

高产聚- β -羟基丁酸酯的甲烷氧化菌 OB3b 和 光合菌共培养体系驯化

王贵儒¹, 辛嘉英^{1,2*}, 孙立瑞¹, 王雨晴¹, 夏春谷²

(1. 哈尔滨商业大学食品科学与工程重点实验室, 哈尔滨 150076; 2. 中国科学院兰州物理化学研究所羰基合成与选择氧化国家重点实验室, 兰州 730000)

摘要: **目的** 提高甲烷氧化菌 OB3b (*Methylosinus trichosporium* OB3b)和光合菌共培养体系中聚- β -羟基丁酸酯(poly- β -hydroxybutyrate, PHB)的产量。**方法** 采用丰盛-饥饿间歇供料法对共生菌进行好氧开放式培养, 以生长速度、PHB 产量、特征性酶甲烷单加氧酶活性为主要指标, 考察驯化过程中共培养体系 PHB 产量及甲烷氧化菌活性的变化。**结果** 经过 4 轮的丰盛-饥饿间歇供料驯化, 丰盛期细胞密度可达 1.2 以上, 饥饿期细胞密度下降速度显著降低, 细胞存活率高, 驯化作用明显, 菌体内 PHB 含量从 11.76%增加到 37.34% (w/w), 传代稳定性良好。**结论** 通过丰盛-饥饿间歇供料模式驯化后的共培养体系 PHB 产量明显提高, 得到了稳定的高产 PHB 甲烷氧化菌-光合菌共培养体系。

关键词: 聚- β -羟基丁酸酯; 甲烷氧化菌 OB3b; 光合菌; 丰盛-饥饿模式; 驯化

Domestication of high-yield poly- β -hydroxybutyrate co-culture system of *Methylosinus trichosporium* OB3b and photosynthetic bacteria

WANG Gui-Ru¹, XIN Jia-Ying^{1,2*}, SUN Li-Rui¹, WANG Yu-Qing¹, XIA Chun-Gu^{1,2}

(1. Key Laboratory for Food Science and Engineering, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China;
2. State Key Laboratory for Oxo Synthesis & Selective Oxidation, Lanzhou Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Science, Lanzhou 730000, China)

ABSTRACT: Objective To increase the yield of poly- β -hydroxybutyrate (PHB) in the co-culture system of methanotroph (*Methylosinus trichosporium* OB3b) and photosynthetic bacteria. **Methods** The aerobic open culture of symbiotic bacteria was carried out by the intermittent feeding feast-famine mode method. The growth rate, PHB yield and characteristic enzyme methane monooxygenase activity were taken as the main indexes to investigate the changes of PHB yield and methanotroph activity in the co-culture system during acclimation. **Results** After 4 rounds of enrichment-starvation intermittent feeding feast-famine acclimation, the cell density in the feeding feast period could reach more than 1.2, decline rates of cell density decreased significantly during famine, the cell survival rate was high, and the acclimation effect was obvious. The PHB content in the bacteria increased from 11.76% to 37.34% (w/w), and the passage stability was good. **Conclusion** The PHB yield of the co-culture system acclimated by intermittent feeding feast-famine mode is significantly improved, and a stable high-yield PHB methane oxidizing

基金项目: 黑龙江省自然科学基金项目(LH2020C063)、中央支持地方高校改革发展资金人才培养支持计划项目(高水平人才)(304017)

Fund: Supported by the Heilongjiang Province Natural Science Foundation (LH2020C063), and the Central Support to Local Colleges and Universities Reform and Development Fund Talent Training Support Program (the Higher Talents) (304017)

***通信作者:** 辛嘉英, 博士, 教授, 主要研究方向为生物催化。E-mail: xinjiayingvip@163.com

***Corresponding author:** XIN Jia-Ying, Ph.D, Professor, Harbin University of Commerce, No.1, Xuehai Road, Songbei District, Harbin 150076, China. E-mail: xinjiayingvip@163.com

bacteria-photosynthetic bacteria co-culture system is obtained.

KEY WORDS: poly- β -hydroxybutyrate; *Methylosinus trichosporium* OB3b; photosynthetic bacteria; feast-famine mode; acclimation

0 引言

随着石油基塑料的使用量的不断增加, 其在环境中的积累也在不断增加, 预计 2050 年将达到 330 亿 t^[1]。人们正在作出许多努力减少对石油基塑料的依赖, 来避免对环境产生更大的影响。在这种情况下, 使用具有符合食品包装材料性能及标准的生物聚合物被认为是最佳解决方案^[1-3]。

聚- β -羟基丁酸酯(poly- β -hydroxybutyrate, PHB)是一种可生物降解的聚酯。作为一种在营养受限的条件下可以大量积累的储能物质广泛存在于微生物中^[4]。由于结构的高度立体规整性, PHB 具有较高的结晶度(65%~75%)^[5], 具有与聚丙烯相似的特性^[6], 具有良好的生物相容性、生物降解性、非线性光学活性、成膜性、气体阻隔性、抗凝血性等高附加值性能^[7], 所以在代替传统石油基塑料、缓解环境污染、生物医用材料及绿色食品包装材料方面具有重要意义, 是传统石油基塑料的可持续替代品^[8]。作为新型的食品包装材料, PHB 能沿用传统塑料的通用加工方式, 可制成薄膜、塑料袋以及容器瓶等一次性包装材料, 同时还还可用作食品及饮料的包装内衬层和生鲜食品盘等^[9]。与传统塑料相比, PHB 包装的透氧率更低, 有利于食品的贮藏运输, 具有广泛的应用前景。作为绿色包装材料, 与传统塑料 100 年的降解时间相比, PHB 包装的自然降解仅需 12 个月, 降解后的产物为无污染的水与二氧化碳^[10]。在欧洲的许多国家, 生物塑料已被普遍应用于超市中有果蔬的食品包装, 具有广阔的市场前景。

目前 PHB 生产行业面临的主要挑战是经济性, 据报道, PHB 的生产成本大约是传统塑料的 3~4 倍^[11]。微生物生产 PHB 主要以异养菌培养为主, 其大规模应用的最关键因素之一是碳源成本高, 占生物聚合物生产总成本的 35%~40%^[12]。因此利用以廉价的甲烷为主要碳源的甲烷氧化菌(methane-oxidizing bacteria, MOB)与利用光能和二氧化碳自养的光合菌(photosynthetic bacteria, PSB)来生产 PHB 的方式, 得到各国学者的广泛关注^[13-14]。

GR 等^[15]将一株野生型细长聚球藻 UAM-C/S03 在光生物反应器中培养, 探究 pH 及氮源对 PHB 产量的影响, 结果显示在氮源充足的条件下, 随着反应系统内 pH 的升高, PHB 的产量逐渐降低。这表明在利用光合细菌生产 PHB 的体系内, pH 的稳定有助于提高 PHB 的产量。HA 等^[16]发现在 PHB 合成过程中, 需要足量的氧气, O₂ 不足时会抑制甲烷氧化菌的 PHB 合成。PHB 的相对分子量取决于 PHB 的培养条件和宿主微生物。普通的 PHB 具有脆性和二次结

晶现象, 因此 HONG 等^[17]以添加低分子量 PHB 的方法, 改善 PHB 的性能。结果表明, 随着低分子量 PHB 的添加量升高, PHB 的柔韧性和生物降解率增加, 证实了低分子量 PHB 可以改善 PHB 的脆性, 控制 PHB 的生物降解率。

图 1 为甲烷氧化菌和光合菌的共培养系统。在甲烷氧化菌和光合菌的共培养系统中, 可以同时利用二氧化碳和甲烷, 基于耦合在有氧光合作用和甲烷氧化之间的强大代谢作用, 二氧化碳和氧气等营养资源会被持续不断的补充^[18], 底物和产物两者之间的抑制作用减小^[19], 生成的杂质毒性减少^[20], 底物的纯度要求降低, pH 得到调节, 使菌体实现平稳的生长和正常生命代谢活动, 最终实现稳定的、可以自我调控的生长状态, 进一步实现高密度发酵^[21-22]。同时, 光合菌产生的 PHB 分子量小于甲烷氧化菌产生的 PHB 分子量^[23], 在共培养体系中产生的 PHB 的性质可以在不同大小分子量混合下得到一定改善^[24]。

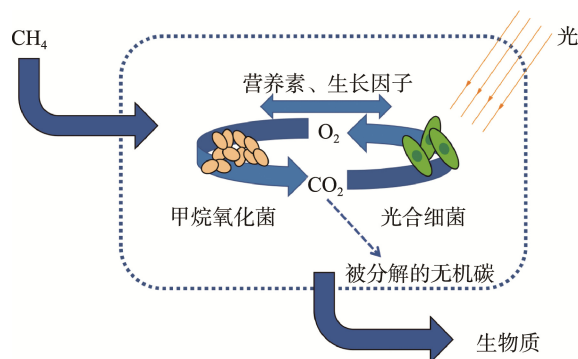


图 1 甲烷氧化菌和光合菌的共培养系统

Fig.1 Co-culture symbiotic system of methanotrophs and photosynthetic bacteria

综上所述, 对比传统的单菌种培养体系, 甲烷氧化菌和光合菌共培养系统不仅使资源利用率最大化, 菌种之间也可以相互促进生长, 降低环境因素带来的生长限制与产量影响, 改善生产出的 PHB 性质, 具有很强的开发潜力。

本研究使用的甲烷氧化菌 OB3b 与光合菌长期伴生, 已无法通过传统的划线法分离, 且目前鲜少有关于提高此菌与光合菌共生产 PHB 能力的相关研究。为了提高共培养体系的 PHB 产量, 在开放条件下培养(开放条件下培养可以降低生产成本), 本研究采用丰盛—饥饿培养模式对体系进行驯化, 经过多轮培养后筛选出菌体内部的 PHB 合成及储藏量相对较高的菌株, 来获得适宜进行大规模连续生产的优秀菌种, 为绿色食品包装材料 PHB 的工业生产提供一种新选择。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验菌种

甲烷氧化菌 OB3b (*Methylosinus trichosporium* OB3b), 由清华大学邢新会教授提供, 其中含有甲烷氧化菌和光合细菌(蓝细菌), 二菌长期伴生, 已无法进行分离。

1.1.2 实验试剂与仪器

甲烷、氧气、二氧化碳等气体(纯度 99.99%, 哈尔滨黎明气体有限公司); 无机盐等试剂(分析纯, 天津市天力化学试剂有限公司); 聚- β -羟基丁酸酯标准品(纯度为 98%, 上海麦克林生化科技有限公司)。

SCION456 型气相色谱仪(天美科学仪器有限公司); BLB10-HYG-FJ2 生物反应器摇床(上海百仑生物科技有限公司); 2-16K 高速冷冻离心机(美国 Sigma 公司); H1850 医用离心机(长沙湘仪离心机仪器有限公司); SHB-IVA 循环水式多用真空泵(郑州长城科工贸有限公司); LRH-70F 生化培养箱、DHG-9053A 电热恒温鼓风干燥箱(上海一恒科技有限公司); HV-5100B 紫外可见分光光度计(上海光析仪器有限公司); BS210S 电子天平(精度 0.1 mg, 德国 Sartorius 仪器有限公司); UV2550 紫外可见光谱仪(日本岛津公司); BA210Digital 数码显微镜(麦克奥迪实业集团有限公司); TM-5 毛细管柱(30 m \times 0.45 μ m, 天美科学仪器有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 无机盐培养基的配制

实验中所涉及菌液的培养皆使用无机盐液体培养基(NMS 培养基), 由 A 液和 B 液组成, 其中 1 L A 液中含有 3.0 g NaCl、7.4 g Na₂HPO₄·12H₂O、5.0 g NH₄Cl、0.04 g FeSO₄·7H₂O、3.0 g MgSO₄·7H₂O、2.62 g KH₂PO₄、10.0 g KNO₃、0.0167 g FeCl₃·6H₂O、0.2 g CaCl₂·2H₂O、5.24 g K₂HPO₄·3H₂O、0.0125 g CuSO₄·5H₂O。1 L B 液中含有 0.3 g MnSO₄·H₂O、0.24 g NaMoO₄·H₂O、0.34 g ZnSO₄·7H₂O。使用前取 A 液 100 mL、B 液 1 mL, 用去离子水定容至 1 L^[25]。

1.2.2 甲烷氧化菌和光合细菌的活化及扩大培养

按照上述方法配制 NMS 培养基 100 mL 并置于 250 mL 带弯管的培养瓶中, 于 120°C 的条件下灭菌 20 min, 然后接种混合菌的种子液, 接种量为培养基体积的 10%, 密封后利用水循环式真空泵抽出瓶中气体, 并置换入混合气(甲烷:二氧化碳:氧气=2:1:1, V:V:V), 接种后将其发酵罐放置于条件为 30°C、180 r/min 的摇床中进行持续光照培养, 光源为 24 W 的白炽灯, 培养 6 d 后以该培养液为种子液, 将其接种于 1 L 的培养基中进行扩大培养。

1.2.3 丰盛-饥饿培养模式

甲烷氧化菌和光合菌共培养的菌种驯化采用丰盛-饥饿模式进行。

(1)丰盛培养条件

将甲烷氧化菌和光合菌的共生菌种按照 10%的接种

量, 接种至 3 L 发酵罐中进行丰盛阶段摇瓶培养, 摇床温度为 30°C, 转速为 120 r/min, 光照条件为 24 W 的单一光源持续光照, 每 24 h 换一次混合气体(混合气体甲烷:二氧化碳:氧气=2:1:1, V:V:V), 培养时间为 5 d, 5 d 后转入饥饿培养条件。

(2)饥饿培养条件

将甲烷氧化菌和光合菌的共生菌种按照 10%的接种量, 接种至 3 L 发酵罐中进行饥饿培养, 摇床温度为 30°C, 转速为 120 r/min, 光照条件为无光的黑暗条件下, 每 24 h 换一次空气。

1.2.4 细胞干重的测定方法

采用恒重法测量细胞干重。首先用低温冷冻离心机收集细胞沉淀, 离心机的操作温度为 4°C, 转速 8000 r/min, 时间 15 min, 并用 0.05 mol/L 磷酸盐缓冲液反复冲洗 2 次, 将得到的菌体细胞放置于 70°C 恒温干燥箱内干燥至恒重, 然后利用分析天平称量样品的重量^[26]。

1.2.5 菌体细胞生长密度的测定方法

采用分光光度法: 首先量取菌液 3 mL, 用去离子水做空白对照组, 每隔 24 h 采用紫外分光光度计测定该菌液在波长 600 nm 处的吸光度值, 用以确定不同时间段的菌种生长情况。

1.2.6 环氧丙烷标准曲线的绘制方法

取环氧丙烷标准品 1 mL 于 100 mL 容量瓶中, 加入 50 mL 去离子水使环氧丙烷标准品完全溶解, 定容至 100 mL 后得到 1% (V:V) 的环氧丙烷标准品溶液。将充分溶解的环氧丙烷标准品溶液稀释至 0.01% (V:V), 从标准品溶液中分别吸取 2、4、6、8、10 mL 于 5 支试管中, 补加去离子水至 10 mL, 则试管中环氧丙烷浓度为 0.002%、0.004%、0.006%、0.008%、0.010%。

气相色谱的检测条件如下: 色谱柱为 TM-5 毛细管柱, 尺寸为 30 m \times 0.45 μ m, 柱温 60°C, 进样口温度 180°C, 氢火焰离子化检测器(flame ionization detector, FID)检测器温度 180°C。采用手动进样, 进样量 1 μ L。以环氧丙烷含量为横坐标(X), 峰面积为纵坐标(Y), 回归方程为 $Y=36.116X-2.5505$, r^2 值为 0.9959。

1.2.7 甲烷单加氧酶酶活测定方法

细胞培养结束后, 于 4°C、8000 r/min 的条件下离心 15 min, 得到菌体细胞沉淀, 用 0.05 mol/L 磷酸盐缓冲液将细胞沉淀冲洗两遍后, 加入适量缓冲液将沉淀重新悬浮, 制成一定浓度的细胞悬浮液。

甲烷单加氧酶(methane monooxygenase, MMO)的活性测定采用丙稀环氧化法, 在 10 mL 反应瓶中加入 2 mL 细胞悬浮液后密封, 利用一次性注射器抽出 4 mL 空气, 并迅速加入 4 mL 丙稀(保持丙稀:空气=1:1, V:V), 二次密封后置于摇床中进行环氧化反应, 摇床温度为 30°C, 转速为 200 r/min, 反应时间为 30 min, 反应结束后将反应瓶于冰箱中倒置过夜, 第 2 d 取静置后样品倒入 4 mL 的小试管中,

在转速为 10000 r/min 的条件下离心 15 min, 离心结束后取上清液进行 MMO 测定。

采用气相色谱法测定反应液中生成的环氧丙烷的浓度。酶活定义为每分钟每毫克细胞(干重)催化生成环氧丙烷的纳摩尔数, 单位为 nmol/(min·mg)。气相色谱的检测条件如下: 色谱柱为毛细管柱, 柱尺寸为 30 m×0.45 μ m, 柱温 60°C, 进样口温度 180°C, FID 检测器温度 180°C。采用手动进样法, 进样量 1 μ L。

1.2.8 叶绿素含量检测

叶绿素在 670 nm 处有最大吸收峰, 因此测定 670 nm 处的吸光度来表征叶绿素的含量, 叶绿素的含量水平代表着光合细菌的含量。

取培养后的菌液 3 mL, 超声波破碎 5 min, 以去离子水做空白, 测定波长 670 nm 下的吸光度值。

1.2.9 PHB 的提取与检测

(1) PHB 的分离提取方法

采用有机溶剂提取法分离提取 PHB。将经过细胞壁处理并烘干的菌体, 加入 5 mL 氯仿溶液, 60°C 抽提 1 h(水浴)获得含 PHB 的氯仿溶液。

(2) PHB 的定性分析

采用苏丹黑染色法。

1) 染色液的配制: 0.03% 苏丹黑染色液: 苏丹黑 0.3 g, 70% 乙醇 100 mL, 混合振荡均匀, 过夜备用; 以二甲苯为褪色剂; 用 0.5% 番红水溶液为复染剂。

2) 染色步骤: 常规法制成菌悬液涂片; 0.3% 苏丹黑染色液染色 10 min 后, 水冲洗染液, 滤纸吸干水分; 二甲苯冲洗涂片至几乎无色素洗脱; 0.5% 番红染色液复染 1~2 min, 水洗, 吸干; 镜检可见类脂颗粒染成蓝黑色, 菌体其他部分呈复染剂颜色^[27]。

(3) PHB 的定量分析

采用紫外分光光度法测定 PHB 含量^[28]。PHB 在浓硫酸中加热时可以定量地转化为巴豆酸(反-2-丁烯酸), 巴豆酸在 235 nm 处有一最大吸收峰值, 而其他含碳化合物在同样条件下的吸收峰与 PHB 有很大的差别。因此, 将经过分离提取 PHB 的菌体细胞吸取 0.5 mL 于磨口试管中, 80°C 水浴加热除去氯仿, 然后加入 10 mL 浓硫酸, 盖上玻璃塞, 100°C 水浴加热 10 min, 冷却至室温并混匀, 在 235 nm 处测定溶液的吸光值。

(4) PHB 标准曲线的绘制方法

用电子天平准确称取 0.01 g PHB 标准品于 250 mL 锥形瓶中, 加入 50 mL 氯仿、60°C 水浴加热 1 h, 使 PHB 充分溶解于氯仿中。将充分溶解 PHB 的氯仿溶液稀释至 5 μ g/mL。从 PHB 标准溶液中分别吸取 2、3、4、5、6 和 7 mL 于 6 支比色管中, 再补加氯仿至 10 mL, 则试管中 PHB 质量浓度依次为 1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 和 3.5 μ g/mL。取第 7 支比色管, 加入 10 mL 氯仿作为空白。将 7 只比色管放入水浴

锅中 80°C 加热, 使氯仿充分蒸发, 比色管中只残留 PHB。然后分别加入 10 mL 浓硫酸, 振荡混匀, 带塞水浴 100°C 加热 10 min, 冷却至室温^[29]。在 235 nm 下测定吸光值, 以 PHB 质量浓度为横坐标(X , μ g/mL), 以 235 nm 吸光值为纵坐标(Y), 回归方程为 $Y=2.825X+0.0158$, r^2 值为 0.9962, 表明其线性关系良好。

1.3 数据处理

实验重复测定 3 次, 利用 Origin 2021b 与 IBM SPSS Statistics 26.0 软件对数据进行分析。

2 结果与分析

2.1 丰盛期培养时间的确定

丰盛—饥饿模式常常被做为提高菌体 PHB 储存能力的培养方式^[30]。众所周知, 细菌在生长受限的情况下合成 PHB, 生长限制可以来自外部(缺乏营养或电子受体, 如氧、氮和磷)或内部。在饥饿阶段, 细胞将活动减少到最低限度以维持生存, 大大降低了内部的酶合成及 RNA 转录的速度^[31]。由于无法获得生长所需的细胞内化合物, 这种细胞活性的下降也会导致丰盛阶段生长受限。当外部碳源供应过量时, 细胞需要进行生理适应才能达到最大生长速度, 而在这个适应期间, 碳源的利用量主要由内部的聚合物所驱动。在多层丰盛—饥饿模式培养之后, 可以显著提高细胞内聚合物即 PHB 的含量。

对菌种进行预培养, 确定丰盛、饥饿阶段的培养时间。对共培养菌种进行为期 9 d 的丰盛培养, 图 2 是丰盛培养阶段每隔 24 h 测定的 OD₆₀₀ 值变化曲线。

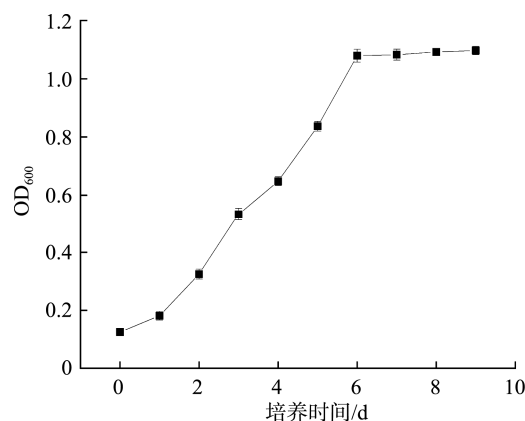


图 2 OD₆₀₀ 随培养时间的变化曲线
Fig.2 Change curve of OD₆₀₀ with culture time

如图 2 所示, 在 0~6 d 的 OD₆₀₀ 值以较快的速度增加, 在第 6 d 时达到 1.079。此时外部营养供给充足, 细胞生长处于对数生长期, 总细胞密度增长较快; 6~9 d 的 OD₆₀₀ 值增长速度放缓, 变化幅度减小, 接近平坦趋势, 此时细胞生长处于迟缓期。第 6 d 时细胞处于对数生长期的最后一

天, 此时细胞酶活性高, 代谢旺盛, 生长、增殖速度较快, 因此确定丰盛阶段培养时间为 6 d。

2.2 饥饿期培养时间的确定

对共培养菌种进行为期 20 d 的饥饿培养, 图 3 是饥饿培养每隔 24 h 测定的 OD_{600} 值变化曲线。

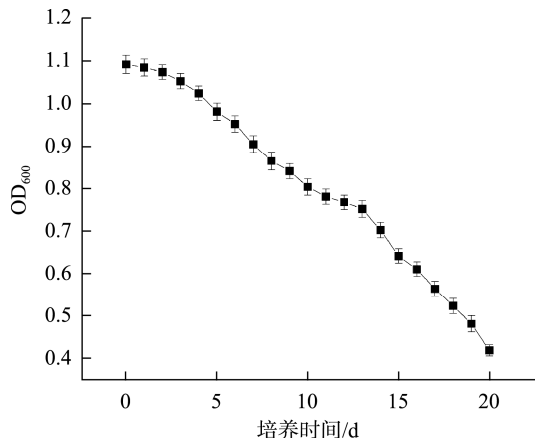


图 3 OD_{600} 随培养时间的变化曲线

Fig.3 Change curve of OD_{600} with culture time

在整个饥饿培养阶段, 随着培养时间的增长, 没有外部碳源的供给, 细胞生长受限, 内部能源被一直消耗, 直至死亡。表现为 OD_{600} 值持续降低, 曲线呈下降趋势。选

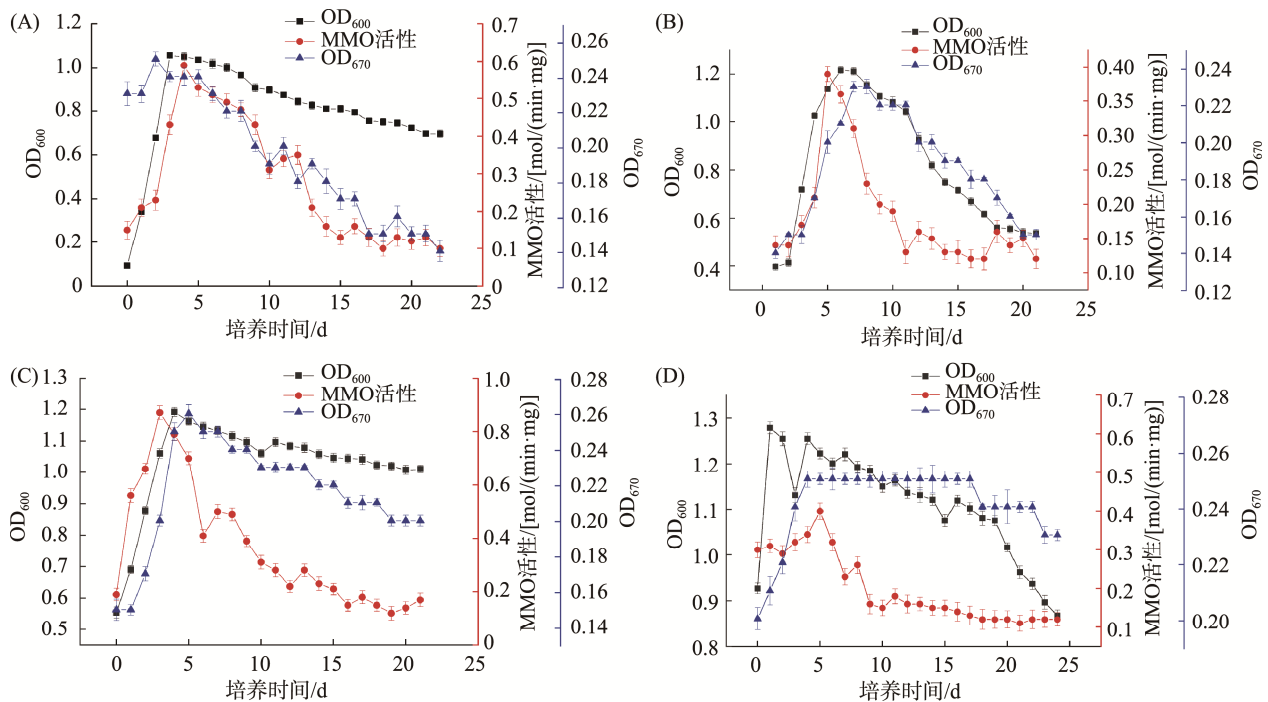
择饥饿阶段培养 18 d, 此时的数据接近第一天数据的一半, 菌种细胞可以检测到活性, 得到实验数据, 并且活性未达到最低点, 使细胞饥饿过度, 无法连续进行下一轮实验。因此确定饥饿阶段培养时间为 18 d。综上所述, 确定驯化实验丰盛、饥饿阶段培养时间比为 1:3。

2.3 驯化培养的结果

2.3.1 菌体生长情况

使用气相色谱测定 MMO 活性, 反映甲烷氧化菌的生长状况; 利用紫外分光光度计测定超声波破碎 5 min 后的 OD_{670} 值, 即叶绿素含量, 反映光合细菌的生长状况; 利用紫外分光光度计测定菌种细胞 OD_{600} 值, 反映混合菌体细胞的总生长状况。每隔 24 h 测定共生菌细胞生长密度和甲烷单加氧酶活性, 图 4 为 4 轮菌种驯化培养 OD_{600} 、 OD_{670} 和 MMO 活性随天数的变化。

在 4 轮驯化的过程中, 丰盛培养阶段, 外部供给营养丰富, 细胞处于对数生长期, MMO 活性、叶绿素含量与总细胞密度上升明显; 饥饿培养阶段, 碳源的不足导致 MMO 活性下降, 甲烷氧化菌的生长受限。光源的缺失导致光合细菌的生长受限, MMO 活性、叶绿素含量与总细胞密度平缓下降。在饥饿阶段后期, MMO 活性与细胞密度都维持在略低但相对平稳的状态, 这表明菌体内部的储能物质 PHB 发挥作用, 维持着细菌的生长代谢需要, 细菌没有大量凋亡。同时在 4 轮驯化中细胞的凋亡速度有着明显的降



注: (A)为第 1 轮驯化; (B)为第 2 轮驯化; (C)为第 3 轮驯化; (D)为第 4 轮驯化。图 5 同。

图 4 OD_{600} 和 MMO 活性随培养时间的变化曲线

Fig.4 Change curves of OD_{600} and MMO activities with culture time

低, 并且每轮饥饿培养阶段结束后总细胞密度高于上一轮, 这表明胞内的储能物质 PHB 含量在不断提高, 驯化作用明显。在 4 轮的丰盛培养阶段中, 细胞密度都达到在 1.2 以上的高密度, 这表明共培养体系具有高密度培养的可行性, 从而可以提高 PHB 的产量。

2.3.2 菌体合成 PHB 含量的变化

采用紫外可见光光度仪器对胞内 PHB 含量进行测定, 使用恒重法测定细胞干重, 图 5 为 4 轮菌种驯化过程中细胞干重与 PHB 含量的变化。

在 4 轮的驯化过程中, 丰盛培养阶段时细菌生长繁殖旺盛, 细胞干重及 PHB 含量增长迅速, 完成了 PHB 的快速积累; 饥饿培养阶段时随着细菌的衰老死亡, 细胞干重逐

步下降, PHB 随着培养时间的增加缓慢消耗。从第 1 轮到第 4 轮, 细胞内 PHB 的含量不断提高, 从 11.76% 增加到 37.34%, 驯化效果明显; 这使得细菌的凋亡速度显著减低, 饥饿阶段结束后细胞干重仍保持较高水平。

2.4 驯化前后 PHB 产量的对比

分别选用驯化前的菌种和驯化后的菌种进行 PHB 定性分析对比。因为 PHB 属于聚酯类物质, 苏丹黑是亲脂性染色剂, 因此采用苏丹黑染色法, PHB 被染成蓝黑色。如图 6 和图 7 所示, 驯化后的细胞染色后, 蓝黑色部分明显高于驯化前, 表明胞内的 PHB 含量得到了显著提高, 驯化效果明显。

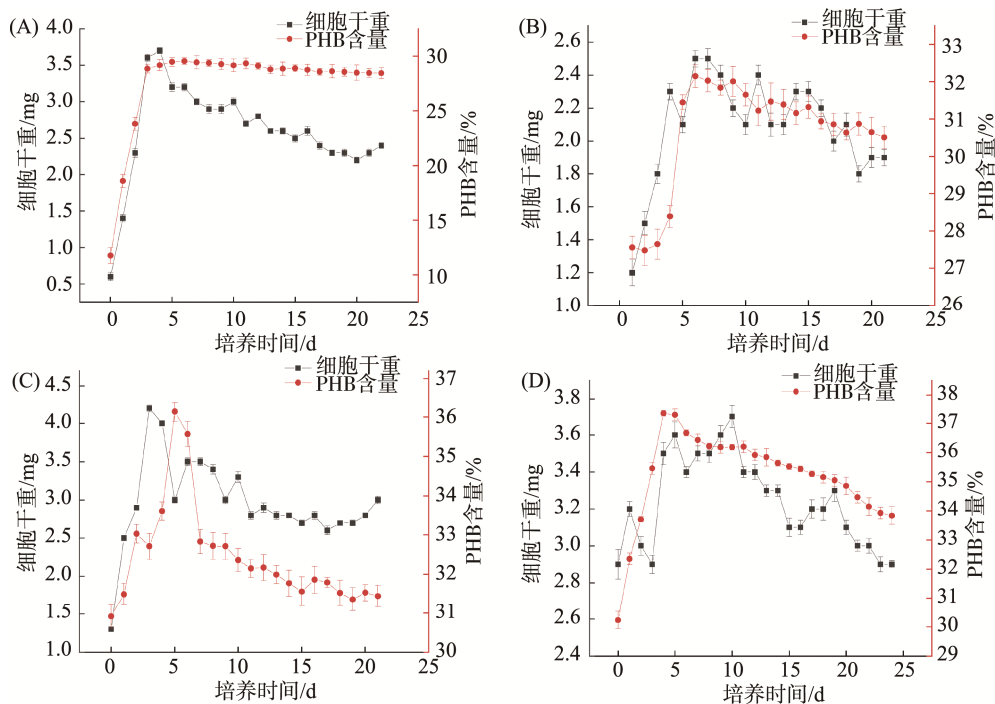


图 5 细胞干重与 PHB 含量随培养时间的变化曲线
Fig.5 Change curves of cell dry weight and PHB content with culture time

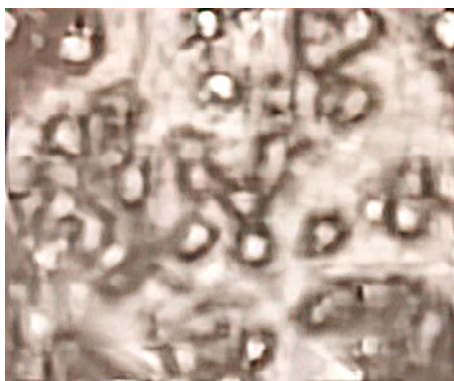


图 6 驯化前细胞 PHB 染色情况(1000 ×)
Fig.6 PHB staining of cells before domestication (1000 ×)

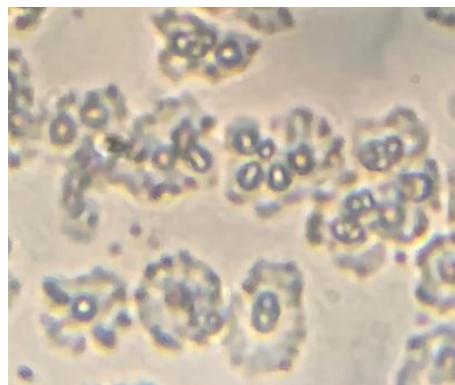


图 7 驯化后细胞 PHB 染色情况(1000 ×)
Fig.7 PHB staining of cells after domestication (1000 ×)

2.5 传代稳定性

对 4 轮驯化后的共培养体系进行 10 代开放式连续培养, 通过考察在相同的丰盛培养条件下 120 h 时细胞密度与 PHB 含量, 来探究驯化后体系的传代稳定性。培养结果如图 8 所示。

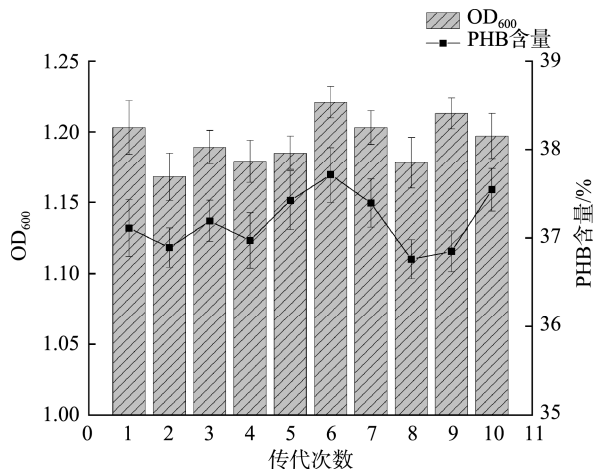


图 8 细胞密度与 PHB 含量随传代次数的变化曲线

Fig.8 Change curves of cell density and PHB content with culture time

由图 8 可知, 驯化后的共培养体系经 10 代传代培养后, 120 h 时 OD₆₀₀ 的平均值为 1.203, 标准差约为 0.02, PHB 含量平均值为 36.89% (w/w), 标准差为 0.3%。说明经驯化后的共培养体系生长及 PHB 含量具有稳定性。

3 结论

本研究主要通过对甲烷氧化菌与光合细菌的共培养体系进行 4 轮丰盛-饥饿间歇模式驯化培养, 目的是提高该体系的 PHB 产量, 通过紫外分光光度计对共培养体系每隔 24 h 进行细胞密度测定, 3 轮驯化培养结束后, 从丰盛培养阶段到饥饿培养阶段细胞凋亡的数量与速度大幅降低。表明在驯化的过程中, 胞内供能物质 PHB 的含量在不断提高以供给细胞的正常生长发育。在 4 轮丰盛-饥饿间歇模式驯化培养中, 每轮丰盛期细胞密度可达 1.2 以上, 饥饿期细胞密度下降速度显著降低, 细胞存活率高, 每 24 h 对 PHB 进行取样检测, 恒重法测定细胞干重, 紫外分光光度法测定 PHB 含量, 通过结果分析甲烷氧化菌和光合菌的共培养体系产生 PHB 的含量由 11.76% 增加到 37.34% (w/w), 驯化效果显著。通过苏丹黑染色法进行显微镜观察发现驯化后的胞内 PHB 含量显著高于驯化前。经过 10 次传代培养后的菌株生长情况与 PHB 含量变化波动小, 具有传代稳定性。

综上所述, 通过对甲烷氧化菌与光合细菌的共培养体系进行 4 轮丰盛-饥饿间歇模式驯化培养, 得到了细胞生长速度快、密度高, 传代稳定性良好, 可以进行开放条件

连续培养的 PHB 高产共培养体系, 为用作绿色食品包装的生物塑料合成提供了可用的良好菌株。

参考文献

- [1] XU P, YANG W, NIU D, *et al.* Multifunctional and robust polyhydroxyalkanoate nanocomposites with superior gas barrier, heat resistant and inherent antibacterial performances [J]. *Chem Eng J*, 2020, 382(2): 2–11.
- [2] BEUN JJ, DIRCKS K, LOOSDRECHT MCMV, *et al.* Poly-*b*-hydroxybutyrate metabolism in dynamically fed mixed microbial cultures [J]. *Water Res*, 2002, 36(5): 1167–1180.
- [3] MGE ALBUQUERQUE, CAV TORRES, MAM REIS. Polyhydroxyalkanoate (PHA) production by a mixed microbial culture using sugar molasses: Effect of the influent substrate concentration on culture selection [J]. *Water Res*, 2010, 44(11): 3419–3433.
- [4] YASHAVANTH PR, DAS M, MAITI SK. Recent progress and challenges in cyanobacterial autotrophic production of polyhydroxybutyrate (PHB), a bioplastic [J]. *J Environ Chem Eng*, 2021, 9(2): 105379.
- [5] ATIWESH G, MIKHAEL A, PARISH CC, *et al.* Environmental impact of bioplastic use: A review [J]. *Heliyon*, 2021, 7(115): e07918.
- [6] YUVARAJ D, IYYAPPAN J, GNANASEKARAN R, *et al.* Advances in bio food packaging-An overview [J]. *Heliyon*, 2021, 7(9): e07998.
- [7] LI F, YU HY, WANG YY, *et al.* Natural biodegradable poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) nanocomposites with multifunctional cellulose nanocrystals/graphene oxide hybrids for high-performance food packaging [J]. *J Agric Food Chem*, 2019, 67(39): 10954–10967.
- [8] MCADAM B, FOURNET MB, MCDONALD P, *et al.* Production of polyhydroxybutyrate (PHB) and factors impacting its chemical and mechanical characteristics [J]. *Polymers*, 2020, 12(12): 2908.
- [9] SAVENKOVA L, GERBERGA Z, NIKOLAEVA V, *et al.* Mechanical properties and biodegradation characteristics of PHB-based films [J]. *Process Biochem*, 2000, 35(6): 573–579.
- [10] ARUL M, KANNAN P, PUGAZHENTHI G. Preparation and characterization of environmentally safe and highly biodegradable microbial polyhydroxybutyrate (PHB) based graphene nanocomposites for potential food packaging applications [J]. *Int J Biol Macromol*, 2020, 154(3): 866–877.
- [11] ANISSA SS, JÉRÔME H, ROALD K, *et al.* Engineered methanotrophic syntrophy in photogranule communities removes dissolved methane [J]. *Water Res X*, 2021, 12(10): 100106.
- [12] MAI D, NGUYEN TT, LEE EY. The ethylmalonyl-CoA pathway for methane-based biorefineries: A case study of using *Methylosinus trichosporium* OB3b, an alpha-proteobacterial methanotroph, for producing 2-hydroxyisobutyric acid and 1,3-butanediol from methane [J]. *Green Chem*, 2021, 23(19): 7712–7723.
- [13] SIROHI R, LEE JS, YU BS, *et al.* Sustainable production of polyhydroxybutyrate from autotrophs using CO₂ as feedstock: Challenges and opportunities [J]. *Bioresour Technol*, 2021, 341(12): 125751.
- [14] BRIASSOULIS D, TSEROTAS P, ATHANASOULIA IG. Alternative

- optimization routes for improving the performance of poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) based plastics [J]. *J Clean Prod*, 2021, 318(12): 128555.
- [15] GR A, SG B, HM C, *et al.* Photoautotrophic poly(3-hydroxybutyrate) production by a wild-type *Synechococcus elongatus* isolated from an extreme environment [J]. *Bioresource Technol*, 2021, 337(12): 125508.
- [16] HA DVD, BUNDERVOET B, VERSTRAETE W, *et al.* A sustainable, carbon neutral methane oxidation by a partnership of methane oxidizing communities and microalgae [J]. *Water Res*, 2011, 45(9): 2845–2854.
- [17] HONG SG, HSU HW, YE MT. Thermal properties and applications of low molecular weight polyhydroxybutyrate [J]. *J Therm Anal Calorim*, 2013, 111(2): 1243–1250.
- [18] NASER AZ, DEIAB I, DARRAS BM. Poly(lactic acid) (PLA) and polyhydroxyalkanoates (PHAs), green alternatives to petroleum-based plastics: A review [J]. *RSC Adv*, 2021, 11(28): 17151–17196.
- [19] VARGHESE S, DHANRAJ ND, REBELLO S, *et al.* Leads and hurdles to sustainable microbial bioplastic production [J]. *Chemosphere*, 2022, 305(13): 135390.
- [20] AZMAN NH, KHAIRUL WM, SARBON NM. A comprehensive review on biocompatible film sensor containing natural extract: Active/intelligent food packaging [J]. *Food Control*, 2022, 141(10): 109189.
- [21] 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, 2013.
- DONG J. Biosynthesis of poly- β -hydroxybutyrate by methane-utilizing mixed culture [D]. Harbin: Harbin University of Commerce, 2013.
- [22] MOSHOOD TD, NAWANIR G, MAHMUD F, *et al.* Green product innovation: A means towards achieving global sustainable product within biodegradable plastic industry [J]. *J Clean Prod*, 2022, 363(13): 1–17.
- [23] KARKI S, GOHAIN MB, YADAV D, *et al.* Nanocomposite and bio-nanocomposite polymeric materials/membranes development in energy and medical sector: A review [J]. *Int J Biol Macromol*, 2021, 193(Pt.B): 2121–2139.
- [24] HILL EA, CHRISLER WB, BELIAEV AS, *et al.* A flexible microbial co-culture platform for simultaneous utilization of methane and carbon dioxide from gas feedstocks [J]. *Bioresource Technol*, 2017, 228(12): 250–256.
- [25] 江梅. 甲烷氧化菌和光合细菌共培养生产甲烷氧化菌素[D]. 哈尔滨: 哈尔滨商业大学, 2019.
- JIANG M. The production of methanobactin by methane oxidizing bacteria-photosynthetic bacteria co-culture [D]. Harbin: Harbin University of Commerce, 2019.
- [26] PATRICIA RR, TANIA L, GÓMEZ B, *et al.* Methanotroph-microalgae co-culture for greenhouse gas mitigation: Effect of initial biomass ratio and methane concentration [J]. *Chemosphere*, 2020, 259(12): 1–10.
- [27] ZHANG TT, ZHOU JT, WANG XW, *et al.* Coupled effects of methane monooxygenase and nitrogen source on growth and poly- β -hydroxybutyrate (PHB) production of *Methylosinus trichosporium* OB3b [J]. *J Environ Sci*, 2017, 52(2): 49–57.
- [28] 季爱云. 聚- β -羟基丁酸酯高产菌株的选育及发酵和提取工艺研究[D]. 青岛: 山东科技大学, 2010.
- JI AIY. Breeding, fermentation and extraction of high poly- β -hydroxybutyrate production strain [D]. Qingdao: Shandong University of Science and Technology, 2010.
- [29] 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*, 2014, 4(17): 71–75.
- LIU JM, WANG L, LI ZW, *et al.* Screening and 16SrDNA identification about poly- β -hydroxybutyrate production strain [J]. *Cere Oils Process*, 2014, 4(17): 71–75.
- [30] ALEKSANDRA G, PIOTR OP, MATEUSZ L. Recent trends in methane to bioproduct conversion by methanotrophs [J]. *Biotechnol Adv*, 2021, 53(10): 107861.
- [31] GOH K, HEISING JK, YUAN Y, *et al.* Sandwich architected poly(lactic acid)-graphene composite food packaging films [J]. *ACS Appl Mater Inter*, 2016, 8(15): 9994–10004.

(责任编辑: 韩晓红 张晓寒)

作者简介



王贵儒, 硕士研究生, 主要研究方向为生物催化。

E-mail: wgr9970@163.com



辛嘉英, 博士, 教授, 主要研究方向为生物催化。

E-mail: xinjiayingvip@163.com