

碳源浓度影响微生物PHB合成代谢的单细胞拉曼光谱分析

覃赵军^{1,4} 彭立新² 竺利波² 宋水山³ 刘军贤¹ 王桂文^{2*}

¹广西师范大学物理科学与技术学院, 广西 桂林 541004

²广西科学院生物物理实验室, 广西 南宁 530007

³河北省科学院生物研究所, 河北 石家庄 050051

⁴广西大学行健文理学院, 广西 南宁 530004

摘要 应用激光镊子拉曼光谱实时监测杀虫贪铜菌(*Cupriavidus necator*) H16菌株在特定氮源、不同果糖浓度下生物塑料聚β-羟基丁酸(PHB)的合成过程及其生化动态,以期获知碳源浓度对PHB合成的影响机制。结果显示:1) 2.0%果糖浓度(质量分数)下的PHB产量获得最佳发酵效果;2) 发酵启动及发酵前期胞内物质的合成速度基本相同,但果糖浓度影响对数生长期的长短;3) 782、1574、1656和1732 cm⁻¹等峰信号强度变化动态显示,高碳源浓度下核酸物质的拉曼信号长时间维持在较高的水平,这可能是影响细胞合成PHB的重要因素;4) 单个细胞在1732 cm⁻¹峰处的平均强度与发酵液PHB总含量线性相关,可用于定量监测发酵过程中PHB总量动态。发现了*C. necator* H16菌株在不同碳源浓度下PHB合成代谢过程中胞内主要生物大分子的变化动态,为PHB发酵提供全新的光谱学信息,也为基于单细胞拉曼光谱快速分选高产优良菌株提供实验依据。

关键词 光谱学;拉曼光谱;单细胞分析;聚β-羟基丁酸

中图分类号 O657.37

文献标识码 A

doi: 10.3788/CJL201542.0315003

Raman Spectral Profiles of PHB Synthesis by *Cupriavidus necator* H16 at Different Fructose Levels

Qin Zhaojun^{1,4} Peng Lixin² Zhu Libo² Song Shuishan³ Liu Junxian¹ Wang Guiwen²

¹College of Physics Sciences & Technology, Guangxi Normal University, Guilin, Guangxi 541004, China

²Laboratory of Biophysics, Guangxi Academy of Sciences, Nanning, Guangxi 530007, China

³Institute of Biology, Hebei Academy of Sciences, Shijiazhuang, Hebei 050051, China

⁴Xingjian College of Science and Liberal Arts, Guangxi University, Nanning, Guangxi 530004, China

Abstract Laser tweezers Raman spectroscopy technology is used to explore the accumulation of biodegradable plastic poly-β-hydroxybutyric acid (PHB) in *Cupriavidus necator* H16 at single-cell level. With ammonium sulfate (2 g/L) as nitrogen source, the fermentation of PHB is performed with 0%, 0.5%, 1.0%, 2.0% or 3.0% of fructose (mass fraction) and Raman spectra of single cell are acquired at different time of incubation respectively. Major results are as follows. 1) The fermentation performs ideal PHB product yield at 20 g/L of fructose. 2) At different fructose levels, *C. necator* H16 cells take almost the same steps to synthesize bio-macromolecule in the initial and early stages of fermentation, while higher fructose level extends the log phase of growth. 3) The dynamics of Raman intensity from peaks 782, 1574, 1656 and 1732 cm⁻¹, which derive from RNA, DNA, proteins and PHB respectively,

收稿日期: 2014-09-17; 收到修改稿日期: 2014-10-28

基金项目: 广西壮族自治区自然科学基金(2012GXNSFCA053001, 2013GXNSFAA019043)

作者简介: 覃赵军(1986—),男,硕士研究生,主要从事拉曼光谱在生物医学中的应用方面的研究。

E-mail: qzhaojun86@163.com

导师简介: 刘军贤(1962—),男,博士,教授,主要从事理论物理与生物物理等方面的研究。E-mail: jxliu@mailbox.gxnu.edu.cn

* 通信联系人。E-mail: wguiwen@gxas.cn

reveals that the cells show stronger Raman intensity of nucleic acid for longer time under higher level of fructose, and this may be of important factor affecting the accumulation of PHB. 4) The average intensity of single cell at peak 1732 cm^{-1} shows linear relationship with yield of PHB and can quantitatively follow the PHB production. This observation uncovers the kinetics of major bio-macromolecule of *C. necator* H16 during the PHB accumulation at different fructose levels, provides novel spectral information for the PHB fermentation. This work shows the potential of laser tweezers Raman spectroscopy for the quick screening of high-yield PHB strains.

Key words spectroscopy; Raman spectrum; single-cell analysis; poly- β -hydroxybutyric acid

OCIS codes 170.5660; 170.1530; 170.1420

1 引 言

以合成树脂为主的普通塑料由于难以降解已经造成了严重的环境问题。在众多的生物可降解材料中,采用微生物发酵法生产的多聚 β -羟基烷酸酯不仅具有普通高分子材料的力学性能和加工性能,还具有可生物降解性、生物相容性、压电性、光学活性等普通高分子材料无法比拟的特性。多聚 β -羟基烷酸酯在医学、农业和食品工业具有广阔的应用前景,因而成为研究热点,其中聚 β -羟基丁酸(PHB)是研究和应用最广泛的一种多聚体^[1-3]。PHB作为细胞内同化作用的初级产物,是微生物遇到不适环境时在胞内累积合成的一种脂类储藏物质,可以作为胞内营养和能量的储存物质参加细胞代谢^[4]。杀虫贪铜菌(*Cupriavidus necator*) H16是一株合成PHB的优良菌株,能利用果糖大量合成PHB,可达细胞干重的80%~90%^[5-6]。目前对该菌株的性能、PHB合成途径以及DNA序列等都做了广泛深入的研究^[6-11]。

拉曼光谱是一种分子振动光谱,在研究含水活细胞或者完整的生物材料时具有实时、快速、无损分析的独特优势,使其在生物医学领域的应用日益广泛和深入^[12-15]。虽然有报道用傅里叶变换红外光谱技术在线监测PHB发酵过程^[16],但总体来说,对微生物合成PHB的研究都是通过发酵过程中宏观特性的表现来优化pH值、氮源和碳源等发酵条件,得到的是宏观的信息。而应用单细胞分析技术分析细胞微观生理生化变化以及微生物个体间的差异等方面的信息亦有重要意义^[17]。本课题组在乙醇发酵方面已经做了一些探索^[18-20]。有文献报道了应用共焦显微拉曼光谱对H16菌株累积PHB进行定量检测^[21]或分析其PHB含量的异质性^[22],但是都没有从单细胞水平跟踪分析核酸、蛋白质及PHB合成的代谢动态。

在*C. necator* H16菌株合成PHB的过程中,一部分碳源用于胞内基本物质如蛋白质的合成,一部分用于微生物的呼吸代谢等,其余的很大一部分用于合成PHB。虽然碳源并非用于合成胞内物质的唯一基质,但对微生物的生理生化和产物合成的影响相当重要,因为它可以通过影响PHB的合成酶进而影响PHB的合成。因此,本文从单细胞的微观角度对微生物合成PHB进行探索,应用光谱技术监测和分析以2 g/L硫酸铵为氮源,果糖浓度为0%、0.5%、1.0%、2.0%或3.0%(质量分数)时*C. necator* H16菌株的代谢和产物合成情况,旨在为优化PHB发酵条件从光谱学与单细胞水平做初步的探索。

2 材料与方 法

2.1 实验材料

菌株: *Cupriavidus necator* (原名 *Ralstonia eutropha*, *Alcaligenes eutrophus*) H16 菌株。

斜面培养基: 酵母粉 10 g/L, 蛋白胨 10 g/L, 牛肉膏 5 g/L, NaCl 5 g/L, 琼脂 20 g/L, pH 值为 7.0。

种子培养基: 酵母粉 10 g/L, 蛋白胨 10 g/L, 牛肉膏 5 g/L, NaCl 5 g/L, pH 值为 7.0。

发酵培养基: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 9.0 g/L, KH_2PO_4 1.5 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g/L, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.002 g/L, NaHCO_3 0.5 g/L, 柠檬酸铁铵 0.005 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.0 g/L, 微量元素溶液 1 mL。pH 值为 7.0, 115 °C 灭菌 20 min。测试的果糖浓度(质量分数)分别为 0%、0.5%、1.0%、2.0%、3.0%。

微量元素: $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g/L, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g/L, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 30 mg/L, $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 30 mg/L, $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 20 mg/L, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 10 mg/L, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 20 mg/L, H_3BO_3 0.3 g/L。所用试剂均为分析纯试剂。

2.2 实验方法

2.2.1 培养方法

从平板上挑取单菌落,接入含有 50 mL 种子培养基的 150 mL 锥形瓶中,在 30 ℃、200 r/min 条件下培养 36 h 作为种子液。以 5% 的接种量,转接到含有 80 mL 发酵培养基的 250 mL 锥形瓶中,在 30 ℃、200 r/min 条件下培养。从接种时起,在第 0、3、6、9、12、15、18、24、30、36、42、48、54、60、66、72、84、96 h 分别取样,每次取样 2 mL,其中 1.2 mL 用于测量细胞的干重和产物 PHB,0.15 mL 用于测量生物量,0.5 mL 用于收集拉曼光谱。

2.2.2 分析方法

应用比浊法测定细胞的生长量。将发酵液用无菌水稀释 10 倍,用 Beckman DU800 紫外-可见分光光度计测定 600 nm 处的光密度值(A_{600})。

用浓硫酸降解法测定 PHB 总量:经干燥的细胞样品中加入浓硫酸 1 mL,在 80 ℃~90 ℃的水中水浴 1 h,适当稀释后测定 208 nm 处的光密度值。用 3,5-二硝基水杨酸(DNS)比色法测定发酵液果糖含量:经适当稀释(使糖浓度为 0.1~1.0 mg/mL)的发酵液 1.0 mL 置于 15 mL 刻度试管中,加入 DNS 试剂 2.0 mL,沸水煮沸 2 min,冷却后用水补足到 15 mL 刻度处,在 540 nm 波长下测定光密度值。用靛酚蓝比色法并参考文献[23]测定铵态氮含量。

2.2.3 实验系统与光谱收集

实验系统和文献[24]描述类似,由半导体激光器(TEC300, Sacher Lasertechnik Group, 德国)发出波长为 780 nm、强度为 500 mW 的连续激光,经过陷波滤波片后被导入倒置的生物显微镜(TE2000U, 尼康, 日本)中,由 100 倍油浸物镜($NA=1.30$)聚焦后在物镜的焦点附近形成单光束光势梯度力阱,用于俘获细胞,同时该激光亦用于激发被俘获细胞的拉曼散射。拉曼信号由物镜收集,途经一个 100 μm 的针孔和一个长通滤波器,最后被聚焦进入 LS785 光谱仪(Acton, 美国)的输入狭缝中。光谱仪被耦合到一台风冷(-70 ℃)的电荷耦合器件 CCD(PIXIS 400BR, 普林斯顿仪器公司, 美国)上。系统的分辨率为 6 cm^{-1} , 单个聚苯乙烯小球(直径 2.0 μm)用于系统校正。

光谱收集:将发酵液用无菌水稀释 3000 倍,吸取 200 μL 置于用石英片密封而成的样品槽中,外加盖玻片密封。100 倍油浸物镜寻找目标细胞,光镊随机俘获单个细胞,将目标细胞提升至石英片上方 5 μm 左右,激光强度调整为 45 mW,信号累积时间为 60 s,收集目标细胞的拉曼光谱,此时收集到的是带有背景的细胞的拉曼光谱,于细胞附近以相同条件收集背景拉曼光谱,每个样品收集 30~45 个细胞的拉曼光谱,3 个背景拉曼光谱。上述光谱的收集于室温 24 ℃的环境下进行。

2.2.4 数据处理方法

光谱数据先进行背景扣除和响应曲线的校正,其算法为 $S_{\text{act}}(v)=[S_{\text{acq}}(v)-S_{\text{bg}}(v)]/R(v)$ [其中 $S_{\text{act}}(v)$ 为样品的实际光谱, $S_{\text{acq}}(v)$ 为带背景的光谱, $S_{\text{bg}}(v)$ 为背景光谱, $R(v)$ 为实验系统的响应曲线];采用 vb 编程对数据进行平滑去噪,其算法是 9 点 Savitzky-Golay 卷积平滑法,最后用线性拟合结合积分法求特征峰的峰面积。数据统计与绘图均在软件 Origin 8.1 中进行。

3 结果与分析

3.1 PHB 合成发酵动态分析

发酵进程如图 1 所示。发酵培养基中无碳源时, H16 细胞仅靠种子液带来的少量碳源维持微弱的生长。在含果糖的培养基中,果糖浓度对细胞生长的迟滞期和对数生长期的时间长短都产生影响,在 0.5%、1.0%、2.0% 和 3.0% 果糖浓度(质量分数)下其迟滞期分别为 9、12、15 和 15 h 左右,而对数生长期持续的时间分别为 11、14、28 和 31 h 左右。单位体积发酵液的细胞干重和生物量变化过程基本一致(数据没有给出)。

细胞生长进程反映了培养基主要营养成分的消耗动态。如图 1(c)所示,在 0.5%、1.0% 和 2.0% 果糖浓度(质量分数)下,果糖被充分利用完的时间分别在 24、36 和 42 h 左右;但在 3.0% 果糖浓度(质量分数)下,发酵 96 h 后尚有约 11% 的残留。硫酸铵的利用也受碳源的影响,对照组基本没有利用氮源;如图 1(d)所示,在 0.5% 和 1.0% 果糖浓度(质量分数)下,硫酸铵的利用率分别约为 49% 和 82%;而 2.0% 和 3.0% 果糖浓度(质量分数)下硫酸铵基

本上被完全利用。碳源和氮源的利用趋势与细胞生长对应,都是在细胞的对数生长期被迅速利用。

PHB合成的趋势和细胞生长曲线基本相同,如图1(b)所示,在0.5%、1.0%、2.0%和3.0%果糖浓度(质量分数)下,发酵液中检测到PHB的时间分别是9、12、12和12 h左右,进入快速合成期并达到最大值的时间范围分别是9~24 h、12~30 h、18~48 h和18~96 h。果糖浓度低时,启动PHB合成较快,但持续时间短、含量低;果糖浓度高时,PHB持续合成的时间长、产量高;因此,2.0%是比较理想的果糖浓度(质量分数),既保障合理的细胞生物量又促使PHB的大量合成,从而提高总体产量,且发酵周期不长。3.0%果糖浓度(质量分数)在48 h发酵周期时PHB产量与2.0%果糖浓度(质量分数)时基本相同,虽然后续还有PHB合成,但发酵周期长,增加成本,且有部分果糖残留,造成浪费。

上述结果说明:1) 碳源对微生物的生物量、细胞干重和产物形成有着重要的影响,在2 g/L硫酸铵条件下,以2.0%果糖浓度(质量分数)的发酵效果最好;2) 细胞生长的对数期长短与碳源浓度呈正相关;3) PHB合成的进程和细胞生长的趋势基本相同;4) 即使是仅提供有限的碳源,H16细胞还是将部分碳源用于合成PHB而不是将所有的碳源全部用于细胞生长,而且是在细胞快速生长的对数期就开始合成,说明H16启动PHB的合成并不是因为营养因子的匮乏。

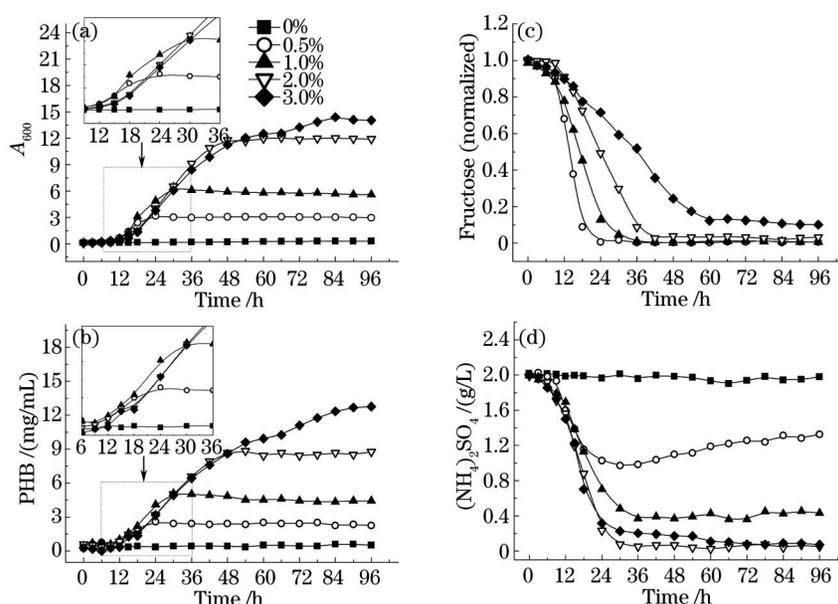


图1 H16菌株在0%、0.5%、1.0%、2.0%和3.0%(质量分数)果糖浓度下的PHB发酵动态。(a)生长曲线(A_{600});(b)PHB含量;(c)果糖浓度;(d)硫酸铵浓度

Fig.1 Kinetic profiles of PHB fermentation by *C. necator* H16 at different fructose levels of 0%, 0.5%, 1.0%, 2.0% and 3.0% (mass fraction). (a) Growth curves (A_{600}); (b) PHB concentration; (c) normalized fructose concentration; (d) concentration of ammonium sulfate

3.2 PHB合成代谢的动态拉曼光谱分析

3.2.1 不同碳源浓度下的单细胞拉曼光谱

图2所示为1.0%果糖浓度(质量分数)下不同发酵阶段和18 h、48 h时不同果糖浓度下单个H16细胞的平均拉曼光谱,特征峰尖锐明显,主要集中于400~1750 cm^{-1} 范围内,其中782、1574和1656 cm^{-1} 分别来自RNA的G、U碱基、DNA的G、A碱基和酰胺化合物I基团,是核酸和蛋白质的特征峰^[21,25];835、901、1058和1104 cm^{-1} 是PHB的C—O—C基团拉伸振动峰,1354 cm^{-1} 和1456 cm^{-1} 峰主要来自PHB中 CH_2/CH_3 基团的对称拉伸振动和变形振动;来自PHB中C=O基团的1732 cm^{-1} 是独立而且显著的特征峰,可以用来定量分析PHB的含量^[21,26-27]。

如图2(a)所示,在1.0%果糖浓度(质量分数)下,6 h时的细胞拉曼光谱信号明显弱于初始时的细胞光谱,随后逐渐增强,在30 h时达到最强,但在后续的发醉中逐渐减弱;如图2(b)所示,18 h时0.5%、1.0%和2.0%果糖浓度(质量分数)下细胞已经开始积累少量PHB,而3.0%果糖浓度(质量分数)下仅观察到较弱的PHB信号;如图2(c)所示,48 h时细胞PHB信号强度与果糖浓度呈正相关,在没有提供碳源的情况下,即使氮源充足,H16菌株也基本不生长,胞内几乎不合成PHB;而胞内生物大分子特征峰的强度则相反,在2.0%、3.0%果糖

浓度(质量分数)下的细胞在 782、1574 和 1656 cm^{-1} 处谱峰明显弱于其他浓度。

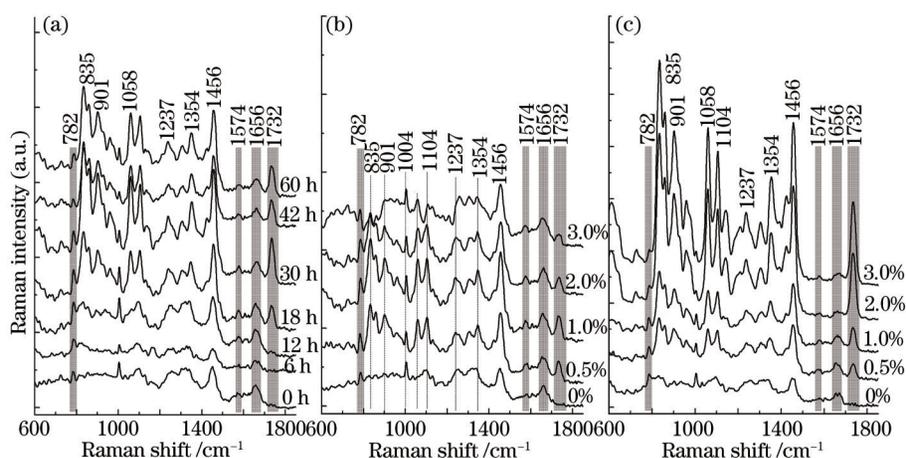


图2 单细胞平均拉曼光谱。(a) 1.0%果糖浓度下不同发酵时间;(b) 不同果糖浓度下 18 h时;(c) 不同果糖浓度下 48 h时

Fig.2 Averaged Raman spectra of a single H16 cell. (a) Different incubation time with 10 g/L of fructose; incubation time of (b) 18 h and (c) 48 h at different fructose concentrations

3.2.2 碳源浓度对核酸和蛋白质代谢的影响

图3为不同果糖浓度下PHB合成过程中核酸和蛋白质的特征峰 782、1574、1656 cm^{-1} 的峰强变化动态,显示了更为详细的代谢过程。

如图3(a)所示,在空白对照组中几乎没有检测到PHB的拉曼信号;而在0.5%、1.0%、2.0%和3.0%果糖浓度(质量分数)下,检测到PHB信号的时间分别是9、12、12和12 h左右,PHB信号快速升高的时间范围分别是9~18 h、12~24 h、18~48 h和18~54 h;在3.0%果糖浓度(质量分数)下,PHB合成的周期很长,在54 h后还在持续缓慢地增加。该结果和分光光度计法检测到的数据保持一致。

核酸物质作为代谢活跃的生物大分子,在不同的碳源浓度下,其对应的782 cm^{-1} 谱峰变化规律也不同。如图3(b)所示,在无果糖与0.5%果糖浓度(质量分数)下,平均信号强度在经历初期的小幅下降后逐渐升高,在24 h左右达到峰值,随后有所减弱并一直维持在比初始强度稍高的水平;在1.0%果糖浓度(质量分数)下,782 cm^{-1} 谱峰信号强度从发酵初始就逐渐增强,在18~24 h达到峰值,在42 h左右回复到接近初始强度的水平;而2.0%、3.0%果糖浓度(质量分数)下,后期更维持在低于初始强度的状态;1.0%~3.0%果糖浓度(质量分数)下782 cm^{-1} 的平均信号较强,维持较高的水平并且维持较长的时间(0~42 h),而低果糖浓度下,782 cm^{-1} 的平均信号较弱,维持较低的水平且维持较短的时间(12~30 h)。

如图3(c)所示,源自DNA的G、A碱基的1574 cm^{-1} 谱峰,在不同的碳源浓度下,其平均峰高峰值都出现在18 h左右;在发酵前、中期,其平均拉曼信号强度变化规律和782 cm^{-1} 谱峰基本相同,但在发酵后期波动较大。

源自蛋白质的1656 cm^{-1} 谱峰,在0.5%果糖浓度(质量分数)和没有碳源的对照实验中,其平均信号强度除了在18~24 h有微弱的增加外,基本维持在与初始强度相当的幅度;在1.0%~3.0%果糖浓度(质量分数)下,平均信号强度在6 h有微弱的降低后逐渐增加,在18 h左右达到最大值,并随着PHB的大量合成开始逐渐减弱,在36 h后降低到初始强度以下;特别是在2.0%、3.0%果糖浓度(质量分数)下,在48 h左右降低至仅为初始强度的30%~40%。

上述结果显示:1) 不管发酵底物浓度多高,H16细胞核酸物质和蛋白质的代谢活跃期都在6~30 h;即使是没有碳源或者碳源浓度很低,H16细胞在进入新的发酵环境时,都呈现从弱逐渐增强然后再减弱的过程,只是其胞内平均含量较低而已;2) 与乙醇发酵环境下的酵母细胞不同^[20],H16细胞的蛋白质含量在PHB发酵过程中变化不大,特别是低浓度果糖条件下几乎不变;而2.0%、3.0%果糖浓度(质量分数)的细胞生长在发酵的中后期显著低于起始阶段;3) 较高的果糖浓度会延长细胞生长的时间和PHB开始合成的迟滞期,但能促进胞内RNA、DNA和蛋白质的快速合成;4) 碳源浓度既影响总体PHB产量,也影响单个细胞的PHB含量。上述结果说明,RNA是PHB合成过程中代谢最为活跃的生物大分子;在较高的果糖浓度下,RNA含量较高且

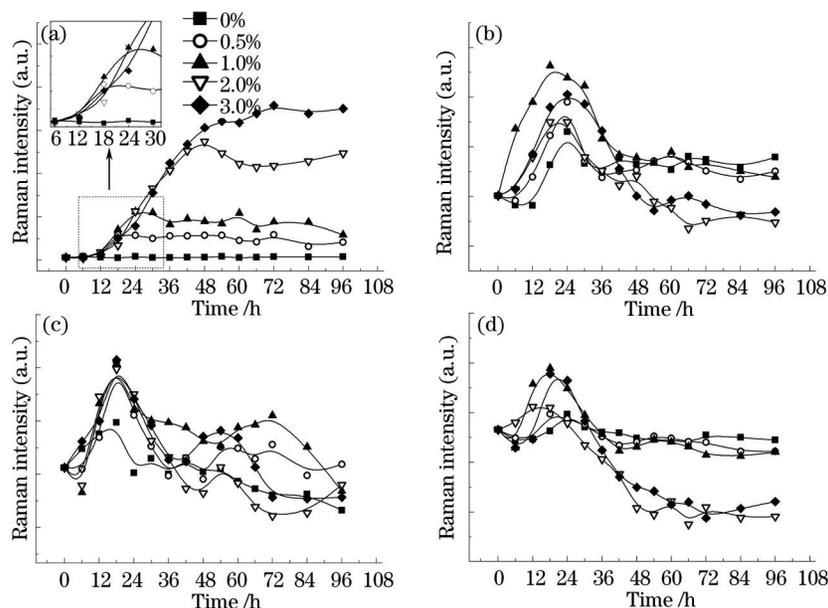


图3 不同果糖浓度下单个细胞特征拉曼谱峰平均信号强度动态变化。(a) 1732 cm⁻¹; (b) 782 cm⁻¹; (c) 1574 cm⁻¹; (d) 1656 cm⁻¹

Fig.3 Kinetics of averaged Raman peak intensity of a single H16 cell at different fructose concentrations. (a) 1732 cm⁻¹; (b) 782 cm⁻¹; (c) 1574 cm⁻¹; (d) 1656 cm⁻¹

活跃期长,主要底物都用于PHB合成,减少了蛋白质的合成。

3.3 单个细胞的PHB拉曼信号强度与总产量的关系

图4是在不同的果糖浓度下,单个H16细胞的1732 cm⁻¹谱峰平均信号强度与发酵液中PHB总量的相关性分析。所有样品同时进行相关性分析,皮尔逊相关系数(r)和 R^2 值分别为0.9765和0.9529。对不同果糖浓度下的数据分别进行相关性分析,对应的皮尔逊相关系数(r)和 R^2 值如表1所示。由表1可见,在实验范围内,底物浓度越高,单细胞的PHB特征峰强度与PHB发酵产量的相关性越高。因此,通过1732 cm⁻¹信号强度可以定量发酵过程中PHB的产量,在细胞分选时尽量选用较高的底物浓度进行培养。上述结果也证明,通过单细胞拉曼光谱观测到的PHB累积过程和常规方法检测到的进程一致[图1(b)和图3(a)],为通过单细胞俘获结合拉曼光谱分选高产PHB菌株提供了实验依据。

表1 不同果糖浓度下单个细胞的1732 cm⁻¹谱峰信号强度与PHB发酵总量的相关系数

Table 1 Correlation coefficient between Raman intensity of peak 1732 cm⁻¹ of a single H16 cell and total PHB yield at different fructose concentrations

Fructose concentration (mass fraction) /%	Pearson's r	R^2
0.5	0.8644	0.7278
1.0	0.9080	0.8109
2.0	0.9582	0.9118
3.0	0.9858	0.9696

4 讨 论

发酵过程中影响PHB合成的两种最重要的基质是碳源和氮源,碳源浓度较低时得到的产物浓度相应较低,但碳源浓度过高会对菌体的生长和产物的形成等产生抑制作用,导致PHB的产量和PHB对底物的转化率下降^[4,7]。从图3可以看到,碳源浓度是影响单个细胞PHB含量的主要因素,碳源浓度逐渐变大时,PHB的含量也随之升高,这与文献[28]报道一致。既然氮源是合成胞内核酸和蛋白质等生物大分子最基本和最重要的物质,为什么在氮源浓度一致的时候,发酵结果的差别如此之大?这是个值得关注的问题。对核酸和蛋白质拉曼光谱特征峰的分析发现,虽然氮源是合成生物大分子的直接基质,但是碳源在合成这些物质的过程中也是不可或缺的,并且有小部分参与了这些物质的合成,是细胞呼吸代谢的必需物质,通过影响PHB

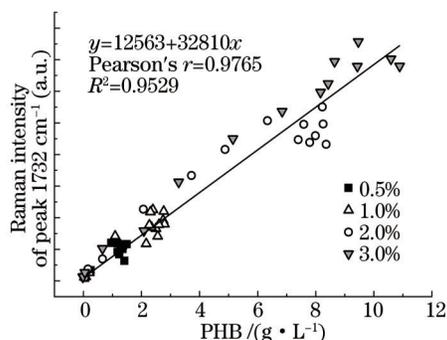


图4 不同果糖浓度下单个细胞的 1732 cm^{-1} 谱峰信号强度与PHB发酵总量的相关性分析

Fig.4 Correlation between Raman intensity of peak 1732 cm^{-1} of a single H16 cell and total PHB yield at different fructose concentrations

的合成酶等进而影响后期合成PHB的速率和产量。

如图3所示,发酵一开始,胞内核酸和蛋白质的特征峰变化就比较活跃。24 h左右是RNA活动的一个转折点,果糖浓度(质量分数)在1.0%或更低时,RNA代谢活跃的时间较短(12~36 h),而在2.0%、3.0%时,活跃期可持续到54 h左右;DNA方面,总体上18 h左右是转折点,54 h以后活动变化相对比较平缓;而在蛋白质的变化中,除了对照组,其他组的菌体均在18 h发生转折,前者推迟了6 h左右,但比果糖浓度(质量分数)为0.5%、1.0%的两个培养基提前6 h进入稳定期。果糖浓度(质量分数)为2.0%、3.0%的这两个培养基中,菌体的蛋白质的活跃变化期持续至66 h左右。综上所述,核酸和蛋白质代谢活跃期较长者,发酵后期胞内RNA、蛋白质含量较低者,其累积的PHB产物量比较高,因此可推断这个关键期也是PHB合成的关键时机,发酵中控制好这个阶段关系到菌体的发酵强度和产量。该实验中,低碳源浓度的培养基在关键期就缺乏碳源,影响了胞内蛋白质等物质和各种酶的合成,最终导致PHB的产量低,而后者在上述关键期碳源充足,保证了胞内RNA、DNA、蛋白质和各种酶的合成所需的基质,所以后者发酵强度大,最终PHB的产量较高。

脂类、蛋白质和DNA的拉曼光谱特征峰动力学行为表明,0~42 h是低浓度碳源细胞的生理生化活动活跃变化的阶段,而较高浓度碳源对应的时间为0~66 h左右,在发酵过程中把握好这个阶段相当重要。结合光谱法对PHB的微生物合成进行监测和分析,可为可生物降解塑料的合成提供发酵信息。

5 结 论

应用拉曼光谱和单细胞分析实时监测了以2 g/L硫酸铵为氮源,0%、0.5%、1.0%、2.0%和3.0%等不同果糖浓度(质量分数)下*C. necator* H16菌株发酵生产生物塑料PHB的合成代谢过程及其生化动态。结果显示,4种果糖浓度中以2.0%的发酵效果最好,但前期几种果糖浓度的胞内物质合成速度和细胞生长速度基本相同,对数期长短与果糖浓度呈正相关;分析各发酵阶段单个细胞的核酸、蛋白质和PHB的特征峰 782 、 1574 、 1656 、 1732 cm^{-1} 的信号强度,结果显示高碳源浓度下胞内核酸类生物大分子变化的活跃期长;前期活跃的细胞生理状态是影响PHB合成的重要因素;单细胞 1732 cm^{-1} 谱峰平均强度与发酵液PHB总量线性相关,通过其强度可以定量监测发酵过程中的PHB总量。即使仅提供有限的碳源,H16细胞还是将部分碳源用于合成PHB而不是将所有的碳源完全用于细胞生长,而且是在细胞快速生长的对数期就开始合成,说明H16启动PHB的合成并不完全因为营养因子的匮乏。发现了H16菌株在不同碳源浓度下PHB合成代谢过程中胞内主要生物大分子的变化动态,为PHB发酵提供全新的光谱学信息,也为基于单细胞拉曼光谱快速分选高产优良菌株提供实验依据。

参 考 文 献

- 1 Keshavarz T, Roy I. Polyhydroxyalkanoates: Bioplastics with a green agenda[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2010, 13(3): 321-326.
- 2 Suriyamongkol P, Weselake R, Narine S, *et al.*. Biotechnological approaches for the production of polyhydroxyalkanoates in microorganisms and plants - a review[J]. *Biotechnology Advances*, 2007, 25(2): 148-175.
- 3 Grage K, Jahns A C, Parlange N, *et al.*. Bacterial polyhydroxyalkanoate granules: Biogenesis, structure, and potential use as nano-

- micro-beads in biotechnological and biomedical applications[J]. *Biomacromolecules*, 2009, 10(4): 660–669.
- 4 Lee S Y. Bacterial polyhydroxyalkanoates[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 1996, 49(1): 1–14.
- 5 Kuchta K, Chi L, Fuchs H, *et al.* Studies on the influence of phasins on accumulation and degradation of PHB and nanostructure of PHB granules in *Ralstonia eutropha* H16[J]. *Biomacromolecules*, 2007, 8(2): 657–662.
- 6 Yoshie N, Goto Y, Sakurai M, *et al.* Biosynthesis and n.m.r. studies of deuterated poly (3-hydroxybutyrate) produced by *Alcaligenes eutrophus* H16[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 1992, 14(2): 81–86.
- 7 Verlinden R A, Hill D J, Kenward M A, *et al.* Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2007, 102(6): 1437–1449.
- 8 Peplinski K, Ehrenreich A, Döring C, *et al.* Genome-wide transcriptome analyses of the ‘Knallgas’ bacterium *Ralstonia eutropha* H16 with regard to polyhydroxyalkanoate metabolism[J]. *Microbiology*, 2010, 156(7): 2136–2152.
- 9 Cramm R. Genomic view of energy metabolism in *Ralstonia eutropha* H16[J]. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 2008, 16: 38–52.
- 10 York G M, Lupberger J, Tian J, *et al.* *Ralstonia eutropha* H16 encodes two and possibly three intracellular poly[D-(–)-3-hydroxybutyrate] depolymerase genes[J]. *Journal of Bacteriology*, 2003, 185(13): 3788–3794.
- 11 Saegusa H, Shiraki M, Kanai C, *et al.* Cloning of an intracellular poly[D-(–)-3-hydroxybutyrate] depolymerase gene from *Ralstonia eutropha* H16 and characterization of the gene product[J]. *Journal of Bacteriology*, 2001, 183(1): 94–100.
- 12 Petry R, Schmitt M, Popp J. Raman spectroscopy — a prospective tool in the life sciences[J]. *Chemphyschem*, 2003, 4(1): 14–30.
- 13 Sun Meijuan, Jiang Yuling, Lai Aihua, *et al.* Analysis of lipid and carotenoids in *Rhodospiridium toruloides* using laser tweezer Raman spectroscopy[J]. *Laser & Optoelectronics Progress*, 2013, 50(3): 033001.
孙美娟, 蒋玉凌, 来爱华, 等. 激光镊子拉曼光谱技术分析圆红冬孢酵母生成油脂和类胡萝卜素[J]. *激光与光电子学进展*, 2013, 50(3): 033001.
- 14 Jiang Yuling, Liu Junxian, Chen Yue, *et al.* Screening of carotenoid high-producing mutants from *Rhodotorula glutinis* using Raman spectroscopy *in situ* quantitative detection technology[J]. *Chinese J Lasers*, 2014, 41(2): 0215002.
蒋玉凌, 刘军贤, 陈越, 等. 利用拉曼光谱原位定量检测技术筛选红酵母类胡萝卜素高产突变株[J]. *中国激光*, 2014, 41(2): 0215002.
- 15 Li Jinjin, Lu Mingqian, Zhang Jingjing, *et al.* Cell apoptosis in yeast under aluminum stress analyzed by laser Raman spectroscopy [J]. *Chinese J Lasers*, 2014, 41(11): 1115002.
李金金, 卢明倩, 张晶晶, 等. 拉曼光谱技术研究铝胁迫下的土生隐球酵母细胞凋亡[J]. *中国激光*, 2014, 41(11): 1115002.
- 16 Jarute G, Kainz A, Schroll G, *et al.* On-line determination of the intracellular poly (beta-hydroxybutyric acid) content in transformed *Escherichia coli* and glucose during PHB production using stopped-flow attenuated total reflection FT-IR spectrometry[J]. *Analytical Chemistry*, 2004, 76(21): 6353–6358.
- 17 Brehm-Stecher B F, Johnson E A. Single-cell microbiology: Tools, technologies, and applications[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2004, 68(3): 538–559.
- 18 Peng L, Wang G, Liao W, *et al.* Intracellular ethanol accumulation in yeast cells during aerobic fermentation: A Raman spectroscopic exploration[J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2010, 51(6): 632–638.
- 19 Li Zida, Lai Junzhuo, Liao Wei, *et al.* Raman spectroscopic profile of ethanol fermentation in high gravity cassava starch brewing[J]. *Acta Optica Sinica*, 2012, 32(3): 0317001.
李自达, 赖钧灼, 廖威, 等. 浓醪乙醇发酵的单细胞拉曼光谱表征[J]. *光学学报*, 2012, 32(3): 0317001.
- 20 Qin Zhaojun, Lai Junzhuo, Liu Bin, *et al.* Raman spectroscopic analysis of ethanol fermentation at various initial pH levels[J]. *Chinese J Lasers*, 2013, 40(2): 0215001.
覃赵军, 赖钧灼, 刘斌, 等. 不同初始pH值的乙醇发酵过程拉曼光谱分析[J]. *中国激光*, 2013, 40(2): 0215001.
- 21 Gelder J D, Willems-Erix D, Scholtes M J, *et al.* Monitoring poly (3-hydroxybutyrate) production in *Cupriavidus necator* DSM 428 (H16) with Raman spectroscopy[J]. *Analytical Chemistry*, 2008, 80(6): 2155–2160.
- 22 Hermelink A, Stammler M, Naumann D. Observation of content and heterogeneity of poly- β -hydroxybutyric acid (PHB) in *Legionella bozemanii* by vibrational spectroscopy[J]. *The Analyst*, 2011, 136(6): 1129–1133.
- 23 Zhao Liangqi, Han Guangye. Improvement on indophenol-blue colorimetry and its application in fermentation process[J]. *Journal of Shanxi University*, 1999, 22(3): 265–269.
赵良启, 韩广业. 靛酚蓝比色法的改进及其在发酵过程中的应用[J]. *山西大学学报*, 1999, 22(3): 265–269.

- 24 Xie C, Dinno M A, Li Y Q. Near-infrared Raman spectroscopy of single optically trapped biological cells[J]. Optics Letters, 2002, 27(4): 249-251.
- 25 Notingher I, Verrier S, Haque S, *et al.*. Spectroscopic study of human lung epithelial cells (A549) in culture: Living cells versus dead cells[J]. Biopolymers, 2003, 72(4): 230-240.
- 26 Izumi C M, Temperini M L. FT-Raman investigation of biodegradable polymers: Poly (3-hydroxybutyrate) and poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)[J]. Vibrational Spectroscopy, 2010, 54(2): 127-132.
- 27 Furukawa T, Sato H, Murakami R, *et al.*. Raman microspectroscopy study of structure, dispersibility, and crystallinity of poly (hydroxybutyrate)/poly (L-lactic acid) blends[J]. Polymer, 2006, 47(9): 3132-3140.
- 28 Suzuki T, Yamane T, Shimizu S. Mass production of poly- β -hydroxybutyric acid by fed-batch culture with controlled carbon/nitrogen feeding[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1986, 24(5): 370-374.

栏目编辑: 吴秀娟