

聚羟基脂肪酸酯细菌合成的生长环境依赖性*

吴 琼¹ 孙素琴² 余海虎³ 陈新滋³ 陈国强^{1**}

(¹ 北京清华大学生物科学与技术系 北京 100084)

(² 北京清华大学化学系 北京 100084)

(³ 香港理工大学手性技术开放实验室 香港)

摘 要 聚羟基脂肪酸酯(Polyhydroxyalkanoate, PHA)是一类由许多细菌合成的、结构多变的能量和碳源的储藏物质. 为了得到能合成新型 PHA 的菌种, 或得到能在便宜简单碳源上合成 PHA 的菌种, 以我们实验室开发的傅立叶红外(FT-IR)细胞无损检测技术和常规气相色谱(GC)法对全国各地的采集的不同样品中分离的菌种进行了筛选. 往往在不同的地理环境中, 筛选出的菌株所合成的 PHA 的单体组成不同, 有的以含四个或五个碳原子的短链单体 PHA(Short-chain-length PHA, scl PHA)为主, 有的以含六个到十六个碳原子的中长链单体 PHA(Medium-chain-length PHA, mcl PHA)为主. 在我们以六种底物为碳源培养的 371 株形态不一的菌株中, 有 40% 的菌可以合成 PHA, 而其中许多可以同时合成 PHB 与中长链 PHA 共混的聚合物. 本研究为进行 PHA 研究的高分子同行提供了寻找能合成 PHA 的微生物菌种的依据.

关键词 聚羟基脂肪酸酯(PHA), 聚羟基丁酸酯(PHB), 傅立叶红外(FT-IR)

聚羟基脂肪酸酯(Polyhydroxyalkanoate, PHA)是一类由细菌合成的能量和碳源的储藏物质^[1,2]. PHA 的分子通式如图 1 所示. PHA 可以被分成两类, 一类是含短链单体的 PHA(scl PHA), 指由含四到五个碳原子的 HA 单体合成的 PHA, 主要有 PHB 及其共聚物 PHBV(图 2a); 另一类是含中长链单体的 PHA(mcl PHA), 指由含六到十六个碳原子的 HA 单体合成的 PHA, 主要是羟基己酸(3-Hydroxyhexanoate 或 HHx)、羟基辛酸(3-Hydroxyoctanoate 或 HO)和羟基癸酸(3-Hydroxydecanoate 或 HD)的共聚物 PHOHHx, PHOD(图 2b)等^[1~12]. 不同的 PHA 都具有完全的生物降解性, 但因单体组成不同而有不同的降解速度^[13,14]. 而合成 PHA 的单体的结构与组成对 PHA 性能的影响是很大的, 而这一点对于 PHA 作为应用性的高分子材料是很重要的, 因为它直接与 PHA 的加工和应用领域有关.

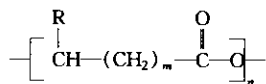


Fig. 1 General structure of polyhydroxyalkanoates
 $m = 1, 2, 3$, yet $m = 1$ is most common, n can range from 100 to several thousands. R is variable. When $m = 1$, $\text{R} = \text{CH}_3$, the monomer structure is 3-hydroxybutyrate, while $m = 1$ and $\text{R} = \text{C}_3\text{H}_7$, it is a 3-hydroxyhexanoate monomer.

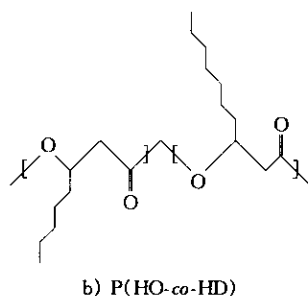
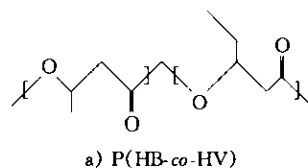


Fig. 2 Structure of two kinds of polyhydroxyalkanoates

PHA 具有生物可降解性和生物相容性, 其性能随单体结构和组成的变化而有很大的变化^[2]. 不同分子结构的 PHA 的生物合成依赖于微生物自身的酶系统与外界培养环境^[1~5], 而其中研究得最清楚的是聚羟基丁酸酯(PHB), PHB 具有较高的熔点($T_m = 178^\circ\text{C}$)和玻璃化温度, 其缺点是加工脆性大且在稍高熔点的温度会发生热降解^[1]. 这些不足被罗氏真养杆菌 *Ralstonia eutropha* (以前叫做真养产碱杆菌 *Alcaligenes*

eutrophus)生产的 3-羟基丁酸(HB)与 3-羟基戊酸(3-Hydroxyvalerate, HV)的共聚物 PHBV 部分克服, PHBV 共聚物有较好的机械加工性能^[1,6]. 在 80 年代已经由英国帝国化学工业公司 ICI(现名 Zeneca)以 BIOPOL 作商品名推出, 主要用于作为生物可降解的包装材料^[7,15].

如果以羟基己酸单体 HHx, 羟基辛酸单体 HO 或羟基癸酸单体 HD 来取代 PHBV 中的羟基戊酸 HV 单体, 则共聚物性能将得到更好的改善^[12,14~16], 以 HB 单体为主体的包括少量 HHx, HO 或 HD 单体的聚合物的性能与简单 PHB 聚合物的性能差别类似于高密度聚乙烯与低密度聚乙烯间的关系^[10].

我们利用本实验室开发的傅立叶红外光谱技术 FTIR 活体检测技术可以很方便快速地发现 PHA 合成菌, 并初步确定胞内合成的 PHA 单体是短链或中长链 HA^[16]. 这使我们可以在短时间内筛选大量的细菌, 发现合成 PHA 的菌株, 同时了解各种 PHA 高分子材料在自然界中的合成分布情况. 并在初步确定 PHA 后用气象色谱(GC)法测定摇瓶培养菌的 PHA 具体单体比例.

1 实验部分

1.1 样品采集

样品采自河北华北油田(HBA-HBS), 山东潍坊(WFA-WFD), 成都污水处理厂(CWA), 江苏盐城(YCA-YCB). 样品包括水样, 土样和油样. 将稀释后的菌悬液涂在分离培养基上分离出单菌落.

1.2 初筛

将细菌在不同的底物培养基上划线培养(温度 37℃)培养后挑取少量菌苔在盐片上作 FT-IR 检测(Perkin Elmer 2000 FT-IR 红外光谱仪), DTGS 检测器, 使用光束聚焦器. 通过观察 1735cm⁻¹附近的羰基谱带定性检出 PHA, 选出具有较高 PHA 含量的菌进行研究.

筛选培养基 无机盐(g/L), Na₂HPO₄ 3.8, KH₂PO₄ 2.65, (NH₄)₂SO₄ 0.5, MgSO₄ 0.2, 微量元素 1mL(g: CuSO₄·6H₂O 0.155, ZnSO₄·7H₂O 0.153, CoCl₂·6H₂O 0.220, MnCl₂·4H₂O 0.0589, CaCl₂ 7.80, FeCl₃·6H₂O 20, 溶于 0.1mol/L HCl 1L 中). 碳源(g/L): 丁酸 2, 辛酸钠 2, 月桂酸 2,

葡萄糖 5, 糖蜜 30. 加入不同碳源制成培养基(但废糖蜜为碳源时直接加自来水配成).

1.3 复筛

将选出的菌株利用更广泛的碳源进行摇瓶培养后做气相色谱分析(SQ-204 气相色谱仪, 北京分析仪器厂)约 50mg 干细胞加 2mL 氯仿, 2mL 酸化甲醇(含 3% H₂SO₄)于旋塞试管中, 100℃, 酯化 4h 冷却, 加入 1mL 蒸馏水, 剧烈振荡 2min, 分层, Chromosome 101-PEG 包裹填充柱, 柱温 170℃, 检测器温度 250℃ 载气 N₂ 0.2MPa, 使用氢焰检测器及 CDP-4s 记录仪(上海记录仪厂).

2 结果与讨论

在我们分离筛选的大量菌种中, 其中有 371 株是通过 BP(牛肉膏蛋白胨)培养基分离出来的. 以辛酸钠、月桂酸、葡萄糖、糖蜜、丁酸, 牛肉膏蛋白胨为底物进行初筛. 初筛使用的是本实验室开发的傅立叶红外光谱 FT-IR 无损检测技术. 复筛则对初筛证明有较多的 PHA 含量的细菌用摇瓶培养之后用气相色谱(GC)和核磁共振(NMR)检测其 PHA 的含量的和共混、共聚情况. 通过筛选, 我们不仅已经得到了一些可以在便宜简单碳源上合成中长链 PHA 而具生产前景的菌株, 也总结出了一些 PHA 合成菌的规律.

表 1 为一部分菌在 6 种底物中的生长情况和用 FTIR 活体检测 PHA 积累情况得到的结果, 表中的 '—, +, —, +, ++, +++, +++++' 用来半定量表示 PHA 在细胞中的积累量, 是根据 PHA 的红外谱图中的羰基峰的大小来决定的. 而其中的数字表示羰基峰的峰位, 一般在 1740cm⁻¹ 以上时, 细胞中主要是中长链 PHA(mcl PHA); 在 1730~1740cm⁻¹ 时, 细胞内 PHA 往往同时有中长链和短链 PHA, 而峰位在 1730cm⁻¹ 以下时, 则一般可确定为 PHB^[13].

从表 1 中可以看出, 从不同地区采集的样品中 PHA 合成菌的存在都是很普遍的. 而且许多微生物中 PHA 的含量是很高的(气相色谱结果, 本文无显示). 我们认为其中不少菌株的 PHA 的积累是组成性的, 而不是需要外界一定条件激发才会生成, 而从标出的羰基峰不难看出无论是短链 PHA 还是中长链 PHA, 以及两种共混 PHA 的存在都是较普遍的, 因而峰位的分布也是很广泛的. 这是由于不同单体比例造成的峰位移.

Table 1 Growth and PHA synthesis by some bacterial strains isolated from soil samples collected from various locations in several provinces*

Strain	BP (PHA)	Ba2 (growth)	Ba2 (PHA)	O2 (growth)	O2 (PHA)	La2 (growth)	La2 (PHA)	Glu5 (growth)	Glu5 (PHA)	M30 (growth)	M30 (PHA)
HBP01	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+
											1719
HBP02	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
											1735
HBP03	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
			1735		1735				1742		
HBP04	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
HBP05	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+
HBP06	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
HBP07	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+
											1718
HBP08	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
					1736				1742		1735
HBP09	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
HBP10	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
HBP11	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
HBP12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HBP13	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
WFA01	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
WFA02	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-
WFA03	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+
WFA04	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+
	1734										1736
WFA05	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+
											1735
WFA06	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
											1736
WFA07	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
											1725
WFA08	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
	1733										1724
WFA09	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+
WFA01	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+
	1735										
WFA11	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
	1725										1736
WFA12	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+
	1738		1735								1736
WFA13	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1736										
WFA14	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	1739										
WFA15	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
	1737										1724
WFA16	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+
	1738										1736

* Strains designated as HB, YC, CW and WF were isolated from Huabei oilfield in Hebei Province, Yangcheng City in Jiangsu Province, Chengdu Waste Water Treatment Plant in Chengdu City, Sichuan Province and Weifang City in Shangdong Province, respectively. A, B, C and D *et al.* after HB, YC, CW and WF represented strains isolated from samples collected from various locations. These strains were isolated from medium of peptone and beef extract (BP).

The numbers in the table indicate the positions of carbonyl group in the FT-IR spectra, peaks above 1740cm⁻¹ point to the existance of mcl PHA, while bands at between 1730 ~ 1740cm⁻¹ present intracellularpolymers containing HB and mcl HA. PHB normally shows its peak below 1730cm⁻¹[13]. O2: 2g/L sodium octanoate; Ba: Butyric acid; La: Lauric acid; Glu: Glucose; M: Molasses etc.

我们发现,从不同的样品中筛选出的细菌往往合成不同类型的 PHA,一般以短链 HA 单体为主的 PHA 或是中长链 HA 单体为主的 PHA. 在上述的 371 株菌中,有将近 40% 的菌可以至少在六种底物中的一种合成 PHA(图 3 和图 4),从而具有 PHA 积累能力. 因为 FT-IR 的检测本身具有灵敏度比气相色谱低的限制,另外因为仅用了六种底物,不能排除有些菌在这六种底物上不合成 PHA 而在其他底物上可以合成 PHA,因而可推断 PHA 合成菌的比例应当比 40% 更高. 这很好地说明了 PHA 的积累在微生物中是一种很普遍的现象. 从图 4 中可以看出,在我们所选用的六种底物中,有的菌只在一种培养基中合成 PHA,而更多的是在二种,三种甚至五种底物中合成 PHA,这一点也造成了 PHA 积累的底物的不规律性.

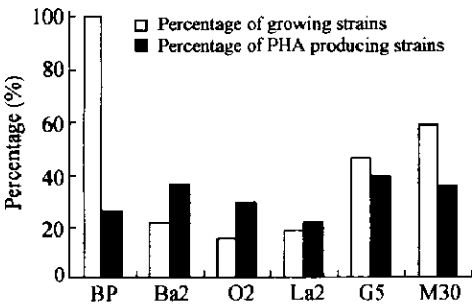


Fig. 3 Growth and PHA synthesis by 371 isolated strains in various carbon sources (O2: 2g/L sodium octanoate; Ba: Butyric acid; La: Lauric acid; Glu: Glucose; M: molasses etc. BP:beef extract and peptone)

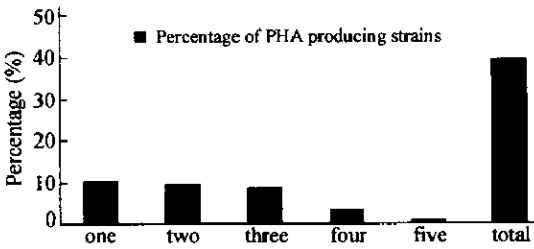


Fig. 4 Synthesis of PHA from six carbon sources
One, two, three, four, five in the figure indicate the arbitrary combination of one, two, three, four, five of the substrates of: sodium octanoate, butyric acid, lauric acid, glucose, molasses and BP

表 2 是我们对用 FTIR 法选出的几株菌以 GC 法进行的进一步研究,在图 3 及表 2 中还可以看出,在不同的碳源中细菌合成 PHA 的情况是不同的. 通过气相色谱分析可以知道,不但 PHA 积累与否是不同的,而且 PHA 的单体组成也是很不相同的,同时图 2 还表明在不同的底物中都有一定数量的菌株可以合成 PHA. 虽然菌株在不同底物之中的生长和积累情况是很不同的,而 PHA 积累的比例也是无一定规律可寻的. 并不是以前一般认为的在脂肪酸上生长的菌中 PHA 合成菌的比例高而在富营养培养基如牛肉膏蛋白胨上积累 PHAs 的菌就少^[1,2],而这一点也是筛选 PHA 合成菌底物不易确定的原因. 同时,从不同的采样地点,分离出的细菌合成的 PHA 往往也是不同的:从含油土样中选出的 PHA 合成菌,往往较易合成中长链 PHA,这是因为在这些菌的生活环境中

Table 2 Growth and PHA formation by selected strains on various carbon sources

Strain carbon sources ^a		CDW(g/L) ^b	HB(%)	HHx(%)	HO(%)	HD(%)	HDD(%) ^c
WFD27	Glucose	0.68	62.8	0.0	0.0	12.4	24.8
	Molasses	1.21	75.0	0.0	0.0	24.1	0.9
WFD15	Glucose	1.42	71.9	0.0	0.0	0.0	28.1
	Molasses	2.81	70.6	0.0	0.0	5.3	24.1
HBP08	Lauric acid	3.72	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0
	Glucose	1.21	0.0	0.0	13.2	29.6	57.2
	Molasses	2.59	4.6	1.4	20.3	58.4	15.3
	Lauric acid	2.38	0.4	3.2	43.5	42.8	10.1
HBL13	Sodium octanoate	1.51	0.0	5.1	85.7	6.1	3.0
	Glucose	1.23	1.05	2.3	17.8	78.8	0.0
	Sodium gluconate	1.08	0.0	1.6	21.6	76.8	0.0
	Lauric acid	1.67	0.3	3.7	44.3	51.6	0.0
	Tetradecanoic acid	1.06	0.0	0.0	0.0	100	0.0

^a Carbon sources: molasses 30g/L, glucose 10g/L, lauric acid 5g/L, tetradecanoic acid 5g/L, sodium octanoate 5g/L
^b CDW: cell dry weight
^c HB: hydroxybutyrate, HHx: hydroxyhexanoate, HO: hydroxyoctanoate, HD: hydroxydecanoate, HDD: hydroxydodecanoate

较多的脂肪酸类物质,这样使分解脂肪酸(利用 β -氧化途径)转成积累物 mcl PHA 的菌占优势。而在一般地点分离的 PHA 合成菌中还是以短链 PHA,特别是 PHB 为主体,这在表 1 和表 2 中及我们过去选育出的一些菌中也得到了体现,表 2 中 HBP08 和 HBL13 都是来自于油田油污土样的 PHA 合成菌。

通常认为同时合成含短链 HA 单体和中长链 HA 单体的 PHA 的菌是很少的,但我们发现实际上 PHA 合成菌中可以合成短链 PHA 和中长链 PHA 共混 PHA 的菌是很普遍的。在我们从初筛得到的菌种中进行进一步研究的 34 株生长良好的菌中发现,11 株积累 PHB,13 株主要产 PHB,8 株主要产中长链 PHA,而 22 株可以同时积累 HB 和中长链 HA 的单体,占了 65%。从表 2 可以看到我们摇瓶和气相色谱研究其中 4 株菌的情况,在不同底物中,它们合成 PHA 情况是不同的,它们中有主要合成中长链 PHA 的,有以合成 PHB 为主的,但都可以在一定条件下同时合成短链和中长链 HA 的单体。因此,我们发现很容易得到可以在不同培养基上合成不同类型单体 PHA 的菌种。当然,多数菌是以中长链单体 PHA 为主体或短链单体 PHA 为主体。目前还只发现极个别 PHA 合成菌可以合成中长链与短链 HA 共聚的

PHA。

而我们在研究中已经选育出一些可以在简单便宜的底物(如废糖蜜、葡萄糖)中合成中长链 PHA 和共混 PHA 的菌株,这对进一步的研究及应用开发都具有重要意义。

总之,在我们的研究中发现,PHA 的合成在自然界是一种很普遍的现象,而其中能合成 PHB 和中长链 PHA 共混的 PHA 的菌也是很普通的。同时 PHA 合成菌的分布具有较强的生理环境依赖性。而我们已经得到一些有研究和应用前景的 PHA 合成菌株。

从上述研究可以看出,寻找合成 PHA 的菌株并非很困难。在大量的 PHA 合成菌中,必有能合成结构新颖 PHA 结构的微生物存在。在适当的底物中,这些微生物应该还能合成一系列结构不同的 PHA。我们推断,有微生物合成的 PHA,尽管结构有许多不同,机械和物理性能也有许多不同,但都应该具有生物可降解性。因此,利用微生物作为一种合成可生物降解材料的手段,相对于一般只能合成非生物可降解材料的化学法,不失为一种值得重视的发展趋势。

致谢 本研究由香港理工大学手性技术开放实验室资助

REFERENCES

- 1 Anderson A J, Dawes E A. *Microbiol Rev*, 1990, 54: 450~472
- 2 Steinbuechel A. In: Byrom D ed. *Biomaterials: Novel Materials from Biological Sources*. Basingstoke: MacMillan Publishers, 1991. 123~213
- 3 Yao J, Zhang G, Wu Q, Chen G Q, Zhang R Q, Antonie Van Leenwenhoek, 1999, 75: 345~349
- 4 He W N, Tian W D, Zhang G, Chen G Q, Zhang Z M. *FEMS Microbiol Lett*, 1998, 169: 45~49
- 5 Lee S Y. *Biotechnol Bioeng*, 1996, 49: 1~14
- 6 Bluhm T L, Hamer G K, Marchessault R H, Fyfe C A, Veregin R P. *Macromolecules*, 1986, 19: 2871~2880
- 7 Byrom D. *FEMS Microbiol Rev*, 1992, 103: 247~250
- 8 Chen G Q, Page W J. *Biotechnol Bioengineering*, 1997, 11: 347~350
- 9 Kim Y B, Lenz R W, Fuller R C. *Appl Environ Microbiol*, 1992, 54: 2942~232
- 10 Abe H, Doi Y, Fukushima T, Eya H. *Int. J. Biol. Macromol*, 1994, 16: 115~119
- 11 Ostle A G, Holt J G. *Appl Environ Microbiol*, 1982, 44: 238~241
- 12 Doi Y, Kitamura S, Abe H. *Macromolecules*, 1995, 28: 4822~4828
- 13 Doi Y, Kanesawa Y, Kunioka M. *Macromolecules*, 1990, 23: 26~31
- 14 Molitoris H P, Moss S T, Dekoning G J M, Jendrossek D. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1996, 46: 570~579
- 15 Holmes P A, Wright L F, Collins S H. *European Patent application*, EP 52459. 1985-12-04
- 16 Hong K, Sun S, Tian W, Chen G Q, Huang W. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1999, 51: 523~526

ENVIRONMENTAL DEPENDENCE OF MICROBIAL SYNTHESIS OF POLYHYDROXYALKANOATES

WU Qiong¹, SUN Suqin², YU Peter H.F.³, CHAN Albert X.Z.³, CHEN Guoqiang¹

(¹Department of Biological Sciences and Biotechnology,

²Department of Chemistry, Tsinghua University, Beijing 100084)

(³Open Laboratory of Chiral Technology, Hong Kong Polytechnic University, Hong Kong)

Abstract Polyhydroxyalkanoate(PHA) is a family of carbon and energy storage materials synthesized by many bacteria, its hydroxyalkanoate monomers have diversified structures. A broad screening process using the FT-IR technique developed by us previously was carried out. Samples were collected from various geological locations around the country. It was found that PHA compositions depend very much on the geological locations. In some locations, bacteria mainly synthesized short-chain-length PHA (scl PHA) consisting of monomers with four to five carbon atoms, in other locations, medium-chain-length PHA (mcl PHA) consisting of monomers with six to sixteen carbon atoms were accumulated by inhabiting bacteria. Additionally, the synthesis of blend polymers consisting of PHB, scl PHA and mcl PHA is a common phenomenon among the bacteria studied. 40% of the 371 strains cultivated on six substrates is able to synthesize PHA, with many of them making blends of PHB and mcl PHA. This result will help polymer researchers to identify sources of PHA synthesis.

Key words Polyhydroxyalkanoate (PHA), Polyhydroxybutyrate (PHB), FT-IR