

真养产碱杆菌利用葡萄糖生产聚 β 羟基丁酸的摇瓶发酵条件

堵国成 陈坚 尹洪波 高海军 伦世仪

(无锡轻工大学生物工程学院, 无锡 214036)

摘要 以葡萄糖为碳源,对真养产碱杆菌生产 PHB 的摇瓶发酵条件进行了探索。研究表明,在摇瓶补料条件下,细胞干重和 PHB 质量浓度可分别达到 35.1 g/L 和 28.3 g/L, PHB 对葡萄糖的产率系数为 0.36 g/g。

关键词 真养产碱杆菌; 补料; 生物材料; 聚 β 羟基 酸; 摇瓶发酵

中图分类号 TQ929

0 前 言

聚 β 羟基丁酸 (PHB) 是许多微生物在营养不平衡条件下积累的一类可作为自身碳源和能源的胞内聚合物^[1]。由于 PHB 在具有与合成塑料聚丙烯相似性质的同时,还具有生物相容性和生物可降解性^[2],因而正成为目前开发生物可降解材料的研究热点之一。但与化工合成的塑料相比,PHB 的生产成本很高^[3],所以许多研究人员一直致力于提高 PHB 的生产强度和采用新的提取技术的研究,以期降低生产成本,提高市场竞争力。

真养产碱杆菌 (*A. eutrophus*) 具有易于培养、生长快和能在简单的合成培养基中积累大量的 PHB (达细胞干重的 80% 以上) 的特点^[4],已被广泛应用于 PHB 的生产和研究过程。本世纪 80 年代中期,英国帝国化学公司 (ICI) 以 *A. eutrophus* 的突变株为生产菌种,以葡萄糖为唯一碳源率先实现了 PHB 的工业化生产。本研究室在前一阶段的研究中,采用 *A. eutrophus* ATCC 17699 以丁酸为碳源进行了 PHB 合成的研究,结果发现该菌株利用丁酸为碳源培养,细胞干重和 PHB 含量可分别达 7.2 g/L 和 72.2%^[5],但该菌株利用葡萄糖的能力很差。

作者采用能利用葡萄糖为碳源的真养产碱杆菌为生产菌株,以提高菌体细胞干重和胞内 PHB 含量为研究目标,进行了 PHB 摇瓶发酵条件的研究和优化,并由此指导了在 2 升台式发酵罐进行的 PHB 初步生产。

1 材料与方法

1.1 菌种

真养产碱杆菌 *A. eutrophus* WSH3 (本研究室保藏号)

轻工总会科技基金项目

收稿日期: 1997-01-20

第一作者: 堵国成,男,1965 年 10 月生,博士生

©1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

1.2 培养基

1.2.1 斜面培养基 (g/L) 酵母膏 10, 蛋白胨 10, 牛肉膏 5, (NH₄)₂SO₄ 5, 琼脂 20, pH 7.0.

1.2.2 无机元素液 (L⁻¹) Na₂HPO₄·7H₂O 8.9 g, KH₂PO₄ 1.5 g; MgSO₄·7H₂O 0.2 g; 柠檬酸铁铵 60 mg; CaCl₂·2H₂O 10 mg; 及 1 ml 微量元素液, 内含: H₃BO₃ 0.3 g, CoCl₂·6H₂O 0.2 g, ZnSO₄·7H₂O 0.1 g, MnCl₂·4H₂O 30 mg, NaMoO₄·2H₂O 30 mg, NiCl₂·6H₂O 20 mg, CuSO₄·5H₂O 10 mg.

1.2.3 种子培养基 (g/L) 酵母膏 10, 蛋白胨 10, 牛肉膏 5, (NH₄)₂SO₄ 5, pH 7.0.

1.2.4 发酵培养基 无机元素液中添加硫氨作为氮源, 葡萄糖为碳源, pH 7.0.

1.3 培养方法

摇瓶培养: 接二环生长良好的斜面培养物至装有 30 ml 种子培养基的 250 ml 三角瓶中, 培养 24 h, 摇瓶转速为 180 r/min, 温度 30℃; 按 10% 的接种量接入发酵培养基中, 500 ml 三角瓶装液量为 60 ml, 摇瓶转速为 220 r/min, 温度为 30℃.

1.4 分析方法

1.4.1 菌体细胞生长量 取发酵液 5 ml, 3000 r/min 离心 10 min, 水洗 2 次, 80℃ 干燥 24 h 后称重.

1.4.2 PHB 测定 气相色谱法定量^[6].

1.4.3 NH₄⁺ 浓度测定 采用修正的 Berthelot 反应法^[7].

1.4.4 葡萄糖含量的测定 3, 5-二硝基水杨酸法.

2 结果与讨论

2.1 PHB 合成摇瓶发酵条件的研究

2.1.1 初始硫酸铵浓度对 PHB 积累的影响 以葡萄糖为碳源, 以硫酸铵为氮源, 比较了不同起始硫酸铵浓度对 PHB 积累的影响, 见表 1. 菌体细胞的生长和 PHB

表 1 初始硫酸铵浓度对菌体生长和 PHB 积累的影响

硫酸铵浓度 (%)	细胞干重 /g·L ⁻¹	PHB 质量浓度 /g·L ⁻¹	PHB 含量 (%)
0.1	12.1	9.6	79.6
0.2	16.7	13.4	80.3
0.3	19.5	13.7	70.2
0.4	18.1	11.3	61.5
0.5	16.6	8.9	53.7

注: 发酵时间为 40 h, 初糖浓度为 4%.

的积累对氮源浓度的要求不一样, 细胞的生长需要有丰富的氮源存在, 相反只有当培养基中氮源浓度很低或耗尽时, 才有利于细胞大量积累 PHB. 从表 1 中可以看出, 随着氮源浓度的升高, 细胞干重有所增加, 但过高的氮

源浓度会对菌体的生长产生抑制作用, 且胞内 PHB 的含量会明显下降. 因此当初糖浓度为 3% 左右时, 采用 0.2% 的初始硫酸铵浓度, 最终可以得到较高的 PHB 浓度和 PHB 含量.

2.1.2 初糖浓度对菌体生长和 PHB 积累的影响 以葡萄糖为碳源, 比较了不同初糖浓度对菌体生长和 PHB 合成的影响, 见表 2. 初糖浓度很低时, PHB 发酵的各项指标都较低, 随着初糖浓度的增加, 细胞干重、PHB 浓度和 PHB 对葡萄糖的产率系数都有所提高, 但过高的初糖浓度对细胞生长有抑制作用, 使最终的细胞干重和 PHB 浓度下降, 且 PHB 对葡萄糖的产率系数也降低. 因此从表 2 中可以看出, 较适宜的初糖浓度为 5% 左右.

表 2 不同的糖浓度对菌体生长和 PHB 积累的影响

初糖浓度 (%)	菌体干重 $/\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	PHB含量 (%)	PHB质量浓度 $/\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	残糖浓度 (%)	PHB对葡萄糖的产率 $/\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$
1	6.7	21.7	1.5	0	0.15
2	10.6	54.9	5.8	0	0.29
3	14.5	67.8	9.8	0	0.33
4	18.9	73.3	13.8	0	0.34
5	21.0	78.3	16.4	0	0.33
6	22.2	78.6	17.3	0.55	0.31
7	20.8	78.0	16.2	1.60	0.30
8	18.9	73.1	13.8	2.89	0.27
9	18.4	67.3	12.4	4.05	0.25
10	17.7	65.5	11.6	4.72	0.22

注:发酵时间为 40 h,初始硫酸铵浓度 0.3%

2.1.3 不同 pH 值对菌体生长和 PHB 积累的影响 采用不同初始 pH 值的培养基,比较了其对菌体生长和 PHB 积累的影响,见图 1。从图中可以看出,pH 值在 6.7~7.6 的范围内,对菌体细胞的生长影响不明显,但对产物 PHB 的积累有较大的影响。在 pH 值为 7.0 时,细胞干重(CDW)和 PHB 的含量均达到最大值,在 pH 值偏高或偏低时,CDW 下降较少,而胞内 PHB 含量明显下降。可见,稍高或稍低的 pH 值可能对细胞生长影响不大,但却不利于胞内 PHB 的积累,如能在发酵过程中控制较佳的 pH 值,可使 CDW 和胞内 PHB 含量都达到较高水平。

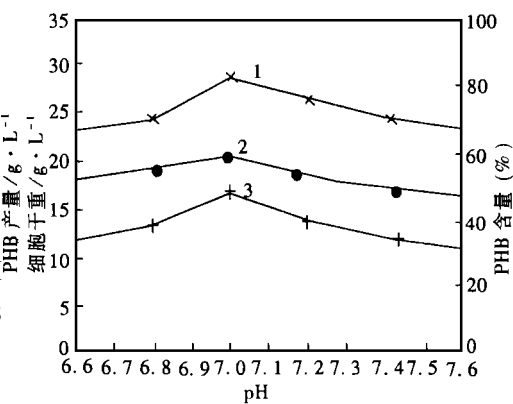


图 1 不同 pH 值对菌体生长和 PHB 合成的影响
1- 胞内 PHB 含量 2- 细胞干重 3- PHB 产量

2.2 PHB 摇瓶发酵过程曲线分析

为了对 PHB 摇瓶发酵过程进行较好的控制,进一步了解摇瓶发酵过程中各参数的变化情况相当重要。在摇瓶过程中不断取样,得到 PHB 发酵过程中各参数的变化情况,见图 2。

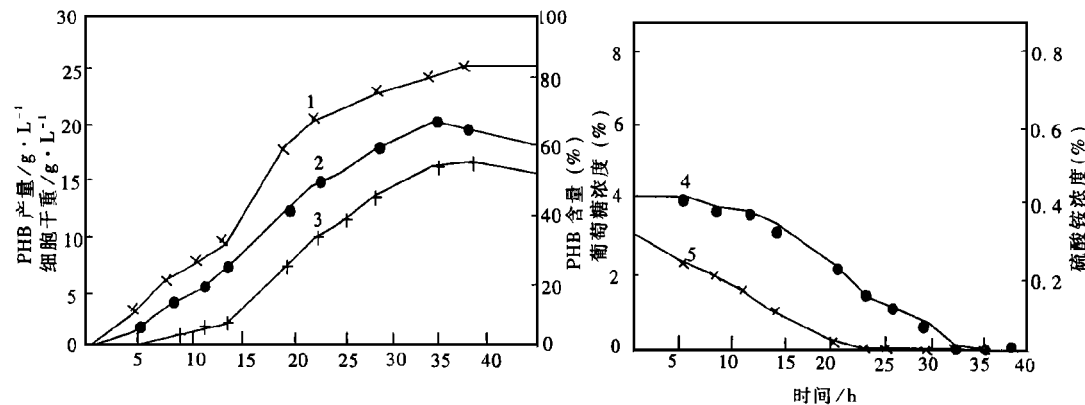


图 2 PHB 摇瓶发酵过程曲线

1- PHB 含量 2- 细胞干重 3- PHB 产量 4- 葡萄糖浓度 5- 硫酸氨浓度

从图 2 可以看出: 1) 在发酵前期氮源较丰富的情况下,胞内 PHB 积累较少,当硫酸铵浓度接近零时,胞内 PHB 含量迅速增加,PHB 浓度也不断上升; 2) 从残留菌体的变化曲线上还可以看出,当培养基中氮源浓度在 21 h 左右降为零时,细胞物质的生长停止,残留菌体浓度开始下降,表明在氮源完全缺乏的 PHB 合成阶段会有少量细胞发生自溶; 3) 34 h 左右糖降为零,此时细胞干重和胞内 PHB 浓度分别达到最大值 18.7 g/L 和 14.0 g/L,随后细胞干重和 PHB 浓度不再增加,此时可以结束发酵。由此分析可以得出,如能在发酵前期补加适量的氮源,增加残留菌体的生长量;在发酵中后期流加一定量的碳源,延长 PHB 积累阶段的时间,就可以进一步提高最终 PHB 的产量。

2.3 摇瓶发酵过程的补料试验

在分析 PHB 摇瓶发酵过程曲线的基础上,进行了 PHB 摇瓶发酵过程的补料试验,见表 3。从表 3 可以看出,在 PHB 发酵过程中补加碳、氮源有利于提高 PHB 的发酵水平。与不补料相比,在本实验条件下,细胞干重从 18.9 g/L 增加到 35.1 g/L,PHB 浓度从 13.8 g/L 提高到 28.3 g/L,PHB 含量最大达到 80.5%,并且 PHB 对葡萄糖的产率系数也有了较大的提高。

表 3 PHB 摇瓶发酵过程的补料试验

试验处理	细胞干重 /g $^{\circ}$ L $^{-1}$	PHB 浓度 /g $^{\circ}$ L $^{-1}$	PHB 含量 (%)	PHB 对葡萄糖的产率 系数 /g $^{\circ}$ g $^{-1}$
总糖 4% (一次投入)	18.9	13.8	73.3	0.34
总糖 6% (第 12、24 h 流加二次)	27.3	21.8	79.7	0.36
总糖 7.5% (第 12、24、36 h 流加三次)	35.1	28.3	80.5	0.36

注: 初始硫酸铵浓度均为 0.3%; 第二、三组的初糖浓度为 3%,并在第 12 h 流加 0.1% 的硫酸铵。

2.4 菌体细胞积累 PHB 前后的透射电镜照片

为了考察 PHB 积累前后菌体细胞的结构形态,作者对发酵前、后期的细胞分别拍摄了透射电镜照片,见图 3。



A 发酵前期 B 发酵后期

图 3 菌体细胞积累 PHB 前后的透射电镜照片

可以看出,在发酵前期(图 3A),细胞基本上不积累 PHB;而在发酵后期(图 3B),培养基中氮源耗尽,细胞大量积累 PHB,几乎所有的细胞都充满了 PHB颗粒。

在分析摇瓶补料的基础上,作者在 2升台式发酵罐进行了 PHB流加发酵优化试验,发酵 52 h左右,细胞干重达 71.0 g/L,PHB含量达 79.4%。进一步的流加发酵试验研究正在进行之中。

致 谢

感谢无锡轻工大学生物工程学院电镜室吴亢老师为作者拍摄了菌体细胞的电镜照片。

参 考 文 献

- 1 Bitar A, Underhill S. Effect of ammonium supplementation on production of poly β -hydroxybutyric acid by *Alcaligenes eutrophus* in Batch Culture. *Biotechnology Letters*. 1990, 12(8): 563~ 568
- 2 Holmes P A. Applications of PHB-a microbially produced biodegradable thermoplastic. *Phys Technol*, 1985, 16 32~ 36
- 3 Kim B S, Lee S C, Lee S Y, et al. Production of poly(3-hydroxybutyric acid) by fed-batch culture of *Alcaligenes eutrophus* with glucose concentration control. *Biotechnol and Bioengin*. 1994, 43 892~ 898
- 4 Heinze E, Lafferty R M. A kinetic model for growth and synthesis of poly β -hydroxybutyric acid (PHB) in *Alcaligenes eutrophus* H16. *Eur J Appl Microbiol Biotechnol*. 1980, 11 8~ 11
- 5 堵国成,陈坚,高海军等.真养产碱杆菌 ATCC 17699生产聚 β -羟基丁酸摇瓶发酵条件的研究.应用与环境生物学报, 1996, 2(3): 308~ 314
- 6 Riis V, Mai W. Gas chromatographic determination of poly β -hydroxybutyric acid in microbiol biomass after hydrochloric acid propanolysis. *Journal of Chromatography*, 1988, 445 285~ 289
- 7 Steinbuchel A, Hans G S. Excretion of pyruvate by mutants of *Alcaligenes eutrophus*, which are impaired in the accumulation of poly(β -hydroxybutyric acid) (PHB), under conditions permitting synthesis of PHB. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1989, 31 168~ 175

Shake-flask Conditions for the Production of Poly β -Hydroxybutyrate Using Glucose as Carbon Source with *A. eutrophus*

Du Guocheng Chen Jian Yin Hongbo Gao Haijun Lun Shiyi

(School of Biotechnology, Wuxi University of Light Industry, Wuxi 214036)

Abstract The conditions of shake-flask culture for the PHB production were investigated with *A. eutrophus* using glucose as carbon sources. It is demonstrated that the cell dry weight, PHB concentration and yield coefficient of PHB to glucose can reach 35.1 g/L, 28.3 g/L and 0.36g/g, respectively.

Key words *A.eutrophus*; fed-batch; biological materials; poly β -hydroxybutyrate; shake-flask culture

(责任编辑:秦和平)