链长度

一般为3–5)和中长链PHA聚酯(单体碳链长度在6–14之间)。根据单体的不同排列方式,PHA被分为均聚物、无规共聚物和嵌段共聚物^[5]。目前,商业化的PHA生产经历了聚-3-羟基丁酸酯(poly-3-hydroxybutyrate,简称PHB)、聚-3-羟基丁酸-3-羟基戊酸酯(poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate),简称PHBV)、聚-3-羟基丁酸-3-羟基己酸酯(poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate),简称PHBHHx)、聚-3-羟基丁酸-4-羟基丁酸酯(poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate),简称P3HB4HB)等几代材料的发展。目前,PHA的生产成本仍然高于石油来源的不可降解塑料材料,影响了其大规模产业化进程^[6]。

微生物发酵生产PHA的成本包括原料消耗和分离提取等方面,其中原料成本约占30%–50%。传统生产采取单一菌种进行,灭菌和发酵过程的能源消耗也是生产成本的主要环节^[6]。为减少能源消耗和规避染菌风险,利用

抗污染的极端微生物作为底盘细胞,进行代谢工程改造用于发酵生产 PHA 成为研究热点^[7]。筛自新疆艾丁湖的盐单胞菌 *Halomonas* sp. TD01 可以在高盐、高碱和限氮的环境下合成接近细胞干重 90% 的 PHB,并且在 中试规模的开放式不灭菌连续发酵中仍保持良好的生产稳定性,发酵过程的能源消耗大大减少^[8]。适用于盐单胞菌的 CRISPR/Cas9 基因编辑技术^[9]、接合转化^[10]和电转化^[11]、组成型和诱导型表达系统^[12]等多种分子生物学改造技术被成功开发,以此为基础盐单胞菌被改造合成出一系列的 PHA 材料。例如,编码 2-甲基柠檬酸合酶的基因敲除使得更多的丙酸流向 3-羟基戊酸单体的聚合,获得的盐单胞菌 (*Halomonas* sp.) TD04 能够合成出聚-3-羟基丁酸-3-羟基戊酸酯,其中 3-羟基戊酸单体含量超过 30 mol%^[10]。在盐单胞菌中表达 4-羟基丁酰辅酶 A: 辅酶 A 转移酶基因 *orfZ*, 获得的重组菌在分批补料发酵中合成出超过 80 g/L 的聚-3-羟基丁酸-4-羟基丁酸酯,其中 4-羟基丁酸单体含量超过 10 mol%^[13]。此外,缺失盐单胞菌天然 *phaC* 基因并表达来自嗜水气单胞菌 4AK4 的异源 PHA 合酶 (PhaC) 和烯酰辅酶 A 水合酶 (PhaJ),使其能够合成出聚-3-羟基丁酸-3-羟基己酸酯和聚-3-羟基丁酸-3-羟基己酸-5-烯酸酯^[14]。

已发表的关于盐单胞菌生产聚羟基脂肪酸酯的研究主要以葡萄糖等为碳源进行发酵^[8,10,14-16]。由于葡萄糖主要来源于淀粉等,用于发酵原料生产生物塑料存在“与人争粮”“与粮争地”的难题。包括厨余垃圾、城市垃圾、农业废料和造纸污水等废弃物中的有机物在厌氧条件下能被微生物降解并产生短链脂肪酸^[17],如乙酸、丙酸和丁酸等^[18-20]。使用源自废弃原料的短链脂肪酸生产聚羟基脂肪酸酯,既能降低原料成本,又有助于缓解废弃物处理的环境压力,有望成

为一种廉价、环保的聚羟基脂肪酸酯生产方式^[17]。以丁酸为底物,海神单胞菌 (*Neptunomonas concharum*) 在不灭菌的开放发酵中能够合成聚-3-羟基丁酸酯,5 L 发酵罐培养的产量为 15.51 g/L^[21]。罗氏真养菌 (*Ralstonia eutropha*) Re2133/pCB81 利用短链脂肪酸等为碳源能够合成出聚-3-羟基丁酸-3-羟基己酸酯、聚-3-羟基丁酸-3-羟基戊酸-3-羟基己酸酯,产量分别为 0.57 g/L 和 0.35 g/L^[22]。地中海富盐菌 (*Haloferax mediterranei*) 能够利用乙酸、丙酸和丁酸混合物生长并合成约 1.57 g/L 聚-3-羟基丁酸-3-羟基戊酸酯^[23]。

本文开展了盐单胞菌 TD01 和 TD08 利用短链脂肪酸为碳源合成聚羟基脂肪酸酯的研究(图 1)。研究发现盐单胞菌 TD01 和 TD08 对丁酸具有较好的耐受性和利用能力,合成出较高产量的聚-3-羟基丁酸酯。添加丙酸为前体,盐单胞菌 TD08 能够合成出聚-3-羟基丁酸-3-羟基戊酸酯,但丙酸对细菌生长具有较大毒性。采用底物共利用策略,添加甘油为辅助碳源,在一定程度上改善了丙酸对细胞生长的负面影响(图 1)。盐单胞菌 TD01 具有较为广泛的底物利用谱^[24],但是目前还没有其以丁酸为主要碳源合成聚羟基脂肪酸酯的报道。本研究为未来进一步降低聚羟基脂肪酸酯的成本提供了一种新的选择。

1 材料与方法

1.1 菌株

本实验所用菌株为盐单胞菌 (*Halomonas* sp.) TD01^[8]和 TD08^[10],菌株均由清华大学陈国强教授课题组提供。*Halomonas* sp. TD01 为野生型菌株,*Halomonas* sp. TD08 为 *prpC* 和 3 个 *phaZ* 基因缺失的 *Halomonas* sp. TD01 突变体。

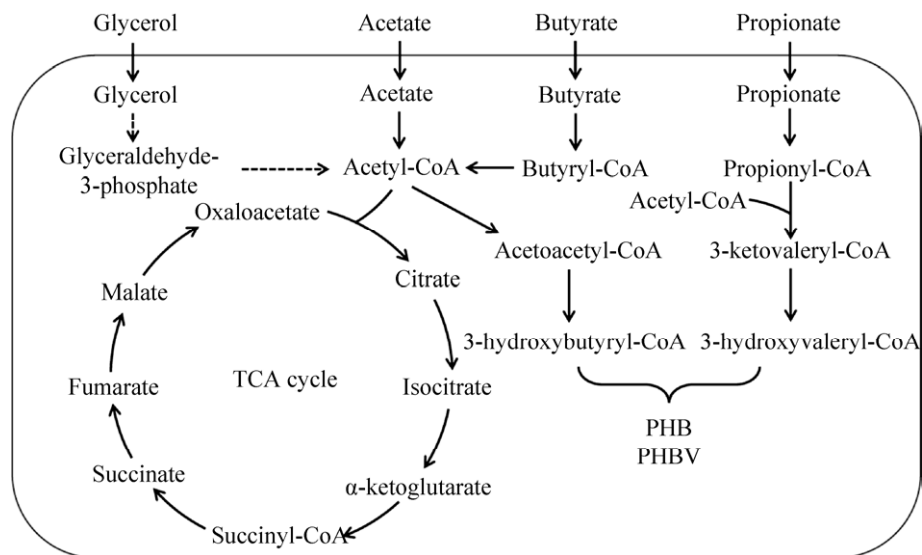


图1 盐单胞菌利用短链脂肪酸等为碳源合成 PHB/PHBV 的代谢途径

Figure 1 PHB/PHBV biosynthesis pathway in *Halomonas* cultured with short-chain fatty acids.

1.2 摇瓶培养条件

本实验所用LB培养基含有胰蛋白胨 10 g/L、酵母提取物 5 g/L 和 NaCl 10 g/L。60LB 培养基衍生自 LB 培养基，其中 NaCl 浓度提高到 60 g/L。60MM 培养基衍生自 60-MMG 培养基^[8]，含有 NaCl 60 g/L、酵母提取物 0.5 g/L、溶液 I 10 mL/L、溶液 II 10 mL/L、溶液 III 10 mL/L、溶液 IV 1 mL/L；其中溶液 I 为不同浓度的碳源（包括丁酸、丙酸或者甘油等），溶液 II 为 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 9.85 g/L、 KH_2PO_4 1.5 g/L、 NH_4Cl 1 g/L、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.4 g/L，溶液 III 为 $\text{Fe(III)-NH}_4\text{-citrate}$ 5 g/L、 CaCl_2 2 g/L，溶液 IV 为 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g/L、 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.03 g/L、 H_3BO_3 0.3 g/L、 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g/L、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g/L、 $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.02 g/L、 $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.03 g/L，60MM 培养基使用 5 mol/L NaOH 调节 pH 值约 9.0。

对于盐单胞菌摇瓶培养合成 PHA 的实验，首先将盐单胞菌甘油储存物接种至 60LB 培养基中，接种体积比为 1%，在 37 °C、200 r/min 条件下培养 12 h，获得活化的种子培

养物。随后将种子培养物接种到 60MM 培养基，接种体积比为 4%，在 37 °C、200 r/min 条件下进行摇瓶发酵培养。

1.3 生长曲线和细胞干重的测定

摇瓶培养过程中，采用 Thermo Scientific BioMate 3S 分光光度计测定细菌的 OD_{600} 。摇瓶培养结束后，在 10 000 r/min 条件下离心 8 min 收集细胞，用去离子水将细胞沉淀洗涤 2 次。将菌体细胞置于冷冻干燥机中冻干至恒重，通过称重对应体积冻干的细胞重量来计算摇瓶培养得到的细胞干重 (cell dry weight, CDW)。

1.4 PHA 定量分析

将 30 mg 左右冻干后的细胞放入酯化管中，加入 2 mL 酯化试剂（在甲醇中加入 3% 的 H_2SO_4 和 1 g/L 的苯甲酸）、2 mL 氯仿，密闭，在 100 °C 下反应 4 h，将聚羟基脂肪酸酯降解为单体并酯化得到羟基脂肪酸甲酯。利用气相色谱法测定羟基脂肪酸甲酯的含量，采用内标法计算 PHA 的质量和其在菌体细胞中的含量^[25]。气相色谱法的标品为聚-3-羟基丁酸-3-羟基戊酸酯，购自 Sigma-aldrich 公司。

1.5 甘油和挥发性脂肪酸的定量分析

将发酵液在 12 000 r/min 条件下离心 5 min, 得到上清液, 经 0.22 μm 滤膜过滤后放置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中待测。通过高效液相色谱法测定发酵液中丁酸、丙酸和甘油的浓度, 采用离子交换柱 (HPX 87H, BioRad, 美国) 和示差折光检测器进行。流动相为 5 mmol/L H_2SO_4 , 流速为 0.6 mL/min。柱温保持在 55 $^{\circ}\text{C}$ 。

2 结果与分析

2.1 盐单胞菌以丁酸为碳源合成 PHB

盐单胞菌已经被深入改造用于聚羟基脂肪酸酯的生产, 以往的多数研究以葡萄糖为主要

碳源^[26]。挥发性脂肪酸可以由废弃生物质资源经过微生物厌氧发酵获得, 主要成分是乙酸、丙酸和丁酸等^[27]。目前还没有盐单胞菌利用丁酸为碳源发酵的报道, 因此本文首先选择丁酸作为唯一碳源培养盐单胞菌, 研究其细胞生长和 PHA 积累情况。在不同丁酸浓度 (10–50 g/L) 的摇瓶培养实验中, 盐单胞菌 TD01 能够以丁酸为碳源较好地生长, 但细胞生长速度随着丁酸浓度的增加而逐渐降低。当丁酸浓度为 10 g/L 时, 在 36 h 左右消耗完毕; 当丁酸浓度为 20 g/L 时, 经过 72 h 培养消耗绝大多数碳源; 30 g/L 及以上的丁酸会抑制细胞的生长, 导致最终细胞生物量有所降低 (图 2A、2B)。盐单胞菌

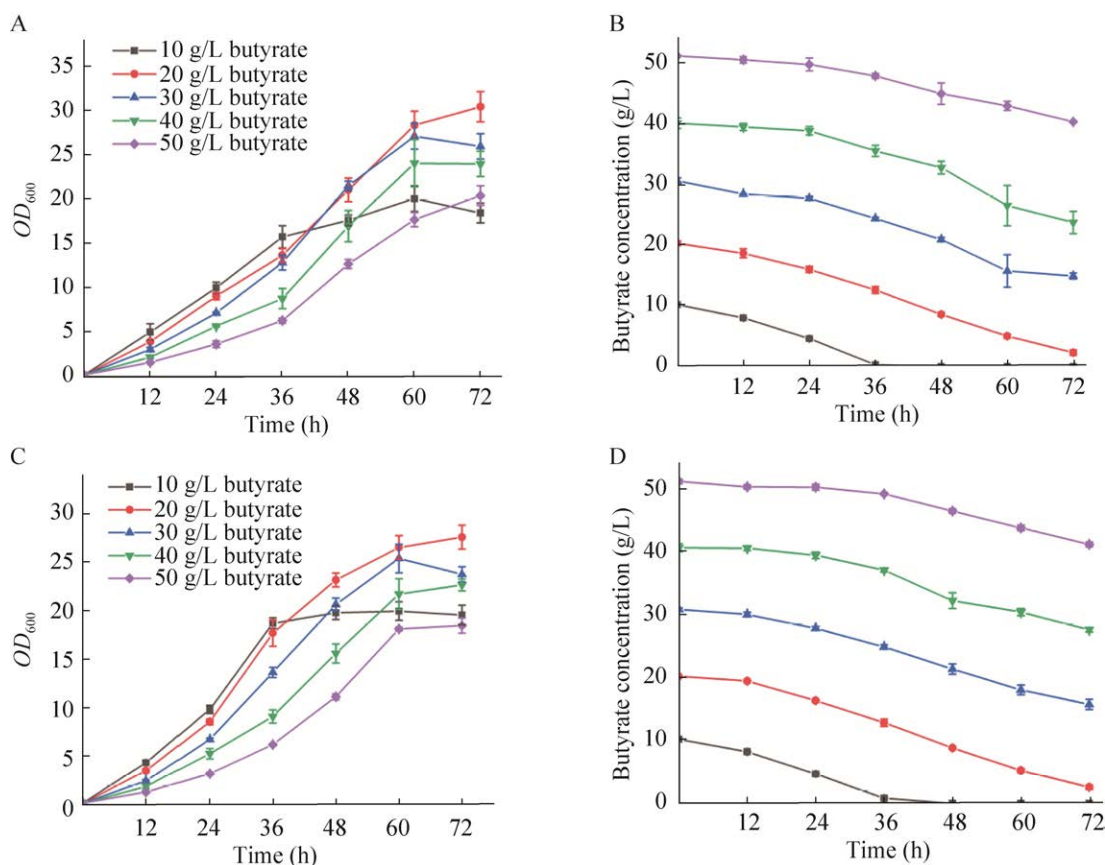


图 2 丁酸为碳源时盐单胞菌 TD01 和 TD08 的细胞生长和底物消耗情况

Figure 2 Growth and carbon consumption of *Halomonas* sp. TD01 and TD08 cultured with butyrate. (A) Growth curve of *Halomonas* sp. TD01. (B) Butyrate consumption of *Halomonas* sp. TD01. (C) Growth curve of *Halomonas* sp. TD08. (D) Butyrate consumption of *Halomonas* sp. TD08. Shake culture experiments were performed at 37 $^{\circ}\text{C}$ and 200 r/min. Data are expressed as averages and standard deviations of three parallel experiments.

TD01 能够利用丁酸在细胞内积累聚-3-羟基丁酸酯, 20 g/L 丁酸条件下的产量最高, 达 9.12 g/L, 此时聚酯在菌体内的含量超过 80% (表 1)。超过此浓度, 聚-3-羟基丁酸酯合成受到抑制, 产量逐渐降低, 主要原因是高浓度丁酸抑制了细胞生长 (表 1)。

另外一株盐单胞菌 TD08 (*prpC* 和 3 个 *phaZ* 基因缺失的 *Halomonas* sp. TD01 突变体) 在不同浓度丁酸条件下的细胞生长和聚-3-羟基丁酸酯积累情况与 TD01 十分相似。丁酸浓度为 20 g/L 时, 细胞干重和聚-3-羟基丁酸酯产量均达到最大值, 分别为 10.01 g/L 和 7.37 g/L。当丁酸浓度持续增加时, 盐单胞菌 TD08 的生长受到抑制, 细胞干重和聚酯产量均显著降低 (图 2C、2D, 表 1)。以上结果表明, 丁酸是盐单胞菌 TD01 和 TD08 细胞生长与聚-3-羟基丁酸酯合成的极佳碳源, 但是过高浓度会抑制细菌生长, 发酵时可采取分批或者流加的方式减轻其抑制作用。

盐单胞菌能在高盐和高碱条件下生长, 因此可用作不灭菌的开放发酵培养而降低能源消

耗^[6]。有报道表明, 丁酸对常见的细菌有较大的毒害作用, 超过 5 g/L 的丁酸会严重抑制大肠杆菌生长^[21]。当用丁酸作为发酵碳源时, 盐单胞菌进行不灭菌发酵的染菌风险会进一步降低。从这方面考虑, 丁酸比葡萄糖作为不灭菌发酵的碳源更有优势。此外, 由葡萄糖到聚-3-羟基丁酸酯的理论得率为 0.48 g/g, 而由丁酸到聚-3-羟基丁酸酯的理论得率为 0.65 g/g。化学法生产的丁酸价格是葡萄糖的两倍多, 但以废弃生物质资源为原料发酵得到的挥发性脂肪酸价格据估算只有葡萄糖的 10%^[21]。对盐单胞菌来说, 丁酸可能是较为理想的替代葡萄糖来生产聚羟基脂肪酸酯的碳源。

2.2 盐单胞菌以丙酸和丁酸为混合碳源合成 PHBV

与聚-3-羟基丁酸酯 PHB 相比, 聚-3-羟基丁酸-3-羟基戊酸酯 PHBV 的应用范围更广, 因为 3-羟基戊酸单体的掺入降低了材料的结晶度, 使得共聚酯的拉伸性能明显提升, 且共聚酯中不同的单体比例也能使得材料的物化性能和机械性能在一定范围内调节^[28]。通过在培养

表 1 丁酸为碳源时盐单胞菌 TD01 和 TD08 的细胞干重和聚-3-羟基丁酸酯积累

Table 1 Cell dry weight and PHB accumulation of *Halomonas* sp. TD01 and TD08 cultured with butyrate

Butyrate (g/L)	Cell dry weight (g/L)	PHB titer (g/L)	PHB content (wt%)
TD01			
10	5.82±0.08	3.02±0.12	51.84±1.91
20	10.89±0.21	9.12±0.38	83.74±1.90
30	9.78±0.18	7.24±0.36	74.14±4.80
40	8.62±0.26	4.55±0.27	52.81±1.72
50	7.19±0.29	3.74±0.22	51.92±1.01
TD08			
10	6.66±0.08	3.96±0.08	59.55±0.85
20	10.01±0.40	7.37±0.04	73.71±3.13
30	7.99±0.09	6.06±0.39	75.81±4.61
40	7.32±0.17	5.17±0.43	70.23±3.83
50	6.11±0.04	3.96±0.30	64.79±4.63

Shake flask experiments were performed at 37 °C and 200 r/min. Data are expressed as averages and standard deviations of three parallel experiments.

过程中添加前体原料或改造微生物的代谢途径,可以产生多种共聚酯^[29-31]。对于盐单胞菌 TD01,在葡萄糖和丙酸混合碳源培养时能够积累聚-3-羟基丁酸-3-羟基戊酸酯,且共聚酯中 3-羟基戊酸单体含量随丙酸浓度的增加而增加。在该菌株中敲除 *prpC* 基因得到 TD08,阻断丙酸的消耗,可以在较低的丙酸浓度下得到较高的 3-羟基戊酸单体含量^[10]。

以丁酸和丙酸作为混合碳源培养盐单胞菌 TD01 和 TD08,丁酸浓度为 20 g/L,丙酸浓度为 0.5–2.0 g/L,研究盐单胞菌的细胞生长和聚酯积累情况。实验结果表明,在 2.0 g/L 范围内,丙酸浓度的增加对盐单胞菌 TD01 的细胞生长和聚酯积累没有明显的影响,细菌合成的是聚-3-羟基丁酸酯,提示在该条件下,丙酸主要经由 β -氧化途径被细菌分解利用,没有用作 3-羟基戊酸聚合的前体(表 2)。对于盐单胞菌 TD08,添加 0.5–2.0 g/L 的丙酸能够合成出聚-3-羟基丁酸-3-羟基戊酸酯 PHBV,且 3-羟基戊酸单体含量随着丙酸的增加而提高,但是丙酸对盐单胞菌 TD08 有强烈的抑制作用。随着丙酸浓度的增加,细胞干重和聚酯合成显著下降。

例如,当丙酸浓度为 0.5 g/L 时,细胞干重为 7.80 g/L,聚酯含量为 77.11%;当丙酸浓度提高到 1.5 g/L 时,细胞干重仅为 1.02 g/L,聚酯含量下降到 18.57% (表 2)。过高浓度的丙酸不利于重组细菌的生长和聚羟基脂肪酸酯的合成。

盐单胞菌 TD08 中编码 2-甲基柠檬酸合酶的基因 *prpC* 被敲除,从而使丙酸活化后的产物丙酰辅酶 A 主要经由 3-酮硫解酶 (PhaA) 和乙酰乙酰辅酶 A 还原酶 (PhaB) 催化转化为 3-羟基戊酰辅酶 A,再由 PHA 聚合酶 (PhaC) 催化合成 PHBV, *prpC* 的敲除阻断了丙酰辅酶 A 的内源分解代谢(图 1)。不过,由于细胞分流代谢丙酸的能力丧失,导致盐单胞菌 TD08 比野生型菌株对丙酸更加敏感,在低浓度下就表现出更强的细胞毒性。

2.3 盐单胞菌利用多种底物合成 PHA

利用几种碳源为混合底物共同培养微生物时,不同底物可以进入各自的代谢途径,有可能满足细胞生长和聚羟基脂肪酸酯及其不同单体合成的多种需要,有利于细胞生长和提高聚酯产量。在丁酸和丙酸混合碳源的基础上,本文进一步研究了添加乙酸和甘油等对细胞生长与聚酯合成的影响。

表 2 丙酸浓度对盐单胞菌 TD01 和 TD08 产生 PHBV 的影响

Table 2 Effects of propionate concentration on PHBV production by *Halomonas* sp. TD01 and TD08

Propionate (g/L)	Cell dry weight (g/L)	PHBV titer (g/L)	PHBV content (wt%)	3HV content (mol%)
TD01				
0.5	10.53±0.34	6.39±0.52	60.61±3.02	0
1.0	10.61±0.17	7.70±0.34	72.62±3.70	0
1.5	10.14±0.35	5.89±0.40	58.08±2.21	0
2.0	10.26±0.36	6.01±0.47	57.49±3.24	0
TD08				
0.5	7.80±0.14	6.01±0.35	77.11±5.93	6.18±0.14
1.0	5.11±0.09	2.95±0.11	57.77±3.14	8.93±0.48
1.5	1.02±0.05	0.19±0.02	18.57±1.75	15.88±0.66
2.0	0.83±0.02	0.15±0.01	18.01±1.02	13.38±0.73

Shake flask experiments were performed at 37 °C and 200 r/min. Data are expressed as averages and standard deviations of three parallel experiments.

2.3.1 乙酸共利用

除丙酸和丁酸外, 乙酸也是生物质厌氧发酵产生的短链挥发性脂肪酸的主要成分^[19]。盐单胞菌 TD01 已被证实可以利用乙酸为碳源合成聚-3-羟基丁酸酯^[24]。通过 NCBI 数据库, 在盐单胞菌 TD01 中鉴定出了几个乙酸利用基因, 包括乙酰辅酶 A 合成酶 (*acsA*, GenBank: EGP21698.1)、乙酸激酶 (*ackA*, GenBank: EGP18271.1, EGP20583.1) 和磷酸乙酰转移酶 (*pta*, GenBank: EGP20582.1)。本文研究了乙酸、丙酸和丁酸混合碳源对盐单胞菌 TD08 细胞生长和聚酯合成的影响 (表 3)。研究发现, 在含有丙酸和丁酸混合碳源的培养基中额外添加了 5 g/L 乙酸后, 细胞生长情况明显改善。例如, 丙酸和丁酸浓度分别为 2 g/L、20 g/L, 添加乙酸后细胞干重由 0.83 g/L 提高到 4.16 g/L。但是, 盐单胞菌 TD08 在乙酸、丙酸和丁酸的混合碳源中积累的聚酯为聚-3-羟基丁酸酯均聚物, 没有检测到 3-羟基戊酸单体的掺入, 表明在该条件下盐单胞菌主要以乙酸和丁酸为碳源生长。

2.3.2 甘油共利用

甘油也是一种被广泛应用的发酵碳源。生物柴油生产过程中会产生大量的废甘油, 是有较好应用前景的大宗廉价发酵原料^[32]。甘油已被用于聚羟基脂肪酸酯的生物合成。例如, 有机酸与甘油共同培养使恶臭假单胞菌 mt-2 的聚羟基脂肪酸酯含量增加, 单独提供辛酸时, 细胞聚酯含量为 32%, 而辛酸与甘油共培养时,

细胞聚酯含量为 42%^[33]。

盐单胞菌 TD01 中含有甘油代谢相关基因, 在甘油激酶 (GlpK, GenBank: EGP18204) 和甘油-3-磷酸脱氢酶 (GPD, GenBank: EGP21016, EGP18205) 催化下, 可以将甘油转变成 3-磷酸甘油醛, 进入糖酵解途径分解 (图 1)。本文研究了甘油、丙酸和丁酸混合碳源对盐单胞菌 TD08 细胞生长和聚酯合成的影响 (表 4)。与添加 5 g/L 乙酸相似, 在含有丙酸和丁酸混合碳源的培养基中额外添加 5 g/L 甘油后, 细胞生长和聚酯合成得到明显改善。例如, 丙酸和丁酸浓度分别为 2 g/L 和 20 g/L, 添加甘油后细胞干重由 0.83 g/L 提高到 4.91 g/L, 细胞合成出聚-3-羟基丁酸-3-羟基戊酸酯, 含量为 80.32%, 其中 3-羟基戊酸单体含量为 8.76 mol%。当用 5 g/L 丙酸、20 g/L 丁酸和 5 g/L 甘油为混合碳源进行聚酯合成时, 细胞干重为 3.72 g/L, 聚酯含量为 46.29%, 其中 3HV 含量提高到 13.15 mol%。添加甘油为辅助碳源提高了盐单胞菌 TD08 对丙酸的耐受性, 但是具体机制尚需进一步地深入探索。为了研究盐单胞菌对不同碳源利用的底物偏好性, 将 TD08 在含有乙酸、丙酸、甘油和丁酸等 4 种碳源的培养基中进行摇瓶培养, 定时取样检测碳源随时间的消耗情况 (图 3)。结果发现, 乙酸和甘油被优先利用且速度较快, 5 g/L 乙酸和 5 g/L 甘油在 36 h 内被消耗完, 丙酸和丁酸的消耗速率较乙酸和甘油的低。

表 3 *Halomonas sp.* TD08 共利用乙酸、丙酸和丁酸合成 PHA

Table 3 PHA production by *Halomonas sp.* TD08 cultured with acetate, propionate, and butyrate

Propionate (g/L)	Butyrate (g/L)	Acetate (g/L)	Cell dry weight (g/L)	PHB titer (g/L)	PHB content (wt%)
0	20	5	11.72±0.32	10.38±0.08	88.62±1.75
2	20	5	4.16±0.13	1.95±0.12	46.83±2.47
3	20	5	3.95±0.03	2.06±0.12	52.04±3.18
4	20	5	3.82±0.05	1.79±0.14	46.81±3.77
5	20	5	3.69±0.05	1.83±0.08	49.62±2.38

Shake flask experiments were performed at 37 °C and 200 r/min. Data are expressed as averages and standard deviations of three parallel experiments.

表 4 *Halomonas* sp. TD08 共利用甘油、丙酸和丁酸合成 PHATable 4 PHA production by *Halomonas* sp. TD08 cultured with glycerol, propionate, and butyrate

Propionate (g/L)	Butyrate (g/L)	Glycerol (g/L)	CDW (g/L)	PHBV titer (g/L)	PHBV (wt%)	3HV content (mol%)
0	20	5	10.68±0.10	9.30±0.16	87.11±1.20	0
2	20	5	4.91±0.11	3.95±0.22	80.32±3.07	8.76±0.55
3	20	5	4.00±0.12	2.26±0.08	56.64±3.84	10.34±0.63
4	20	5	3.79±0.09	1.90±0.12	50.08±3.43	11.68±0.70
5	20	5	3.72±0.03	1.72±0.08	46.29±1.97	13.15±0.76

Shake flask experiments were performed at 37 °C and 200 r/min. Data are expressed as averages and standard deviations of three parallel experiments.

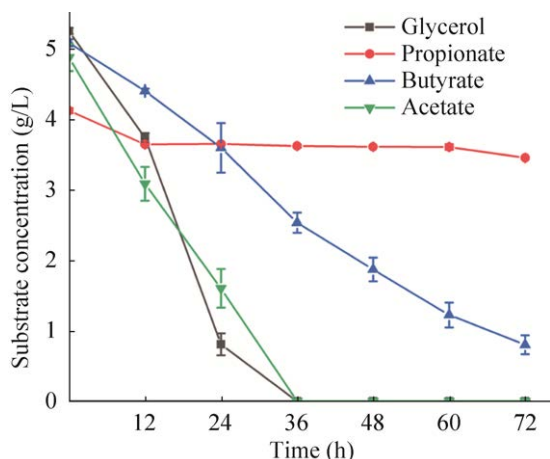


图 3 盐单胞菌 TD08 对不同底物利用的偏好

Figure 3 Substrate preference of *Halomonas* sp. TD08. Shaking culture experiments were performed at 37 °C and 200 r/min. Data are expressed as averages and standard deviations of three parallel experiments.

3 总结

盐单胞菌 TD01、TD08 被证明可以有效利用丁酸生产聚-3-羟基丁酸酯 PHB。在摇瓶培养中,盐单胞菌 TD01、TD08 可以耐受高浓度丁酸,并将丁酸转化为 PHB,产量分别达到 9.12 g/L、7.37 g/L。向培养基补充丙酸后,盐单胞菌 TD01 合成的聚酯中未检测到 3-羟基戊酸单体,而盐单胞菌 TD08 可以生产聚-3-羟基丁酸-3-羟基戊酸酯 PHBV,但其生长被严重抑制。通过采取底物共培养策略来改善盐单胞菌 TD08 的细胞生长以提高 PHBV 产量,添加 5 g/L 甘油后,细胞生长明显改善,最终产生 3.95 g/L P (3HB-co-8.76 mol% 3HV)。以短链脂肪酸为碳源进行

PHA 生产,有望拓宽盐单胞菌作为下一代合成生物底盘的竞争力。

REFERENCES

- [1] Conti I, Simioni C, Varano G, et al. Legislation to limit the environmental plastic and microplastic pollution and their influence on human exposure. *Environ Pollut*, 2021, 288: 117708.
- [2] 韦丽娟, 李宁杰. 限塑令与塑料替代品的发展现状. *广东化工*, 2021, 48(17): 110-111.
Wei LJ, Li NJ. Development status of plastic restriction order and plastic substitutes. *Guangdong Chem Ind*, 2021, 48(17): 110-111 (in Chinese).
- [3] 陈心宇, 李梦怡, 陈国强. 聚羟基脂肪酸酯 PHA 代谢工程研究 30 年. *生物工程学报*, 2021, 37(5): 1794-1811.
Chen XY, Li MY, Chen GQ. Thirty years of metabolic engineering for biosynthesis of polyhydroxyalkanoates. *Chin J Biotech*, 2021, 37(5): 1794-1811 (in Chinese).
- [4] Ansari S, Sami N, Yasin D, et al. Biomedical applications of environmental friendly poly-hydroxyalkanoates. *Int J Biol Macromol*, 2021, 183: 549-563.
- [5] Zheng Y, Chen JC, Ma YM, et al. Engineering biosynthesis of polyhydroxyalkanoates (PHA) for diversity and cost reduction. *Metab Eng*, 2020, 58: 82-93.
- [6] 袁恺, 周卫强, 彭超, 等. 微生物发酵法生产聚羟基脂肪酸酯的研究进展. *生物工程学报*, 2021, 37(2): 384-394.
Yuan K, Zhou WQ, Peng C, et al. Engineering progress in microbial production of polyhydroxyalkanoates. *Chin J Biotech*, 2021, 37(2): 384-394 (in Chinese).
- [7] Chen GQ, Jiang XR. Next generation industrial biotechnology based on extremophilic bacteria. *Curr Opin Biotechnol*, 2018, 50: 94-100.
- [8] Tan D, Xue YS, Aibaidula G, et al. Unsterile and continuous production of polyhydroxybutyrate by *Halomonas* TD01. *Bioresour Technol*, 2011, 102(17):

- 8130-8136.
- [9] Qin Q, Ling C, Zhao YQ, et al. CRISPR/Cas9 editing genome of extremophile *Halomonas* spp.. *Metab Eng*, 2018, 47: 219-229.
- [10] Fu XZ, Tan D, Aibaidula G, et al. Development of *Halomonas* TD01 as a host for open production of chemicals. *Metab Eng*, 2014, 23: 78-91.
- [11] Wang ZY, Qin Q, Zheng YF, et al. Engineering the permeability of *Halomonas* bluephagenesis enhanced its chassis properties. *Metab Eng*, 2021, 67: 53-66.
- [12] Zhao H, Zhang HM, Chen XB, et al. Novel T7-like expression systems used for *Halomonas*. *Metab Eng*, 2017, 39: 128-140.
- [13] Shen R, Yin J, Ye JW, et al. Promoter engineering for enhanced P(3HB-co-4HB) production by *Halomonas* bluephagenesis. *ACS Synth Biol*, 2018, 7(8): 1897-1906.
- [14] Yu LP, Yan X, Zhang X, et al. Biosynthesis of functional polyhydroxyalkanoates by engineered *Halomonas* bluephagenesis. *Metab Eng*, 2020, 59: 119-130.
- [15] Chen Y, Chen XY, Du HT, et al. Chromosome engineering of the TCA cycle in *Halomonas* bluephagenesis for production of copolymers of 3-hydroxybutyrate and 3-hydroxyvalerate (PHBV). *Metab Eng*, 2019, 54: 69-82.
- [16] Ye JW, Hu DK, Che XM, et al. Engineering of *Halomonas* bluephagenesis for low cost production of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) from glucose. *Metab Eng*, 2018, 47: 143-152.
- [17] Szacherska K, Oleskowicz-Popiel P, Ciesielski S, et al. Volatile fatty acids as carbon sources for polyhydroxyalkanoates production. *Polymers*, 2021, 13(3): 321.
- [18] Strazzera G, Battista F, Tonanzi B, et al. Optimization of short chain volatile fatty acids production from household food waste for biorefinery applications. *Environ Technol Innov*, 2021, 23: 101562.
- [19] Ping Q, Zhang JY, Tang RJ, et al. Effect of surfactants on phosphorus release and acidogenic fermentation of waste activated sludge containing different aluminium phosphate forms. *Chemosphere*, 2022, 287: 132213.
- [20] Zhou XN, Lu Y, Huang L, et al. Effect of pH on volatile fatty acid production and the microbial community during anaerobic digestion of Chinese cabbage waste. *Bioresour Technol*, 2021, 336: 125338.
- [21] Pu N, Hu P, Shi LL, et al. Microbial production of poly(3-hydroxybutyrate) from volatile fatty acids using the marine bacterium *Neptunomonas concharum*. *Bioresour Technol Rep*, 2020, 11: 100439.
- [22] Jung HR, Jeon JM, Yi DH, et al. Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate-co-3-hydroxyhexanoate) terpolymer production from volatile fatty acids using engineered *Ralstonia eutropha*. *Int J Biol Macromol*, 2019, 138: 370-378.
- [23] Wang K, Zhang RH. Production of polyhydroxyalkanoates (PHA) by *Haloferax mediterranei* from food waste derived nutrients for biodegradable plastic applications. *J Microbiol Biotech*, 2021, 31(2): 338-347.
- [24] Zhang J, Zhang X, Mao YF, et al. Substrate profiling and tolerance testing of *Halomonas* TD01 suggest its potential application in sustainable manufacturing of chemicals. *J Biotechnol*, 2020, 316: 1-5.
- [25] 笄央央, 李微, 史理陇, 等. 大肠杆菌利用葡萄糖和木糖合成乙醇酸、乳酸和 3-羟基丁酸共聚酯. *生物工程学报*, 2019, 35(2): 254-262.
- Da YY, Li W, Shi LL, et al. Microbial production of poly(glycolate-co-lactate-co-3-hydroxybutyrate) from glucose and xylose by *Escherichia coli*. *Chin J Biotech*, 2019, 35(2): 254-262 (in Chinese).
- [26] Chen GQ, Jiang XR, Guo YY. Synthetic biology of microbes synthesizing polyhydroxyalkanoates (PHA). *Synth Syst Biotechnol*, 2016, 1(4): 236-242.
- [27] Ramos-Suarez M, Zhang Y, Outram V. Current perspectives on acidogenic fermentation to produce volatile fatty acids from waste. *Rev Environ Sci Bio/Technology*, 2021, 20(2): 439-478.
- [28] Luangthongkam P, Strong PJ, Syed Mahamud SN, et al. The effect of methane and odd-chain fatty acids on 3-hydroxybutyrate (3HB) and 3-hydroxyvalerate (3HV) synthesis by a *Methylosinus*-dominated mixed culture. *Bioresour Bioprocess*, 2019, 6: 50.
- [29] Al-Kaddo KB, Mohamad F, Murugan P, et al. Production of P(3HB-co-4HB) copolymer with high 4HB molar fraction by *Burkholderia contaminans* Kad1 PHA synthase. *Biochem Eng J*, 2020, 153: 107394.
- [30] Ye JW, Hu DK, Yin J, et al. Stimulus response-based fine-tuning of polyhydroxyalkanoate pathway in *Halomonas*. *Metab Eng*, 2020, 57: 85-95.
- [31] Choi SY, Park SJ, Kim WJ, et al. One-step fermentative production of poly(lactate-co-glycolate) from carbohydrates in *Escherichia coli*. *Nat Biotechnol*, 2016, 34(4): 435-440.
- [32] Poblete-Castro I, Wittmann C, Nickel PI. Biochemistry, genetics and biotechnology of glycerol utilization in *Pseudomonas* species. *Microb Biotechnol*, 2020, 13(1): 32-53.
- [33] Fontaine P, Mosrati R, Corroler D. Medium chain length polyhydroxyalkanoates biosynthesis in *Pseudomonas putida* mt-2 is enhanced by co-metabolism of glycerol/octanoate or fatty acids mixtures. *Int J Biol Macromol*, 2017, 98: 430-435.

(本文责编 陈宏宇)