

文章编号:1008-1542(2012)05-0459-05

门多萨假单胞菌 DS04-T 对 Poly(3HB-co-4HB) 的降解研究

李琳琳, 高 佳, 杨翔华, 王战勇

(辽宁石油化工大学环境与生物工程学院, 辽宁抚顺 113001)

摘要:考察了门多萨假单胞菌 DS04-T 对 Poly(3HB-co-4HB) 的降解行为。以 Poly(3HB-co-4HB) 为唯一碳源, 分别考察培养时间、培养温度、摇床转速、装液量、培养基起始 pH 值、接种量等因素对降解行为的影响。结合正交试验优化获得了菌株的最佳产酶条件: 培养时间为 28 h, 培养温度为 30 °C, 培养基初始 pH 值为 7.3, 摇床转速为 150 r/min, 培养基装液量为 120 mL (250 mL 三角瓶), 接种量为 1.5% (体积分数), 此条件下菌株对 Poly(3HB-co-4HB) 的降解酶活力可达 $(26.2 \pm 0.7) \text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

关键词: 门多萨假单胞菌; Poly(3HB-co-4HB); 降解; 酶活力

中图分类号: Q93 文献标志码: A

Degradation of Poly(3HB-co-4HB) by *Pseudomonas mendocina* DS04-T

LI Lin-lin, GAO Jia, YANG Xiang-hua, WANG Zhan-yong

(School of Environmental and Biological Engineering, Liaoning Shihua University, Fushun Liaoning 113001, China)

Abstract: The degradation of Poly(3HB-co-4HB) by *Pseudomonas mendocina* DS04-T was studied. Poly(3HB-co-4HB) was used as the sole carbon source of culture medium. The influence of cultivation time, cultivation temperature, shaking revolution, liquid medium volume, initial pH and inoculation content were studied. Combining single factor test and orthogonal test, the optimal degrading enzyme production conditions were chosen as follows: cultivation time is 28 h, cultivation temperature is 30 °C, shaking revolution is 150 r/min, initial pH is 7.3, culture medium volume is 120 mL and inoculation content is 1.5% (V/V). Under the optimized condition, the degradation enzyme activity reaches $(26.2 \pm 0.7) \text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$.

Key words: *Pseudomonas mendocina*; Poly(3HB-co-4HB); degradation; enzyme activity

聚羟基脂肪酸酯(PHA, polyhydroxyalkanoates)是近 20 多年迅速发展起来的生物高分子材料,是很多微生物合成的一种细胞内聚酯,是一种天然的高分子生物材料^[1]。由于 PHA 具有良好的生物降解性和生物相容性,可由微生物发酵生产,已引起材料领域越来越多学者的关注,被认为是环境友好的生物可降解塑料^[2-3]。聚(3-羟基丁酸酯-co-4-羟基丁酸酯)即 poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate)或 Poly(3HB-co-4HB),是 PHA 的一种。Poly(3HB-co-4HB)是一种典型的半结晶聚合物,它主要由 2 种共聚物构成,即富 3HB 微区 Poly(3HB-co-4HB)共聚物和富 4HB 微区的 Poly(3HB-co-4HB)共聚物^[4]。微生物降

收稿日期:2012-03-05;修回日期:2012-06-11;责任编辑:王海云

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31100099);辽宁省教育厅科学技术项目(L2011060);辽宁石油化工大学科学基金项目(2011XJ-025)

作者简介:李琳琳(1988-),女,山东济南人,硕士研究生,主要从事生物化工方面的研究。

通讯作者:王战勇。E-mail:wangzy125@gmail.com

解技术成本低廉,是一种具有广泛应用前景的环境治理技术^[5-6]。Poly(3HB-co-4HB)作为生物可降解塑料,虽具有良好降解特性,其废弃物能够在环境中实现完全降解,不会造成环境污染。但实际上 Poly(3HB-co-4HB)在自然环境中的降解相对缓慢,这就要求在其应用后对其进行必要的降解处理。本研究初步考察了门多萨假单胞菌 DS04-T 菌株对 Poly(3HB-co-4HB)的降解行为,为其进一步的应用和降解提供相关的基础研究结果。

1 材料与方法

1.1 菌种来源

门多萨假单胞菌(*Pseudomonas mendocina*) DS04-T,笔者实验室保存。

1.2 实验药品及培养基

Poly(3HB-co-4HB)由中国科学院长春应用化学研究所提供;其他药品均为国产分析纯。

基本培养基(质量分数): NH_4Cl (0.1%); $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.05%); $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0.0005%); KH_2PO_4 (0.554%); $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (1.194%)。

发酵培养基(质量分数):基础培养基添加 Poly(3HB-co-4HB)(0.15%),即为发酵培养基。

LB培养基(质量分数):胰蛋白胨(1.0%);酵母粉(0.5%);NaCl(1.0%)。

1.3 实验仪器

ALC-210.4 电子天平(德国赛多利斯股份公司提供);MODEL868 型数字式酸度计(美国 Thermo 公司提供);HZQ-C 空气浴振荡器(哈尔滨东联电子技术开发有限公司提供);JY 92-II 超声波细胞破碎机(宁波新芝科器研究所提供);HH-4 型数显恒温水浴锅(国华电器有限公司提供);UV-2600 紫外可见分光光度计(尤尼克(上海)仪器有限公司提供);SHP-1500 型生化培养箱(上海精宏实验设备有限公司提供);BCN-1360B 型生物洁净工作台(北京东联哈尔仪器制造有限公司提供);LDZX-50KB 立式压力蒸汽灭菌器(上海申安医疗器械厂提供);PICO17 高速离心机(美国 Thermo 公司提供)。

1.4 实验方法

将菌种接种于 LB 液体培养基中,37℃摇床 150 r/min 培养 16 h,将菌液转移至离心管中 3 500 r/min 离心 5 min,倾去上清液,再用基本培养基反复洗涤 3 次,最后使其悬浮于基本培养基中制成菌悬液,保证菌悬液中细菌浓度约为 1×10^9 个/mL。

按发酵培养基配方配制液体培养基,考察不同培养条件对菌株降解 Poly(3HB-co-4HB)的影响。

1.5 酶活力测定

培养结束后将发酵液以 12 000 r/min 离心 5 min,取上清液(粗酶液),以 Poly(3HB-co-4HB)乳化液为底物,分光光度法测定 Poly(3HB-co-4HB)降解酶活力。取 3 mL Poly(3HB-co-4HB)乳化液加 1 mL 粗酶液,置于 50℃恒温水浴中保温 30 min 后,630 nm 测定吸光值变化。以灭活酶液做空白对照。依照酶活单位定义(50℃条件下,每分钟引起光吸收降低 0.001(A_{630 nm})单位所需的酶量定义为 1 个酶活力单位(U)^[7-8])进行酶活力测定。

2 结果与讨论

2.1 培养时间对菌株的 Poly(3HB-co-4HB)降解酶活力的影响

菌悬液以 1%(体积分数)接种量接种到 100 mL 的 pH 值为 7.3 的发酵培养基中,37℃,150 r/min 摇床振荡培养不同时间。考察培养时间对降解酶活力的影响,如图 1 所示。

由图 1 可看出,菌株产酶能力随着培养时间的增加,呈上升趋势。前 12 h 增加较为缓慢,这应该是菌株的调整和适应阶段;培养时间为 12~28 h 时酶活力迅速增加,应该是菌株处于对数增长期,菌体迅速增长,状态最佳,产酶能力增加显著;当培养时间大于 28 h 之后酶活力变化并不明显,这是由于菌株生长进入稳定期的结果。综上所述,初步确定培养时间为 28 h。

2.2 培养温度对菌株的 Poly(3HB-co-4HB)降解酶活力的影响

菌悬液以 1%(体积分数)接种量接种到 100 mL 的 pH 值为 7.3 的发酵培养基中,150 r/min 摇床振荡培养 28 h。考察培养温度对降解酶活力的影响,如图 2 所示。

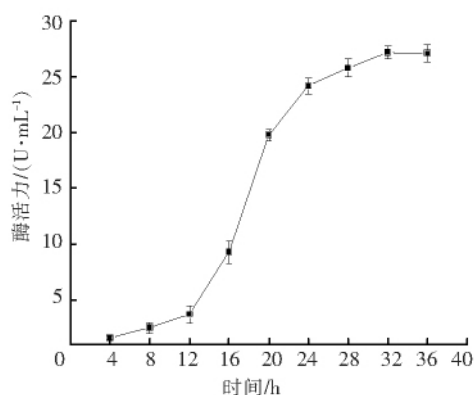


图 1 培养时间对菌株的 Poly(3HB-co-4HB) 降解酶活力的影响

Fig. 1 Effect of cultivation time on Poly(3HB-co-4HB) degrading enzyme activity of the strain

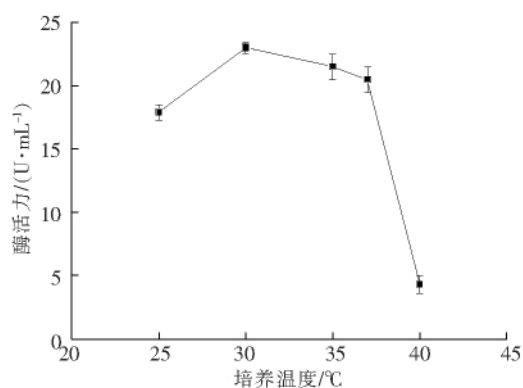


图 2 培养温度对菌株的 Poly(3HB-co-4HB) 降解酶活力的影响

Fig. 2 Effect of cultivation temperature on Poly(3HB-co-4HB) degrading enzyme activity of the strain

由图 2 可看出,酶活力随培养温度的变化先上升后下降,培养温度为 30 °C 时降解酶活力最高,此后提高温度酶活力呈现下降趋势,一般来说温度对酶活力的影响具有两面性,一方面温度的升高有利于酶活力的提高,另一方面温度过高又会导致酶活力的丧失,综合考虑确定 30 °C 为最适培养温度。

2.3 摇床转速对菌株的 Poly(3HB-co-4HB) 降解酶活力的影响

菌悬液以 1% (体积分数) 接种量接种到 100 mL 的 pH 值为 7.3 的发酵培养基中,30 °C 摇床振荡培养 28 h。考察摇床转速对降解酶活力的影响,如图 3 所示。

由图 3 可看出,实验范围内,摇床转速对菌株产酶能力的影响并不明显。因摇床转速某种程度上是培养基溶解氧的体现,因此可推测实验范围内摇床转速对培养基溶解氧影响不大,进而对菌株生长和降解能力影响不明显。

2.4 装液量对菌株的 Poly(3HB-co-4HB) 降解酶活力的影响

菌悬液以 1% (体积分数) 接种量接种到 pH 值为 7.3 的发酵培养基中,30 °C,150 r/min 摇床振荡培养 28 h。考察 250 mL 三角瓶中的培养基装液量对降解酶活力的影响,结果如图 4 所示。

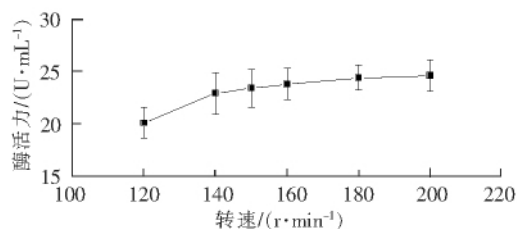


图 3 摇床转速对菌株的 Poly(3HB-co-4HB) 降解酶活力的影响

Fig. 3 Effect of shaking revolution on Poly(3HB-co-4HB) degrading enzyme activity

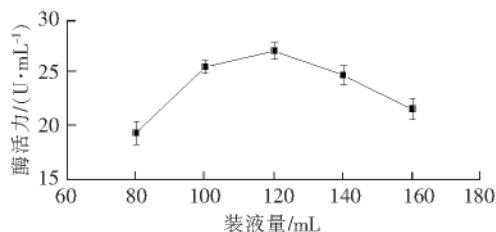


图 4 装液量对菌株的 Poly(3HB-co-4HB) 降解酶活力的影响

Fig. 4 Effect of liquid medium volume on Poly(3HB-co-4HB) degrading enzyme activity

由图 4 可看出,装液量对酶活力有影响,在实验范围内呈现先上升后下降趋势,装液量也是培养基溶解氧的体现,由图 4 可见培养基装液量对溶解氧影响比较明显,综合考虑选定培养基装液量为 120 mL。

2.5 培养基初始 pH 值对菌株的 Poly(3HB-co-4HB) 降解酶活力的影响

菌悬液以 1% (体积分数) 接种量接种到 120 mL 的不同 pH 值的发酵培养基中,30 °C,150 r/min 摇床振荡培养 28 h。考察培养基初始 pH 值对降解酶活力的影响,结果如图 5 所示。

由图 5 可看出,酶活力随培养基初始 pH 值的增加先上升后下降,pH 值为 7.3 时酶活力最高,其原因在

于 pH 值影响微生物的代谢以及酶活力,过高或过低都不利于微生物的生长代谢,而且也会影响到降解酶的活力,因此确定培养基初始 pH 值为 7.3。

2.6 接种量对菌株的 Poly(3HB-co-4HB)降解酶活力的影响

菌悬液以不同接种量接种到 pH 值为 7.3 的 120 mL 发酵培养基中,30 °C,150 r/min 摇床振荡培养 28 h。考察接种量对降解酶活力的影响,结果如图 6 所示。

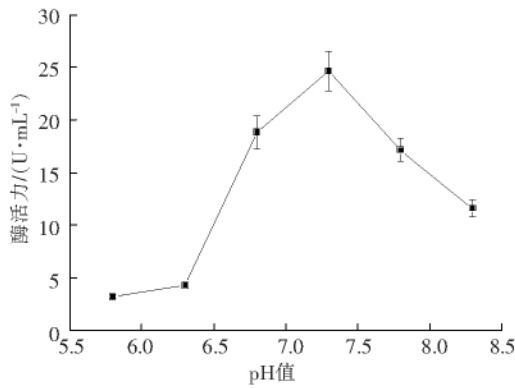


图 5 培养基初始 pH 值对菌株的 Poly(3HB-co-4HB)降解酶活力的影响
Fig. 5 Effect of initial pH on Poly(3HB-co-4HB) degrading enzyme activity

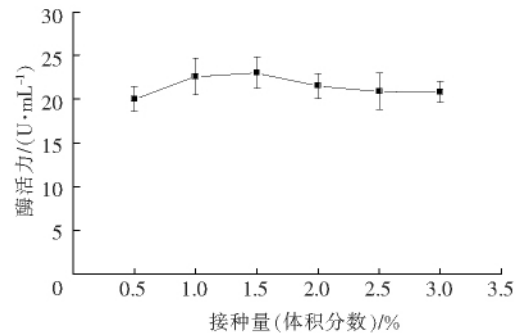


图 6 接种量对菌株的 Poly(3HB-co-4HB)降解酶活力的影响
Fig. 6 Effect of inoculation content on Poly(3HB-co-4HB) degrading enzyme activity

由图 6 可看出,试验范围内接种量对酶活力的影响并不明显,但接种量为 1.5%(体积分数)时酶活力相对较高。

2.7 正交试验

结合单因素实验,设计 4 因素 3 水平的正交试验优化发酵条件。实验的因素和水平如表 1 所示。

正交试验的直观分析如表 2 所示。 K_n 表示以 n 水平试验的结果的均值。 R 表示因素极差,即 K_1, K_2, K_3 中最大值与最小值之差。从以上实验结果可

表 1 因素与水平
Tab. 1 Factors and the levels

水平	因素			
	A 培养时 间/h	B pH 值	C 250 mL 三角瓶中 装液量/mL	D 接种量(体积 分数)/%
1	28	7.0	100	1.0
2	30	7.3	120	1.5
3	32	7.5	140	2.0

表 2 正交试验直观分析
Tab. 2 Direct analysis of orthogonal test

试验号	因素				酶活力/ (U·mL ⁻¹)
	A	B	C	D	
1	28	7.0	100	1.0	24.8
2	28	7.3	120	1.5	26.4
3	28	7.5	140	2.0	24.3
4	30	7.0	120	2.0	25.7
5	30	7.3	140	1.0	24.3
6	30	7.5	100	1.5	25.1
7	32	7.0	140	1.5	24.2
8	32	7.3	100	2.0	25.1
9	32	7.5	120	1.0	25.4
K_1	25.17	24.90	25.00	24.83	
K_2	25.03	25.27	25.83	25.23	
K_3	24.90	24.93	24.27	25.03	
R	0.27	0.37	1.56	0.40	

确定最优培养条件为 $A_1B_2C_2D_2$, 即培养时间为 28 h, 初始 pH 值为 7.3, 装液量为 120 mL, 接种量为 1.5% (体积分数)。根据表中极差值大小, 排列出影响试验的因素的主次顺序: C (装液量) $>$ D (接种量) $>$ B (初始 pH 值) $>$ A (培养时间)。

正交试验的方差分析如表 3 所示。

通过表 3 的方差分析再次证明, 装液量对结果影响最大, 其他影响因素与之相比影响较小。

综上所述, 确定了门多萨假单胞菌 DS04-T 菌株对 Poly(3HB-co-4HB) 的最佳产酶条件: 培养温度为 30 °C, 培养时间为 28 h, 培养基初始 pH 值为 7.3, 摇床转速为 150 r/min, 培养基装液量为 120 mL (250 mL 三角瓶), 接种量为 1.5% (体积分数)。在此优化条件下菌株产生的 Poly(3HB-co-4HB) 降解酶活力可达 $(26.2 \pm 0.7) \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

参考文献:

- [1] PAPANEPHYTOU C P, VELALI E E, PANTAZAKI A A. Purification and characterization of an extracellular medium-chain length polyhydroxyalkanoate depolymerase from *Thermus thermophilus* HB8 [J]. *Polym Degrad and Stabil*, 2011, 96(4): 670-671.
- [2] LUCAS N, BIENAIME C, BELLOY C, et al. Polymer biodegradation: Mechanisms and estimation techniques [J]. *Chemosphere*, 2008, 73(4): 429-442.
- [3] WEN Xing, LU Xiu-ping. Microbial degradation of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) in soil [J]. *J Polym Environ*, 2012, 20(2): 381-387.
- [4] CHANPRATEEP S. Current trends in biodegradable poly-hydroxyalkanoates [J]. *J Biosci Bioeng*, 2010, 110(6): 621-632.
- [5] 刘宝友, 罗湘南, 邢质贤, 等. 微生物降解含煤油废水的研究 [J]. *河北科技大学学报 (Journal of Hebei University of Science and Technology)*, 2007, 28(4): 314-316.
- [6] 王瑜瑜, 张春晓, 郭建博, 等. 耐盐基因工程菌降解偶氮染料特性研究 [J]. *河北科技大学学报 (Journal of Hebei University of Science and Technology)*, 2010, 31(5): 483-486.
- [7] WANG Zhan-yong, GAO Jia, LI Lin-lin, et al. Purification and characterization of an extracellular poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) depolymerase from *Acidovorax* sp. HB01 [J]. *World J Microb Biot*, 2012, 28(6): 2 395-2 402.
- [8] 刘天识. 可控降解 PHB 为单体及其发酵条件的探索研究 [D]. 长春: 东北师范大学, 2007.

(上接第 385 页)

实际上, A-statistic^[3] 中的 r 是与 Lander-Waterman 定理^[6] 中的 T, L 和 θ 相关的, $r = (k-1)(1-\theta)L$, 因此 contig 的个数也可以写成

$$Fe^{-\frac{LF}{G}(1-\theta)} + \sum_{i=1}^{\infty} [(\omega_i(k-1)(1-\theta)LF/G)^k / k!] e^{-\omega_i(k-1)(1-\theta)LF/G} (\omega_i - 1). \quad (2)$$

在 Lander-Waterman 定理^[6] 中有几个公式, 其他的几个公式都可以据此推广到有重复片段叠加的一般情况, 由于篇幅限制, 本文只给出第一个公式的推广。

4 在基因组中的应用说明

基于给出的式(1)和式(2), 可以计算出正确的 contig 的个数, 可与实际组装生成的 contig 的个数相比较, 来评价组装的质量以及受 repeat 叠加影响的严重程度。

参考文献:

- [1] LI R, FAN W, TIAN G, et al. The sequence and de novo assembly of the giant panda genome [J]. *Nature*, 2010, 463: 311-317.
- [2] PEVZNER P A, TANG H, WATERMAN M S. An Eulerian path approach to DNA fragment assembly [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2001, 98: 9 748-9 753.
- [3] EUGENE W, MYER S. A whole-genome assembly of drosophila [J]. *Science*, 2000, 287: 2 196.
- [4] STEVEN L, SALZBERG J A. Beware of mis-assembled genomes [J]. *Bioinformatics*, 2005, 21: 4 320-4 321.
- [5] PAUL A P, HAIXU T, GLENN T. De novo repeat classification and fragment assembly [J]. *Genome Research*, 2004, 14: 1 786-1 796.
- [6] ERIC L, MICHAEL S W. Genomic mapping by fingerprinting random clones: A mathematical analysis [J]. *Genomics*, 1988, 2: 231-239.