

真养产碱杆菌突变株 65-7 产羟基丁酸 与羟基戊酸共聚物的研究

翁维琦 易祖华 黄和容 陈琦

(中国科学院微生物研究所, 北京 100080)

摘要 研究了真养产碱杆菌突变株 65-7, 以葡萄糖为主原料, 添加丙酸或戊酸, 采用二步发酵积累共聚物聚 β -羟基丁酸- β -羟基戊酸 (PHBV)。摇瓶总发酵时间为 50h, 细胞干重达 7-11g/L, 共聚物含量占细胞干重的 70% 以上, 其中 β -羟基戊酸 (3HV) 含量占 PHBV 的 10-72%, 主要取决于不同碳源的组成, 丙酸和戊酸对 HV 的转化率分别为 0.41-0.63gHV/g 丙酸和 0.40-0.74gHV/g 戊酸, 制得的 PHBV 产品纯度 99% 以上, 分子量 6.9×10^5 。

关键词 PHBV, 生物塑料, 突变株 65-7

由化学合成塑料引起的环境污染已日趋严重, 为保护人类生存环境, 增强健康成为全球性关注的热点。其中用微生物生产的生物降解塑料——聚羟基烷酸 (PHA) 在这类研究中尤为突出。PHA 中最基本的均聚物——聚 β -羟基丁酸 (PHB) 和共聚物——聚 β -羟基丁酸-Co- β -羟基戊酸 [P(3HB-Co-3HV), PHBV] 是具有生物降解性和生物相容性的一种无毒热塑性塑料, 而 PHBV 又较 PHB 具有更好的机械性能。目前已成为开发聚羟基烷酸类生物塑料的研究重点^[1,2]。目前世界上唯一投入工业化生产的英国帝国化学公司 (ICI), 利用真养产碱杆菌, 以丙酸和葡萄糖为碳源, 生产的 PHBV 产品 “Biopol”, HV 含量达 5-30%^[2], PHBV 占细胞干重的 70-80%。有关 PHBV 的研究国内至今少见报道。

一些细菌在环境中存有丙酸或戊酸的条件, 能在细胞内积累 PHBV^[3], 基于真养产碱杆菌具备合成速度快、产量高、产物分子量大等优点^[3,4], 本组选育的真养产碱杆菌利用葡萄糖的突变株 65-7, 是一株高效利用葡萄糖产 PHB 的优良菌株^[5,6], 故以此菌开展积累 PHBV 的研究, 现报道如下。

1 材料与方法

1.1 菌种

真养产碱杆菌 (*Alcaligenes eutrophus*) 利用葡萄糖突变株 65-7, 本课题组选育^[5]。

1.2 培养基

前期生长培养基(%): 葡萄糖 1.5, (NH₄)₂SO₄ 0.2, KH₂PO₄ 0.15, Na₂HPO₄ · 12H₂O 0.9, MgSO₄ · 7H₂O 0.02, NaHCO₃ 0.05, CaCl₂ · 2H₂O 0.002, 柠檬酸铁铵 0.0005, 微量元素液 0.1ml, 酵母膏 1.0, pH7.0, 115℃ 灭菌 30min, 装液量 50ml/500ml 三角瓶。

后期积累培养基(%): 葡萄糖 2.0, (NH₄)₂SO₄ 0.037, 其它无机盐同前期生长培养基, pH7.0, 115℃ 灭菌 30min, 装液量 20ml/250ml 三角瓶。丙酸、戊酸依试验所需加入。

1.3 培养方法

分二步进行, 第一步: 以斜面种子接种于 50ml 前期生长培养基内, 30℃, 振荡培养 20h, 在无菌条件下离心收集菌体, 无菌水洗涤一次, 再制成细胞悬液。第二步: 细胞悬液以 5% 接

1995-06-20 收稿

种量转接到 20ml 后期积累培养基中,继续培养 30h 左右,是为产物积累阶段。

1.4 分析方法

菌体细胞生长量: a. 细胞浓度: 发酵液经稀释,于波长 620nm 测定 OD 值。 b. 细胞干重: 发酵液离心,水洗一次,湿细胞置 80℃ 干燥至恒重后称量。

还原糖测定: 3,5-二硝基水杨酸法。

PHBV 测定: 以苯甲酸作内标,气相色谱法定量^[7]。

PHBV 分子量测定: 凝胶渗透色谱(GPC)法。

1.5 提取方法

发酵终了离心收集细胞,制成丙酮干粉后

用氯仿回流提取,分离细胞碎片后将氯仿提取液加入甲醇水溶液中使 PHBV 析出,为白色固形物,过滤并洗净后烘干^[8,9]。该产品经气相色谱分析与 Sigma 公司 PHBV 标准品相当,纯度 >99%,提取收率 >90%,分子量 6.9×10^5 。

2 结果

2.1 不同辅助碳源与 PHBV 积累的相关性

在后期积累培养基中,分别加入丙酸、丙醇、戊酸、正戊醇和异戊醇作为辅助碳源,发酵 27h,结果列于表 1,发现添加丙酸、戊酸和正戊醇均能积累 PHBV,而添加丙醇和异戊醇则不积累 PHBV 而仅积累 PHB。同时看到,正戊醇对细胞生长有较强的抑制作用。故以后实验

表 1 不同辅助碳源与产物的积累

辅助碳源	碳源浓度 (%)	积累产物	细胞干重 (g/L)	对照组细胞干重 (g/L)	HV 含量 (%PHA)	菌体生长相对抑制量* (%)
丙酸	0.22	PHBV	9.30	10.7	20.1	8.4
丙醇	0.10	PHB	10.9	10.7	0	0
戊酸	0.25	PHBV	7.90	8.95	24.5	11.7
正戊醇	0.16	PHBV	6.10	8.00	37.3	23.8
	0.32	PHEV	4.27	8.00	39.3	46.6
异戊醇	0.10	PHB	10.90	10.7	0	0

* 菌体生长相对抑制量 = (相应对照组细胞干重 - 实验组细胞干重) / 相应对照组细胞干重

选择丙酸和戊酸为辅助碳源进行研究。

2.2 pH 对 PHBV 积累的影响

以葡萄糖和丙酸(或戊酸)为混合碳源,并在后期积累过程中控制 pH 分别为 5.0、6.0、6.5、7.0 和 8.0,发酵 27h,测定细胞干重和产物含量。结果如图 1(A、B)。由图看出,无论是丙酸还是戊酸为辅助碳源,控制 pH 在 6.5—7.5 范围内 PHBV 积累量最大,尤以 pH7.0 最为适宜,偏酸性条件严重抑制 PHBV 积累。

2.3 丙酸为辅助碳源的 PHBV 积累

2.3.1 丙酸浓度与细胞量及 PHBV 含量的关系:

在后期积累培养基中,分别加入不同量的丙酸,发酵过程维持 pH7.0,25h 发酵,观察不同浓度的丙酸对积累 PHBV 的影响,结果见表 2。随着丙酸浓度的增加,PHBV 含量亦增,尤

其是 HV 含量明显升高,说明培养液中的丙酸浓度明显影响 PHBV 中 HV 的含量,同时看到高浓度丙酸有毒害细胞生长的作用,当丙酸浓度超过 0.4%,相对抑制量约 20%。

2.3.2 葡萄糖浓度对 PHBV 积累的影响: 当丙酸浓度一定(0.185%)时,后期积累培养基中葡萄糖浓度分别为 0.5、1.0、2.0 和 3.0%,30h 后,观察不同浓度葡萄糖对积累 PHBV 的影响,结果如图 2 所示。由图 2 看出,随着葡萄糖浓度增加,细胞干重随之升高,PHBV 含量增加,由于供给丙酸为一定量,此时相对丙酸浓度降低使 HV 含量下降。另外,当葡萄糖浓度为 3.0%,发酵 6h,残糖仍高于 2.0%,测得样品中 PHBV 的含量却低于其它初糖小于 2.0% 的试样,约低 22.8%(此数据未列出)。由此说明,总糖浓度较高,虽有利于 PHBV 积累及细胞量的

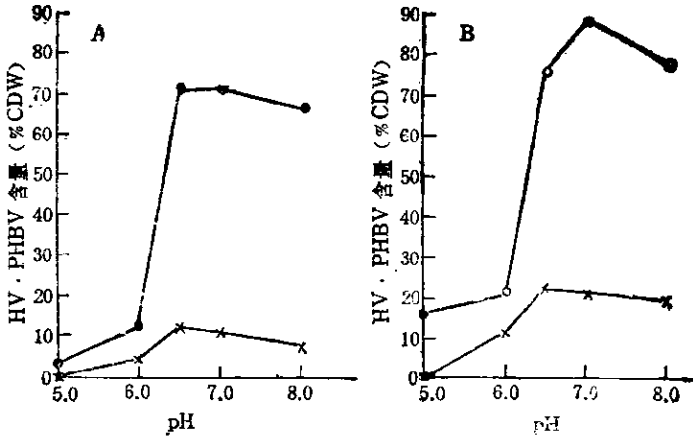


图1 pH对PHBV积累的影响

葡萄糖 2.0%, A. 丙酸: 0.185% B. 戊酸: 0.255%

●: PHBV 含量 (%CDW) ×: HV 含量 (%CDW)

表2 丙酸浓度与细胞量及 PHBV 含量关系

葡萄糖浓度 (%)	丙酸浓度 (%)	细胞干重 ^a (g/L)	PHBV 含量 ^b (%CDW)	HV 含量 ^c (%HA)	丙酸转化率 (gHV/g 丙酸)	细胞生长相对抑制量 (%)
2.0	0	10.7	63.5	0	/	对照
2.0	0.11	10.6	62.3	10.4	0.63	0.9
2.0	0.22	9.80	66.7	20.1	0.59	8.4
2.0	0.37	8.80	68.3	25.0	0.41	17.8

a. 初始细胞干重 1.75g/L

b. PHBV 含量指占细胞干重的百分比,以 %CDW 表示(以下均同)

c. HV 含量指占 PHBV 的重量百分比,以 %PHA 表示(以下均同)

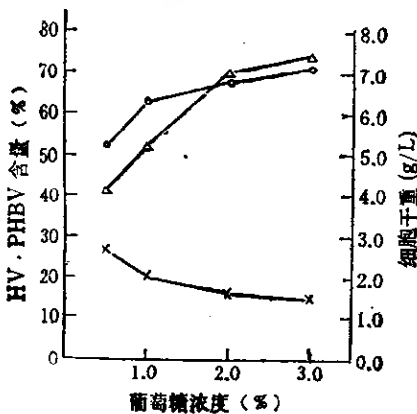


图2 葡萄糖浓度与PHBV积累

○: PHBV 含量 (%CDW), ×: HV 含量 (%PHA),
△: 细胞干重 (g/L)

增长,但应控制葡萄糖浓度为1.0—1.5%,通过

流加方式来提高总糖浓度,此结果与我们以前报道的PHE积累一致^[6]。

2.4 戊酸浓度与细胞量及 PHBV 含量关系

在后期积累培养基中,分别加入不同量的戊酸,发酵过程维持pH7.0,发酵30h,研究戊酸浓度与细胞量及PHBV含量的关系,结果如表3。比较表3与表2发现,二者基本一致,即随着戊酸浓度增加,HV含量明显提高,PHBV含量也随之提高,但同时戊酸对细胞生长也有抑制作用。当戊酸浓度为0.5%时,抑制量约21%,戊酸对HV的转化率与戊酸浓度成反比,戊酸的转化率较丙酸略高。

2.5 丙酸与戊酸积累 PHBV 的比较

2.5.1 丙酸(或戊酸)为唯一碳源的 PHBV 积累:

在后期积累培养基中,分别以丙酸和戊酸

表3 戊酸浓度与细胞量及 PHBV 含量关系

葡萄糖浓度 (%)	戊酸浓度 (%)	细胞干重* (g/L)	PHBV 含量 (%CDW)	HV 含量 (%PHA)	戊酸转化率 (gHV/g 戊酸)	细胞生长相对抑制量 (%)
2.0	0	8.95	70.9	0	/	对照
2.0	0.102	9.15	72.8	11.3	0.74	0
2.0	0.255	7.90	82.5	24.5	0.63	11.7
2.0	0.51	7.05	81.5	35.1	0.40	21.2

* 初始细胞干重 0.9g/L

表4 丙酸、戊酸分别为唯一碳源的 PHBV 积累

唯一碳源	每摇瓶中加入量 (mmol)	细胞干重增值 (g/L)	PHBV 含量 (%CDW)	HV 含量 (%PHA)	PHBV 转化率 (gPHBV/g 碳源)	HV 转化率 (gHV/g 碳源)
丙酸	1.0	2.40	55.2	47.5	0.36	0.23
戊酸	1.0	4.00	92.9	72.2	0.73	0.68

作为唯一碳源进行 PHBV 积累试验。培养 22h 后分别补加丙酸和戊酸一次，总培养时间为 46h，结果如表 4。以戊酸为唯一碳源，能得到

HV 含量很高 (72.2%PHA) 的共聚物，而且 PHBV 含量、细胞干重及转化率均高于丙酸。

2.5.2 PHBV 积累曲线：在后期积累培养基中，分别加入丙酸和戊酸作为辅助碳源，发酵过程维持 pH7.0，结果如图 3。由图中看出，无论是丙酸还是戊酸，在 6h 内，HV 含量迅速增加，而 6h 后，细胞干重及 PHBV 的总量虽继续增加，但其中 HV 含量则急剧下降，这说明随着细胞量的增加，新生细胞由于丙酸（或戊酸）的不足而主要以利用葡萄糖积累 PHB 为主。另外，比较图 3A 与 B，以戊酸为辅助碳源，HV 含量较丙酸约高一倍，与表 4 结果一致。

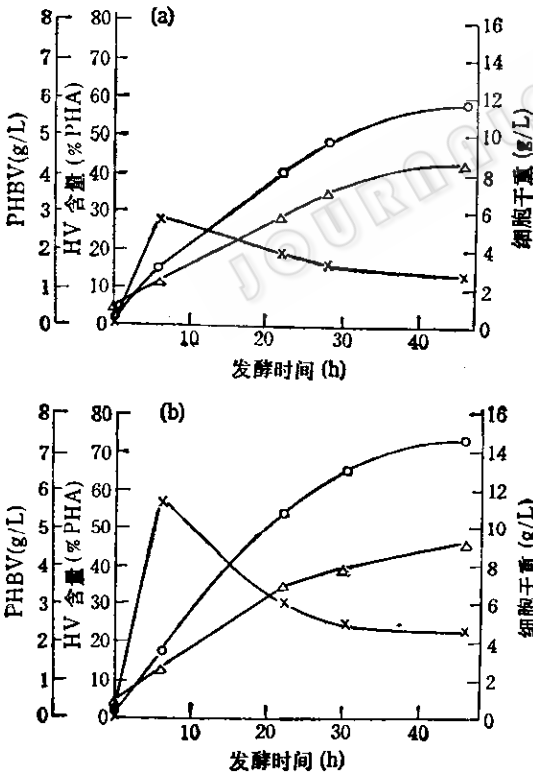


图3 PHBV 积累曲线

A. 丙酸(1.85%)为辅助碳源, B. 戊酸(2.55%)为辅助碳源
 ○: PHBV 重量(g/L), ×: HV 含量 (%PHA),
 △: 细胞干重 (g/L)

3 讨论

a. 我们的试验证明真养产碱杆菌突变株 65-7，以葡萄糖为碳源，加少量丙酸或戊酸（或正戊醇）为辅助碳源，能在细胞内合成 PHBV。摇瓶发酵 50h 左右，细胞干重达 7g/L 以上，最高达 11g/L，PHBV 占细胞干重的 70% 以上。其 HV 含量占 PHA 的 10—72%，主要与辅助碳源的种类和辅助碳源与葡萄糖的比例有关。丙酸和戊酸对 HV 的转化率分别为 0.41—0.62 gHV/g 丙酸和 0.40—0.74gHV/g 戊酸。在发酵过程中，流加丙酸以提高 HV 含量，为避免丙酸对生长的抑制，应采取低浓度（不超过

0.1—0.2% 分次流加的方式进行。

b. 分别以丙酸和戊酸为唯一碳源,产生的 PHBV 中 HV 含量分别占 47.5% 和 72.2%, 这表明通过适当控制积累条件可制取不同 HV 含量的 PHBV, 达到获得具有不同物理性质及机械性能的共聚物的目的。

c. 以葡萄糖进行分批补料培养提高总糖浓度可以增加细胞量及 PHB 含量^[6]。为积累 PHBV 亦可在补糖的同时考虑丙酸(或戊酸)的分批补料,即提高葡萄糖中丙酸(或戊酸)的相对浓度,由此我们初步在 21 自控罐(N.B.S)上进行了以丙酸为辅助碳源的 PHBV 积累实验,发酵 65h 左右,细胞干重达 35g/L, PHBV 含量为 60% CDW 以上,其中 HV 占 PHBV 的 6.2%, 并通过提取获得成品。此初步结果为开发这类产品打下了良好的基础。

致谢: 本研究课题得到万县飞亚企业公司的经

费资助,工作中得到王丽、王秀岭二位同志的帮助,特此一并致谢。

参 考 文 献

- [1] Doi Y. *Microbial Polyesters*. VCH, New York, 1990.
- [2] Byrom D. *FEMS Microbiology Review*, 1992, **103**: 247—250.
- [3] Kim J H, Kim B G, Choi C Y. *Biotechnol Lett*, 1992, **14**(10): 903—906.
- [4] Taidi B, Anderson J, Dawes A, *et al.* *Appl Microbiol Biotechnol*, 1994, **40**: 786—790.
- [5] 陈琦,易祖华,黄和容. *微生物学通报*, 1994, **21**(6): 333—335.
- [6] 易祖华,黄和容,翁维琦,陈琦. *微生物学通报*, 1995, **22**(1): 29—31.
- [7] BrauneGG G, Sonnleitner B, Lafferty R M. *European J Appl Microbiol Biotechnol*, 1978, **6**: 29—37.
- [8] Brandl H, Gross R A, Lenz R W, *et al.* *Arch Microbiol*, 1991, **155**: 337—340.
- [9] Steinbüchel A, Pieper U. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1992, **37**: 1—6.

STUDIES ON COPOLYESTER CONSISTING OF 3-HYDROXYBUTYRATE AND 3-HYDROXYVALERATE BY THE MUTANT 65-7 OF *ALCALIGENES EXTROPHUS*

Weng Weiqi Yi Zuhua Huang Herong Chen Qi

(*Institute of Microbiology Academia Sinica, Beijing 100080*)

Abstract By two-stage fermentation, the synthesis of the copolymer of 3-hydroxybutyrate (3HB) and 3-hydroxyvalerate (3HV), PHBV, by the mutant 65-7 of *Alcaligenes extrophus* from glucose and propionic (or pentanoic) acid was studied. For 50 hours, the total cell concentration in shake-flask was 7—10 g/L, and the PHBV content reached up to 70% of the dry cell weight. The 3HV fraction in the copolymers was 10—74%, depending on the composition of carbon substrates supplied. The conversion from propionic and pentanoic acid to 3HV was 0.41—0.63 and 0.40—0.74 wt/wt, respectively. The molecular weight of PHBV isolated from the biomass was 6.9×10^5 with purity more than 99%.

Key words PHBV, Biopolymer, Mutant 65-7