

利用真养产碱杆菌生产 β 羟基丁酸和 β 羟基戊酸的共聚物的摇瓶发酵条件

郁 明 陈 坚 堵国成 陈银广 伦世仪

(无锡轻工大学生物工程学院, 无锡 214036)

摘要 在摇瓶条件下,综合考虑菌体干重、 β -羟基 酸和 β -羟基戊酸共聚物的质量分数、 β -羟基戊酸组分的摩尔分数和酸对 β -羟基戊酸组分的转化率等指标,以及共聚物的发酵条件包括以丙酸为 β -羟基戊酸合成前体时不同初始加入时间和加入量对共聚物发酵的影响。并比较了分别以丙酸和戊酸为 β -羟基戊酸合成前体时对共聚物生产的影响。在分析了共聚物发酵过程曲线的基础上,又进一步研究了补料对合成产物的影响。结果表明,丙酸是 β -羟基戊酸合成的较好前体;采用合理的补料方式,可使菌体干重、 β -羟基 酸和 β -羟基戊酸共聚物的质量分数、 β -羟基戊酸组分的摩尔分数,以及酸对 β -羟基戊酸组分转化率等指标明显提高,在最佳补料条件下,上述指标可分别达到 27.7 g/L, 80.7%, 16.8%和 54%。

关键词 真养产碱杆菌; β -羟基 酸和 β -羟基戊酸的共聚物;摇瓶发酵;补料

中图分类号 TQ929

0 前 言

随着人们对化学合成塑料所造成的环境污染的日益关注,生物可降解塑料的研究方兴未艾。其中利用微生物发酵生产的聚羟基烷酸(Polyhydroxyalkanoate 简称 PHAs)由于其具有生物可相容性和生物可降解性而成为研究的热点。聚 β -羟基丁酸(PHB), β -羟基丁酸与 β -羟基戊酸的共聚物(PHBV)是 PHAs 中研究最多的两种多聚物。PHB 的许多物理化学性能与聚丙烯相似,但 PHB 较硬且发脆,当在 PHB 中加入 β -羟基戊酸(HV)组分时,共聚物的物化性能与 PHB 相比有了较大改善,如硬度降低、韧性增加等,且随着 PHBV 中 HV 组分含量的变化可得到性能各异的共聚物,因而 PHBV 已成为最具潜力的合成塑料替代品,在医学、药学和农业等领域有广阔的应用前景^[1,2]。国外已经将 PHBV 进行工业化生产,商品名为 Biopol,而国内的研究尚处于实验室阶段。

研究表明,大多数能积累 PHB 的菌株也有产 PHBV 的能力,且可通过控制不同的发酵条件得到具有不同 HV 组分含量的 PHBV。作者采用一株能利用葡萄糖的 *A. eutrophus* 变

异株 WSH3,以葡萄糖为主要碳源,奇数碳有机酸为 HV 合成前体,综合考虑菌体干重 (CDW)、PHBV 质量分数、HV 摩尔分数、酸对 HV 组分的转化率等各项指标,进行了 PHBV 的发酵条件研究

1 材料与方方法

1.1 菌种

真养产碱杆菌 (*A. eutrophus*) WSH3 本校环境生物技术研究室保藏

1.2 培养基

斜面培养基,种子培养基,无机元素液和发酵培养基配方见参考文献 [7].

1.3 培养方法

摇瓶过程中按不同的需要进行丙酸、葡萄糖或硫酸铵的流加,其余同参考文献 [7].

1.4 分析方法

1.4.1 (NH)₂SO₄ 浓度的测定 采用修正的 Berthelot 反应法

1.4.2 葡萄糖含量的测定 3,5-二硝基水杨酸法

1.4.3 菌体细胞生长量的测定 取发酵液 4.5 ml, 6 000 r/min 离心 5 min, 水洗 2 次, 真空冷冻干燥后称重

1.4.4 PHBV 测定 气相色谱法定量

1.4.5 丙酸测定 气相色谱法定量

2 结果与讨论

2.1 丙酸为辅助碳源时初始加入时间和每次加入量

在初始硫酸铵质量浓度 3 g/L, 初始葡萄糖质量浓度 50 g/L 的发酵培养基中, 对丙酸的不同加入时间和加入量进行了试验, 结果见表 1.

表 1 丙酸不同初始加入时间和加入量的摇瓶结果比较

初始加入时间 /h	每次丙酸加入的体积分数 (%)	发酵液中糖酸比	CDW /g · L ⁻¹	PHBV 质量分数 (%)	PHBV 质量浓度 /g · L ⁻¹	HV 摩尔分数 (%)	残留丙酸体积分数 (%)
13	0.1	16.7	21.4	80.7	17.3	10.9	0
	0.2	8.3	21.0	76.5	16.1	13.6	0
	0.3	5.6	15.5	63.1	9.78	23.4	0
	0.4	4.2	11.2	37.9	4.24	28.5	0.132
19	0.1	16.7	25.9	78.0	20.2	10.5	0
	0.2	8.3	24.2	80.1	19.4	13.2	0
	0.3	5.6	17.9	72.5	13.0	15.3	0.100
	0.4	4.2	13.6	53.3	7.25	25.6	0.224
25	0.1	16.7	27.0	79.3	21.4	8.25	0
	0.2	8.3	24.0	76.5	18.4	10.3	0.287
	0.3	5.6	23.9	70.9	16.9	11.5	0.359
	0.4	4.2	17.8	67.4	12.0	13.8	0.527

注: 加酸 3 次, 每次加酸间隔时间 8 h.

从表 1 可以看出, 丙酸的加入量和加入时间对 PHBV 的发酵有明显的影响. 1) PHBV 中 HV 组分的摩尔分数取决于发酵液中糖与丙酸的浓度之比 (以下简称糖酸比)^[3,4]. 随着丙酸加入量的增大, 糖与酸比例的降低, HV 组分的摩尔分数增加. 但由于作为 HV 合成前体

的丙酸在较高浓度下对菌体生长和产物合成有一定的抑制作用,所以随着丙酸量的增加,CDW 和 PHBV 质量浓度明显下降。2) 发酵 13 h 菌体正合成细胞物质,此时加入丙酸,菌体生长和 PHBV 合成活性都受到较大抑制,严重影响最终菌体干重和 PHBV 产量,且随着丙酸加入量的增大,抑制作用明显。发酵 19 h 时,发酵液中氮源基本耗尽,细胞开始大量合成多聚物,这时加入丙酸就可以在 PHB 片段合成的同时均匀嵌入 HV 组分,最终产物中 HV 组分摩尔分数较高。但太高的丙酸加入量也将抑制细胞合成 PHBV 的活性。25 h 细胞已合成较多的 PHB 均聚物,此时开始加入丙酸,最终 PHBV 中 HV 含量很低,且产物中 HV 组分积聚在 PHBV 长链的某一区域,这可能会影响材料的性能。

由此可见,丙酸初始加入时间和加入量是 PHBV 合成的两个重要因素。只有综合考虑 CDW, PHBV 质量浓度和 HV 组分含量等指标,才能确定较佳的丙酸加入时间和加入量,最终使得到的 PHBV 质量浓度较高,且 HV 组分含量又比较适宜。

2.2 PHBV 合成中合适辅助碳源的确定

丙酸和戊酸是 PHBV 生产中最常用的两种辅助碳源,为选择更合适的 HV 合成前体,进行了丙酸和戊酸的对照实验。结果见表 2。

表 2 WSH 3 利用丙酸和戊酸情况比较

辅助碳源	加酸方法	CDW / $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	PHBV 质量分数 (%)	PHBV / $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	HV 摩尔分数 (%)	酸对 HV 组分 的转化率 (%)
丙酸	0.1% 3	25.9	78.0	20.2	10.5	40.8
	0.2% 3	24.2	80.1	19.4	13.2	48.0
	0.3% 3	17.9	72.5	13.0	15.3	37.6
	0.4% 3	13.6	53.3	7.25	25.6	34.7
戊酸	0.1% 3	25.6	80.5	20.6	11.7	67.8
	0.2% 3	23.9	78.9	18.9	14.3	51.0
	0.3% 3	18.3	72.9	13.3	16.5	26.1
	0.4% 3	12.8	65.6	8.39	28.2	22.9

注: 0.1% 3 表示每次加入 0.1% 的酸,分 3 次加入,每次间隔时间 8 h,初始加入时间为接种后 19 h。

从表 2 可以看出,丙酸为 HV 合成前体时,PHBV 质量浓度,PHBV 质量分数,HV 组分摩尔分数与酸的转化率均略低于以戊酸为 HV 合成前体时的发酵结果。但丙酸的价格仅为戊酸的 1/3 多,因此仍以丙酸为 HV 合成前体。

2.3 PHBV 摇瓶发酵过程曲线分析

为了对 PHBV 摇瓶过程中菌体的生长、基质的消耗、产物的形成进行全面了解和析,制作了摇瓶发酵过程曲线。作者采用已得的较佳发酵条件,即初始葡萄糖和初始硫酸铵质量浓度分别为 50 g/L, 3 g/L,丙酸在接种后 19 h 开始分 3 次均量加入,每次 0.2% (体积分数),间隔时间为 8 h。在摇瓶发酵过程中不断取样测定各参数,得发酵过程曲线,见图 1。

从图 1 可见: 1) 发酵 8 h 左右,铵离子质量浓度开始很快下降,细胞进入对数生长期,至 15 h 左右氮源浓度已接近零,细胞开始大量合成多聚物。2) 在细胞对数生长期,胞内也有少量的 PHB,但聚合物大量合成却是在铵离子质量浓度接近零(15 h 左右)的时候开始^[5],此时加入丙酸立即合成 HV 组分,PHBV 质量分数快速增长。所以将初始加酸时间提前至 15 h。3) 从丙酸变化曲线可见,每次间隔 8 h 补加 0.2% 体积分数的丙酸,在下次补加前已全部用完,因此在以后实验中可缩短补加间隔时间。4) 50 g/L 的葡萄糖质量浓度在发酵 47 h 基本耗尽,发酵接近结束。

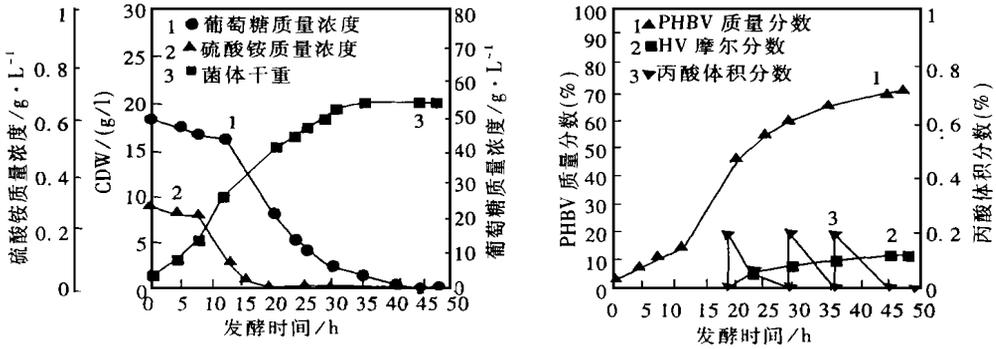


图 1 发酵过程中细胞干重、葡萄糖质量浓度、铵离子质量浓度、PHBV质量分数、HV 组分摩尔分数、丙酸体积分数的变化情况

2.4 摇瓶补料合成 PHBV

研究表明^[2],采用降低初糖浓度,中间补糖的方法可以减少葡萄糖对菌体生长的抑制,同时补加少量氮源有利于 PHBV 的合成和产量的提高。

在分析摇瓶发酵过程曲线的基础上,作者进行了摇瓶发酵过程的补料优化实验,结果见表 3。从表 3 可以看出,摇瓶补料发酵的较优条件为初糖质量浓度 30 g/L,流加 3 次,每次 10 g/L;初氮质量浓度 3 g/L,以 1 g/L 和 0.5 g/L 流加两次;总酸 0.8% (体积分数),初始加酸时间为发酵 15 h,分 4 次加入,间隔 6 h。与对照组相比,菌体干重提高了 31.9%, PHBV 质量分数提高了 10.0%, PHBV 质量浓度提高了 43.6%, HV 组分摩尔分数提高了 9.8%, 丙酸对 HV 组分的转化率提高了 58.9%。

表 3 摇瓶发酵过程补料优化实验

	0	1	2	3	
实验处理	糖质量浓度 /g·L ⁻¹	60	30+ 10× 3	30+ 10× 3	30+ 10× 4
	补糖时间		发酵 12 h 起,每隔 6 h		
	硫酸铵质量浓度 /g·L ⁻¹	3	3	3+ 1	3+ 1+ 0.5
	补氮时间		发酵 12 h 起,每隔 6 h		
	加酸量		0.2%× 4		
实验结果	加酸时间		发酵 15 h 起,每隔 6 h		
	CDW /g·L ⁻¹	21	23.1	25.5	27.7
	相对提高量 (%)	0	10	21.4	31.9
	PHBV 质量分数 (%)	73.4	78.0	79.6	80.7
	相对提高量 (%)	0	6.3	8.4	10.0
	PHBV 质量浓度 /g·L ⁻¹	15.6	18.0	20.3	22.4
	相对提高量 (%)	0	15.4	30.1	43.6
	HV 摩尔分数 (%)	15.3	15.8	18.6	16.8
	相对提高量 (%)	0	3.37	21.6	9.8
	Y HV 丙酸	0.34	0.41	0.53	0.54
相对提高量 (%)	0	18.6	54.7	58.9	

注: 1 表中 30+ 10× 3 表示初糖质量浓度为 30 g/L,流加 3 次,每次 10 g/L,其余类推

2 发酵时间: 48 h.

3 相对提高量= (实验组量 - 对照组 (0 组) 量) / 对照组 (0 组) 量

以上实验证明,补料发酵确实有利于 PHBV 合成,在 2 L 容积的发酵罐上,能对一些环

境因子(如 pH 值、溶氧浓度等)实行有效的检测和控制,连续流加可以避免底物浓度波动过大,易于实现流加策略,菌体干重、PHBV 产量、HV 组分和转化率都有明显提高。作者在研究了 PHBV 摇瓶发酵条件的基础上,进一步在 2 L 容积的罐上进行了 PHBV 发酵生产的优化研究。CDW, PHBV 质量分数, PHBV 质量浓度, HV 组分摩尔分数分别达到了 52.1 g/L, 78.3%, 40.8 g/L 和 16.2%。丙酸的 HV 组分的转化率为 50%。研究结果将另文报道

参 考 文 献

- 1 Lee S Y. Bacterial Polyhydroxyalkanoates, *Biotechnology and Bioengineering*, 1996, 49: 1~ 14
- 2 堵国成,陈坚,高海军等. 流加法生产生物可降解多聚体. *生物技术*, 1996, 6(4): 5~ 10
- 3 Doi Y, Kawaguchi Y, Doyama N, et al. Synthesis and degradation of polyhydroxyalkanoates in *A. eutrophus*, *FEM S Microbiology Reviews*, 1992, 103: 103~ 108
- 4 翁维琦,黄和荣,易祖华. *A. eutrophus* 突变株 65-7 产 β -羟基丁酸与 β -羟基戊酸共聚物的研究. *微生物学通报*, 1995, 22(5): 271~ 275
- 5 Takahiro Suzuki, Tsuneo Yamane, Shoichi Shimizu. Kinetics and effect of nitrogen source feeding on production of poly(β -hydroxybutyric acid) by fed-batch culture. *Appl Microbiol Biotech*, 1986, 3: 322~ 329
- 6 Bitar A, Underhill S. Effect of ammonium supplementation on production of poly(β -hydroxybutyric acid) by *A. eutrophus* in Batch Culture. *Biotechnology Letters*, 1990, 12(8): 563~ 568
- 7 堵国成,陈坚,尹洪波等. 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. *无锡轻工大学学报*, 1998, 17(1): 14~ 18

Studies on Fermentation Conditions of Poly(β -Hydroxybutyrate and β -Hydroxyvalerate) Acid Production by *Alcaligenes Eutrophus*

Yu Ming Chen Jian Du Guocheng Chen Yinguang Lun Shiyi

(School of Biotech., Wuxi University of Light Industry, Wuxi, 214036)

Abstract Based on the consideration of CDW, PHBV content, HV unit fraction and the conversion ratio of propionate to HV unit (YHV / propionate), the conditions of PHBV fermentation with propionate as precursor, including initial addition time and concentration were studied in shaking flask. A comparison between propionate and valerate as precursor for synthesis of HV was made. The time course of PHBV fermentation was analysed and fed-batch fermentation of PHBV was carried out. The results indicated that propionate was better than valerate as precursor in PHBV fermentation. By applying suitable feeding mode and the optimal conditions in fed-batch fermentation, the CDW, PHBV mass content, HV unit fraction and YHV / propionate could be apparently improved to be 27.7 g/L, 80.7%, 16.8 mol% and 54% (HV / g propionate), respectively.

Key words *Alcaligenes eutrophus*; poly(β -hydroxybutyrate and β -hydroxyvalerate) acid; fermentation; feed

(责任编辑:秦和平)