

北京红菱菌合成聚羟基烷酸的研究

张伟 姜成英 戴欣 刘双江*

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

摘要: 报道从污水处理厂回流池废水中分离到的北京红菱菌 (*Rcs. pekingensis* strain 3-p) 合成 PHAs 的研究结果。实验结果表明, 3-p 菌株生长及积累 PHAs 的最佳培养条件为: 0.01% 酵母膏, 0.01% NH₄Cl, 乙酸钠 5 g/L; 培养基最适 pH 值为 7.0~7.2。在此培养条件下, 细胞内 PHAs 积累量达菌体干重的 60% 以上。酶活测定表明菌株 3-p 含有与 PHAs 合成相关的 β-酮硫解酶, 乙酰乙酰 CoA 还原酶, PHA 聚合酶, 初步推断此菌株的代谢途径为: 乙酸 (或其他脂肪酸) → 乙酰 CoA → 乙酰乙酰 CoA → 羟基丁酰 CoA → PHAs。

关键词: PHAs, 光合细菌, 北京红菱菌

中图分类号: 59.6991 文献标识码: A 文章编号: 0253-2654 (2004) 01-0026-04

BIOSYNTHESIS OF POLYHYDROXYALKANOATES BY *RHODOCISTA PEKINGENSIS*

ZHANG Wei JIANG Cheng-Ying DAI Xin LIU Shuang-Jiang*

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

Abstract: In this article we report the results on the synthesis and accumulation of PHAs by *Rhodocista pekingensis* (strain 3-p), a phototroph that was isolated from wastewater treatment plant. Our results showed that the optimal conditions for PHAs accumulation with strain 3-p were as following: 0.01% Yeast Extract, 0.01% NH₄Cl, Acetate 5 g/L, and medium pH of 7.0~7.2. Under optimized conditions, strain 3-p accumulated PHAs up to 60% of its cellular dry weight. Enzymatic activities of β-ketothiolase, acetoacetyl-CoA reductase, and PHA polymerase were detected and their activities increased as PHA synthesis initialized. Based on these study, we proposed the metabolic pathway of this strain should be: Acetate (or other fatty acids) → Acetyl-CoA $\xrightarrow{\text{thiolase}}$ Acetoacetyl-CoA $\xrightarrow{\text{reductase}}$ D (-) β-Hydroxybutyryl-CoA $\xrightarrow{\text{PHA polymerase}}$ PHAs.

Key words: PHAs, Phototrophic bacteria, *Rhodocista pekingensis*

聚羟基烷酸 (Polyhydroxyalkanoic Acids, PHAs) 是一种生物多聚酯, 由羟基烷酸单体聚合而成, 可以作为可生物降解和生物相容材料 (如组织培养工程的支架) 等应用。许多微生物在营养非平衡环境中生长时 (如碳源极为丰富而其它一些生长必须营养物质如氮源、硫源、磷源、生长因子等缺乏), 能够合成聚羟基烷酸, 作为一种碳源及能源储存物在细胞中积累。光合细菌也不例外, 在碳源丰富的条件下, 包括紫色硫细菌和紫色非硫细菌如: *Chromatium vinosum*, *Thiocapsa pfennigii*, *Rhodobacter sphaeroides*, *Rhodospirillum rubrum* 等均能够在细胞中积累相当量的 PHAs^[1]。同非光合细菌相比, 光合细菌合成 PHAs 因具有以下特点而更加具有研究和开发价值: (1) 利用太阳能, 可以减少底物的消耗, 提高底物转化为 PHAs 的效率; (2) 可合成包括 3-羟基丙酸、3-羟基丁酸、3-羟基戊酸、3-羟基己酸等单体的聚合物^[2]; (3) 光合细菌对环境适应性强, 能够以有机废水或经初步处理的有机废水中的碳源 (主要是中、短链的脂肪酸分子) 合成 PHAs, 可以将废物处理与资源回收结合起来^[3]。

* 联系人 Tel: 010-62527118

收稿日期: 2003-01-27, 修回日期: 2003-05-06

红菱菌属 (*Rhodocista*) 1992年由 Kawasaki 建立, 目前包括世纪红菱菌 (*Rcs. centennium*) 和北京红菱菌 (*Rcs. pekingensis*)^[4]。有关本属菌种合成 PHAs 的能力和特性还没有报道。本文报道对北京红菱菌合成 PHA 的研究结果。

1 材料与方法

1.1 菌种和培养

北京红菱菌 (*Rcs. pekingensis* strain 3-p, ASI.2194 = JCM11669) 为我室分离并鉴定^[4]。菌种保存及种子培养采用 Imhoff & Trüper 培养基^[5], 去除 NaHCO_3 , 补加酵母膏 (1g/L), 蛋白胨 (1g/L); 积累 PHAs 培养时不加蛋白胨, 酵母膏降低为 0.1g/L, 同时, 补加乙酸、丙酸、丁酸等作为碳源 (浓度参见结果与讨论)。

培养条件: 厌氧 20mL 螺口瓶, 光照 1,000-2,000 Lux, 30℃ ~ 35℃。

1.2 PHAs 积累培养

采用两步培养法。首先将在种子培养基中培养 (48 h) 的细胞离心收集, 用 0.9% 的 NaCl 溶液洗涤后转入积累 PHAs 的培养基中进行培养。定时取样, 测定 PHAs 积累量。

1.3 硫解酶、乙酰乙酰 CoA 还原酶及 PHA 聚合酶活性的测定^[6]

硫解酶测定反应体系: 50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5), 50 $\mu\text{mol/L}$ MgCl_2 , 50 $\mu\text{mol/L}$ acetoacetyl-CoA, 100 $\mu\text{mol/L}$ CoA, 0.2% KCl, 0.9% NaCl。测定 OD_{303} , $\epsilon = 12.9 \times 10^3 \text{ L/cm/mole}$ 。

乙酰乙酰 CoA 还原酶测定反应体系: 50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5), 50 $\mu\text{mol/L}$ NADPH, 50 $\mu\text{mol/L}$ acetoacetyl-CoA, 0.9% NaCl, 0.2% KCl, 0.5% $\text{MgCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 。测定 OD_{340} , $\epsilon = 6.22 \times 10^3 \text{ L/cm/mole}$ 。

PHA 聚合酶测定反应体系: 1 mmol/L DTNB, 20 mmol/L MgCl_2 , 0.9% NaCl, 0.2% KCl, 0.5% $\text{MgCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 。测定 OD_{412} , $\epsilon = 13.61 \times 10^3 \text{ L/cm/mole}$ 。

1.4 PHAs 的测定

收集菌体于 1.5 mL 小管中, 加入 0.9% NaCl 振荡摇匀洗涤菌体, 离心后 80℃ 烘箱里烘至恒重, 称取适量烘干的菌体细胞于螺口玻璃管中, 每管加入 3 mL 浓硫酸, 95℃ 水浴加热, 每隔 5 min 振荡摇匀 1 次, 1 h 后取出冷却。同样方法处理标准样品 PHAs 作为对照。将处理后液体稀释 1,000 倍, 在紫外分光光度计上测定 210 nm 光吸收值, 通过对标准样品和样品的吸收峰进行比较得到在细胞干重中的 PHAs 含量。

分析 PHAs 中单体组份采用气相色谱法^[7]。取一定量干细胞, 加入甲醇: 浓硫酸 (15: 85) 混合液、氯仿各 2 mL, 105℃ 酯化 2 h, 冷却后加入 0.5 mL 水充分震荡, 取氯仿层溶液气相色谱测定。

1.5 脂肪酸总量测定

比色测定法^[8]。离心 (8,000 r/min) 收集菌株培养液, 取 0.5 mL 于小试管中, 加入 1.7 mL 酸性乙二醇充分混合后, 沸水加热 3 min, 置于冷水中冷却, 加入 2.5 mL 羟胺试剂, 混匀放置 1 min, 加入 10 mL 酸性氯化铁试剂, 定容到 25 mL 静置 5 min, OD_{500} 测定吸光值。

1.6 细胞生长测定

721 分光光度计测定 OD_{660} 。

2 结果与讨论

2.1 细胞生长与 PHAs 积累的关系

以乙酸钠 (5 g/L) 为碳源培养 3-p 菌株, 测定 PHAs 的积累量、菌体生长量 (OD_{660}) 和乙酸钠在培养基中的消耗, 如图 1 所示, 随时间延长, PHAs 在细菌菌体中的

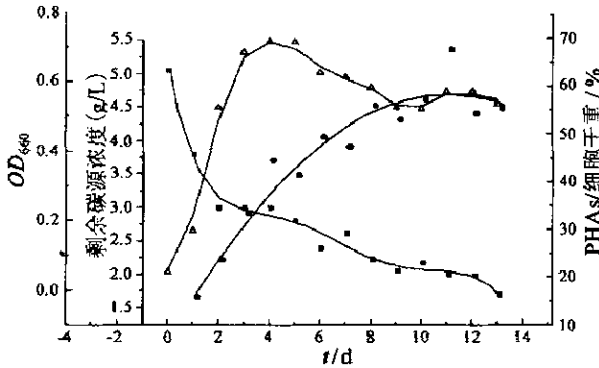


图 1 菌株 3-p 积累 PHAs、菌体生长及培养基中剩余碳源浓度的关系

■ 剩余碳源浓度 (g/L), ● PHA/细胞干重 (%), ▲ OD_{660}

的积累量逐渐上升, 碳源浓度逐渐下降。培养初期, 菌体生长与 PHAs 的积累基本相互平行, 但细胞生长在大约 4d 达到最高点, 而 PHAs 积累则需要 10d 左右。

2.2 3-p 菌株积累 PHAs 培养条件的研究

3-p 菌株除了可以利用乙酸钠为碳源合成 PHAs 之外, 还可以利用丙酸钠、丁酸钠、琥珀酸钠, 或者有机酸混合物积累 PHAs (表 1)。从表中可以看出, 乙酸钠是积累 PHAs 的最佳底物, 丁酸钠和琥珀酸钠次之, 以丙酸钠为碳源时, 细胞积累的 PHAs 很少, 仅占细胞干重的 1.9%。

对积累的 PHAs 的组分通过 GC/MS 分析表明 (表 1), 除了 3-羟基丁酸外, 合成的 PHAs 中, 还有相当比例的 3-羟基戊酸组分, 比例的高低与碳源的种类有关, 以丙酸钠或乙酸钠丙酸钠混合碳源培养时, 3-羟基戊酸的比例较高。

表 1 不同碳源培养 3-p 菌株积累 PHAs

碳源	碳源浓度 (g/L)	PHAs / 细胞干重 (%)	PHAs 成份
乙酸钠	5	51.35	PHB (s) PHV (w)
丙酸钠	5	1.883	PHB (s) PHV (s)
丁酸钠	5	23.03	PHB (s) PHV (w)
乙酸钠/丙酸钠	2.5/2.5	23.04	PHB (s) PHV (s)
乙酸钠/丁酸钠	2.5/2.5	43.55	PHB (s)
乙酸钠/琥珀酸钠	3/2.5	42.09	PHB (s)

注: PHAs / 细胞干重 (%) 为培养 7d 后测得数据, s 气相色谱测定信号强表明该组份比例高, w 测定时信号弱表明该组份比例低

实验还研究不同乙酸钠浓度对 3-p 积累 PHAs 的影响, 结果见图 2。乙酸钠浓度在 4~6 g/L 时, PHAs 的积累效果最好, 其中, 5 g/L 的浓度时 PHAs 的积累量达到最大 (62.49%); 从曲线中还可以看出随着乙酸钠浓度增大, 菌体生长受到较为明显的抑制, PHAs 的积累量同样呈下降趋势。

研究了 pH 范围在 6~10 时对菌株 3-p 积累 PHAs 的影响, 以乙酸钠为碳源 (5g/L) 的 PHAs 积累培养基, 严格调节其 pH 值并转接相同量菌种, 培养 7d 时取样进行测定。结果表明, pH 值在 7~8 之间, PHAs 积累情况最好, pH 值为 7 时积累最高 (63.65%)。

从以上实验得到初步结论, 3-p 菌株积累 PHAs 的最佳碳源为乙酸钠 (5 g/L), 其最佳培养条件为 0.01% 酵母膏, 0.01% NH_4Cl ; 培养基最适 pH 值为 7.0 左右, PHAs 的积累量可以达到细菌干重的 60% 以上。此外, 还发现在提供合适底物时, 该菌株还能合

成 3-羟基丁酸和 3-羟基戊酸的同聚物或共聚物。

2.3 3-p 菌株合成 PHAs 相关酶活性的测定

迄今为止,已经阐明的光合细菌合成 PHAs 的代谢途径主要包括 3 个反应^[9]:首先是在 β -酮硫解酶催化下把两个分子的乙酰 CoA 合成为乙酰乙酰 CoA,乙酰乙酰 CoA 还原酶进一步把乙酰乙酰 CoA 还原为 3-羟基丁酰 CoA,最后 PHAs 聚合酶以链延长方式把 3-羟基丁酰 CoA 合成为 PHAs 的分子。实验测定了催化 3 个反应的酶活,结果见表 2。

从表 2 结果可以推测,3-p 菌株具有与 *Chromatium vinosum* 类似的 PHAs 合成途径,并且同不积累 PHAs 的细胞相比(ATYP),积累 PHA 的细胞中 β -酮硫解酶、乙酰乙酰 CoA 还原酶、PHA 聚合酶的酶活性有明显提高。

3 结论

本研究表明,北京红菱菌能够以乙酸、丙酸、丁酸、琥珀酸等为碳源合成 PHAs,依据提供的碳源种类和比例的不同,北京红菱菌可以合成聚羟基丁酸或聚羟基丁酸-羟基戊酸共聚物。在本实验条件下以乙酸为碳源合成 PHAs 可达细胞干重的 60%。通过对参与 PHAs 合成过程的酶活测定,初步推测北京红菱菌合成 PHAs 的代谢途径包括了 β -酮硫解酶、乙酰乙酰 CoA 还原酶、PHA 聚合酶等三酶催化的代谢反应。

致谢 本研究得到了中国科学院院长青年基金和百人计划的支持,对 PHAs 组分的分析得到了德国 Muenster 大学 A. Steinbuechel 教授研究组的支持,特此致谢!

参考文献

- [1] Liebergesell M, Timm A, Hustede E, et al. Arch Microbiol, 1991, 155: 415 ~ 421.
- [2] Lenz R W, Kim B W, Ulmen H W, et al. Novel Biodegradable Microbial Polymers (Dawes E A, Ed). Dordrecht: Kluwer, 1990, 23 ~ 25.
- [3] Maeda I, Miyasaka H, Umeda F, et al. Biotechnol Bioeng, 2003, 81 (4): 474 ~ 481.
- [4] 张德民, 黄志勇, 杨惠芳. 微生物学报, 2000, 40 (1): 14 ~ 20.
- [5] Imhoff J F, Trüper H G. The Prokaryotes. 2nd ed. Heidelberg: Springer-Verlag, 1992, 2141 ~ 2155.
- [6] Nishinura T, Saito T, Torrita K. Arch Microbiol, 1978, 116 (1): 21 ~ 27.
- [7] Liu S J, Steinbuechel A. Appl Microbiol Biotech, 2000, 53: 545 ~ 552.
- [8] 中国科学院成都生物研究所《沼气发酵常规分析》编写组.《沼气发酵常规分析》(第一版).北京:科学技术出版社, 1984. 48 ~ 51.
- [9] Liebergesell M, Steinbuechel A. Eur J Biochem, 1992, 209: 135 ~ 150.

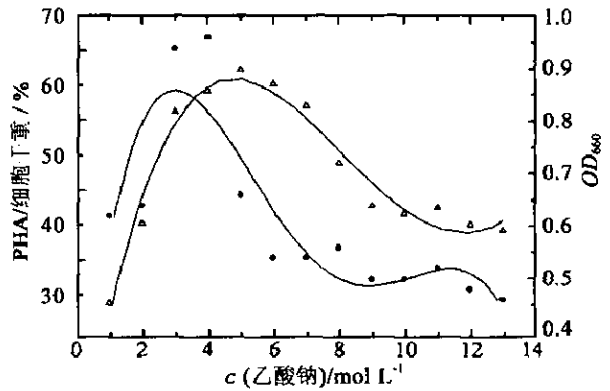


图 2 不同乙酸钠浓度下的 PHAs 积累量及细菌生长情况

● OD_{660} , ▲ PHA/细胞干重 / %

表 2 3-p 菌株合成 PHAs 相关酶活性

酶活 (pmol/min/mg)	ATYP	菌种转接入 PHAs 积累培养基	
		1d	4d
β -酮硫解酶	0.653	2.89	1.18
乙酰乙酰 CoA 还原酶	2.03	3.19	1.45
PHA 聚合酶	0.295	1.46	0.47