

氮源影响PHB合成代谢的拉曼光谱分析

覃赵军^{1,2} 陶站华¹ 廖 威³ 陈真英² 黎永青⁴ 王桂文^{1*}

¹广西科学院生物物理实验室, 广西南宁 530007

²广西大学行健文理学院, 广西南宁 530004

³广西职业技术学院食品与生物技术系, 广西南宁 530226

⁴美国东卡罗来那大学物理系, 北卡罗来那州格林维尔 NC27858

摘要 应用拉曼光谱学结合奇异值分解方法在单细胞尺度上对杀虫贪铜菌(*C. necator*) H16菌株在不同的氮源下合成聚 β -羟基丁酸(PHB)的代谢动态进行分析。结果显示,硫酸铵是PHB发酵的理想氮源,对应PHB发酵速度、效率和产量在测试氮源中表现最好。奇异值分解结果显示,源自RNA、DNA、蛋白质和PHB的拉曼峰是发酵的主要特征,随着发酵进程的延伸,菌体细胞差异、产物含量差别逐渐增大。分析PHB产物快速合成过程,可见表征核酸、蛋白质和PHB的782、1574、1660、1732 cm^{-1} 等峰的强度变化活跃;不同氮源下,782 cm^{-1} 峰与1660 cm^{-1} 峰的强度呈正相关,而1660 cm^{-1} 峰与1732 cm^{-1} 峰的强度呈负相关。因此,不同氮源可能影响细胞的RNA代谢和蛋白质代谢,从而间接影响PHB的合成。拉曼光谱结合数据挖掘技术可以分析微生物发酵过程中的代谢信息,从分子光谱的角度为寻找最佳的发酵条件提供新的信息。

关键词 生物光学;拉曼光谱;奇异值分解;氮源;聚 β -羟基丁酸;单细胞分析

中图分类号 O657.37

文献标识码 A

doi: 10.3788/AOS201636.0417001

Raman Spectral Profiles of PHB Synthesis Influenced by Different Nitrogen Sources

Qin Zhaojun^{1,2} Tao Zhanhua¹ Liao Wei³ Chen Zhenying² Li Yongqing⁴ Wang Guiwen¹

¹Laboratory of Biophysics, Guangxi Academy of Sciences, Nanning, Guangxi 530007, China

²Xingjian College of Science and Liberal Arts, Guangxi University, Nanning, Guangxi 530004, China

³Department of Food and Biotechnology, Guangxi Vocational and Technical College, Nanning, Guangxi 530226, China

⁴Department of Physics, East Carolina University, Greenville, NC 27858, USA

Abstract Laser tweezers Raman spectroscopy and singular value decomposition are used to explore the synthesis dynamics of biodegradable plastic poly- β -hydroxybutyrate(PHB) in *C. necator* H16 strain cultured with different nitrogen sources at the single-cell level. The results show that ammonium sulfate performing best on fermentation speed, efficiency and productivity in all tested nitrogen sources, is demonstrated as an ideal nitrogen source for PHB fermentation. The singular value decomposition results reveal that the main fermentation features are the Raman peaks belonging to RNA, DNA, protein and PHB, and the difference in bacterial cells and product yield becomes more notable as the fermentation process works. The dynamics of Raman intensity peaks of nucleic acid, protein and PHB at 782, 1574, 1660, 1732 cm^{-1} are active to the fast PHB synthesis, and no matter what nitrogen sources are used, the intensity of peaks at 1660 cm^{-1} and 782 cm^{-1} is positively correlated, but the intensity of 1660 cm^{-1} and 1732 cm^{-1} peaks is negatively correlated. The results suggest that nitrogen sources influence the RNA and the protein metabolism and then affect the synthesis of PHB indirectly. Raman spectroscopy combining with data analysis can provide the metabolism information of

收稿日期: 2015-11-11; 收到修改稿日期: 2015-12-06

基金项目: 广西自然科学基金(2012GXNSFC A053001, 2013GXNSFAA019043)、广西高校自然科学基金(KY2015LX747)

作者简介: 覃赵军(1986—),男,硕士,助教,主要从事拉曼光谱在生物医学中的应用研究和数据挖掘等方面的研究。

E-mail: qinzhaojun10@gmail.com

*通信联系人。E-mail: wguiwen@gxas.cn

the microbial fermentation and offer a powerful experiment basis for optimizing fermentation process.

Key words biotechnology; Raman spectrum; singular value decomposition; nitrogen sources; poly- β -hydroxybutyrate; single-cell analysis

OCIS codes 170.5660; 170.1530; 170.1420

1 引 言

微生物合成的聚 β -羟基烷酸(PHA)具有优良的特性,是一类在医药、工业、农业、包装业等领域有广泛应用前景的微生物塑料^[1-3]。其中,聚 β -羟基丁酸(PHB)是PHA家族中研究和应用最广泛的一种多聚体^[4]。发酵法是合成PHB的主要途径,杀虫贪铜菌(*C. necator*)H16菌株及其突变株是目前已知的利用果糖发酵生产PHB效果最好的菌株^[5-6],也是最早应用于PHB工业生产的菌株,目前各国研究人员对其性能、合成途径及生物信息学等进行了广泛深入的研究^[4-12]。过去针对PHB合成的研究主要在细胞群体水平,即从宏观层面探索PHB合成的最适条件,通过改变pH值、氮源、碳源和PHB产量等宏观信息来优化发酵环境^[13-14]。然而,即使是在很均一的微生物群体中,细胞间也存在遗传、生理、形态等多方面的遗传或非遗传的细胞间差异化能力,因此,应用单细胞分析技术分析细胞间的差异化信息亦有重要意义^[15],文献[16-19]基于单细胞分析技术对乙醇发酵进行了相关研究。单个细胞的拉曼光谱包含了核酸、蛋白质、多糖和脂类物质等反映细胞固有特性的信息,是细胞基因型、表型和生理状态的表现,在生物医学领域的应用日益广泛和深入^[20-21]。

文献[22-23]利用共焦显微拉曼光谱对菌株累积PHB进行定量检测或分析其PHB含量的异质性,但并未跟踪分析PHB合成过程中胞内核酸、蛋白质的代谢动态。文献[24]分析了不同碳源浓度下H16菌株的PHB合成动态,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,而发酵前期活跃的细胞生理状态是影响PHB合成的重要因素,菌株启动PHB的合成并不完全由于营养因子的匮乏。氮源是微生物生长必需的营养物质之一,直接参与核酸、蛋白质等生物大分子的合成。虽然氮源不是PHB合成的直接底物,但PHB合成需要一系列酶的催化,而氮源可以影响酶的活性,进而间接影响PHB的合成。

此外,不同发酵过程收集的单个菌体细胞的拉曼光谱数据是个庞大的数据矩阵,从中提取有效的细胞信息比较困难,有学者建立了生物大分子拉曼光谱数据库,尝试从化学计量学的多个角度挖掘微生物个体的拉曼光谱信息^[25-28]。鉴于氮源在PHB合成中的重要作用,本文结合光谱学和单细胞分析技术,利用数据挖掘技术分析*C. necator* H16菌株在不同氮源下合成PHB的规律及其胞内生物大分子的变化动态,旨在从分子光谱的角度为PHB发酵过程的优化提供新的信息。

2 材料与方 法

2.1 实验材料

菌株:杀虫贪铜菌(*C. necator*)H16菌株,由河北省科学院生物研究所宋水山研究员惠赠。

斜面培养基:酵母膏 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:酵母膏 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:Na₂HPO₄·7H₂O 9.0 g/L,KH₂PO₄ 1.5 g/L,MgSO₄·7H₂O 0.2 g/L,CaCl₂·2H₂O 0.002 g/L,NaHCO₃ 0.5 g/L,柠檬酸铁铵 0.005 g/L,微量元素溶液 1 mL,分别在 121 °C 灭菌后混合。

微量元素:CoCl₂·6H₂O 0.2 g/L,ZnSO₄·7H₂O 0.1 g/L,MnCl₂·4H₂O 30 mg/L,NaMoO₄·2H₂O 30 mg/L,NiCl₂·6H₂O 20 mg/L,CuSO₄·5H₂O 10 mg/L,FeSO₄·7H₂O 20 mg/L,H₃BO₃ 0.3 g/L。碳源为 2.0%(质量分数)果糖,pH 值为 7.0,115 °C 灭菌 20 min。

参与测试的无机氮源为硫酸铵和硝酸铵,有机氮源为尿素、牛肉膏、酵母粉和蛋白胨,用量分别为 2.0、1.21、0.91、4.35、4.21、3.90 g/L,每种氮源的总氮摩尔浓度基本相同。

所用试剂均为生物纯或分析纯试剂。

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 °C、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 80 mL 发酵培养基的 250 mL 锥形瓶中, 在 30℃、200 r/min 条件下培养。从接种时起至 72 h, 每隔 6 h 取样一次, 之后在 84 h 和 108 h 各取样一次。每次取样 2 mL, 1.2 mL 用于测量细胞的干重和 PHB 含量, 0.3 mL 用于测量菌体生物量, 0.5 mL 用于收集拉曼光谱。

2.2.2 分析方法

在一定的浓度范围内, 酵母细胞的浓度与 600 nm 处的光密度值(即 A_{600})成正比。用无菌水将发酵液稀释 10 倍, 测定 A_{600} 值。

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, 80~90℃ 水浴 1 h, 经适当稀释后测定 235 nm 处的光密度值。

用 3,5-二硝基水杨酸(DNS)比色法^[29]测定果糖含量。上述检测均由北京普析通用 TU-1901 紫外-可见分光光度计完成。

2.2.3 拉曼光谱系统与光谱检测

拉曼光谱系统与文献[19,30-31]描述类似。不同的是, 激发的拉曼散射经聚焦导入 LS785 光谱仪(Acton 公司, 美国), 光谱信号由一台风冷(-70℃)CCD(PIXIS 400BR, 普林斯顿仪器公司, 美国)采集。系统的分辨率为 6 cm^{-1} , 单个聚苯乙烯小球(直径 2.0 μm)用超纯水稀释后用于校正系统。

细胞光谱收集: 取 50 μL 发酵液稀释至合适的浓度, 置于样品槽内, 外加盖玻片密封。100 倍油浸物镜下寻找目标细胞, 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, 22 mW 激光激发, 信号累积时间为 45 s, 收集目标细胞的拉曼光谱, 于细胞附近以相同条件收集背景拉曼光谱。每个样品收集 45 个拉曼光谱, 5 个背景光谱。上述光谱的收集均于室温 24℃、湿度稳定的环境中进行。

2.3 数据处理方法

实验采集到的光谱数据转成 ASCII 格式, 进行背景扣除和响应曲线校正, 其算法为

$$S_{\text{act}}(v) = [S_{\text{acq}}(v) - S_{\text{bg}}(v)] / R(v), \quad (1)$$

式中 $S_{\text{act}}(v)$ 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 Visual Basic 6.0 编程对数据进行平滑去噪, 其算法为 9 点 Savitzky-Golay 卷积平滑法。通过 Matlab 编程, 以线性本底法(总峰面积法)计算的峰面积作为特征峰的信号强度, 并以设定发酵初始的强度为 1。

提取光谱数据矩阵的奇异值分解(SVD)在 C 程序中进行, 其算法为

$$A = U \Sigma V^T, \quad (2)$$

式中 A 为采集的去除背景的细胞拉曼光谱数据, 是 $M \times N$ 矩阵; 等号右侧是经分解得到的矩阵, 相乘后接近光谱矩阵 A 。 U 为 $M \times M$ 方阵, U 中的向量称为左奇异向量; Σ 为 $M \times N$ 矩阵, 其中除对角线元素外其他元素都为 0, 对角线上的元素称为奇异值; V^T 为 $N \times N$ 矩阵, V 中的向量称为右奇异向量, U 、 V 中的向量均相互正交。左奇异向量表征数据矩阵特性的大小, 右奇异向量表征数据矩阵特性, 中间的奇异值矩阵表征左奇异矩阵(向量)与右奇异矩阵(向量)的相关程度, 称之为相关系数, 数字越大表示相关度越大。在矩阵 Σ 中奇异值从大到小排列, 因此只需提取较大的几个奇异值就可以获得较多的信息。

3 结果与分析

3.1 不同氮源对菌体生长、底物利用和 PHB 合成的影响

如图 1 所示, 氮源不同, H16 菌株的菌体生长曲线、底物消耗、菌体干重和产物的合成动态明显不同。硝酸铵氮源下, 菌体生长和果糖消耗都只维持了约 18 h 就基本停滞, 有约 60% 的果糖残留, 细胞干重和 PHB 合成量很低。牛肉膏和蛋白胨是复杂的有机氮源, 两者的动力学行为基本一致, 细胞生长起步快, 但菌体生长、底物消耗和 PHB 合成速率较慢, 108 h 后尚残余 40% 左右的果糖。酵母粉也是复杂的有机氮源, 种子液接入发酵培养基 6 h 左右细胞数量开始进入对数生长期, 直到 30 h, 随后维持较缓的增长至 48 h, 果糖在 72 h 左右基本消耗完全, 其 PHB 合成也在 72 h 左右达到峰值。以硫酸铵、尿素为氮源的培养基, 其发酵动态基本一致, 12~36 h 是对数生长期, 也是果糖快速消耗时期, PHB 合成在 42 h 左右达到最大值, 是测试氮源中 PHB 合成效率最高的, 其中硫酸铵在 42 h 左右达到稳定期且 PHB 量最大。

上述结果显示,在H16菌株的PHB发酵中,氮源影响细胞生长,从而间接影响底物消耗和产物合成;所有测试氮源中,无机氮源硫酸铵发酵效果最好,有机氮源尿素次之;复杂的有机氮源利于细胞生长但影响PHB合成效率;可能是该菌株对硝酸铵利用效率低,PHB发酵效果最差。

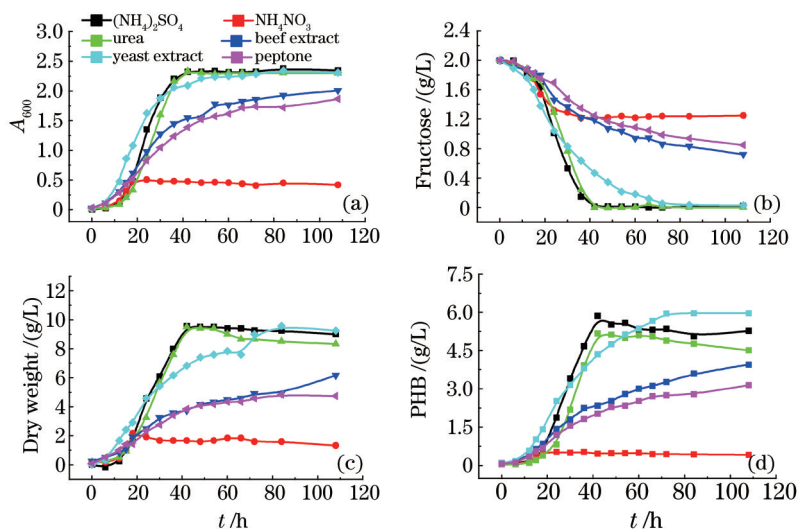


图1 H16菌株在不同氮源下的发酵动态。(a)生长曲线;(b)果糖消耗;(c)细胞干重;(d)PHB产量

Fig.1 Kinetic profiles of *C. necator* H16 cultured with ammonium sulphate, ammonium nitrate, urea, beef extract, yeast extract and peptone as nitrogen sources. (a) Growth curves (A_{600}); (b) fructose consumption; (c) cell dry weight; (d) PHB yield

3.2 不同氮源下PHB发酵过程拉曼光谱分析

3.2.1 不同氮源下PHB发酵过程拉曼光谱数据信息的压缩提取

图2为以硫酸铵作为氮源发酵时不同时间点的单个菌体细胞的平均拉曼光谱,特征峰尖锐明显,主要集中在 $400\sim 1750\text{ cm}^{-1}$ 范围内。其他氮源培养下的菌体细胞光谱与此类似(图中未给出)。其中 782 cm^{-1} 峰源自核酸U、T、C等碱基的环呼吸模, 1574 cm^{-1} 峰源自DNA碱基G、A的环呼吸模, 1660 cm^{-1} 峰来自蛋白质酰胺I,依细菌细胞成分组成特点依次为细胞RNA、DNA和蛋白质的特征峰^[22,32-33],而 835 、 901 、 1052 、 1104 、 1354 、 1454 、 1732 cm^{-1} 等峰主要来自细胞累积的PHB中C—O—C基团的伸缩振动、 CH_3 与CH基团的变形振动以及CO键的伸缩振动^[22,32-33]。随着PHB先累积再消耗,PHB特征峰拉曼信号在42 h前显著增强,而在42 h后逐步减弱。源自PHB中C=O基团的 1732 cm^{-1} 峰独立且显著,可用于定量分析细胞PHB含量而不受其他基团的干扰^[34-35]。

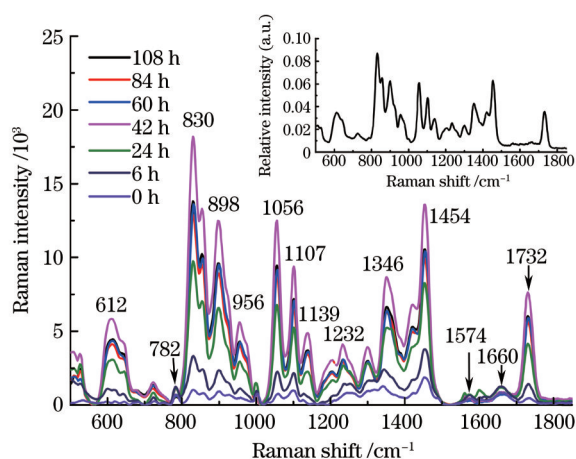


图2 硫酸铵为氮源时PHB发酵过程中单细胞平均拉曼光谱(插图为经奇异值分解提取的光谱)

Fig.2 Averaged Raman spectra of single *C. necator* H16 cell cultured with ammonium sulphate as the nitrogen source (the inset shows the spectrum extracted by singular value decomposition)

常用的光谱特征信息提取方法有很多种^[36],其中,SVD和主成分分析类似,是一种重要的矩阵分解方法^[37-38],该方法可通过降维简化数据集,并且提取前面较少的奇异值就可以获得较多信息,在多元分辨、模式

识别、统计学等领域有广泛应用。本文将发酵过程中收集到的各时段拉曼光谱数据矩阵进行奇异值分解,对数据进行列与行的压缩,抽取庞大数据中的主要信息,得到很好的效果。对60 h平均光谱进行奇异值分解,取压缩矩阵的第一维得到图2中的插图,获得了几乎所有光谱特征,和原光谱极其相似。

结合图1,选择具有典型代表性的6、36、60、108 h这4个时间点的数据进行SVD分析。结果显示,第一奇异值占总奇异值的比例分别为:6 h时96%、36 h时98%、60 h和108 h时99%;前三个奇异值获取了全部信息的98%以上。第一奇异值的占比随发酵时间逐渐增加,表明发酵初期(6 h)的整体差异较小,36 h时次之,60 h时基本趋于稳定,108 h时异质性最大;前三个奇异值所占的总方差比例极高,分析前三行矩阵和前三列矩阵所包含的信息即可获得绝大部分信息。下文将重点分析前三维数据的信息。

图3为6、36、60 h细胞光谱的奇异值分解结果,图3(a1)~(c1)为前三列奇异值(即左奇异向量)的投影,图3

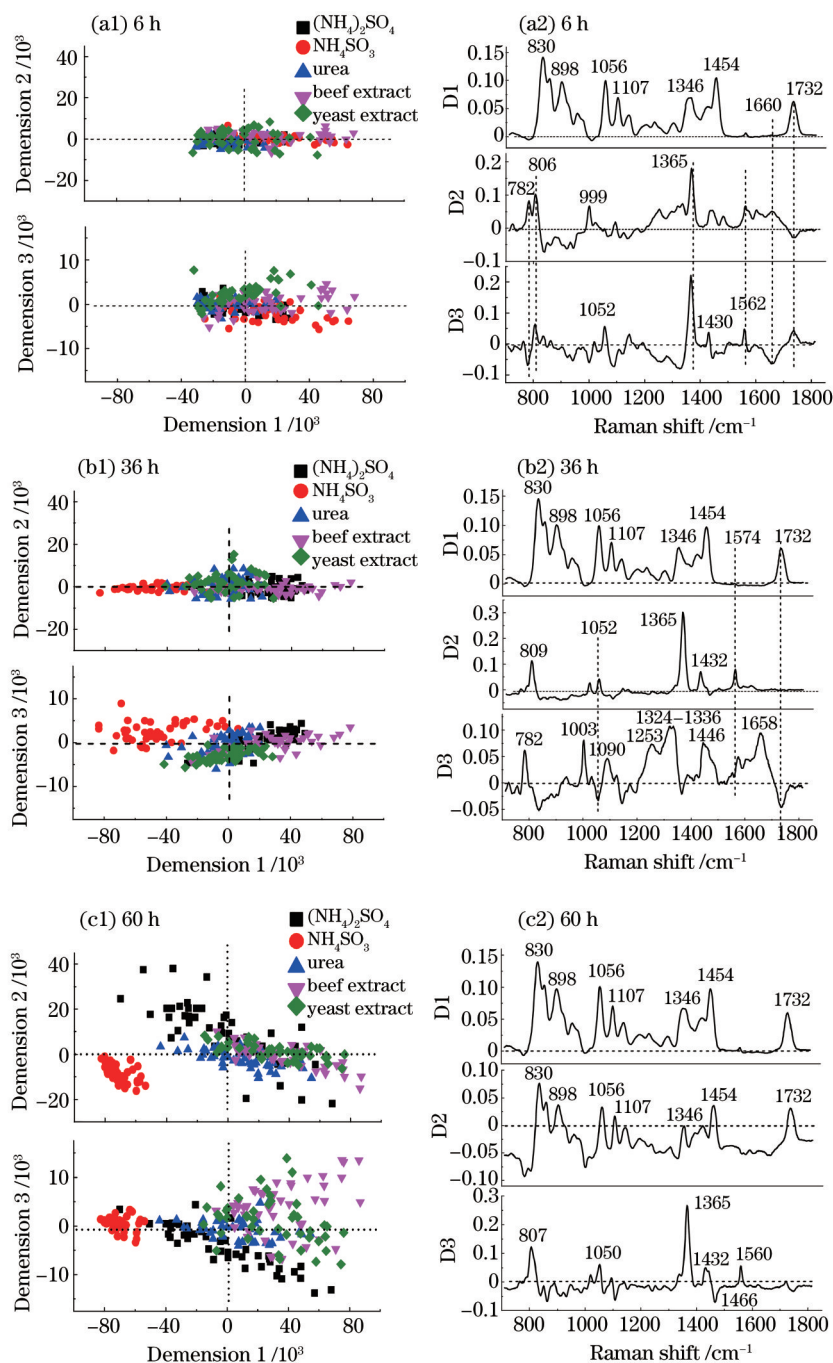


图3 单细胞拉曼光谱奇异值分解结果。(a1)(b1)(c1)前三列奇异值;(a2)(b2)(c2)前三行奇异矩阵投影图

Fig.3 SVD results of single-cell Raman spectra. (a1)(b1)(c1) The first three columns of singular values;

(a2)(b2)(c2) the first three rows of singular matrix

(a2)~(c2)为以拉曼位移为横坐标、以右奇异向量的前三行数据(D1、D2和D3)为纵坐标构成的投影图。6 h时,大部分氮源培养基的细菌光谱差异不明显,奇异值分布集中,只有牛肉膏和硝酸铵的细胞奇异值稍大。36 h时,硝酸铵菌体的奇异值和相关系数最小,硫酸铵和牛肉膏的奇异值和相关系数相当且最大,其分布区域能和硝酸铵区分开来;尿素和酵母粉的奇异值和相关系数相当,分布区域多有重叠,并且奇异值处在所有奇异值和相关系数值的中间。发酵至60 h,数据矩阵中奇异值和相关系数最小的仍为硝酸铵,分布于孤立的区域;和108 h时(数据未列出)相比较,除了硫酸铵氮源的数值比108 h时稍大之外,总体上其余特征都变化不大,表明60 h以后发酵已基本稳定。结合行矩阵的投影[图3(a2)~(c2)]分析发现,细胞光谱分布区域与生物大分子和PHB的特征峰呈负相关,对应胞内积累的生物大分子和PHB产物含量均达到最小,此时牛肉膏、酵母粉的菌体奇异值和相关系数有增大趋势且都超过尿素,硫酸铵的数值则维持在中间水平。

分析图3(a2)~(c2)可知,影响D1向量的主要因素是PHB的830、898、1056、1107、1346、1454、1732 cm^{-1} 等特征峰,对应胞内PHB的含量。影响D2、D3向量的主要是782、806~809、999~1003、1052、1090、1253、1324~1336、1365、1432、1446、1574、1660 cm^{-1} 左右的拉曼峰,对应核酸、蛋白质和脂类。此外,在发酵的各个阶段,表征RNA和蛋白质的782 cm^{-1} 和1660 cm^{-1} 峰强度相对较小。不同氮源下细胞RNA和产物的特征峰在发酵的各个时段出现在奇异矩阵的多个向量中,表明不同氮源下菌体的发酵和代谢方向是多样性的。在发酵过程中,氮源通过影响蛋白质、RNA、腺嘌呤和DNA等物质的代谢,间接影响PHB的合成。综上,经过数据的压缩降维,可清楚地得到发酵过程中各氮源菌体的发酵趋势、差异性以及影响机制,同时了解各特征峰在发酵中扮演的角色。

3.2.2 不同氮源下菌体中RNA、DNA、蛋白质和PHB的动力学分析

图4为几个主要特征峰峰面积的变化动态情况。782 cm^{-1} 峰与RNA相关,由图4(a)可见,不管何种氮源下,从接种时刻起,H16细胞内RNA均表现为先快速合成再逐渐减少,其中三种复杂有机氮源的细胞的峰值出现在9~10 h左右,无机氮源硫酸铵、硝酸铵和简单的有机氮源尿素的细胞内RNA量在12~15 h左右达到最大。以硫酸铵、硝酸铵和尿素为氮源的细胞,其RNA峰强度是初始强度的2.5~3.4倍左右,而复杂有机氮源的细胞RNA强度仅为起始强度的1.5~1.7倍左右。特别的是,硝酸铵氮源下的H16细胞,其RNA在发酵中后期一直保持很高的含量。

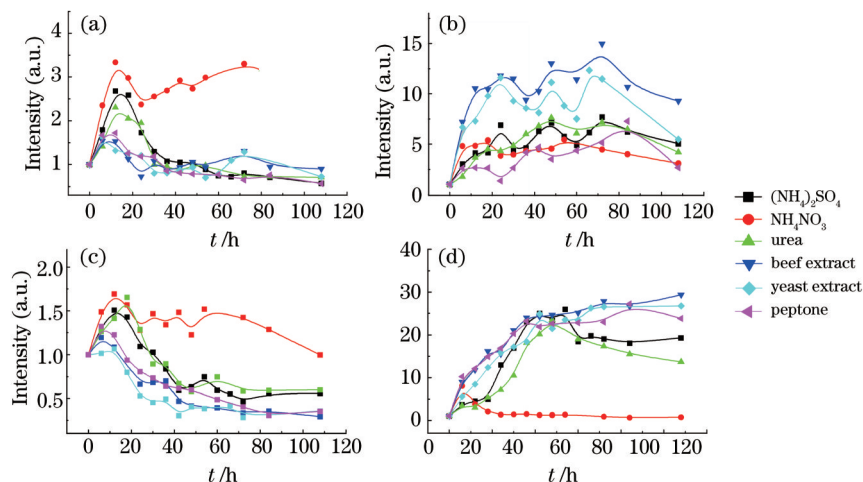


图4 PHB发酵过程中特征峰的变化动态。(a) 782 cm^{-1} ; (b) 1574 cm^{-1} ; (c) 1660 cm^{-1} ; (d) 1732 cm^{-1}

Fig.4 Dynamic peak intensity during the PHB fermentation. (a) 782 cm^{-1} ; (b) 1574 cm^{-1} ; (c) 1660 cm^{-1} ; (d) 1732 cm^{-1}

1574 cm^{-1} 峰源于细胞DNA,其强度在接入发酵培养基后迅速增大见[图4(b)],其中酵母粉和牛肉膏的增强速度和强度基本类似且在所有氮源中最大,增长态势维持至24 h左右,峰值强度是起始强度的10~12倍左右,之后一直保持着高含量的动态平衡。尿素与硫酸铵的动态基本一致,前12 h增长速率较大,12~42 h缓慢增加,之后保持稳定直到发酵结束。蛋白胍氮源的峰值一直维持在相对较低的水平。硝酸铵1574 cm^{-1} 峰(DNA)的变化动态与782 cm^{-1} (RNA)、1660 cm^{-1} (蛋白质)明显不同,在经过12 h左右的快速增强后基本保持不

变,且与其他氮源相比含量相对较低。

1645~1670 cm^{-1} 峰源自细胞的蛋白质。由图4(c)可见,不同氮源下H16胞内的蛋白质变化动态和源自RNA的782 cm^{-1} 峰基本相同,均有一个快速合成和减少的过程,其中三种复杂有机氮源的峰值出现在6~9 h左右,其强度约为起始强度的1.1~1.3倍;硫酸铵、硝酸铵和尿素为氮源的细胞在12~18 h左右达到最大,其强度为起始强度的1.5~1.7倍。硝酸铵氮源下的H16细胞,其蛋白质峰在发酵中后期一直保持很高的强度。

图4(d)为与PHB相关的1732 cm^{-1} 特征峰强度变化动态,硝酸铵在接种后就开始积累PHB,但其特征峰经历6 h短暂增加后很快开始变弱。其他氮源下,在前42 h总体呈快速增长态势。此后,复杂有机氮源下的细胞还在继续合成PHB,而硫酸铵和尿素下的细胞胞内PHB含量开始逐渐下降,对比图1(c)可知,这是由于培养基中果糖已经消耗殆尽,H16细胞开始以胞内累积的PHB为能源维持细胞的生长。酵母粉、牛肉膏和蛋白胨氮源下的细胞从发酵起始就开始在胞内较快速地合成PHB,而硫酸铵和尿素氮源下的细胞则是经过12~18 h的少量合成后才开始大量合成PHB,这个现象和图1(a)对应,三种复杂有机氮源下的细胞在接入发酵培养基后经过短暂的适应就快速生长,而硫酸铵和尿素氮源下的细胞则是经过12~18 h迟滞期后才开始生长。对比图4(d)和图1(a)可见,单个细胞内部PHB合成态势和群体细胞的生长动态基本相同。

图4的数据还显示,细胞782 cm^{-1} 峰强度的变化趋势与1660 cm^{-1} 峰类似,而与1732 cm^{-1} 峰的变化趋势相反。由图5可见,不管何种氮源,782 cm^{-1} 峰与1660 cm^{-1} 峰的强度呈正相关,而1660 cm^{-1} 峰与1732 cm^{-1} 峰的强度呈负相关,亦即胞内RNA与蛋白质含量呈正相关,而PHB含量与胞内RNA、蛋白质含量呈负相关。这是由于细菌细胞的RNA以核糖体RNA为主,而核糖体RNA是合成蛋白质的基础,因此,胞内活跃且含量高的RNA有可能加强了蛋白质的合成,进而削弱了PHB的合成。

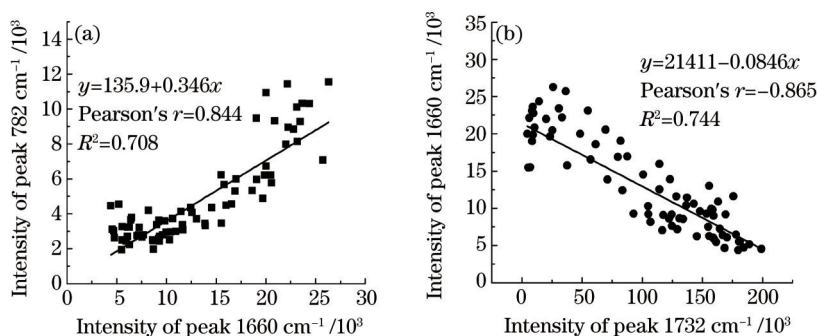


图5 信号强度相关性分析。(a) 782 cm^{-1} 峰与1660 cm^{-1} 峰;(b) 1660 cm^{-1} 峰与1732 cm^{-1} 峰

Fig.5 Raman intensity correlation analysis. (a) Peak 782 cm^{-1} and peak 1660 cm^{-1} ; (b) peak 1660 cm^{-1} and peak 1732 cm^{-1}

在不同的氮源条件下,H16细胞进入新的发酵环境后,均经历一个活跃的代谢过程,RNA和蛋白质先是快速合成,达到峰值后又降低,而DNA和PHB则是经过一定时期的快速合成后进入较为稳定的阶段,但在不同的氮源下上述大分子合成代谢的强度不同。PHB的合成与氮源密切相关,RNA、DNA和PHB在不同氮源中合成的强度和方向不一致,氮源通过影响RNA和蛋白质的代谢进而影响PHB的合成。

4 结 论

以发酵速率和产量作为衡量指标,可得在PHB发酵中以硫酸铵氮源的发酵效果最好,尿素次之。根据奇异值分布可知菌体的代谢方向、产物的差别自发酵开始就不一致,并且随着发酵的进行,差异越来越大,且由奇异向量可知各氮源中发酵和代谢是多向的。胞内物质特征峰强度的动力学分析显示,生物大分子变化活跃期对应PHB快速合成期,氮源通过影响RNA和蛋白质的代谢间接影响PHB产物的合成。拉曼光谱结合数据挖掘技术可以分析微生物发酵过程中的代谢信息,从分子光谱的角度为寻找最佳的发酵条件提供新的信息。

参 考 文 献

- 1 Grage K, Jahns A C, Parlane 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.

- 2 Keshavarz T, Roy I. Polyhydroxyalkanoates: Bioplastics with a green agenda[J]. *Current opinion in microbiology*, 2010, 13(3): 321–326.
- 3 Chen G Q. A microbial polyhydroxyalkanoates (PHA) based bio- and materials industry[J]. *Chemical Society Reviews*, 2009, 38(8): 2434–2446.
- 4 Cramm R. Genomic view of energy metabolism in *Ralstonia eutropha* H16[J]. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 2009, 16(1–2): 38–52.
- 5 Peoples O P, Sinskey A J. Poly- β -hydroxybutyrate (PHB) biosynthesis in *Alcaligenes eutrophus* H16, identification and characterization of the PHB polymerase gene (phbC)[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1989, 264(26): 15298–15303.
- 6 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(Pt 7): 2136–2152.
- 7 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.
- 8 Kobayashi T, Shiraki M, Abe T, *et al.*. Purification and properties of an intracellular 3-hydroxybutyrate-oligomer hydrolase (PhaZ2) in *Ralstonia eutropha* H16 and its identification as a novel intracellular poly (3-hydroxybutyrate) depolymerase[J]. *Journal of Bacteriology*, 2003, 185(12): 3485–3490.
- 9 Tian J, Sinskey A J, Stubbe J. Kinetic studies of polyhydroxybutyrate granule formation in *Wautersia eutropha* H16 by transmission electron microscopy[J]. *Journal of Bacteriology*, 2005, 187(11): 3814–3824.
- 10 Eggers J, Steinbuchel A. Poly (3-hydroxybutyrate) degradation in *Ralstonia eutropha* H16 is mediated stereoselectively to (S)-3-hydroxybutyryl coenzyme A (CoA) via crotonyl-CoA[J]. *Journal of Bacteriology*, 2013, 195(14): 3213–3223.
- 11 Batcha A F M, Prasad D M R, Khan M R, *et al.*. Biosynthesis of poly (3-hydroxybutyrate) (PHB) by *Cupriavidus necator* H16 from jatropha oil as carbon source[J]. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2013, 37(5): 943–951.
- 12 Sznajder A, Pfeiffer D, Jendrossek D. Comparative proteome analysis reveals four novel polyhydroxybutyrate (PHB) granule-associated proteins in *Ralstonia eutropha* H16[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2015, 81(5): 1847–1858.
- 13 Jarute G, Kainz A, Schroll G, *et al.*. On-line determination of the intracellular poly (β -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.
- 14 Khanna S, Srivastava A K. On-line characterization of physiological state in poly (β -hydroxybutyrate) production by *Wautersia eutropha* [J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2009, 157(2): 237–243.
- 15 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.
- 16 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.
- 17 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.
- 18 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.
- 19 Qin Zhaojun, Lai Junzhuo, Peng Lixin, *et al.*. Raman spectral profiles of promoting effects of organic nitrogen sources on ethanol fermentation using *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2014, 42(10): 1471–1477.
覃赵军, 赖钧灼, 彭立新, 等. 拉曼光谱分析有机氮源促进乙醇发酵的机制[J]. *分析化学*, 2014, 42(10): 1471–1477.
- 20 Chan J W. Recent advances in laser tweezers Raman spectroscopy (LTRS) for label-free analysis of single cells[J]. *Journal of Biophotonics*, 2013, 6(1): 36–48.
- 21 Li M Q, Xu J, Romero-Gonzalez M E, *et al.*. Single cell Raman spectroscopy for cell sorting and imaging[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2011, 23(1): 56–63.
- 22 Gelder J D, Willemsse-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.
- 23 Hermelink A, Stämmli M, Naumann D. Observation of content and heterogeneity of poly- β -hydroxybutyric acid (PHB) in *Legionella bozemanii* by vibrational spectroscopy[J]. *Analyst*, 2011, 136(6): 1129–1133.

- 24 Qin Zhaojun, Peng Lixin, Zhu Libo, *et al.*. Raman spectral profiles of PHB synthesis by *Cupriavidus necator* H16 at different fructose levels[J]. Chinese J Lasers, 2015, 42(3): 0315003.
覃赵军, 彭立新, 竺利波, 等. 碳源浓度影响微生物 PHB 合成代谢的单细胞拉曼光谱分析[J]. 中国激光, 2015, 42(3): 0315003.
- 25 Moritz T J, Taylor D S, Polage C R, *et al.*. Effect of cefazolin treatment on the nonresonant Raman signatures of the metabolic state of individual *Escherichia coli* cells[J]. Analytical Chemistry, 2010, 82(7): 2703–2710.
- 26 De Gelder J, De Gussem K, Vandenabeele P, *et al.*. Methods for extracting biochemical information from bacterial Raman spectra: Focus on a group of structurally similar biomolecules—fatty acids[J]. Analytica Chimica Acta, 2007, 603(2): 167–175.
- 27 De Gelder J, De Gussem K, Vandenabeele P, *et al.*. Methods for extracting biochemical information from bacterial Raman spectra: An explorative study on *Cupriavidus metallidurans*[J]. Analytica Chimica Acta, 2007, 585(2): 234–240.
- 28 Hall E K, Singer G A, Pözl M, *et al.*. Looking inside the box: Using Raman microspectroscopy to deconstruct microbial biomass stoichiometry one cell at a time[J]. ISME Journal, 2011, 5(2): 196–208.
- 29 Zhao Haixia, Yuan Ding, He Yumin, *et al.*. Quantitative determination of *Panax japonicus* polysaccharide by DNS method[J]. Science and Technology of Food Industry, 2010, 31(6): 327–329.
赵海霞, 袁 丁, 何毓敏, 等. 3,5-二硝基水杨酸比色法测定竹节参中多糖的含量[J]. 食品工业科技, 2010, 31(6): 327–329.
- 30 Xie C G, Dinno M A, Li Y Q. Near-infrared Raman spectroscopy of single optically trapped biological cells[J]. Optics Letters, 2002, 27(27): 249–251.
- 31 Huang Shushi, Lu Mingqian, Li Bing, *et al.*. Real-time detection on the expression of soluble protein and inclusion body in the recombinant *Escherichia coli* with laser tweezers Raman spectroscopy[J]. Chinese J Lasers, 2014, 41(12): 1215003.
黄庶识, 卢明倩, 李 冰, 等. 重组大肠杆菌表达可溶性蛋白和包涵体过程的拉曼光谱实时分析[J]. 中国激光, 2014, 41(12): 1215003.
- 32 De Gelder J, De Gussem K, Vandenabeele P, *et al.*. Reference database of Raman spectra of biological molecules[J]. Journal of Raman Spectroscopy, 2007, 38(9): 1133–1147.
- 33 Movasaghi Z, Rehman S, Rehman I U. Raman spectroscopy of biological tissues[J]. Applied Spectroscopy Reviews, 2007, 42(5): 493–541.
- 34 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.
- 35 Izumi C M S, Temperini M L A. FT-Raman investigation of biodegradable polymers: Poly (3-hydroxybutyrate) and poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)[J]. Vibrational Spectroscopy, 2010, 54(2): 127–132.
- 36 Maguire A, Vega Carrascal I, White L, *et al.*. Competitive evaluation of data mining algorithms for use in classification of leukocyte subtypes with Raman microspectroscopy[J]. Analyst, 2014, 140(7): 2473–2481.
- 37 Nejadgholi I, Caytak H, Bolic M, *et al.*. Preprocessing and parameterizing bioimpedance spectroscopy measurements by singular value decomposition[J]. Physiological Measurement, 2015, 36(5): 983–999.
- 38 Khmaladze A, Jasensky J, Price E, *et al.*. Hyperspectral imaging and characterization of live cells by broadband coherent anti-Stokes Raman scattering (CARS) microscopy with singular value decomposition (SVD) analysis[J]. Applied Spectroscopy, 2014, 68(10): 1116–1122.

栏目编辑: 史 敏