

球衣菌合成聚羟基烷酸 (PHA) 的发酵研究*

杨幼慧¹ 伍朝晖** 余海虎² 钟士清¹

(华南农业大学食品系 广州 510642)¹ (香港理工大学应用生物及化学科技学院 香港九龙)²

摘要: 研究了球衣菌 (*Sphaerotilus* sp.) W99136 合成聚羟基烷酸 (PHA) 的培养基配方及发酵条件。结果表明, W99136 适宜发酵培养基配方为: 葡萄糖 10.25 g/L, 蛋白胨 2.63g/L, MgSO₄·7H₂O 0.17 g/L, CaCl₂ 0.05 g/L, NaH₂PO₄·2H₂O 0.02 g/L, K₂HPO₄ 0.04 g/L, KH₂PO₄ 0.03 g/L; 最佳接种量为 0.138g (干)/100mL, 培养基适宜初始 pH 为 7.0~7.5, 发酵 36h 可获得较大的细胞干重与 PHA 产量, 经¹H-NMR 与 GC 分析, 其 PHA 为羟基丁酸与羟基戊酸共聚体 P (HB-co-HV), 其中羟基戊酸 (HV) 含量达 39.3%。

关键词: 球衣菌, PHA 发酵

中图分类号: TQ929 文献标识码: A 文章编号: 0253-2654 (2001) 04-0061-06

STUDIES ON FERMENTATION OF SYNTHESIZING POLY-β-HYDROXYALKANOATE (PHA) BY *SPHAEROTILUS* SP.

YANG You-Hui¹ WU Zhao-Hui YU Peter H² ZHONG Shi-Qing¹

(Dept. of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642)¹

(Dept. of ABCT, The Hong Kong Polytechnic University, Hung Hom Kowloon Hong Kong)²

Abstract: Fermentation of synthesizing Poly-β-hydroxyalkanoate (PHA) by *Sphaerotilus* sp. W99136 were optimized. The result of uniform design test showed that the optimized medium composition contained (g/L): glucose 10.25, peptone 2.63, MgSO₄·7H₂O 0.17, CaCl₂ 0.05, NaH₂PO₄·2H₂O 0.02, K₂HPO₄ 0.04, KH₂PO₄ 0.03. The optimum seed culture volume was 0.138g (CDW) /100mL. With control initial pH in the medium between 7.0, higher dry cell weight and PHA content were achieved after fermentation for 36h. ¹H-NMR and GC analysis of PHA products from *Sphaerotilus* sp. W99136 show that the product was P (HB-co-HV). The HV content of P (HB-co-HV) came to 39.3%.

Key words: *Sphaerotilus*, Poly-β-hydroxyalkanoate (PHA) fermentation

聚羟基烷酸 (polyhydroxyalkanoate, 简称 PHA) 是许多细菌在营养缺乏时细胞内贮存的一类脂肪族高分子聚合物, 它不仅具有与化学合成塑料相似的理化性质, 而且具有化学合成塑料所没有的特殊性能, 如生物降解性、生物相容性、光学活性等, 并可利用再生资源进行生物合成, 因此成为当今微生物工程研究的热点之一^[1,2]。其中研究最多的是聚 β-羟基丁酸 (PHB) 和 β-羟基丁酸与 β-羟基戊酸的共聚体 P (HB-co-HV)。PHB 的性能与化学合成塑料聚丙烯相近, 但较硬、发脆, P (HB-co-HV) 含有 HV 成分, 比 PHB 硬度低, 韧性好, 加工性能得到改善, 备受人们的重视。目前获得 P (HB-co-

* 广东省自然科学基金资助项目 (No. 970040)

** 现在广东省中山市出入境检验检疫局工作

收稿日期: 2000-02-06, 修回日期: 2000-05-22

HV) 主要采用向发酵液中添加 HV 组分合成前体——奇数碳有机酸的办法, 由于这些有机酸在较低浓度下对菌体有抑制作用, 增加了操作难度, 且价格较高^[3]。作者从啤酒厂活性污泥中分离得到 1 株球衣菌 W99136, 其最大特点是可以葡萄糖作唯一碳源合成 P (HB-co-HV)。因此, 本文对球衣菌 W99136 合成 P (HB-co-HV) 的培养基及发酵条件进行研究。

1 材料与方法

1.1 菌株

W99136 从珠江啤酒厂废水处理厂的活性污泥中分离, 经鉴定为球衣菌属 (*Sphaerotilus* sp.)。

1.2 培养基

1.2.1 斜面 and 种子培养基: 见文献 [4]。

1.2.2 发酵培养基基本配方: 葡萄糖 10g, 蛋白胨 3g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2g, $CaCl_2$ 0.05g, $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 0.05g, K_2HPO_4 0.04g, KH_2PO_4 0.03g, $FeCl_3$ 0.01g, H_3BO_3 0.005g, 蒸馏水定容至 1L, pH7.0, $0.55 \times 10^5 Pa$ 灭菌 30min。

1.3 接种与培养条件

1.3.1 种子培养: 从斜面接二环菌苔于种子培养基中, 于 30℃、150r/min 培养 18h。

1.3.2 摇瓶培养: 250mL 摇瓶装料系数为 0.12, 接种量为 0.138g (干)/100mL, 于 30℃、150r/min 条件下摇床培养 40h。

1.4 发酵培养基的优化

1.4.1 氮源筛选: 发酵培养基配方中变动氮源, 浓度 0.3%, 摇瓶培养 40h。

1.4.2 发酵培养基组分的优化: 在氮源筛选基础上, 选择葡萄糖、蛋白胨、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、 $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 、 K_2HPO_4 5 个因素 (其它成分同 1.2.2), pH7.0, 采用均匀设计 (见表 1)^[5]按 1.3.2 进行试验, 然后利用 SAS 软件进行统计处理分析。

表 1 均匀设计因素及水平表

因素 水平	葡萄糖 (%) x_1	蛋白胨 (%) x_2	$MgSO_4$ (g/L) x_3	NaH_2PO_4 (g/L) x_4	K_2HPO_4 (g/L) x_5
1	0.7	0.1	0.10	0.02	0.02
2	0.8	0.2	0.15	0.03	0.03
3	0.9	0.3	0.20	0.04	0.04
4	1.0	0.4	0.25	0.05	0.05
5	1.1	0.5	0.30	0.06	0.06

1.5 培养条件对菌体生长和 PHA 合成的影响

1.5.1 接种量: 将培养 18h 的种子液按接种量 0.017、0.052、0.086、0.138、0.173g (干重)/100mL 分别接入优化发酵培养基中按 1.3.2 培养。

1.5.2 起始 pH: 用 5% HCl 和 10% NaOH 溶液调节优化发酵培养基的起始 pH 值分别为 6.5、7.0、7.5、8.0、8.5, 按 1.3.2 培养。

1.5.3 通风量: 以固定摇床转速而变化摇瓶装液量的方式来进行。在 250mL 三角瓶中加

入装料系数分别为 0.08、0.12、0.16、0.20、0.24 的优化发酵培养基, 初始 pH7.0, 按 1.3.2 方法培养。

1.5.4 发酵时间: 采用优化培养基配方, 初始 pH7.0, 按 1.3.2 方法, 分别发酵 24h、30h、36h、42h、48h。

1.6 分析方法

1.6.1 细胞干重的测定: 取发酵液 5mL, 6000r/min 离心 5min, 水洗 2 次, 105℃ 烘至恒重。

1.6.2 PHA 的提取和测定: 参照文献 [6, 7]。

2 结果

2.1 不同氮源对菌体生长和 PHA 合成的影响

W99136 对无机氮源、低分子和高分子的有机氮源均能利用, 其中有机氮源对菌体细胞生长和 PHA 的合成有促进作用, 尤其是胰蛋白胨、蛋白胨和酵母膏的促进作用较强, PHA 含量均在 33% 以上, 以利用蛋白胨效果为好, 其 PHA 含量达 49.2% (表 2)。

2.2 发酵培养基配方的优化

发酵培养基配方均匀设计试验结果列于表 3。利用 SAS 软件进行响应面模型分析^[8], 得到响应值 PHA 含量 (y) 对 5 个试验因素即葡萄糖 (X_1)、蛋白胨 (X_2)、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (X_3)、 $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ (X_4)、 K_2HPO_4 (X_5) 的多元回归方程: $y = -3.1206 + 7.2487X_1 + 1.1327X_2 + 3.0536X_3 + 1.5117X_4 - 0.9115X_5 - 3.5372X_1^2 - 2.1543X_2^2 - 8.8136X_3^2 - 53.8567X_4^2$ 。

表 3 5 种因素的均匀设计表及试验结果

试验号	葡萄糖 (%) x_1	蛋白胨 (%) x_2	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (g/L) x_3	$NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ (g/L) x_4	K_2HPO_4 (g/L) x_5	PHA 浓度 (g/L) y
1	0.7	0.2	0.15	0.04	0.06	0.54
2	0.7	0.3	0.25	0.06	0.05	0.43
3	0.8	0.5	0.10	0.03	0.04	0.62
4	0.8	0.5	0.20	0.06	0.03	0.57
5	0.9	0.2	0.30	0.03	0.02	0.78
6	0.9	0.4	0.10	0.05	0.06	0.75
7	1.0	0.5	0.20	0.02	0.05	0.84
8	1.0	0.1	0.30	0.05	0.04	0.71
9	1.1	0.3	0.15	0.02	0.03	0.96
10	1.1	0.4	0.25	0.04	0.02	0.85

方程 y 的响应面平均值为 0.7050, 相关系数 $R^2 = 1.0000$ 。对回归方程 y 求偏导, 并

表 2 不同氮源对 W99136 菌体生长和 PHA 积累的影响

氮源	细胞干重 (g/L)	PHA 含量 (% 干重)	PHA 浓度 (g/L)
胰蛋白胨	1.62	46.9	0.76
蛋白胨	1.81	49.2	0.89
牛肉膏	1.42	28.9	0.41
酵母膏	1.93	33.7	0.65
硫酸铵	1.53	30.1	0.46
硝酸铵	1.56	24.4	0.38
尿素	1.67	27.5	0.46
氯化铵	1.33	26.3	0.35

令之为零, 求极大值 (y), 同时求得各因素的最佳水平分别为: $X_1 = 1.0246$, $X_2 = 0.2629$, $X_3 = 0.1732$, $X_4 = 0.02$, $X_5 = 0.04$, 即葡萄糖 10.25g/L、蛋白胨 2.63g/L、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.17g/L、 $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 0.02g/L、 K_2HPO_4 0.04g/L。在此优化配方下理论 PHA 浓度 (y) 为 0.98g/L, 经实际发酵验证, 菌体细胞干重为 1.93g/L, PHA 含量为 53.3%, PHA 浓度 (y) 为 1.03g/L。

2.3 培养条件对菌体生长和 PHA 合成的影响

2.3.1 接种量对菌体生长和 PHA 合成的影响: 接种量对菌体生长和 PHA 合成有明显影响。起初随接种量上升, 细胞干重和 PHA 含量呈上升趋势, 当为 0.138g/100mL 时最高, PHA 浓度达 1.01g/L; 当接种量继续上升, 细胞干重和 PHA 含量均下降 (图 1A), 表明适宜接种量为 0.138g/100mL。

2.3.2 初始 pH 对菌体生长和 PHA 合成的影响: 采用不同初始 pH 值的发酵培养基, 比较其对菌体生长和 PHA 合成的影响 (图 1B)。由图 1B 可见, pH 在 6.5~7.5 的范围内, 对菌体生长和 PHA 合成的影响规律相似, 在 pH 为 7.0~7.5 时, 菌体细胞干重及 PHA 含量均达最大值, 在 pH 偏高或偏低时, 细胞干重和 PHA 含量明显下降; 当 pH 为 7.5~8.5 时, 随 pH 的增加, 菌体细胞干重下降较少, 而胞内 PHA 含量明显下降。

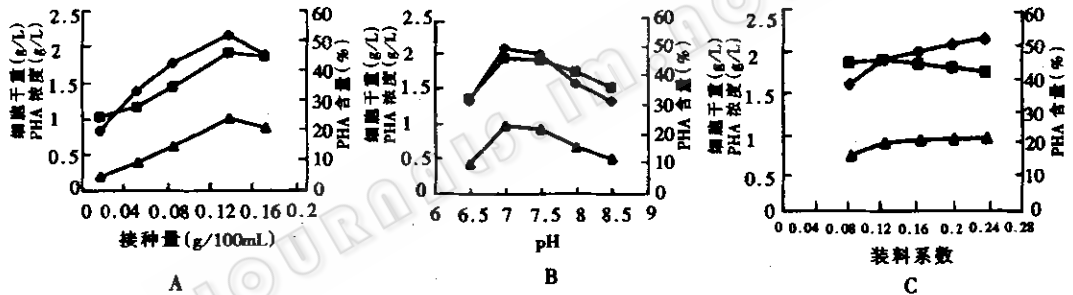


图 1 培养条件对 W99136 菌体生长和 PHA 合成的影响

—■— 细胞干重, —▲— PHA 浓度 (g/L), —●— PHA 含量 (%)

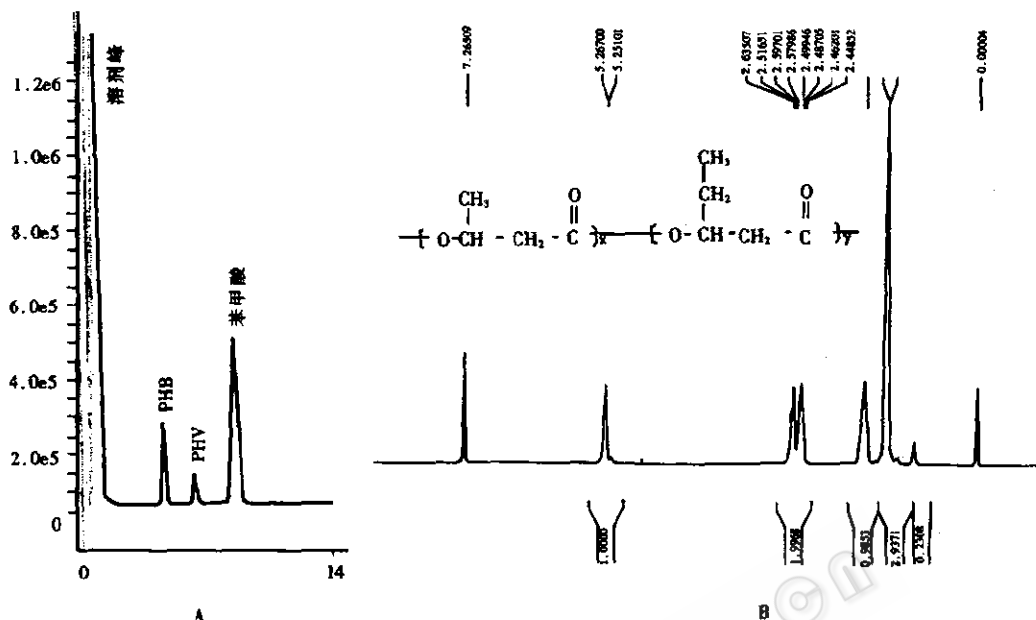
2.3.3 通风量对菌体生长和 PHA 合成的影响: 结果 (图 1C) 表明, 当转速为 150r/min 时, 不同装料系数对菌体生长和 PHA 合成均有影响。随装料系数的增大, 胞内 PHA 含量呈上升趋势, 而细胞干重在装料系数较低时 (0.08~0.12) 略有增加, 随后呈下降趋势, 当装料系数达 0.12 以上时, 对 PHA 浓度影响不大。

2.3.4 发酵时间对菌体生长和 PHA 合成的影响: 发酵时间对 PHA 产量及其组成均有明显的影响。开始 PHA 的浓度及共聚物中 HV 的含量随发酵时间的延长而提高, 36h 时达最高, PHA 浓度为 1.06g/L, HV 在共聚物中的含量为 39.3% (图 2)。此后随发酵时间的延长, 两者均有所下降。

表 4 发酵时间对菌体生长和合成 PHA 的影响

发酵时间 (h)	HB/细胞干重/(%)	HV/细胞干重/(%)	HV/P(HB- ω -HV)/(%)	PHA 浓度 (g/L)
24	25.4	3.6	12.4	0.55
30	31.3	18.0	36.5	0.94
36	33.0	21.4	39.3	1.06
42	32.8	14.5	30.7	0.90
48	31.9	4.4	12.1	0.68

不过, 在 30~42h 之间, PHA 的产量比较接近 (表 4)。

图2 PHA的GC和¹H-NMR图谱A GC图谱, B ¹H-NMR图谱

3 讨论

关于微生物合成PHA已有大量报道,但关于球衣菌以葡萄糖为唯一碳源合成P(HB-co-HV)未见其他报道。一般认为^[3,9],PHB最终由HB、P(HB-co-HV)最终由HB和HV在聚合酶作用下分别合成。其中HB的前体是乙酰CoA,HV的前体则是丙酰CoA。一般细菌在不添加丙酸或戊酸(奇数碳源)的情况下仅合成乙酰CoA,最终只能合成PHB。而球衣菌W99136在不添加丙酸或戊酸的情况下,可利用葡萄糖合成P(HB-co-HV),说明其代谢途径与一般细菌有不同之处。其途径可能是,葡萄糖降解为丙酮酸后,一部分经丙酮酸脱氢酶催化生成乙酰CoA,一部分经甲基丙二酰CoA转羧基酶催化,沿丙酮酸-丙酸途径形成丙酰CoA,并以丙酰CoA作引物合成HV单体,进而在聚合酶的催化下由HB、HV合成P(HB-co-HV)^[3,10,11]。

张立新等^[12]从山东造纸总厂分离得到1株球衣菌,以葡萄糖为碳源,结合其他条件进行发酵试验。结果表明,葡萄糖对菌丝生长影响较大,浓度在0.5%时,生长速度显著减慢,1.0%以上则不生长;发酵56h,发酵液中PHA含量为0.198g/L,占菌体干重26%。而本实验的球衣菌W99136对葡萄糖耐受能力较强,在1.02%的葡萄糖浓度下不但可正常生长,且细胞干重和PHA浓度均较高,分别为上述水平的2.6倍和5.5倍。其原因除了菌种因素外,还可能与培养基和培养条件优化因素有关。

本实验中所试的8种氮源虽均可合成PHA,但产量差异较大,说明氮源的种类和浓度对细胞生长和PHA的合成均有重要影响,其机理有待探讨。实验发现,发酵液初始pH值对菌体生长和PHA积累影响较大,如能在发酵过程中控制pH值在7.0~7.5,则可使菌体生长和PHA积累都达到较高水平。实验还发现适当提高接种量,有利于发酵时细菌细胞浓度的增加,但接种量过高,由于新生细菌细胞浓度的减少,使细胞干

重有所下降; W99136 是好氧菌, 实验表明发酵前期适当通气可以加快菌体生长, 中后期适当限氧则有利于 PHA 的积累; 发酵时间对 P (HB-co-HV) 中 HV 比例影响很大, 实际应用中予以注意。

球衣菌 W99136 的最大特点是能以葡萄糖为唯一碳源合成 P (HB-co-HV), 其 PHA 产量也较报道^[12]高得多, 但相对于真氧产碱杆菌等 PHA 高产菌而言, 产量仍较低, 今后应加强菌种改良研究与发酵条件的进一步优化。

参 考 文 献

- [1] 伍朝晖, 杨幼慧, 钟士清. 微生物学通报, 2000, 27 (3): 220~223.
- [2] Choi J, Lee S Y. Appl Microbiol Biotechnol, 1999, 51: 13~21.
- [3] 赵良启, 田杰生, 吴柏和, 等. 微生物学报, 1996, 36 (5): 351~359.
- [4] Takeda M, Matsuoka H, Hamana H, et al. Appl Microbiol Biotechnol, 1995, 43: 31~34.
- [5] 方开泰. 均匀设计与均匀设计表. 北京: 科学出版社, 1994, 1~38.
- [6] Hu W F, Chua H, Yu P H F. Biotechnol Letters, 1997, 19 (7): 695.
- [7] Yu P H, Chua H, Huang A L, et al. Appl Biochem & Biotechnol, 1998, 70~72: 603~614.
- [8] 杨晓泉, 李汴生, 曹劲松. 计算机在食品工程中的应用. 广州: 华南理工大学出版社, 1998, 146~151.
- [9] Lee S Y, Choi J. Waste Management, 1999, 19: 133~139.
- [10] Satoh H, Mino T, Matsuo T. Inter J of Biological Macromolecules, 1999, 25: 105~109.
- [11] Byrom D. Trends Biotechnol, 1987, 5: 246~250.
- [12] 张立新, 王锦平, 郭秀君, 等. 微生物学杂志, 1993, 13 (1): 30~33.