DOI:10.3969/j.issn. 1673–1689.2018.06.002

Halogranum amylolyticum TNN58 全基因组测序及 PHBV 代谢途径分析

赵有玺[1,2,3]，薛燕芬[3]，马延和[3]，饶志明[*1]

（1. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室，江苏 无锡 214036；2. 北京联合大学 生物化学工程学院，北京 100023；3. 中国科学院 微生物研究所，北京 100101）

摘要： 解淀粉盐颗菌 TNN58（*Halogranum amylolyticum* TNN58）是一株极端嗜盐古菌，它可以利用葡萄糖积累 3HV 摩尔分数高达 20%的 PHBV。首次通过鸟枪法对 *H.amylolyticum* TNN58 进行了全基因组测序，利用 Velvet 软件进行组装，得到 32 个支架序列，整个基因组大小约为 4.71 Mb，测序深度为 218X。通过对基因组数据进行分析，发现该菌株 PHA 合酶由 phaE 和 phaC 两个亚基组成，存在 4 条 3–HV 的供应途径，同时发现该菌株不存在乙醛酸循环途径，但存在甲基天冬氨酸循环途径作为乙酸盐的回补利用途径。本研究的结果为揭示 *H.amylolyticum* TNN58 的 PHBV 合成机制和后续的功能基因组学研究的提供了数据。

关键词： PHBV；基因组；解淀粉盐颗菌

中图分类号：Q 789　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**1673—1689(2018)06—0572—08

Genomic Sequencing and Analysis of Genes Related to PHBV of *Halogranum amylolyticum* TNN58

ZHAO Youxi[1,2,3]，*XUE Yanfen*[3]，*MA Yanhe*[3]，*RAO Zhiming*[*1]

（1. Key Lab of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Biochemical Engineering College, Beijing Union University, Beijing 100023, China; 3. Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China）

Abstract: *Halogranum amylolyticum* TNN58 belong to haloarchaeon. It could produce a type of PHBV containing up to 20 mol% 3HV from glucose. This study uses shot-gun sequencing technology to uncover the genome sequence of *H. amylolyticum* TNN58. Then use Velvet software stitching get 32 scaffolds. The whole genome is about 4.71 Mb, the sequencing depth was 218X.

收稿日期： 2015–09–29

基金项目： 国家自然科学基金项目(21276110)；国家 973 计划项目(2012CB725202)；江苏高校优势学科建设工程项目；北京市优秀人才培养资助青年骨干个人项目((2014000020124G064))；111 计划(111–2–06)；生物质废弃物资源化利用北京市重点实验室开放课题项目。

作者简介： 赵有玺(1979—)，男，山东日照人，工学博士，副教授，主要从事工业微生物方面的研究。E–mail: :zhaoyouxi@buu.edu.cn

*** 通信作者：** 饶志明(1975—)，男，江西临川人，农学博士，教授，博士研究生导师，主要从事工业微生物育种和发酵代谢方面的研究。E–mail：raozm@jiangnan.edu.cn

引用本文： 赵有玺，薛燕芬，马延和，等. *Halogranum amylolyticum* TNN58 全基因组测序及 PHBV 代谢途径分析[J]. 食品与生物技术学报，2018，37(06)：572–579.

According to the analysis of genome sequence, the PHA sythaseis composed of PhaE and PhaC subunits and there is no acetaldehyde acid cycle in strain. It is interesting to find the methylaspartate cycle is an anaplerotic acetate assimilation pathway. These results will help to reveal the mechanism of PHBV synthesis and provide genome sequence for the research on *H. amylolyticum* TNN58.

Keyword: PHBV, genome, *Halogranum amylolyticum*

Polyhydroxyalkanoates（PHAs）是一类由多种羟基脂肪酸单体组成的生物聚合物。通常是在碳源过剩时，细菌或极端嗜盐古菌合成 PHAs 作为一种碳源和能源的储备物质[1-2]。PHAs 具有良好的生物可降解性、生物相容性和可再生性，可作为传统化石来源的塑料的替代物，近年来引起科学家的高度关注[3-7]。PHAs 的特性由许多参数决定，如单体的种类、含量、单体在链上的分布、聚合物的相对分子质量及其分布等[8]。目前，已经发现超过 150 多种单体结构和特性不同的 PHAs。在这些 PHAs 中，poly-3-hydro-xybutyrate（PHB）和 poly（3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate）（PHBV）受到广泛的关注[9]。PHB 具有较高的结晶度，这导致了其具有硬度高和脆的特性，同时由于它的熔点高达 170 ℃，且在 180 ℃时就会裂解，使得 PHB 的处理加工困难，这限制了它的应用[10]。3-羟基戊酸（3-hydroxyvalerate，3HV）单体的掺入使 PHBV 的结晶结构明显改变，带来硬度下降、强度下降、熔点下降，但分解温度却没有下降，而且随着 3HV 的加入，结晶的晶体规整性下降且呈现不同的结晶形态，这对 PHBV 性能都有改进作用。因此，PHBV 具有更加广阔的应用前景[11]。目前，PHBV 在组织工程领域得到了广泛的应用。研究发现，PHBV 材料学性能与其单体 3HV 含量密切相关[12]。

大多数的细菌需要在培养基中添加 3HV 的前体来合成 PHBV，这极大地增加了 PHBV 的成本[13]。研究发现，大部分极端嗜盐古菌能够利用非相关碳源合成 PHBV，这引起了科学家的关注[14-15]。我们最近的研究表明，*Halogranum amylolyticum* TNN58 可以利用葡萄糖积累 3HV 摩尔分数高达 20% 的 PHBV。目前，这是利用非相关碳源和非基因工程改造菌株合成 PHBV 材料中 3HV 摩尔分数最高的[16]。这使得 *H.amylolyticum* TNN58 具有极高的研究价值和一定的工业应用前景。*H.amylolyticum* TNN58 合成 PHBV 材料高 3HV 摩尔分数的机制引起了我们的关注和兴趣。

在本研究中，我们对 *H.amylolyticum* TNN58 的基因组进行了测序，进一步分析了 PHBV 的代谢途径，为揭示 *H.amylolyticum* TNN58 合成 PHBV 材料高 3HV 摩尔分数的机制奠定了一定的基础。

1 材料与方法

1.1 菌株

H.amylolyticum TNN58：作者所在实验室保存。

1.2 基因组测序

基因组测序由作者所在实验室委托北京百迈克生物科技有限公司完成。基因组测序采用全基因组鸟枪法测序策略和 Illumina 公司提供的标准实验操作方案进行测序。测序数据使用 Velvet 进行组装。

1.3 基因组注释

采用 Glimmer 软件采用内插马尔可夫模型来识别基因组中的编码基因，对基因组进行基因预测。将预测得到的基因序列与 COG、KEGG、GO、Swiss-Prot、Nr 功能数据库进行 Blast 比对，进行基因注释。使用 TRF 采用从头预测的原理进行重复序列的预测。

1.4 PHBV 前体供应途径的分析

根据已经报道的 *H. mediterrane* 中存在 4 条 3-HV 供应途径，通过在 *H.amylolyticum* TNN58 已经注释的基因中检索相关途径的酶是否存在来预测 *H.amylolyticum* TNN58 是否存在相关代谢途径。

1.5 PHBV 降解分析

以 PHA 降解酶氨基酸序列为参考对象对 *H.amylolyticum* TNN58 的全基因组序列进行本地 BlastP 比对分析。

1.6 乙醛酸循环和甲基天冬氨酸循环

通过在 *H.amylolyticum* TNN58 已经注释的基因中检索乙醛酸和甲基天冬氨酸循环的酶是否存在，来预测 *H.amylolyticum* TNN58 是否可能存在相关代谢途径。

2 结果与分析

2.1 基因组测序

采用全基因组鸟枪法测序策略和 Illumina 公司提供的标准 protocol 进行测序。使用样品的基因组 DNA 分别构建 600 bp、3 kb 共 2 个文库，在 Illumina Hiseq2500 测序平台测序得到的 875 Mb 原始数据，总测序深度约为 218X。拼接组装后，TNN58 共得到 125 个重叠群，总计大小为 4.68 Mb；32 个支架序列，总计大小为 4.73 Mb，N50 长度为 820 653 bp。17-mer 总数为 518、108、634，平均固定短串深度即主峰对应的固定短串深度为 55，估计基因组大小约为 4.71 Mb。

2.2 基因组序列初步分析

对基因组数据进行分析，基因组的 GC 含量为 63.49%。采用 TRF 从头预测原理进行重复序列预测，共有 366 条重复序列，总长度为 21 978 bp。同时分析鉴定了基因组的非编码 RNA，包括 42 个 tRNA，8 个 rRNA，8 个 miRNA。使用 Glimmer 软件采用内插马尔可夫模型（interpolated Markov models，IMMs）来识别基因组中的编码区域，预测编码基因，共得到编码基因 5 815 个。

2.3 基因功能分类

对预测基因的氨基酸序列在数据库中进行比对注释。在 Nr 库中，有 4 878 个基因具有注释信息，占到预测基因的 83.88%。共有 4 887 个基因可以注释到 Nr、COG、KEGG、GO 等数据库，占到预测基因的 84.04%，见表 1。

表 1 基因功能注释信息

Table 1 Statistical information on gene function annotation

数据库	注释基因数目	百分比/%
COG	2 431	41.81
KEGG	1 501	25.81
GO	3 598	61.87
Swiss-Prot	3 828	65.82
Nr	4 878	83.88
合计	4 887	84.04

将预测到的所有蛋白质序列与 COG 数据库进行 BlastP 比对分析，其中 2 431 个蛋白质获得 COG 功能注释，见图 1。由图 1 可知，COG 聚类主要集中于转录、翻译、糖代谢、氨基酸代谢、脂类代谢和次级代谢等。

将预测到的所有蛋白质序列与 GO 数据库进行 BlastP 比对分析，其中 3 598 个蛋白质获得 GO 功能注释，见图 2。由图 2 可知，GO 聚类主要分为 3 个部分，按照其参与构成细胞组成，实现分子功能和参与生物过程等进行分类。

2.4 PHA 合酶的初步分析

PHA 合酶是 PHA 生物合成中的关键酶，决定了 PHA 的种类，如 PHA 的单体种类、含量和聚合方式等。目前报道利用非相关碳源合成 PHBV 的非基因工程菌中，*H.amylolyticum* TNN58 是 3-HV 含量最高的微生物，对其 PHA 合酶分析具有一定的意义[16]。2003 年，Rehm 报道，细菌中 PHA 合酶的种类



图 1 *Halogranum amylolyticum* TNN58 蛋白质 COG 聚类分析

Fig. 1 COG cluster analysis of *Halogranum amylolyticum* TNN58 proteins

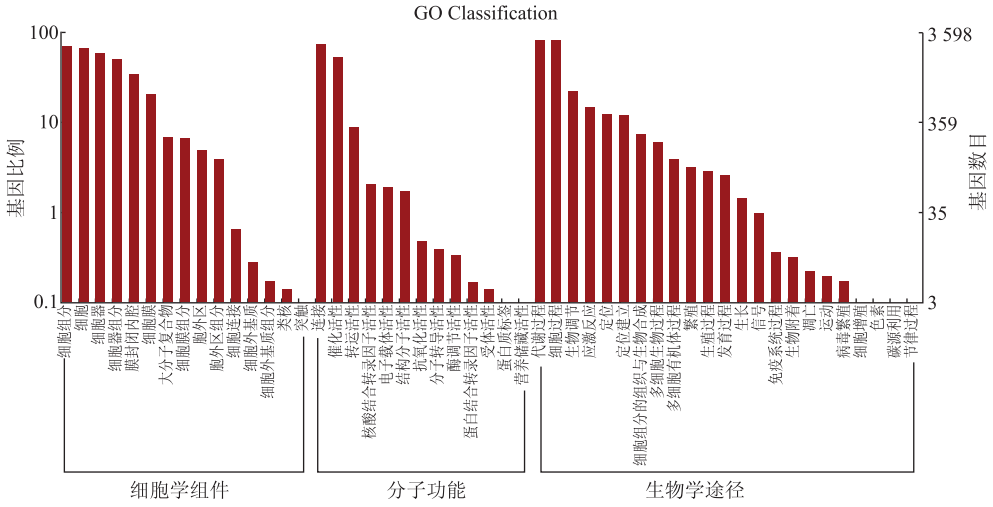


图 2　*Halogranum amylolyticum* TNN58 蛋白质 GO 聚类分析

Fig. 2　GO cluster analysis of *Halogranum amylolyticum* TNN58 proteins

共有 4 类，见图 3。I 类 II 类合酶只有一个单体 PhaC,III 类由 PhaC 和 PhaE 组成,IV 类合酶由 Phac 和 PhaR 亚基组成。不同类型的 PHA 合酶具有不同的底物类型等差异[17]。2008 年,Hanjing 等在 *Haloarcula marismortui* ATCC43049 中发现一类新的合酶种类,由 PhaC 和 PhaE 组成,PhaC 亚基 53 000,PhaE 亚基 20 000。而细菌中的 III 类 PHA 合酶,PhaC 亚基和 PhaE 亚基大小类似，均在 40 000 左右。进一步分析发现,目前研究发现的极端嗜盐古菌的 PHA 合酶类似于 III 类 PHA 合酶，但是 PhaC 亚基的相对分子质量明显大于 PhaE 亚基，故定义为新一类的 PHA 合酶[18]。

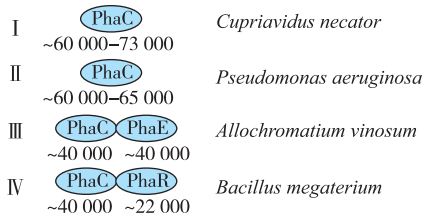
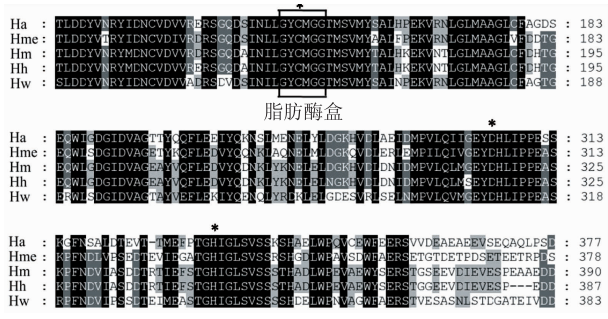


图 3　细菌中 PHA 合酶的分类

Fig. 3　PHA synthase in bacteria

将预测的 *H.amylolyticum* TNN58 的 PHA 合酶基因与 *H. mediterranei* 的 PHA 合酶进行比对,发现两个 ORF 编码的氨基酸与 *H. mediterranei* 的 PhaE 和 PhaC 的氨基酸序列同源性达到 64%和 62%,因此命名为 phaE 和 phaC。phaC 的起始密码子(ATG)与 phaE 的终止密码子(TGA),有两个碱基的重叠,共用了 T 和 G。PhaC 亚基的相对分子质量为 54 000,PhaE 亚基的相对分子质量为 21 000，见图 4。进一步的分析发现,PhaC 亚基的氨基酸序列中存在一个“脂肪酶盒”(Gly–X–Cys–X–Gly–Gly)结构,该结构在 PHA 合酶十分保守，推测可能是 PHA 合酶的活性位点 (Gerngross et al.,1994)[19]。同时发现 PhaC 亚基具有 PHA 合酶所特有的三联体催化氨基酸 Cys150–Asp305 –His334,对应于 *H. mediterranei* 的 PhaC 亚基中的催化氨基酸 Cys150–Asp305–His334。



$PhaC_{Hme}$:EU374220;$PhaC_{Hm}$:YP_137339;$PhaC_{Hh}$:ABV71394;$PhaC_{Hw}$:YP_658052。

图 4　*H. amylolyticum* TNN58 PHA 合酶氨基酸比对结果

Fig. 4　Multiple alignments of partial amino acid sequences of the PHA synthase of *H. amylolyticum* TNN58

2.5　PHBV 前体供应途径的分析

2013 年,Han 等通过对 *H. mediterrane* 的基因组数据,芯片组数据,代谢流分析和遗传学实验等发现了 4 条 propionyl–coA 的供给途径[20]。

根据 Nr、COG、KEGG、GO 等数据库对基因功能的注释,通过与 Han 等报道的 *H. mediterrane* 中 3–

HV 供应途径进行分析，得到了 *H.amylolyticum* TNN58 中 3–HV 的供应途径[20]。具体途径见图 5，基因的信息见表 2。TNN58 的 3–HV 供应途径一共有 4 条。

2.6 PHBV 降解分析

PHA 的降解即是 PHA 的解聚过程。PHA 的降解由 PHA 解聚酶 PhaZ 催化进行。根据降解底物的不同，PhaZ 分为两种：胞内降解酶（intracellular depolymerase，iPhaZ）和胞外降解酶（extracellular depolymerase，ePhaZ），分别负责胞内 PHA 颗粒的降解解聚和环境中 PHA 的降解[21]。

以细菌中已知的 PHA 降解酶（Knoll，et al.

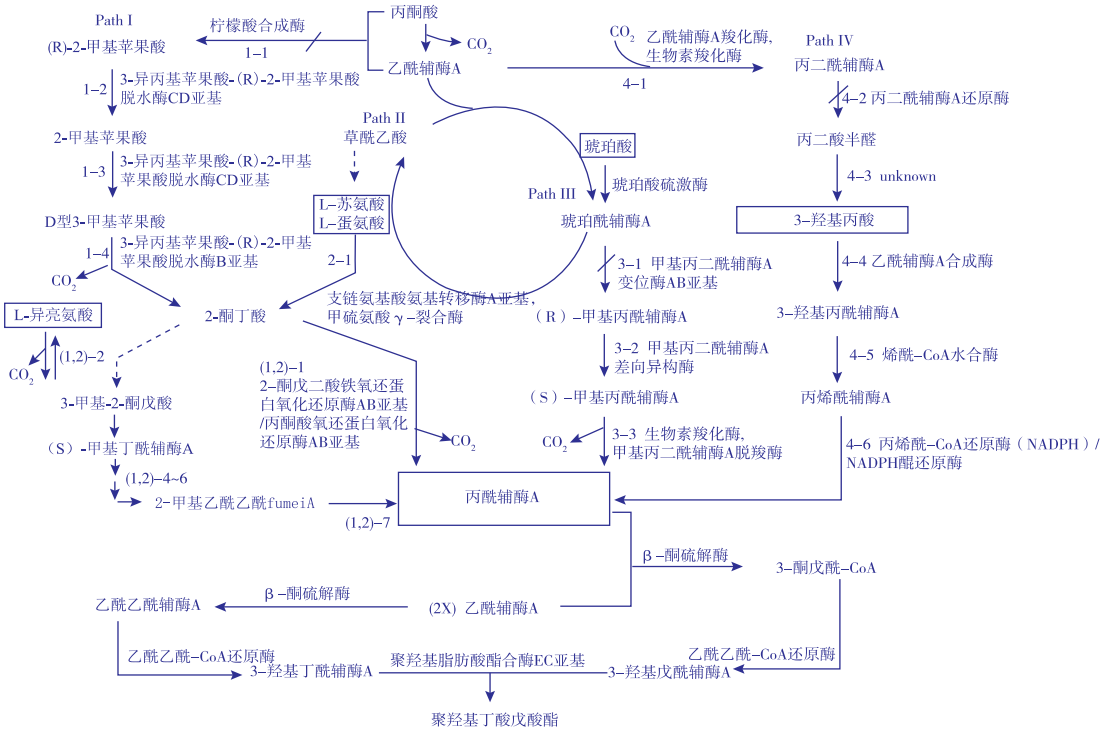


图 5 *H. amylolyticum* TNN58 PHBV 合成代谢预测途径

Fig. 5 Predicted biosynthetic pathway of PHBV in *H. amylolyticum* TNN58

表 2 *H. amylolyticum* TNN58 基因组中预测 PHBV 合成代谢相关基因

Table 2 Predicted gene relate to PHBV biosynthetic pathway identified by *H. amylolyticum* TNN58 genome

基因编号	基因注释	催化反应	基因编号	基因注释	催化反应
BSP004084	柠檬酸合成酶	1–1	BSP002411	乙酰辅酶 A 脱氢酶	(1,2)–4
BSP004085	柠檬酸合成酶	1–1	BSP002152	乙酰辅酶 A 脱氢酶	(1,2)–4
BSP002448	3–异丙基苹果酸脱水酶大亚基	1–2,1–3	BSP002319	烯酰辅酶 A 水合酶活性	(1,2)–5
BSP002447	3–异丙基苹果酸脱水酶小亚基	1–2,1–3	BSP000788	烯酰辅酶 A 水合酶活性	(1,2)–5
BSP004270	2–酮戊二酸氧化还原酶亚基 B	1–4	BSP003146	烯酰辅酶 A 水合酶活性	(1,2)–5
BSP004271	2–酮戊二酸氧化还原酶亚基 A	(1,2)–1	BSP000676	烯酰辅酶 A 水合酶活性	(1,2)–5
BSP002219	2–酮戊二酸合酶亚基	(1,2)–1	BSP000763	烯酰辅酶 A 水合酶	(1,2)–5
BSP002220	2–酮戊二酸合酶亚基	(1,2)–1	BSP002267	烯酰辅酶 A 水合酶	(1,2)–5
BSP004339	支链氨基酸转氨酶	(1,2)–2	BSP003134	烯酰辅酶 A 水合酶	(1,2)–5
BSP003717	支链氨基酸转氨酶	(1,2)–2	BSP000769	烯酰辅酶 A 水合酶	(1,2)–5
BSP004448	丙酮酸脱氢酶 E1 组分 α 亚基	(1,2)–3	BSP000066	烯酰辅酶 A 水合酶	(1,2)–5
BSP004449	丙酮酸脱氢酶 E1 组分?亚基	(1,2)–3	BSP002325	3–羟基丁酰–CoA 脱氢酶	(1,2)–6
BSP003295	丙酮酸脱氢酶 E1 组分 α 亚基	(1,2)–3	BSP005399	3–羟基丁酰–CoA 脱氢酶	(1,2)–6
BSP003296	丙酮酸脱氢酶 E1 组分 β 亚基		BSP000690	3–羟基丁酰–CoA 脱氢酶	(1,2)–6

基因编号	基因注释	催化反应	基因编号	基因注释	催化反应
BSP003145	3-羟基丁酰-CoA 脱氢酶	(1,2)-6	BSP002418	甲基丙二酰辅酶 A 差向异构酶	3-2
BSP000764	3-羟基丁酰-CoA 脱氢酶	(1,2)-6	BSP005275	甲基丙二酰辅酶 A 脱羧酶	3-3
BSP000769	3-羟基丁酰-CoA 脱氢酶	(1,2)-6	BSP000325	生物素羧化酶活性	3-3
BSP000689	乙酰辅酶 A C-乙酰转移酶	(1,2)-7	BSP000326	生物素羧化酶活性	3-3
BSP001002	乙酰辅酶 A C-乙酰转移酶	(1,2)-7	BSP005270	生物素羧化酶活性	3-3
BSP001276	乙酰辅酶 A C-乙酰转移酶	(1,2)-7	BSP000325	生物素羧化酶	4-1
BSP000800	乙酰辅酶 A C-乙酰转移酶	(1,2)-7	BSP005270	生物素羧化酶	4-1
BSP001919	乙酰辅酶 A C-乙酰转移酶	(1,2)-7	BSP000326	生物素羧化酶	4-1
BSP005660	乙酰辅酶 A C-乙酰转移酶	(1,2)-7	BSP005198	丙二酰辅酶 A 还原酶	4-2
BSP000820	乙酰辅酶 A C-乙酰转移酶	(1,2)-7	BSP004277	乙酰辅酶 A 合酶	4-4
BSP002511	L-苏氨酸脱水酶	2-1	BSP001877	乙酰辅酶 A 合酶	4-4
BSP000725	L-苏氨酸脱水酶	2-1	BSP000232	乙酰辅酶 A 合酶	4-4
BSP000179	L-苏氨酸脱水酶	2-1	BSP000799	烯酰-CoA 水合酶	4-5
BSP003745	L-苏氨酸脱水酶	2-1	BSP002319	烯酰-CoA 水合酶	4-5
BSP004288	甲基丙二酰辅酶 A 变位酶	3-1	BSP000788	烯酰-CoA 水合酶	4-5
BSP002289	甲基丙二酰辅酶 A 变位酶	3-1	BSP003146	烯酰-CoA 水合酶	4-4
BSP004276	甲基丙二酰辅酶 A 变位酶	3-1	BSP001112	丙烯酰-CoA 还原酶	4-6
BSP001552	甲基丙二酰辅酶 A 差向异构酶	3-2			

2009)序列为参考对象对 *H.amylolyticum* TNN58 的全基因组序列进行本地 BlastP 比对分析，结果并没有找到匹配度很高的蛋白质序列。2015 年，Liu 等在 *H. mediterrane* 报道了一个能够胞内降解 PHA 的 PhaZ，命名为 PhaZh1[21]。以 *H. mediterrane* 的 PhaZh1 的序列为参考对象，对 TNN58 的全基因组序列进行本地 BlastP 比对分析，结果发现BSP003746 与之高度同源，达 63%，推测可能是 TNN58 中的 iPhaZ。

2.7 乙醛酸循环和甲基天冬氨酸循环

极端嗜盐古菌的生存环境中盐浓度很高，在此盐浓度下，大部分微生物不能存活。极端嗜盐古菌通过长期的进化具有了许多独特的特征。由于具备这些特性，它们才能适应高盐环境。科学家对极端嗜盐古菌适应高盐环境的机制进行了长期的研究。2011 年 Mairakhomyakova 等通过对极端嗜盐古菌 *Haloarcula marismortui* DSM3752 进行蛋白质组学研究，发现 *H. marismortui* DSM3752 中不存在乙醛酸循环。通过进一步分析和酶活测定，他们预测 *H. marismortui* DSM3752 存在一条甲基天冬氨酸途径替代乙醛酸循环的途径，起到同化乙酸盐的作用，同时认为该途径和极端适应环境的机制存在一定的关系[22]。2015 年，Farshad 等通过基因敲除等技术设计遗传学实验，验证了该条途径的存在。同时发现该途径与生物合成有关，特别是和 PHA 的合成有一定的关系[23]。

对 *H.amylolyticum* TNN58 的基因组进行分析，在已经预测功能的基因中，不存在异柠檬酸裂解酶，因此推断，*H.amylolyticum* TNN58 中不存在乙醛酸循环。进一步研究 *H.amylolyticum* TNN58 中是否存在甲基天冬氨酸循环作为乙醛酸的替代途径，我们以 *Haloarcula marismortui* DSM3752 的甲基天冬氨酸途径为参照，对其基因组数据进行分析，结果见图 6[22]。2-酮戊二酸在谷氨酸脱氢酶的作用下转化为谷氨酸，谷氨酸在谷氨酸变位酶的作用下生成甲基天冬氨酸，甲基天冬氨酸在甲基天冬氨酸裂解酶作用下生成康酸，接下来在康酸辅酶 A 转移酶的作用下生成康酰辅酶 A，在康酰辅酶 A 水合酶的催化下生成 β-甲基苹果酰辅酶 A，β-甲基苹果酰辅酶 A 通过 mcl 的催化裂解为丙酰辅酶 A 和乙醛酸。乙醛酸和乙酰辅酶 A 合成苹果酸，进入 TCA 循环，或者进一步用于生物合成。丙酰辅酶 A 经过一系列转化可以生成琥珀酰辅酶 A 进入 TCA 循环。此循环中，甲基天门冬氨酸是其特征性中间体。具体的基因信息见表 3。通过表 3 可以看出，甲基天冬氨酸循环所涉及的酶在 TNN58 的预测功能基因中都存在。这 6 个基因存在于 1 个基因簇上。因此推测 TNN58 中，可能存在此代谢途径。

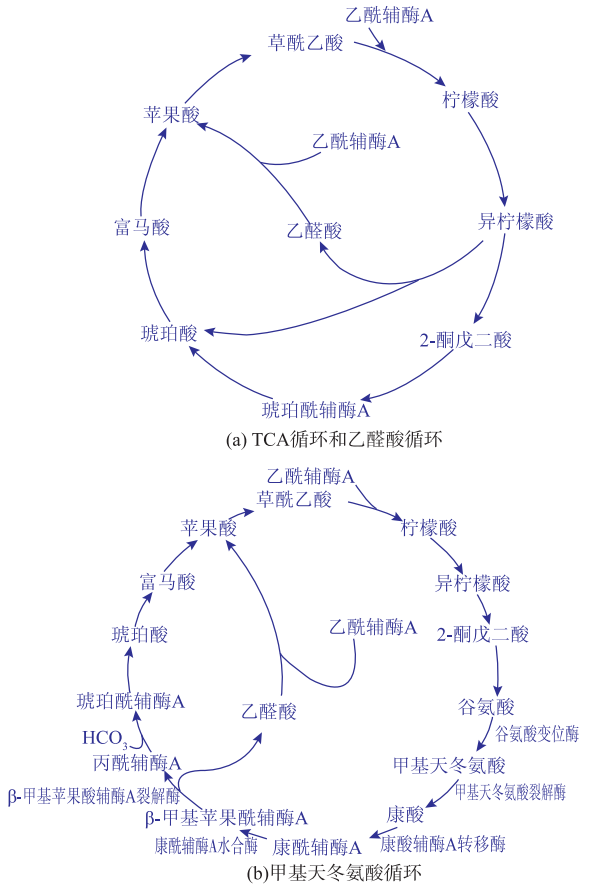


图 6　乙醛酸循环和甲基天冬氨酸循环

Fig. 6　Acetaldehyde acid cycle and methylaspartate cycle

表 3　*H. amylolyticum* TNN58 基因组中预测甲基天冬氨酸循环相关基因

Table 3　Predicted gene relate to methylaspartate cycle identified by *H. amylolyticum* TNN58 genome

基因编号	基因简写	基因注释
BSP005252	*mam AB*	谷氨酸变位酶
BSP005253	*mam AB*	谷氨酸变位酶
BSP005254	*mal*	甲基天冬氨酸裂解酶
BSP005255	*mct*	康酸辅酶 A 转移酶
BSP005256	*mch*	康酰辅酶 A 水合酶
BSP005257	*mcl*	β-甲基苹果酰辅酶 A 裂解酶

3 结　语

在我们的研究中，发现 *H.amylolyticum* TNN58 可以利用非相关碳源合成 3HV 摩尔比高达 20%的 PHBV 材料，这在目前的已报道的研究中属于最高。因此，研究 *H.amylolyticum* TNN58 合成高含量 3-HV 的 PHBV 机制，具有重要的意义。

研究发现，PHBV 是由乙酰辅酶 A 和丙酰辅酶 A 通过 3 个酶——β-酮硫解酶、β-酮脂酰还原酶和 PHA 合酶催化合成的。PHBV 中 3-HV 的比例与丙酰辅酶 A 的供给及 PHA 合酶的特性具有直接的关系。

通过数据分析，初步预测 *H.amylolyticum* TNN58 存在 4 条丙酰辅酶 A 的供给途径。同时，我们初步预测和分析了 *H.amylolyticum* TNN58 的 PHBV 合成代谢的途径及关键酶的特征，这为我们进一步了解其合成高摩尔比 3-HV 的 PHBV 机制具有重要的参考价值，也为通过遗传改造提高 PHBV 产量奠定了基础。

通过比对分析发现 *H.amylolyticum* TNN58 中负责 PHA 降解的酶。这对于研究 PHA 代谢的动态平衡，在适当的代谢条件下阐明 PHA 如何降解成单体的机制是非常必要的。

通过对数据进行分析，发现 *H.amylolyticum* TNN58 不存在乙醛酸循环，同时可能存在甲基天冬氨酸途径。这有助于我们理解甲基天冬氨酸途径与 PHBV 代谢的作用，以及甲基天冬氨酸途径在极端嗜盐古菌适应高盐环境的机制中的作用。

H.amylolyticum TNN58 基因组测序完成为进一步开展该菌的基因结构与功能和代谢途径研究，特别是 PHBV 代谢途径的研究提供有价值的信息，为进一步阐述其合成高摩尔比 3-HV 的 PHBV 机制，通过基因工程手段提高 PHBV 产量及 3HV 比例等提供了参考。

参考文献：

[1] PRIETO A,ESCAPA I F,MARTINEZ V,et al. A holistic view of polyhydroxyalkanoate metabolism in *Pseudomonas putida*[J]. **Environ Microbiol**,2016,18(2):341-357.

[2] JENDROSSEK D,PFEIFFER D. New insights in the formation of polyhydroxyalkanoate granules (carbonosomes) and novel functions of poly(3-hydroxybutyrate)[J]. **Environ Microbiol**,2014,16:2357-2373.

[3] WANG Y,YIN J,CHEN G Q. Polyhydroxyalkanoates,challenges and opportunities[J]. **Curr Opin Biotech**,2014,30C:59-65.

[4] YOU M,PENG G,LI J,et al. Chondrogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells on

polyhydroxyalkanoate（PHA）scaffolds coated with PHA granule binding protein PhaP fused with RGD peptide[J]. **Biomaterials**，2011，32：2305-2313.

[5] DONG Y，LI P，CHEN C B，et al. The improvement of fibroblast growth on hydrophobic biopolyesters by coating with polyhydroxyalkanoate granule binding protein PhaP fused with cell adhesion motif RGD[J]. **Biomaterials**，2010，31：8921-8930.

[6] OU W F，QIU H D，CHEN Z F，et al. Biodegradable block poly（ester-urethane）s based on poly（3-hydroxy -butyrate-co-4-hydroxybutyrate）copolymers[J]. **Biomaterials**，2011，32：3178-3188.

[7] HU D，CHUNG A L，WU L P，et al. Biosynthesis and characterization of polyhydroxyalkanoate block copolymer P3HB-b-P4HB[J]. **Biomacromolecules**，2011，12：3166-3173.

[8] PEDERSON E N，MCCHALICHER C W，SRIENC F. Bacterial synthesis of PHA block copolymers[J]. **Biomacromolecules**，2006，7：1904-1911.

[9] NODA I，GREEN P R，SATKOWSKI M M，et al. Preparation and properties of a novel class of polyhydroxyalkanoate copolymers [J]. **Biomacromolecules**，2005，6：580-586.

[10] ASRAR J，VALENTIN H E，BERGER P A，et al. Biosynthesis and properties of poly（3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate）polymers[J]. **Biomacromolecules**，2002，3：1006-1012.

[11] LUZIER W D. Materials derived from biomass/biodegradable materials[J]. **Proc Natl Acad Sci**，1992，89：839-842.

[12] WU Q，WANG Y，CHEN G Q. Medical application of microbial biopolyesters polyhydro xyalkanoates[J]. **Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol**，2009，37：1-12.

[13] CHOI J I，LEE S Y. High-level production of poly（3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate）by fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli*[J]. **Appl Environ Microb**，1999，65：4363-4368.

[14] LEGAT A，GRUBER C，ZANGGER K，et al. Identification of polyhydroxyalkanoates in *Halococcus* and other haloarchaeal species[J]. **Appl Microbiol Biot**，2010，87：1119-1127.

[15] HAN J，HOU J，LIU H，et al. Wide distribution among halophilic archaea of a novel polyhydroxyalkanoate synthase subtype with homology to bacterial type III synthases[J]. **Appl Environ Microb**，2010，76：7811-7819.

[16] ZHAO Y X，RAO Z M，XUE Y F，et al. Poly（3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate）production by Haloarchaeon *Halogranum amylolyticum*[J]. **Appl Microbiol Biot**，2015，99：7639-7649.

[17] REHM B H. Polyester synthase：natural catalysts for plastics[J]. **Biochem J**，2003，376：15-33.

[18] LU Q，HAN J，ZHOU L，et al. Genetic and biochemical characterization of the poly（3-hydroxybutyrate- co-3-hydroxyvalerate）synthase in Haloferax mediterranei[J]. **J Bacteriol**，2008，190：4173-4180.

[19] GERNGROSS T U，SNELL K D，PEOPLES O P，et al. Overexpression and purification of the solublepolyhydroxyalkanoate synthase from Alcaligenes eutrophus：evidence for a required posttranslational modification for catalytic activity [J]. **Biochemistry**，1994，33：9311-9320.

[20] HAN J，HOU J，ZHANG F，et al. Multiple propionyl-CoA supplying pathways for production of bioplastic poly（3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate）in haloferax mediterranei[J]. **Appl Environ Microb**，2013，79：2922-31.

[21] LIU G，HOU J，CAI S，et al. A patatin-like protein associated with the polyhydroxyalkanoate （PHA）granules of Haloferax mediterranei acts as an efficient depolymerase in degradation of native PHA[J]. **Appl Environ Microb**，2015，81：3029-3038.

[22] KHOMYAKOVA M，BUKMEZ O，THOMAS L K，et al. A methylaspartate cycle in haloarchaea[J]. **Science**，2011，331：334-337.