

真养产碱菌利用高果糖浆积累 聚 β -羟基丁酸的研究

文欣 庄国强 郑士民

(山东大学微生物研究所 济南 250100)

摘 要 真养产碱菌 (*Alcaligenes eutrophus*) H16 能以果糖为碳源在无机合成培养基上积累聚 β -羟基丁酸 (PHB)。将该菌用富含果糖的高果糖浆 (HFS) 培养, PHB 的积累可达到果糖发酵水平, 但发现高浓度的果糖和葡萄糖对菌体生长及 PHB 积累有抑制作用。采用补料分批培养技术可降低果糖和葡萄糖的抑制, 并可大幅度提高产量, 菌体干重达 16—20g/L, PHB 产量 7.0—7.6g/L, PHB 的产率达 0.24g/g 果糖。

关键词 聚 β -羟基丁酸, 真养产碱菌, 补料分批培养

聚 β -羟基丁酸 (PHB) 是某些微生物胞内碳源和能源的贮藏物质, 由 D-3-羟基丁酸重复聚合而成。PHB 是高度结晶的热塑性物质, 与化学合成塑料一样能铸造和压制成型, 并能成膜或拉丝, 特别是它具有生物可降解性和生物组织亲合性, 使其在医学、药学、农业等领域具有独特而广阔的应用前景^[1]。

自 1925 年首次发现 PHB 以来, 对产 PHB 的微生物和 PHB 积累条件进行了大量研究。自生固氮菌、假单胞菌和真养产碱菌是产生 PHB 的重要微生物; 用于 PHB 积累的碳源不但广泛, 而且碳源的不同会引起生产工艺及产品性质的差别^[2,3]。

真养产碱菌是兼性自养氢细菌。早期工作主要是研究自养条件下该菌合成 PHB 的途径及其酶性质^[4]; 70 年代后转向研究该菌的异养培养和以果糖为碳源的有关 PHB 发酵动力学^[5,6]; 80 年代英国帝国化学公司利用该菌的突变株生产出第一代可降解的塑料 BIOPOL^[7]。近几年为拓宽真养产碱菌的碳源利用范围, 用基因工程方法对该菌的改造工作受到广泛重视^[8-10]。本文报道真养产碱菌利用高果糖浆 (HFS) 补料分批发酵产 PHB 的研究结果。

1 材料和方法

1.1 菌株

真养产碱菌 (*Alcaligenes eutrophus*) H16, 由德国哥廷根大学微生物所 Peter Schubert 先生提供。

1.2 培养基

1.2.1 基础培养基 (g/L): A. $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 9, KH_2PO_4 1.5; B. 柠檬酸铁铵 0.005, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.02; C. NaHCO_3 0.5; D. $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.7; E. 果糖 5.0; F. Hoagland 溶液 2ml。A、B、C、D、E 和 F 各组分分别于 115℃ 灭菌 30 分钟, 冷却后于无菌条件下混合。

1.2.2 斜面培养基: 基础培养基加 20% 琼脂。

1.2.3 液体种子培养基: 同基础培养基, 其中 E 改为 HFS 25ml (其果糖含量 $7.5 \pm 0.5\text{g}$)。

1.2.4 发酵培养基: 同基础培养基, 其中 D 改为 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3.4g, E 改为果糖 12g 或 HFS 40ml (其果糖含量 $12 \pm 0.5\text{g}$)。

1.2.5 补料浓缩培养基: A. 果糖 40g, 用蒸馏水定容至 150ml 或 HFS 150ml (其中果糖含量 $42 \pm 0.5\text{g}$)。B. $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.4g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 14g, 蒸馏水定容至 50ml。C. 柠檬酸铁铵 0.01g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.04g, NaHCO_3 0.5g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 4.5g, KH_2PO_4 0.75g, Hoagland 溶液 8ml, 蒸馏水定容至 100ml。A、B、C 三组分分别于 113℃ 湿热灭菌 30 分钟, 冷却后无菌条件下混合。

1.3 培养方法

接两环生长良好的斜面培养物到装有 50ml 种子培养基的 250ml 三角瓶中培养 20 小时, 按 10% 的接种量接入发酵培养基中。发酵设备为德国 B. Broum 公司 2L 自控发酵罐, 温度 30℃, 自控, 发酵过程中用 10% NaOH 自动流加, 控制 pH 6.8—7.0, 发酵液溶解氧饱和度自动指示。

1.4 分析方法

1.4.1 菌体生长: 发酵液经稀释测 436nm 光密度和直接称量菌体干重^[5]。

1.4.2 还原糖浓度: 3, 5-二硝基水杨酸法。

1.4.3 果糖浓度: 见参考文献^[11]。

1.4.4 PHB 含量: 气相色谱法^[12]。

2 结果和讨论

2.1 果糖和 HFS 产 PHB 的比较

真养产碱菌 H16 能较好地利用果糖, 而不利用葡萄糖 (突变株除外)^[13]。由于果糖价格昂贵, 而廉价的 HFS 又富含果糖, 故比较了 HFS 和果糖对该菌的生长及产 PHB 的影响 (表 1)。结果表明 HFS 除了使发酵周期有所延长外, 其发酵结束时菌体生物量及 PHB 积累量都可达到果糖为碳源的水平, 因此认为 HFS 代替果糖为碳源是可行的。

2.2 HFS 初始浓度对菌体生长的影响

以 HFS 为碳源, 比较不同初始糖浆浓度对菌体生长的影响 (图 1, 图 2)。糖浆浓度低时 (折合果糖浓度 7.0g/L), 菌的初期比生长速率高, 但随后迅速减小, 菌体产量低。随着糖浆浓度的增加, 比生长速率增大, 菌体产量也增高。但当初始糖浆浓度高达含果糖 18.0g/L 时, 不仅菌体产量不再增加, 比生长速率也变小, 生长周期相应延长。可见, 培养基中的糖浓度是影响菌体生长的主要因素, 并存在着高糖 (果糖和葡萄糖) 对菌体生长的抑制作用。为更好地发挥该菌的生长潜能, 可选用适中的初始 HFS 浓度, 使比生

长速率在较长时间内维持在高水平，并在发酵中后期比生长速率低时，补加菌体生长必需的糖和铵盐，以维持比生长速率处在一较高水平，从而提高菌体产量，缩短发酵周期。

表 1 果糖和 HFS 对菌体生长及 PHB 积累的影响

Table 1 Comparison between fructose and HFS on cell growth and PHB accumulation

碳源 Carbon sources	初始果糖浓度 Initial conc. of fructose (g/L)	发酵周期 Time (h)	菌体产量 Biomass production (g/L)	PHB 产量 PHB production (g/L)	PHB 对果糖的转化率 The conversion from fructose to PHB (%)
果糖 fructose	12.4	17.5	8.0	2.1	16.5
HFS	11.9	21.5	7.6	2.0	16.8

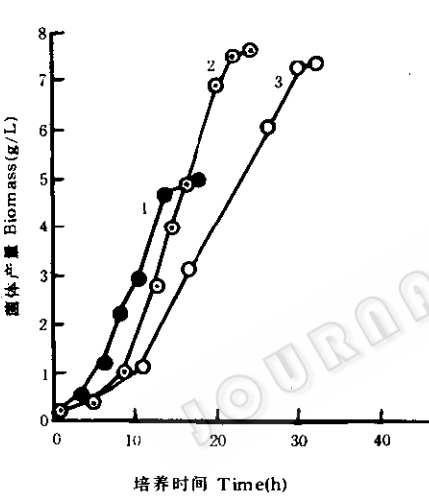


图 1 不同 HFS 初始浓度对菌体生长的影响
Fig.1 Effect of initial HFS concentration on biomass
1. 7.0 g/L; 2. 12.0 g/L; 3. 18.0 g/L.

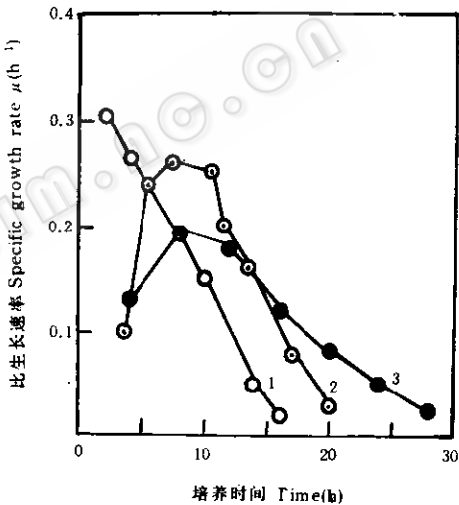


图 2 HFS 不同初始浓度下的比生长速率
Fig.2 Effect of initial HFS concentration on the specific growth rate
果糖浓度 fructose conc. (g/L):
1. 7.0 g/L; 2. 12.0 g/L; 3. 18.0 g/L.

2.3 非反馈补料分批培养对 PHB 积累的影响

选择合适的初糖浓度（含果糖 12 g/L），在果糖和 HFS 分批培养的中后期，即比生长速率下降至 0.1 h^{-1} 左右时，开始定时变流率补加果糖和 HFS 的浓缩培养基，以满足逐渐增加的菌体对营养物的需求。流率按公式 $f_n = \frac{V}{\Delta t} \log_{n+1} \frac{n+1}{n}$ 变化^[14]。式中： f_n 为第 n 级流率， V 为流加总体积， Δt 为流率变化的时间间隔， n 为流率变化的总级数。

2.3.1 补加果糖的分批培养：用果糖分批培养该菌 13 小时后，开始补加果糖浓缩培养基，流率从 9.6ml/h 到 49.5ml/h 分 7 级变化，在 14 小时内完成补料，发酵结果见图 3。

发酵周期 42 小时, 菌体产量 17.85g/L, PHB 产量达 8.0g/L, PHB 对果糖的转化率为 15.4%。

该补料流率的变化依据是: 假设在 $n \cdot \Delta t$ 时间内, 补料量是菌体生长的限制性因素, 其它条件最适, 料液的加入使得菌体能以稳定的比生长速率指数增加。果糖的补料试验中, 菌体比生长速率可在补料后 10 小时内维持在 0.1h^{-1} 左右 (图 4)。但随后, 该发酵设备的供氧已满足不了大量增长的菌体对氧的需求 (空气流量从初始的 $1.0\text{V}/\text{V} \cdot \text{min}$ 增加至 $1.4\text{V}/\text{V} \cdot \text{min}$, 搅拌速度由 $800\text{r}/\text{min}$ 增至 $1000\text{r}/\text{min}$, 氧的饱和度只为初始的 40%), 成为限制性因素, 引起菌体比生长速率迅速下降, 生长减缓, 发酵液中果糖浓度逐渐升高。在此限氧的条件下, 高浓度的果糖有利于菌体大量积累 PHB。

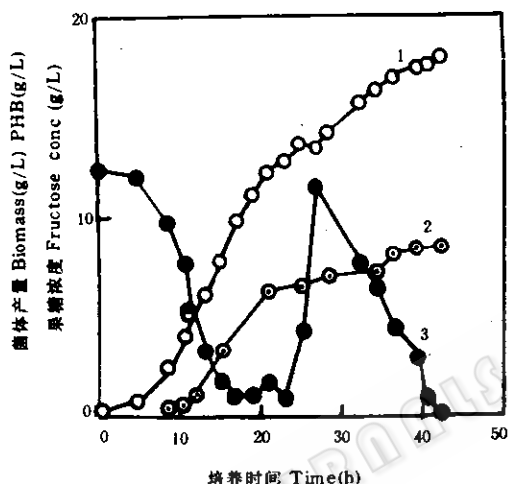


图 3 果糖补料分批发酵过程中果糖浓度、菌体产量和 PHB 积累的变化

Fig. 3 Changes in Fructose concentration, biomass and PHB accumulation in fructose fed-batch culture

1. 菌体产量 Biomass (g/L); 2. PHB (g/L);
3. 果糖浓度 Fructose conc. (g/L).

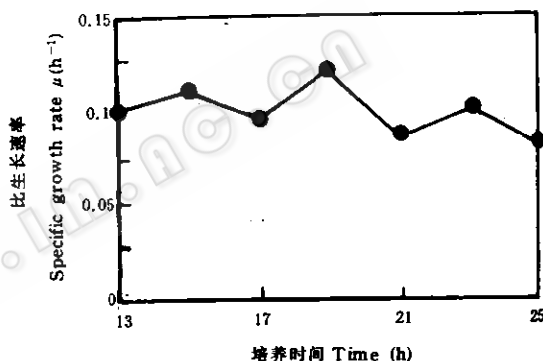


图 4 果糖分批培养过程中比生长速率的变化

Fig. 4 The changes of specific growth rate in fructose fed-batch culture

2.3.2 补加 HFS 的分批培养: 用 HFS 为碳源培养到 15.5 小时开始补料, 流率从 6.8ml/h 到 45ml/h, 分 9 级变化, 18 小时内完成补料, 发酵结果见图 5。由于 HFS 中含有不被利用的葡萄糖, 随着环境中葡萄糖的积累及供氧条件不足, 菌体生长减缓。葡萄糖在发酵液中累积影响了菌体对果糖的利用及 PHB 在细胞内的积累。发酵周期的延长, 使菌体产量有所增加 (20g/L 干菌体), 但 PHB 产量仍较低 (6.9g/L)。另外发酵液中残糖量过高也是该补糖方式的缺点。

2.4 以培养基中糖浓度为基准的 HFS 补料分批培养

在发酵前期控制发酵液中果糖浓度为 5—8g/L, 以保证菌体大量生长。在发酵 20 小时后, 提高发酵液中果糖浓度至 10—12g/L, 维持 6 小时, 然后停止补料, 同时减小搅拌

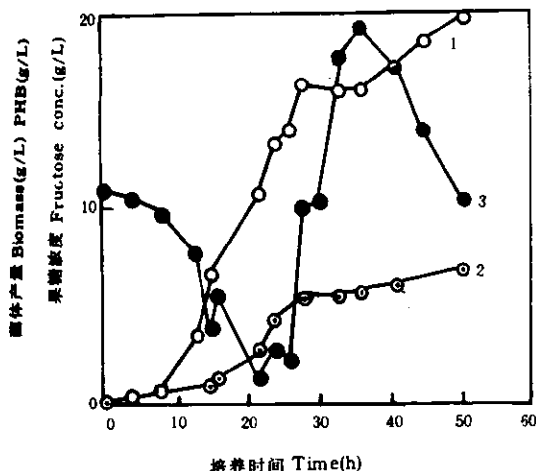


图5 HFS补料分批发酵过程中果糖浓度、菌体产量和PHB积累的变化

Fig. 5 Changes in Fructose concentration, biomass and PHB accumulation in HFS fed-batch culture

1. 菌体产量 Biomass (g/L); 2. PHB (g/L);
3. 果糖浓度 Fructose conc. (g/L).

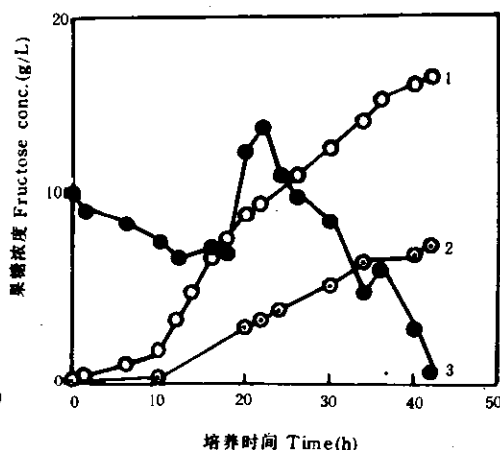


图6 HFS补料分批发酵过程中果糖浓度、菌体产量和PHB积累的变化

Fig. 6 Changes in Fructose concentration, biomass and PHB accumulation in HFS fed-batch culture

1. 菌体产量 Biomass (g/L); 2. PHB (g/L);
3. 果糖浓度 Fructose conc. (g/L).

速度和通气量以降低发酵液中溶解氧浓度, 以利于菌体积累 PHB, 发酵结果见图 6。

采用该补料工艺, 菌体产量达 16.4 g/L, PHB 产量达 7.6 g/L, 而且补料总体积可大减, 仅为非反馈补料工艺的 46%, 同时 PHB 对果糖转化率提高至 24%, 大大提高了糖的利用率。

若在此实验基础上, 在培养前期进一步提高发酵液中溶解氧浓度, 而在后期较合理地控制 NH_4^+ 浓度和溶解氧浓度, 在提高菌体产量和 PHB 占细胞百分含量的前提下, 获得更高的 PHB 产量, 由于该菌利用葡萄糖的能力很差, 所以在发酵液中残留有相当量的葡萄糖。若能对发酵液进行综合利用, 如生产 SCP 等, 则能进一步降低 PHB 生产成本。

致谢 对中国科学院微生物研究所的陈琦、龚建华二位先生的支持表示感谢。

参 考 文 献

- [1] 乔宝义. 生物工程进展, 1990, 10 (6): 43—46.
- [2] Byrom D. *Trends in Biotechnology*, 1987, 5: 246—248.
- [3] Anderson A J, Dawes E A. *Microbiological Reviews*, 1990, 450—472.
- [4] Oeding V, Schlegel H G. *Biochem J*, 1985, 143: 178—184.
- [5] Vollbrecht D, Elnawawy M A, Schlegel H G. *European J Appl Microbiol Biotechnol*, 1978, 6: 145—155.
- [6] Mulchandani A, Luong H T, Groom C. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1989, 30: 11—17.
- [7] King P P. *J Chem Tech Biotechnol*, 1982, 32: 2—8.
- [8] Friehs K. *Biotechnol*, 1989, 10: 285—292.

- [9] Slater S C, Voige W H, Dennis D E. *J Bacteriol*, 1988, **170** (10): 4431--4436.
- [10] Schubert P, Steinbuchel A, Schlegel H G. *J Bacteriol*, 1988, **170** (12): 5837--5847.
- [11] 崔绍汉. 淀粉与淀粉糖, 1985, **1**: 23--24.
- [12] Brauneegg G, Sonnleitner B, Lafferty R M. *European J Appl Microbiol Biotechnol*, 1978, **6**: 29--37.
- [13] Buchanan R E, Gibbons N E (中国科学院微生物研究所译). 伯杰细菌鉴定手册, 第八版. 北京: 科学出版社, 1984. 361.
- [14] 徐 浩. 中国科学, 1986, **8**: 836--842.

STUDIES ON THE PRODUCTION OF PHB FROM HFS BY *ALCALIGENES* *EUTROPHUS* H16

Wen Xin Zhuang Guoqiang Zheng Shimin

(Microbiology Institute of Shandong University, Jinan 250100)

Abstract Fructose can be utilized by *A. eutrophus* to accumulate poly- β -hydroxybutyric acid (PHB) in mineral medium. When fructose was replaced by HFS, the accumulation of PHB from HFS amounted to those of PHB from fructose. There existed the inhibition of high fructose and glucose concentration on cell growth and PHB accumulation. The fed-batch culture can eliminate the inhibition. The yield of PHB production was about 7.0--7.6g/L and cell biomass was about 16--20g/L.

Key words Poly- β -hydroxybutyric acid, *A. eutrophus* H16, Fed-batch