

# 菌株 0206 产 PHA 的发酵条件优化

朱九滨, 李爽芹, 梁宝东, 李湘利 (济宁学院生命科学与工程系, 山东曲阜 273155)

**摘要** [目的]优化菌株 0206 产 PHA 株的发酵条件。[方法]以菌株 0206 为试验菌株,对碳源、氮源、培养基 pH 和培养时间进行了单因素试验和正交试验。[结果]从活性污泥中分离筛选到高产 PHA 的菌株 0206,通过生理生化鉴定,菌株 0206 为芽孢杆菌属,菌株 0206 产 PHA 最优发酵条件为葡萄糖 10 g/L,硫酸铵 10 g/L,氯化钠 2 g/L,培养基 pH 7.0,培养时间 48 h。[结论]优化了菌株 0206 产 PHA 的发酵条件,为 PHA 的发酵提供参考。

**关键词** PHA;生理生化鉴定;发酵条件优化

中图分类号 Q93 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2016)12-123-03

## Optimization of Fermentation Conditions of PHA-producing Strain 0206

ZHU Jiu-bin, LI Shuang-qin, LIANG Bao-dong et al (Life Science and Engineering Department of Jining University, Qufu, Shandong 273155)

**Abstract** [Objective] The aim was to study fermentation conditions of PHA-producing strain. [Method] With strain 0206 as test material, fermentation conditions about carbon, nitrogen, pH value and the culture time were analyzed by single factor experiment and orthogonal experiment. [Result] High PHA-producing strain 0206, which was isolated from activated sludge filter, was identified as *Bacillus cohn* through the physiological-biochemical identification. After optimization, fermentation conditions were: 10 g/L glucose, 10 g/L ammonium sulfate, 2 g/L NaCl, medium pH 7.0, incubation time for 48 hours. [Conclusion] The study provides reference for fermentation of PHA.

**Key words** PHA; Physiological-biochemical identification; Fermentation condition optimization

聚羟基脂肪酸酯(PHA)作为一种新颖的生物材料,其生物组织相容性和可降解性已得到人们的认可,具有良好的应用前景<sup>[1]</sup>。PHA 因具有优越的理化性质,近年来在电学、光学、生物医学等高新技术领域中得到广泛应用<sup>[2-3]</sup>。

PHA 在生物体内作为碳源和能源的贮藏物而存在<sup>[4]</sup>。微生物发酵法生产 PHA 在国内外都有大量研究,但在生产过程中仍存在一系列问题,尤其是生产能力低和生产成本过高<sup>[5]</sup>,这制约了生物发酵生产 PHA 工业的扩大和 PHA 的应用。笔者以从活性污泥中筛选出来的产 PHA 菌株 0206 为试验菌株,通过优化发酵条件,比较不同发酵条件下的活菌数,旨在为 PHA 的发酵提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

**1.1.1 菌株** 菌株 0206:济宁学院生命科学实验中心分离获得。

**1.1.2 培养基** 牛肉膏蛋白胨培养基<sup>[6]</sup>:牛肉膏 5 g,蛋白胨 5 g,NaCl 2 g,水 1 000 mL,pH 7.5。生理生化鉴定培养基:蛋白胨水培养基、明胶液化试验培养基、石蕊牛奶试验培养基、葡萄糖利用试验培养基、甲基红试验培养基、过氧化氢酶试验培养基。

**1.2 菌株 0206 的生理生化鉴定** 对筛选出的菌株按照《伯杰细菌鉴定手册》<sup>[7]</sup>进行菌落形态和生理生化特征鉴定。

### 1.3 菌株 0206 产 PHA 的发酵条件优化

#### 1.3.1 单因素试验

**1.3.1.1 碳源对菌株 0206 产 PHA 的影响**。分别用葡萄糖、乳糖、蔗糖、果糖、淀粉(接入量为 10 g/L)代替牛肉膏蛋白胨

培养基中的碳源,接入 1 mL 摇瓶培养的高产 PHA 菌株的菌液,摇瓶培养 36 h 后,吸取 1 mL 菌液加入装有 9 mL 无菌水的试管中,以此为  $10^{-1}$  稀释菌悬液,用旋涡振荡器混匀。按上述操作顺序,分别制成  $10^{-2} \sim 10^{-7}$  梯度稀释菌悬液。取 0.1 mL 适当稀释的菌悬液涂布于牛肉膏蛋白胨固体培养基上,培养 48h 后,对培养基中的菌落数进行统计,做 3 个平行,计算原培养液中的活菌总数,并结合荧光显微镜观察菌株的荧光强度,以确定不同碳源对菌株产 PHA 的影响,从而确定最佳碳源。

在确定最佳碳源的基础上,用同样的方法研究碳源浓度对菌株 0206 生长和产 PHA 的影响,从而确定该碳源的最适浓度。

**1.3.1.2 氮源对菌株 0206 产 PHA 的影响**。牛肉膏蛋白胨培养基在确定碳源及其浓度的基础上,分别用酵母粉、精氨酸、 $\text{NH}_4\text{Cl}$ 、尿素、硫酸铵(接入量 10 g/L)代替优化碳源后培养基中的氮源,按“1.3.1.1”的方法确定最佳氮源及其最适浓度。

**1.3.1.3 培养基 pH 对菌株 0206 产 PHA 的影响**。牛肉膏蛋白胨培养基在确定最佳碳源、氮源的基础上,调节不同初始 pH(6.0、6.5、7.0、7.5、8.0)进行发酵试验,按“1.3.1.1”的方法确定培养基的最佳初始 pH。

**1.3.1.4 培养时间对菌株 0206 产 PHA 的影响**。以最佳碳源、氮源代替牛肉膏蛋白胨培养基中的碳源和氮源,调节最佳初始 pH,接入 1 mL 摇瓶培养的高产 PHA 菌株的菌液,摇瓶培养 24、30、36、42、48、54、60 h 后,按“1.3.1.1”的方法测试不同培养时期菌株 0206 的生长状况和产 PHA 情况。

**1.3.2 正交试验**。根据单因素试验结果,选择碳源、氮源、培养基 pH 及培养时间为影响因素,设计 4 因素 3 水平  $L_9(3^4)$  的正交试验。按表 1 进行正交试验,每组试验做 3 个平行,以活菌数为评价指标,确定产 PHA 菌株的最佳发酵

基金项目 济宁学院青年科研基金项目(2012QNKJ08)。

作者简介 朱九滨(1980-),男,山东滨州人,讲师,硕士,从事微生物学教学和研究。

收稿日期 2016-04-06

条件。

表1 正交试验设计因素水平

Table 1 Factors and levels of  $L_9(3^4)$  orthogonal test

水平 Levels	因素 Factors			
	碳源(A) Carbon source//g/L	氮源(B) Nitrogen source//g/L	培养基 pH(C) pH value of culture medium	培养时间(D) Culture time//h
1	8	8	6.5	42
2	10	10	7.0	48
3	12	12	7.5	54

## 2 结果与分析

### 2.1 形态特征和生理生化鉴定

**2.1.1 形态特征。**高产 PHA 菌株 0206 在牛肉膏蛋白胨固体培养基上的菌落形态见图 1。该菌的菌落形态特征:菌落较小,呈圆形,中间凸起,边缘光滑,不透明,黄色,表面较干燥,易于挑取。

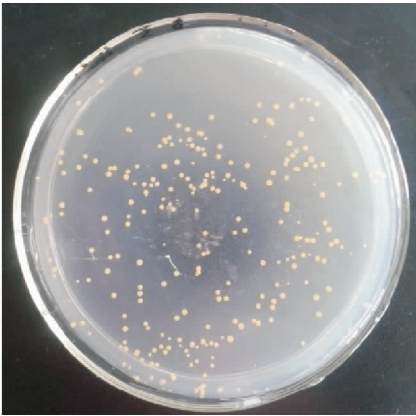


图1 菌株 0206 菌落形态

Fig.1 Colony morphology of strain 0206

**2.1.2 生理生化鉴定。**按照菌落特征和生理生化鉴定结果,参照《伯杰细菌鉴定手册》,并对其进行芽孢染色,将菌株 0206 初步鉴定为芽孢杆菌属(*Bacillus* Cohn)(表 2)。

表2 菌株 0206 生理生化鉴定结果

Table 2 Physiological and biochemical identification results of strain 0206

鉴定项目 Identification items	鉴定结果 Identification results	鉴定项目 Identification items	鉴定结果 <sub>1</sub> identification results
明胶液化 Gelatin liquefaction	液化	吲哚试验 Indole test	+
石蕊牛奶 Litmus milk	陈化	葡萄糖利用 Glucose utilization	产酸
甲基红试验 Methyl redtest	-	革兰氏染色	紫色(+)
过氧化氢酶 Catalase	+		

注:“+”表示阳性,“-”表示阴性。

Note:“+”indicates positive,“-”indicates negative.

### 2.2 菌株 0206 产 PHA 的发酵条件优化

#### 2.2.1 单因素试验

**2.2.1.1 碳源对菌株 0206 产 PHA 的影响。**由图 2 可知,不同碳源对菌株 0206 的影响不同,葡萄糖的平均活菌数最大。

在确定菌株最佳碳源(葡萄糖)的基础上,测定葡萄糖的初始浓度对菌株 0206 的影响,结果见图 3。由图 3 可知,随着葡萄糖浓度的增加,活菌数呈增加趋势,当葡萄糖浓度在 6~10 g/L 时,活菌数呈增加趋势,当葡萄糖浓度在 10~14 g/L 时,活菌数呈减少趋势,结合在荧光显微镜下观察的荧光强度,确定最佳碳源浓度为 10 g/L。

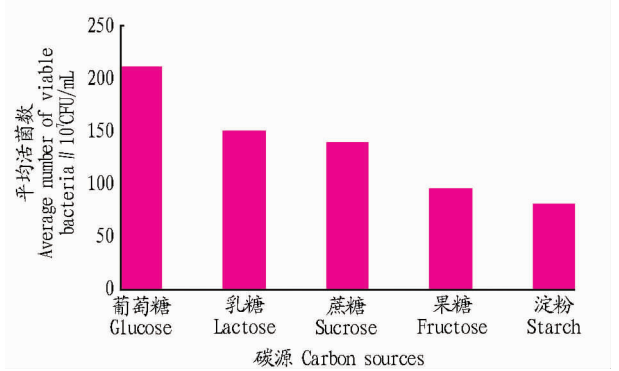


图2 不同碳源对菌株 0206 菌落数的影响

Fig.2 Effects of different carbon sources on colony number of strain 0206

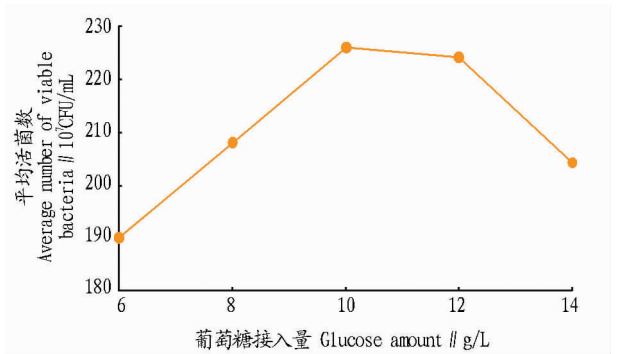


图3 葡萄糖浓度对菌株 0206 菌落数的影响

Fig.3 Effects of glucose concentration on colony number of strain 0206

**2.2.1.2 氮源对菌株 0206 产 PHA 的影响。**由图 4 可知,不同氮源对菌株 0206 的影响不同,其中,有机氮源酵母粉和无机氮源硫酸铵的平均活菌数较多,且差别不大,但在荧光显微镜下硫酸铵对菌株 0206 的荧光强度比酵母粉对菌株 0206 的荧光强度较强,综合考虑,选择无机氮源硫酸铵为最佳氮源。

在确定最佳氮源(硫酸铵)的基础上,测定硫酸铵的初始浓度对菌株 0206 的影响,结果见图 5。由图 5 可知,随着硫酸铵浓度的增加,活菌数呈增加趋势,当硫酸铵浓度在 6~10 g/L 时,活菌数呈增加趋势,当硫酸铵浓度在 10~14 g/L 时活菌数呈下降趋势,结合在荧光显微镜下观察的荧光强度,确定最佳氮源浓度为 10 g/L。

**2.2.1.3 培养基 pH 对菌株 0206 产 PHA 的影响。**由图 6 可知,不同培养基初始 pH 对菌株 0206 的影响不同,当 pH 为 6.0~7.0 时,活菌数呈上升趋势,当 pH 为 7.0~8.0 时,活菌数呈下降趋势,结合在荧光显微镜下观察的荧光强度,确定最佳初始 pH 为 7.0。

**2.2.1.4 培养时间对菌株 0206 产 PHA 的影响。**由图 7 可

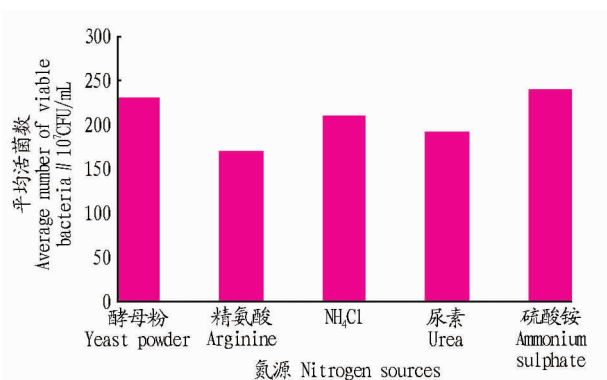


图4 不同氮源对菌株 0206 菌落数的影响

Fig. 4 Effects of different Nitrogen sources on colony number of strain 0206

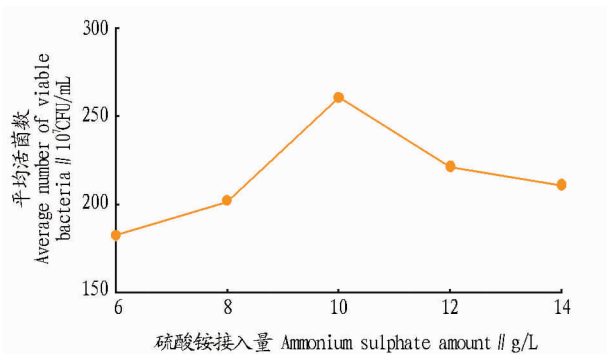


图5 硫酸铵浓度对菌株 0206 菌落数的影响

Fig. 5 Effects of ammonium sulphate concentration on colony number of strain 0206

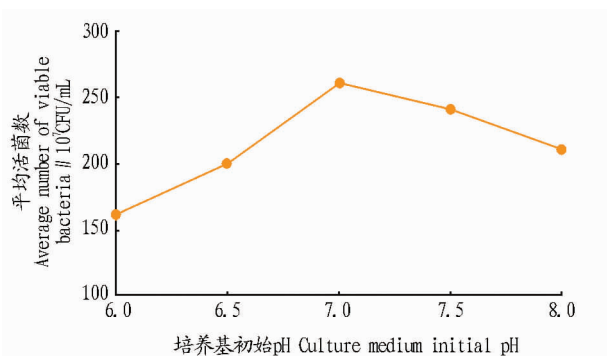


图6 培养基初始 pH 对 0206 菌株菌落数的影响

Fig. 6 Effects of culture medium initial pH on colony number of strain 0206

知,随着培养时间的增加,活菌数呈增加趋势,当培养时间在 24~48 h 时,活菌数呈增加趋势,荧光强度增加,当培养时间在 48~60 h 时,活菌数呈下降趋势,荧光强度减弱,故 PHA 的积累与菌体生长呈明显的正相关,故确定最佳培养时间为 48 h。

**2.2.2 正交试验。**由表 3 可知,对菌株 0206 生长的影响由大到小依次为 A、D、B、C,即葡萄糖添加量影响最大,培养时间次之,培养基 pH 影响最小。方差分析表明,4 个因素中,葡萄糖对菌株影响较显著,培养基 pH 的影响较小。菌株 0206 发酵条件的最优组合为 A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>C<sub>2</sub>D<sub>2</sub>。经验证试验,在该条件下平均活菌数为  $2.59 \times 10^9$  CFU/mL,较 9 组试验最高组

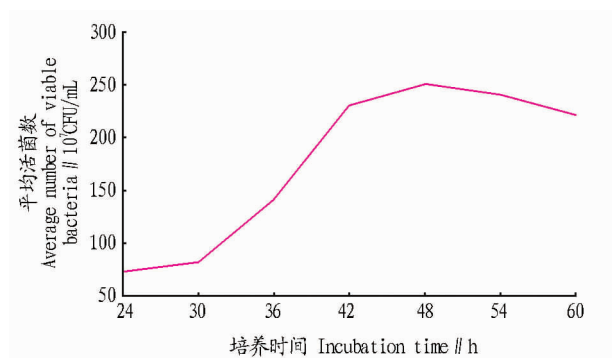


图7 培养时间对菌株 0206 菌落数的影响

Fig. 7 Effects of incubation time on colony number of strain 0206

所得的菌落数 ( $2.45 \times 10^9$  CFU/mL) 高,故确定最优发酵条件为葡萄糖 10 g/L,硫酸铵 10 g/L,氯化钠 2 g/L 培养基 pH 为 7.0,培养时间为 48 h。

表 3 正交试验结果

Table 3 Orthogonal test results

试验号 Test No.	因素 Factors				平均活菌数 Average number of viable bacteria 10 <sup>8</sup> CFU/mL
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	7.6
2	1	2	2	2	13.6
3	1	3	3	3	4.5
4	2	1	2	3	17.8
5	2	2	3	1	24.5
6	2	3	1	2	22.3
7	3	1	3	2	18.2
8	3	2	1	3	15.7
9	3	3	2	1	16.2
<i>k</i> <sub>1</sub>	8.567	14.533	15.200	16.100	
<i>k</i> <sub>2</sub>	21.533	17.933	15.867	18.033	
<i>k</i> <sub>3</sub>	16.700	14.333	15.733	12.667	
<i>R</i>	12.966	3.600	0.667	5.366	

### 3 结论与讨论

该研究通过形态特征及生理生化鉴定可以得出,产 PHA 菌株 0206 为芽孢杆菌属,对碳源、氮源、培养基初始 pH 和培养时间分别进行单因素和正交试验分析,结果显示菌株 0206 产 PHA 最佳发酵条件为葡萄糖 10 g/L,硫酸铵 10 g/L,氯化钠 2 g/L,培养基 pH 7.0,培养时间 48 h。

该研究是基于实验室摇瓶培养的条件下完成的,鉴于大规模发酵的工艺条件与摇瓶有较大差别,经摇瓶筛选出来的高产突变株未必在发酵罐内也高产,因此,关于 PHA 高产菌株的生产试验还有待于进一步研究。该试验虽只对一株菌进行了研究,但仍可为其他产 PHA 菌株的培养提供参考。

### 参考文献

- [1] 杨宇,徐爱玲,张燕飞,等. 生物合成材料聚 β-羟基丁酸(PHB)的研究进展[J]. 生命科学研究,2006,10(4):61-67.
- [2] 李懋,王朝云,吕江南,等. 可生物降解材料聚羟基脂肪酸酯(PHA)的合成与应用概述[J]. 环境科学与管理,2009,34(12):144-148.

均气温分为8个变化区,将冬季气温分为5个变化区,并指出近46 a我国年平均气温的主要升温区为东北、华北北部和新疆自治区,升温幅度为1.2℃左右;降温区为四川、贵州,幅度为0.3~0.4℃,升温范围和升温幅度最大的为冬季。张晶晶等<sup>[11]</sup>利用1961~1990年逐年我国年平均气温资料,采用REOF方法将我国大陆分为8个气温变化区,指出1951~2000年我国大陆的35°N以北地区年平均气温变暖显著于35°N以南,且除西南区为降温区外,其他7个区域均为变暖趋势,其中东北区、东北—华北区增温最显著,气候倾向率达0.35℃/10 a,西北区、青新区增温也较显著。黄琦<sup>[5]</sup>利用1951~2000年我国160站月平均气温资料,分析我国冬季气温均方差分布指出,我国冬季气温从南向北气温变化幅度逐渐加大,表现为东北、内蒙东部、西北地区冬季气温的变化幅度较大,而南方大部分地区的冬季气温变化幅度相对较小。宋连春<sup>[4]</sup>采用经验正交函数分解(EOF)方法分析1950~1990年我国336站冬季气温的时空分布特征指出,我国冬季气温第1主分量空间分布全国大部分地区是同号的,我国冬季气温第2主分量空间分布为东北和西北西部同号,且与其余全国大部分地区符号相反,我国冬季气温第3主分量空间分布为黄河以北、110°E以东与全国其他地区反号。刘宣飞等<sup>[12]</sup>对1951~1989年我国年平均气温和冬季平均气温进行EOF分解指出,我国160站年平均气温EOF第1模态空间分布体现出我国除西南局部地区外,全国其他大部分地区符号相同,其中东北、内蒙和新疆北部有极值中心;我国冬季气温EOF第1模态空间分布与年平均的基本相同,只是西南地区与全国其他地区异号的范围略有减小。其他学者也对我国160站不同时间长度的冬季气温资料进行EOF分解分析,得到的结论也基本一致,即近几十年来我国冬季气温EOF第1模态证明,我国冬季气温在全国大范围具有一致偏冷或偏暖的特征(除西南小部分地区外),且东北、华北、新疆地区冬季气温的异常最明显;EOF第2模态证明,我国西南、华南地区的冬季气温与东北、华北及新疆地区冬季气温的异常变化具有反相变化的特征<sup>[5,13-14]</sup>。此外,康丽华等<sup>[15]</sup>分析发现年代际尺度上冬季气温的EOF分析结果与年际尺度的基本

一致,但全国一致变化型可能在年代际时间尺度上表现得更加显著,而南北反相变化型可能在年际尺度上更加显著。

### 3 展望

综上所述,前人对于我国气温时空变化特征及影响因子方面的研究很多,并得到了很多有意义的结论。在气温的影响因子方面,前人总结了5个方面的影响因子,包括大气遥相关型及涛动、大气活动中心及流场、冬季风、海温、积雪及海冰。然而这些影响因子绝大部分集中在对流层,笔者认为以往对于对流层上的影响因子研究很全面,而平流层上的一些影响因子以及平流层和对流层因子间的相互作用也可能是影响我国气温的重要因子,值得进一步研究。此外,影响因子对气温的影响机理方面的研究也应成为今后的研究重点。

### 参考文献

- [1] 屠其璞. 我国冬季气温时空分布的气候特征[J]. 南京气象学院学报, 1981(1): 26-36.
- [2] 林学椿, 于淑秋. 近40年我国气候趋势[J]. 气象, 1990, 16(10): 16-21.
- [3] 丁一汇, 戴晓苏. 我国近百年来的温度变化[J]. 气象, 1994, 20(12): 19-26.
- [4] 宋连春. 近40年我国气温时空变化特征[J]. 应用气象学报, 1994, 5(1): 119-124.
- [5] 黄琦. 我国冬季气温的年际变化[J]. 山东气象, 2007, 27(2): 5-8.
- [6] 周自江, 王颖. 我国近46年冬季气温序列变化的研究[J]. 南京气象学院学报, 2000, 23(1): 106-112.
- [7] 刘莉红, 郑祖光. 近百余年我国气温变化的突变点分析[J]. 南京气象学院学报, 2003, 26(3): 378-383.
- [8] 李庆祥, 董文杰, 李伟, 等. 近百年我国气温变化中的不确定性估计[J]. 科学通报, 2010, 55(16): 1544-1554.
- [9] 吴洪宝, 李栋梁, 章基嘉. 我国冬季月平均气温异常的旋转EOF分析[J]. 南京气象学院学报, 1995(3): 349-354.
- [10] 屠其璞, 邓自旺, 周晓兰. 我国气温异常的区域特征研究[J]. 气象学报, 2000, 58(3): 288-296.
- [11] 张晶晶, 陈爽, 赵昕奕. 近50年我国气温变化的区域差异及其与全球气候变化的联系[J]. 干旱区资源与环境, 2006(4): 1-6.
- [12] 刘宣飞, 朱乾根. 我国气温与全球气温变化的关系[J]. 南京气象学院学报, 1998(3): 390-397.
- [13] 朱艳峰, 谭桂容, 王永光. 我国冬季气温变化的空间模态及其与大尺度环流异常的联系[J]. 气候变化研究进展, 2007(5): 266-270.
- [14] 康丽华, 陈文, 王林, 等. 我国冬季气温的年际变化及其与大气环流和海温异常的关系[J]. 气候与环境研究, 2009, 14(1): 45-53.
- [15] 康丽华, 陈文, 魏科. 我国冬季气温年代际变化及其与大气环流异常变化的关系[J]. 气候与环境研究, 2006, 11(3): 330-339.

(上接第125页)

- [3] 金大勇, 顾国维, 杨海真. 生物降解塑料聚羟基脂肪酸(PHA)的研究进展[J]. 氨基酸和生物资源, 2004, 26(3): 30-32.
- [4] 王琴, 陈银广. 活性污泥合成聚羟基脂肪酸(PHAs)的研究进展[J]. 环境科学与技术, 2007, 30(5): 112-114.
- [5] RAY S, PRAJAPATI V, PATEL K. Optimization and characterization of

- PHA from isolate *Pannonibacter phragmitetus* ERC8 using glycerol waste [J]. International journal of biological macromolecules, 2016, 86: 741-749.
- [6] BUCHANAN R E, GIBBONS N E. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 中国科学院微生物研究所, 译. 北京: 科学出版社, 1984.
- [7] 赵斌, 何绍江. 微生物学实验[M]. 北京: 科学出版社, 2010.