

研究报告

紫外线和硫酸二乙酯复合诱变选育 PHB 高产菌株

刘俊梅^{1*} 王庆¹ 王丹² 杨盼盼¹ 丁伟¹ 朴春红¹ 王玉华¹ 于寒松¹

(1. 吉林农业大学食品科学与工程学院 吉林 长春 130118)

(2. 吉林医药学院 吉林 吉林 132013)

摘要:【目的】获得高产聚β-羟基丁酸酯(Poly-β-hydroxybutyricacid, PHB)菌株。【方法】以假单胞菌属 *Pseudomonas koreensis* PK3 菌株为出发菌株,采用硫酸二乙酯和紫外线相结合的诱变方法进行多轮诱变。【结果】经过初筛和复筛得到一株高产 PHB 突变菌株,命名为 *Pseudomonas koreensis* UVCN-18。连续传代9次后,发酵28 h条件下,PHB产量达到15.94 g/L,占细胞干重69.54%,较原出发菌株 *Pseudomonas koreensis* PK3 (4.42 g/L)提高了2.61倍,并且该菌株具有良好的遗传稳定性。【结论】采用硫酸二乙酯和紫外线相结合的诱变方法,成功获得了一株高产 PHB 突变菌株。

关键词: 紫外线, 硫酸二乙酯, PHB

Mutagenesis of poly-β-hydroxybutyricacid producing strain by UV and diethyl sulfate

LIU Jun-Mei^{1*} WANG Qing¹ WANG Dan² YANG Pan-Pan¹ DING Wei¹
PIAO Chun-Hong¹ WANG Yu-Hua¹ YU Han-Song¹

(1. College of Food Science and Engineering, Jilin Agricultural University, Changchun, Jilin 130118, China)

(2. Jilin Medical College, Jilin, Jilin 132013, China)

Abstract: [Objective] We aim to get a high-yield poly-β-hydroxybutyricacid (PHB) mutant strain. [Methods] We use composite multiple rounds of mutagenesis breeding of UV and diethyl sulfate and after primary and secondary screening from the original strain *Pseudomonas koreensis* PK3. [Results] It's named *Pseudomonas koreensis* UVCN-18. After serially passed 9 times and fermentation 28 h, PHB production of the mutant was 15.94 g/L, Accounting for cell dry weight 69.54%. PHB production of the mutant was increased by 2.61 times compared with the original strain *Pseudomonas koreensis* PK3 (4.42 g/L), and the strain has a good genetic stability. [Conclusion] We use composite multiple rounds of mutagenesis breeding of UV and diethyl sulfate to get a high-yield PHB mutant strain.

Keywords: UV, Diethyl sulfate, PHB

Foundation item: Jilin Province Major Research and Technological Support Special Projects (No. 20116034)

*Corresponding author: E-mail: spring430817@163.com

Received: November 09, 2015; Accepted: March 14, 2016; Published online (www.cnki.net): March 18, 2016
基金项目: 吉林省科技支撑重大攻关专项项目(No. 20116034)

*通讯作者: E-mail: spring430817@163.com

收稿日期: 2015-11-09; 接受日期: 2016-03-14; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2016-03-18

聚 β -羟基丁酸酯(Poly- β -hydroxybutyric acid, PHB)是一种生物可降解材料,由多种微生物在碳氮比失衡的条件下作为自身的能源物质时所积累^[1-2]。由于 PHB 具有相对较低的溶解性和相对较大的摩尔质量,因此可以在细菌胞内大量存储而不影响胞内外的渗透压^[3]。PHB 与传统的聚丙烯塑料有相似的材料学性质,还具有生物相容性和生物降解性等独特性质,在工业、农业、食品和环保等领域具有十分广阔的应用前景^[4-6]。目前 PHB 的生产方法主要采用微生物合成法,但其出发菌株产率较低,生产成本较高,是当前 PHB 生产和应用的瓶颈问题。硫酸二乙酯(DES)是一种诱变谱较为广泛的烷化剂,能与 DNA 中碱基的磷酸部分发生烷化作用,从而引起 DNA 复制时碱基错误配对而引起的突变^[7]。紫外诱变是微生物育种中最常用和最有效的诱变方法之一^[8],核酸在波长 254 nm 处有最大吸收峰,而紫外诱变时常采用的波长为 200–300 nm,这样阻碍碱基间的正常配对,从而有可能引起基因突变。目前采用紫外线和硫酸二乙酯复合诱变的方法获取高产 PHB 菌种还未见报道。本试验以实验室前期筛选获得的 *Pseudomonas koreensis* PK3 菌株为出发菌株,采用紫外线和硫酸二乙酯相结合的复合诱变方法进行多轮诱变,以期获得一株 PHB 产量高和遗传稳定好的突变菌株。

1 材料与方法

1.1 菌种

出发菌株:假单胞菌属 *Pseudomonas koreensis* PK3^[9]菌株由实验室前期筛选所获得,以下称为 PK3。

1.2 培养基

种子培养基^[10]和发酵培养基^[11]均来自相关文献。

筛选固体培养基(g/L):发酵培养基+2%琼脂粉+尼罗蓝,培养基中尼罗蓝的终浓度为 50 mg/L。

1.3 主要试剂

PHB 标准品购自 Sigma-Aldrich 公司;尼罗蓝购自上海生物科技有限公司。

1.4 菌体生长曲线的测定

将菌株接种于种子培养基上,32 °C 恒温摇床中 150 r/min 培养 24 h,然后按 5%接种于液体种子培养基培养,培养 18 h,每隔 2 h 用紫外分光光度法测定波长为 620 nm 下的 OD 值,计算菌株生长情况。

1.5 菌悬液的制备

将菌种活化后,接种于装有 100 mL 种子培养基的 250 mL 三角瓶中,于 32 °C、150 r/min 培养 8 h 后,吸取 5 mL 培养液,加入装有 45 mL 生理盐水和玻璃珠的三角瓶振荡 20 min,使菌体得到充分搅拌。采用血球计数板检测菌体浓度,使其为 10^7 – 10^8 个/mL。

1.6 紫外诱变育种

将稀释好的菌液各取 10 mL 放入 10 个无菌培养皿中,依次放置于距 15 W 紫外灯 30 cm 照射,时间分别为 0、10、20、30、40、50、60、70 和 80 s (做 3 组平行样)。在暗光环境下,分别取经紫外线诱变的菌悬液 0.2 mL 涂布于 10 个含有尼罗蓝的固体平板培养基上,倒置于 32 °C 恒温培养箱中避光培养 48 h。培养好的菌种在紫外透射仪下观察菌落情况,计算致死率。通过致死率选取合适的诱变时间的菌悬液,涂布在有尼罗蓝的固体培养基上,挑取具有荧光且菌落较大的菌株 20 个,用试管斜面培养保存,同时取对应的菌株接入含 100 mL 发酵培养基的 250 mL 摇瓶中,置于 32 °C、150 r/min 培养 28 h 后,测定 PHB 产量和 PHB 所占细胞干重的量。

1.7 硫酸乙酯(DES)诱变

以紫外线诱变所得产 PHB 高的菌株作为出发菌株,进行硫酸二乙酯诱变。取 5 mL 菌悬液 20 份,与浓度为 2%的 DES 溶液 5 mL 混合,在 32 °C 振荡处理,分别振荡处理 0、10、20、30、40、50、60、70 和 80 min,最后加入 1 mL 25%硫代硫酸钠溶液中止反应。将诱变处理的菌液稀释到 10^{-5} ,以未经化学诱变处理的出发菌为对照,在 32 °C 恒温培养箱中培养 48 h。将培养好的平板取出,菌落计数,计算致死率。挑取具有荧光且菌落较大的菌株 20 个,用试管斜面培养保存,同时取对应的菌株接入含 100 mL 培养基的 250 mL 摇瓶中,置于 32 °C、

150 r/min 培养 28 h 后,测定 PHB 产量和 PHB 所占细胞干重的量。

1.8 致死率计算

诱变菌株致死率(%)=(未诱变平板菌落数-诱变后平板菌落数)/未诱变平板菌落数×100。

1.9 遗传突变菌株稳定性试验

将经过紫外线和 DES 复合诱变筛选出的 PHB 产量最高的菌株连续 9 代传代培养后,测定 PHB 产量和 PHB 所占细胞干重的量。

1.10 PHB 的测定

通过超声破碎机对细胞破碎处理,条件为:功率 600 W,工作时间 5 s,间隔时间 5 s,连续 20 次。然后在 8 000×g 条件下离心 10 min,去上清,烘干菌体,取 10 mg 干菌体,加入 5 mL 氯仿溶液,60 °C 水浴 1 h,获得含 PHB 的抽提溶液。然后吸取 0.5 mL 的抽提溶液于试管中,80 °C 水浴加热除去氯仿,然后加入 10 mL 浓硫酸,密封试管后置于 100 °C 水浴加热 10 min,冷却至室温,采用紫外分光光度计在 235 nm 处测定溶液的 OD 值。

1.11 胞内产物定性分析

分别称取 10 mg 菌粉、PHB 标品于两个试管中,向每个试管中加入 1 mL 氯仿和 1 mL 酸化甲醇(含 3%浓硫酸,体积比),密封试管,放置于 100 °C 水浴中加热 4 h,然后冷却至室温,加入 1 mL 蒸馏水充分振荡后,转移到 5 mL 离心管中,5 000 r/min 离心 5 min,下层即为溶有胞内产物的氯仿相,进行气相色谱分析。气相色谱条件:3.5% PEGA,柱长为 2 m,以氮气作为载体,流速为 40 mL/min,进样器温度为 200 °C, FID 检测器温度为 250 °C,柱温 80 °C 维持 2 min,然后以 20 °C/min 升高至 195 °C,维持 3 min。

2 结果与分析

2.1 菌体生长曲线的绘制

取 2 环新鲜活化斜面菌种 *Pseudomonas koreensis* PK3 接种到种子培养基中,在培养温度 32 °C 条件下,180 r/min 振荡培养 16–18 h,然后接菌量 5%移入新鲜发酵培养基中培养,每隔 2 h 用紫

外分光光度法测波长为 620 nm 下的 OD 值,绘出菌体的生长曲线,如图 1 所示。

选用对数生长中后期的细菌细胞进行诱变处理,此时的细胞不但菌浓合适、生理状态同步,而且绝大多数细胞对理化因素敏感,有利于诱变的作用。由图 1 可看出, *Pseudomonas koreensis* PK3 在培养 2 h 后开始进入对数生长期,在培养 12 h 后达到对数生长末期,因此选取培养 10 h 的菌体来进行诱变处理。

2.2 诱变条件的选择

2.2.1 紫外诱变:测定紫外线的不同照射时间对出发菌株致死率的影响,结果如图 2 所示。

根据图 2 所示结果可以看出,出发菌株对紫外线比较敏感,致死率与紫外线照射时间呈正相关。用诱变剂处理菌株后,只有当致死率达到 70%左右时得到的突变株才能满足诱变筛选的条件^[12]。本研究中,对菌种 PK3 紫外线照射时间为 60 s 时,致死率为 75%。所以,将紫外诱变 60 s 的菌悬液涂布在含有尼罗蓝固体培养基上,在 32 °C 条件下培养 48 h。由于在筛选培养基中添加尼罗蓝染料,当细菌生长时,尼罗蓝能

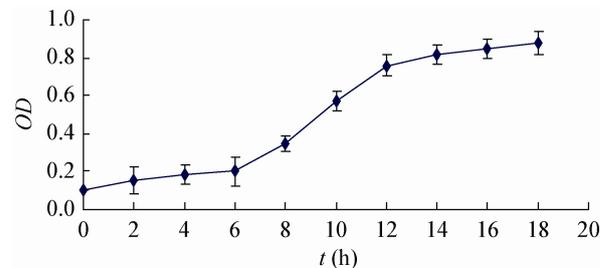


图 1 生长曲线

Figure 1 Growth curve

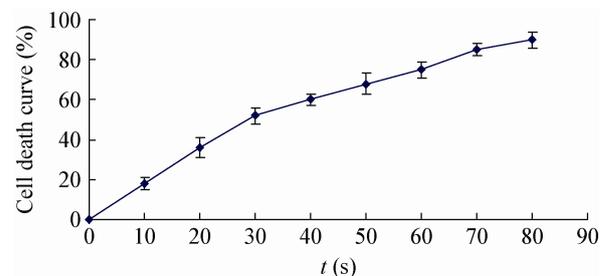


图 2 紫外致死曲线

Figure 2 UV lethal curve

透过细胞壁进入细胞体内,并能特异性地与胞内的 PHB 结合,在 365 nm 紫外灯照射下产生橙红色荧光。因此,通过在含有尼罗蓝的固体培养基中上挑选菌落较大、橙红色荧光较强的菌落,作为诱变后正向突变的菌株。本研究中挑取具有荧光且菌落较大的菌株 20 个,接入含 100 mL 发酵培养基的摇瓶中,置于 32 °C、150 r/min 培养 28 h 后,测定 PHB 产量和 PHB 所占细胞干重的量。见表 1。

从表 1 可以看出,紫外诱变对菌种诱变效果较好,诱变所得到的 20 个菌株与出发菌株相比,PHB 产量和 PHB 所占细胞的干重都明显提高。其中 UV-14 的 PHB 产量达到 13.75 g/L,PHB 所占细胞的干重达到 65.41%。所以,选择 UV-14 作为 DES 诱变的出发菌株。

2.2.2 DES 诱变: 实验采用终浓度为 1% (体积比) 的 DES 于 37 °C 进行诱变处理,DES 诱变时间与致死率的关系如图 3 所示。

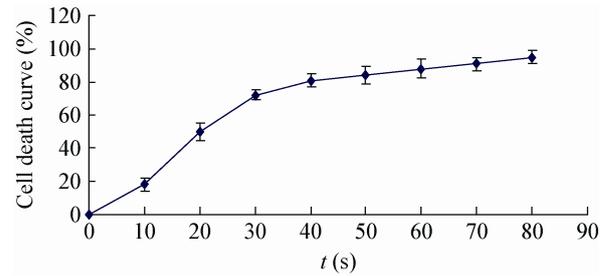


图 3 DES 致死曲线

Figure 3 DES lethal curve

从图 3 可以看出,用 DES 诱变 30 min 时细胞致死率为 72%。所以选择诱变 3.0 min 的菌悬液涂布在含有尼罗蓝的固体培养基上,在 32 °C 条件下培养 48 h,挑取具有荧光且菌落较大的菌株 20 个,接入液体培养基中,置于 32 °C、150 r/min 培养 28 h 后,测定 PHB 产量和 PHB 所占细胞干重的量。结果如表 2 所示。

从表 2 中可以看出,经 DES 诱变后的菌株 PHB

表 1 紫外诱变后 PHB 产量和 PHB 占细胞干重

Table 1 PHB yield and PHB accounted dry cell weight after UV mutagenesis

菌株 Strains	PHB 所占细胞的干重 PHB accounted DCW (%)	PHB 产量 PHB yield (g/L)	菌株 Strains	PHB 所占细胞的干重 PHB accounted DCW (%)	PHB 产量 PHB yield (g/L)
PK3	24.60±0.12	4.42±0.11	UV-11	63.42±0.12	11.51±0.14
UV-1	63.03±0.11	11.30±0.12	UV-12	64.63±0.11	12.87±0.12
UV-2	63.50±0.13	11.56±0.11	UV-13	62.89±0.14	11.26±0.11
UV-3	64.02±0.14	12.08±0.15	UV-14	65.41±0.15	13.75±0.13
UV-4	61.66±0.15	10.06±0.11	UV-15	64.33±0.13	12.54±0.09
UV-5	62.59±0.12	11.03±0.12	UV-16	61.78±0.12	10.50±0.12
UV-6	63.89±0.13	11.72±0.13	UV-17	61.99±0.09	10.65±0.11
UV-7	63.69±0.14	11.55±0.08	UV-18	63.72±0.11	11.64±0.12
UV-8	62.06±0.06	10.85±0.12	UV-19	64.06±0.12	12.01±0.13
UV-9	62.14±0.13	10.88±0.12	UV-20	62.77±0.13	11.23±0.11
UV-10	63.98±0.11	11.91±0.14			

注:菌株培养在发酵培养基中,置于 32 °C、150 r/min 培养 28 h 后,测定 PHB 产量和 PHB 所占细胞干重的量,每组数据测定 3 次,取平均值。

Note: After the strain was cultured in a fermentation medium, placed in 32 °C, 150 r/min shaking culture 28 h, measured PHB and PHB yield percentage of the amount of cell dry weight. Each set of data was measured three times and used the average.

表2 DES 诱变后 PHB 产量和 PHB 占细胞干重
Table 2 PHB yield and PHB accounted dry cell weight after DES mutagenesis

菌株 Strains	PHB 所占细胞的干重 PHB accounted DCW (%)	PHB 产量 PHB yield (g/L)	菌株 Strains	PHB 所占细胞的干重 PHB accounted DCW (%)	PHB 产量 PHB yield (g/L)
UV-14	65.41±0.11	13.75±0.12	UVCN-11	69.42±0.11	15.98±0.11
UVCN-1	67.03±0.12	14.88±0.12	UVCN-12	68.63±0.12	15.65±0.13
UVCN-2	67.50±0.12	14.97±0.13	UVCN-13	67.89±0.13	15.32±0.14
UVCN-3	68.02±0.14	15.21±0.15	UVCN-14	67.41±0.08	15.02±0.12
UVCN-4	66.66±0.12	14.06±0.11	UVCN-15	68.33±0.14	15.34±0.09
UVCN-5	68.72±0.13	15.88±0.11	UVCN-16	67.78±0.12	15.15±0.12
UVCN-6	66.89±0.13	14.21±0.13	UVCN-17	66.99±0.12	14.95±0.11
UVCN-7	67.69±0.12	15.11±0.08	UVCN-18	69.59±0.12	16.03±0.12
UVCN-8	66.06±0.08	14.01±0.12	UVCN-19	69.06±0.12	15.91±0.13
UVCN-9	66.14±0.11	14.13±0.12	UVCN-20	68.48±0.14	15.40±0.12
UVCN-10	68.98±0.12	15.71±0.16			

注：菌株培养在发酵培养基中，置于 32 °C、150 r/min 摇床培养 28 h 后，测定 PHB 产量和 PHB 所占细胞干重的量，每组数据测定 3 次，取平均值。

Note: After the strain was cultured in a fermentation medium, placed in 32 °C, 150 r/min shaking culture 28 h, measured PHB and PHB yield percentage of the amount of cell dry weight. Each set of data was measured three times and used the average.

产量和 PHB 所占细胞干重都明显提高。其中 UVCN-18 的 PHB 产量可达到 16.03 g/L，PHB 占细胞干重达 69.59%。

2.3 菌种遗传稳定性及稳产试验

将菌株 UVCN-18 在种子培养基固体斜面上连续转接 9 次，测定其遗传标记与 PHB 产量情况，结果见表 3。

从表 3 中可以看出，UVCN-18 的遗传稳定，连续传代 9 次后的 PHB 产量和 PHB 所占细胞干重分别为 15.94 g/L 和 69.54%。对菌种 PK3 采用紫外诱变法和硫酸二乙酯复合诱变，并没有影响菌种正常生理生长，可能产生突变的 PHB 合成关键酶的相关基因遗传稳定，所以诱变后的菌种 PHB 的产量没有下降。

2.4 产物鉴定结果

采用气相色谱法对菌种 UVCN-18 的胞内产物进行定性分析，PHB 标品结果如图 4 所示，样品结果如图 5 所示。

通过气相色谱图可以看出，通过氯仿抽提获得的胞内产物和 PHB 标准品的校正保留时间均为 1.854，完全一致，应为同一物质，所以确定 UVCN-18 菌种能积累 PHB。

表3 菌种连续传代 9 次的 PHB 产量和 PHB 占细胞干重
Table 3 Strains serially passaged 9 times PHB yield and PHB accounted dry cell weight

传代数 The number of generations	PHB 占细胞干重 PHB accounted DCW (%)	PHB 产量 PHB yield (g/L)
1	69.60±0.12	16.06±0.14
2	69.58±0.08	16.01±0.12
3	69.57±0.12	15.97±0.11
4	69.51±0.11	15.89±0.12
5	69.52±0.14	15.91±0.12
6	69.55±0.12	15.93±0.09
7	69.52±0.13	15.91±0.14
8	69.52±0.12	15.91±0.13
9	69.48±0.12	15.89±0.11
平均 Average	69.54±0.14	15.94±0.15

注：通过固体培养基连续传代 9 次，每次传代后接入液体发酵培养基中，置于 32 °C、150 r/min 摇床培养 28 h 后，测定 PHB 产量和 PHB 所占细胞干重的量，每组数据测定 3 次，取平均值。

Note: Through solid medium serially passaged 9 times, then access liquid fermentation medium, placed in 32 °C, 150 r/min shaking culture 28 h to measure PHB and PHB yield percentage of the amount of cell dry weight. Each set of data was measured three times and used the average.

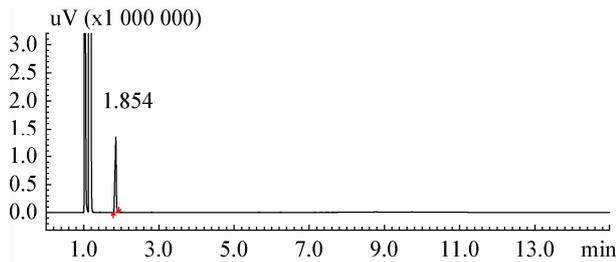


图4 PHB 标品气相色谱图

Figure 4 GC spectrum of PHB standard

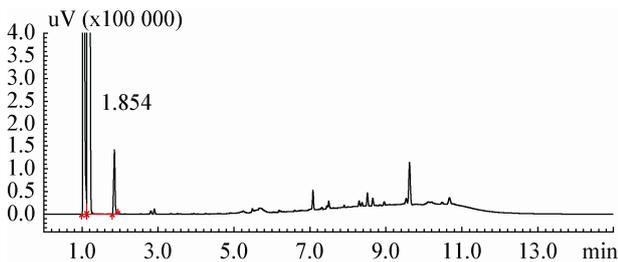


图5 样品气相色谱图

Figure 5 GC spectrum of samples

3 讨论

本研究采用紫外线和硫酸二乙酯复合诱变选育 PHB 高产菌株,从研究结果来看,紫外线和 DES 对该菌种的致死率较高。当用紫外照射 60 s 时,对菌种的致死率就达到 75%;DES 诱变 30 min 时,对菌种的致死率达到 72%。最终获得的突变体 UVCN-18 连续转接 9 次后,平均可积累 PHB 产量达 15.94 g/L,占细胞干重 69.54%,较原出发菌株 *Pseudomonas koreensis* PK3 (4.42 g/L)提高了 2.61 倍。在近几年的报道中可以看出,对于从野外筛选获得的产 PHB 菌株,直接用于发酵生产 PHB,所获得的 PHB 产量相对较少。在 2013 年,董静^[13]在土壤中筛选获得的甲烷氧化混合菌,在供氧条件下,培养基丰富的条件下培养 5 d,然后饥饿培养 15 d,PHB 含量可以达到细胞干重的 35.5%。在 2014 年, Han 等^[14]从绿藻中分离出一株产 PHB 的菌株 UMI-21,在以淀粉为碳源时合成 PHB 可达细胞干质量的 45.5%。以前也有人采用转基因植物来合成 PHB, John 等^[15]将产 PHB 的关键基因与棉花纤维

特异启动子相连构建了表达载体,导入棉花植物中,在纤维成熟时积累 PHB 水平为 30–3 440 $\mu\text{g/g}$ 干纤维。但当 PHB 积累时会抑制植物生长,所以目前转基因合成 PHB 依然没有大规模应用。也有人利用活性污泥来合成 PHB,但由于活性污泥环境中杂菌较多,导致合成的 PHB 纯度低,所以对 PHB 的分离提纯很困难。采用诱变的方法选育高产 PHB 菌株,不仅成本低、操作简单,而且所选育的菌种 PHB 产量高、遗传稳定。

近年来,采用紫外线和硫酸二乙酯复合对菌种诱变的报道较多,在 2012 年,罗跃中等^[16]曾经利用紫外线与硫酸二乙酯复合诱变,选育出一株遗传稳定的高效油脂降解菌株,其脂肪酶活性为 14.85 U/mL,比出发菌株提高了 15.2%;在 2012 年,张卫兵等^[17]利用紫外线与硫酸二乙酯复合诱变,筛选获得一株凝乳活力较高且水解活力较低的突变株 DES-6,其凝乳活力为 184.65 SU/mL,比原菌株增加了 15.41%,水解活力为 23.35 U/mL,比原菌株降低了 64.80%。可见紫外线和硫酸二乙酯复合对菌种诱变效果显著,其主要原因在于这两种诱变方式均能使细胞中的遗传物质 DNA 发生突变,硫酸二乙酯是一种诱变谱较为广泛的烷化剂,能与 DNA 中碱基的磷酸部分发生烷化作用,从而引起 DNA 复制时碱基错误配对而引起的突变。在产 PHB 的菌种中,PHB 聚合酶是 PHB 合成过程中的关键酶。DES 可能导致编码 PHB 聚合酶的基因 *phbC* 发生突变,影响了 PHB 聚合酶的活性中心位置,使其酶活性提高,加快了对 PHB 合成所需的前体物质 (R)-3-羟基丁酰辅酶 A 的聚合速度,进而提高了胞内的 PHB 积累量。对于确定诱变处理合成 PHB 相关基因的影响,还需通过分子生物学手段进一步探讨。

4 结论

(1) 通过气相色谱检测,诱变后的菌株依然能够在胞内积累 PHB。并且采用紫外诱变法和硫酸二乙酯复合诱变出发菌株 *Pseudomonas koreensis*

PK3, 筛选获得 PHB 产量较高且遗传稳定性好的菌株 *Pseudomonas koreensis* UVCN-18, UVCN-18 的 PHB 产量可达到 16.03 g/L, PHB 占细胞干重达 69.59%。

(2) 将菌株 *Pseudomonas koreensis* UVCN-18 连续转接 9 次后, 经摇瓶培养, 在转速 180 r/min、初始 pH 7.6、接种量 5%, 温度为 32 °C, 发酵 28 h 条件下, 平均可积累 PHB 产量达 15.94 g/L, 占细胞干重 69.54%。较原出发菌株 *Pseudomonas koreensis* PK3 (4.42 g/L) 提高了 2.61 倍。该突变菌株具有良好的遗传稳定性。

参 考 文 献

- [1] Chen DJ, Xu D, Li MS, et al. Proteomic analysis of bacillus thuringiensis Δ phaC mutant BMB171/PHB(-1) reveals that the PHB synthetic pathway warrants normal carbon metabolism[J]. Journal of Proteomics, 2012, 75(17): 5176-5188
- [2] Xue F, Liu Y, Hong CL, et al. Pathway analysis of the leptospiral polyhydroxybutyrate (PHB) synthesis[J]. Microbiology China, 2013, 40(11): 2047-2056 (in Chinese)
薛峰, 刘媛, 洪彩玲, 等. 钩端螺旋体聚 β -羟基丁酸(PHB) 生物合成途径分析[J]. 微生物学通报, 2013, 40(11): 2047-2056
- [3] Wang HF, Hao XH, Li K. The Research progress of biodegradable material poly- β -hydroxybutyrate[J]. Packaging Journal, 2013, 5(2): 5-9 (in Chinese)
王会芬, 郝喜海, 李奎. 生物降解材料聚 β -羟基丁酸酯的研究进展[J]. 包装学报, 2013, 5(2): 5-9
- [4] Qian YY, Zhao M, Pan JB, et al. Research progress of a new kind of biodegradable plastics poly- β -hydroxybutyrate (PHB)[J]. Heilongjiang Medicine Journal, 2010, 23(6): 895-898 (in Chinese)
钱永雨, 赵敏, 潘俊波, 等. 新型可降解塑料聚- β -羟基丁酸(PHB)的研究进展[J]. 黑龙江医药, 2010, 23(6): 895-898
- [5] Liu ZG, Wang YP, He N, et al. Optimization of polyhydroxybutyrate (PHB) production by excess activated sludge and microbial community analysis[J]. Journal of Hazardous Materials, 2011, 185(1): 8-16
- [6] Hiroe A, Ushimaru K, Tsuge T. Characterization of polyhydroxyalkanoate (PHA) synthase derived from *Delftia acidovorans* DS-17 and the influence of PHA production in *Escherichia coli*[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2013, 115(6): 633-638
- [7] Liu B. Complex mutagenesis of keratinose degrading strain with ultraviolet ray and diethyl sulfate[D]. Nanjing: Master's Thesis of Nanjing Agricultural University, 2012 (in Chinese)
刘宝. 角蛋白降解菌的紫外线和硫酸二乙酯复合诱变[D]. 南京: 南京农业大学硕士学位论文, 2012
- [8] Li XY, Wang G, Fei ZQ, et al. Screening of high amylase-producing strains by mutagenesis with ultraviolet ray and nitrosoguanidine[J]. Chinese Journal of Biologicals, 2012, 25(11): 1543-1546, 1549 (in Chinese)
李旭媛, 王刚, 费卓群, 等. 紫外-亚硝基胍复合诱变筛选高产淀粉酶菌株[J]. 中国生物制品学杂志, 2012, 25(11): 1543-1546, 1549
- [9] Liu JM, Wang L, Li ZW, et al. Screening and 16SrDNA identification about poly- β -hydroxybutyrate production strain[J]. Cereals and Oils Processing (Electronic Version), 2014(4): 71-75 (in Chinese)
刘俊梅, 王璐, 李琢伟, 等. 产聚 β -羟基丁酸酯(PHB)菌种的筛选及 16SrDNA 鉴定[J]. 粮油加工: 电子版, 2014(4): 71-75
- [10] Wang W, Cheng FQ, Li LY. Hydroxy fatty acid polyester producing bacteria breeding[J]. Journal of Wuxi University of Light Industry, 1995, 15(4): 303-307 (in Chinese)
王武, 陈富强, 李礼尧. 羟基脂肪酸聚酯产生菌选育[J]. 无锡轻工大学学报, 1995, 15(4): 303-307
- [11] Li HS, Zhang CY, Zhang W, et al. Strain selection and fermentation conditions of production poly- β -hydroxybutyrate[J]. Petrochemical Industry Technology, 1997, 4(4): 212-215 (in Chinese)
郝和生, 张春元, 张伟, 等. 生产聚- β -羟基丁酸酯(PHB)的菌种选育及发酵条件[J]. 石化技术, 1997, 4(4): 212-215
- [12] Wen YJ, Feng GL, Yan D. Screening of high acidic protease-producing strains by combined mutagenesis by UV and DES[J]. Liquor-Making Science & Technology, 2011(5): 50-52 (in Chinese)
温拥军, 冯刚利, 鄢东. 紫外线与硫酸二乙酯复合诱变选育酸性蛋白酶高产菌株[J]. 酿酒科技, 2011(5): 50-52
- [13] Dong J. Biosynthesis of poly (β -hydroxybutyrate) by methane-utilizing mixed culture[D]. Harbin: Doctoral Dissertation of Harbin University of Commerce, 2013 (in Chinese)
董静. 利用甲烷氧化混合菌生物合成聚 β -羟基丁酸酯[D]. 哈尔滨: 哈尔滨商业大学博士学位论文, 2013
- [14] Han XR, Satoh Y, Kuriki Y, et al. Polyhydroxyalkanoate production by a novel bacterium *massilia* sp. UMI-21 isolated from seaweed, and molecular cloning of its polyhydroxyalkanoate synthase gene[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2014, 118(5): 154-159
- [15] John ME, Keller G. Metabolic pathway engineering in cotton: biosynthesis of polyhydroxybutyrate in fiber cells[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1996, 93(23): 12768-12773
- [16] Luo YZ, Lan LX, Wu YY. Ultraviolet and diethyl sulfate mutagenesis breeding efficient oil degrading strains[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2012, 40(2): 295-297 (in Chinese)
罗跃中, 兰立新, 吴永尧. 紫外线与硫酸二乙酯复合诱变选育高效油脂降解菌株[J]. 江苏农业科学, 2012, 40(2): 295-297
- [17] Zhang WB, Liang Q, Qiao HJ, et al. Study on mutation breeding of *Bacillus licheniformis* producing chymosin by ultra violet and diethyl sulfate[J]. Science and Technology of Food Industry, 2012, 33(5): 174-176, 184 (in Chinese)
张卫兵, 梁琪, 乔海军, 等. 紫外线和硫酸二乙酯诱变高产凝乳酶地衣芽孢杆菌的研究[J]. 食品工业科技, 2012, 33(5): 174-176, 184