

真养产碱杆菌积累聚- β -羟基丁酸发酵条件的研究

堵国成 陈 坚 高海军 陈银广 伦世仪

(无锡轻工大学 生物工程学院 环境生物技术研究室 无锡 214036)

摘 要 对 *Alcaligenes eutrophus* 培养过程的研究表明,氮源的限制或缺乏可刺激细胞大量积累聚- β -羟基丁酸(PHB),但 PHB 合成期氮源的完全缺乏,会导致细胞的 PHB 合成速率迅速下降;氧的限制也可刺激 *A. eutrophus* 合成 PHB,但胞内 PHB 的积累量远小于氮源控制下的情况。在细胞的不同生长期限制氮源的供应会明显影响 PHB 的发酵过程,当残留菌体浓度达到 20g/L 至 30g/L 时停止流加氨水,可以得到较好的发酵水平,细胞干重, PHB 含量和 PHB 浓度可分别达到 61.9g/L、80.5% 和 49.0g/L。

关键词 真养产碱杆菌 聚- β -羟基丁酸 发酵

中图分类号 TQ92 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2000)01-0103-05

聚- β -羟基丁酸(简称 PHB)作为一种有光学活性的聚酯,除具有高分子化合物的基本特性,如质轻、弹性、可塑性、耐磨性和抗射线外,更重要的是其还具有生物可降解性和生物可相容性,因此,PHB 在食品包装、农业、化妆品和医药等领域具有广泛的用途^[1]。自 1926 年首次发现 PHB 以来,各国学者对其进行了大量的研究,包括产生 PHB 的微生物, PHB 的合成途径、形成动力学和机制,PHB 的结构、分子量及生物降解特性等多方面的研究^[2]。

本文探讨了氮源和溶解氧浓度控制条件下, *A. eutrophus* 胞内 PHB 的积累机制;在此基础上,进一步研究了 *A. eutrophus* 培养过程中不同的停止氮源流加时间对 PHB 发酵过程的影响。

1 材料和方法

1.1 菌种

真养产碱杆菌(*Alcaligenes eutrophus*) WSH3 (本研究室保藏号)。

1.2 培养基

1.2.1 斜面培养基、种子培养基和无机元素液与文献[3]相同。

1.2.2 发酵培养基:无机元素液中添加硫酸铵为氮源、葡萄糖为碳源, pH 7.0。

1.3 培养方法

1.3.1 氮源的限制、缺乏和恢复氮源供应的控制过

程:采用 2L 小型发酵罐(瑞士 INFOR2L 台式发酵罐)接种量为 10%,初始装液量为 1.2L。通气速率为 1.2~1.5L/min,搅拌转速为 600~1200r/min,以控制溶氧百分浓度在 20% 以上。pH 控制 7.0 \pm 0.1(以 3mol/L 的 NaOH 和 3mol/L 的 H₂SO₄ 来调节),发酵温度控制在 30 \pm 0.5 $^{\circ}$ C。葡萄糖和硫酸铵的初始浓度分别为 2% 和 0.2%,第 15 小时氮源浓度降至生长限制浓度以下时,开始连续流加硫酸铵溶液,其流加速率为 1.0g/L \cdot h,使细胞生长处于氮源限制状态;第 25 小时时停止硫酸铵的流加,使细胞处于氮源缺乏状态,第 35 小时向发酵罐中一次加入 0.2% 的硫酸铵;整个发酵过程中维持葡萄糖浓度在 1%~2% 之间。

1.3.2 氧的限制和恢复氧供应的控制过程:发酵温度和 pH 的控制同 1.3.1,通气速率为 1.2~1.5L/min。初糖浓度为 2%,初始硫酸铵浓度为 0.2%,发酵第 12 小时后开始连续流加葡萄糖和硫酸铵,使两者的浓度维持在细胞的平衡生长条件下;发酵第 20 小时,将搅拌转速由 800r/min 降至 600r/min,通气速率不变,溶氧为 0%~5%(处于临界百分溶氧以下),使细胞的生长处于溶氧限制状态;发酵第 40 小时,将搅拌转速增至 800r/min,解除溶氧的限制作用。

1.3.3 PHB 流加发酵过程的控制:初糖 2%、初硫酸铵 0.2%,通气量为 1.2~1.5vvm,搅拌转速为

600~1200r/min, 以控制溶氧在 20% 以上, 温度 $30^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$, 中间补加 50% 的葡萄糖溶液, 并控制适宜的流速, 维持葡萄糖浓度在 1%~2%。以 28% 的氨水作为调节 pH 值和菌体生长阶段中间补氮的手段, pH 值控制在 7.0 ± 0.1 。当发酵进行至 15、23、26 和 32h 时分别停止氨水的流加, 此后以 3mol/L 的 NaOH 代替氨水调节 pH 值。

1.4 分析方法

1.4.1 铵离子浓度的测定: 采用修正的 Berthelot 反应法^[4]。

1.4.2 葡萄糖含量的测定: 3,5-二硝基水杨酸法。

1.4.3 细胞干重的测定: 发酵液 4.5mL, 6000r/min 离心 5min, 水洗 2 次, 真空干燥称重。残留菌体浓度 = 细胞干重 - PHB 浓度。

1.4.4 PHB 含量的测定: 气相色谱法^[5]。PHB 浓度 = PHB 含量 · 细胞干重。

2 结果和讨论

2.1 氮源的限制、缺乏和恢复氮源供应对菌体生长和 PHB 合成的影响

图 1 为氮源控制条件下各参数的变化情况。从

图中可以看出, 第 15 小时限氮后, 细胞继续生长, 但其生长速率比平衡状态时有所下降; 从 PHB 浓度和含量变化曲线可以看出, 细胞在限氮条件下开始大量合成 PHB, 胞内 PHB 含量和 PHB 的浓度迅速上升, 另外, 从 PHB 的比合成比速 (μ_{PHB}) 可以看出, 其值从平衡生长条件下的 0.022h^{-1} 上升至 0.053h^{-1} , 增加了 140.1%, 表明细胞在氮源限制的情况下, 其胞内的代谢途径发生了很大的变化, 细胞物质的生物合成过程受到一定程度的抑制, 代谢的中间产物乙酰 CoA 由原来主要流向 TCA 循环以形成合成菌体所需的物质转为流向 PHB 的合成途径而形成 PHB。此阶段由于 PHB 浓度迅速增加, 残留菌体浓度也不断增加, 使得细胞干重增加很快; 此过程中溶氧百分比浓度仍呈线性下降趋势, 说明细胞在 PHB 合成过程中对氧的消耗很大。

第 25 小时后, 由于氮源的缺乏, 残留菌体浓度开始下降, 残留菌体的比生长速率接近为零, 而 PHB 的浓度和其胞内含量仍继续增加, PHB 的生成比速上升至最高点 (0.086h^{-1}) 后开始不断下降。在缺氮条件下, 细胞合成 PHB 能力的逐渐下降, 还可能与 PHB 合成酶的活力逐渐降低有关。Heizle

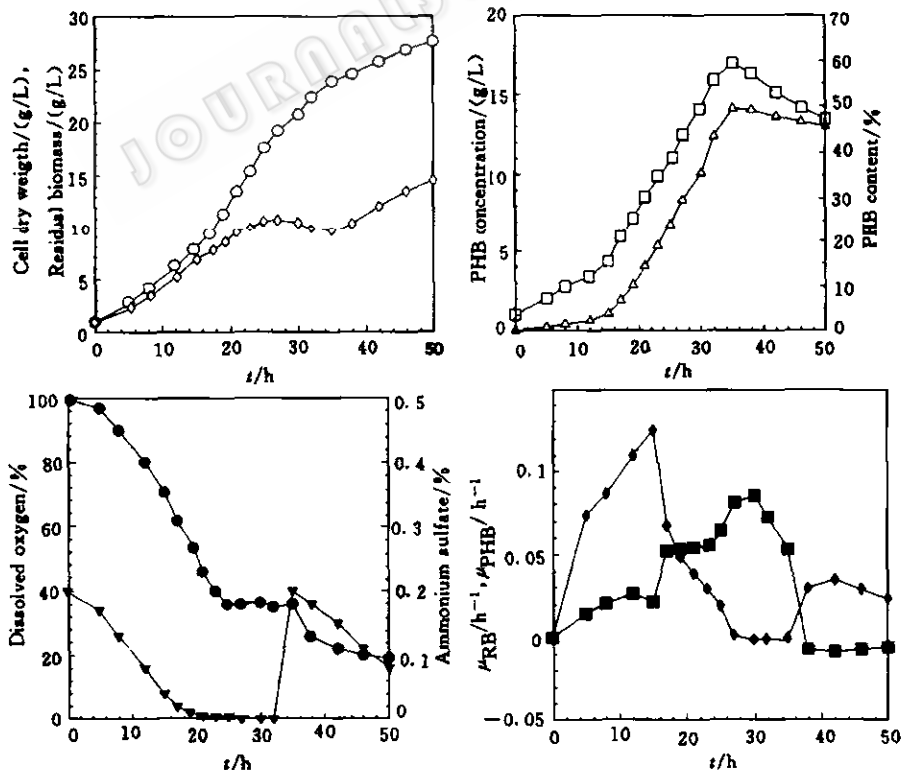


图 1 氮源控制下的 PHB 发酵过程

Fig. 1 Time courses of PHB fermentation under nitrogen controlled

□ Cell dry weight; ◇ Residual biomass; △ PHB concentration; □ PHB content
● Dissolved oxygen; ▼ Ammonium sulfate; ◆ μ_{RB} ; ■ μ_{PHB}

and Laffery^[6]的研究发现,在氮源缺乏的情况下,除与 PHB 合成有关的途径外,所有的代谢途径的活性都极大地降低了,TCA 循环的活力从 PHB 积累的早期至后期下降了 50%。再者,从细胞的生理角度考虑,尽管 PHB 积累过程中细胞能大为膨大,但不可能无限地膨大,因而 PHB 合成可能会受到细胞空间的限制。

第 35 小时恢复供氮后,残留菌体的比生长速率开始上升,残留菌体浓度也不断增加,说明部分细胞在有氮源存在时开始生长繁殖,但其比生长速率和限氮前平衡生长阶段的值相比要小得多。James G. C.^[7]的研究发现,在 *A. eutrophus* 的 PHB 合成过程中,当氮源的供应恢复时,细胞的生长没有回复到先前平衡生长时的水平,同时发现细胞的呼吸作用加强了,细胞在能量产生方面的相对增加表明,这对细胞克服非生长期所造成的细胞生物合成机制的延滞是必需的。在恢复供氮时,胞内 PHB 的含量已达细胞干重的 59.3%,电子显微镜下观察到 PHB 在胞内呈大的颗粒状,其出现可能会对细胞的生长产生一种生理性障碍,从而降低细胞的比生长速率。从 PHB 生成比速曲线可见,其值小于零;PHB 浓度

和含量也不断下降,PHB 浓度的下降表明此阶段胞内的部分 PHB 发生了降解作用。此阶段溶氧百分浓度的下降速度增大,表明细胞的生长对氧需求的增加。在整个发酵阶段,细胞干重不断增加。

从上述结果可以看出,在 PHB 的发酵过程中,为了使胞内 PHB 大量积累,只能限氮而不能缺氧,完全缺氧会造成菌体细胞的自溶和 PHB 合成比速的迅速下降;另外,如在 PHB 合成阶段缺氧一段时间后再大量补氮,则会导致胞内 PHB 的降解。

2.2 限氧和恢复氧供应对生长的 PHB 合成的影响

多种细胞的生命活动过程需要氧的参与,氧在细胞的生物合成过程中起着十分重要的作用。有关研究报道^[6],有些细菌如 *Azotobacter beijerinckii* 在氧供应缺乏的条件下能在胞内大量积累 PHB。为了了解氧在 *A. eutrophus* 合成 PHB 过程中的作用,研究了氧的限制和恢复氧供应过程对 *A. eutrophus* 菌体生长和 PHB 合成的影响。

图 2 为溶解氧控制下的 PHB 发酵过程。从图中可以看出,当细胞处于溶氧限制状态时,残留菌体的比生长速率在 2h 内从 0.15h^{-1} 下降至 0.03h^{-1} ,表明细胞在限氧条件下其生长受到严重的限制,残

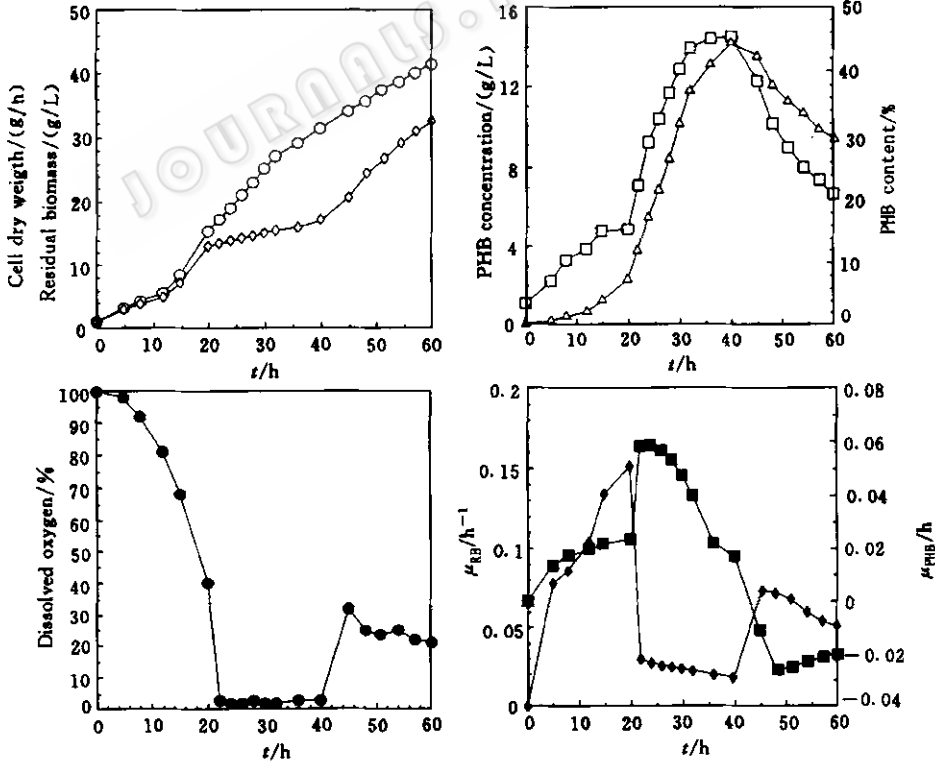


图 2 溶解氧控制下的 PHB 发酵过程

Fig. 2 Time courses of PHB fermentation under dissolved oxygen controlled

○ Cell dry weight; ◇ Residual biomass; △ PHB concentration;
□ PHB content; ● Dissolved oxygen; ◆ μ_{RB} ; ■ μ_{PHB}

留菌体浓度在此阶段略有增加;PHB 合成比速则迅速增加,其值在 2h 内从 $0.022h^{-1}$ 增至 $0.058h^{-1}$,表明与细胞的限氮情况相似,处于限氧条件下的细胞也会在其胞内大量积累 PHB。从代谢途径的分析可以得知,当细胞的供氧受能限制时,其呼吸活性降低,使胞内的 NAD(P)H 浓度增加,增加的 NAD(P)H 浓度抑制了 TCA 循环中异柠檬酸脱氢酶的活性,因而降低了 TCA 循环的活性,该途径对乙酰 CoA 的消耗减少。另外,由于细胞呼吸作用下降,胞内 ATP 浓度下降,AMP 浓度升高,活化了丙酮酸激酶的活性,这将导致磷酸烯醇式丙酮酸水平的降低,由此可以解除其对糖酵解途径中葡萄糖-6-磷酸脱氢酶的抑制作用,糖酵解途径活性增加,导致乙酰 CoA/CoASH 的比例增加,部分解除了 CoASH 对 β -酮基硫解酶的抑制作用,有利于 PHB 的合成。限氧初期胞内 PHB 含量和 PHB 浓度迅速增加,至第 40 小时时 PHB 含量增至 45.3%,随后其增加趋势趋于平缓,而细胞在氮源限制和缺乏情况下胞内 PHB 含量可达近 80%。结果表明氧限制条件也可以激发 *A. eutrophus* 合成 PHB,但胞内 PHB 的积累量难以达到象细胞处于氮源限制和缺乏下的水平。

在第 40 小时解除供氧限制后,残留菌体的比生长速率迅速增加,但其所达到的最大值($0.074h^{-1}$)

远小于氧限制以前的生长水平,可能是长时间的限氧过程损害了细胞的活性,或是由于胞内大的 PHB 颗粒的存在从生理上妨碍了细胞的生长和分裂。PHB 合成比速降为负值,表明细胞处于平衡生长条件下,胞内所积累的 PHB 部分开始降解,PHB 浓度和 PHB 含量减少。由于细胞的生长,细胞干重和残留菌体浓度不断增加。至第 60 小时时,胞内 PHB 含量降为 20.5%。James G. C.^[7] 在 *A. eutrophus* 的培养过程中发现,处于一定条件下的细胞其胞内的 PHB 含量为一确定值,因而胞内的 PHB 含量也是细胞所处的环境状态的一种指示,当细胞所处的环境条件改变时,其生理状态也会发生相应的变化。作者在连续培养过程中亦发现,细胞在一定的比生长速率下,其胞内 PHB 含量为一确定值^[8]。

2.3 培养过程中的不同停氮时间对 PHB 形成的影响

从前面的研究可以看出,在真养产碱杆菌培养过程中限氮更有利于刺激细胞积累 PHB。为了研究在不同的细胞生长期停止氮源的供给对 PHB 合成的影响,进行了在 4 个不同的生长阶段停止氨水流加的试验。停止氨水的流加时,细胞干重分别达到 15.1g/L、20.6g/L、29.3g/L 和 39.6g/L,培养过程中各种参数的变化结果见图 3。

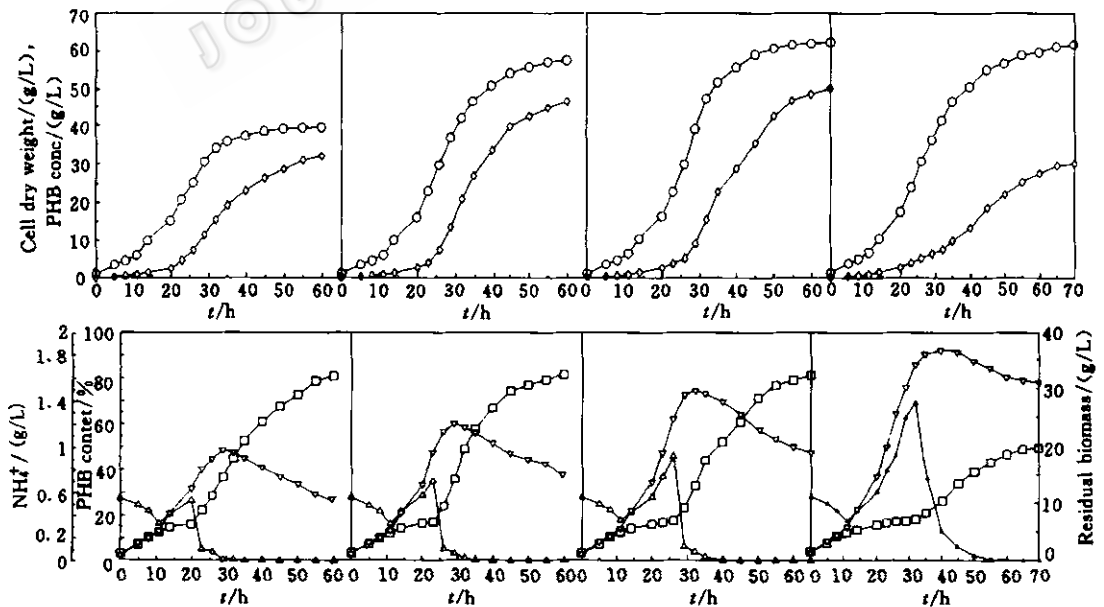


图 3 不同生长阶段停加氨水情况下的 PHB 发酵过程

Fig. 3 Time courses of PHB fermentation with ammonia water feeding stopped at different cell growth phases

○ Cell dry weight; ◇ PHB concentration; □ PHB content; △ NH₄⁺; ▽ Residual biomass

图 3 为不同生长阶段停加氨水情况下的 PHB 发酵过程。从图中可以看出,在细胞的不同生长阶段停止流加氨水,培养液中所积累的铵离子浓度不同,它们分别为 0.53g/L、0.69g/L、0.91g/L 和 1.37g/L。当停氨水时间控制在第 20 小时、23 小时、26 小时时,停加氨水后培养基中铵离子浓度很快被细胞消耗,当铵离子浓度基本接近为零时,残留菌体的生长停止,细胞开始大量积累 PHB,PHB 含量和 PHB 浓度的增加很快,最终 PHB 含量分别达到 80.7%、81.1% 和 80.5%,PHB 浓度分别达到 32g/L、46.2g/L 和 49.0g/L;而当停加氨水时间较迟时,培养基中的铵离子消耗较慢,PHB 含量和 PHB 浓度的增加较慢,最终 PHB 含量和 PHB 浓度分别达 48.9% 和 29.9g/L;在 4 种情况下,细胞干重分别达到 39.6g/L、57.0g/L、61.9g/L 和 61.3g/L。

从上述结果可以看出,如在细胞生长早期即停止流加氨水,尽管最终的 PHB 含量很高,但由于停氨水时的残留菌体量相对较少,因而最终所获得的 CDW 和 PHB 浓度将受到影响。但如果在细胞生长的后期才停止氨水的流加,尽管此时的残留菌体量很高,但由于停氨后培养基中残留的铵离子浓度较高及生长后期细胞的活力降低,不利于细胞大量积累 PHB,最终的 PHB 含量和 PHB 浓度很低。当残留菌体浓度达到 20g/L 至 30g/L 时,停止流加氨水,最终可获得较高的 PHB 含量和 PHB 浓度。另外,从图 3 中还可以进一步看出,停加氨水后,当培养基中氮源完全耗尽时,部分细胞会发生自溶,这必将导致 PHB 合成速率的不断下降,因而在 PHB 合成期还需进行氮源的限量流加,以提高细胞的 PHB 合成能力,进一步的研究结果将随后报道。

参 考 文 献

- [1] 堵国成,陈 坚,高海军等.生物技术,1996,(4)5-10
- [2] Yamane T, Fukunaga M, Lee Y W. *Biotechnology and Bioengineering*, 1996, 50:197-202
- [3] 堵国成,陈 坚,高海军等.应用与环境生物学报,1996,(3)308-314
- [4] Steinbuchel A, Hans G S. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1989, 31:168-175
- [5] 高海军,陈 坚,堵国成等.第七届全国生物化工学术会议论文集,1996,p245-249
- [6] Heinzle E, Laffety R M. *Eur J Appl Microbiol*, 1980, 11:8-16
- [7] James G C. PHD Dissertation, 1990, p.98
- [8] 堵国成,陈 坚,高海军等.化学反应工程与工艺,1998,14(1):61-65

Studies on Fermentation Conditions for the Accumulation of Poly- β -hydroxybutyrate in *Alcaligenes eutrophus*

DU Guo-cheng CHEN Jian GAO Hai-jun CHEN Yin-guang LUN Shi-yi

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

Abstract The results of the cultivation of *Alcaligenes eutrophus* showed that nitrogen limitation or exhaustion could stimulate the substantial accumulation of PHB. But the exhaustion of nitrogen source in PHB formation period would result in the rapid drop of PHB synthetic rate. Oxygen limitation could also stimulate the formation of PHB, but the content of PHB in the cell was much less than that in case of nitrogen controlled conditions. Obvious influences were observed on PHB fermentation when ammonia water feeding was stopped at different cell growth phases, and better results could be obtained when it was performed at 20g/L to 30g/L of residual biomass. Cell dry weight, PHB content and PHB concentration reached 61.9g/L, 80.5% and 49.0g/L, respectively under desired conditions.

Key words *Alcaligenes eutrophus*, poly- β -hydroxybutyrate, fermentation