

# 产聚 $\beta$ -羟基丁酸芽孢杆菌的拉曼光谱快速筛选研究\*

## Rapid Screening of Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate Producing *Bacillus* by Using Raman Spectroscopy

冯 旻<sup>1,2</sup>, 王忠文<sup>1</sup>, 陶站华<sup>2</sup>, 陈 越<sup>3</sup>, 王桂文<sup>2\*\*</sup>

FENG Min<sup>1,2</sup>, WANG Zhong-wen<sup>1</sup>, TAO Zhan-hua<sup>2</sup>, CHEN Yue<sup>3</sup>, WANG Gui-wen<sup>2</sup>

(1. 广西大学农学院, 广西南宁 530004; 2. 广西科学院, 广西南宁 530007; 3. 广西师范大学物理科学与技术学院, 广西桂林 541004)

(1. Agricultural College, Guangxi University, Nanning, Guangxi, 530004, China; 2. Guangxi Academy of Sciences, Nanning, Guangxi, 530007, China; 3. College of Physics Sciences & Technology, Guangxi Normal University, Guilin, Guangxi, 541004, China)

**摘要:**【目的】探索快速筛选产生物塑料聚  $\beta$ -羟基丁酸(PHB)芽孢杆菌的光学手段,以期筛选到以葡萄糖或蔗糖为发酵底物的高产 PHB 优良菌株。【方法】应用拉曼光谱技术快速收集分离株的单个细胞拉曼光谱,分析其光谱特征。【结果】基于拉曼光谱特征峰可快速辨别细胞类型和细胞 PHB 含量,菌落细胞的 PHB 拉曼信号强度与菌株的 PHB 发酵能力有相关性;从不同土壤样品中分离的菌株,45%以上具有产 PHB 的能力,其中 S-C-2 菌株在 3%蔗糖下 PHB 最大产量为 5.27 g/L,PHB 占细胞干重 70%;拉曼光谱监测发酵过程显示,不同发酵阶段发酵液的 PHB 总含量与单个芽孢杆菌细胞 1732  $\text{cm}^{-1}$  峰的平均信号强度线性相关。【结论】拉曼光谱可以简单快速筛选产 PHB 的芽孢杆菌,实时监测 PHB 发酵进程。

**关键词:**拉曼光谱 PHB 芽孢杆菌 菌株筛选

**中图分类号:**Q6-33 **文献标识码:**A **文章编号:**1005-9164(2015)06-0664-06

**Abstract:**【Objective】A new method for rapid screening poly- $\beta$ -hydroxybutyrate (PHB) producing *Bacillus* strains was established by means of novel optical technique. 【Methods】Raman tweezers technique was used to acquire the single-cell Raman spectra of isolates and to monitor the accumulation of PHB during further laboratory cultivation. 【Results】The cell types and PHB content of individual cells were quickly distinguished based on the Raman characteristic peaks and Raman intensities. The averaged Raman intensities at peak 1732  $\text{cm}^{-1}$  of single-cell from plate colonies showed a certain correlation with the capacity of PHB fermentation. Over

one hundred randomly chosen strains were isolated from 4 soil samples and tested by Raman spectroscopy, of which more than 45% exhibited the ability to produce PHB. Among them, strain S-C-2 accumulated up to 5.27 g/L of PHB(70% of the cell dry weight) when incubated with 3% sucrose. During the flask cultivation, the averaged intensities of single cell at peak 1732  $\text{cm}^{-1}$  was linearly related with the

收稿日期:2015-09-13

修回日期:2015-11-10

作者简介:冯 旻(1990—),女,硕士研究生,主要从事植物保护与拉曼光谱研究。

\* 广西自然科学基金项目(2012GXNSFCA053001, 2013GXNSFAA019043)资助。

\*\* 通讯作者:王桂文(1969—),男,研究员,主要从事生物物理与应用微生物研究, E-mail:wguiwen@gxas.cn.

yields of PHB ( $R^2=0.91$ ). **【Conclusion】**Raman spectroscopy can be considered as a fast and novel optical technique for screening of PHB-producing *Bacillus* and real-time monitoring of PHB fermentation processes.

**Key words:** Raman spectroscopy, PHB, *Bacillus*, strain screening

## 0 引言

**【研究意义】**塑料制品在人类的日常生活和工农业生产中占据着重要的地位,以合成树脂为主的普通塑料由于其难以被降解而造成严重的环境污染问题,研究和开发新的可降解生物塑料迫在眉睫。在众多的生物可降解材料中,聚 $\beta$ -羟基烷酸(Poly-hydroxyalkanoate)是一类可由微生物合成的热塑性聚酯,因其具有独特的生物可降解性和生物可相容性,在医学、农业和食品工业具有广阔的应用前景<sup>[1~4]</sup>。其中聚 $\beta$ -羟基丁酸(Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate, PHB)是研究和应用最广泛的一种多聚体。PHB作为细胞内同化作用的初级产物,是微生物为适应不良环境而在胞内合成累积的一种脂类储藏物质,可以作为一种胞内营养和能量的储存物质参加细胞代谢,其发酵底物为糖、脂肪酸等可再生资源,近几十年以来,PHB日益受到世界各国重视,并成为研究热点被列入重点投资项目<sup>[5]</sup>。影响PHB进一步推广和广泛商业化的阻力是其发酵底物价格较高,发酵、提取过程能耗大,生产成本低,而优良菌株是影响发酵效率、降低生产成本的关键。**【前人研究进展】**通过创新的技术,快速筛选能利用廉价底物进行发酵的高产PHB菌株,是加快生物塑料产业化的有效途径之一<sup>[5]</sup>。当前PHB的合成途径主要通过微生物发酵法获得,尽管已经发现有300多种菌种能够合成PHB,人们仍然在寻找理想的合成PHB的菌种,其中芽孢杆菌是研究热点之一<sup>[6~8]</sup>。常规的筛选产PHB微生物的方法比较复杂,耗时较多并需要通过染色来确认细胞所含聚酯物质为PHB<sup>[9~11]</sup>。**【本研究切入点】**拉曼光谱来源于激光与物质分子化学键的相互振动作用,它能够获取细胞内部的结构信息,而不需要做任何外部标记。细胞的拉曼光谱包含着细胞内核酸、蛋白质、糖类和脂类物质等生物大分子的丰富信息<sup>[12,13]</sup>,通过这些信息能够了解细胞内的分子组成结构和生理状态,反映细胞的类型和胞内成分组成及其变化状况<sup>[14]</sup>。**【拟解决的关键问题】**针对广西优势的木薯淀粉和甘蔗资源,应用拉曼光谱新技术,探索快速简易的辨别和分选产生物塑料PHB的芽孢杆菌,监测PHB发酵过程。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 样品

取自广西大新糖厂附近不同地点的蔗田土壤1号、2号、3号和糖厂蔗渣干屑,共4种样品。蔗田土壤、蔗渣干屑经过风干和粉碎后常温保存于实验室。

#### 1.1.2 培养基

筛选培养基(g/L):  $\text{NH}_4\text{Cl}$  1.5,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  1.3,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  8.7,  $\text{KCl}$  0.2,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  0.1,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.2,  $\text{CaCl}_2$  0.001,  $\text{MnSO}_4$  0.0006,  $\text{FeCl}_3$  0.0002, 葡萄糖或蔗糖 30, 蛋白胨 6, 琼脂 18, pH值为7.2~7.4。种子培养基(g/L): 蛋白胨 10、牛肉膏 3、氯化钠 5, pH值为7.4。发酵培养基: 同筛选培养基, 不含琼脂。

#### 1.1.3 实验系统

拉曼光谱系统参考文献<sup>[15]</sup>构建, 780 nm的激光由半导体激光器(TEC-300-780-1000, Sacher, 德国)发出, 经过滤光, 导入倒置生物显微镜(TE2000U, 尼康, 日本), 经油浸物镜(N. A. 1.30, 100 $\times$ )聚焦后在焦点附近形成一个单光束光势阱来俘获细胞, 同时该激光也用于激发被俘获细胞的拉曼散射。拉曼散射信号由物镜收集, 经100  $\mu\text{m}$ 的针孔和2个长通滤波器后聚焦进入LS785光谱仪(Acton, 美国)的输入狭缝, 由电荷耦合器件(CCD, PIXIS 400BR, 美国普林斯顿仪器公司)上。系统的分辨率为6  $\text{cm}^{-1}$ , 并经聚苯乙烯小球(直径2  $\mu\text{m}$ )校正。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 检测方法

应用比浊法测定细胞的生长量。发酵液用无菌水稀释10倍, 用普析通用TU1901紫外-可见分光光度计测定600 nm处的光吸收值( $OD_{600}$ )。

用浓硫酸降解法测定PHB总量<sup>[16]</sup>: 取2 mL发酵液于E<sub>p</sub>管内, 9000 r/min离心10 min收集菌泥, 用丙酮洗涤两次, 并于60 $^{\circ}\text{C}$ 的干燥箱内烘干至恒重; 经干燥后的细胞样品加入浓硫酸1 mL, 在80~90 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中水浴1 h, 经适当稀释后测定208 nm处的光吸收值。根据标准曲线换算发酵液的PHB的总浓度, 并结合细胞干重计算PHB占细胞干重的百分比。标准曲线测定方法同上, 标准曲线方程为  $y =$

$0.142x + 0.008$ ,  $R^2 = 0.9993$ 。其中  $y$  为 208 nm 处的光吸收值 ( $OD_{208}$ ),  $x$  为 PHB 的质量浓度。

### 1.2.2 芽孢杆菌的分离筛选和纯化

分别称取 4 种土壤样品各 1 g, 放入 99 mL 无菌水中, 振荡 10 min 后放到 60°C 的恒温水浴锅中保温 1 h, 通过 60°C 水浴 1 h 将多数非芽孢微生物杀死; 再进行  $10^{-1} \sim 10^{-5}$  梯度稀释, 吸取 0.1 mL 涂布在筛选培养基上, 并于 30°C 条件下培养 40 h。

在数量合适、菌落均匀分布的平板上选择单个圆形乳白色或淡黄色菌落, 挑取少量菌落到 800  $\mu$ L 无菌水中 (在平板上编号标记), 然后将挑选出来的菌株做拉曼光谱检测: 激光强度为 45 mW, 光谱采集时间为 10 s, 每个样品随机收集 20 个以上的细胞。通过拉曼光谱特征峰的出现及其强度判断胞内是否合成 PHB 以及 PHB 含量高低, 从中筛选出高产 PHB 的菌株。将选定的菌株纯化, 冰箱保存。通过拉曼光谱的 1017  $\text{cm}^{-1}$  等特征峰判断是否形成芽孢<sup>[17]</sup>。

### 1.2.3 发酵培养

挑取单菌落接入种子培养基, 30°C, 180 r/min 培养 24 h; 以 5% (V/V) 接种量转接入以蔗糖或葡萄糖为碳源的发酵培养基中 (每个 250 mL 三角瓶装 60 mL 发酵液), 30°C, 180 r/min 培养 36 h, 并在不同的发酵阶段取样, 用于测定发酵液的干重和 PHB 总量, 以及拉曼光谱检测。

### 1.2.4 数据处理方法

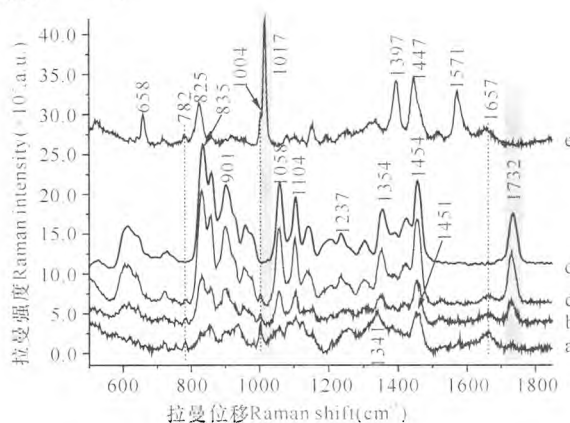
光谱数据先进行背景扣除和响应曲线的校正, 其算法为  $S_{\text{net}}(v) = (S_{\text{acq}}(v) - S_{\text{bg}}(v))/R(v)$ , 其中  $S_{\text{net}}(v)$  为样品的实际光谱,  $S_{\text{acq}}(v)$  为带背景的光谱,  $S_{\text{bg}}(v)$  为背景光谱,  $R(v)$  为实验系统的响应曲线; 采用 vb 编程对数据进行平滑去噪, 其算法是 9 点 Savitzky-Golay 卷积平滑法, 最后用线性拟合结合积分法求特征峰的峰面积。数据统计与绘图均在软件 Origin 8.0 中进行。

## 2 结果与分析

### 2.1 单个细胞的拉曼光谱及不同类型细胞的辨别

图 1 是不同类型细胞的拉曼光谱, 其中曲线 d 是 *Cupriavidus necator* H16 菌株合成的 PHB 光谱。图中光谱特征峰主要集中于 600~1750  $\text{cm}^{-1}$ , 其中 782  $\text{cm}^{-1}$ 、1004  $\text{cm}^{-1}$ 、1341  $\text{cm}^{-1}$  和 1657  $\text{cm}^{-1}$  为胞内的核酸、蛋白质的特征峰<sup>[18,19]</sup>; 835  $\text{cm}^{-1}$ 、901  $\text{cm}^{-1}$ 、1058  $\text{cm}^{-1}$ 、1104  $\text{cm}^{-1}$ 、1354  $\text{cm}^{-1}$ 、1454  $\text{cm}^{-1}$  和 1732  $\text{cm}^{-1}$  等峰来自细胞累积的 PHB; 658  $\text{cm}^{-1}$ 、825  $\text{cm}^{-1}$ 、1017  $\text{cm}^{-1}$ 、1397  $\text{cm}^{-1}$ 、1447  $\text{cm}^{-1}$  和 1571  $\text{cm}^{-1}$  等峰则来自细菌芽孢的吡啶二羧酸, 是细菌芽

孢的典型特征峰。从光谱信号强度与特征峰即可判断细胞的类型: 曲线 a 是不产 PHB 的细胞, 曲线 b 是仅含少量 PHB 的细胞, 曲线 c 是高含量 PHB 的细胞, 曲线 e 为细菌芽孢。其中来自 PHB 的 C=O 基团的 1732  $\text{cm}^{-1}$  是独立而且显著的特征峰, 峰强度与 PHB 含量成正比, 可以用来定量分析细胞 PHB 的含量<sup>[19~21]</sup>。



a、b 曲线乘以系数 1.5 放大。

Curves a and b were amplified by a factor of 1.5.

图 1 不同微生物细胞的拉曼光谱曲线

Fig. 1 Single-cell Raman spectra of various microbes

### 2.2 产 PHB 芽孢杆菌的分离、筛选

从筛选培养基上选择生长迅速、特征典型的芽孢杆菌菌落, 挑取少量样品悬浮于无菌水中进行拉曼光谱检测。从葡萄糖筛选培养基挑选得到 47 个典型的菌株, 有 22 个菌株显示胞内有 PHB 积累, 占 47%; 从蔗糖筛选培养基挑选得到 69 个菌株, 31 个菌株显示胞内有 PHB 积累, 占 45%。图 2 是部分菌株的 1732  $\text{cm}^{-1}$  特征峰信号强度对比, 其中带星号的两个菌株 1732  $\text{cm}^{-1}$  峰强度很高, 表明胞内累积有较多的 PHB。

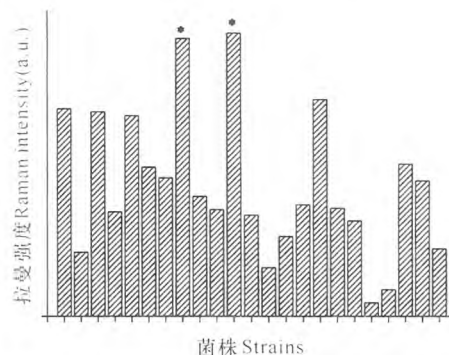


图 2 不同菌株间单个细胞 1732  $\text{cm}^{-1}$  峰平均强度对比

Fig. 2 Comparison of averaged Raman intensities at 1732  $\text{cm}^{-1}$  among isolates cultured on agar plate

图 2 反映的仅是菌株在固体平板培养时胞内 PHB 的累积情况, 为验证菌株的真实发酵能力, 进一步进行摇瓶发酵实验。通过菌落平板单细胞拉曼光谱与摇瓶发酵对比发现 (图 3), 菌株平板培养时的单

细胞  $1732\text{ cm}^{-1}$  峰平均信号强度与菌株的摇瓶发酵 PHB 产量有一定的相关性, 相关曲线为  $y = 1522 + 4003x$ ,  $R^2 = 0.72$ 。也就是说从筛选平板挑取少量菌落进行拉曼光谱检测, 其  $1732\text{ cm}^{-1}$  峰平均信号强度可以用于初步判断菌株的 PHB 发酵能力, 这为快速筛选 PHB 菌株提供了实验依据。

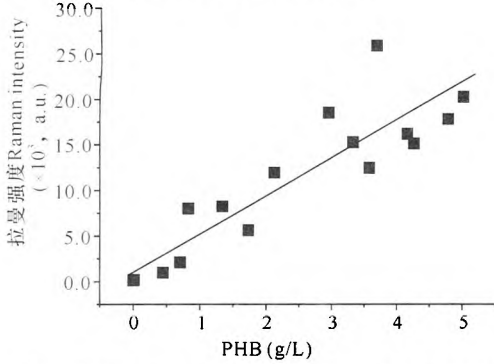


图3 菌落平板单细胞拉曼光谱与摇瓶发酵 PHB 产量相关性分析

Fig. 3 Correlations between the averaged Raman intensities of  $1732\text{ cm}^{-1}$  from single cell of *Bacillus* isolates cultured on plate and its total yields of PHB cultured in flask

### 2.3 产 PHB 分离株摇瓶发酵实验

利用拉曼光谱检测技术分别从葡萄糖和蔗糖筛选培养基挑选出 9 株和 8 株产 PHB 能力较强的芽孢杆菌菌株, 摇瓶发酵 36 h。通过拉曼光谱检测发现, 以葡萄糖为底物的菌株中, 菌株 G-C-11、G-C-5 的生物量(干重)和 PHB 含量最高; 以蔗糖为底物的菌株中, 菌株 S-C-2、S-D-2 的 PHB 产量最高。用上述 4 个菌株做进一步的发酵观察, 于不同的发酵阶段取样分析, 结果见图 4。图中显示, 不同底物下, 不同菌株的生物量、PHB 产量和 PHB 占细胞干重百分比都随着发酵进程逐渐增加, 并在 36 h 时达到最大; 而在后续的发酵过程中, 胞内的部分 PHB 则被逐渐消耗。在 3% 蔗糖下, S-C-2 菌株的发酵效果比 S-D-2 菌株好, PHB 最高含量达到  $5.27\text{ g/L}$ , 占细胞干重的 70%; 而 S-D-2 菌株的 PHB 最大产量为  $3.75\text{ g/L}$  (占细胞干重的 72%), 虽然其生物量不大, 但胞内 PHB 含量却较高; 在 3% 葡萄糖下, G-C-5 菌株的发酵效果比 G-C-11 菌株好, 其 PHB 含量最大值为  $3.95\text{ g/L}$  (占细胞干重 68%)。

### 2.4 细胞拉曼信号强度与发酵液 PHB 含量相关性分析

在 3% 葡萄糖或者蔗糖底物下, 于发酵的不同阶段, 随机收集两个菌株的单细胞拉曼光谱, 分析其  $1732\text{ cm}^{-1}$  峰平均信号强度与发酵液中 PHB 总量的

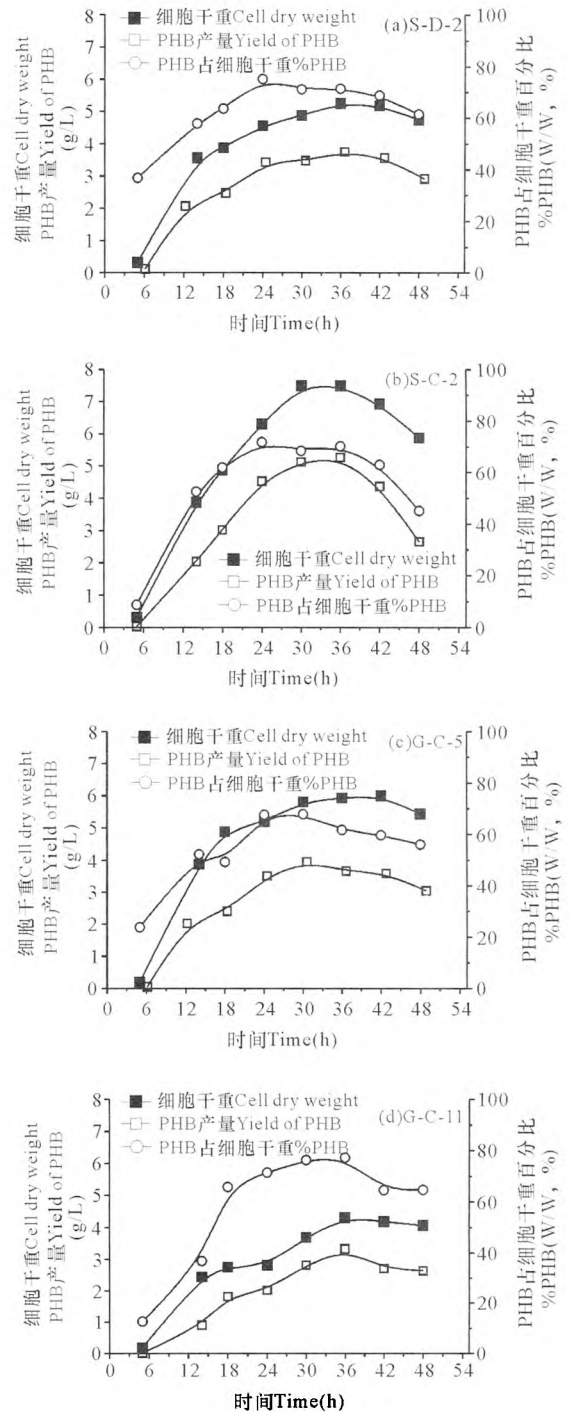
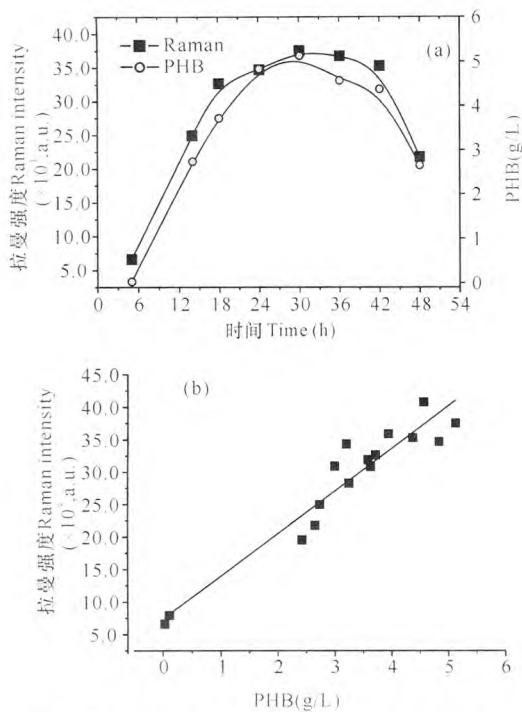


图4 不同菌株以蔗糖(a, b)或葡萄糖(c, d)为底物的 PHB 发酵动态

Fig. 4 Dynamics of PHB fermentation of four isolates cultured with sucrose (a, b) or glucose (c, d)

相关性(图 5)。结果显示, 两者的相关曲线为  $y = 7408 + 6557x$ , 皮尔逊相关系数( $r$ )和  $R^2$  值分别是 0.956 和 0.908。说明单个细胞的 PHB 平均拉曼信号强度与发酵过程 PHB 产量显著相关。因此, 通过  $1732\text{ cm}^{-1}$  信号强度可以实时定量监测芽孢杆菌发酵过程 PHB 合成动态, 判断 PHB 的产量。



a: PHB 产量与  $1732\text{ cm}^{-1}$  峰平均强度对比; b: 相关曲线。  
a: Raman intensities versus yields of PHB; b: Correlation curve.

图 5 发酵过程 PHB 产量与单个细胞  $1732\text{ cm}^{-1}$  峰平均信号强度的相关性分析

Fig. 5 Correlations between the averaged Raman intensities of peak  $1732\text{ cm}^{-1}$  from single cell of *Bacillus* sp. and the total yields of PHB

### 3 讨论

不同的物质其特征性的拉曼振动谱带不同,使得拉曼光谱具有定性分析功能;而拉曼光谱的特征峰强度与相应物质分子的浓度呈正比例关系,使得拉曼光谱同时具有定量分析功能。图 1 显示,不同的细胞类型具有不同特征的拉曼光谱,而不同含量的 PHB 其特征峰  $1732\text{ cm}^{-1}$  强度也不同,这是基于拉曼光谱进行细胞辨别和筛选的基础。样品经过  $60^\circ\text{C}$  水浴 1 h 处理后,多数非芽孢微生物已被杀死,45% 以上的分离菌落都检测到有 PHB 合成,说明样品中产 PHB 的芽孢杆菌丰富,也反映了本文采用的分离方法效率较高。

快速、无损、高效是微生物分离的目标,也是开展本研究的目的。染色法是目前最常用的筛选产 PHB 微生物的方法,包括苏丹黑玻片染色法、尼罗蓝玻片染色法和尼罗蓝菌落染色法<sup>[9,11,22]</sup>等。其中尼罗蓝菌落染色法是操作最为简便的一种方法,但是需要针对不同的微生物选用适当的染色液浓度<sup>[9]</sup>,这对大量未知微生物的筛选来说是难以确定的,而且添加到培养基的尼罗蓝染料和其它试剂给待选菌株带来未知

的伤害<sup>[23]</sup>,不能用于直接筛选。本文所探索的拉曼光谱方法,细胞样品无需染色,无需特别处理,可在水中直接检测,每个细胞检测时间仅需要 10 s,再加上光谱采集和数据处理的时间,每个样品只需 5 min 即可,对细胞没有伤害,而且适用于所有单细胞微生物,不影响检测样品进一步的培养和纯化。

固体平板培养时细胞合成 PHB 的能力能否反映菌株的发酵能力,亦即能否通过平板菌落细胞的拉曼光谱检测初步判断菌株的 PHB 发酵能力,这是基于拉曼光谱快速筛选 PHB 菌株的基础。本文实验结果显示(图 3)两者有一定的相关性,这为快速筛选 PHB 菌株提供了实验依据。通过拉曼光谱监测分离株的发酵过程也显示,不同发酵阶段单个细胞 PHB 特征峰的平均信号强度与发酵液的 PHB 总含量具有显著的相关性(图 5)。因此,通过拉曼光谱可以实时定量监测芽孢杆菌发酵过程 PHB 合成动态,判断 PHB 的产量。

### 4 结论

本研究将拉曼光谱技术应用于产 PHB 芽孢杆菌的快速筛选,细胞样品无需染色,无需特别处理,通过拉曼光谱技术既可以定性辨别微生物细胞类型,也可以定量分析胞内 PHB 含量,初步判断分离株的 PHB 发酵潜力,实时监测分离株的发酵过程。因此,拉曼光谱可以作为一种新颖的技术方法用于快速大量筛选产 PHB 的芽孢杆菌,并可以用于芽孢杆菌 PHB 发酵进程的实时监测。

#### 致谢

感谢广西科学院生物研究所许黎明协助采样。

#### 参考文献:

- [1] Lee S Y, Choi J, Wong H H. Recent advances in polyhydroxyalkanoate production by bacterial fermentation: Mini-review[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 1999, 25(1/2/3): 31-36.
- [2] 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.
- [3] Keshavarz T, Roy I. Polyhydroxyalkanoates: Bioplastics with a green agenda[J]. Current Opinion in Microbiology, 2010, 13(3): 321-326.
- [4] Chen G Q. A microbial polyhydroxyalkanoates (PHA) based bio- and materials industry[J]. Chemical Society Reviews, 2009, 38(8): 2434-2446.

- [5] Rehm B H. Bacterial polymers: Biosynthesis, modifications and applications[J]. Nature Reviews Microbiology, 2010, 8(8): 578-592.
- [6] Thirumala M, Reddy S V, Mahmood S K. Production and characterization of PHB from two novel strains of *Bacillus* sp. isolated from soil and activated sludge[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2010, 37(3): 271-278.
- [7] Singh M, Patel S K, Kalia V C. *Bacillus subtilis* as potential producer for polyhydroxyalkanoates[J]. Microbial Cell Factories, 2009, 8: 38-49.
- [8] Kumar T, Singh M, Purohit H J, et al. Potential of *Bacillus* sp. to produce polyhydroxybutyrate from biowaste [J]. Journal of Applied Microbiology, 2009, 106 (6): 2017-2023.
- [9] 薛林贵, 赵旭, 景春娥, 等. 尼罗蓝在筛选 PHB 高产菌株中的应用研究[J]. 生物技术通报, 2010, 212(3): 181-184.  
Xue L G, Zhao X, Jing C E, et al. Study on the application of Nile blue in screening of high yielding PHB strain [J]. Biotechnology Bulletin, 2010, 212(3): 181-184.
- [10] 季爱云, 崔志芳, 李春露, 等. 生物可降解塑料聚  $\beta$ -羟基丁酸酯产生菌的选育[J]. 塑料, 2010, 39(3): 100-102.  
Ji A Y, Cui Z F, Li C L, et al. Breeding of producing strains of the biodegradable plastic poly-beta-hydroxybutyrate[J]. Plastic, 2010, 39(3): 100-102.
- [11] 薛林贵, 常思静, 赵旭, 等. PHB 高产菌株选育中初筛方法的比较研究[J]. 应用化工, 2010, 39(5): 633-636.  
Xue L G, Chang S J, Zhao X, et al. A comparative study on the methods for screening high-yielding PHB strain[J]. Applied Chemical Industry, 2010, 39 (5): 633-636.
- [12] Huang W E, Griffiths R I, Thompson I P, et al. Raman microscopic analysis of single microbial cells[J]. Analytical Chemistry, 2004, 76(15): 4452-4458.
- [13] Petry R, Schmitt M, Popp J. Raman spectroscopy—a prospective tool in the life sciences [J]. Chemphyschem: A European Journal of Chemical Physics and Physical Chemistry, 2003, 4(1): 14-30.
- [14] Huang W E, Li M, Jarvis R M, et al. Shining light on the microbial world the application of Raman microspectroscopy[J]. Advances in Applied Microbiology, 2010, 70: 153-186.
- [15] 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.
- [16] Law J H, Slepecky R A. Assay of poly-hydroxybutyric acid[J]. J Bacteriol, 1961, 82: 33-36.
- [17] Kong L, Setlow P, Li Y Q. Analysis of the Raman spectra of  $\text{Ca}^{2+}$ -dipicolinic acid alone and in the bacterial spore core in both aqueous and dehydrated environments[J]. The Analyst, 2012, 137(16): 3683-3689.
- [18] 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.
- [19] Gelder J D, Willemse-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.
- [20] 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.
- [21] 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.
- [22] Degelau A, Scheper T, Bailey J E, et al. Fluorometric measurement of poly - beta hydroxybutyrate in *Alcaligenes eutrophus* by flow cytometry and spectrofluorometry[J]. Applied Microbiology & Biotechnology, 1995, 42(5): 653-657.
- [23] 孙燕飞, 王翀, 程模香, 等. 一种快速筛选产聚羟基烷酸细菌方法的建立[J]. 河南农业科学, 2011, 40(4): 87-89.  
Sun Y F, Wang C, Cheng M X, et al. A novel system for selection of polyester biosynthetic bacteria[J]. Journal of Henan Agricultural Sciences, 2011, 40(4): 87-89.

(责任编辑:米慧芝)