



专论与综述

利用光合细菌生产聚-β-羟基丁酸酯的研究进展

赵芮晗^{1,2,3} 卢海凤^{*1,2,3}

1 中国农业大学水利与土木工程学院 北京 100083

2 农业农村部设施农业工程重点实验室 北京 100083

3 北京畜禽健康养殖环境工程技术研究中心 北京 100083

摘要: 石油基塑料进入环境后会造成污染并影响人体健康。因此,寻找石油基塑料的替代品成为未来发展的趋势。生物塑料因其具有良好的生物降解性与安全性,近年来备受关注,尤其是作为生物塑料之一的聚-β-羟基丁酸酯(Poly-β-Hydroxybutyrate, PHB),已成为生产生物塑料制品的重要来源。光合细菌(Photosynthetic Bacteria, PSB)是生产 PHB 的重要原料。PSB 可利用废水中廉价的碳源为底物累积 PHB, 能实现废水资源化,其应用前景广阔。本文系统地总结了目前可生产 PHB 的 PSB 菌种、PHB 在菌体内的合成途径、影响 PSB 累积 PHB 的因素和目前利用废水培养紫色非硫菌(Purple Non-Sulfur Bacteria, PNSB)并累积 PHB 的研究现状,并对以废水生产 PHB 的 PNSB 污水资源化这一技术的工程化应用提出了展望,以期为解决石油基塑料污染与废水资源化提供新的思路与参考。

关键词: 光合细菌, 紫色非硫菌, 聚-β-羟基丁酸酯, 聚羟基脂肪酸酯

Research progress of poly-β-hydroxybutyrate production by photosynthetic bacteria

ZHAO Ruihan^{1,2,3} LU Haifeng^{*1,2,3}

1 College of Water Resources & Civil Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China

2 Key Laboratory of Agricultural Engineering in Structure and Environment of Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Beijing 100083, China

3 Beijing Engineering Research Center for Livestock and Poultry Healthy Environment, Beijing 100083, China

Abstract: Petroleum-based plastics will cause pollution and affect human health after entering the environment. Therefore, looking for alternatives to petroleum-based plastics has become the trend of future development. Bioplastics have attracted much attention in recent years because of their good biodegradability and safety; in particular, poly-β-hydroxybutyrate (PHB), one of the bioplastics, has become an important source for the production of bioplastics. Photosynthetic bacteria (PSB) is an important raw material for PHB production. PSB can use the cheap carbon source in wastewater as a substrate to accumulate PHB, which can realize the recycling of wastewater, and its application prospects are broad. This

Foundation item: International (Regional) Cooperation and Exchange Program of National Natural Science Foundation of China (51861125103)

***Corresponding author:** E-mail: haifenglu@cau.edu.cn

Received: 30-07-2020; **Accepted:** 18-09-2020; **Published online:** 31-12-2020

基金项目: 国家自然科学基金国际(地区)合作与交流项目(51861125103)

*通信作者: E-mail: haifenglu@cau.edu.cn

收稿日期: 2020-07-30; 接受日期: 2020-09-18; 网络首发日期: 2020-12-31

paper systematically summarizes the PSB strains that can produce PHB, the synthesis pathway of PHB in the bacteria, the factors affecting the accumulation of PHB by PSB, and the research status of purple non-sulfur bacteria (PNSB) accumulating PHB by wastewater. The prospect of the engineering application of PNSB wastewater recycling technology for PHB production from wastewater is put forward, aiming to provide new ideas and reference for solving the pollution of petroleum based plastics and wastewater recycling.

Keywords: photosynthetic bacteria, purple non-sulfur bacteria, poly- β -hydroxybutyrate (PHB), polyhydroxyalkanoates (PHA)

石油基塑料是人类日常生活中大量使用的消耗品。截止到 2015 年, 全球产出的塑料废料量已达 6 300 t, 其中, 约 9% 已回收利用, 12% 已焚化, 79% 则被填埋或丢弃于自然环境中^[1]。石油基塑料分子量大且单体间往往通过较强的共价键结合^[2], 因此, 其难以在短时间内被环境中微生物分解消纳并利用, 进入环境后会产生“白色污染”, 尤其是直径小于 5 mm 的塑料碎片和颗粒, 即微塑料其粒径小、覆盖范围广, 对环境危害程度更大。人体吸入空气中的微塑料可致使肺部炎症或肺部癌变几率增加, 食用含有微塑料的鱼类会引发肠道炎症等疾病^[3]。为了解决上述问题, 寻找易生物降解、无毒无害的替代品取代传统石油基塑料成为趋势。其中, 生物塑料由于其易降解性、可再生性和较高的安全性成为首选。生物塑料是指以淀粉等天然物质为原料, 在微生物作用下生成的塑料。联合市场研究公司 (Allied Market Research) 的报告指出, 预计到 2024 年, 生物塑料的市场份额将达到 685.7 亿美元^[4]。

聚羟基脂肪酸酯 (Polyhydroxyalkanoates, PHA) 作为生物塑料之一, 近年来备受科研人员的关注。PHA 是一类聚合物的总称, 是微生物合成并储存在细胞内的聚酯, 其根据单体组成的差异可分为聚- β -羟基丁酸酯 (Poly- β -Hydroxybutyrate, PHB)、聚-3-羟基戊酸酯 (Poly-3-Hydroxyvalerate, PHV) 和羟基丁酸戊酸共聚酯 (PHBV) 等 (图 1)。当满足 R 基为甲基且 $m=1$ 时的 PHA 称为聚- β -羟基丁酸酯 (PHB)。在众多 PHA 的聚合物中, 关于 PHB 的研究最为广泛^[6], 其可替代部分传统塑料材料应用于医疗^[7]、工业、农业等领域。PHB 的生产主要通过微生物发酵而获得, 然而 PHB 的生产成本较高, 限制了其大规模应用。目前提高 PHB 生产的途径

主要有获得高产 PHB 菌株、有关 PHB 合成的基因转录调控、PHB 生产条件的优化及降低原料成本等^[8-10], 具体而言, 包括对 PHB 高产菌的筛选与培育、使用更适应生产条件的启动子诱导菌体内 PHA 增产、从光氧条件入手寻找最优生产条件、从碳源、氮源入手寻找廉价生产原料等。菌种是影响 PHB 生产的重要因素, 目前, PHB 生产菌包括真养产碱杆菌、巨大芽孢杆菌、棕色固氮菌、光合细菌、大肠杆菌等 300 多种^[9-11]。其中, 光合细菌是一种可以利用廉价碳源进行 PHB 生产的菌株, 其体内 PHB 含量最高可达到 80%, 是用于生产 PHB 的较优菌种之一。

光合细菌 (Photosynthetic Bacteria, PSB) 可进行光合作用而不产氧, 是一类原核生物^[12], 主要分为紫色非硫菌 (Purple Non-Sulfur Bacteria, PNSB)、紫色硫细菌 (Purple Sulfur Bacteria, PSB)、绿色硫细菌 (Green Sulfur Bacteria, GSB) 和绿色丝状菌 (Green Filamentous Bacteria, GFB) 这 4 类。除其本身无毒且含有大量丰富的高价值营养物质 (例如蛋白

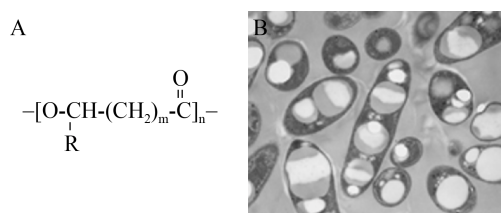


图 1 PHA 结构通式与电镜照片

Figure 1 The general structural formula and electron micrograph of PHA

注: A: PHA 的结构通式; B: PHA 在 *R. capsulatus* 中的电镜照片 (14 200 \times)^[5]

Note: A: General formula of PHA structure; B: Electron micrograph of PHA in *R. capsulatus* (14 200 \times)^[5]

质、色素、辅酶 Q10)外, PSB 还具有较强的净水功能, 可以高效降解污水中污染物^[12]。前期研究表明, PSB 对各类营养型废水的 COD、氨氮及总磷降解率可达到 90%以上, 因此, 采用有机废水培养 PSB 用以产生 PHB, 不仅可以降低 PHB 生产成本, 又可以实现废水中营养物质的资源化^[13], 具有较好的应用前景。

本文对 PSB 生产 PHB 的菌株、代谢路径、影响因素等进行了全面的归纳总结, 提出了利用废水与 PSB 生产 PHB 的污水资源化工艺, 为实现 PHB 大规模生产与应用提供参考。

1 PHB 生产菌株(PSB)及代谢途径

1.1 PSB 菌株

PSB 可在某些营养物质缺乏^[14]或者菌体内氧化还原不平衡^[15-16]的生理胁迫条件下合成 PHB。目前用于生产 PHB 的 PSB 菌株主要为紫色硫细菌(PB)及紫色非硫细菌(PNSB), 其中 PNSB 的研究最多。用于生产 PHB 的 PNSB 包括球形红细菌(*Rhodobacter sphaeroides*)、沼泽红假单胞菌(*Rhodospseudomonas palustris*)、荚膜红细菌(*Rhodobacter capsulatus*)、红螺菌(*Rhodospirillum rubrum*)及部分海洋 PNSB。有研究显示, *R. sphaeroides* 及 *R. capsulatus* 生产 PHB 的能力优于 *R. palustris*。例如:*R. sphaeroide* 可积累占干重 60%–80%的 PHB, *R. capsulatus* 在以乙酸为底物时, 可积累占菌体干重 70%的 PHB^[17]。然而 *R. palustris* WP53、*R. palustris* 42OL 等沼泽红假单胞菌仅能积累占菌体干重 4%–10%的 PHB^[18]; *R. rubrum* 中 PHB 的积累量可达 45%^[19]。另外, 前期研究证明, 与复配的 PNSB 混菌培养相比, 单一 PNSB 菌株产生的 PHB 含量及浓度均处于较高水平^[20]。

1.2 PHB 在 PNSB 中的生物合成路径

部分 PNSB 可在厌氧光照的条件下以乙酸与丁酸为底物合成 PHB, 合成路径如图 2 所示^[21]。首先乙酸进入菌体后转化为乙酰辅酶 A, 在 β -酮硫解酶(PhaA)的作用下由 2 个乙酰辅酶 A 缩合形

成乙酰乙酰辅酶 A, 再经过乙酰乙酰辅酶 A 还原酶(PhaB)的作用使乙酰乙酰辅酶 A 还原为 R-3-羟基丁酰辅酶 A。其中 PhaB 的作用伴随着还原型辅酶 II (NADPH)的消耗, 有学者认为还原型辅酶 I (NADH)也参与了 PhaB 的作用过程^[22]。关于丁酸的转化途径, 目前学者提出了 2 种假设: (1) 部分学者认为丁酸主要通过图 2 中的途径①进行转化: 即丁酸先转化为丁酰辅酶 A, 再缩合成乙酰乙酰辅酶 A 参与 PHB 合成, 这种代谢途径比较符合近年文献中的主流研究观点; (2) 刘如林等^[23]则认为 PNSB 通过途径②将丁酸转化为 R-3-羟基丁酰辅酶 A。最终 PHA 合成酶(PhaC)使得上述 2 条路径形成的单体分别聚合形成 PHB。在外部碳源供应不足时, PHB 也可分解为内部碳源参与细菌中的其他代谢, 例如在棕色固氮菌中作为碳源合成藻酸盐^[10]。

乙酸是合成 PHB 的重要前体, 其在 PNSB 中的代谢途径较为清晰, 主要包括三羧酸循环(TCA)、乙醛酸循环、乙基丙二酰辅酶 A 途径(EMC)以及柠檬酸循环 4 种, 并且不同的 PNSB 有各自的 1 种或 2 种不同的乙酸代谢途径。由图 2 可知, 乙酸的代谢途径影响着乙酰辅酶 A 的转化方向, 进而影响着 PHB 的合成。

Fradinho 等研究发现, 光合作用产生的 ATP 是加速乙酸摄取的关键^[24]。*R. sphaeroides* 积累 PHB 的能力较强, 其利用 TCA 来同化乙酸, 在黑暗好氧或者光照厌氧条件下, 当周围环境中 C/N 不平衡(较高)时, *R. sphaeroides* 突变体中柠檬酸合成酶会受到影响, 使得 TCA 活性下降, 进而导致乙酸主要通过 PHB 合成的代谢路径而被消耗^[25]。也有报道显示, *R. sphaeroides* 使用 EMC 途径代谢乙酸^[26-27]。然而此途径与 PHB 合成途径重合, 即 *R. sphaeroides* 也可以通过 EMC 途径中的部分步骤合成 PHB。*R. rubrum* 因缺少异柠檬酸裂解酶, 因此无法使用乙醛酸代谢乙酸, 而是使用柠檬酸循环来进行乙酸的代谢^[28], EMC 途径也可能在该菌种中参与了乙酸代谢。*R. capsulatus* 被证实也使用柠

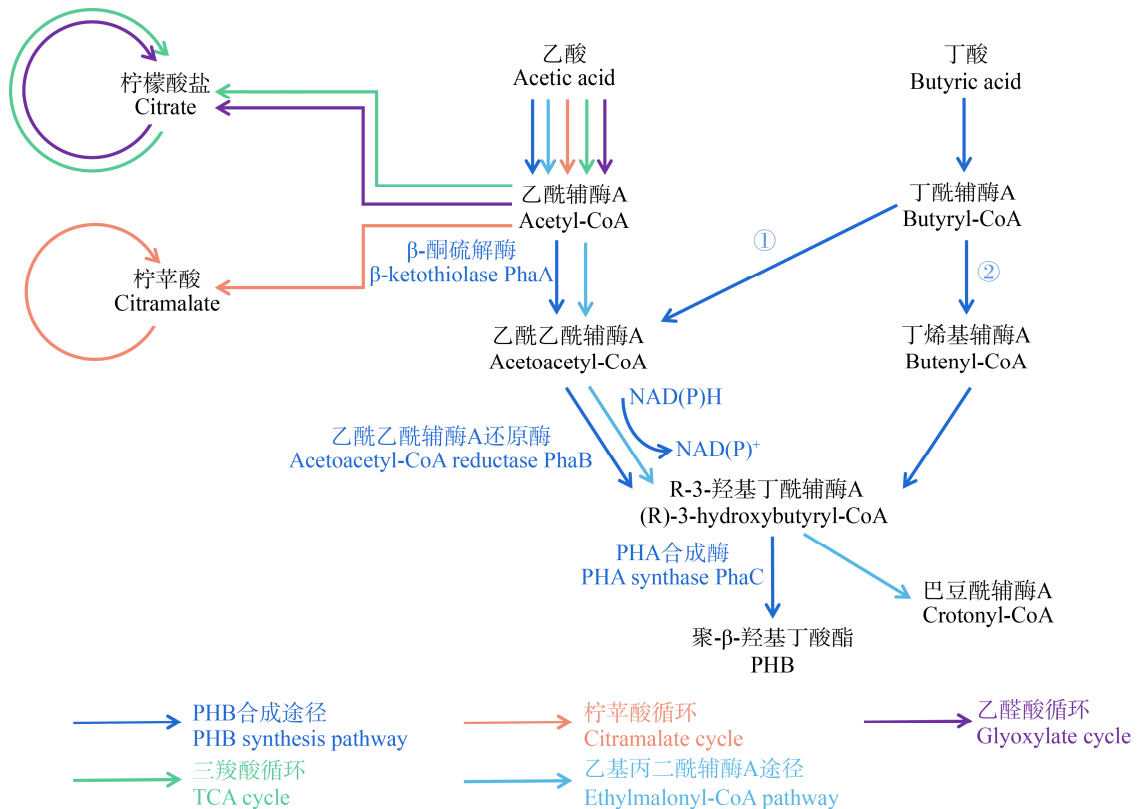


图2 PHB合成路径图
Figure 2 PHB synthesis path

苹果酸循环^[29]、EMC途径^[30]同化乙酸。*R. palustris*中通过乙醛酸循环来同化乙酸^[31]。Kars等^[32]的报道对乙酸在苹果酸循环、EMC途径及乙醛酸循环中的代谢步骤有着详细介绍。

乙酸浓度可能也是影响PHB累积效果的重要因素之一。有学者发现*R. capsulatus*中PhaC的活性与乙酸盐浓度相关,65 mmol/L的乙酸盐使得该酶活提升^[33],进而加快了PHB的累积。另外,从2个乙酰辅酶A缩合成乙酰乙酰辅酶A的过程会被高浓度的CoASH所抑制,这些CoASH为乙酰辅酶A进入TCA循环后的产物^[34]。

2 PNSB产PHB的影响因素

近年来对PNSB产PHB影响因素的研究较为广泛。我们综合前期相关研究报道,将影响因素分为光氧条件、碳源与氮源、代谢途径和其他4个部分进行阐述。

2.1 光氧条件

2.1.1 光氧模式

PNSB具有光、氧两套代谢途径,可在不同光氧条件下进行代谢^[13],而且通常采用光异养模式。在光照条件下,PNSB主要通过光合磷酸化获取能量;在有氧存在的条件下,PNSB主要通过氧化磷酸化获取能量。近年来,各国学者对光照厌氧、黑暗好氧、光照微氧等不同条件下PNSB产PHB效果进行了研究(表1)。

光照厌氧条件是光合细菌产氢的常规光氧条件。光照厌氧及氮限制条件下,PNSB极易产氢,但同时也可合成PHB。因此目前大多数学者将PHB作为产氢过程的副产物开展了相关研究。Demiriz等^[33]在厌氧条件下,利用*R. capsulatus* DSM 1710同时实现生产氢气与PHB,其中PHB最高浓度可达234.7 mg/L。Cardeña等^[35]利用以

表 1 不同光-氧条件下 PNSB 产 PHB 一览表

Table 1 The production of PHB in PNSB under different light-oxygen conditions

菌种 Strains	光-氧条件 Light-oxygen conditions	碳源 Carbon source	氮源 Nitrogen source	PHB 产量 PHB production	参考文献 References
<i>R. rubrum</i> S1	Aerobic-dark	Malate 4 g/L, Acetate 3.7 g/L	(NH ₄) ₂ SO ₄ 0.31 g/L	0.24 g/L	[15]
<i>R. sphaeroides</i> U7	Aerobic-dark	L-glutamic acid 26 mmol/L,	(NH ₄) ₂ SO ₄	1.47 g/L (PHA)	[19]
	Microaerobic-light	Acetate 40 mmol/L,	–	0.9 g/L (PHA)	
	Anaerobic-light	Valeric acid 40 mmol/L		2.34 g/L (PHA)	
<i>R. sulfidophilum</i>	Oxygen-limited light	Sodium malate 3 g/L,	NH ₄ Cl 3 g/L	45% DCW (PHA)	[22]
	Anaerobic-light	Sodium pyruvate 3 g/L		>40% DCW (PHA)	
	Aerobic-dark	As above, sodium acetate 0.5%		33% DCW (PHA)	
<i>R. sphaeroide</i> R	Aerobic-dark	Acetate 0.2%	(NH ₄) ₂ SO ₄ 0.05%	46.2% DCW	[25]
<i>R. sphaeroide</i> M				60.0% DCW	
<i>R. sphaeroide</i> R	Anaerobic-light			42.8% DCW	
<i>R. sphaeroide</i> M				69.5 DCW	
<i>R. capsulatus</i> DSM 1710	Microaerobic-light	Acetate 65 mmol/L	Glutamate 2 mmol/L	234.7 mg/L	[33]
Consortium of PNSB	Anaerobic-light	Acetic acid 1 370 mg/L, Propionic acid 618 mg/L, Butyric acid 133 mg/L	Glutamate (C/N=16/1)	16.4 mg-PHB/(g-TSS·d)	[35]
<i>R. sphaeroides</i>	Anaerobic-light	Acetate 30 mmol/L	NH ₄ Cl 0.04% (W/V)	70% DCW (PHA)	[36]
<i>R. sphaeroide</i> KD131	Anaerobic-light	Acetate 60 mmol/L	(NH ₄) ₂ SO ₄ 4 mmol/L	54% DCW	[37]
<i>R. sphaeroides</i> U7	Aerobic-dark	L-glutamic acid 3.8 g/L, CH ₃ COONa 3.26 g/L	(NH ₄) ₂ SO ₄ 0.2 g/L	2.37 g/L, 82.29% DCW	[38]
<i>R. sphaeroides</i> U7	Aerobic-dark	L-glutamic acid 3.8 g/L,	(NH ₄) ₂ SO ₄ 0.8 g/L	42.0% DCW	[39]
<i>R. sphaeroides</i> N20		D,L-malate 2.7 g/L		53.9% DCW	
<i>R. sphaeroides</i> ES16				19.5% DCW	
<i>Rhodospseudomonas</i> sp. strain W-1S	Microaerobic-light	Acetate 0.5%	NH ₄ Cl 5 mmol/L	56.1% DCW	[40]
<i>Rhodovulum sulfidophilum</i>	Microaerobic-light	Sodium L-malate 3.0g/L, Sodium pyruvate 3.0 g/L	NH ₄ Cl 0.68 g/L	1.0 g/L	[41]
<i>Rhodospseudomonas</i> sp. S16-VOGS3	Anaerobic-light	Glycerol 6.3 g/L	–	18% DCW	[42]
<i>Rhodospseudomonas</i> sp. S16-VOGS3	Anaerobic-light	Butyrate 6.0 g/L	NH ₄ Cl –	34.4% DCW	[43]

注: DCW 为细菌干重。–: 文中未明确说明

Note: DCW is Dry Cell Weight. –: Not mentioned in the text

R. palustris 为主的混合 PNSB 菌群产氢及 PHB, 最终获得的 PHB 日产量为 16.4 mg-PHB/(g-TSS·d)。Husted 等研究发现, 野生型 *R. sphaeroides* 能够在厌氧光照条件下以 30 mmol/L 的乙酸盐为底物, 产出占 70% 的 PHA 而无氢气产生^[36]。Kim 等^[37]在光厌氧条件下, 采用 *R. sphaeroide* KD131 菌株产氢并获得了占菌体干重约 54% 的 PHB。产氢过程中

需要还原力的参与, 还原力可为产氢过程提供电子, 也可参与 PHB 的合成过程, 因此产氢和产 PHB 这 2 种途径会竞争还原力, 所以当产氢被抑制时会出现高 PHB 产量的情况, 为了提高 PHB 的产量, 在厌氧光照的条件下需调整环境条件, 抑制氢气的产生。

黑暗好氧条件下, 菌株 *R. sphaeroide* 及其突

变体是最常用的产 PHB 模式菌株。研究发现, *R. sphaeroide* 可以分别在厌氧及有氧 2 种状态下积累 PHB^[19]。Kemavongse 等发现, *R. sphaeroide* 突变体 U7 在黑暗有氧的状态下培育 60 h 可产出 2.37 g/L 的 PHB, 占菌体干重的 82.29%^[38]。另外, 使用 *R. sphaeroide* 突变体 N20 在黑暗有氧且最佳营养状态下培养 60 h, 最终可获得 8.02±0.10 g/L PHB, 占细胞干重的 88%^[39]。Krasil'nikova 等的研究表明, 在厌氧黑暗条件下, *R. sphaeroide* 的 M 菌株突变体比 R 菌株突变体积累 PHB 的能力更强^[25]。除球形红细菌外, Narancic 等^[15]在黑暗有氧条件下培养 *R. rubrum* S1 获得了 0.24 g/L 的 PHB。Higuchi-Takeuchi 等^[22]发现, 好氧条件下乙酸是供给海洋 PNSB *Rhodovulum sulfidophilum* 菌株生产 PHB 的最佳碳源, 其他碳源条件下的 PHA 产量极低。

光照微氧条件是 PNSB 累积 PHB 的重要光氧条件。Chowdhury 等将海洋 PNSB——*Rhodopseudomonas* sp. strain W-1S 在微氧光照条件下培养, 发现最终 PHB 积累量可达细胞干重的 56.1%^[40]。Foong 等在光照微氧条件下培养 PNSB——*Rhodovulum sulfidophilum*, 获得了最高约 1.0 g/L 的 PHA^[41]。

综上所述, 不同 PNSB 菌株产 PHB 的最佳光氧组合不同。例如, Higuchi-Takeuchi 团队利用 *Rhodovulum sulfidophilum* 分别在不同光氧条件下做了 PHA 积累试验, 发现在厌氧光照条件下 PHA 积累量可以超过干重的 40%, 而在光照氧限制条件下更高, 可达 45%, 黑暗好氧条件反而不利于 PHB 累积(<5%); 但当更换乙酸为碳源后, PHA 积累量达干重的 33%^[22]。Kemavongse 等^[19]研究表明, *R. sphaeroides* U7 在 3 种光氧条件下, 细菌平台期与最大 PHA 浓度获得时间均保持一致, 而且光照厌氧培养效果最佳, 光照微氧效果最差。

2.1.2 光周期

光周期作为 PNSB 培养中重要的光调控条件, 对 PHB 生产有着刺激作用。有学者认为对于细菌和藻类共生的光合混合培养系统, 光暗循环的条件

下可以保持甚至获得更高的 PHB 生产能力^[44]。Corona 等^[18]在光照厌氧条件下, 以恒光作为对照, 采用 15 min:15 min 及 30 min:30 min 的光:暗周期操作模式, 将 *R. capsulatus* 及混合 PNSB 的 PHB 生产能力提高了 2-3 倍; 尤其对 *R. capsulatus* 而言, 光暗循环削减了用于产氢的 ATP, 而且在黑暗条件下固氮酶受到抑制, 导致更多的还原当量用于生产 PHB。Özgür 等^[45]发现, 16 h 光照/8 h 黑暗的循环条件下, *R. capsulatus* 产氢会被抑制, 根据产氢和产 PHB 的竞争关系, 推测此条件下会促进细胞内 PHB 的累积。然而 Sargsyan 等和 Koku 等的研究则表明, 对 *R. sphaeroides* 菌种, 光暗循环可能使得固氮酶活性提升, 从而导致氢气产量增加, 反而不利于 PHB 的累积^[46-47]。上述光周期带来的 PHB 累积的差异可能是由于不同菌种的生理生化代谢特性不同导致。

2.1.3 光强与光波长

已发表的文献中, 对不同光强、光波长刺激 PHB 累积的研究相对较少。PNSB 仅有一个光合作用中心, 光能的获取依靠菌绿素及类胡萝卜素对光的吸收^[23]。2 种色素可吸收的光波长分别为 715-1 050 nm 和 450-550 nm。不同菌种的适宜光波长有所差异。Higuchi-Takeuchi 等^[22]研究了不同光波长对 PNSB 累积 PHB 的影响, 结果表明, 800 nm 及 850 nm 光波长实验组中 PNSB 前 4 天的长势优于 750 nm 光波长组, 但最终在 750 nm 光波条件下获得了最高的细胞生物量。这可能是因为试验的前 4 天, PNSB 浓度相对较低, 此时不同波长光的穿透性差距不大, 而 800 nm 及 850 nm 的光更有利于被 PNSB 的光合作用中心的捕光色素吸收, 从而为 PNSB 生长初期提供了更多的能量来源。但有研究表明, 800-850 nm 的光无法到达反应器的较深区域, 光能损失严重, 而 600-780 nm 的光则有着更好的穿透性, 最终能够被 PSB 所利用^[48]。所以当 4 d 后 PNSB 浓度升高时, 750 nm 的光穿透性更强, 削减了 PNSB 细胞的“遮光性”这一效应, 使得该条件下获得的生物量最高。

Higuchi-Takeuchi 等^[22]还研究了光强度对 PNSB 累积 PHB 的影响, 结果表明 800 nm 波长的条件下, 第 4 天低光强(8 W/m²)下细菌产生的 PHA 含量约为细菌干重的 50%, 而高光强(50 W/m²)下 PHA 含量仅约为干重的 30%。

2.2 碳源与氮源

2.2.1 碳源种类

PSB 可以利用多种有机或无机碳源合成 PHB, 其中乙酸与丁酸都是 PHB 合成的重要前体, 因此很多研究都会使用这 2 种酸作为生产 PHB 的底物。另外, 苹果酸、甘油均为 PSB 产 PHB 的有机碳源^[41-42]。许多研究表明, 混合碳源比单一碳源更有利于累积 PHB。

Brandl 等^[49]发现在氮限制条件下, *R. rubrum* 可以积累占细胞干重 45% 的 PHA, 利用丁酸积累的 PHA 含量远超乙酸和丙酸, 而辛酸、壬酸、癸酸酯、庚酸均不适宜作为底物进行 PHA 的生产。吴光学等^[14]发现, 以丁酸盐为主的混合基质比单一基质更利于 PHB 的积累, 混合基质使得 PNSB 的 PHB 生产量相较于单一基质提高 25% 以上。岳文洁等^[50]发现, 乙酸钠以及硫酸铵有利于 PSB 菌体的生长, 而且能累积占菌体湿重 50% 的 PHB。张晓艳等^[51]利用响应面法研究了 *R. sphaeroide* 生产 PHB 的最适碳、氮源种类及浓度, 发现苹果酸 2.5 g/L、硫酸铵 1.0 g/L 为最佳培养条件, 最终可获得 25.75% 的 PHB。Monroy 等^[17]则认为乙酸是 *R. sphaeroide* 及 *R. rubrum* 生产 PHB 的最佳碳源。Demiriz 等^[33]发现碳源浓度的提升可能导致细胞中 mRNA 转录物的增加, 从而增加 PHB 生物合成途径中的酶总量, 所以相对高的碳源浓度有着促进 PHB 合成的效应。

除了有机碳源外, PSB 还可以利用无机碳源 CO₂ 转化为有机化合物并参与 PHA 的合成^[52], *R. rubrum* 甚至可以利用合成气为碳源生产 PHB^[53]。

2.2.2 氮源种类

PNSB 常在氮限制条件下生产 PHB, 有关氮源影响 PNSB 累积 PHB 的研究较少。对相关报道

进行整理可发现, 供给有机或无机氮源均可使 PNSB 累积 PHB。有机氮源中较为常见的是谷氨酸盐; 无机氮源中较为常见的是铵类氮源, 例如硫酸铵、氯化铵(表 1)。吴光学等^[14]研究发现, 向 *Rhodospseudomonas gelatinosa*、*Rhodospseudomonas capsulata* 以及 *Rhodospseudomonas viridis* 提供 NH₄⁺-N 及有机氮均利于 PHB 的累积。

2.2.3 C/N 的影响

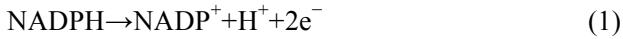
C/N 通常会影响到微生物生长以及菌体产量^[54]。前期研究表明, 其对 PSB 累积 PHB 也有一定的影响。虽然实现最佳累积 PHB 的 C/N 随生产菌株与不同光氧条件而异, 但过低的 C/N ($\leq 1:1$) 在任何条件下均不利于 PHB 的累积。例如, Waligórska 等^[55]研究表明, 厌氧光照条件下, 高 C/N 有利于 PHB 的累积: 当 C/N=6 时, *R. sphaeroide* 仅能积累 1% PHB (干重), 而当 C/N=60 或 120 时, PHB 的含量可达 45%。Sangkharak 等的研究表明, 在黑暗好氧条件下, *R. sphaeroide* 的最佳 C/N=6, 此时可获得 73.2% 的 PHB, 而过高(12:1)或者过低(0.15:1)的 C/N 都不利于其累积 PHB^[39]。Krasil'nikova 等^[25]研究发现, 在光照厌氧、黑暗有氧 2 种条件下, C/N=4 均是 *R. sphaeroide* 突变体获得最高 PHB 累积量的条件。然而 Monroy 等^[17]则认为 C/N ≥ 30 时更有利于 PNSB 累积 PHB。除了 C/N 外, D'Alessio 等^[56]在苜蓿中华根瘤菌中发现氮代谢的基因表达与 PHB 积累也存在联系。PNSB 与苜蓿中华根瘤菌类似, 能高效固氮, 因此 PNSB 中氮的代谢与 PHB 的累积可能也存在一定的相关性。

2.3 代谢途径的影响

2.3.1 产氢与产 PHB 的竞争

在厌氧光照、有机碳源充足且氮限制条件下, PNSB 既适合于生产氢气, 也适合于生产 PHB^[37], 2 种生产途径之间会产生还原力的竞争。NADPH 是菌体内重要的还原力, 其主要来源于光合作用及有机碳源的代谢, 即 NADPH 氧化为 NADP⁺的过程中将产生电子(公式 1)。固氮酶能够利用这部分电子及有机氮源代谢产生的 H⁺进行氢

气生产的活动(公式 2), 而 PHB 合成过程中, PhaB 的作用过程也需要氧化 NADPH (图 2), 因此导致了 2 条生产途径间还原力的竞争关系。以往研究中, PHB 通常被视为产氢过程的副产物。



光异养细菌能够根据底物和培养条件选择最有利的路线: 产氢或者产 PHB^[34]。当底物更适宜产 PHB 时, 部分细菌的氢气生产会被抑制。早在 1993 年, Hustede 等^[36]发现产氢与产 PHA 途径的竞争效应显著, 利用乙酸为碳源时 *R. sphaeroides* ATCC 17023 中积累了大量的 PHA 而非氢气。Wu 等^[57]的研究中发现 *R. palustris* WP3-5 会将收获的还原力优先用于 PHB 的生产, 尤其是底物更适宜 PHB 生产时。Padovani 等^[42]发现以甘油为碳源时, 氮和硫的缺乏可以刺激 *Rhodospseudomonas* 积累更多的 PHB, 而且此过程没有氢气产出。Corneli 等^[58]发现麦麸暗发酵废水中的丙酸可能被水解为乙酸并参与 PHB 合成, 等水中丙酸消耗完毕后产氢才开始。

为了解决产氢和产 PHB 之间的竞争, 学者们开始进行分阶段培养的研究, 即将上述 2 种产物的代谢路径按照反应阶段分开, 最终在各自阶段获得不同产物。早在 1997 年就有学者提出了两阶段产氢和产 PHB 的系统^[59], 即采用半连续式培养 *R. palustris*, 设置了氮限制、磷限制 2 种环境, 在氮限制阶段(碳源为 DL-苹果酸)菌体优先将不用于生物量生产的基质转化为氢气而不是 PHB; 在磷限制阶段 PNSB 充分利用碳源转化 PHB, 此时氢气产量受限。Melnicki 等^[60]采用了硫限制的培养方式, 使得产氢受到抑制, 并在缺乏硫的 24 h 内发现 *R. rubrum* 的 PHB 含量增加了约 3.5 倍, 而且发现在 *R. sphaeroides* 和 *R. palustris* 的试验中有着类似的结果。Corneli 等^[58]发现在较低的 VFA 浓度下, 因为 Mg^{2+} 的缺乏, 会使得 *R. palustris* 从产氢转化为产 PHB, 因此可以从 Mg^{2+} 的控制入手调整目标产物。近些年, 有报道使用 *Rhodospseudomonas* sp.

S16-VOGS3 三阶段培养分离产氢与产 PHB。例如 2019 年 Carlozzi 等^[43]利用全营养培养基、氮缺乏培养基、硫缺乏培养基进行 PHB 生产, 最终结果显示氮缺乏时可以同时产氢与 PHB, 硫缺乏时仅产 PHB。另外, 有学者发现可以通过控制底物不同 VFA 组成而控制细菌生产氢气或 PHB^[35]。Koku 等^[47]使用平台期的菌体进行试验, 发现其不利于产氢, 这可能使细菌代谢往累积 PHB 方向发展, 也是一种止氢产 PHB 的手段。

2.3.2 NAD(P)H/NAD(P)⁺

NADPH 及 NADH 都是 PNSB 菌体内重要的还原力, 它们来源于细菌的光合作用及碳源代谢过程。NAD(P)H/NAD(P)⁺是影响菌体内氧化还原平衡的重要因素, 过高的 NAD(P)H/NAD(P)⁺会导致菌体内氧化还原不平衡, 进而影响细菌生长。研究表明, 细菌调节 NAD(P)H/NAD(P)⁺平衡的机制很多, 主要包括产氢、产 PHB 和卡尔文循环这 3 条途径, 也有部分学者认为 EMC 途径能够参与调节。

前人的研究认为 PhaB 作用的过程中可以消耗 NAD(P)H, 所以当 NAD(P)H/NAD(P)⁺比值过高造成氧化还原不平衡时, PHB 的生产可以用于调节这种不平衡现象。Leroy 等^[26]发现当 *R. rubrum* 以乙酸为唯一碳源时, 面对过饱和光会使得胞内产生更多 NADH, 造成氧化还原不平衡, Bayon-Vicente 等^[61]基于此发现这种氧化还原不平衡能够刺激 PHA 的积累。

Gordon 等认为^[62] PNSB 在光异养条件下可以利用卡尔文循环来消耗多余的 NADPH 以调节氧化还原平衡。除卡尔文循环外, EMC 途径也是 PNSB 中消耗过多 NADH 调节氧化还原平衡的方式之一。例如, Laguna 等^[31]的研究中发现, 当 *R. sphaeroides* 和 *R. palustris* 以乙酸为碳源时, 能够通过 EMC 途径消耗过量 NADH, 而无需通过卡尔文循环模式。Erkal 等^[29]的研究中也发现, 当 NADH 过多时, EMC 途径的相关酶活性会得到提高。另外, 在有氧黑暗的条件下, Narancic 等^[15]在试验中加入乙酸后发现细胞内 NADPH/NADP⁺

迅速提升, 试验结果显示此种环境刺激了 PHB 的积累, *R. rubrum* 中 PHB 的积累使得卡尔文循环的关键酶 RubisCO 活性下降, 说明 PHB 的积累使得卡尔文循环活性下降, 多余的还原力主要被 PHB 生产所消耗。Leroy 等^[26]发现在厌氧光照条件下以乙酸为唯一碳源时会导致 RubisCO 酶活性下降, 而与此同时 PHB 的产量提高, 即 *R. rubrum* 可以利用 PHB 合成作为还原力消耗的途径而不是卡尔文循环。总而言之, *R. rubrum* 在不同的光氧条件下均发现菌体内部的 PHB 合成途径有着代替卡尔文循环消耗还原力的作用。此外, Hauf 等^[63]在对突囊藻的研究中发现, PhaC 的活性与细胞内氧化还原环境的变化相关, 当 NADPH/NADP⁺ 过高时, PHB 可以作为氧化还原调节剂而生成。

2.4 其他

2.4.1 生长依赖性的 PHB 生产

大多 PHB 生产菌在营养限制的条件下于生长对数期后期或平台期合成 PHB, 而部分海洋 PNSB 中的 PHB 积累有着依赖细菌生长的特性, 即与一般的 PNSB 合成 PHB 的路径不同, 它们可在细菌生长对数期的任何阶段合成 PHB。营养丰富、利于细菌生长的条件不仅能够使得细菌较好生长, 同样有利于这类细菌在体内累积 PHB, 而不是大多数 PNSB 累积 PHB 所需要的营养限制条件。例如 *Rhodospseudomonas* sp. strain W-1S 无法使用苹果酸、琥珀酸等不利于细菌生长的酸来积累 PHB, 而且 NaCl 和磷酸盐的缺乏会导致细菌生长受限, 同时影响 PHB 的积累^[40], 这与其他报道中因某种营养元素缺乏而刺激 PHB 大量合成的机制相反。日本的 Higuchi-Takeuchi 研究团队^[41]在对海洋光合细菌 *Rhodovulum sulfidophilum* 的研究中发现, 该菌在微氧光异养条件下的 PHA 合成也与细菌生长相关, 在添加微量(1-2 $\mu\text{mol/L}$)的铁后细菌的生长及 PHB 积累量均有提升。该团队还在不同光强的试验中发现, 在低光强的条件下 *R. sulfidophilum* 中 PHA 的积累依赖于细菌生长^[22]。

2.4.2 pH

前期研究表明, 不同菌种累积 PHB 的最佳 pH 值不同。关于 pH 对 PNSB 累积 PHB 的影响, 在产氢体系中研究较多。例如, *R. sphaeroides* 在碱性或微碱性条件下 PHB 的产率较高^[27], 特别是当碱性环境抑制细菌生长导致产氢受阻时, PHB 会成为细菌代谢的主要产物。前期研究表明^[37], pH 升高与氢气产量成反比, 当环境 pH 维持在 7.0 时, *R. sphaeroides* 的代谢偏向产氢, 而 PHB 积累较少; 当 pH 不受控制最终达到 10.0 时, 产氢被抑制, 此时细胞体内累积了更多的 PHB。Khatipov 等^[64]也发现, 以乳酸为碳源且初始 pH 由 6.8 升高到 7.5 时, 最终 pH 将达到 10.0, 致使氢气产量下降近 90%, 而 PHB 产量增加 6 倍。但也有研究发现, *R. palustris* WP3-5 以乙酸为碳源时, 恒定 pH 6.8 的条件下 PHB 含量最高, 而在 pH 值为 6.0 或 8.0 时, PHB 产量降低^[57]。当超过适宜的 pH 生长范围时, PSB 细胞内部会通过一级质子泵或二级活性运转体调节 pH 稳态(例如 F_1F_0 -ATP 合成酶调节 pH 稳态), 此时细胞会消耗用于合成 PHB 的能量, 进而导致 PHB 产量下降^[57]。另外, Guerra-Blanco 等^[34]发现, 在光合混合培养的非产氢体系中, pH 在 6.8 ± 0.2 范围内积累的 PHA 量为未控制 pH 试验组的 7 倍, 但是此条件下细菌生物量较低。

3 利用废水生产 PHB 的 PNSB 污水资源化技术

3.1 概况综述

前期研究表明, 小分子挥发酸(Volatile Fatty Acid, VFA)为 PSB 生长的最适碳源, 包括乙酸、丙酸、丁酸等^[65]。大多数 PNSB (*R. palustris*, *R. sphaeroides*, *R. rubrum*, *R. capsulatus*)均能以 VFA 为碳源生长, 并且混合 VFA 底物使得菌体生长更佳。Fradinho 等^[21]发现在乙酸盐存在的情况下, 能够促进 PNSB 对丁酸盐及丙酸盐的摄取, 提高 PHB 和 PHV 的积累量及速率。另外, 结合 PNSB 的 PHB 合成途径, 乙酸及丁酸是较好的 PHB 合成前体^[66]。

丙酸虽然指向合成 PHV, 但有报道显示, 丙酸有被水解为乙酸并参与 PHB 合成的可能性^[57], 但丙酸的水解会消耗电子, 从而可能导致部分用于 PHB 合成的电子被消耗, 进而降低 PHB 的产量。

PNSB 有净化废水的功能, 可利用废水中存在的污染物质作为碳源生产 PHB, 从而实现废水资源化。很多高浓度有机废水或者厌氧消化废水中含有大量 VFA, 理论上可作为生产 PHB 的廉价碳源。前期研究结果表明, 直接利用 VFA 废水生产 PHB 是可行的, 不少研究直接使用厌氧发酵废水培养 PNSB 并在培养中获得了 PHB, 相关研究结果如表 2 所示。

由表 2 可知, 目前用于生产 PHB 的废水多为暗发酵废水, 菌种包括 *R. sphaeroides*、*R. capsulatus* 和部分红假单胞菌属的细菌, 也有的使用 PNSB 混菌。除沼泽红假单胞菌外, 大多 PNSB 在纯培养条件下可生产占菌体干重 18%–82% 的 PHB, 相比之下真实废水培养 PNSB 获得的 PHB 产量不高, 最高仅达菌体干重的 30% 左右。废水经 PNSB 处理后 COD 去除率可以达到 60%–80%^[20,27], 细菌

生物量可达到 1.0–2.1 g/L^[18,20,67]。

3.2 工艺流程设想

前人的研究证明了利用 PNSB 处理 VFA 废水并生产 PHB 的可行性, 提供了一种废水资源化利用的新思路。但目前的研究主要为实验室小试规模的试验, 今后如需实现 PHB 最终大规模的生产与应用, 则要根据 PNSB 生产 PHB 的基本原理设计合适的工艺流程。

根据废水处理流程以及扩大 PHB 生产的目标, 本文提出以下工艺(图 3): 废水首先经过格栅进行初级处理, 除去废水中体积较大的不可溶悬浮物; 随后进入厌氧发酵池中, 在污泥的作用下进行产酸发酵, 获得富含 VFA 的废水; 下一阶段向此废水中投加 PNSB 累积 PHB, 与此同时 PNSB 可以降低水中 COD 对水质进行净化, 并且最终可获得富含 PHB 的 PNSB 菌泥。在实际运行过程中, 该工艺流程可能面临着诸多挑战, 例如目前使用废水培养 PNSB 获取的 PHB 含量并不高, 如何提高该系统中 PHB 产量是一个关键性的问题, 另外产酸过程环境条件的控制也需要进一步的探讨。

表 2 PNSB 利用真实废水生产 PHB

Table 2 The production of PHB by PSB from real wastewater

菌种 Strains	废水种类 Type of waste water	PHB 产量 PHB production	参考文献 References
<i>R. capsulatus</i> ATCC 17015 IZT	Dark fermentation effluents of fruit & vegetable wastes	30.8% DCW 17.8% DCW	[18]
<i>R. sphaeroide</i> AV1b Mixed culture of PNSB	Dark fermentation effluents of food waste	24±0.7% DCW 6.3±0% DCW	[20]
<i>R. capsulatus</i> ATCC 17015 IZT	Dark fermentation effluents of fruit & vegetable wastes	29% DCW 5% DCW	[27]
<i>R. palustris</i> CGA676	Dark fermentation effluents of olive pomance	11.53% TS	[58]
<i>R. sphaeroide</i> AV1b Mixed culture of PNSB	Dark fermentation effluents of municipal solid waste	155 mg PHB/g-COD 55 mg PHB/g-COD	[67]
<i>Rhodobacter sphaeroides</i> O.U.001	Dark fermentation effluents	1.21 mg/g-wet weight	[68]
<i>Rhodopseudomonas</i>	Olive mill wastewater	175 mg/L	[69]
<i>Rhodopseudomonas</i> sp. S16-FVPT5	Dephenolized-olive mill wastewater	315 mg/L	[70]

注: DCW 为细菌干重; TS 为总固体质量; IZT 为光异养富集培养产; PNSB 为紫色非硫菌

Note: DCW is dry cell weight; TS is total solid; IZT is enriched phototrophic culture; PNSB is purple non-sulfur bacteria

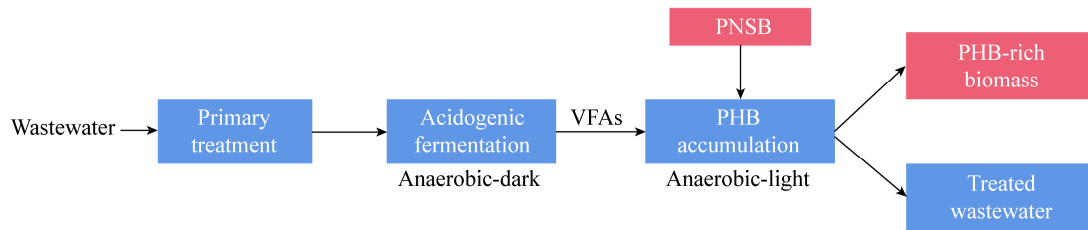


图3 PHB 生产工艺流程图

Figure 3 PHB production process

4 展望

有机废水,尤其是富含挥发性脂肪酸的废水是 PNSB 累积 PHB 的最佳原料。利用高浓度有机废水生产 PHB,为污水资源化利用提供了一个值得探究的选择。食品加工类废水是厌氧发酵产挥发酸的原料,在中国此类废水年均产量可达 27 亿 t^[13],年均 COD 可达 77 万 t。据报道,PSB 在废水中的产量通常为 0.12–1.50 g-biomass/g-COD 去除量。因此,若利用此类废水为原料,每年可生产高达 115.5 万 t 的 PSB (干重)。按照废水培养的 PSB 体内 PHB 的最高含量 30% 计算,以此类废水为碳源时,PHB 年产量最高可达 34.7 万 t。此产量远远超过进入环境中的石油基塑料总量。因此,若能利用废水产出足够的 PHB 替代石油基塑料,则可以极大地避免石油基塑料的污染,这对环境的保护及人体健康有着深远的意义。

目前国内外有关利用废水与 PNSB 生产 PHB 的研究多停留在小试实验阶段,未达到工业化规模,并且废水成分较为复杂,导致 PNSB 中 PHB 含量较低。因此,开发适用于高浓度有机废水生产 PHB 的 PNSB 大规模污水资源化工艺技术,避免杂菌带来的 PNSB 系统污染,并控制最佳环境条件与工艺参数提升 PHB 的累积量,是未来该技术研究发展的关键。

REFERENCES

- [1] Geyer R, Jambeck JR, Law KL. Production, use, and fate of all plastics ever made[J]. *Science Advances*, 2017, 3(7): e1700782
- [2] Xu Y, Yin CF, Yue WL, Zhou NY. Microbial degradation of petroleum-based plastics[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2019, 35(11): 2092-2103 (in Chinese)
- [3] 许楹, 殷超凡, 岳纹龙, 周宁一. 石油基塑料的微生物降解[J]. *生物工程学报*, 2019, 35(11): 2092-2103
- [4] Lin XH, Li JP, Hu X. Current situation and health harmful effects of microplastics in the environment[J]. *Chinese Journal of Industrial Hygiene and Occupational Diseases*, 2020, 38(2): 153-156 (in Chinese)
- [5] 林肖惠, 李建平, 胡晓. 环境中微塑料的污染现状及健康危害[J]. *中华劳动卫生职业病杂志*, 2020, 38(2): 153-156
- [6] Allied Market Research. Global Bioplastics Market is estimated to reach \$68.57 billion by 2024: AMR[EB/OL]. (2019-08-06). <http://www.globenewswire.com/news-release/2019/08/06/1897708/0/en/Global-Bioplastics-Market-is-estimated-to-reach-68-57-billion-by-2024-AMR.html>
- [7] Kranz RG, Gabbert KK, Locke TA, Madigan MT. Polyhydroxyalkanoate production in *Rhodobacter capsulatus*: genes, mutants, expression, and physiology[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63(8): 3003-3009
- [8] Anjum A, Zuber M, Zia KM, Noreen A, Anjum MN, Tabasum S. Microbial production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) and its copolymers: A review of recent advancements[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2016, 89: 161-174
- [9] Grigore ME, Grigorescu RM, Iancu L, Ion RM, Zaharia C, Andrei ER. Methods of synthesis, properties and biomedical applications of polyhydroxyalkanoates: a review[J]. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 2019, 30(9): 695-712
- [10] Qiu SZ, Li JY, Yang JC, Liu CL. Research progress of low-cost method of synthesizing polyhydroxyalkanoates (PHAs)[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2019, 35(9): 45-52 (in Chinese)
- [11] 邱石正, 李佳益, 杨景辰, 刘长莉. 低成本合成聚羟基脂肪酸酯(PHAs)的研究进展[J]. *生物技术通报*, 2019, 35(9): 45-52
- [12] Wu H, Wang H, Chen JC, Chen GQ. Effects of cascaded *vgb* promoters on poly(hydroxybutyrate) (PHB) synthesis by recombinant *Escherichia coli* grown micro-aerobically[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014, 98(24): 10013-10021

- [10] Page WJ, Tindale A, Chandra M, Kwon E. Alginate formation in *Azotobacter vinelandii* UWD during stationary phase and the turnover of poly- β -hydroxybutyrate[J]. Microbiology, 2001, 147(2): 483-490
- [11] Liu C, Zhang XF. Application of PHB used in production of degradable plastics and research progress in microbial synthesized PHB[J]. China Plastics Industry, 2005, 33(8): 1-3,18 (in Chinese)
刘春, 张小凡. PHB 在生产可降解塑料方面的应用及其微生物累积的研究进展[J]. 塑料工业, 2005, 33(8): 1-3,18
- [12] Zhang GM, Zhao W. Research development of high-value substances in photosynthetic bacteria[J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2013, 44(7): 156-160 (in Chinese)
张光明, 赵微. 光合细菌内高价值物质研究进展[J]. 东北农业大学学报, 2013, 44(7): 156-160
- [13] Lu HF, Zhang GM, Zheng ZQ, Meng F, Du TS, He SC. Bio-conversion of photosynthetic bacteria from non-toxic wastewater to realize wastewater treatment and bioresource recovery: A review[J]. Bioresource Technology, 2019, 278: 383-399
- [14] Wu GX, Guan YT, Wang JQ, Jiang ZP. Effect of carbon and nitrogen sources on the accumulation of poly- β -hydroxybutyrate by purple non-sulfur photosynthetic bacteria[J]. Environmental Science, 2004, 25(6): 102-107 (in Chinese)
吴光学, 管运涛, 王剑秋, 蒋展鹏. 碳源及氮源对紫色非硫光合细菌积累 PHB 的影响[J]. 环境科学, 2004, 25(6): 102-107
- [15] Narancic T, Scollica E, Kenny ST, Gibbons H, Carr E, Brennan L, Cagney G, Wynne K, Murphy C, Raberg M, et al. Understanding the physiological roles of polyhydroxybutyrate (PHB) in *Rhodospirillum rubrum* S1 under aerobic chemoheterotrophic conditions[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2016, 100(20): 8901-8912
- [16] Kumar G, Ponnusamy VK, Bhosale RR, Shobana S, Yoon JJ, Bhatia SK, Banu JR, Kim SH. A review on the conversion of volatile fatty acids to polyhydroxyalkanoates using dark fermentative effluents from hydrogen production[J]. Bioresource Technology, 2019, 287: 121427
- [17] Monroy I, Buitrón G. Production of polyhydroxybutyrate by pure and mixed cultures of purple non-sulfur bacteria: A review[J]. Journal of Biotechnology, 2020, 317: 39-47
- [18] Corona VM, Le Borgne S, Revah S, Morales M. Effect of light-dark cycles on hydrogen and poly- β -hydroxybutyrate production by a photoheterotrophic culture and *Rhodobacter capsulatus* using a dark fermentation effluent as substrate[J]. Bioresource Technology, 2017, 226: 238-246
- [19] Kemavongse K, Prasertsan P, Upaichit A, Methacanon P. Poly- β -hydroxyalkanoate production by halotolerant *Rhodobacter sphaeroides* U7[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2008, 24(10): 2073-2085
- [20] Ghimire A, Valentino S, Frunzo L, Pirozzi F, Lens PNL, Esposito G. Concomitant biohydrogen and poly- β -hydroxybutyrate production from dark fermentation effluents by adapted *Rhodobacter sphaeroides* and mixed photofermentative cultures[J]. Bioresource Technology, 2016, 217: 157-164
- [21] Fradinho JC, Oehmen A, Reis MAM. Photosynthetic mixed culture polyhydroxyalkanoate (PHA) production from individual and mixed volatile fatty acids (VFAs): substrate preferences and co-substrate uptake[J]. Journal of Biotechnology, 2014, 185: 19-27
- [22] Higuchi-Takeuchi M, Numata K. Acetate-inducing metabolic states enhance polyhydroxyalkanoate production in marine purple non-sulfur bacteria under aerobic conditions[J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2019, 7: 118
- [23] Liu RL, Diao HX, Liang FL, Zhao DJ. Photosynthetic bacteria and its application[M]. Beijing: China Agriculture Sciencetech Press, 1991: 105,116,136 (in Chinese)
刘如林, 刁虎欣, 梁凤来, 赵大健. 光合细菌及其应用[M]. 北京: 中国农业科技出版社, 1991: 105,116,136
- [24] Fradinho JC, Domingos JMB, Carvalho G, Oehmen A, Reis MAM. Polyhydroxyalkanoates production by a mixed photosynthetic consortium of bacteria and algae[J]. Bioresource Technology, 2013, 132: 146-153
- [25] Krasil'nikova EN, Mil'ko ES, Keppen OI, Lebedeva NV, Ivanovskii RN. Poly- β -hydroxybutyrate accumulation by *Rhodobacter sphaeroides* phase variants[J]. Microbiology, 2015, 84(3): 347-350
- [26] Leroy B, De Meur Q, Moulin C, Wegria G, Wattiez R. New insight into the photoheterotrophic growth of the isocitrate lyase-lacking purple bacterium *Rhodospirillum rubrum* on acetate[J]. Microbiology, 2015, 161(Pt 5): 1061-1072
- [27] Montiel-Corona V, Revah S, Morales M. Hydrogen production by an enriched photoheterotrophic culture using dark fermentation effluent as substrate: Effect of flushing method, bicarbonate addition, and outdoor-indoor conditions[J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2015, 40(30): 9096-9105
- [28] Berg IA, Ivanovsky RN. Enzymes of the citramalate cycle in *Rhodospirillum rubrum*[J]. Microbiology, 2009, 78(1): 16-24
- [29] Erkal NA, Eser MG, Özgür E, Gündüz U, Eroglu I, Yücel M. Transcriptome analysis of *Rhodobacter capsulatus* grown on different nitrogen sources[J]. Archives of Microbiology, 2019, 201(5): 661-671
- [30] Petushkova EP, Tsygankov AA. Acetate metabolism in the purple non-sulfur bacterium *Rhodobacter capsulatus*[J]. Biochemistry-Moscow, 2017, 82(5): 587-605
- [31] Laguna R, Tabita FR, Alber BE. Acetate-dependent photoheterotrophic growth and the differential requirement for the Calvin-Benson-Bassham reductive pentose phosphate cycle in *Rhodobacter sphaeroides* and

- Rhodospseudomonas palustris*[J]. Archives of Microbiology, 2011, 193(2): 151-154
- [32] Kars G, Gündüz U. Towards a super H₂ producer: Improvements in photofermentative biohydrogen production by genetic manipulations[J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2010, 35(13): 6646-6656
- [33] Demiriz BÖ, Kars G, Yücel M, Eroğlu İ, Gündüz U. Hydrogen and poly- β -hydroxybutyric acid production at various acetate concentrations using *Rhodobacter capsulatus* DSM 1710[J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2019, 44(32): 17269-17277
- [34] Guerra-Blanco P, Cortes O, Poznyak T, Chairez I, García-Peña EI. Polyhydroxyalkanoates (PHA) production by photoheterotrophic microbial consortia: Effect of culture conditions over microbial population and biopolymer yield and composition[J]. European Polymer Journal, 2018, 98: 94-104
- [35] Cardeña R, Valdez-Vazquez I, Buitrón G. Effect of volatile fatty acids mixtures on the simultaneous photofermentative production of hydrogen and polyhydroxybutyrate[J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2017, 40(2): 231-239
- [36] Hustede E, Steinbüchel A, Schlegel HG. Relationship between the photoproduction of hydrogen and the accumulation of PHB in non-sulphur purple bacteria[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1993, 39(1): 87-93
- [37] Kim MS, Kim DH, Son HN, Ten LN, Lee JK. Enhancing photo-fermentative hydrogen production by *Rhodobacter sphaeroides* KD131 and its PHB synthase deleted-mutant from acetate and butyrate[J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2011, 36(21): 13964-13971
- [38] Kemavongse K, Prasertsan P, Upaichit A, Methacanon P. Effect of co-substrate on production of poly- β -hydroxybutyrate (PHB) and copolymer PHBV from newly identified mutant *Rhodobacter sphaeroides* U7 cultivated under aerobic-dark condition[J]. Songklanakarin Journal of Science and Technology, 2007, 29(4): 1101-1113
- [39] Sangkharak K, Prasertsan P. Nutrient optimization for production of polyhydroxybutyrate from halotolerant photosynthetic bacteria cultivated under aerobic-dark condition[J]. Electronic Journal of Biotechnology, 2008, 11(3): 1-12
- [40] Chowdhury WQ, Idehara K, Maeda I, Umeda F, Yagi K, Miura Y, Mizoguchi T. Factors affecting polyhydroxybutyrate biosynthesis in the marine photosynthetic bacterium *Rhodospseudomonas* sp. strain W-1S[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 1996, 57/58(1): 361-366
- [41] Foong CP, Higuchi-Takeuchi M, Numata K. Optimal iron concentrations for growth-associated polyhydroxyalkanoate biosynthesis in the marine photosynthetic purple bacterium *Rhodovulum sulfidophilum* under photoheterotrophic condition[J]. PLoS One, 2019, 14(4): e0212654
- [42] Padovani G, Emiliani G, Giovanelli A, Traversi ML, Carlozzi P. Assessment of glycerol usage by five different purple non-sulfur bacterial strains for bioplastic production[J]. Journal of Environmental Chemical Engineering, 2018, 6(1): 616-622
- [43] Carlozzi P, Giovannelli A, Traversi ML, Touloupakis E, Lorenzo TD. Poly-3-hydroxybutyrate and H₂ production by *Rhodospseudomonas* sp. S16-VOGS3 grown in a new generation photobioreactor under single or combined nutrient deficiency[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 135: 821-828
- [44] Fradinho JC, Oehmen A, Reis MAM. Effect of dark/light periods on the polyhydroxyalkanoate production of a photosynthetic mixed culture[J]. Bioresource Technology, 2013, 148: 474-479
- [45] Özgür E, Uyar B, Öztürk Y, Yücel M, Gündüz U, Eroğlu I. Biohydrogen production by *Rhodobacter capsulatus* on acetate at fluctuating temperatures[J]. Resources, Conservation and Recycling, 2010, 54(5): 310-314
- [46] Sargsyan H, Gabrielyan L, Hakobyan L, Trchounian A. Light-dark duration alternation effects on *Rhodobacter sphaeroides* growth, membrane properties and bio-hydrogen production in batch culture[J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2015, 40(11): 4084-4091
- [47] Koku H, Eroğlu İ, Gündüz U, Yücel M, Türker L. Kinetics of biological hydrogen production by the photosynthetic bacterium *Rhodobacter sphaeroides* O.U. 001[J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2003, 28(4): 381-388
- [48] Nakada E, Asada Y, Arai T, Miyake J. Light penetration into cell suspensions of photosynthetic bacteria and relation to hydrogen production[J]. Journal of Fermentation and Bioengineering, 1995, 80(1): 53-57
- [49] Brandl H, Knee Jr EJ, Fuller RC, Gross RA, Lenz RW. Ability of the phototrophic bacterium *Rhodospirillum rubrum* to produce various poly (β -hydroxyalkanoates): Potential sources for biodegradable polyesters[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 1989, 11(1): 49-55
- [50] Yue WJ, Xia YS, Zhang XF. Study on the growth and poly- β -hydroxybutyrate accumulation of red non-sulfur bacteria[J]. Environment and Sustainable Development, 2008(2): 18-20 (in Chinese)
岳文洁, 夏元生, 张小凡. 红色非硫磺菌生长及聚 β -羟基丁酸积累的研究[J]. 环境与可持续发展, 2008(2): 18-20
- [51] Zhang XY, Zhao LQ, Lv LH, Zhang C, Lin J. Culture conditions selection and optimization for PHB production by *Rhodobacter sphaeroides*[J]. Shanxi Chemical Industry, 2009, 29(6): 1-5,29 (in Chinese)
张晓艳, 赵良启, 吕利华, 张婵, 林汲. 球形红细菌合成 PHB 培养条件的选择与优化[J]. 山西化工, 2009, 29(6): 1-5,29
- [52] Higuchi-Takeuchi M, Morisaki K, Toyooka K, Numata K.

- Synthesis of high-molecular-weight polyhydroxyalkanoates by marine photosynthetic purple bacteria[J]. *PLoS One*, 2016, 11(8): e0160981
- [53] Karmann S, Panke S, Zinn M. Fed-batch cultivations of *Rhodospirillum rubrum* under multiple nutrient-limited growth conditions on syngas as a novel option to produce poly(3-hydroxybutyrate) (PHB)[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2019, 7: 59
- [54] Zhao W, He CH, Zhang GM. Culture medium optimization for photosynthetic bacteria[J]. *Advanced Materials Research*, 2010, 113/116: 1443-1446
- [55] Waligórska M, Seifert K, Górecki K, Moritz M, Łaniecki M. Kinetic model of hydrogen generation by *Rhodobacter sphaeroides* in the presence of NH_4^+ ions[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2009, 107(4): 1308-1318
- [56] D'Alessio M, Nordeste R, Doxey AC, Charles TC. Transcriptome analysis of polyhydroxybutyrate cycle mutants reveals discrete loci connecting nitrogen utilization and carbon storage in *Sinorhizobium meliloti*[J]. *mSystems*, 2017, 2(5): e00035-17
- [57] Wu SC, Liou SZ, Lee CM. Correlation between bio-hydrogen production and polyhydroxybutyrate (PHB) synthesis by *Rhodospseudomonas palustris* WP3-5[J]. *Bioresource Technology*, 2012, 113: 44-50
- [58] Corneli E, Adessi A, Dragoni F, Ragagnini G, Bonari E, De Philippis R. Agroindustrial residues and energy crops for the production of hydrogen and poly- β -hydroxybutyrate via photofermentation[J]. *Bioresource Technology*, 2016, 216: 941-947
- [59] Vincenzini M, Marchini A, Ena A, De Philippis R. H and poly- β -hydroxybutyrate, two alternative chemicals from purple non sulfur bacteria[J]. *Biotechnology Letters*, 1997, 19(8): 759-762
- [60] Melnicki MR, Eroglu E, Melis A. Changes in hydrogen production and polymer accumulation upon sulfur-deprivation in purple photosynthetic bacteria[J]. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2009, 34(15): 6157-6170
- [61] Bayon-Vicente G, Wattiez R, Leroy B. Global proteomic analysis reveals high light intensity adaptation strategies and polyhydroxyalkanoate production in *Rhodospirillum rubrum* cultivated with acetate as carbon source[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 464
- [62] Gordon GC, McKinlay JB. Calvin cycle mutants of photoheterotrophic purple nonsulfur bacteria fail to grow due to an electron imbalance rather than toxic metabolite accumulation[J]. *Journal of Bacteriology*, 2014, 196(6): 1231-1237
- [63] Hauf W, Schlebusch M, Hüge J, Kopka J, Hagemann M, Forchhammer K. Metabolic changes in *Synechocystis* PCC6803 upon nitrogen-starvation: excess NADPH sustains polyhydroxybutyrate accumulation[J]. *Metabolites*, 2013, 3(1): 101-118
- [64] Khatipov E, Miyake M, Miyake J, Asada Y. Accumulation of poly- β -hydroxybutyrate by *Rhodobacter sphaeroides* on various carbon and nitrogen substrates[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 1998, 162(1): 39-45
- [65] Alloul A, Wuyts S, Lebeer S, Vlaeminck SE. Volatile fatty acids impacting phototrophic growth kinetics of purple bacteria: Paving the way for protein production on fermented wastewater[J]. *Water Research*, 2019, 152: 138-147
- [66] Ghosh S, Dairkee UK, Chowdhury R, Bhattacharya P. Hydrogen from food processing wastes via photofermentation using Purple Non-sulfur Bacteria (PNSB): a review[J]. *Energy Conversion and Management*, 2017, 141: 299-314
- [67] Luongo V, Ghimire A, Frunzo L, Fabbicino M, D'Antonio G, Pirozzi F, Esposito G. Photofermentative production of hydrogen and poly- β -hydroxybutyrate from dark fermentation products[J]. *Bioresource Technology*, 2017, 228: 171-175
- [68] Eroğlu İ, Tabanoğlu A, Gündüz U, Eroğlu E, Yücel M. Hydrogen production by *Rhodobacter sphaeroides* O.U.001 in a flat plate solar bioreactor[J]. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2008, 33(2): 531-541
- [69] Padovani G, Carozzi P, Seggiani M, Cinelli P, Lazzeri A. PHB-rich biomass and BioH_2 production by means of photosynthetic microorganisms[J]. *Chemical Engineering Transactions*, 2016, 49: 55-60
- [70] Carozzi P, Seggiani M, Capperucci A, Tanini D, Cinelli P, Lazzeri A. Hydroxytyrosol rich-mixture from olive mill wastewater and production of green products by feeding *Rhodospseudomonas* sp. S16-FVPT5 with the residual effluent[J]. *Journal of Biotechnology*, 2019, 295: 28-36