

# 费氏中华根瘤菌合成羟基丁酸和羟基己酸共聚体的研究\*

张 婵 董岳峰 王海宾 赵良启\*\*

(山西大学化学生物学与分子工程教育部重点实验室 太原 030006)

**摘要** 进行了费氏中华根瘤菌(*Sinorhizobium fredii*)合成羟基丁酸和羟基己酸共聚体[P(HB-HH)]的研究,通过摇瓶正交试验优化了培养基成分、培养条件和癸酸盐调控条件,采用发酵罐分批发酵和两阶段补料分批发酵方式及两步加盐法研究了P(HB-HH)的高密度发酵技术参数。经55h发酵,P(HB-HH)产量可以达到17.55g/L,其中HH单体含量占共聚体的20.6%,该共聚体的分子量约为 $1.4 \times 10^5$ D。结果表明*S. fredii*的生产性状优良,有可能通过该菌株的高密度发酵与代谢调控实现P(HB-HH)的工业化生产。

**关键词** 费氏中华根瘤菌,癸酸盐,聚羟基丁酸和羟基己酸共聚体,补料分批发酵

中图分类号:Q939.9 文献标识码:A 文章编号:0253-2654(2007)06-1077-05

## Studies on Synthesis of Poly(3-Hydroxybutyrate-co-3-Hydroxyhexanoate) by a *Sinorhizobium fredii* Strain\*

ZHANG Chan DONG Yue-Feng WANG Hai-Bin ZHAO Liang-Qi\*\*

(Key Laboratory of Chemical Biology and Molecular Engineering of Ministry of Education,  
Shanxi University, Taiyuan 030006)

**Abstract** The potential of a *Sinorhizobium fredii* strain producing a copolymer polyhydroxyalkanoate (PHA) from glucose and sodium decanoate substrates was studied in this paper. Using orthogonal design in a flask-shaker culture system, the culture medium, some culture conditions and vital regulation conditions for polymer synthesis were optimized. These optimized results were applied into further studies in two-stage fed-batch with a 10L fermentor. The whole culture process consisted of two stages, that is, the cell growth and the copolymer production. The first stage was for the cell growing to a desired biomass and the second was for the copolymer synthesis. For producing PHA polymers, the selected 8 mM sodium decanoate was added into the broth by adopting a two-step adding method for avoiding of foaming when the biomass had approached 28.5g/L dry cell. The maximum P(HB-HH) production could be 17.55 g/L with a monomer ratio of 79.4% (W/W) 3-HB and 20.6% (W/W) 3-HH. The molecule constitute of the copolymer is poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) [P(HB-HH)] and its molecular weight (MW) is  $1.4 \times 10^5$  D. The results demonstrated that the employed *S. fredii* strain could be a potential candidate for industrial production of the copolymer. The fermentation parameters acquired in the experimental system offered some valuable references for studying large-scale production of the copolymer.

**Key words** :*Sinorhizobium fredii*, Sodium decanoate, Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate), Fed-batch

多聚羟基烷酸(Polyhydroxyalkanoates,简称PHAs)是一类由某些生物在不平衡代谢条件下合成的碳源与能源储藏物质。这类物质不仅具有石化塑料的一般特性,而且具有生物可降解性、生物相容性、表面可修饰性等特性,是一类无毒、无污染的新型环境友好型材料。它不仅可以用于轻工、化工、食品、农业等领域,还可以用于医疗卫生及医学组织工程。

根据所含单体的不同,PHAs被分为两大类:一类为短链羟基烷酸聚酯(SCL-PHAs,以3~5个碳原子的羟基脂肪酸为单体);另一类为中长链羟基烷酸聚酯(MCL-PHAs,以6~14个碳原子的羟基脂肪酸为单体)<sup>[1]</sup>。通常,SCL-PHAs同型聚合体的硬度较高,但韧性不足;MCL-PHAs同型聚合体的韧性较好,但硬度较差;而短链单体与中长链单体的共聚体,可依其单体比例改变聚合体的物理性质与加工

\* 国家自然科学基金项目(No.50573045)

\*\* 通讯作者 Tel 0351-7017151 E-mail liangqi@sxu.edu.cn

收稿日期:2007-01-22,修回日期:2007-04-13

性能,使其应用范围更加广泛。因此对于羟基烷酸异型聚合体的研究越来越多地受到关注。

本文研究了 *Sinorhizobium fredii* 合成羟基丁酸和羟基己酸共聚体 (HB-HH) 的培养基成分、培养条件及调控技术,并在此基础上进行了两阶段补料分批发酵试验,获得了 (HB-HH) 工业化放大生产的必要技术参数。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种

费氏中华根瘤菌 *Sinorhizobium fredii* (CCTCC No. AB 92049) 中国典型培养物保藏中心提供。

### 1.2 培养基

种子培养基:黄豆芽 200g,葡萄糖 20g(称新鲜豆芽 200g,放入烧杯中,加水 1000mL,煮沸约 30min,用纱布过滤。用水补足原量,再加入葡萄糖 20g,煮

沸溶化,  $1 \times 10^5$  Pa 灭菌 20min。优化后的发酵培养基见本文结果。

### 1.3 培养基及培养条件的优化

选用  $L_{27}(3^3)$  正交设计表,分两次进行培养基配方及培养条件的摇瓶正交试验,其表头设计见表 1、表 2。以生物量为检测指标。摇床转速为 180r/min,其他条件参见表 1、2 所示。

表 1 第一次  $L_{27}(3^3)$  正交试验水平因子设计表

水平	因子					
	A 碳源 (g/L)	B 氮源 (g/L)	C 生长因子 (g/L)	D 接种量 (%)	E pH	F 温度(°C)
1	葡萄糖 30	蛋白胨 4	豆芽 200	1	6.5	28
2	蔗糖 30	硫酸铵 3	酵母粉 1.5	5	7.0	30
3	淀粉 30	牛肉膏 4	空白	10	7.5	32

表 2 第二次  $L_{27}(3^3)$  正交试验水平因子设计表

水平	因子						
	A 葡萄糖 (g/L)	B 硫酸铵 (g/L)	C 豆芽 (g/L)	D 氯化钙 (g/L)	E 培养时间 (h)	F 磷酸盐 (g/L)	G 硫酸镁 (g/L)
1	8	0.5	100	0	12	0.80 + 1.50	0.4
2	20	1	150	0.1	16	0.61 + 0.39	0.6
3	30	3	200	0.2	20	0.39 + 0.87	0.8

### 1.4 癸酸盐的配制

称取癸酸盐 86.13g,溶于蒸馏水,以 6mol/L 的氢氧化钠溶液调节 pH 值至 7.0,最终定容为 500mL,配制成 0.5mol/L 癸酸盐溶液,灭菌备用。

### 1.5 (HB-HH) 合成的调控条件优化

**1.5.1 癸酸盐浓度范围的选择试验** 将进入对数生长期的种子液接种到发酵培养瓶中,当生长至菌体浓度达到  $OD_{600}$  为 4,然后分别加入不同量的无菌癸酸盐溶液,使培养基中癸酸盐浓度分别达到 0 mmol/L,1 mmol/L,2 mmol/L,3 mmol/L,4 mmol/L,5 mmol/L,6 mmol/L,10mmol/L,每个浓度梯度做 3 个重复,在 1.3 所得优化条件下摇床培养 25h,离心得菌体,烘干称重并检测其 PHAs 组分。

**1.5.2 癸酸盐浓度及调控时间选择的正交试验** 当发酵摇瓶中菌体浓度  $OD_{600}$  达到 4 时,以癸酸盐的浓度和调控时限为因子,分别以癸酸盐浓度为 4mmol/L,6mmol/L,8mmol/L,10mmol/L 和调控培养时间为 5h,10h,15h,20h 为水平,以所得干细胞中 P

(HB-HH) 的 HH 单体含量为检验指标,采用  $L_{16}(4^5)$  正交表(表 3)进行正交试验。结果经方差分析,确定最适癸酸盐浓度和调控时间。

表 3  $L_{16}(4^5)$  正交试验水平因子设计表

水平	因子	
	癸酸盐浓度 (mmol/L)	调控时间 (h)
1	4	5
2	6	10
3	8	15
4	10	20

### 1.6 分批发酵

采用 5L 发酵罐(New Brunswick Scientific. Co., Inc. Edison, N. J., USA) 装入 3.5L 发酵培养基,磷酸盐(包括  $KH_2PO_4 \cdot 12H_2O$  和  $K_2HPO_4$ ) 经单独灭菌后加入,接种体积分数为 5%,利用 6mol/L NaOH 和 2mol/L HCl 调节 pH 恒定为 7.0,培养温度 30°C,搅

拌速度 200r/min ~ 800r/min 使溶氧饱和度保持在 15% 以上, 通气量 3.5L/min。发酵过程中定时取样测定生物量、葡萄糖、硫酸铵含量。

### 1.7 两阶段补料分批发酵

采用 10L 自动控制发酵罐(镇江东方生物工程有限公司制造)进行两阶段补料分批发酵放大试验, 发酵罐装液量为 7L, 通气量为 7L/min, 其它参数同分批发酵。第 1 阶段为菌体培养阶段, 在此发酵阶段, 定时取样测定生物量、葡萄糖、硫酸铵含量, 适时流加葡萄糖或硫酸铵溶液保持发酵液中葡萄糖含量在 10g/L 以上, 硫酸铵含量保持在 0.3g/L ~ 1.0g/L 之间, 以保证该阶段积累大量菌体。第 2 阶段当生物量达到 32g 干细胞/L 时, 通过流加癸酸盐溶液调节 P(HB-HH) 的合成。采用两步加盐法, 首先一次性加入一定量的癸酸盐使发酵液中癸酸盐的浓度达到 4mmol/L, 然后在 1h 内将一定量的癸酸盐溶液流加入发酵液, 使其中癸酸盐终浓度达到 8mmol/L。此阶段中调节发酵液 pH 在 7.2, 在不影响菌体生长的情况下使癸酸盐更易被利用。

### 1.8 检测方法

细胞干重测定方法见文献 [3], 发酵液中葡萄糖采用 3,5-二硝基水杨酸法测定<sup>[4]</sup>, 铵离子采用改良靛酚兰比色法测定<sup>[5]</sup>。PHAs 及其单体含量的测定采用气相色谱法<sup>[6]</sup>, 其结构以核磁共振测定<sup>[7]</sup>, 分子量采用粘度计法<sup>[8]</sup>。

## 2 结果

### 2.1 培养基成分及培养条件的优化

经 2 次正交试验, 我们得到了最佳的培养基配方及培养条件(表 4, 表 5), 最佳培养基配方为 (g/L): 葡萄糖, 30g/L; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 3g/L; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O, 0.61g/L; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.39g/L; CaCl<sub>2</sub>, 0.1g/L; 酵母粉, 1g/L; 微量元素 (H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 5g/L; Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>, 5g/L), 4mL。最佳培养条件为 29℃, pH7.0, 接种量 10%。

### 2.2 癸酸盐浓度范围选择试验

当加入发酵液的癸酸盐浓度在 4mmol/L ~ 10mmol/L 之间经 20h 培养后得到的菌体中含有一种新的 PHAs, 由气相色谱图(图 1)可以看出在 HB 单体特征峰和内标峰之间出现了 1 个新的峰, 这说明 *S. fredii* 很可能合成了 1 种含有 HB 及新单体的

PHA。经核磁共振确定了该 PHA 的结构为 P(3-HB-co-3-HH)(图 2)。

表 4 培养基配方及培养条件的方差分析

方差来源	自由度	平方和	均方	F 值	显著性
碳源	2	4.67	2.34	11.85	**
氮源	2	4.75	2.38	12.06	**
碳源 × 氮源	4	6.05	1.51	7.68	**
生长因子	2	23.33	11.67	59.21	***
接种量	2	5.28	1.32	6.70	**
pH	2	19.08	4.77	24.21	**
温度	2	5.44	2.72	13.81	**
误差	10	5.31	0.19		

注: \*\* P < 0.01

表 5 培养基各组分的含量与培养条件的方差分析

方差来源	自由度	平方和	均方	F 值	显著性
葡萄糖	2	0.66	1.25	5.42	**
硫酸铵	2	0.76	1.19	60.6	**
葡萄糖 × 硫酸铵	4	1.05	0.75	3.29	**
豆芽	2	10.33	6.73	24.33	***
葡萄糖 × 豆芽	4	2.32	0.62	3.40	**
硫酸铵 × 豆芽	4	8.08	2.33	11.21	**
氯化钙	2	2.32	1.31	6.76	**
磷酸盐	2	120.34	50.47	341.16	***
硫酸镁	2	1.12	0.54	2.30	**
误差	2	2.31	0.19		

注: \*\* P < 0.01

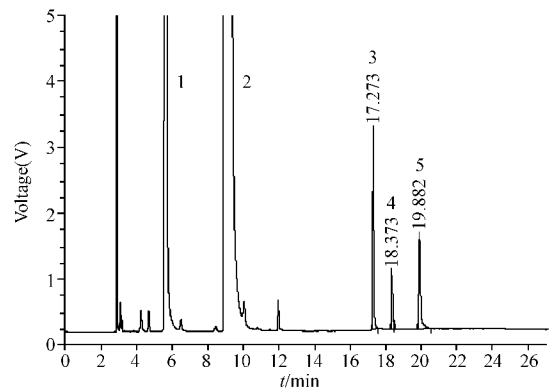


图 1 P(HB-HH) 的 GC 图谱

1 甲醇特征峰 2 氯仿特征峰 3 HB 单体特征峰 4 HH 单体特征峰 5 苯甲酸特征峰(内标峰)

### 2.3 癸酸盐调控条件的优化

正交试验的结果表明, 癸酸盐浓度对于 P(HB-HH) 合成的影响是显著的(见表 5), 考虑到节省成

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

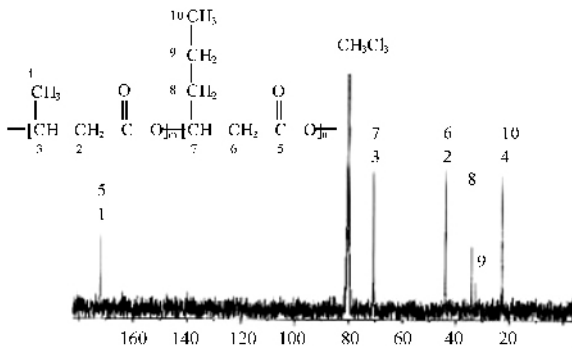


图2 经癸酸盐调控的 PHAs 产品在 75 MHz 的 <sup>13</sup>C NMR 图谱

本等因素,采用 8mmol/L,调控 5h 作为 *S. fredii* 合成 P(HB-HH) 的条件。

表 6 癸酸盐的浓度与调控时间对 HH 单体含量影响的方差分析

方差来源	自由度	平方和	均方	F 值	显著性
癸酸盐的浓度(A)	3	1.09	0.36	10.11	**
调控时间(B)	3	0.02	0.01	0.21	
误差	12	0.44	0.04		

注: \*\*  $P < 0.01$

### 2.4 分批发酵

分批发酵进行了 50h, *S. fredii* 以葡萄糖为碳源合成 PHB 的细胞生长曲线、底物消耗、产物合成曲线见图 3。由实验结果可以得知该菌细胞生长的延滞期约为 10h 左右。在对数期,细胞的生长速率为 0.84g/L·h,底物葡萄糖、硫酸铵的消耗速率分别为 1.44 g/L·h、0.038g/L·h,产物 PHB 的合成速率为 0.75g/L·h。在稳定期,细胞生长趋于平衡,但产物 PHB 仍继续合成,最高合成速率达 0.8g/L·h,最高产量可达 5.45g/L。由于碳、氮源营养物质的缺乏,从 45h 开始发酵过程进入衰亡期,细胞浓度与细胞中的 PHB 含量均有所下降。最终细胞相对于葡萄糖的得率系数为 0.51(g/g)。这些结果与数据为两阶段补料分批发酵提供了相应的发酵参数。

### 2.5 两阶段补料分批发酵

在分批发酵的基础上,进行了合成 P(HB-HH) 的两阶段补料分批发酵。在第一阶段,通过补充营养物质,延长对数期,使细胞达到高密度 40h 左右细胞处于对数生长末期,加入癸酸盐进行代谢调控,1h 后开始有 P(HB-HH) 合成,其 HH 单体含量呈上升趋势,并在 46h 达到最大为 2.6g/L,之后开始缓慢下降(图 4)。经过 55h 的发酵,将发酵液离心烘干,

得干细胞 47.01g/L,发酵过程中底物消耗及细胞生长曲线见图 5。将干细胞以氯仿萃取乙醇沉淀法提取得到 P(HB-HH) 17.55g/L,其中 HH 单体含量占共聚体含量的 20.6%,HB 单体 79.4%,经粘度计测定其分子量约为  $1.4 \times 10^5$  D。

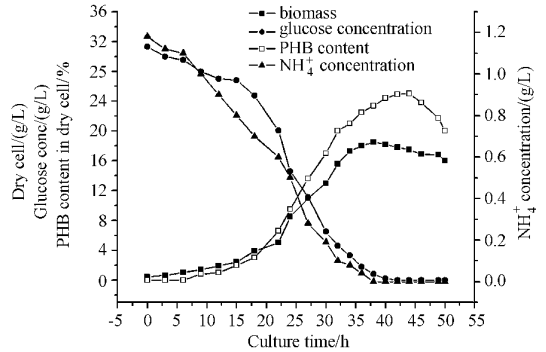


图 3 分批发酵

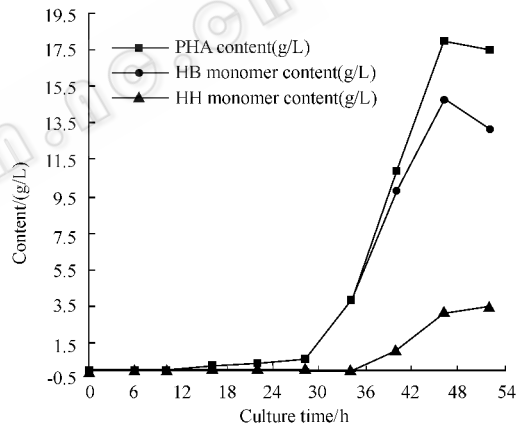


图 4 两阶段补料分批发酵过程中 PHAs 含量及单体变化

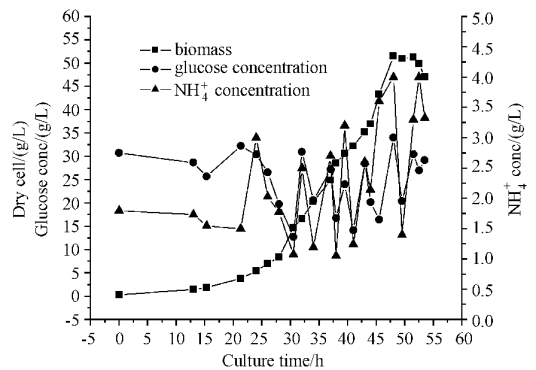


图 5 两阶段补料分批发酵

## 3 讨论

*S. fredii* 是 1 株快生型根瘤菌,以往的研究主要集中在固氮方面,而以其作为生产菌株发酵生产

PHAs,尚未见到相关报道。我们在此前的研究中发现,以葡萄糖作为唯一碳源时,该菌株合成聚羟基丁酸(PHB),而以葡萄糖和癸酸盐作为混合碳源时,则可以合成P(HB-HH)共聚体。本文初步优化了培养基配方、培养条件及加盐调控条件后,P(HB-HH)的产量可以达到17.55g/L,达到该领域的先进水平。倘若进一步提高发酵液的细胞密度,其产量还会有较大提高<sup>[9]</sup>。

在癸酸盐调控过程中采用了两步加盐法,首先加入4mmol/L癸酸盐促进菌体开始合成P(HB-HH),其次通过蠕动泵再将另外4mmol/L癸酸盐缓慢流加到发酵液中。2步加盐法降低了由于一次性加入大量癸酸盐对菌体造成的毒害作用,同时通过第2步缓慢流加及调节发酵液pH值还可以避免大量泡沫的产生,提高了癸酸盐的利用率。

此外根据文献报道,多数PHAs产生菌在某些营养(N、P等)限制的情况下会大量积累PHAs<sup>[10]</sup>,而*S. fredii*能够在氮源及磷酸盐相对充足的情况下大

量合成P(HB-HH)。这一生理学特性可以延长该菌的存活时间,从而能够合成更多的PHAs产品,对工业化生产管理颇为有利。

### 参考文献

- [1] Lee S Y, Chang H N. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 1995, **52**(1): 27 ~ 58.
- [2] Ramsay B A, Ramsay J A, Cooper D G, *et al.* *Appl Environ Microbiol*, 1989, **55**: 584 ~ 589.
- [3] Laura De, Long Forst. *The Chemical Educator*, 2004, **9**: 4.
- [4] Chaney A L, Marbach E P. *Clin Chem*, 1962, **8**: 130 ~ 132.
- [5] Braunegg G, Sonnenleitner B, Lafferty R M, *et al.* *Applied and Environmental Microbiology*, 1978, **6**: 29 ~ 37.
- [6] Page W J. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1989, **31**: 329 ~ 333.
- [7] Lemos P C, Viana C, Salgueiro E N, *et al.* *Enzyme and Microbial Technology*, 1998, **22**: 662 ~ 671.
- [8] 张 谨, 吴 琼, 张 广, 等. *食品与生物技术*, 2002, **21**(1): 76 ~ 79.
- [9] Bertrand J L, Ramsay B A, Ramsay J A, *et al.* *Applied and Environmental Microbiology*, 1990, **56**: 3138 ~ 3138.