

一株新型高产 PHB 假单胞菌 SCH17 的 分离和特征分析

戴君 高毅 刘洋 徐德聪 程香 彭惠*

(安徽省生态工程与生物技术重点实验室 安徽大学生命科学学院 安徽 合肥 230039)

摘要: 通过丁醇富集筛选, 从土壤样品中筛选到一株菌株SCH17。经过生理特性和 16S rRNA 分析, 鉴定菌株SCH17 属于假单胞菌属。透射电镜显示该菌细胞内聚集了大量颗粒状物质, 经过氯仿抽提和核磁共振分析, 确认这些颗粒物质是聚 β -羟基丁酸(PHB)。通过对碳源和氮源的优化, 得到最佳积累PHB的碳源是果糖, 氮源是蛋白胨。在该培养基中仅需发酵 14 h, 菌体干重和PHB含量均达到最大, 分别为 3.52 g/L 和 2.69 g/L, PHB含量高达细胞干重的 76%。

关键词: 聚 β -羟基丁酸(PHB), 假单胞菌, 核磁共振, 发酵

Isolation and characterization of a novel *Pseudomonas* sp. SCH17 with high PHB production

DAI Jun GAO Yi LIU Yang XU De-Cong CHENG Xiang PENG Hui*

(Key Laboratory of Ecological Engineering and Biotechnology of Anhui Province, School of Life Science, Anhui University, Hefei, Anhui 230039, China)

Abstract: A novel poly β -hydroxybutyrate (PHB)-accumulating bacterium, strain SCH17, was isolated from soil samples by butanol enrichment. A phylogenetic analysis based on 16S rRNA sequence data indicated that the strain SCH17 was a member of the genus *Pseudomonas*. Transmission electron micrographs showed electron-transparent intracellular granules. The purified sample was extracted from cells with chloroform and was determined as PHB by nuclear magnetic resonance analysis. *Pseudomonas* sp. SCH17 was able to accumulate PHB after growth on various carbon and nitrogen substrates. Fructose and fish peptone were the optimal carbon source and the optimal carbon source, respectively. After grown under the optimal conditions for 14 h, the maximum cell dry weight of 3.52 g/L with the PHB concentration of 2.69 g/L was obtained, and the PHB content was up to 76%.

Keywords: Poly- β -hydroxybutyrate (PHB), *Pseudomonas*, Nuclear magnetic resonance, Fermentation

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 30800010); 安徽大学博硕士队伍建设计划项目(No. 02203104)

* 通讯作者: Tel: 86-551-5107224; 信箱: pph0259@126.com

收稿日期: 2010-09-21; 接受日期: 2010-12-30

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

聚羟基脂肪酸酯 (Poly-hydroxyalkanoates, PHAs)是微生物在营养不均衡的条件下积累的内源性聚合物。目前已经发现 150 多种不同的单体可以聚合形成 PHAs。聚 β -羟基丁酸 (Poly- β -hydroxybutyrate, PHB)是发现最早、研究得较为深入的一种 PHA。PHB 不仅具有质量轻、热塑性大、耐磨性高等优点,还可以被生物降解。因此,PHB 作为一种新型的可生物降解高分子材料,在工业、农业、医药等领域具有广阔的应用前景^[1]。

自然界中多种细菌能积累 PHB 颗粒,研究较多的有产碱杆菌属 (*Alcaligenes*)^[2]、固氮菌属 (*Azotobacter*)^[3]、红假单胞菌属 (*Rhodospseudomonas*)^[4]和假单胞菌属 (*Pseudomonas*)^[5]。但是大部分从自然界筛选的野生型菌株积累 PHB 的水平较低^[3-4,6],发酵周期长达数天^[4,7-8]。因此,分离生长速度快、PHB 产量高的菌株将对 PHB 的开发应用具有重要意义。本文报道一株新型高效积累 PHB 的细菌的分离、鉴定、发酵产物鉴定和条件优化,并初步评价了其 PHB 积累速度和产量的优势,以期为该菌的进一步应用研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株:产 PHB 的菌株分离自巢湖周边采集的土壤样品。

1.1.2 培养基:基础培养基(g/L): 酵母粉 1.0, KH_2PO_4 2.0, Na_2HPO_4 2.5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, pH 7.0。测定菌株生长特征时,采用基础培养基中添加 10 g/L 葡萄糖和 2 g/L 蛋白胨。测定碳源对 PHB 合成的影响时,以 NH_4Cl (2 g/L)为氮源,在基础培养基中添加 10 g/L 的碳源;测定氮源时,以葡萄糖(10 g/L)为碳源,在基础培养基中添加 2 g/L 的氮源。

1.2 方法

1.2.1 菌的分离和培养:以添加了 3% (V/V)丁醇、5 g/L 葡萄糖和 2.0 g/L NH_4Cl 的基础培养基富集筛选土壤样品。单菌落连续划线 3 次以上,以获得纯培养。在光学显微镜下观察确认无杂菌。发酵实验的接种量为 5%, 30 °C 培养。菌体干重(g/L)定义为 1 L 发酵液 12 000×g 离心 20 min 获得的细胞,洗涤

后在 90 °C 烘干 24 h 后的重量。

1.2.2 电镜观察:取培养至稳定期的菌液,细胞离心洗涤后,按照文献[9]制备透射电子显微镜超薄切片,并在透射电子显微镜(JEM-2100)下观察。

1.2.3 16S rRNA 基因的扩增:基因组的提取参照文献[10]。扩增 16S rRNA 基因的引物根据通用引物 27F 和 1492R 设计,为 5'-TTAGAGTTTGATCCTGG C-3'和 5'-GGTTACCTTGTTACGACT-3'。PCR 产物纯化后进行 TA 克隆,产生质粒由上海生工测序。

1.2.4 PHB 的提取:基本参照文献[11]进行,略有修改,主要过程如下。细胞离心收集,加入终浓度为 10% SDS,沸水中处理 15 min。12 000 ×g 离心 20 min,弃上清。沉淀用 H_2O 洗涤 2 次,40 °C 烘干。加入氯仿,并搅拌 1 h 以上。不溶解的物质过滤去除。旋转蒸发,浓缩溶解在氯仿中的 PHB。加入一定量甲醇进行洗涤,35 °C 缓慢振荡 15 min,离心后取氯仿层,过滤后 40 °C 烘干,称重。PHB 含量(g/L)定义为 1 L 发酵液中提取获得的 PHB 干重。

1.2.5 核磁共振分析(NMR):使用核磁共振谱仪 (BRUK-400)鉴定提取的 PHB。PHB 溶解在氘代氯仿(CDCl_3)中,浓度为 5 g/L。 ^{13}C NMR 碳谱的观察频率为 100.62 MH。

2 结果与分析

2.1 菌株的特征与鉴定

通过使用含 3% (V/V)丁醇的培养基对土壤样品进行筛选,分离获得了一株具有丁醇耐受性的细菌 SCH17。菌株 SCH17 为革兰氏阴性的短杆菌,最高丁醇耐受浓度为 5% (V/V)。菌株 SCH17 的温度生长范围为 10 °C–40 °C,最适生长温度为 30 °C (图 1);生长的 pH 范围为 5.0–9.0,最适 pH 为 7.0–7.5 (图 2)。生长的 NaCl 范围为 0–5% (图 3)。菌株 SCH17 的超薄切片在透射电子显微镜下显示出细胞中含有大量的颗粒物 (图 4)。

菌株 SCH17 的 16S rRNA 基因序列长度为 1 498 bp, BLAST 分析结果表明,菌株 SCH17 属于假单胞菌属,与假单胞菌 Z64-1zhy (AM411070)的相似性最高,达到 99.8%。但是假单胞菌 Z64-1zhy 不是假单胞菌属的模式菌株,也没有进一步的分类

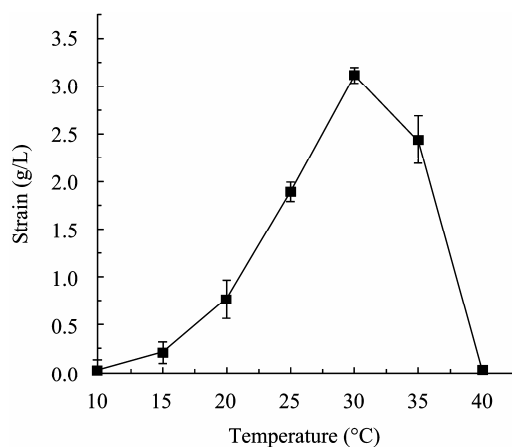


图1 温度对菌株 SCH17 生长的影响

Fig. 1 Effect of temperature on the growth of the strain SCH17

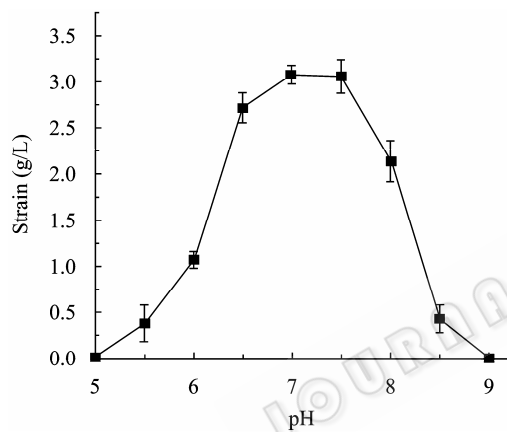


图2 pH 对菌株 SCH17 生长的影响

Fig. 2 Effect of pH on the growth of the strain SCH17

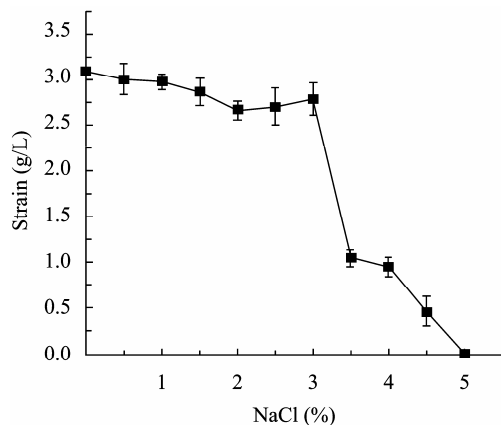
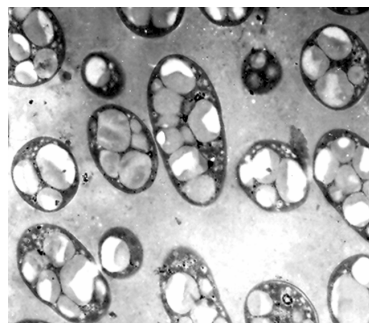


图3 NaCl 对菌株 SCH17 生长的影响

Fig. 3 Effect of NaCl on the growth of the strain SCH17

图4 透射电子显微镜显示假单胞菌 SCH17 产生的颗粒物($\times 10\,000$)Fig. 4 Transmission electron micrograph of a thin section of *Pseudomonas* sp. SCH17 containing granules ($\times 10\,000$)

信息。选取与菌株 SCH17 相似性高的 14 个假单胞菌属的模式菌株, 运用邻接法(NJ)构建的系统进化树如图 5 所示。可见, 菌株 SCH17 与假单胞菌属的菌株可以聚类, 因此是假单胞菌属的一个菌株。这些模式菌株中, 菌株 SCH17 与进化距离最近的变形假单胞菌 *P. plecoglossicida* 的 16S rRNA 基因相似性也是最高, 达到 99.4%。但是, 菌株 SCH17 在系统进化树上形成一个新的分支, 因此, 暂不能归属于已经鉴定的任何种。本文中命名为假单胞菌 SCH17。另外, 未有变形假单胞菌积累 PHB 的报道。

2.2 ^{13}C NMR 的分析结果

为了检验电镜观察到的胞内颗粒物质是否为 PHB, 将氯仿抽提物进行 ^{13}C NMR 分析(图 6)。碳谱图显示抽提物具有 4 个典型的 PHB 峰^[12-13], 即甲基(CH_3)、亚甲基(CH_2)、次甲基(CH)和羰基($\text{C}=\text{O}$)。这证明了假单胞菌 SCH17 胞内颗粒状物质是 PHB。

2.3 碳/氮源对假单胞菌 SCH17 中 PHB 积累的影响

假单胞菌 SCH17 不能在含有 1 g/L 酵母粉的基础培养基中生长, 但是这种微量的酵母粉不能被成分明确的复合维生素以及复合微量元素取代。在基础培养基中, 碳氮比为 5:1, 30 °C 培养 14 h, 测定的碳/氮源对菌株 SCH17 中 PHB 积累的影响如表 1 所示。菌株 SCH17 只能利用淀粉微弱生长; 可以利用丁醇和乙醇生长, 并合成 PHB, 但含量偏低; 对于 PHB 的积累而言, 果糖是最佳碳源。除了 NaNO_3 , 测试的各种有机复合氮源和无机氮源都能促使菌株 SCH17 较好的合成 PHB, 最佳氮源是蛋白胨。

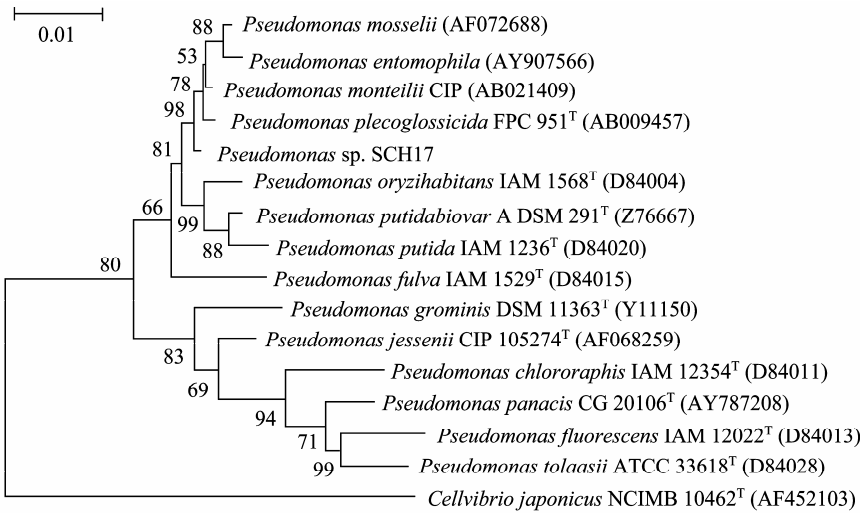


图 5 系统进化树显示假单胞菌 SCH17 和亲缘关系近的模式菌株之间的关系

Fig. 5 Phylogenetic tree showed the phylogenetic relationship of strain SCH17 relative to the type strains of species in the genera *Pseudomonas*

Note: Bootstrap values (%) from 1 000 replicates are as shown. The scale bar represents 0.01 nucleotide substitutions per position. Numbers in brackets are GenBank accession numbers for the 16S rRNA gene sequence of the type strains.

表 1 不同碳源和氮源对假单胞菌 SCH17 积累 PHB 的影响

Table 1 Effect of different carbon sources and nitrogen sources on PHB accumulation of *Pseudomonas* sp. SCH17

| 碳源 Carbon source (10 g/L) | PHB 含量 PHB concentration (g/L) | 细胞干重 Cell dry weight (g/L) | 氮源 Nitrogen source (2 g/L) | PHB 含量 PHB concentration (g/L) | 细胞干重 Cell dry weight (g/L) |
|---------------------------------|--------------------------------------|----------------------------------|---|--------------------------------------|----------------------------------|
| Yeast extract | 1.90 | 3.1 | Fish peptone | 2.40 | 3.30 |
| Butanol | 0.72 | 1.3 | Casitone | 2.10 | 3.30 |
| Ethanol | 0.85 | 1.5 | Tryptone | 2.00 | 3.60 |
| Sucrose | 1.70 | 2.5 | Casamino acids | 1.80 | 3.90 |
| Glucose | 1.90 | 2.6 | Beef extract | 2.20 | 3.10 |
| Fructose | 2.10 | 2.5 | NH ₄ Cl | 1.90 | 2.60 |
| Glycerol | 1.00 | 1.7 | (NH ₄) ₂ SO ₄ | 1.60 | 2.00 |
| Starch | 0.07 | 0.2 | NaNO ₃ | 0.12 | 0.36 |

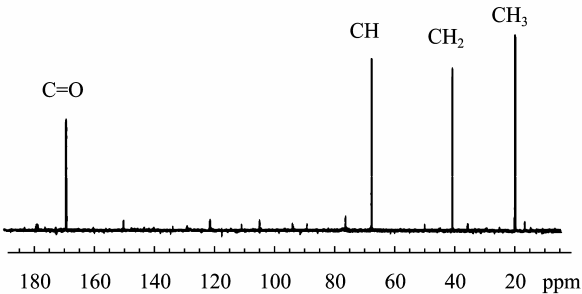


图 6 ¹³C NMR 分析从 *Pseudomonas* sp. SCH17 中抽提的聚合物的单体成分

Fig. 6 ¹³C NMR spectrum showed the carbon composition of the monomers belonging to the polymer extracted and purified from *Pseudomonas* sp. SCH17 cells

2.4 假单胞菌 SCH17 的发酵和 PHB 积累

在积累 PHB 的最适条件下,即基础培养基中添加 10 g/L 果糖和 2 g/L 蛋白胨,假单胞菌 SCH17 摇瓶发酵 18 h 的结果如图 7 所示。菌体生长 14 h 时,菌体干重和 PHB 含量都达到最大,分别为 3.52 g/L 和 2.69 g/L,PHB 含量高达细胞干重的 76%。进入稳定期后,菌体干重基本保持不变,但是 PHB 含量明显下降。这是因为生长后期培养基中营养成分减少,胞内积累的 PHB 部分重新分解,为细胞提供能量。每个测试点 3 个平行样品。

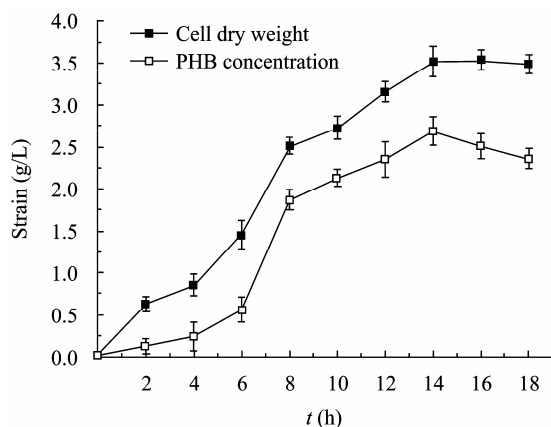


图7 假单胞菌 SCH17 在最适条件下的生长和 PHB 积累
Fig. 7 Cell growth and PHB accumulation of *Pseudomonas* sp. SCH17 under the optimal conditions

与报道过的积累 PHB 的细菌相比,假单胞菌 SCH17 的显著特点是积累 PHB 的速度快,只需要 14 h PHB 含量就可以占细胞干重的 76%。研究得最为深入的 PHB 积累细菌是真养产碱杆菌 *Alcaligenes eutrophus*。真养产碱杆菌的很多菌株均能高效积累 PHB,最高可占细胞干重的 96%^[14]。但是,大多数野生型的真养产碱杆菌菌株的发酵周期长达 100 h 以上^[15-16],远远高于本实验筛选的野生型假单胞菌 SCH17。即使与已经产业化的几株真养产碱杆菌比较,假单胞菌 SCH17 在 PHB 积累速度方面依然具有优势。日本 Ishizaki 等采用的真养产碱杆菌 ATCC17697^T 菌株,PHB 的积累周期已经大幅度缩短,但依然有 40 h^[17]。我国早期采用的真养产碱杆菌 WSH3 菌株和 H16 菌株,经过发酵条件优化,发酵周期分别为 50 h^[18]和 48 h^[19];近年报道的突变菌株 LY6,发酵周期进一步缩短为 30 h,但是 PHB 含量下降到 47%^[20]。我们进一步将假单胞菌 SCH17 的 PHB 积累速度和含量与一些尚在研究阶段的细菌进行了比较,情况如下。以快速积累为特色的 PHB 合成菌中,棕色固氮菌 *Azotobacter vinelandii* ATCC53799 的研究最为集中,其 PHB 积累时间最短只需 24 h,最高产率达到 85%^[21]。我国崔志芳等分离的球衣菌 *Sphaerotilus* sp. AE13 菌株发酵周期也只需 24 h,但 PHB 含量仅占细胞干重的 14%^[6]。可见,假单胞菌 SCH17 的 PHB 积累速度明显比它们

快。此外,近几年我国学者新分离的积累 PHB 菌包括:许旭萍等分离的 *Sphaerotilus natans* FQ40 发酵 42 h 后 PHB 含量占细胞干重的 48%^[8];周琴等分离的巨大芽孢杆菌 Bm-10 发酵 40 h 后 PHB 含量占细胞干重的 33.6%^[22];徐爱玲等报道隐藏嗜酸菌 *Acidiphilium cryptum* DX1-1 经过诱变改良,发酵时间从 120 h 缩短为 80 h^[23]。综上所述,虽然假单胞菌 SCH17 的生物量低、总的 PHB 产量并不高,但是我们依然认为菌株 SCH17 是一株极具潜力的 PHB 生产菌株。在下一步的工作中,可以结合诱变和发酵优化等技术手段,进一步提高假单胞菌 SCH17 的发酵密度,提高 PHB 产量。

3 讨论

从土壤样品中分离的菌株 SCH17 经过 16S rRNA 基因序列分析,初步鉴定为假单胞菌 SCH17。假单胞菌 SCH17 可以利用多种碳源和氮源快速地积累 PHB。在使用最佳碳源果糖和最佳氮源蛋白胨的条件下,仅需发酵 14 h,PHB 含量就可以达到最大 (2.69 g/L),而且 PHB 含量高达细胞干重的 76%。因此,该菌株在 PHB 生产方面具有很高的应用价值。

参考文献

- [1] Holmes PA. Applications of PHB: a microbially produced biodegradable thermoplastic[J]. *Physics in Technology*, 1985, 16(1): 32-36.
- [2] Hiramitsu M, Koyama N, Doi Y. Production of poly (3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) by *Alcaligenes latus*[J]. *Biotechnology Letters*, 1993, 15(9): 461-464.
- [3] Page WJ. Production of poly-β-hydroxybutyrate by *Azotobacter vinelandii* UWD in media containing sugars and complex nitrogen sources[J]. *Applied Microbiology Biotechnology*, 1992, 38: 117-121.
- [4] 岳文洁,刘春,张小凡. 沼泽红假单胞菌累积聚 β-羟基丁酸的研究[J]. *环境科学与技术*, 2007, 30(4): 26-28.
- [5] Kimura H, Yoshida Y, Doi Y. Production of poly (3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) by *Pseudomonas acidovorans*[J]. *Biotechnology Letters*, 1992, 14(6): 445-450.
- [6] 崔志芳,季爱云,李春露. 产聚 β-羟基丁酸酯菌株的筛选及发酵条件的优化[J]. *生物技术通报*, 2010(1):

- 103-106.
- [7] Suzuki T, Yamane T, Shimizu S. Mass production of poly- β -hydroxybutyric acid by fed-batch culture with controlled carbon/nitrogen feeding[J]. *Applied Microbiology Biotechnology*, 1986, 24: 370-374.
- [8] 许旭萍, 陈接锋, 李惠珍. *Sphaerotilus natans* FQ40 合成聚 β -羟基丁酸(PHB)条件的研究[J]. *食品与发酵工业*, 2004, 30(9): 23-26.
- [9] 黄悦, 张子平, 程波. HOG1 基因对白念珠菌超微结构的影响[J]. *中国真菌学杂志*, 2010, 5(1): 13-16.
- [10] Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*[M]. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 2001: 78-79.
- [11] Griebel R, Smith Z, Merrick JM. Metabolism of Poly (β -hydroxybutyrate). I. Purification, composition, and properties of native poly (β -hydroxybutyrate) granules from *Bacillus megaterium*[J]. *Biochemistry*, 1968, 7(10): 3676-3681.
- [12] Barnard GN, Sanders JKM. The poly- β -hydroxybutyrate granule *in vivo*. A new insight based on NMR spectroscopy of whole cells[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1989, 264(6): 3286-3291.
- [13] Jacob GS, Garbow JR, Schaefer J. Direct measurement of poly (β -hydroxybutyrate) in a *Pseudomonas* by solid-state ^{13}C NMR[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1986, 261(36): 16785-16787.
- [14] 戈进杰. 生物降解高分子材料及其应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2002: 112.
- [15] 苏涛. 真养产碱杆菌 *Alcaligenes eutrophus* 从不同碳源合成可降解塑料: 发酵过程及产物种类确定[J]. *工业微生物*, 1995, 25(3): 38-42.
- [16] Heinze E, Lafferty RM. A kinetic model for growth and synthesis of poly- β -hydroxybutyric acid (PHB) in *Alcaligenes eutrophus* H16[J]. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 1980, 11(1): 8-16.
- [17] Ishizaki A, Tanaka K. Production of poly- β -hydroxybutyric acid from carbon dioxide by *Alcaligenes eutrophus* ATCC 17697^T[J]. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 1991, 71(4): 254-257.
- [18] 堵国成, 陈坚, 尹洪波, 等. 真养产碱杆菌生产聚 β -羟基丁酸的流加发酵条件研究[J]. *应用与环境生物学报*, 1997, 3(4): 371-374.
- [19] 陈琦, 易祖华, 黄和容. 利用葡萄糖发酵产聚 β -羟基丁酸菌株的选育[J]. *微生物学通报*, 1994, 21(6): 333-335.
- [20] 于平, 励建荣. 真养产碱杆菌发酵生产 PHB 的培养条件优化[J]. *中国食品学报*, 2007, 7(1): 59-63.
- [21] Chen GQ, Page WJ. Production of poly- β -hydroxybutyrate by *Azotobacter vinelandii* in a two-stage fermentation process[J]. *Biotechnology Techniques*, 1997, 11(5): 347-350.
- [22] 周琴, 蒋冬花, 杨叶, 等. 合成聚- β -羟基丁酸芽孢杆菌的筛选、鉴定及碳氮源优化[J]. *浙江师范大学学报: 自然科学版*, 2010, 33(2): 203-209.
- [23] 徐爱玲, 张帅, 张燕飞, 等. 积累 PHB 菌种隐藏嗜酸菌 DX1-1 的诱变改良[J]. *微生物学通报*, 2008, 35(10): 1516-1521.

编辑部公告

《微生物学通报》英文刊名

《微生物学通报》之前使用的英文刊名“Microbiology”因在国际上有重名,造成了本刊在被国内外作者引用以及国外数据库收录时英文刊名的混乱,这大大影响了本刊在国际上的传播,也不利于对我刊引用数据的统计。经本届编委会讨论,以及主办单位批准,本刊英文刊名自2010年起变更为“Microbiology China”,请各位作者、读者和数据库引用时注意使用。