

羟基脂肪酸聚酯产生菌选育

王 武 陈富强 李礼尧

(生物工程学院)

(食品学院)

摘要 以特定方法筛得羟基脂肪酸聚酯(PHAS)产生株 AMB-001,初步鉴定为产碱菌(*Alcaligenes*)属。经紫外线与亚硝基胍诱变,变异株 AUN-39 产聚羟丁酸(PHB)和聚羟丁戊酸共聚物(PHBV)的产率分别为细胞干重的35%和47.5%。透射电镜观察表明 AUN-39 胞内积累的 PHB 粒子可充满胞内空间。

主题词 产碱杆菌;聚羟丁酸;聚羟丁戊酸共聚物

中图分类号 TQ920.1

0 前 言

羟基脂肪酸聚酯英文全称 Polyhydroxyalkanoates (PHAs)。不同的 PHAs,其单体碳链可为 $C_3 \sim C_{12}$ 不等,其中聚羟丁酸(PHB)和聚羟丁戊酸共聚物(PHBV)具有较大的开发价值,它们的物理性质与一些化学合成材料比较接近,可开发成接骨材料,缓释药物载体,外科缝线等医用材料;各种包装薄膜,容器,卫生用品等工业材料;以及地膜,除虫剂,除草剂载体等农用材料。PHAs 材料是由多种微生物在碳源丰富而氮源贫乏的情况下在胞内积累的,作为胞内碳源储存物,^[1] 故很容易在生态环境中彻底降解。在当今生态环境日益恶化,石油资源日趋耗竭的情况下,开发这类生物合成高分子材料具有十分重要的意义。本研究着重从当地自然环境中筛选出能合成 PHB 和 PHBV 的产生菌,并进行改良,初步提高其 PHB 和 PHBV 的生物合成能力。

1 材料与方 法

1.1 培养基

培养基 A(g/100ml):酵母膏 1 蛋白胨 1 牛肉膏 0.5 葡萄糖 2.0 硫酸铵 0.5

培养基 B(g/L):葡萄糖 20 硫酸铵 1 磷酸盐 10 硫酸镁 0.2 氯化钙 0.01 柠檬酸亚铁铵 0.06

培养基 C:培养基 A+0.04%显色剂+琼脂 2.0

国家自然科学基金资助项目

收稿日期:1996-03-04

1.2 基本培养方法

温度 30℃, 旋转式摇床振荡 200r/min, 培养方式: 富氮(培养基 A)培养菌体 30h 左右, 菌体转接入贫氮(培养基 B)摇瓶, 以利产 PHAs。

1.3 染色法

苏丹黑染色法^[2]

1.4 测定方法

1) PHB 紫外分光吸收测定法^[3]。

2) PHBV 气相色谱分析法 PHBV 溶于氯仿。色谱条件 柱 OV-17, 检测器 FID, 220℃。程序升温 80℃ $\xrightarrow{1\text{min}}$ $\xrightarrow{10\text{℃/min}}$ 180℃, 维持 10min, 进样量 0.3μl, 分馏比 1:100。

2 结果与讨论

2.1 菌种筛选

2.1.1 筛选方案 可产生 PHAs 的微生物多为细菌, 种类较多, 就生物合成 PHAs 的潜力而言, 产碱杆菌属(*Alcaligenes*)是一类较为理想的菌属。针对 *Alcaligenes* 的生理特征, 筛选路线设计为:

以特定显色剂筛出产生变色圈的细菌
↓
以蕃红染色筛出革兰氏阴性菌
↓
以苏丹黑染色, 检查筛出 PHAs 产生菌
↓
以紫外分光吸收法初测所产的 PHAs 种类
↓
以气相色谱确证
↓
根据形态, 生理生化特征初步鉴定菌种

2.1.2 初筛 收集多种土壤、污泥、污水, 稀释后, 分别涂布在培养基 C 平板上, 培养 2d 后, 在平板的粉红色的背景下, 寻找黄褐色的变色菌落。这是因为 *Alcaligenes* 产生的某些物质能使显色剂变色。对 14 个不同土样的分离, 共挑到 7 个黄褐色菌落。经蕃红染色鉴别为革兰氏阴性的杆菌。分别编号为 AMB-001, …AMB…007。

根据 *Alcaligenes* 产生 PHAs 的特点, 将初筛到的上述 7 个菌株分别接入培养基 A, 富氮培养 36h, 无菌离心收集菌体, 转入培养基 B, 贫氮培养 36h。分别在富氮和贫氮培养过程中取出细胞, 以苏丹黑 B 染色镜检, 发现 AMB-001, AMB-002, AMB-005 三个菌株经富氮培养呈负染, 经贫氮培养, 染色后呈蓝黑色。初步判断 AMB-001, AMB-002, AMB-005 可产生羟基脂肪酸聚酯。

2.1.3 产物鉴别 上述 3 支筛得株经富氮转贫氮培养后, 分别取出 1ml 菌液, 离心获得细胞后, 分别以次氯酸钠处理, 无水乙醇洗涤, 再以氯仿萃取羟基脂肪酸聚酯, 紫外分光吸收法和气相色谱法测定皆表明这 3 支菌株都能产生 PHB。色谱图上, 上述产物与购自 Aldrich 公司的 PHB 标准样品出峰位置相同(图谱略)。说明上述 3 个菌株皆可产 PHB。它们所产的 PHB 含量以菌株 AMB-001 为最多(见表 1)。

选菌株 AMB-001 作为下一步诱变育种的出发株。



大,耐葡萄糖浓度更高的变异株。经复筛后获得一株 PHB 占细胞干重为 15%,耐葡萄糖浓度 6%的变异株 AUV-68。

2.2.2 亚硝基胍诱变 以变异株 AUV-68 作为亚硝基胍诱变的出发株,在诱变剂浓度为 0.1mg/ml 菌液,处理时间为 15min,致死率为 83%的条件下,从存活株中挑出耐葡萄糖浓度高,生长快的 90 个菌落,经复筛,其中 16 个菌落产 PHB 的产率超过 15%,最高的一株达到 35%,定名为 AUN-39。AUN-39 经斜面转接 7 次,每次都进行摇瓶培养测定其产 PHB 的稳定性,结果表明其产 PHB 的产率基本上仅有 1 个百分点的差异,转接到第 7 次产率为 33%,说明 AUN-39 产 PHB 的遗传性状基本上稳定。菌株 AUN-39 的诱变谱系见表 2。

表 2 菌株 AUN-39 的诱变谱系

菌 株	诱变剂法	PHB 产率(%) (PHB/细胞干重)
AMB-001		9.8
↓	紫外线	
AU-27		11.5
↓	紫外线	
AUV-68		15.0
↓	NTG	
AUN-39		35.0

2.3 羟基脂肪酸聚酯产生条件研究

2.3.1 几种碳氮源对菌体生长和 PHB 生成的影响 以菌株 AUN-39 为研究对象,选择可利用碳源中 5 种完全不同类型的碳源葡萄糖、甘油、丁酸、色拉油、正己烷进行了碳源对菌体生长和 PHB 生成的影响进行比较,结果发现对菌体生长而言,色拉油最为有利;而丁酸抑制生长。对于 PHB 的生成而言,丁酸是最好的碳源,而甘油的效果则最差。另外无论对于菌体生长还是 PHB 生成而言,葡萄糖都是较好的碳源(表 3)。

4 种氮源对细胞生长和 PHB 生成的影响也进行了比较,各种氮源浓度保持氮源百分比相同,富氮期为 0.105%,贫氮期为 0.021%,结果发现硝酸铵在两种情况下都是最有利的氮源,硫酸铵次之(表 4)。硝酸铵的阳离子和酸根中都含有氮元素,可望成为一步法培养的合适氮源。

表 3 碳源对菌体生长和 PHB 生成的影响

碳源(2%)	细胞干重(g/L)	PHB/细胞干重(%)
葡萄糖	5.0	33
甘 油	3.4	6
丁 酸	—	42
色拉油	6.6	31
正己烷	3.6	25

表 4 氮源对菌体生长和 PHB 生成的影响

氮 源	细胞干重(g/L)	PHB/细胞干重(%)
(NH ₄) ₂ SO ₄	4.9	33
NH ₄ Cl	4.7	19
CO(NH ₂) ₂	4.1	26
NH ₄ NO ₃	14.4	35

2.3.2 胞内 PHB 积累情况 通过对碳源、氮源、摇瓶条件的摸索,以及正交试验比较,在最佳的条件下培养 AUN-39,取其 64h 摇瓶培养细胞,进行透射电镜观察(图 1),可以看出细胞生长期和 PHB 合成期的细胞形态截然不同,前者狭长呈“辣椒”形,胞内仅积累少量的 PHB 粒子;后者呈圆形或椭圆形,胞内积累大粒 PHB 颗粒,有的甚至充满了整个胞内空间。电镜观察显示了菌株 AUN-39 生成 PHB 的潜力,如果细胞群体中所有的细胞个体都能积累 PHB 至如此饱满的程度,PHB 的产率将能进一步提高。

2.3.3 PHBV 的生物合成 羟基脂肪酸聚酯是一类化合物,除了 PHB 外,最有开发价值的还有羟基丁酸与羟基戊酸的共聚物。近几年有文献[6,7]报道一些 PHB 产生菌可吸收丙酸或戊酸,合成出羟基丁酸(HB)和羟基戊酸(HV)单体随机排列的共聚物 PHBV。本研究以丁酸和戊酸为碳源,配成三种不同混合比的培养基,研究其对 PHBV 产量以及其中 HB

和 HV 单体组分的影响,结果见表 5。

由表 5 可见 AUN-39 可利用戊酸作为唯一碳源合成 PHBV,其产率甚至比利用葡萄糖或丁酸合成 PHB 的产率更高。

另外从表中可以看出戊酸比例的增加对 PHBV 中 HV 组分的提高有着直接的影响。通过人为调节培养基中丁酸、戊酸的比例来控制 PHBV 共聚物中 HB 和 HV 的组分比例可开发出物理性能略为不同的系列共聚物。

表 5 丁酸戊酸混合比对 PHBV 及其 HB 和 HV 组分的影响(%)

戊酸	丁酸	PHBV/细胞干重	HB/PHBV	HV/PHBV
1.5	0	47.5	39.5	60.5
1.0	0.5	45.7	60.5	39.5
0.5	1.0	30.8	70.5	29.5

参 考 文 献

1 Lemoigne M. Bull. Soc. Chem. Biol. 1926,8:770~782
2 Manual of Methods for General Bacteriology 1980
3 Law J H. J. Bacteriology 1961,82:33~36
4 Chester V E. J. Gen. Microbiol. 1968,51:49
5 Marchessault R H. Macromol. Chem. Symp. 1988,19:235~254
6 Bruce A R. Appl. Environ Microb. 1990,6:2093
7 石原义幸. 平成 4 年度特别研究. 大阪大学工学部发酵工学科管研究室. 1993

Breeding of Polyhydroxyalkanoates Producer

Wang Wu Chen Fuqiang Li Liyao

(School of Bioengineering) (School of Food Science & Technology)

Abstract Bacteria AMB-001 accumulating polyhydroxyalkanoates (PHAs) was screened out through special procedure, and identified as the Genus Alcaligenes. The mutant AUN-39 was obtained after UV light and NTG mutagenesis, and found to synthesize PHB 35% and PHBV 47% of cell dry weight respectively. Transmittional Electronmicroscopy showed that PHB granules almost occupied the whole cellular plasmic space.

Subject-words Alcaligenes; Polyhydroxybutyrate (PHB); Polyhydroxybutyrate-co-valerate (PHBV)