

真养产碱杆菌二级连续培养系统中稀释率 对聚 β -羟基丁酸合成的影响

堵国成 陈 坚 陈银广 高海军 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 在研究真养产碱杆菌 WSH3 一级连续培养动力学的基础上,采用二级连续培养系统对不同稀释率下聚 β -羟基丁酸的生产进行了研究。结果表明:在一级连续培养系统中,当稀释率为 0.21h^{-1} 时,细胞干重最大值达 27.1g/L ;二级培养系统中,稀释率为 0.14h^{-1} 时细胞干重最大值为 47.6g/L ;在稀释率为 0.12h^{-1} 时,PHB 的生产强度达到最大值为 $2.50\text{g}/(\text{L}\cdot\text{h})$,但胞内 PHB 含量仅为 47.6% ;在稀释率为 0.075h^{-1} 时,产物对基质的转化率达到最大值为 0.38g/g ,此时 PHB 的生产强度达 $2.14\text{g}/(\text{L}\cdot\text{h})$ 和胞内 PHB 含量 $\pm 72.1\%$;随着细胞比生长速率的增长,细胞中 PHB 含量和单位菌体合成 PHB 的量不断下降。

关键词 真养产碱杆菌,聚 β -羟基丁酸,二级连续培养,稀释率

学科分类号 Q939.97

聚 β -羟基丁酸(PHB)是许多微生物在生长不平衡的条件下贮存于胞内的一种大分子聚合物。由于 PHB 除具有与聚丙烯相类似的机械可加工性能外,更重要的是还具有生物可降解性和生物可相容性^[1],因而将其开发为一种具有多种用途的生物可降解材料已引起了广泛的研究和重视。到目前为止,已有许多关于 PHB 产生的酶学、代谢机理^[2,3]及流加发酵的研究^[4],而有关以真养产碱杆菌(*Alcaligenes eutrophus*)为出发菌株采用二级连续培养技术进行 PHB 生产的动力学研究报道却很少。

本研究室在研究了以不同的菌种和基质进行生物可降解塑料生产的基础上^[5,6],为了更好地了解 PHB 产生菌(*Alcaligenes eutrophus*)的生产行为和生产性能,进一步挖掘其生产潜力,本文在研究了其单级连续培养动力学的基础上,采用二级连续培养法对不同稀释率下 PHB 的生产进行了研究。

1 材料和方法

1.1 菌种

真养产碱杆菌 *A. eutrophus* WSH3,从 *A. eutrophus* DSM545 改良获得。

1.2 培养基

1.2.1 斜面培养基、无机元素液和种子培养基同文献[6]。

1.2.2 发酵培养基:无机元素液中添加 $0.2\% \sim 0.3\%$ 硫酸铵、 1% 葡萄糖, $\text{pH}7.0$ 。

国家自然科学基金资助项目 基金号 29677011。

收稿日期:1997-02-28,修回日期:1997-08-25。

1.2.3 一级培养罐用流加液：无机元素液中添加 5% 的葡萄糖。

1.2.4 二级培养罐用流加液：50% 的葡萄糖液。

1.3 培养方法和实验装置

1.3.1 种子培养：接 2 环生长良好的斜面培养物至装有 60ml 种子培养基的 500ml 三角瓶中，摇床转速为 180r/min，温度 30℃，培养 24h。

1.3.2 一级连续培养：按 10% 的种量接入一级罐中，初始培养基体积为 1.2L，通气速率为 1.4~1.8L/min，转速为 600~1000r/min，维持溶氧百分比浓度在 20% 以上，温度控制 $30 \pm 0.5^\circ\text{C}$ ，pH 值通过自动流加 28% 的氨水溶液控制在 7.0 ± 0.1 。恒化操作首先经过分批培养阶段，当葡萄糖浓度达到限制条件时，开始流加培养液，以恒流泵精确地控制流量，稀释率大小按实验要求而定。

1.3.3 二级连续培养：一级培养罐中的发酵液通过恒流泵流入二级培养罐中，并向其中流加 50% 的葡萄糖液，维持二级罐中一定的葡萄糖浓度，通气速率为 1.4~1.8L/min，转速为 800~1000r/min，保持溶氧百分比浓度在 20% 以上，温度控制 $30 \pm 0.5^\circ\text{C}$ ，pH 值通过自动流加 3 mol/L 的 NaOH 的溶液控制在 7.0 ± 0.1 。控制适当的罐体积，以维持一定的稀释率大小。

二级连续培养系统的实验装置如图 1 所示，采用瑞士 INFOR 2 L 台式发酵罐。

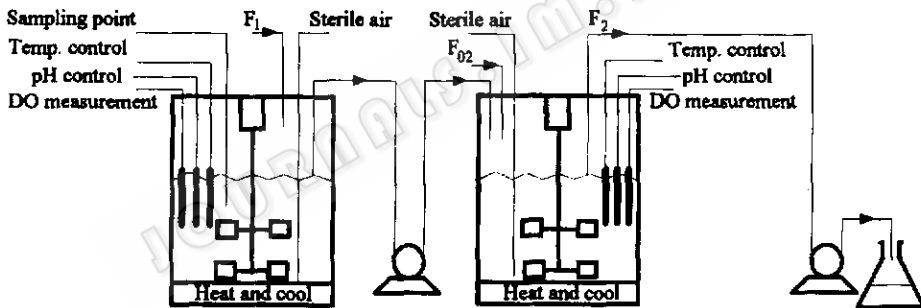


图 1 二级连续培养系统的实验装置

Fig.1 Experimental set-up of two-stage continuous culture system

F_1, F_{02} : 5% glucose, F_2 : outlet

1.4 分析方法

菌体细胞浓度测定方法为取发酵液 5ml，3000r/min 离心 10min，水洗 2 次，80℃ 干燥 24h 后称重。PHB 的测定采用气相色谱法定量^[7]。 NH_4^+ 浓度的测定用修正的 Berthelot 反应法^[8]。葡萄糖含量的测定采用 3,5-二硝基水杨酸法。

2 结果与讨论

2.1 一级培养罐中细胞干重、PHB 含量和葡萄糖浓度与稀释率的关系

从图 2 可以看出，在稀释率(D)为 0.05h^{-1} 至 0.21h^{-1} 的范围内，一级罐中的细胞干

重(CDW)随着 D 的增大而增加,CDW 从 D 为 0.05h^{-1} 时的 21.9g/L 增至 D 为 0.21h^{-1} 时的 27.1g/L ; D 大于 0.21h^{-1} 以后,CDW 随着 D 的增大而迅速下降,当 D 为 0.40h^{-1} 时,细胞干重仅为 8.8g/L ,比最大值下降了 67.5% ,另外,从图 2 中还可以看出,此稀释率下发酵液中残留葡萄糖浓度很高,说明该点已接近洗出点了。

从 PHB 含量曲线可以看出,随着细胞比生长速率的增加,胞内 PHB 的积累量不断减少。这与 Y. Morinaga^[9]在利用 H_2 、 O_2 和 CO_2 为基质连续培养 *A. eutrophus* 时所得出的随着稀释率的增加而胞内 PHB 含量不断下降的结果相似。这是由于在高的稀释率情况下,即在高的菌体比生长速率下,胞内的 NAD(P)H 被迅速氧化,其含量很低,三羧酸循环途径中各个酶的活性很高,乙酰 CoA 有效地进入三羧酸循环进行氧化以形成各种合成菌体所需的氨基酸等中间代谢产物,使得用于合成 PHB 的中间产物—乙酰 CoA 的浓度很低,同时又由于三羧酸循环所产生的高浓度 CoA 强烈抑制了 PHB 合成途径中 β -酮基硫解酶的活性,结果造成了随着比生长速率的增大细胞合成的 PHB 量减少。

2.2 一级罐与二级罐稀释率之间的对应关系

一级罐中的发酵液经恒流泵流入二级罐中,两罐之间稀释率的对应关系见表 1。从表 1 和图 2 可以看出进入二级罐时的 CDW 和 PHB 浓度的值。

2.3 二级罐中 CDW、PHB 浓度和葡萄糖浓度与稀释率之间的关系

图 3 为二级罐中 CDW、PHB 浓度和葡萄糖浓度与稀释率之间的关系。从图中可以看出, D 在 0.054h^{-1} 至 0.14h^{-1} 之间时,细胞干重随稀释率的增大而增加,CDW 从 D 为 0.054h^{-1} 时的 40.1g/L 增至 D 为 0.14h^{-1} 时的最大值 47.6g/L ,随后随着稀释率的进一步增大而下降,至稀释率为 0.35h^{-1} 时 CDW 下降为 16.8g/L ,比最大值下降了 64.7% 。PHB 浓度在稀释率为 0.075h^{-1} 时达到最大值 30.5g/L ,当稀释率继续增大时,其值不断下降,至稀释率为 0.35h^{-1} 时,其值仅为 0.59g/L 。二级罐中葡萄糖浓度通过调节流加糖液的流量来控制,由于细胞只有在氮源缺乏而碳源丰富的条件下才能在胞内大量积累 PHB,因而二级罐中的葡萄糖浓度必须控制在既有利于 PHB 合成,又不影响后处理的较适宜范围内,其浓度变化见图 3。

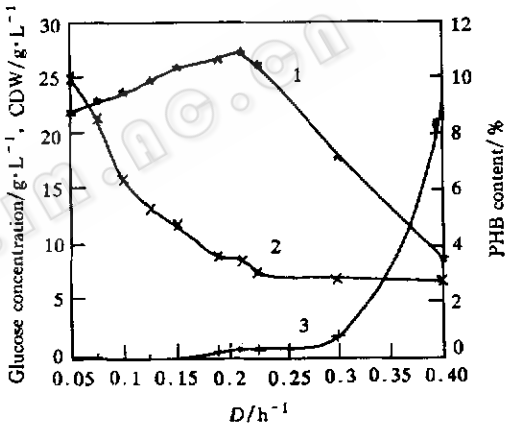


图 2 一级罐中 CDW、PHB 含量和葡萄糖浓度与稀释率的关系

Fig. 2 Relationship between CDW, PHB content, glucose concentration and dilution rate in 1st stage
1. Cell dry weight(CDW), 2. PHB content, 3. Glucose concentration

表 1 一级罐与二级罐稀释率之间的对应关系

Table 1 Relationship of dilution rate between 1st stage and 2nd stage

Dilution rate in 1st stage/h	0.05	0.075	0.10	0.125	0.15	0.188	0.21	0.225	0.3	0.40
Dilution rate in 2nd stage/h	0.054	0.075	0.10	0.12	0.14	0.173	0.20	0.22	0.275	0.35

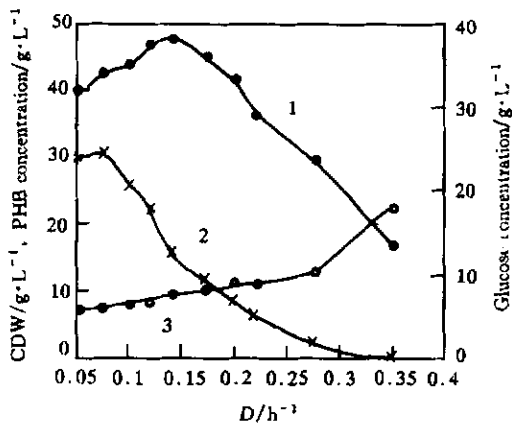


图3 二级罐中细胞干重、PHB浓度和葡萄糖浓度与稀释率之间的关系

Fig. 2 Relationship between CDW, PHB conc., glucose conc. and dilution rate in 2nd stage

1. Cell dry weight(CDW), 2. PHB conc. 3. Glucose conc.

酸合成酶和异柠檬酸脱氢酶的活性,使得 CoA 的浓度降低,因而解除了高浓度的 CoA 对 PHB 合成途径中 β -酮基硫解酶的抑制作用,导致大量乙酰 CoA 的形成,有利于 PHB 的积累。相反,随着培养基中氮源浓度的升高,乙酰 CoA 浓度降低,同时由于 TCA 循环中所产生的 CoA 增加,高浓度的 CoA 抑制了 PHB 合成途径中酶的活力,有利于细胞生长而不利其积累 PHB,使胞内 PHB 含量下降。

从图 4 中残留菌体浓度(RB)的变化曲线可以看出,在稀释率为 0.054h^{-1} 至 0.173h^{-1} 的范围内, RB 浓度随稀释率的增大而增加,至稀释率为 0.173h^{-1} 时达最大值 32.6g/L ,随后随稀释率的增大而不断下降,稀释率为 0.35h^{-1} 时下降至 16.0g/L 。比较一级培养罐与二级培养罐中 RB 的浓度变化还可以发现,随着稀释率的增大,由于二级罐中的铵离子浓度逐渐增大, D 大于 0.12h^{-1} 后,二级罐中的 RB 浓度大于一级罐中的 RB 浓度,这是由于在二级罐中的碳、氮

2.4 残留菌体浓度、铵离子浓度和 PHB 含量与稀释率的关系

实验结果见图 4。从图 4 中可见,二级罐中残留铵离子浓度随着稀释率的增大而增大,在较低的稀释率时其浓度很低,铵离子浓度基本接近为零,因而培养过程中的氮源成为生长限制性基质,有利于细胞大量积累 PHB。从 PHB 含量变化曲线可以看出,在低稀释率时胞内 PHB 含量很高,随着稀释率的增大,由于培养液中铵离子的不断积累,使细胞合成 PHB 的能力下降,导致 PHB 含量迅速下降。关于氮源浓度与细胞合成 PHB 的关系, Ahrens W.^[10] 观察到 *Alcaligenes eutrophus* 在生长过程中氮源缺乏的情况下,胞内丙酮酸浓度是正常生长条件下的 5 倍,由此导致乙酰 CoA 的浓度相应升高,同时由于高浓度的 NADPH 抑制了 TCA 循环中柠檬

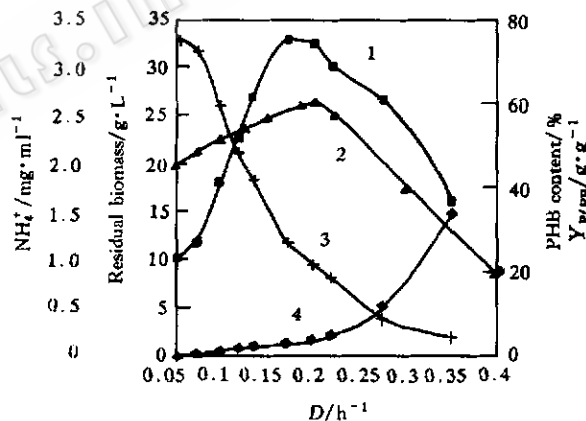


图4 残留菌体浓度、铵离子浓度和 PHB 含量与稀释率的关系

Fig. 4 Relationship between residual biomass, NH_4^+ , PHB content and dilution rate

1. Residual biomass in second stage, 2. Residual biomass in first stage, 3. PHB content, 4. NH_4^+ conc.

源均较丰富的条件下,有利于菌体的生长而不利细胞积累 PHB。

2.5 产物对残留菌体的产率系数($Y_{P/RB}$)、产物对基质的产率系数($Y_{P/S}$)和 PHB 生产强度与稀释率之间的关系

实验结果见图 5。从图中可以看出, PHB 的生产强度在稀释率在 0.054h^{-1} 至 0.12h^{-1} 之间随稀释率的增大而增加,其值从稀释率为 0.054h^{-1} 时的 $1.50\text{g/L}\cdot\text{h}$ 增至稀释率为 0.12h^{-1} 时的最大值 $2.50\text{g/L}\cdot\text{h}$,此值与国外报道的^[11]采用流加发酵法生产 PHB 所达到的最大生产强度($2.42\text{g/L}\cdot\text{h}$)相当。当稀释率继续增大时,PHB 的生产强度随稀释的增大而减小,至稀释率为 0.35h^{-1} 时,PHB 生产强度下降至 $0.2\text{g/L}\cdot\text{h}$ 。但是在稀释率为 0.12h^{-1} 时,胞内 PHB 含量仅为 47.6% (细胞干重为 46.5g/L)。由于过低的 PHB 含量会大大增加 PHB 提取过程的难度和成本,因此这一稀释率不宜作为最佳工作点,考察稀释率为 0.075h^{-1} 时的情况,此时 PHB 的生产强度为 $2.14\text{g/L}\cdot\text{h}$,胞内 PHB 的含量达 72.1% (细胞干重为 42.3g/L),也就是说,在此稀释率下,系统既有较大的 PHB 生产强度,细胞内 PHB 含量也较高。

从产物对基质的产率系数($Y_{P/S}$)和对残留菌体的产率系数($Y_{P/RB}$)曲线上可以看出:(1)在稀释率为 0.075h^{-1} 时, $Y_{P/S}$ 达到最大值 0.38g/g ,随后随着稀释率的增大而不断降低;(2) $Y_{P/RB}$ 随着稀释率的增加而不断下降,说明随着比生长速率的增加,单位残留菌体合成 PHB 的能力不断下降,这与在一级连续培养中所得的结果相类似。

综上所述,采用二级发酵连续培养系统生产 PHB 时,当稀释率较小时,二级罐发酵液中氮源浓度很低,细胞中 PHB 含量较高,但 PHB 的生产强度小。随着稀释率的增大,由一级培养系统中带入的氮源会在二级培养罐中逐渐积累,高浓度的氮源不利于细胞积累 PHB,故胞内 PHB 含量低。稀释率 0.075h^{-1} 是一关键条件,在此时不仅 PHB 的生产强度和胞内 PHB 含量较高,而且产物对基质的产率系数也最大,这一结果具有相当的实际应用价值。如果要在较大的稀释率下进行培养,可考虑采用三级连续培养系统,以提高 PHB 的含量和产物对基质的转化率,但这会加大过程控制的难度和增加系统染菌的可能性。

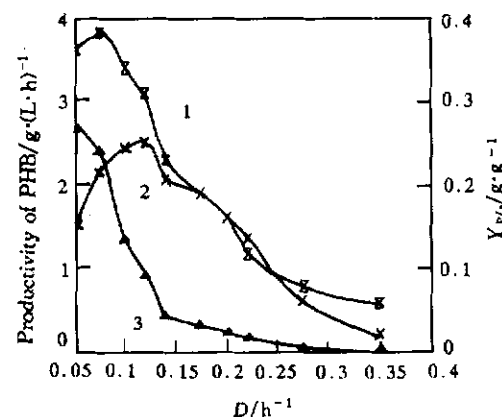


图 5 产物对残留菌体的产率系数、产物对基质的产率系数和 PHB 的生产强度与稀释率的关系

Fig. 5 Relationship between $Y_{P/RB}$, $Y_{P/S}$, PHB productivity and dilution rate

1. Yield coefficient of PHB to substrate
2. Productivity of PHB, 3. Yield coefficient of PHB to RB

参 考 文 献

- 1 堵国成, 陈 坚, 高海军等. 生物技术, 1996, 6(4): 5~10
- 2 Haywood G W, Anderson A J *et al.* FEMS Microbiology Letters, 1989, 57: 1~6

- 3 Peter J S, Edwin A D. *Biochem J*, 1973, **134**:225~238
- 4 Suzuki T, Yamane T *et al.* *Appl Microbiol Biotechnol*, 1986, **24**:370~374
- 5 堵国成, 陈 坚, 高海军等. *应用与环境生物学报*, 1996, **2**(3):308~314
- 6 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, 245~249
- 7 Riis V, Mai W. *Journal of Chromatography*, 1988, **445**:285~289
- 8 Steinbuchel A, Hans G S. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1989, **31**:168~175
- 9 Morinaga Y, Yamanaka S. *Agric Biol Chem*, 1978, **42**(2):439~444
- 10 Ahrens W. Thesis. University of Göttingen, 1970
- 11 Kim B S, Lee S C. *Biotechnology and Bioengineering*, 1994, **433**:892~898

Influences of Dilution Rate on PHB Formation with *Alcaligenes eutrophus* in a Two-stage Continuous Culture System

Du Guocheng Chen Jian Chen Yinguang Gao Haijun Lun Shiyi
(*Environ. Biotechnol. Lab, School Biotechnol., Wuzi Univ. Light Industry, Wuzi 214036*)

Abstract The influences of dilution rate on PHB formation were investigated with *A. eutrophus* in a two-stage continuous culture system. It showed that the maximal cell dry weight of 27.1 g/L could be obtained at 0.21 h⁻¹ dilution rate in the first-stage, while it was 47.6 g/L at 0.14 h⁻¹ dilution rate in the second-stage. The maximal PHB productivity could reach 2.5 g/L·h at 0.12 h⁻¹ dilution rate with relatively low PHB content of 47.6%. Maximal yield coefficient could reach 0.38 g/g at 0.075 h⁻¹ dilution rate, with relatively high PHB productivity of 2.14 g/L·h and PHB content of 72.1%, respectively. PHB content in cells decreased and the quantity of PHB produced per unit mass of cells declined rapidly with increasing specific growth rate.

Key words *Alcaligenes eutrophus*, poly-β-hydroxybutyrate, two-stage continuous culture, dilution rate