

# 丛毛单胞菌 CNB-1 合成 PHA 及相关基因的研究

应娇妍<sup>1,2</sup> 杨苏声<sup>2</sup> 刘双江<sup>1</sup> 姜成英<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>中国科学院微生物研究所 北京 100101) (<sup>2</sup>中国农业大学生命科学学院 北京 100083)

**摘 要:** 分析了丛毛单胞菌(*Comamonas* sp.) CNB-1 菌株在不同条件下合成聚羟基烷酸(polyhydroxyalkanoic acids, PHAs)的组分和含量,同时克隆了与 PHA 合成相关的基因。结果表明,该菌可以多种短链有机酸及醇类为碳源合成 PHA 多聚物或共聚物,以戊酸和 1,4-丁二醇为底物时,可达菌体干重的 57%,同时发现小分子醇类的存在能显著促进 PHA 的合成,推测与醇类氧化过程中提供了更多的还原力有关。为了克隆相关基因,利用已知 *phaC* 的保守区简并引物筛选基因组文库,将得到的阳性克隆质粒测序,发现 *phaC*、*phaA*、*phaB* 组成一个基因簇 *phaC-A-B*。将 *phaC*、*phaA*、*phaB* 连接到 pET 载体在 *E. coli* 中共表达,重组 *E. coli* 菌株能合成 PHA,将这 3 个基因单独连接到 pET 载体,在 *E. coli* 中表达后检测到相应酶活,分别约为原始菌株的 4.1、71 和 2882 倍。

**关键词:** 丛毛单胞菌(*Comamonas*); 聚羟基烷酸(PHA); 生物塑料; 高分子聚酯

中图分类号: Q75; Q93 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2007)04-0616-06

聚羟基烷酸(polyhydroxyalkanoic acids, PHAs)是存在于很多微生物体内的一种高分子聚酯物质,作为高分子材料具有多方面的优点,尤其是其可降解性和生物相容性引起了很大的关注<sup>[1]</sup>。许多原核微生物都可以在碳源过剩而其它生长条件受限制的情况下在体内合成 PHA,目前已经在 90 多个属的微生物体内发现 PHA,约 150 种不同结构的羟基脂肪酸可以作为 PHA 的单体,已从 40 多个菌株中克隆到了 PHA 聚合酶的基因<sup>[2]</sup>。PHA 单体结构的多样性使得 PHA 具有多种多样的性能,可以适应不同的需要。但是由于生产 PHA 的成本较高,目前得到大规模生产的品种主要为聚羟基丁酸 PHB (polyhydroxybutyric acid, PHB)和聚羟基丁酸-戊酸共聚物 [poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate), PHBV]<sup>[3,4]</sup>。同这些已有的 PHA 聚合物相比,含有 4-羟基丁酸(4HB)的 PHA 多聚物具有抗张强度高、断裂伸长率高等优点,因此关于这类聚合物的研究受到了格外的重视。已有报道,*Delftia acidovorans*(原 *Comamonas acidovorans*)和睾酮丛毛单胞菌(*Comamonas testosteroni*)可以合成含有 4HB 的聚合物<sup>[5-11]</sup>,但是关于它们合成 PHA 代谢途径的研究很少。

本实验室分离得到一株降解氯代硝基苯的菌种 *Comamonas* strain CNB-1<sup>[12]</sup>,随后的研究进一步发现

CNB-1 菌株还能合成 PHA。本文报道 CNB-1 菌株不同情况下 CNB-1 合成 PHA 的能力,并克隆了 PHA 合成相关基因,结果如下。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 主要试剂和仪器:** DNA 聚合酶、T4 连接酶、DNA 凝胶回收试剂盒均购自北京经科宏达生物科技有限公司;PCR 产物纯化试剂盒购自鼎国公司;T-easy vector 购自 Promega 公司;其它化学试剂均为分析纯。BH-2 光学显微镜(Olympus 公司),H-600A 透射电镜(Hitachi 公司),UV-2010 紫外分光光度计(Shimadzu 公司),DU800TM 分光光度计(Beckman-coulter 公司),T-Gradient PCR 仪(Biometra 公司)。

**1.1.2 菌株、质粒和培养条件:** 本实验中用到的菌株及质粒见表 1。CNB-1 菌株的基因组文库为本研究室构建<sup>[13]</sup>。如无特殊说明,大肠杆菌(*Escherichia coli*)各菌株所用培养基为 LB 培养基,根据质粒不同,添加 50mg/L 的氨苄或卡那霉素,37℃ 培养。菌株 CNB-1 在液体培养时摇床转速为 150r/min,培养温度为 30℃。

**1.1.3 PCR 引物:** 本实验用到的 PCR 引物的序列和用途见表 2。

基金项目: 中国科学院院长青年基金项目资助

\* 通讯作者。Tel: 86-10-64807581; Fax: 86-10-64807421; E-mail: jiangcy@sun.im.ac.cn

作者简介: 应娇妍(1978-),女,宁波人,博士,从事环境微生物应用研究工作。E-mail: enjoybd@gmail.com

收稿日期: 2006-11-10; 接受日期: 2007-01-12; 修回日期: 2007-06-06

表 1 本实验中使用的菌株及质粒

Bacterial strains or plasmid	Relevant phenotype	Source or reference
<i>Comamonas</i> sp. CNB-1	Separated from Activated Sludge	Wu et al. <sup>[11]</sup>
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	Express host	Stratagene
pET-21a(+)	Express vector	Novagen
pET-28a(+)	Express vector	Novagen
pET21-C1	pET-21a(+ ) connected with <i>phaC</i> gene1	this study
pET21-AB	pET-21a(+ ) connected with <i>phaAB</i> gene	this study
pET21-C-AB	pET-21a(+ ) connected with <i>phaC</i> 、 <i>phaAB</i>	this study
pET28-C2	pET-28a(+ ) connected with <i>phaC</i> gene2	this study
pET21-A	pET-21a(+ ) connected with <i>phaA</i> gene	this study
pET21-B	pET-21a(+ ) connected with <i>phaB</i> gene	this study

表 2 本实验使用的 PCR 引物

Table 2 Primers used in this experiments

Names of primer	Characteristics and utilities	Sequences of primer (5'→3')
P1	Degenerate primer of <i>phaC</i> upstream conservative region	CC( C/G )CC( C/G )TGGATCAA( T/C )AAGT( T/A )( T/C )TAC( T/C )ATC
P2	Degenerate primer of <i>phaC</i> downstream conservative region	( G/C )AGCCA( G/C )GC( G/C )GTCCA( A/G )TC( G/C )GGCCACCA )
CP1	Upstream primer 1 of <i>phaC</i>	ATAGGATCCCCGGTCGCTTGCCCTTGA
CP2	Downstream primer 1 of <i>phaC</i>	AGGGAGCTCTCAGGCTTTTGACAGAAC
CPF	Upstream primer 2 of <i>phaC</i>	CGCGGATCC <u>ATG</u> AATTTTGACCCGAGCTG
ABP1	Upstream primer of <i>phaA-B</i>	TGGGAGCTC <u>ATG</u> GAAGACATCGTTATC
ABP2	Downstream primer of <i>phaA-B</i>	ATCTAAGCTTTTGCTGAACCGAGTTTT
BP1	Upstream primer of <i>phaB</i>	CGCGGATCC <u>ATG</u> GGTCAGAAAAGTAGCC
BP2	Upstream primer of <i>phaB</i>	CGCGGATCCTGCTGAATGCCTGAAAA

Note :The start codons are Underlined.

## 1.2 CNB-1 中合成的 PHA 分析

### 1.2.1 培养方法 :分为一步培养法和二步培养法。

一步培养时,以矿物盐(MS)培养基<sup>[6]</sup>为基础培养基,添加 0.5% 的碳源,接种培养 2d 后测定 PHA 组分及含量。二步培养时,CNB-1 首先在 100mL NB<sup>[9]</sup>培养基中培养 12h,然后离心收集菌体,转入无氮 MS 培养基 2d 后测定 PHA 组分及含量。

1.2.2 PHA 组分与含量的分析:取适量干菌体或标准 PHA 样品,添加 0.025% 的苯甲酸钠作为内标,溶解到 2mL 氯仿中,加入等体积的硫酸(15%):甲醇(85%)溶液,95℃ 酯化 2~3h,用 2mL 水萃取,取下层氯仿相,过滤,取 1 $\mu$ L 进样,用岛津 2010 气相色谱仪测定 PHA 组分及含量。

### 1.3 基因组文库的筛选及测序分析

利用 PHA 聚合酶基因的保守区简并引物 P1 和 P2<sup>[14]</sup>从 CNB-1 基因组中扩增 *phaC* 片断,以其为对照,用菌落 PCR 的方法筛选基因组文库。菌落 PCR 模板采用碱裂解法制备。为减少 PCR 的数量,先以 10 个克隆为一组进行筛选,再将阳性组进行逐一筛选。将得到的阳性克隆测序,测序结果在 NCBI 上进行 BLAST 比对分析。

### 1.4 基因的克隆和表达

为了分析各基因功能,根据测序结果,从阳性质

粒中 PCR 扩增目的片段并引入酶切位点,将各基因单独或一起连接到 pET-21a(+ )或 pET-28a(+ )载体,转化 *E. coli* BL21(DE3)菌株进行表达。构建质粒见表 1,所用 PCR 引物见表 2。

### 1.5 重组 *E. coli* 菌株合成 PHA 能力的分析

重组 *E. coli* BL21(DE3)菌株在 LB 培养基中 37℃ 培养至  $OD_{600}$  为 0.6 左右,加入 0.1mmol/L IPTG,30℃ 诱导 3h,之后加入 1% 葡萄糖,继续培养 2d。PHA 的产量测定如前所述。

### 1.6 酶活测定和 SDS-PAGE

1.6.1 粗酶液制备:CNB-1 在 100mL 的 LB 培养基中 30℃ 培养 12h,重组 *E. coli* 菌株在 100mL LB 培养基中 37℃ 培养至  $OD_{600}$  为 0.6 左右,加入不同浓度 IPTG(0.0.1,1mmol/L)30℃ 诱导 3h,离心 30mL 菌液收集菌体,0.9% NaCl 洗涤后悬浮于 1mL pH8.0 的 10mmol/L 的 PBS 缓冲液中,超声破碎后,13000r/min 离心 10min,上清液即为粗酶液。粗酶液进行 SDS-PAGE<sup>[16]</sup>检测蛋白的表达。

1.6.2 酶活测定:①PhaC 酶活测定反应液组成:Tris·HCl(150mmol/L,pH7.5),MgCl<sub>2</sub>(20mmol/L),DTNB(1mmol/L)3HBCoA(0.6mmol/L)。②PhaA 酶活测定反应液组成:Tris·HCl(50mmol/L,pH7.5),MgCl<sub>2</sub>

(10mmol/L), 乙酰乙酰 CoA (0.05mmol/L), CoA (0.6mmol/L) ③ PhaB 酶活测定反应液组成: Tris · HCl (50mmol/L, pH7.5), MgCl<sub>2</sub> (10mmol/L), 乙酰乙酰 CoA (0.05mmol/L), NADPH (0.05mmol/L)。

PhaC、PhaA、PhaB 的酶活由紫外分光光度计分别测定 412nm, 303nm, 340nm 光波长条件下反应体系的吸光值变化, 经过计算获得。蛋白浓度由 Bradford 法测定<sup>[17]</sup>。

## 2 结果

### 2.1 CNB-1 合成 PHA 分析

在一步培养下, CNB-1 可以利用多种短链有机酸进行生长并合成 PHA, 但是不能利用长链脂肪酸如庚酸、癸酸等进行生长。该菌在一步培养和二步培养下利用不同碳源合成 PHA 的情况见表 3。如结果所示, 二步培养法比一步培养法明显有利于 PHA 的合成, 不同碳源合成的 PHA 组分和菌体内含量差别很大, 但是都有 3HB 单体的存在, 在有 1,4-丁二醇和戊酸存在时还可合成 4HB 和 3HV 单体。这 3 种单体占菌体干重的最高含量分别为 21.5%、29.1%、47.7%。以乙醇、丁醇为碳源时合成的 PHB 比以乙酸钠、丁酸为碳源时多, 而 1,4-丁二醇的存在也能提高 3HB 及 3HV 的含量, 推测这种现象与醇类氧化过程中提供了更多的还原力有关。以丙酸为底物时合成的 3HV 含量远远小于以戊酸为底物时, 可能它们转化成 PHA 前体的途径不同, 戊酸可能经过脂肪酸 β-氧化途径进入 PHA 的合成。丁酸和戊酸的存在对利用 1,4-丁二醇合成 4HB 有抑制作用, 推测丁酸和戊酸的存在抑制了 1,4-丁二醇的氧化。此外, 丁醇 + 1,4-丁二醇培养时, 合成的 3HB 的含量比只有丁醇时增加, 而 4HB 的含量则大大减少, 因此通过对碳源的调节有可能实现对 PHA 不同单体比例的调控。

此外, 当用营养丰富 (NR<sup>5</sup>)<sup>[6]</sup> 培养基代替 NB 培养基进行二步法培养时, 该菌以 1,4-丁二醇为底物合成的 4HB 可达菌体干重的 56.2%, 远高于一般菌株, 而与 *D. acidovorans* JCM 10181 菌株多拷贝表达 *phaA* 和 *phaC* 的重组菌株的合成量相近<sup>[7]</sup>。该菌不能以 1,4-丁二醇为底物进行生长, 但当在 LB 培养基中添加 1,4-丁二醇培养时, 可以在一步培养下就实现 4HB 的合成, 含量为 10.3%。这些结果表明, CNB-1 是研究 4HB 聚合物或共聚物合成的良好菌株。

表 3 一步和二步培养条件下 CNB-1 菌株合成 PHA 的组分及含量

Table 3 PHAs content and composition by strain CNB-1 with one-stage and two-stage batch cultivation

Carbon source(s)	Two-stage batch cultivation (% of cell dry wt)			PHA	One-stage batch cultivation (% of cell dry wt)
	3HB	3HV	4HB		
Sodium acetate	1.4	0	0	1.4	0.5
Propionic Acid	1.1	5.5	0	6.6	0.16
butyric acid	3.1	0	0	3.1	0.7
valerate	2.4	37.1	0	39.5	0.1 * (14.2, 3HV)
1,4-butenediol	0.9	0	29.1	30.0	-
Ethanol	10.7	0	0	10.7	-
Butanol	6.1	0	0	6.1	-
Butanol + 1,4-butenediol	21.5	0	2.0	23.5	-
Butyric acid + 1,4-butenediol	7.3	0	1.1	8.4	2.2
Valerate + 1,4-butenediol	7.9	47.7	1.4	57.0	0.2 * (23.5, 3HV)

\* - means not detected; \* means except special note; all the component are 3HB.

### 2.2 基因组文库的筛选和阳性克隆的序列分析

以上结果表明, CNB-1 菌株可以合成多种 PHA, 而在其裂解液中也可以检测到短链 PHA 合成途径中的 β-酮硫解酶、乙酰乙酰 CoA 还原酶及 PHA 聚合酶活性 (表 4)。为了克隆得到相关基因, 首先利用聚合酶基因的保守区简并引物从 CNB-1 基因组中扩增 *phaC* 片段, 结果得到约 900bp 的片段, 测序结果表明该片段与 *phaC* 基因具有高度同源性。之后以该片段为参照, 用菌落 PCR 的方法从 CNB-1 基因组文库中筛选得到 3 个阳性质粒, 酶切分析表明这 3 个质粒可以分为不同的两种质粒, 测序后将两种质粒的插入片段序列进行拼接, 得到总长约 46kb 的序列。序列比对结果表明, 与大多数阅读框序列相似性最高的序列来自分类学与 *Comamonas* 同属于 Burkholderiales 纲的 *Polaromonas*, *Ralstonia*, *Burkholderia* 等属的细菌。其中有 3 个相邻的 ORF 的蛋白序列分别与 *PhaC*、*PhaA*、*PhaB* 具有较高的同源性, 大小分别为 1890bp、1179bp 和 735bp (不包括终止密码子), 以 *phaCAB* 的形式组成一个基因簇 (图 1)。

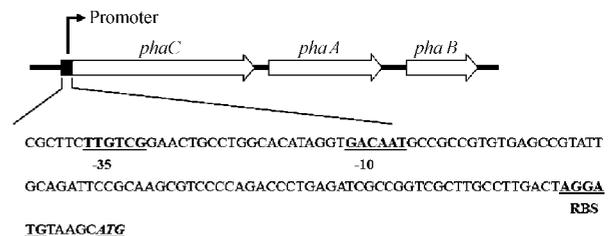


图 1 *phaCAB* 片段序列分析

Fig. 1 Subfragments of *phaCAB* nucleotide sequence analysis.

PhaC 比对结果中与之相似性最高的为来自 *P. oleovorans* NRRL B-14682 菌株的合成酶序列 (AAL17611, Identity = 90.5%); 其次为来自 *D. acidovorans* DS-17 的序列 (BAA33155, Identity =

70.2%) 与 DS-17 中的序列相似, NRRL B-14682 和 CNB-1 中的序列也包含了一段大多数合成酶不具有的片段<sup>[18]</sup>, 这个区域也是这两段序列之间的主要差异所在, 说明了这个区域的高度变异性。核苷酸序列比对结果表明, NRRL B-14682 中包含 *phaC* 基因和部分 *phaA* 基因的核苷酸序列( AF422800 )从第 18 个核苷酸起与本实验得到的序列相似性达 90.9%, 而且包含转录间隔区在内, 只有 6 个插入或缺失碱基。 *Comamonas* 与 *Pseudomonas* 的进化距离较远, 它们分别属于 Betaproteobacteria 和 Gammaproteobacteria 纲, *Comamonas* 与同为 Comamonadaceae 科的 *Delftia* 属较为接近, 这与以上序列的同源性分析结果不符, 推测 NRRL B-14682 菌株中的这段序列为横向转移而来。

与 CNB-1 菌株中 *PhaA* 相似性最高的序列分别来自 *D. acidovorans* DS-17( BAA33156, 88.6%), *Azohydromonas lata*(原 *Alcaligenes latus*) DSM 1124( AAD10275, 80.0%)。与 *PhaB* 相似性最高的序列来自近期经基因组测序的 *Acidovorax* sp. JS42( ZP\_01383710, 88.5%) 及 *Rhodospirillum rubrum* T118( YP\_523808, 87.7%)。

在 [http://www.fruitfly.org/seq\\_tools/promoter.html](http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html) 上对 *phaCAB* 及其上下游序列进行启动子分析, 在 *phaC* 前发现一个可能的启动子序列和类似核糖体结合位点的序列(图 1)。在 *phaCAB* 上下游未发现调控基因。

此外, 在 *phaCAB* 前约 14kb 处有一个 ORF 与 PHA 解聚酶具有较高相似性, 与之相似性最高的是来自 *Polaromonas* sp. JS666 基因组测序结果中的解聚酶序列(76%), 此外与 *Cupriavidus necator* 胞内 PHB 解聚酶的相似性为 64%<sup>[19]</sup>, 而与 Shinomiya 等<sup>[20]</sup>在 *Comamonas testosteroni* 中克隆得到的胞外解聚酶相似性不高<sup>[20]</sup>。

虽然阳性克隆菌株中包含了硫解酶途径中的所有 3 个酶, 但是在阳性克隆菌株中仅可检测到微弱的 *PhaA*、*PhaB* 酶活, 而检测不到明显的 *PhaC* 酶活, 也检测不到 PHB 的合成。为了进一步证明这 3 个基因的功能, 将这几个基因连接到高表达的 pET 系列载体, 转化到 *E. coli* BL21(DE3) 菌株中进行表达。

### 2.3 *phaC*、*phaA*、*phaB* 在 *E. coli* 中的表达和重组菌株合成 PHA 能力和酶活的分析

含有以上 3 个基因的重组质粒 pET21-C-AB 转化到 *E. coli* BL21(DE3) 中, 能使重组菌株合成

3.3% 的 PHB。酶活测定结果(表 4) 表明, 该重组菌株中 3 个酶的活性都不是很高, 尤其是 *PhaC* 的活性很低。与上述重组菌株不同, 含有 pET28-C2、pET21-A、pET21-B 这 3 个单独表达质粒的重组菌株中各酶的活性有了显著提高。无 IPTG 诱导时酶活较低, 而 1mmol/L 与 0.1mmol/L IPTG 诱导时的结果比较接近(数据未展示)。在含 pET28-C2 的重组菌株中有包涵体的形成, 这可能也是导致其酶活不如另两个基因表达物活性高的主要原因, 将诱导温度改为 20℃ 后酶活没有明显提高。利用 His-tag 纯化柱将重组 *PhaC* 纯化, 也能测到明显酶活(资料未展示)。与其它菌株的 *PhaC* 如 *PhaC<sub>Re</sub>* 相似, 重组表达后的 *PhaC* 在测定酶活时显示出一定的迟缓期而原始菌株则没有, 应该是由于缺乏聚合物前体导致<sup>[21, 22]</sup>。

表 4 CNB-1 及重组 *E. coli* BL21(DE3) 菌株中 (0.1mmol/L IPTG 诱导) *PhaC*、*PhaA*、*PhaB* 的酶活测定

Table 4 Determination of specific activities of *PhaC*, *PhaA* and *PhaB* of CNB-1 and *E. coli* BL21(DE3) (which is induced by 1mmol/L IPTG)

Bacterial plasmids	Specific activities[ nmol/(min·mg) ]		
	<i>PhaC</i>	<i>PhaA</i>	<i>PhaB</i>
pET21-C-AB	4.5	37	49
pET28-C2	27.9		
pET21-A		76902	
pET21-B			31125
CNB-1	13.4	1089	10.8

The blank means data not available.

## 3 讨论

本文对 *Comamonas* sp. CNB-1 菌株中 PHA 的合成情况分析结果表明, 该菌可以利用多种短链有机酸及醇类为碳源在一步培养或二步培养下在体内合成短链 PHA, 其单体包括 3HB、4HB 及 3HV; 尤其值得注意的是, 以戊酸、1,4-丁二醇为碳源时则分别可以合成高含量的 3HV 或 4HB。4HB 高的含量在其它野生型菌株中报导较少<sup>[7]</sup>, 所以 CNB-1 菌株可以作为研究含有 4HB 单体的 PHA 合成的良好菌株。

二步培养法比一步培养法有利于 CNB-1 中 PHA 的合成。碳源组成对于合成的 PHA 组分和含量都有很大影响, 这种影响来自很多方面, 比如不同的底物可能经过不同的途径进入 PHA 的合成, 醇类的存在能显著促进 3HB 和 3HV 的合成, 应该与醇类氧化过程中提供了更多的还原力和产酸有关; 当丁酸、戊酸、丁醇等碳源与 1,4-丁二醇共存时, 4HB 的合成量很低, 推测它们的存在使 1,4-丁二醇的氧化受到了抑制, 因此设计不同的碳源组成是调控

PHA 合成的一个有效手段。

在 CNB-1 菌株中能检测到 PhaC、PhaA、PhaB 的活性,其中 PhaC 的活性相对较低。通过筛选基因组文库得到了相关基因序列,发现它们以 *phaCAB* 的形式组成一个基因簇,其排列方式与来自于  $\beta$ -紫色细菌的 *Cupriavidus necator* (原 *Ralstonia eutropha*)<sup>[23]</sup>, *Alcaligenes latus*<sup>[24]</sup>, *Burkholderia* sp.<sup>[25]</sup> 等的序列排列方式相同,与它们相似性较高的序列也大多来自分类地位比较接近的菌株,这些基因之间可能具有相近的进化来源。比较特殊的是相似性最高的序列来自属于 Gammaproteobacteria 的 *Pseudomonas oleovorans* NRRL B-14682 菌株,与 *D. acidovorans* DS-17 中的序列相似,NRRL B-14682 和 CNB-1 中的序列也包含了一段大多数合成酶不具有的片段<sup>[26]</sup>,这个区域也是这两段序列之间的主要差异所在,说明了这个区域的高度变异性,也说明了这 3 个序列可能有共同的来源,NRRL B-14682 中的序列应该为横向转移而来。与此相似,*Comamonas testosteroni* KBOS 01 与 *Pseudomonas* sp. KBOS 04 中的 *phaC1/phaZ/phaC2* 基因簇相似性极高,也可能来源于基因横向转移<sup>[27]</sup>,*Comamonas* 与 *Pseudomonas* 属菌株之间这两个 PHA 合成基因簇的高度相似性意味着什么还不得而知。

将以上 3 个基因一起连接到 pET-21a(+) 并转化到 *E. coli* BL21(DE3) 菌株中,可以使重组菌株合成少量的 PHB (3.3%)。一些研究结果表明,在 *E. coli* 中 PHB 的合成量与 PhaC 活性正相关<sup>[28]</sup>,比较其它 *E. coli* 中 PhaC 酶活相近时的 PHB 合成量,我们推测 PhaC 的活性太低是该重组菌株中合成的 PHB 含量不高的主要原因。将 *phaC*、*phaA*、*phaB* 分别连接到 pET 系列载体并在 *E. coli* BL21(DE3) 中表达后,SDS-PAGE 能观察到明显的表达条带,并且检测到了明显高于原始菌株的酶活,但是 PhaC 的提高幅度相对较少 (2.1 倍),这可能与包涵体的形成有关,因此如果想在 *E. coli* 中高效表达该酶,方法还有待改进。PhaC 的活性不高可能对 CNB-1 合成 PHA 的能力有很大影响,在 *D. acidovorans* 中,多拷贝表达 *phaC* 和 *phaA* 后可以使 4HB 含量达到原来的 2 倍<sup>[7]</sup>。在 CNB-1 中 PhaA 和 PhaB 的活性都很高,但是 PhaC 的活性只有其 1/7,因此高效表达 *phaC* 可能是提高 PHA 含量的一个有效手段。

综合以上结果,我们认为 CNB-1 可以作为研究含有 4HB 单体的 PHA 合成的良好菌株,对于如何更好地提高产量,调控组成也进行了一些摸索和探讨,

但是仍有许多问题有待解决。为什么该菌可以 1,4-丁二醇为底物合成如此高含量的 4HB 是一个让人感兴趣的问题,1,4-丁二醇是怎样转变成 4HB 的还未可知,目前关于这方面的研究还在进行中。

## 参 考 文 献

- Jandrossek D, Schirmer A, Schlegel HG. Biodegradation of polyhydroxyalkanoic acids. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1996 **46**: 451 - 463.
- Rehm BHA, Steinbüchel A. 聚羟基脂肪酸酯合酶——聚羟基脂肪酸酯合成过程中的关键酶. 生物高分子 第 3a 卷: 聚酯 I——生物系统和生物工程法生产. 丘远征译, 陈国强主译. 第一版. 北京: 化学工业出版社 2004 年.
- Doi Y. Microbial synthesis, physical properties, and biodegradability of polyhydroxyalkanoates. *Macromol Symp*, 1995 **98**: 585 - 599.
- Kunioka M, Tamaki A, Doi Y. Crystalline and thermal properties of bacterial copolyesters: Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and Poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate). *Macromol*, 1989 **22**: 694 - 697.
- Saito Y, Nakamura S, Hiramitsu M, et al. Microbial synthesis and properties of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate). *Polymer International*, 1996 **39**: 169 - 174.
- Sudesh K, Fukui T, Doi Y. Genetic analysis of *Comamonas acidovorans* polyhydroxyalkanoate synthase and factors affecting the incorporation of 4-hydroxybutyrate monomer. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998 **64**(9): 3437-3443.
- Sudesh K, Fukui T, Taguchi K, et al. Improved production of poly(4-hydroxybutyrate) by *Comamonas acidovorans* and its freeze-fracture morphology. *International Journal of Biological Macromolecules*, 1999 **25**: 79 - 85.
- Mitomo H, Hsieh WC, Nishiwakia K, et al. Poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) produced by *Comamonas acidovorans*. *Polymer* 2001 **42**: 3455 - 3461.
- Lee WH, Azizan MNM, Sudesh K. Effects of culture conditions on the composition of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) synthesized by *Comamonas acidovorans*. *Polymer Degradation and Stability* 2004 **84**: 129 - 134.
- Mothes G, Ackermann. Synthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) with a target mole fraction of 4-hydroxybutyric acid units by two-stage continuous cultivation of *Delftia acidovorans* P4a. *Eng Life Sci* 2005 **5**(1): 58 - 62.
- Renner G, Haage G, Braunnegg G. Production of short-side-chain polyhydroxyalkanoates by various bacteria from the rRNA superfamily III. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1996 **46**: 268 - 272.
- 吴建峰, 沈锡辉, 周宇光, 等. 一株降解对氯硝基苯的 *Comamonas* sp. CNB-1 的分离鉴定及其降解特性. 微生物学报 2004 **44**(1): 8 - 12.
- Wu JF, Sun CW, Jiang CY, et al. A novel 2-aminophenol 1,6-dioxygenase involved in the degradation of *p*-chloronitrobenzene by *Comamonas* strain CNB-1: purification, properties, genetic cloning and expression in *Escherichia coli*. *Arch Microbiol* 2005 **183**: 1 - 8.
- Fukui T, Doi Y. Cloning and analysis of the poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) biosynthesis genes of *Aeromonas caviae*.

- [ 15 ] Sambrook J ,Russell DW. Molecular Cloning. 3<sup>rd</sup> ed. New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press 2001 ,Vol , 131 – 138.
- [ 16 ] Laemmli UK. Cleavage of structure proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* ,1970 **227** :680 – 685.
- [ 17 ] Bradford MM. 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.
- [ 18 ] Tsuge T ,Imazu S ,Takase K ,et al. An extra large insertion in the polyhydroxyalkanoate synthase from *Delftia acidovorans* DS-17 : its deletion effects and relation to cellular proteolysis. *FEMS Microbiology Letters* 2004 **231** :77 – 83.
- [ 19 ] Saegusa H ,Shiraki M ,Kanai C ,et al. Cloning of an intracellular Poly[ D( - )-3-Hydroxybutyrate ] depolymerase gene from *Ralstonia eutropha* H16 and characterization of the gene product. *J Bacteriol* , 2001 **183** ( 1 ) :94 – 100 .
- [ 20 ] Shinomiya M ,Iwata T ,Kasuya KI ,et al. Cloning of the gene for poly( 3-hydroxybutyric acid ) depolymerase of *Comamonas testosteroni* and functional analysis of its substrate-binding domain. *FEMS Microbiology Letters* ,1997 **154** :89 – 94.
- [ 21 ] Müh U , Sinskey AJ , Kirby DP , et al. PHA synthase from *Chromatium vinosum* : cysteine 149 is involved in covalent catalysis. *Biochemistry* ,1999 **38** :826 – 837.
- [ 22 ] Wodzinska J ,Snell KD ,Rhombert A , et al. Polyhydroxybutyrate synthase : evidence for covalent catalysis. *J Am Chem Soc* ,1996 , **118** :6319 – 6320.
- [ 23 ] Steinbüchel A ,Schlegel HG. Physiology and molecular genetics of poly(  $\beta$ -hydroxyalkanoic acid ) synthesis in *Alcaligenes eutrophus*. *Mol Microbiol* ,1991 **5** :523 – 542.
- [ 24 ] Choi JI , Lee SY , Han K. Cloning of the *Alcaligenes latus* polyhydroxyalkanoate biosynthesis genes and use of these genes for enhanced production of poly( 3-hydroxybutyrate ) in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* ,1998 **64** :4897 – 4903.
- [ 25 ] Rodrigues MF ,Valentin HE ,Berger PA , et al. Polyhydroxyalkanoate accumulation in *Burkholderia* sp. : a molecular approach to elucidate the genes involved in the formation of two homopolymers consisting of short-chain-length 3-hydroxyalkanoic acid. *Appl Microbiol Biotechnol* 2000 **53** :453 – 460.
- [ 26 ] Tsuge T ,Imazu S ,Takase K ,et al. An extra large insertion in the polyhydroxyalkanoate synthase from *Delftia acidovorans* DS-17 : its deletion effects and relation to cellular proteolysis. *FEMS Microbiology Letters* 2004 **231** :77 – 83.
- [ 27 ] Ciesielski S , Cydzik-Kwiatkowska A , Pokoj T , et al. Molecular detection and diversity of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates-producing bacteria enriched from activated sludge. *Journal of Applied Microbiology* 2006 **101** :190 – 199.
- [ 28 ] Taguchi S , Nakamura H , Kichise T , et al. Production of polyhydroxyalkanoate ( PHA ) from renewable carbon sources in recombinant *Ralstonia eutropha* using mutants of original PHA synthase. *Biochemical Engineering Journal* 2003 **16** :107 – 113.

## Biosynthesis of polyhydroxyalkanoates and its metabolic pathway in *Comamonas* sp. strain CNB-1

YING Jiao-yan<sup>1,2</sup> , YANG Su-sheng<sup>2</sup> , LIU Shuang-jiang<sup>1</sup> , JIANG Cheng-ying<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup> Institute of Microbiology , Chinese Academy of Sciences , Beijing 100080 , China )

(<sup>2</sup> College of Life Sciences , Chinese Agricultural University , Beijing 100094 , China )

**Abstract** : *Comamonas* sp. strain CNB-1 degrades chloronitrobenzene and nitrobenzene for carbon and nitrogen sources. In this study , accumulation of polyhydroxyalkanoic acids ( PHAs ) within strain CNB-1 cells was investigated under various conditions. Results indicated that strain CNB-1 was able to synthesize PHA from various short-chain fatty acid and alcohols , and 57 w% of the dry cell weight ( DCW ) PHA was obtained when valerate and 1,4-butanediol were co-fed. Supplements of short-chain alcohols stimulated the accumulation of PHAs and this stimulatory effect was attributed to the more amount of reductant generated from alcohol dehydrogenation. The genes encoding for PHA polymerase ( *phaC* ) , for acetoacetyl-CoA thiolase ( *phaA* ) , and acetoacetyl-CoA reductase ( *phaB* ) were cloned in *Escherichia coli* , and the recombinant *E. coli* synthesized PHA and showed enzymatic activities of PHA polymerase , acetoacetyl-CoA thiolase , and acetoacetyl-CoA reductase. The three genes occurred as a cluster of *phaC* ( *C-A-B* ). To optimize their expression , the three genes were cloned to the pET vector and expressed respectively. Mass of expressed protein was detected and the enzyme activities increased greatly in contrast to wild CNB-1 strain , which is about 4.1 , 71 , and 2882 folds of activities of CNB-1.

**Keywords** : *Comamonas* ; polyhydroxyalkanoate ; biopolymer ; biopolyester

Foundation item : Youth Foundation of President of Chinese Academy of Sciences

\* Corresponding author. Tel : 86-10-64807581 ; Fax : 86-10-64807421 ; E-mail : jiangcy@sun.im.ac.cn

Received : 10 November 2006 / Accepted : 12 January 2007 / Revised : 6 June 2007