

甲烷氧化细菌生物催化合成聚- β -羟基丁酸酯的分子量调控宋 昊^{1,3}, 张颖鑫^{1,2}, 辛嘉英^{1,2}, 夏春谷^{1*}

(1. 中国科学院兰州化学物理研究所 羰基合成与选择氧化国家重点实验室, 甘肃 兰州 730000;

2. 哈尔滨商业大学 食品科学与工程省重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150076;

3. 中国科学院研究生院, 北京 100039)

摘 要:在甲烷氧化细菌 *Methylosinus trichosporium* IMV3011 细胞内生物催化合成聚- β -羟基丁酸酯 (PHB) 的过程中, 对影响聚合物分子量的各种因素进行了研究. 发现碳源、培养基组分 NH_4^+ , NO_3^- , HPO_4^{2-} , Mg^{2+} , 某些导向 PHB 合成的关键中间产物以及 PHB 的提取方法均会对 PHB 的分子量产生影响. 同时, 通过对胞内 PHB 合成酶系中关键作用酶的活性变化进行研究, 发现 β -酮硫解酶催化着控制进入 PHB 循环入口的关键反应, 而 PHB 分子量的变化则主要取决于 PHB 合成酶和 PHB 降解酶的协同作用.

关 键 词: 聚- β -羟基丁酸酯 (PHB); 分子量; 甲烷氧化细菌

中图分类号: O643.32

文献标识码: A

PHB (聚- β -羟基丁酸酯) 是一种具有良好的生物可降解性和生物相容性的高分子材料, 可以广泛地应用于医药、食品包装、农业等领域^[1]. 目前, PHB 合成主要通过微生物发酵的方法, 已经取得了很大的突破^[2-4], 但该领域的研究焦点大多放在微生物发酵生产 PHB 的产量提高上, 而忽略了所生产的 PHB 的实用性. 通常, 由发酵过程获得的聚合产物分子量非常高, 只有经过进一步的改性才能得到实际应用. 聚合产物的平均分子量 (Molecular weight, M_w) 和分子量的分布对 PHB 的性质及其商业价值都有很重要的决定作用^[5]. 所以, 研究如何对经由生物过程合成的 PHB 的分子量进行调控是十分必要的.

Suzuki 等^[6]最早报道了对微生物合成 PHB 的分子量产生影响的因素. 他们在用甲醇培养的 *Protonobas extorquens* 细胞积累 PHB 的研究中发现, M_w 会随着不同的细胞生长阶段变化, 同时也受培养基 pH 的轻微影响. 随后, 他们陆续发现培养基组分 NH_4^+ , Mg^{2+} , PO_4^{3-} 以及不同碳源的使用均会对细胞内积累的 PHB 分子量有一定的影响^[7, 8]; Lee 等^[9]进一步证明了 pH 对菌种 *Aureobasidium pullulan* 所积累 PHB 的分子量具有显著的影响; Tai-di 等^[10]又对以不同碳源生长的不同菌种积累的

PHB 分子量进行了较为深入的研究. 此外, Zhang 等^[11]通过将同一菌株中的 PHB 合成路径分别克隆到 *Escherichia coli*, *Klebsiella aerogenes*, *Klebsiella oxytoca* 中, 可以成功地从 *K. aerogenes* 2688 (pJM9131) 和 *E. coli* JMU213 (pJM9131) 工程菌细胞中获得比原始菌分子量高得多的 PHB. 由此可见, 不同的菌种具有自己的特性, 能够调控或者影响其细胞内 PHB 分子量的因素是也不同的, 即使同一种菌株也会由于所处的培养环境和培养方式的差别, 使得细胞积累的 PHB 分子量呈现不同的变化规律. 此外, 对不同菌种采用不同的 PHB 提取方法也将会影响到获得的 PHB 的分子量^[12].

我们对甲烷氧化细菌 *Methylosinus trichosporium* IMV3011 胞内积累 PHB 的过程展开了一系列基础研究^[13-15], 取得了很大的进展. 然而, IMV3011 合成出来的 PHB 是否具有应用价值, 还需要对其相关性质进行研究. 分子量是影响 PHB 实用性的一个重要性质, 对于一般微生物而言, 细胞内合成的 PHB 分子量在一定范围内是可调控的, 然而, 关于调控甲烷氧化细菌类微生物合成 PHB 的分子量的研究还未见报道. 研究表明, 分子量相对较低 ($10^5 \sim 10^6$) 的 PHB 具有更好的生物可降解性, 可通过改性手段处理使其更具应用价值. 甲烷氧化细

收稿日期: 2012-01-16; 修回日期: 2012-02-07.

基金项目: 国家自然科学基金 (21133011) 资助项目.

作者简介: 宋昊, 女, 生于 1979 年, 助理研究员.

1) 通讯联系人: cgxia@lzb. ac. cn.

菌 IMV3011 细胞内积累的 PHB 分子量基本在 $10^5 \sim 10^6$ 的数量级范围内,为了更好的实现其应用价值,需要对其分子量调控进行深入研究. 本文中,我们利用 IMV3011 以廉价的甲烷、甲醇作为碳源,发酵生产分子量为 $10^5 \sim 10^6$ 的 PHB,并结合 PHB 胞内合成机理,对各种影响 PHB 分子量的因素及其调控进行了详细的研究.

1 材料和方法

1.1 菌种培养

Methylosinus trichosporium IMV3011 (简称 IMV3011), 俄罗斯微生物与病毒研究所赠送.

无机盐培养基(g/L): KH_2PO_4 (0.4), K_2HPO_4 (0.4), Na_2HPO_4 (0.4), CaCl_2 (0.024), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.3), NH_4Cl (0.5), NaCl (0.3), KNO_3 (1.6), EDTA (0.01), $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (5.23×10^{-4}), ZnSO_4 (2.4×10^{-4}), $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (2.88×10^{-4}), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (4×10^{-4}), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (4×10^{-3}), FeCl_3 (1×10^{-3}).

补料分批发酵培养^[15]: 2 L 无机盐培养基置于 5 L 全自动发酵罐(上海保兴, Biotech-2001)中. 初始接种量 10% (v/v). 34 °C 恒温培养, 使用 1 mol/L 氢氧化钠或 1 mol/L 盐酸调节 pH 值为 7.0 左右, 搅拌速率 300 r/min. 通入甲烷(50%) ~ 空气(50%)混合气体, 手动调节气体流速维持罐内溶氧饱和度为 50%. 为了避免甲醇对菌体生长造成抑制, 初始碳源浓度为 1 g/L, 发酵 96 h 后, 每隔 24 h 补料一次, 共 5 次, 每次加 200 mL 补料培养基(无氮源), 每次补料时, 同时补充 0.1% (v/v) 甲醇.

1.2 PHB 分析

PHB 含量测定: 采用气相色谱分析方法^[16], 40 mg 干细胞、20 mg 苯甲酸置于 4 mL 氯仿中, 在氯仿溶液中加入 4 mL 含 15% (V/V) H_2SO_4 的甲醇溶液, 100 °C 恒温油浴中(IKA RCT-basic, GER)消化 4 h. 迅速冷却至室温, 加入 4 mL 去离子水, 振荡 30 s, 快速混匀, 静置分相. 取下层溶液进行气相色谱(Agilent 6820)检测(内标法定量检测; SE-54 弹性石英毛细管柱: 30 m $\times$ 0.25 mm, 载气为高纯氮气, FID 检测器).

PHB 分子量测定: Waters 2695-2414 型 GPC 凝胶相色谱检测系统. 流动相: HPLC 级氯仿; 流速: 1 mL/min; 聚苯乙烯标样, 浓度: 0.1 mg/mL

氯仿.

1.3 酶活测定

离心收获菌体(9 000 r/min, 4 °C, 15 min), 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲溶液(pH 7.4)清洗菌体两次. 超声破碎(宁波新芝, JY92-II 型)得到菌体细胞(20 KHz, 4 °C, 30 s $\times$ 5, 150 W). 离心收集破碎后细胞(9 000 r/min, 4 °C, 45 min), 上清液(粗酶)用于酶活测定. 经检测, 离心后的细胞残留固体物质中无酶活表现.

β -酮硫解酶(β -Ketothiolase)活性^[17, 18]: 取 1.5 mL 浓度为 10 mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲溶液(pH 7.9), 加入 40 mmol/L MgCl_2 , 1 mmol/L 二硫苏糖醇(DTT), 50 μL 浓度为 3.5 mmol/L 的 CoA, 10 μL 浓度为 10 mmol/L 的乙酰乙酰 CoA 和 10 μL 粗酶液. 该混合溶液用蒸馏水稀释至 3 mL. 该反应液在 30 °C 反应 2 min, 采用紫外可见分光光度计(HP 8453)测定 D303 下乙酰乙酰 CoA 浓度的减少.

乙酰乙酰-CoA 还原酶(Acetoacetyl-CoA reductase)活性^[19]: 取 1.5 mL 浓度为 100 mmol/L 的磷酸钾缓冲溶液(pH 5.5), 加入 0.12 mL 浓度 0.25 mmol/L 的 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.1 mL 浓度为 12.5 mmol/L 的二硫苏糖醇(DTT), 0.1 mL 浓度为 6.0 mmol/L 的 NADPH, 10 μL 浓度为 10 mmol/L 的乙酰乙酰 CoA 和 0.1 mL 粗酶液. 该混合溶液用蒸馏水稀释至 3 mL. 从加入乙酰乙酰 CoA 开始反应 3 min, 在 D340 进行紫外光谱检测.

PHB 合成酶(PHB synthase)^[20]: 取 1.5 mL 浓度为 25 mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲溶液(pH 7.5), 加入 1 mmol/L 的 5,5'-二硫代双-2-硝基苯甲酸(DTNB), 10 μL 浓度为 30 mmol/L 的 D-3-羟基丁酸 CoA 和 50 μL 粗酶液. 该混合溶液用蒸馏水稀释至 3 mL. 从加入粗酶液开始, 30 °C 反应 3 min, 在 D412 进行紫外光谱检测.

上述三种酶活力计算单位定义为: $1\text{U} = 1 \mu\text{mol}/\text{min}/(\text{mg protein})$.

PHB 降解酶(PHB depolymerase)^[21]: 50 mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲溶液(pH 8.0)中含有浓度为 1 mmol/L 的 CaCl_2 , 加入含 150 μg PHB 颗粒/mL 的粗酶液. 在 D650 进行紫外光谱检测. 酶降解活力计算单位定义为: $1\text{U} = 1 \mu\text{g}/\text{min}/(\text{mg protein})$.

蛋白含量测定: 考马斯亮蓝 G-250 法.

酶活分析中所用各种酶及生化试剂均购自 Sigma. 其它试剂均为分析纯.

2 结果与讨论

2.1 补料分批发酵培养过程中 PHB 分子量变化

一般微生物合成 PHB 的分子量并不是一直保持同一水平的,会随着细胞生长进入不同阶段而有一个变化的过程^[22]. 为了深入研究不同生长阶段对胞内的 PHB 分子量的影响,在补料分批发酵培养过程中连续监控了细胞生长量、PHB 积累量和 PHB 分子量等重要参数.

在补料分批发酵的培养过程中(图 1、图 2),可以看出 PHB 的含量和分子量在细胞进入对数生长期后(48~96 h)有一定程度的降低,说明在细胞迅速生长的初期,碳源消耗很快,细胞内含物 PHB 可作为辅助碳源,发生降解,供给细胞生长,造成体系中 PHB 含量和分子量的降低. 随后,随着细胞的迅速生长,PHB 含量和分子量也迅速增加. 在生长平衡期,三个参数均处于相对稳定的峰值状态. 当培养进行至 360 h 之后,菌体进入衰亡期,胞内的 PHB 也会随着菌体的衰亡而发生降解,胞内聚合物的分子量开始逐渐下降.

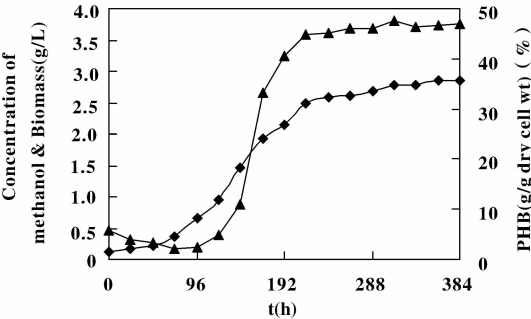


图 1 补料分批发酵培养过程中的细胞生长量和 PHB 含量曲线

Fig. 1 Time courses of biomass, PHB concentration in the fed-batch fermentation
◆ Biomass ▲ PHB

值得注意的是,由于接种细胞的浓度和分子量的影响,最终合成的 PHB 分子量也会受到一定的影响. 如果选择生长状态较差的细胞接种体,在富营养条件下,由于胞内 PHB 消耗所提供的 NADH 不足以供给细胞迅速生长的需要,在此种情况下会导致胞内 PHB 完全消耗,待细胞生长速度减缓后再开始积累,因而在短时间内不能获得稳定分子量的 PHB. 因此,保证接种细胞处于较好的生长状态是十分必要的.

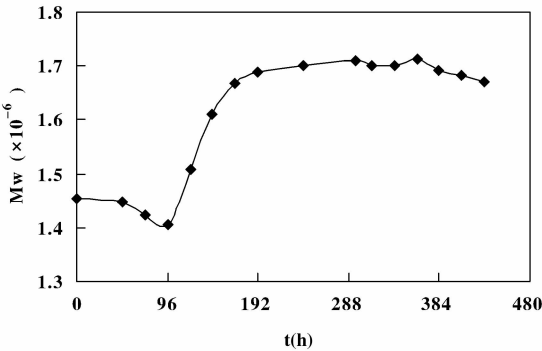


图 2 补料分批发酵培养过程中的 PHB 分子量变化曲线
Fig. 2 Change of molecular weight during the fed-batch fermentation course

2.2 提取方法对分子量的影响

除了细胞自身性质对分子量的影响,在提取过程中对细胞的处理方法不同,对胞内 PHB 的分子量也有不同程度的影响. Hahn 等^[12]发现对于 *A. eutrophus* 和重组 *E. coli* 采用次氯酸钠处理细胞提取 PHB 时,前者的 PHB 部分发生降解,平均分子量降低,而后者则没有发生降解;而用次氯酸钠-氯仿法处理时,两者获得的 PHB 的分子量都同样降低,可见处理方法对最终获得的 PHB 的分子量是有一定影响的. 本研究中,我们对比了进行超声破碎和未进行超声破碎的细胞所积累的 PHB 的分子量差别. (处理方法:离心收集细胞,−80 ℃冻融,超声破碎:功率 80 W,超声 10 s,间隔 7 s,反复 80 次).

表 1 PHB 提取方法对分子量的影响		
Table 1 Effect of sonication recovery methods on Mw of PHB		
	Mw	Inhomogeneity
A	9.68×10^5	1.36
B	1.71×10^6	1.11

A: recovery of PHB from cells without sonication;
B: recovery of PHB from cells sonicated.

根据 IMV3011 细胞的结构特点,我们在提取 PHB 时,先对细胞进行超声破碎,再抽提胞内的 PHB,得到的 PHB 分子量与未经超声破碎的细胞中的 PHB 分子量做对比,结果如表 1 所示. 可以看出,经过超声破碎的细胞中的 PHB 不仅不会因为超声破碎的作用发生降解,反而比未经超声破碎的细胞中的 PHB 分子量略高. 这可能是因为经过超声破碎处

理后,细胞中的高分子量 PHB 更容易抽提出来,而对于未经超声破碎的细胞,由于抽提方法的限制有些分子量较高的 PHB 分子不易被抽提出来,因此造成收率偏低,导致测得的分子量有偏差.

2.3 菌体培养条件对 PHB 产物分子量的影响

2.3.1 培养基组成对分子量的影响 将菌体分别接入含有不同浓度 NH_4^+ , NO_3^- , HPO_4^{2-} , Mg^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} 的培养基中进行发酵培养,收集生长稳定期的细胞,提取 PHB 进行分子量测定. 据文献报道,在甲基菌 *Pseudomonas*135 的培养过程中,培养基组分 NH_4^+ , Mg^{2+} , HPO_4^{3-} 的缺乏对于 PHB 的分子量有很大的影响^[7]. 在对 IMV3011 的研究中发现,培养基中的某些组分的浓度对 PHB 的分子量也有较大影响(图 3, 图 4).

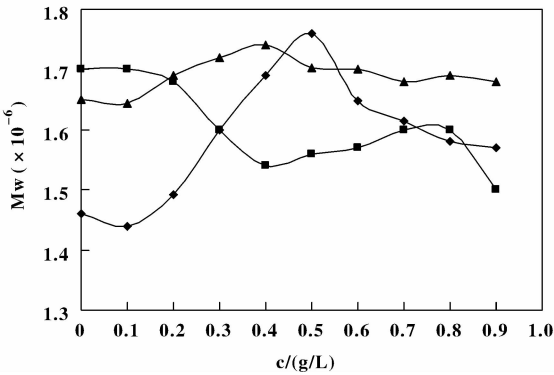


图 3 培养体系中 NH_4^+ , Mg^{2+} , HPO_4^{2-} 对 PHB 分子量的影响

Fig.3 Effect of NH_4^+ , Mg^{2+} , and HPO_4^{2-} on Mw of PHB

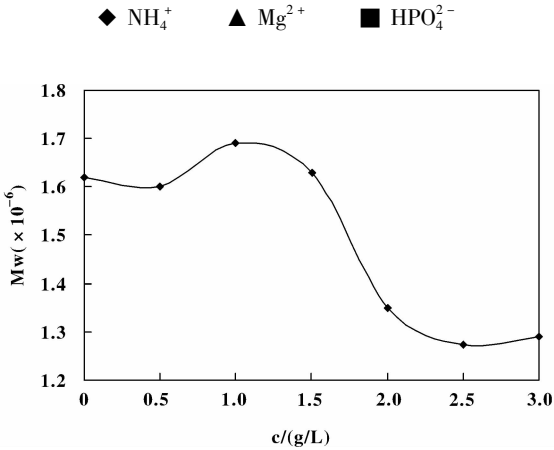


图 4 培养体系中 NO_3^- 对 PHB 分子量的影响

Fig.4 Effect of NO_3^- on Mw of PHB

分的浓度变化呈现出一定的变化规律. NH_4^+ 浓度偏低的培养基中收获的 PHB 的 Mw 也较低 ($< 1.5 \times 10^6$), 随着体系中的 NH_4^+ 浓度增加, Mw 值也不断上升, 可达到 1.75×10^6 , 随后 Mw 值反而会随着 NH_4^+ 浓度的进一步增加而下降. Mg^{2+} 也有与 NH_4^+ 类似的变化趋势, 其浓度受到一定限制时 PHB 的 Mw 值略低, 大约在 1.65×10^6 左右, Mw 值会随着 Mg^{2+} 浓度的增加略微上升, 但其影响的程度远不如 NH_4^+ 显著. NO_3^- 也具有同样的影响, Mw 值在所选择的浓度范围内最高可接近 1.7×10^6 , 但随着 NO_3^- 浓度增加, Mw 值下降程度剧烈, 最低至 1.28×10^6 . 具有上述影响的原因可能是由于过低或者过高浓度的营养元素会对体系中的菌体生长和 PHB 合成酶的活性造成一定的抑制. 而体系中 HPO_4^{2-} 浓度对 PHB 分子量的影响趋势则与上述两种离子完全相反, 在 HPO_4^{2-} 浓度偏低时, PHB 的 Mw 值较高, 随着 HPO_4^{2-} 浓度的增大, Mw 值将从 1.7×10^6 下降至 1.55×10^6 左右, 随后又有缓慢的升高. 同时, 不同浓度的 Fe^{3+} 和 Cu^{2+} 对于 PHB 产物分子量的影响并没有呈现出像前面几种组分那样明显的作用规律. 从实验结果可以看出, 培养基的营养结构对 PHB 的分子量是具有一定影响的, 但其对分子量的影响和对细胞生长及 PHB 含量的高低并不具有必然的相关性, 其作用机制还在进一步的探索之中.

2.3.2 不同碳源对 PHB 分子量的影响 在甲烷正常供给下, 向体系中分别加入相当于 0.10% (v/v)/d 甲醇碳摩尔量的乙醇、β-羟基丁酸酯、甲酸、葡萄糖等碳源, 对在这些碳源存在下所培养的细胞积累 PHB 的产量和分子量进行了考察. 如同添加高浓度甲醇后的作用一样, 虽然 β-羟基丁酸酯、甲酸、葡萄糖可以被细胞利用积累 PHB, 但由于其对甲烷氧化细菌细胞的生长并没有明显的积极作用, 从而严重影响到细胞合成 PHB 的能力 (PHB 含量在 2% ~ 9%), 导致 PHB 的分子量很低. 而乙醇则完全不能供给细胞生长. 以上结论表明, 对于甲烷氧化细菌来讲, 其所能利用的碳源以甲烷和甲醇为主, 其它对细胞生长不利的碳源, 因为不能维持细胞的正常生长, 进而使胞内各种相关酶活受到抑制, 致使 PHB 产量和分子量很低, 而不适用于生产 PHB.

这与营养不平衡条件下培养菌体有本质的区

如图 3 和图 4 所示, PHB 分子量随各种营养组

别. 营养受限条件下虽然对细胞生长有一定的影响, 但是这种环境下却能使 PHB 合成酶系的各种酶保持较高的活性. 一般在没有外界物质干扰的情况下, 胞内的各种酶活性水平基本保持不变, 因此合成的 PHB 的分子量也是固定的. 而如果细胞所处的环境发生改变, 那么相应的各种酶活性也会发生不同程度的改变. 比如, 碳源量充足而氮源不足, 则形成 PHB 的小分子片段相应也较多, PHB 合成酶的活性较高, 则利于高分子量 PHB 的形成; 如果碳源量不足, PHB 合成酶的活性较低, 则更易于低分子量 PHB 的形成; 而如果碳源对细胞生存不利, 不管碳源量是否充足, 各种酶的活性均会受到抑制, 合成 PHB 和聚合 PHB 小分子片段的能力都将被削弱.

2.3.3 导向 PHB 合成的关键中间产物对 PHB 分子量的影响 在已有的研究中发现, 在甲烷氧化细菌积累 PHB 的培养体系中引入 TCA 循环中的关键中间体, 会对 TCA 循环产生明显的影响, 从而间接调控 PHB 循环, 对胞内积累的 PHB 含量产生显著影响^[15]. 在本研究中, 分别向发酵体系中添加最适浓度的柠檬酸(0.3 g/L)、 α -酮戊二酸(0.05 g/L)、琥珀酸(0.2 g/L)、苹果酸(0.2 g/L)、丙二酸(0.05 g/L)、乙酸铵(0.1 g/L)、乙酸钠(0.1 g/L), 测定聚合产物的分子量.

由表 2 中的结果可以看出, 对比不添加任何导向物质的发酵培养过程 (blank), 对 PHB 合成比较有利的几种物质的添加, 的确会使 PHB 的分子量受到一定的影响. 柠檬酸、苹果酸、乙酸钠等的加入可使体系中与 PHB 合成相关的酶活性有所提高, 获得的 PHB 的分子量就会相应的增高; 而丙二酸、乙酸铵等物质的加入, 因为其对细胞生长具有比较强烈抑制作用, 所以对 PHB 积累也没有明显促进作用, 甚至加速了胞内 PHB 的降解, 使得分子量下降.

柠檬酸是 TCA 循环中的第一个重要中间产物, 体系中存在过量的柠檬酸会抑制柠檬酸合成酶的活性, 从而减少柠檬酸的转化, 这将会阻止乙酰-CoA 进入 TCA 循环, 而进入 PHB 循环, 参加 PHB 的合成. 另一方面, TCA 循环被抑制, 体系中游离 CoA 的浓度则会减少, 这会减轻高浓度 CoA 对 β -酮硫解酶的抑制, 大量的乙酰乙酰 CoA 会经由 β -酮硫解酶的催化而产生, 同时, 大量的 β -羟基丁酸单体也会经由 PHB 合成循环路径产生. 因而, 柠檬酸对

PHB 的合成是具有有利影响的. 苹果酸是 TCA 循环最后一步反应的底物, 这个反应过程会产生大量的 NADH. NADH 会显著促进细胞的新陈代谢. 添加高浓度的苹果酸会使体系中产生大量的 NADH, 过量的 NADH 也会使 TCA 循环中的关键酶活性受到抑制, 更多的乙酰-CoA 将进入 PHB 循环参加 PHB 的合成, 使得 PHB 循环中相关酶活性得到提高.

表 2 TCA 循环中导向 PHB 合成的关键中间体对 PHB 分子量的影响

Table 2 Effect of crucial intermediate on Mw of PHB accumulated in IMV 3011

Additon ^[a]	Mw ($\times 10^{-6}$) ^[b]
Blank	1.70
Citric acid	1.79
α -Ketoglutaric acid	1.65
Succinic acid	1.74
Malic acid	1.83
Malonic acid	0.64
Ammonium acetate	0.73
Sodium acetate	1.81
All above	0.88

- a. Substrate added at an optimum concentration;
- b. Mw (10^{-6}) of PHB recovered from the harvest cells cultivated at the stationary phase.

可以看出, 乙酰-CoA 对 TCA 循环和 PHB 循环都具有关键性的作用, 乙酰-CoA 进入 TCA 和 PHB 循环的比例对于体系中 PHB 的积累是有至关重要的作用的. 在体系中添加高浓度的乙酸钠, 乙酸根会结合游离的 CoA, 生成大量的乙酰-CoA. 足量的乙酰-CoA 不仅能够进入 TCA 循环供给细胞进行正常的生长代谢, 同时也能够减轻游离 CoA 对 β -酮硫解酶的抑制作用, 促进体系中乙酰乙酰-CoA 的大量生成^[23-25]. 乙酰乙酰 CoA 能够促进 PHB 聚合物前体物质 β -羟基丁酸的大量生成. 因而, PHB 合成循环中关键作用酶的活性都会因乙酸钠的加入而升高, 促进 PHB 的进一步合成.

2.4 PHB 中关键酶活与 PHB 分子量的关系

外界培养环境对 PHB 的分子量有很重要的影响作用, 最根本的原因是环境的变化对细胞内部各

种酶活性的影响所致. 在 PHB 的合成过程中, 直接对 PHB 合成起作用的是胞内 PHB 循环路径(图 5) 中的各种酶, 包括 β-酮硫解酶 (β-ketothiolase)、乙酰乙酰-CoA 还原酶 (acetoacetyl- CoA reductase)、PHB 合成酶 (PHB synthase) 和 PHB 降解酶 (PHB depolymerase).

表 3 中显示了在发酵培养的各生长阶段, 各种关键酶活性的变化情况. 在 PHB 的合成过程中, 这几种关键酶并不是独立存在的, 而是在同一个循环体系中互相协调配合, 共同完成这一循环中的一系列反应.

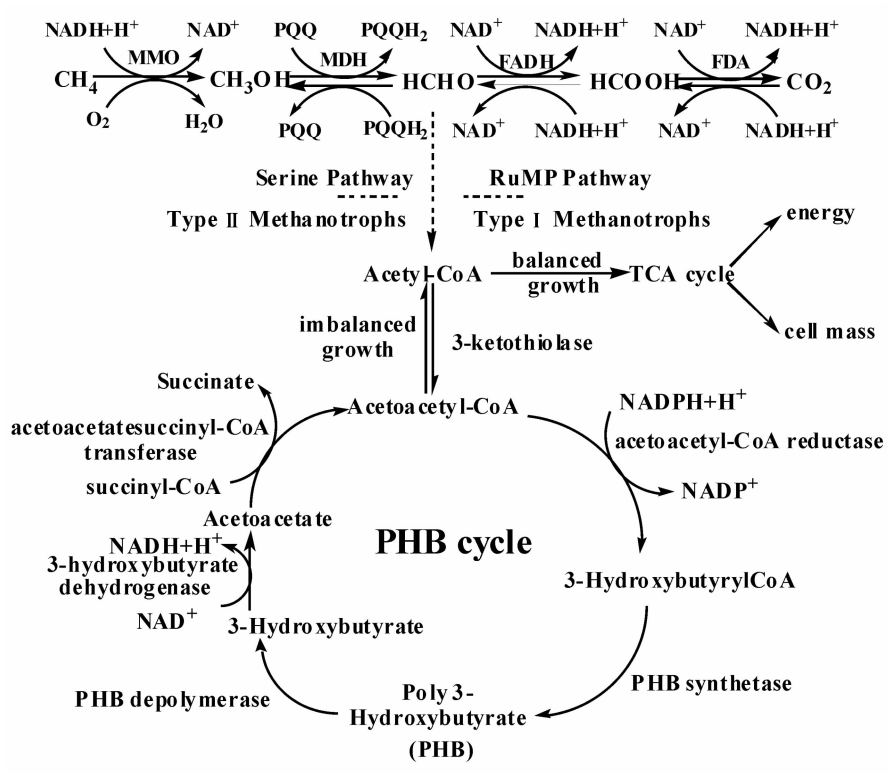


图 5 甲烷氧化细菌胞内 PHB 合成的循环代谢路径
Fig.5 Metabolism pathways of PHB cycle in the Methanotrophic bacteria

表 3 PHB 合成路径中关键酶活性对 PHB 分子量的影响
Table 3 Effects of activities of key enzymes on Mw of PHB

The course of fermentation ^a (h)	Concentration of Biomass (dry cells g/L)	PHB (% , w/w of dry cells)	β-Ketoth- iolase (U)	Acetoacetyl-CoA reductase (U)	PHB Synthetase (U)	PHB Depolymerase (μg/min/mg protein)	Mw (× 10 ⁻⁶ Da)
48	0.19	3.4	0.029	0.020	7.7 × 10 ⁻³	4.34	1.45
96	0.66	2.6	0.085	0.051	9.4 × 10 ⁻³	3.21	1.40
144	1.47	11.1	0.079	0.048	0.031	10.46	1.61
288	2.71	46.1	9.1 × 10 ⁻³	0.017	0.042	13.02	1.71
384	2.72	46.3	7.1 × 10 ⁻³	0.011	0.030	14.86	1.68

a. The course of fermentation; Lag phase (0 ~ 48 h); Logarithmic phase (48 ~ 240 h); Stationary phase (240 ~ 384 h)

在生长停滞期, 细胞代谢缓慢, 所有的酶活都非常低. 进入对数生长期, 起初菌体迅速生长, 但

PHB 还未开始大量积累,碳源消耗非常快,所以接种体细胞中的 PHB 将被作为辅助碳源而发生降解,所以,此时的分子量表现为有微小的下降. β -酮硫解酶是催化乙酰-CoA 进入 PHB 循环的重要反应,在整个对数生长期,随着 PHB 的快速积累,可以看到 β -酮硫解酶的活性在此阶段都比较高,大量乙酰-CoA 会经由 β -酮硫解酶催化进入 PHB 循环,参加 PHB 合成. 而在这个阶段中,PHB 迅速积累,体系中 PHB 含量迅速增大,但 PHB 合成酶的活性表现相对较低,PHB 分子量也相对较小,说明此时胞内积累的 PHB 是以短链形式存在的. 随着短链 PHB 的进一步聚合,当细胞生长进入稳定阶段,此时, β -酮硫解酶已经完成了控制进入 PHB 循环入口的关键反应,此时细胞主要由 PHB 合成酶调控发生聚合,PHB 合成酶的活性逐渐增大,保持在较高水平,而 β -酮硫解酶和乙酰乙酰-CoA 还原酶的催化活性则逐渐减弱. 在此过程中,PHB 的分子量也持续升高. 而当细胞基本完成聚合,分子量分布相对均匀后,PHB 合成酶的活性也会逐渐降低. 由此表明,PHB 合成酶对 PHB 分子量的影响作用更明显. 同时,也可以看到,PHB 降解酶的活性也会

随着 PHB 的不断积累而升高. 对这几种关键酶活性的变化情况进行分析,推断 PHB 的分子量变化主要是由 PHB 合成酶和 PHB 降解酶的联合作用决定的.

在 PHB 积累的过程中,这两种酶活性同步升高,这表明在 PHB 循环中,PHB 的聚合和降解其实是同步发生的. 在细胞的生长稳定期,PHB 分子量达到最大值,且保持较长时间. 在细胞培养末期,分子量缓慢下降,这是因为随着细胞的衰亡,PHB 也发生了进一步的降解. 此时,PHB 合成酶的活性逐渐下降,而 PHB 降解酶在整个循环体系中开始扮演主要角色.

从表 4 所示数据可以看出,某些 TCA 循环中导向 PHB 合成的关键中间产物的引入对 PHB 的分子量也有轻微的影响,添加柠檬酸、苹果酸、琥珀酸和乙酸钠均会使 PHB 分子量有相应的提高. 考察相应的关键酶活性,发现相对于无添加的情况,体系中 PHB 合成酶的活性均有所提高,同时,PHB 降解酶的活性也伴随 PHB 合成酶相应的增大. 这也从另一个侧面证明了 PHB 的合成过程主要是由 PHB 合成酶和 PHB 降解酶的联合作用决定的.

表 4 TCA 循环中导向 PHB 合成的关键中间体对关键酶活性的影响
Table 4 Effects of different additions on Mw of PHB

	PHB Synthetase (U)	PHB Depolymerase($\mu\text{g}/\text{min}/\text{mg protein}$)	Mw ($\times 10^{-6}$ Da)
No addition	0.042	13.02	1.71
Citric acid	0.068	16.97	1.79
Succinic acid	0.076	15.63	1.74
Malic acid	0.087	18.47	1.83
sodium acetate	0.067	13.61	1.81

由上述讨论可以推断,尽管分子量的提高主要依赖于 PHB 合成酶的作用(图 6),细胞要完成自身的代谢还是必须依赖其它几种酶的协同作用. β -酮硫解酶控制进入 PHB 循环的入口,其活性越高,为提高 PHB 的积累量的准备越充分,同时也会有相应的部分开始进入 PHB 的聚合. 当能够利用的碳源基本进入 PHB 循环后,随着短链 PHB 的大量形成,此时其它几种与 PHB 合成相关的酶的活性已开始逐渐降低,PHB 合成酶的活性呈现最高,它的活性高低对 PHB 的分子量有很重要的决定意义,

活性越高分子量相对也就会较高. 在 PHB 的积累过程中,PHB 解聚酶也一直在发挥自己的作用,它随着 PHB 合成酶活性的增加而增加,可以说,在细胞体内,PHB 的聚合反应和解聚反应一直是同时存在的,因此不会出现 PHB 的分子量一直持续增大的状态. 当细胞进入生长稳定期,胞内 PHB 的分子量也保持在一个稳定的状态,说明此时,PHB 的聚合和解聚实际上也达到了一个平衡状态. 当外界能量供应不足时,PHB 解聚酶便开始发挥主要作用,伴随着细胞中的 PHB 分子量的降低. 所以,要实现

更高分子量 PHB 的合成，也可以通过适当抑制 PHB 解聚酶的活性来实现。

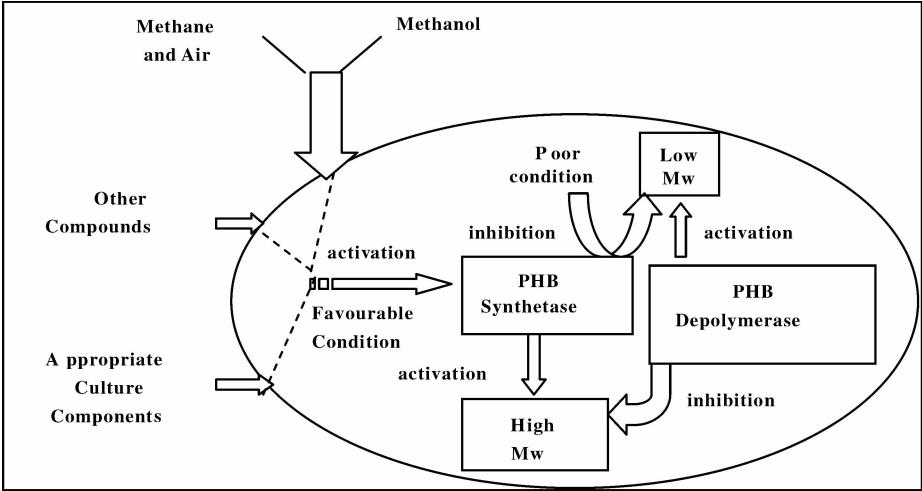


图 6 调控 PHB 分子量的主要因素
Fig. 6 Proposed essential factors to control Mw of PHB

3 结 论

微生物可以在细胞内积累分子量在 10^6 数量级以上的高分子量 PHB，而分子量过高会影响到 PHB 的实用性。在对甲烷氧化细菌 IMV3011 的研究中发现，细胞内可合成分子量在 $10^5 \sim 10^6$ 的 PHB，如果能调控分子量保持在此范围内，将获得具有实用价值的 PHB，因此，对该菌种积累的 PHB 分子量的影响因素进行研究，对其生产应用更具实际意义。对培养环境各方面因素进行考察，发现碳源、不同浓度的培养基组成以及 TCA 循环中的某些关键中间产物都会对胞内 PHB 的分子量产生影响，所以，可以通过适当调节细胞的生长环境来实现 PHB 分子量在一定范围内的调控。同时，通过对胞内 PHB 合成酶系中各种酶的作用规律进行研究，发现 PHB 分子量的变化主要取决于 PHB 合成酶和 PHB 降解酶的协同作用。影响 PHB 分子量的本质原因在于胞内 PHB 合成酶系和微生物本身之间的“配合”。能够积累 PHB 的微生物的 PHB 合成酶系都具有自己的特点，其活性也相应的受到所在微生物体系的控制，两者相辅相成又互相制约，这就决定了每种具有 PHB 合成酶系的微生物积累 PHB 的能力以及分子量在一定范围内是可以调控的。调节适宜的细胞的生长环境，是调控胞内合成 PHB 分子量的前提，我们的研究提供了必要的基础准备，对实现微生物合成目标分子量的 PHB 具有一定的指导意义，而要真正实现指定范围内分子量的调控，则需要系

统掌握胞内合成 PHB 的代谢规律，进行更加深入细致的研究。

参考文献：

[1] Ikada Y, Tsuji H. Biodegradable polyesters for medical and ecological applications[J]. *Macromol. Rapid Commun.*, 2000, **21**: 117 – 132

[2] Bitar A, Underhill S. Effect of ammonium supplementation on production of poly-β-hydroxybutyric acid by *Alcaligenes eutrophus* in batch culture [J]. *Biotechnol. Lett.*, 1990, **12**: 563 – 568

[3] Lee J H, Lee Y W, Yoo Y J. Effect of osmotic pressure of salts on growth of *Torula sp.* and erythritol production [J]. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1992, **20**: 668 – 676

[4] Rhee Y H, Jang J H, Rogers P L. Production of copolymer consisting of 3-hydroxybutyrate and 3-hydroxyvalerate by fed-batch culture of *Alcaligenes sp.* SH-69 [J]. *Biotechnol. Lett.*, 1993, **15**: 377 – 382

[5] Sung H Y, Young J Y. Effect of pH on the molecular weight of poly-3- hydroxybutyric acid produced by *Alcaligenes sp*[J]. *Biotechnol. Lett.*, 1995, **17**: 389 – 394

[6] Suzuki T, Deguchi H, Yamane T, *et al.* Control of molecular weight of poly-3-hydroxybutyric acid produced in fed-batch culture of *Protomonas extorquens*[J]. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1988, **27**: 487 – 491

[7] Daniel M, Choi J H, Kim J H, *et al.* Effect of nutrient deficiency on accumulation and relative molecular weight of poly-3-hydroxybutyric acid by methylotrophic bacteri-

- um Pseudomonas* 135[J]. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1992, **37**: 702 – 706
- [8] Shimizu H, Tamura S, Shioya S, *et al.* Kinetic study of poly-D(-)-3- hydroxybutyric acid (PHB) production and its molecular weight distribution control in a fed-batch culture of *Alcaligenes eutrophus* [J]. *J. Ferment Bioeng.*, 1993, **76**: 465 – 469
- [9] Lee K Y, Yoo Y J. Optimization of pH for high molecular weight pullulan[J]. *Biotechnol. Lett.*, 1993, **15**: 1 021 – 1 024
- [10] Taidi B, Anderson A J, Dawes E A, *et al.* Effect of carbon source and concentration on the molecular mass of poly (3-hydroxybutyrate) produced by *Methylobacterium extorquens* and *Alcaligenes eutrophus* [J]. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1994, **40**: 786 – 790
- [11] Zhang H, Obias V, Gonyer K, *et al.* Production of poly-hydroxyalkanoates in sucrose-utilizing recombinant *Escherichia coli* and *Klebsiella* strains[J]. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1994, **60**: 1 198 – 1 205
- [12] Hahn S K, Chang Y K, Lee S Y. Recovery and characterization of poly (3- hydroxybutyric acid) synthesized in *Alcaligenes eutrophus* and recombinant *Escherichia coli* [J]. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1995, **61**: 34 – 39
- [13] Zhang Y X, Xin J Y, Chen L L, *et al.* Biosynthesis of poly-3-hydroxybutyrate with a high molecular weight by methanotroph from methane and methanol[J]. *J. Natur. Gas. Chem.*, 2008, **17**: 103 – 109
- [14] Zhang Ying-xin(张颖鑫), Xin Jia-ying(辛嘉英), Song Hao(宋昊), *et al.* Effect of Organic Acids on Biosynthesis of Poly-3-Hydroxybutyrate of *Methylosinus Trichosporium* IMV3011[J]. *J. Mol. Catal. (China) (分子催化)*, 2009, **23**: 298 – 303
- [15] Song H, Xin J Y, Zhang Y X, *et al.* Poly-3-hydroxybutyrate production from methanol by *Methylosinus trichosporium* IMV3011 in the non-sterilized fed-batch fermentation[J]. *Afr. J. Micro. Res.*, 2011, **5**: 5 022 – 5 029
- [16] Riis V, Mai W. Gas chromatographic determination of poly- β -hydroxybutyric acid in microbial biomass after hydrochloric acid propanolysis [J]. *J. Chromatogr. A.*, 1988, **445**: 285 – 289
- [17] Volova T G, Kalacheva G S, Gorbunova O V, *et al.* Dynamics of activity of the key enzymes of polyhydroxyalkanoate metabolism in *Ralstonia eutropha* B5786[J]. *Appl. Biochem. Microbiol.*, 2004, **40**: 170 – 177
- [18] Oh D H, Chung C W, Kim J Y, *et al.* Partial purification and characterization of β -Ketothiolase from *Alcaligenes sp. SH-69* [J]. *J. Microbiol.*, 1997, **35**: 360 – 364
- [19] Senior P J, Dawes E A. The regulation of poly- β -hydroxybutyrate metabolism in *Azotobacter beijerinckii* [J]. *Biochem. J.*, 1973, **134**: 225 – 238
- [20] Jossek R, Reichelt R, Steinbchel A. In vitro biosynthesis of poly (3- hydroxybutyric acid) by using purified poly (hydroxyalkanoic acid) synthase of *Chromatium vinosum* [J]. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1998, **49**: 258 – 266
- [21] Doronina N V, Ezhov V A, Trotsenko Yu A. Growth of *Methylosinus trichosporium OB3b* on methane and poly- β -hydroxybutyrate biosynthesis[J]. *Appl. Biochem. Microbiol.*, 2008, **44**: 182 – 185
- [22] Chen G Q, Page W J. The effect of substrate on the molecular weight of poly- β - hydroxybutyrate produced by *Azotobacter Vineland II UWD* [J]. *Biotechnol. Lett.*, 1994, **16**: 155 – 160
- [23] Dawes E A, Senior P J. The role of energy reserve polymers in microorganisms [J]. *Adv. Microb. Physiol.*, 1973, **10**: 135 – 266
- [24] Oeding V, Schlegel H G. β -Ketothiolase from *Hydrogenomonas eutropha H16* and its significance in the regulation of poly- β -hydroxybutyrate metabolism[J]. *Biochem J.*, 1973, **134**: 239 – 248
- [25] Yamane T. Yield of poly-D(-)-3-hydroxybutyrate from various carbon sources; A theoretical study[J]. *Biotechnol. Bioeng.*, 1993, **41**: 165 – 170

Study on Molecular Weight of Poly- β -hydroxybutyrate Biosynthesized by *Methylosinus Trichosporium* IMV3011

SONG Hao^{1,3}, ZHANG Ying-xin^{1,2}, XIN Jia-ying^{1,2}, XIA Chun-gu^{1*}

- (1. *State Key Laboratory for Oxo Synthesis & Selective Oxidation, Lanzhou Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China;*
2. *College of Food Engineering, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China;*
3. *Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100039, China*)

Abstract: Influencing factors on the molecular weight of poly- β -hydroxybutyrate (PHB) synthesized by methanotrophic bacteria were studied. The carbon sources, the concentration of NH_4^+ , NO_3^- , HPO_4^{2-} , Mg^{2+} in the culture medium, key intermediate in TCA cycle and different purification methods, have important effects on the molecular weight of PHB accumulated in the cells. Moreover, it was suggested that each key enzyme have their unique effects on PHB synthesized pathway by the study on the key enzymes activities in PHB metabolism. The molecular weight of PHB depended mainly on the combined effect of PHB synthetase and PHB depolymerase.

Key words: poly- β -hydroxybutyrate (PHB); molecular weight (Mw); methanotrophic bacteria

《分子催化》简介

《分子催化》是由中国科学院兰州化学物理研究所主办、中国科学院主管、科学出版社出版的向国内外公开发行的学术性刊物。主要报道有关分子催化方面最新进展与研究成果。辟有学术论文、研究简报、研究快报及综述述评等栏目。内容侧重于配位催化、酶催化、光助催化、催化过程中的立体化学问题、催化反应机理与动力学、催化剂表面态的研究及量子化学在催化学科中的应用等。工业催化过程中的均相催化剂、固载化学的均相催化剂、固载化的酶催化剂等活化、失活和再生;用于新催化过程的催化剂的优选与表征等方面的内容,本刊亦有报道。读者对象主要是科研单位及工矿企业中从事催化工作的科技人员、研究生、高等院校化学系和化工系的师生。

《分子催化》已被美国化学文摘(CA)、俄罗斯化学文摘、中国科学引文数据库、中国化学文献数据库、中国学术期刊文摘、中国化工文摘等国内外文献数据库收录。《分子催化》现为《中文核心期刊要目总览》的中国核心期刊和中国科技核心期刊。曾荣获中科院和甘肃省科委“优秀期刊三等奖”和“优秀科技期刊”奖。

《分子催化》为双月刊,每逢双月末出版,大16开本,约16万字,每册定价20.00元。中国标准刊号:ISSN 1001-3555/CN 62-1039/O6。

欢迎订阅,欢迎来稿。