

文章编号 :1009 - 038X(2002)01 - 0076 - 04

嗜水性气单孢菌利用豆油生产 3-羟基丁酸和 3-羟基己酸共聚物

张瑾¹, 吴琼², 张广², 陈国强²

(1. 沈阳农业大学土地与环境学院, 辽宁 沈阳 100161; 2. 清华大学生物系, 北京 100084)

摘 要:以嗜水性气单孢菌 *Aeromonas hydrophila* 4AK4 利用含有豆油的碳源为底物, 实现了聚 3-羟基丁酸和 3-羟基己酸共聚物 (PHBHHx) 的发酵生产, 克服了用月桂酸的生产中碳源成本高、起泡、产物难分离等问题。当以豆油为唯一碳源, 经 48 h 培养, 通过限制氮、磷、氧 3 种营养条件, 可获得菌体细胞干重 (CDW) 19.5 g/L, PHBHHx 质量浓度 10.8 g/L; 若以豆油和月桂酸为混合碳源, 获得 CDW 42.2 g/L, PHBHHx 质量浓度 16.8 g/L。发酵进行 12 h 后, 3-羟基己酸 (3-HHx) 在 PHBHHx 中含量稳定, 仅在 10% ~ 13% 之间变化。结果表明, 混合碳源更适合 PHBHHx 的工业化生产。

关键词:嗜水性气单孢菌; 聚 3-羟基丁酸-3-聚羟基己酸酯; 豆油; 月桂酸

中图分类号: TQ 921.4

文献标识码: A

Production of Poly(3-Hydroxybutyrate-co-3-Hydroxyhexanoate) by *Aeromonas hydrophila* 4AK4 Grown on Soybean Oil

ZHANG Jin¹, WU Qiong², ZHANG Guang², CHENG Guo-qiang²

(1. College of Soil and Environment, Shenyang Agricultural University, Shenyang 100161, China; 2. Department of Biological Sciences and Biotechnology, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract: Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) (PHBHHx) was produced by *Aeromonas hydrophila* 4AK4 using soybean oil instead of lauric acid as substrate. The use of soybean oil instead of lauric acid solves the problems in PHBHHx production such as high cost of carbon source, foaming and difficult recovery of product. In a fermentation study conducted in a 6 L NBS vessel, cell dry weight and PHBHHx concentration obtained through triple nutrient limitations on nitrogen, phosphorus and oxygen over 48 hours were 19.5 g/L and 10.8 g/L when soybean was used as the only carbon source. While 42.2 g/L CDW and 16.8 g/L PHBHHx were achieved when soybean oil and lauric acid were used together as mixed carbon sources during the cultivation. The 3-hydroxyhexanoate contents in PHBHHx under all cases were rather constant; it ranged only from 10% to 13% after 12 hours of fermentations. The results showed that mixed carbon sources was more suitable for industrial production of PHBHHx.

Key words: *Aeromonas hydrophila*; Poly(3-Hydroxybutyrate-co-3-Hydroxyhexanoate); Soybean oil; Lauric Acid

收稿日期: 2001 - 12 - 04; 修订日期: 2001 - 12 - 24.

作者简介: 张瑾 (1976 -) 女, 辽宁鞍山人, 生物化学与分子生物学博士研究生。

万方数据

聚羟基脂肪酸酯(PHA)是很多细菌在营养不平衡条件下合成的一种细胞内聚酯,在生物体内主要是作为细胞内碳源和能源的贮藏性物质^[1~3]。其中聚 3-羟基丁酸酯和 3-羟基丁酸和 3-羟基戊酸共聚物已经有大规模生产,但由于热加工性能差而限制了其广泛的应用^[4]。3-羟基丁酸和 3-羟基己酸的共聚物(PHBHHx)作为第三代生物可降解材料,以其优良的机械性能而引起人们广泛的兴趣^[5]。嗜水性气单孢菌 *Aeromonas hydrophila* 4AK4 利用月桂酸和油酸,通过限磷发酵生产 PHBHHx 已经取得很好结果^[6,7]。但由于月桂酸难溶于水,并在发酵过程中产生大量泡沫,使补料和发酵较难进行。虽然已有报道应用月桂酸发酵生产 PHBHHx^[6],但为防止起泡,不得不设置 pH 6.5(不利于细菌生长),发酵液体积只能是发酵罐的一半,这是不经济的;收获细胞后残留月桂酸粘于细胞表面很难清洗,使得 PHBHHx 提取分离难度加大。采用油酸虽可发酵生产 PHBHx,但油酸价格昂贵,使得工业化生产因成本过高而无法进行。而豆油相对来说价格低廉,底物中含有豆油可以防止起泡,并且使发酵后洗涤细胞变得容易,是一种很有前景的碳源。本文对含有豆油的碳源为底物发酵生产 PHBHHx 的初步研究作报道。

1 材料与方法

1.1 培养条件

1.1.1 实验装置 BioFlow 3000(New Brunswick Scientific, USA) 6.5 L 容积全自动发酵罐。

1.1.2 菌株 嗜水性气单孢菌 4AK4(*Aeromonas hydrophila* 4AK4)。

1.1.3 实验用豆油 食用大豆色拉油,北京艾森绿宝油脂有限公司提供。

1.1.4 种子培养基 碳源 20 g/L (NH₄)₂SO₄ 2.0 g/L, MgSO₄·7H₂O 0.2 g/L, 5 mL 磷酸盐缓冲液(Na₂HPO₄·12H₂O 193 g/L, KH₂PO₄ 53 g/L, 分别单独灭菌), 酵母粉 1 g/L, 微量元素溶液 1 mL(分别单独灭菌)。1 升微量元素溶液含有 20 g FeCl₃·6H₂O, 10 g CaCl₂·H₂O, 0.03 g CuSO₄·5H₂O, 0.05 g MnCl₂·4H₂O, 0.1 g ZnSO₄·7H₂O, 0.5 mol HCl。

1.1.5 摇瓶实验培养条件 培养温度 30 ℃, 培养时间 24 h, 200 r/min 摇床培养(25D, New Brunswick Scientific Co, USA)。

1.2 实验方法

1.2.1 不同碳源的影响 分别以葡萄糖、月桂酸、豆油、混合碳源(含豆油和月桂酸)为底物进行摇瓶发酵实验。

1.2.2 不同限制营养条件的影响 以豆油为唯一碳源,以限氧、限氮氧、限磷氧、限氮磷氧不同方案,在发酵罐中培养 24 h,研究 PHBHHx 最佳积累条件。培养基及发酵条件见表 1。

表 1 用于限制营养条件影响实验的培养基配方
Tab.1 Medium compositions for limitation growth study

成分	A 限氧方案	B 限氮氧方案	C 限磷氧方案	D 限氮磷氧方案
豆油 ¹⁾	100 g/L	100 g/L	100 g/L	100 g/L
(NH ₄) ₂ SO ₄ ²⁾	13 g/L ^(a)	13 g/L	5 g/L ^(b)	5 g/L ^(b)
磷酸盐缓冲液 ³⁾	50 mL/L	16.7 mL/L	50 mL/L	16.7 mL/L
MgSO ₄ ·7H ₂ O ⁴⁾	0.8 g/L	0.8 g/L	0.8 g/L	0.8 g/L
酵母膏 ⁵⁾	1 g/L	1 g/L	1 g/L	1 g/L
微量元素 ⁶⁾	5 mL/L	5 mL/L	5 mL/L	5 mL/L

表 1 中:
1)分批补加 0 h 80 g/L, 12 h 20 g/L;
2)分批补加 (a) 0 h 6 g/L, 12 h 7 g/L;
(b) 0 h 2 g/L, 12 h 3 g/L;
3)一次加入 0 h;
4)分批补加 0.4 g/L, 分别在 0、12 h;
5)分批补加 2.5 mL/L, 分别在 0、12 h。

1.2.3 限氮磷氧发酵罐实验 培养温度 30 ℃, 发酵液体积 3 L, 通气量 3 L/min, 起始搅拌速度 150 r/min, 最高转速 900 r/min, 溶氧控制下线 10%, 培养时间 48 h, 接种量 150 mL 种子菌液。培养基成分见表 1(Fermentor A)。

1.2.4 混合碳源发酵罐实验 培养条件同上。培养基成分见表 2(Fermentor B)。

表 2 发酵罐实验用培养基
Tab.2 Media used in the fermentor studies

成分	A(限氮磷氧实验)	B(混合碳源实验)
豆油	100 g ^(1a)	80 g ⁽²⁾
月桂酸	0 g	20 g ⁽³⁾
(NH ₄) ₂ SO ₄	15 g ^(1b)	20 g ⁽²⁾
磷酸盐缓冲液	25 mL	33 mL
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1.2 g ^(1c)	1.2 g ⁽²⁾
酵母膏	1 g	1 g
微量元素	8 mL ⁽²⁾	8 mL ⁽²⁾

表 2 中:
1) 流加 a: 起始质量浓度 50 g/L, 6 h 后 3 g/(L·h) 流加; b: 起始质量浓度 1 g/L, 6 h 后 1 g/(L·h) 流加; c: 起始质量浓度 1 g/L, 6 h 后 1 g/(L·h) 流加。

- 2) 0 h, 12 h 和 24 h 三批加入;
- 3) 12 h 补加.

1.3 分析方法

CDW、PHBHHx 含量及发酵液中 $(\text{NH}_4)^+$ 浓度的测量方法见文献[8]. 发酵液中 PO_4^{3-} 浓度的测量见文献[9].

2 结果与讨论

2.1 不同碳源的影响

实验结果见表3. 4种碳源中,该菌在葡萄糖中生长细胞干重只有0.91 g/L,且气相色谱检测不到PHA的积累.该菌在豆油、月桂酸和混合碳源上生长都较好,细胞干重分别达到1.87 g/L、1.70 g/L和1.81 g/L,并且都有PHBHHx的积累.但豆油为碳

源得到PHBHHx的产量较低,仅有0.17 g/L;而在月桂酸和混合碳源中生长得到的PHBHHx产量较高,为0.89 g/L和0.86 g/L.但在月桂酸中生长时产生大量的泡沫,收获菌体经3次洗涤后,仍然含有月桂酸,不利于产物PHBHHx的提取和分离;而其它处理均无此弊端.结果表明,虽然月桂酸很适合菌体积累PHBHHx,但种种弊端使其很难应用于大规模生产;而在豆油中生长虽然PHBHHx含量较低,但其培养的细胞密度高,成本低,并可以通过改变培养条件提高PHBHHx产量;该菌在混合碳源中产PHBHHx的产量接近月桂酸,培养过程无起泡,收获细胞经3次洗涤后,气相色谱检测不到月桂酸残留,因为月桂酸可溶于豆油,一起被清洗掉,从而使PHA的分离提取工作简化.

表 3 不同碳源对嗜水性气单孢菌 4AK4 积累 PHBHHx 的影响

Tab.3 Effect of carbon source on PHBHHx production by *Aeromonas hydrophila* 4AK4

碳源	CDW ¹⁾ /(g/L)	(PHA 产量/CDW) %	(HHx 量/PHA 量) %	PHA 质量浓度/(g/L)
葡萄糖	0.916±0.07	1.74±0.01	17.3±0.5	0.016±0.001
豆油	1.87±0.1	8.6±1.7	15.3±0.6	0.17±0.02
月桂酸	1.70±0.02	52±1.6	12.3±0.4	0.89±0.02
混合碳源 ¹⁾	1.81±0.02	48±1.5	13.6±0.3	0.86±0.04

注:1)混合碳源,豆油 10 g/L 和月桂酸 10 g/L.24 h 摇瓶培养.

2.2 不同限制营养条件的影响

以豆油为唯一碳源,以不同营养限制条件的4个方案,经过24 h的实验后,细胞仍在旺盛生长,可观察到培养基中有豆油剩余.培养至24 h,A、B、C和D罐CDW分别为31.7 g/L、24.6 g/L、13.3 g/L和10.1 g/L.其中三营养限制的D罐PHBHHx/CDW为30.66%;而双营养限制方案B、C罐PHBHHx/CDW分别为23.9%、28.3%;单独限氧实验A罐PHBHHx/CDW为18.1%;见图1.可见,在碳源过量时,限磷、氮都对PHBHHx积累有助,但同时限氮磷氧更适合PHBHHx的积累.

2.3 限氮磷氧发酵实验结果

以豆油为唯一碳源,培养时间48 h,得到CDW 19.48 g/L,PHBHHx 10.8 g/L,HHx占PHHHx的质量分数为12.2%.培养16 h后,搅拌转数达到900 r/min,发酵液中溶氧下降到0%,16 h后,发酵实现氮、磷、氧限制条件.此后细胞干重增长缓慢,而PHBHHx在细胞中的质量分数不断提高,从33.3%提高至68.9%.此含量为目前报道PHBHHx占细胞干重的最高结果.44 h后溶氧开始回升.此期间PHBHHx从4.6 g/L增加至10.8 g/L,增加6.2 g/L.

见图2.培养过程中无起泡现象,细胞收获后经3次洗涤后,经GC检测不到月桂酸残留.结果表明,在豆油底物过剩存在时,3种营养限制条件非常有利于PHBHHx的积累.但由于细胞干重不高而影响了PHBHHx的最终产量.

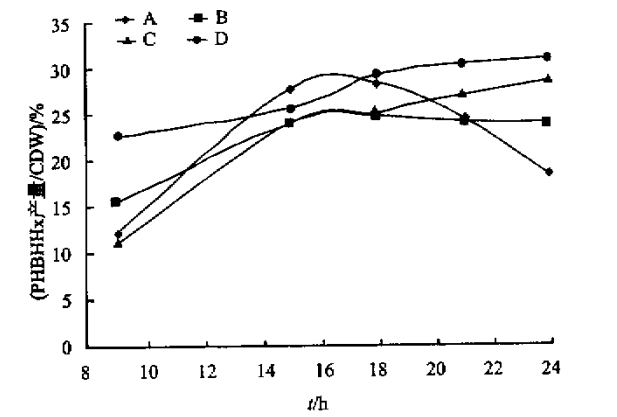


图 1 限制营养条件对 PHBHHx 在嗜水性气单孢菌 4AK4 胞内含量的影响

Fig.1 Effect of nutrient limitations on PHBHHx production by *Aeromonas hydrophila* 4AK4

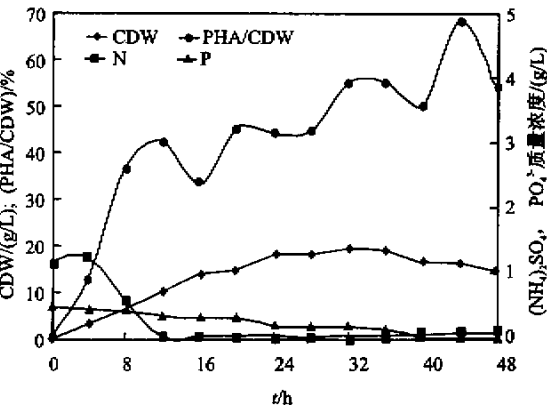


图2 N,P和O₂限制培养条件对 PHBHHx 在嗜水性气单孢菌 4AK4 胞内含量的影响

Fig.2 Effect of N,P and O₂ limitations on PHBHHx production by *Aeromonas hydrophila*

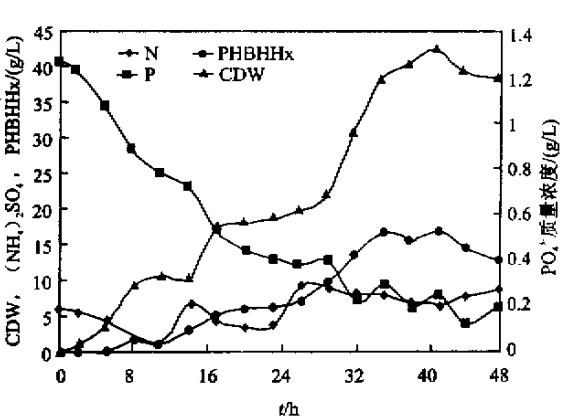


图3 混合碳源培养对嗜水性气单孢菌 4AK4 积累 PHBHHx 的影响

Fig.3 Effect of mixed carbon sources on PHBHHx production by *Aeromonas hydrophila* 4AK4

2.4 混合碳源发酵实验

以豆油和月桂酸混合作为碳源 ,培养时间 48 h ,上罐实验取得 CDW 42.2 g/L,PHBHHx 16.8 g/L ,HHx 占 PHA 质量分数 10.2% .12 h 加入月桂酸之前 PHBHHx 产量 1.2 g/L(11 h) ,加入后培养至 41 h ,提高至 16.8 g/L 增加 15.6 g/L ,可见少量月桂酸的加入对 PHBHHx 的积累十分有利 ,而且对细胞干重亦有促进作用 .见图 3 .发酵过程中无起泡现象 ,收获细胞经 3 次洗涤后 ,气相色谱检测无月桂酸残留 .与豆油为唯一碳源相比 ,PHBHHx 产量有大幅度提高 ,且简便易控制 ,结果稳定 .

3 结 论

研究嗜水性气单孢菌 4AK4 利用含豆油的碳源发酵生产新型可降解材料 PHBHHx 的规律 ,得到如下结论 :相对于油酸和月桂酸 ,豆油是一种廉价碳源 ,可应用于 PHBHHx 的生产 ,虽然得到 68.9% 的高含量 ,但 PHBHHx 的最终产量只有 10.8 g/L ,故其大规模生产条件有待于进一步研究 ;以豆油和月桂酸作为混合碳源 ,解决了月桂酸发酵的起泡和产品难分离提取的问题 ,并且降低了成本 ,取得了 16.8 g/L PHBHHx 的产量 ,发酵条件易于控制 ,结果稳定 ,可应用于工业化生产 .

参考文献 :

[1] ANDERSON A , DAWES E A . Occurrence , metabolism , metabolic role , and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates[J] . *Microbiol Rev* ,1900 , 54 :450 - 472 .
[2] LEE S Y . Bacterial polyhydroxyalkanoates[J] . *Biotechnol Bioeng* , 1996 ,49 :1 - 14 .
[3] STEINBÜCHEL A . Biodegradable plastics[J] . *Curr Opin Biotechnol* ,1992 , 3 :291 - 297 .
[4] CHEN G Q ,PAGE W J . Biotechnol production of poly-beta-hydroxybutyrate by *Azotobacter vinelandii* UWD in a two-stage fermentation process[J] . *Biotechniques* ,1997 ,11 :347 - 350 .
[5] DOI Y , KITAMURA S , ABE H . Microbial synthesis and characterization of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) [J] . *Macromolecules* ,1995 , 28 :4822 - 4828 .
[6] CHEN G Q , ZHANG G , PARK S J ,et al . Industrial scale production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) [J] . *Appl Microbiol Biotechnol* 2001 , 57 :50 - 55 .
[7] LEE S H , OH D H , AHN W S ,et al . Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) by high-cell-density cultivation of *Aeromonas hydrophila*[J] . *Biotechnol Bioeng* 2000 , 67 :240 - 244 .
[8] PAGE W J . Production of poly-3-hydroxybutyrate by *Azotobacter vinelandii* UWD during growth in molasses and other complex carbon sources[J] . *Appl Microbiol Biotechnol* ,1989 , 31 :329 - 333 .
[9] CHEN P S , TORIBARA JR TY ,WARNER H . Micro-determination of phosphorus[J] . *Anal Chem* ,1956 , 28 :1756 - 1758 .