

一株具有工业应用潜力的聚 β -羟基丁酸产生菌

徐 浩 江慧修 周惠玲 周 坚

(中国科学院微生物研究所, 北京)

从国内外搜集的样品中, 分离到一株革兰氏阴性、氧化性、能运动的短杆菌, 编号 3248A₁ (以下简称 A₁), 经鉴定为肥大产碱菌 (*Alcaligenes latus*)。该菌株具有优良的产聚 β -羟基丁酸 (PHB) 能力, 能利用常见的碳源, 生长要求较简单。用显微镜观察, 可以看到经苏丹黑染色的 24 小时细胞内, 含有大量的 PHB 颗粒。提取后的 PHB 纯度与 Sigma 产品相一致。经初步培养和提取试验后, 能得到为细胞干重 23.9% 的 PHB。因此认为该菌株有工业应用前景。

关键词 聚 β -羟基丁酸; 肥大产碱菌

自二十年代末在巨大芽胞杆菌中发现聚 β -羟基丁酸 (PHB) 以来, PHB 一直作为该菌分类上的一项指征。由于 PHB 可作为热塑的原料, 且可被生物降解, 故不会造成塑料公害。在全球环境污染日趋严重的今日, 发酵生产 PHB 的研究成为一项热门课题。一些国家已进行了细菌发酵 PHB 的工业化生产, 英国 ICI (Imperial Chemical Industry) 公司居于领先地位。

我国 PHB 发酵工业的建立需筛选到优良菌株。作者从所采集的众多样品中, 分离筛选到一株高产 PHB 的短杆菌 3248A₁ 菌株。对该菌株进行了研究, 结果证明它是一株具有工业应用前景的 PHB 产生菌。

材 料 和 方 法

Ashby 培养基: 固体培养用。

无机盐合成培养基: 碳源为 2% 葡萄糖, 磷、氮、镁、铁、钙源和微量元素均分别灭菌。

用以上液体培养基在 35℃ 摇床培养 24 小时富集样品, 再经平板分离, 反复纯化, 得到纯菌株。

挑取的菌株用苏丹黑染色法^[1]检查细胞内所含的 PHB, 以此作为初筛的标准。

新培养菌株的运动能力用相差显微镜镜检和 U 形管^[2]穿刺法检查。为了证明细胞鞭毛有无, 用银盐法进行染色^[3], 光学显微镜观察, 以及磷钨酸钠染色, 透射电镜观察。

分离到的菌株依照《伯杰氏系统细菌学手册》^[4]进行鉴定。根据获得的生物量及每个细胞中 PHB 的含量, 来估算得到 PHB 的重量 (W), 即:

$$W \text{ PHB} = W \text{ 生物量} \times \text{PHB}\%$$

所以, PHB 产量的验证过程应该是测定生物量及残糖, 以及细胞内 PHB 的含量。

将 A₁ 菌株培养在改进的 Ashby 培养基 (另加 0.1% 酵母自溶粉) 上, 一天后接入混合液, 35℃、100r/min 摇床上培养 48 小时。培养液在 K70 离心机 (德国产)

本文于 1990 年 12 月 22 日收到。

本工作承陈国强博士协助, 谨此致谢。

鄂超苏、张金铃参加部分工作。

缩写词: PHB: 聚 β -羟基丁酸

IR: 红外光谱分析

GC: 气相色谱

TEM: 透射电镜

上, 4000r/min 离心 20 分钟, 收集菌体, 于 -70°C 下冻干。

残糖用 3,5-二硝基水杨酸钠法^[4]测定 (还原糖)。用比浊法测定菌体生长量, 并比较生长量 (A_{600}) 与定糖 (终反应液 A_{540}) 所得到的糖分下降趋势之间的关系。

PHB 的提取与测定: 用氯仿法提取 PHB^[6], 用 KBr 混样后压片, 红外光谱测定 PHB, 并与标准样品比较 (标准样品为 Sigma 产品)。

用 Brunegg 等的气相色谱法测定提取的 PHB 纯度。称取标准样品及 A_4 菌株自制的 PHB 样品各 4mg, 加入 2ml 酸化甲醇, 40°C 水浴中酯化 20 小时后, 加氯仿 2ml, 摇匀, 再加 1ml 水剧烈振荡, 用分液漏斗分层, 取有机相, 用 GC 定量。

结 果

(一) A_4 菌株鉴定结果

1. 个体形态: 革兰氏阴性、氧化性细菌, 短杆—球杆或近球、球形。直径 $1.0-1.1 \times 1.1-2.5 \mu\text{m}$, 单个、成对或成短链。细胞内密集着聚 β -羟基丁酸盐 颗粒 (图 1)。以 1—6 根周生鞭毛运动 (图 2、3)。

2. 培养特征: 在固体无机盐培养基上

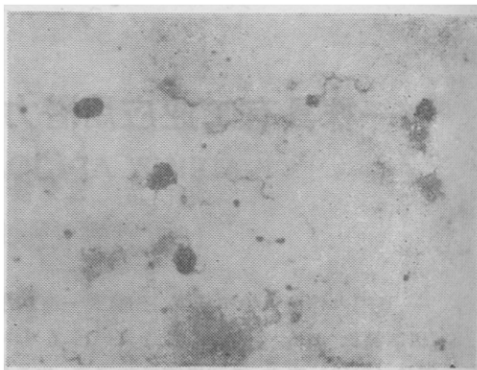


图 1 银盐染色的 A_4 细胞 (示鞭毛, 2000 \times)

Fig. 1 Silver stained A_4 cells showing flagella

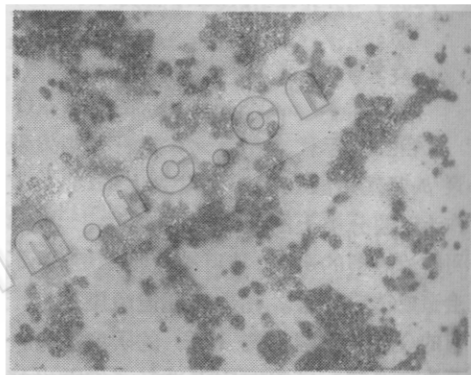


图 2 经苏丹黑染色的 A_4 细胞 (示 PHB, 1000 \times)

Fig. 2 Sudan Black stained A_4 cells showing the occurrence of PHB

中度生长, 30°C 培养 5 天后的菌落圆形,

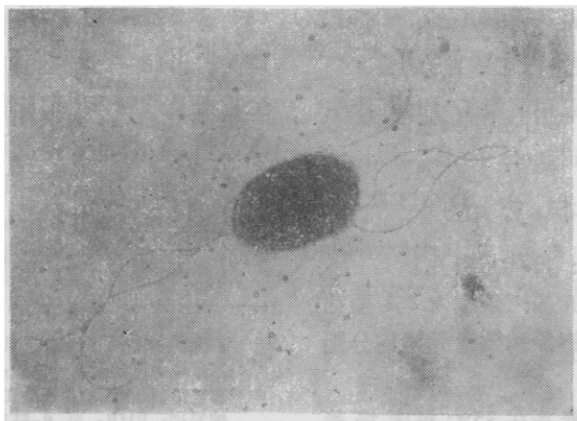


图 3 A_4 菌株的鞭毛 (透射电镜, 12000 \times)

Fig. 3 TEM photograph of A_4 cell showing flagella

表面光滑,低凸,边缘整齐,直径 0.8—1.5 mm,粉白色,不透明。最适生长温度为 30—35℃;最适 pH 为 7.0。

3. 生理生化特性:

葡萄糖氧化发酵 氧化产酸
由碳水化合物产酸

葡萄糖	产酸
半乳糖	产碱
木糖	产碱
阿拉伯糖	产碱
麦芽糖	产碱
山梨糖	产碱
甘油	产碱
甘露醇	产碱

氧化酶	+
接触酶	+
淀粉水解	+
明胶液化	+
硝酸盐还原	+
反硝化	-
从半胱氨酸产 H_2S	-
石蕊牛奶	产碱,还原

碳源利用	
葡萄糖	+
果糖	-
甘露糖	+
木糖	-
阿拉伯糖	-
蔗糖	+
麦芽糖	+
海藻糖	+
鼠李糖	-
甘露醇	-
柠檬酸钠	+
葡萄糖酸钠	+
内消旋酒石酸钠	+
乙酸钠	-
丙酸	-

己酸 -

琥珀酸钠 +

(二) PHB 纯度及产量估算

冻干的菌体在 105℃ 下烘干后,含 3.8% 的水分。用比色法测 A 值得到的生物量与用测定还原糖得到的残糖曲线见图 4。从图 4 可以看出,培养至 20 小时菌体生物量已不再增加。从 PHB 染色镜检也可证明,24 小时的细胞内 PHB 累积最多。

红外光谱测 PHB 由波数 4000—500 扫描,结果见图 5、6。在波数 1750 处(即 $5.75\mu m$),无论我们提取的样品,还是标准样品,均有一强烈的峰值,证明由 A_1 菌株提取的 PHB,其纯度合格。

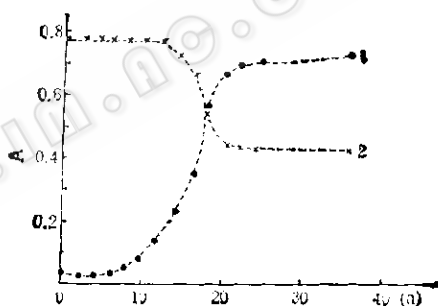


图 4 细胞生长与含糖量下降趋势曲线

Fig. 4 The correlation of cell growth and sugar consumption

1. 细胞生长 Cell growth
2. 残糖 Sugar consumption

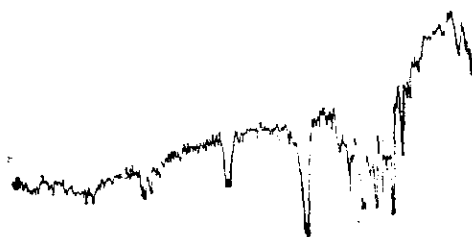


图 5 标准 PHB 样品红外光谱指纹图

Fig. 5 IR spectrum graph of standard PHB sample (Sigma)

用 GC 法比较 PHB 标准样品与 A_1 菌株提取的样品的纯度(图 7), 标准样品

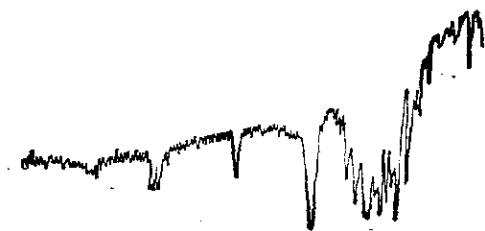


图6 从 A_4 菌株提取的 PHB 样品的红外光谱指纹图

Fig. 6 IR spectrum graph of PHB sample from strain A_4

的面积和 A_4 菌株提取样品相对面积之比为 1:1.06。根据 GC 分析结果,说明我们的产物,其纯度不低于 Sigma 产品。



图7 用 GC 比较 PHB 标准品与 A_4 样品的纯度

Fig. 7 Purity comparison by GC inspection

左: 标准品 右: A_4 样品

Left: standard Right: A_4 preparation

用 10L 培养液培养 A_4 菌株,经离心,再冻干后得到 8.66g 生物量,用氯仿从中提取出 2.0715g PHB 纯品。因此,PHB 在细胞中的含量为 23.92%。

结论和讨论

PHB 是一种易被生物降解的热塑原料,其社会需要量日增。我们分离出的 A_4 菌株,经鉴定为一株肥大产碱菌。从苏丹黑染色显微镜检或 IR 光谱分析看,不论产品纯度分析,还是产量估算,该菌株均属优质高产株。

A_4 菌株是一株可望在工业上应用的菌株。它是目前在一般条件下的优良原始菌株,其 PHB 产量的提高还有很大潜力。如果对其条件进行适当改进、优化,菌株 PHB 的产量可望提高。

参考文献

- [1] Gerhard, P. (ed. in chief): *Manual of Methods for General Bacteriology* Amer. Society for Microbiology, pp. 30—31, 1981.
- [2] Dino, T. and M. Enomoto: *Methods in Microbiology*, Vol. 5A, Chap. 4, pp. 145—163, 1971.
- [3] 中国科学院微生物研究所细菌分类组编: 一般细菌常用鉴定方法, 科学出版社, 北京, 第 115—119 页, 1978。
- [4] Krieg, N. K. and J. G. Hold: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* Vol. I, Williams and Wilkins Co., Baltimore, 1984.
- [5] 张龙翔等: 生化实验方法和技术, 高等教育出版社, 北京, 第 9—11 页, 1981。
- [6] Juettner, R. R. et al.: *European J. Appl. Microbiol.*, 1: 233—237, 1975.
- [7] Brauwegg, G. et al.: *European J. Appl. Microbiol. Biotechnology*, 6: 29—37, 1978.

A PROMISING STRAIN WITH INDUSTRIAL PRODUCTIVE POTENTIALITY FOR POLY- β -HYDROXY BUTYRIC ACID

Xu Hao Jiang Huixiu Zhou Huilin

Zhou Jian

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

From samples collected both from domestics and from abroad the authors screening out a gram negative, mobile strain No. 3248A₄, identified as *Alcaligenes latus*. This strain is of high PHB productive potentiality. This can be demonstrated both by microscopical observation after Sudan Black staining or by IR or GC inspection. In a non-industrial and far from optimal culture condition strain A₄ is able to produce PHB with

an amount of 23.9% by cellular dry weight. So one can predict that in an optimal fed-batch process with improved extraction method a bulk increment of yield is quite possible.

Key words

PHB; *Alcaligenes latus*