

溶氧振荡对聚 β 羟基丁酸混合培养过程的调控作用

钱梓文^{1*} 远山正幸² 花强² 清水和幸²

¹(生化工程国家重点实验室,中国科学院化工冶金研究所,北京 100080)

²(日本九州工业大学,情报工学部,生化工程科学系,日本福岡,饭塚市 820-8502)

摘 要 研究生物可降解塑料 PHB(Poly β -hydroxy butyrate)生产的低成本和高产率发酵。采用廉价碳源——废食品糕点作为原料,其中同时具有葡萄糖和乳酸。培养是在同一 5L 发酵罐中先后接入 2 种细菌,先由乳酸杆菌 *Lactobacillus delbrueckii* 消耗葡萄糖产生乳酸,再由真养产碱菌 *Ralstonia eutrophus* 消耗乳酸产生 PHB。本文应用混沌控制理论设计溶氧振荡来协调混生菌矛盾的生理需求,同时改变振荡节律激励细胞的代谢能。考虑真养产碱菌在乳酸里的代谢,有异养和真养两种途径,其中两种重要代谢通量,生物氧化能 ATP 和还原能 NADPH,能够反映混生菌细胞的生理状态,二者都与供氧密切相关。实验通过取样进行细胞破碎后,由荧光分析仪监测不同发酵阶段的 ATP 和 NADPH,发现 2 种代谢能随着溶氧控制的不同节律变化而起伏,溶氧节律振荡能够使混合培养的 PHB 的浓度比常规供氧方法提高 1 倍。

关键词 PHB 混合发酵,溶氧振荡,节律控制,ATP,NADPH 代谢能测定

中图分类号 O623.61 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2001)04-0441-04

取 β 羟基丁酸(Poly β -hydroxy butyrate)是一种可降解的生物塑料聚合物。但是生物塑料实现工业化的一个主要障碍是它的成本远高于传统的石化塑料,其主要原因是细菌发酵的碳源葡萄糖成本很高。日本九州工业大学的 Shimizu 等试图采用廉价碳源,废糕点中的葡萄糖和乳酸生产 PHB。实验研究了在同一 5L 发酵罐内 2 种碳源下的混合培养过程^[1~3]。培养方法是先用乳酸杆菌 *L. delbrueckii* 消耗葡萄糖产生乳酸,稍后再用真养产碱菌 *Ralstonia eutrophus* 消耗乳酸产生 PHB。在两菌共存的发酵体系里由于所需的生存条件和代谢途径差异很大,甚至互相抵触,导致最终产物 PHB 浓度很低。为了探讨提高 PHB 这种混合培养方法的最终收率,本文应用时空混沌控制方法^[4~6],提出以氧供给的节律控制来刺激代谢,调控混生菌宏观生理状态。实验结果表明 ATP 和 NADPH 随溶氧振荡而呈现节律变化,并且使 PHB 浓度比常规的线性设定值控制方法提高 1 倍。

1 PHB 混合培养过程细胞生理状态调控

细胞生理状态调控主要目的是激励细胞的代谢活力从而提高增殖速率,通过外部培养环境的改变

去作用和影响胞内目标代谢物的形成速率。方法是应用混沌控制理论^[6]设计振荡输入模式,加速细胞内代谢网络上某些代谢途径里的酶促反应,建立闭环调节回路^[7]来提高代谢的目标产物形成速率。

1.1 两菌混生培养体系的过程分解

PHB 混合培养是 2 种菌在同一发酵罐的共生和代谢过程,可以分解为 3 个进程。首先由乳酸杆菌 *L. delbrueckii* 消耗葡萄糖产生乳酸,这是一个厌氧发酵过程,氮源充足有利于乳酸杆菌生长。当乳酸浓度达到 5g/L 时,接入真养产碱菌 *R. eutrophus* 消耗乳酸产生 PHB。这个过程需要充足的氧和适当的氮/碳比。最后随着氮源的缺乏,真养产碱菌开始在体内积累 PHB,减少氧的供应可以抑制长菌而转向产物的积蓄。混合培养的过程分解如图 1 所示。在混生系统里乳酸浓度太高会产生产物抑制,不利于葡萄糖消耗,同时也不利于真养产碱菌增殖和积累 PHB。由此可见调节溶氧和葡萄糖浓度可以控制乳酸产生速率,而调节溶氧和氮的浓度可以控制乳酸消耗速率。在同一发酵体系内氧供应同时满足低和高两种要求,宏观上满足两菌的细胞生理需求,只有采取振荡改变的供氧方式,同时根据氮的消耗流加

葡萄糖,保持适当碳氮比。比葡萄糖消耗速率($SGUR$)定性表达如下所示:

$$SGUR = \frac{F_{MC} \cdot S_0 - (F_{MC} + F_{NH_3}) \cdot S}{V \cdot x}$$

式中 F_{MC} 为流加葡萄糖速率, S_0 为初糖浓度, S 为流加糖浓度, F_{NH_3} 为氮流加速率, x 为混生菌浓度, V 为总体积。

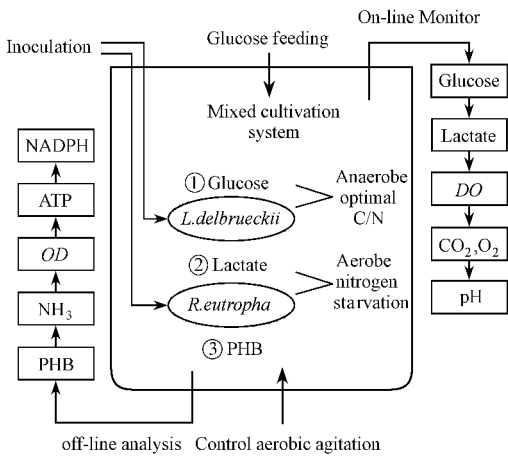


图1 PHB混合培养的两菌共存发酵体系以及在
线检测和离线分析的生化变量

Fig.1 PHB mixed cultivation system coupled with on-line
monitoring variables and off-line bio-chemoanalytic variables

按上式控制比葡萄糖消耗速率,在三个进程中为阶梯形如图3(1)粗线所示。

1.2 混生菌细胞内部代谢能的调控

真养产碱菌在乳酸里的代谢是严格需氧的,其代谢途径见文献[3],包括真养和异养两种途径。当真养代谢时,是由乙酰辅酶A通过三酶合成途径产生PHB,限制氮源使TCA循环切断,NADPH过剩,PHB合成速率提高。在异养代谢时,真养产碱菌用TCA循环作为它的ATP能量产生源,细胞生长在乳酸里两个回补反应发生的两个主要途径:一是由乙酰辅酶A被异柠檬酸裂解酶经乙醛酸支路生成苹果酸,再经草酰乙酸回到异柠檬酸,另一条途径是从苹果酸到丙酮酸和从草酰乙酸(Oxaloacetate)到磷酸烯醇丙酮酸(PEP),再由丙酮酸到PEP经羧化酶形成草酰乙酸再回到异柠檬酸。当氧供应充足时ATP浓度高,使柠檬酸合成受抑制,而使NADPH过剩。所以ATP和NADPH对提高PHB产率来说是相辅关联的。这两种代谢能的调控可以通过改变溶氧节律和碳氮比来实现。

1.3 溶氧节律控制的模式设计

由于细胞内的酶促反应存在终产物抑制和中间产物构激活耦合的催化作用,在细胞增殖的自组织过程中表现出复杂周期振荡行为,形成细胞内部代

谢动力学的混沌机制^[7]。混沌控制的目的是利用预先设计好的外源节律作用同步和驯化细胞内部的复杂动力学行为,这种控制方法在理论上已经被大量的建模和计算证明是可行的^[5,7]。溶氧节律控制的模式如图2所示,振幅变化为前期限制氧在0.5~1.5ppm有助于乳酸杆菌的生长。中期溶氧在0.5~4.5ppm之间振荡,主要满足真养产碱菌的需氧。后期溶氧在0.5~3.0ppm之间振荡,为了限制真养产碱菌的繁殖并且氮饥饿。频率和相位的改变参考葡萄糖消耗速率分三个阶段调节,不同的振荡频率、振幅和相位呈现不同的节律。按照传统的设想细胞内部在合成本身所需要的中间代谢产物中,严格保持核苷酸和嘌呤物质的平衡稳定。现在的工作要通过实验观测当供氧节律变化时,ATP和NADPH是否作相应的变化和由此产生的PHB合成效果。

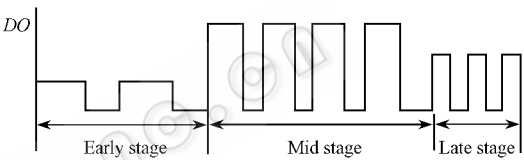


图2 节律控制的模式示意图

Fig.2 Scheme of a rhythmical variation pattern for
dissolved oxygen oscillation

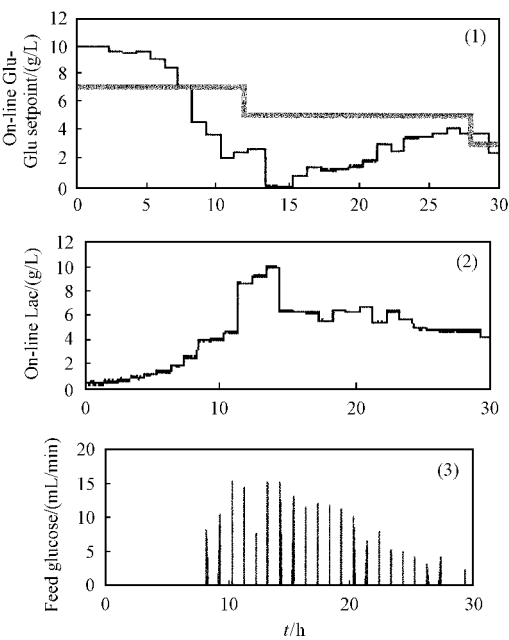


图3 PHB混合培养实验中在线监测的葡萄糖和乳酸浓度
Fig.3 The on-line supervisory concentration of glucose(1) lactate
(2)and the additional glucose(3)in the mixed cultivation

2 实验

2.1 混合培养的实验材料与方法

2.1.1 菌种和培养基 乳酸生产菌株为 *Lactobacillus Delbrueckii* IAM1928, 其培养基组分如下所示:

Polypepton (Nippon Seiyaku co., Tokyo), 10g/L; Yeast extract (Nippon Seiyaku Co., Tokyo) 5g/L; Meat extract (Nippon Seiyaku Co., Tokyo) 5g/L; K_2HPO_4 2g/L; Ammonium citrate 1g/L; L-Cystein 0.1g/L; $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 0.033g/L; $FeSO_4 \cdot 4H_2O$ 0.013g/L。

PHB 生产菌株为 *Ralstonia eutropha* H16 (ATCC17699)。菌株首先在含 yeast extract 10g/L, Polypepton 5g/L, meat extract 5g/L 和 $(NH_4)_2SO_4$ 5g/L 的富氮培养基中进行预培养, 然后菌体经离心洗涤后接入合成培养基中进行培养。混合培养所用的培养基组成与上述乳酸杆菌所用的相同。

2.1.2 分析方法 细胞浓度的测定采用分光光度计 (Ubest-3, Jasco Co., Tokyo) 在 660nm 测定光密度获得。葡萄糖浓度的测定采用葡萄糖分析仪 (Glucose B-test 271-31401, Wako Pure Chemical Co., Osaka)。乳酸浓度的测定采用乳酸分析仪 (F-kit L-lactic acid 139084, Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany)。硫酸铵浓度通过酶法 (Wake Co., Tokyo) 测定铵离子浓度获得。PHB 浓度采用 Law & Slepecky 改善法。其余有机酸浓度用 HPLC (LC-10A, Shimadzu Co., Osaka) 进行测定 (色谱柱 Shim-PAK SCR-102H, Shimadzu Co., Osaka)。生物代谢能 ATP, NADPH 用荧光光谱分析仪 (F-4010 Fluorescence Spectrophotometer, HITACHI CO.)。

2.2 培养过程

0.2mL *L. Delbrueckii* 从 -80°C 的甘油冷冻管中转移到装有 20mL 培养基试管中进行接种物的制备。斜面培养在 37°C 12h 之后转移到 200mL 的 T 形瓶中进行预培养 12h。在静置培养 4.5h 之后, 培养基在 4°C 5000g 条件下离心 10min。细胞沉淀物悬浮于新鲜培养基内, 然后接种到一个 5L 的发酵罐 (M-100, Tokyo Rikakikai Co., Tokyo) 中, 工作体积为 3L。P. eutropha 的培养过程与 *L. Delbrueckii* 的培养过程相类似。预培养周期一般为 30h, 接种时间晚 4h, 两菌共存时开始混合培养。

2.3 发酵设备与控制系统

5L 发酵罐的装备如图 4 所示, 其中在线监测变量包括葡萄糖浓度、乳酸浓度、溶氧、排气 CO_2 、 O_2 、pH, 离线分析的参数包括 NADPH、ATP、细胞浓度、 NH_3 、PHB。温度恒温控制在 37°C , pH 通过在线 pH 传感器 (FC-1, Tokyo Rikakikai Co., Tokyo) 进行检测,

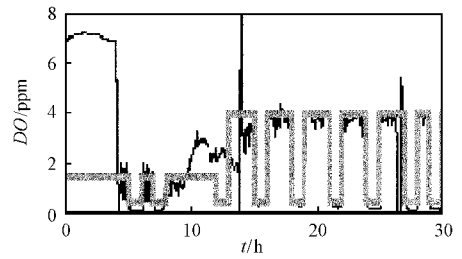


图 4 在线监测溶氧节律控制模式改变的溶氧控制节律
Fig.4 A real-time recorded dissolved oxygen rhythmical pattern

采用 8mol/L NaOH 或 4mol/L HCl 维持在设定值。溶氧浓度通过在线 DO 传感器 (FC-1, Tokyo Rikakikai Co., Tokyo) 进行检测, 通过改变搅拌速率和通气量保持在设定的节律状态下 (图 2)。

葡萄糖和乳酸的浓度分别通过在线的葡萄糖和乳酸传感器 (BF-400, Biot Co., Tokyo) 进行测定, 采用开关模式添加葡萄糖使其维持在设定点。由于这些传感器非常昂贵, 所以我们通过 NaOH 溶液添加的体积估算乳酸的浓度。所有的信号经放大后传送到计算机中, 所有的阀门均通过 D/A 转换器或继电器由计算机进行控制。所有的设备在使用之前于 121°C 灭菌 20min。

3 结果与讨论

溶氧振荡节律控制是基于细胞代谢的复杂周期行为的混沌控制理论提出的调控细胞生理状态的方法。在两菌混生的培养体系中, 溶氧振荡协调了两种菌对氧的需求反差, 而节律激励了真养产碱菌的代谢能 ATP 和 NADPH 相应振荡, 促进了 PHB 的合成。图 5 所示为 ATP 和 NADPH 用荧光光度计测得的浓度变化, 基本上与图 4 所示溶氧的节律改变一致, 二者的振荡规律前期 (大约 0 ~ 15h) ATP 有一下降谷, 随之 NADPH 有一上升峰, 中期 (大约 15 ~ 28h), ATP 已经上升到一定值并且又有一下降谷, 随之 NADPH 产生一上升峰, 在后期 (28 ~ 30h) ATP 再次发生下降谷, 而 NADPH 有上升峰, 在 3 个阶段有 3 次起伏。图 6 所示为全过程主要生化量的实验结果, PHB 在节律控制下达到 4.14g/L, 而在同样培养条件下溶氧非节律控制的混合发酵体系 PHB 为 2 ~ 3g/L^[1]。利用废弃原材料中的碳源进行两种细菌的混合培养生产 PHB 是一种新的尝试, 由于动力学关系复杂和耦合关系不易分解, 迄今为止仍只有有限的混合培养过程被报道。本文实验测试了振荡节律供氧情况下细胞内的生物能 ATP 和 NADPH 的相应振荡现象。由于两种细菌同时存在, 所测的生物代

谢能不完全是真养产碱菌一种菌细胞内的代谢能,只能假设乳酸杆菌在发酵中期供氧充足的情况

下已经失去活性,所测的两种生物能主要是真养产碱菌的胞内代谢能浓度。

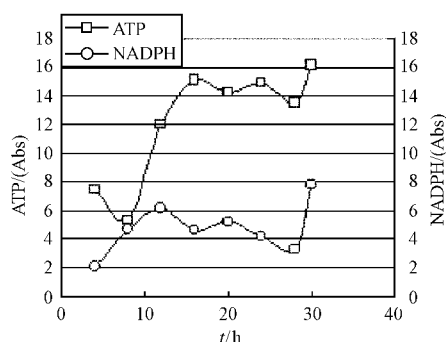


图5 节律控制下的胞内代谢能 ATP 和 NADPH

Fig.5 Variation of intracellular ATP and NADPH under rhythmical DO control

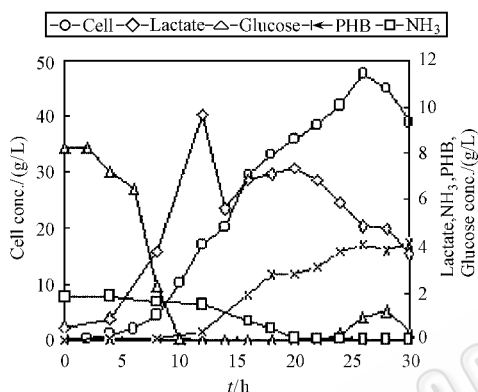


图6 PHB 混合培养实验结果

Fig.6 Results for PHB mixed cultivation experiments

REFERENCES (参考文献)

- [1] Masayuki Tohyama, Kazuyuki Shimizu. Control of a mixed culture of lactobacillus delbrueckii and ralstonia eutropha for the production of PHB from glucose via lactate. *Biochemical Engineering Journal*, 1999, **4**: 45 ~ 53
- [2] Tomoji Katoh, Daisuke Yuguchi, Kazuyuki Shimizu. Dynamics and modeling on fermentation production of poly (β -hydroxybutyric acid) from sugars via lactate by a mixed culture of lactobacillus delbrueckii and alicigenes eutrophus. *J of Biotech*, 1999, **67**: 113 ~ 124
- [3] Huidong Shi, Masafumi Shiraishi, Kazuyuki Shimizu. Metabolic flux analysis for biosynthesis of poly (β -Hydroxybutyric acid) in alicigenes eutrophus from various carbon sources. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 1997, **84** (6): 579 ~ 587
- [4] QIAN Z W (钱梓文), LI H (李华), HUANG Y X (黄永曦). Cultivation method employed to control microbial metabolic rhythm in aerobic fermentation process. Chinese Patent ZL 1 19825.7, 1996-09-19
- [5] QIAN Z W (钱梓文), YANG L (杨磊). Study and application on nonlinear control methodology for aerobic microbial cultivation processes. Proceeding of the eighth national conference on biochemical engineering, Chemical Industry Press, 1998, pp. 209 ~ 217
- [6] QIAN Z W (钱梓文), TOHYAMA, M, SHIMIZU, K. Application of chaotic control in poly (β -hydroxybutyric acid) mixed cultivation process. *Journal of Wuxi University of Light Industry*, 2000, **19**: 5
- [7] Somdatta Sinha, R. Ramaswamy. Dynamics of controlled metabolic network and cellular behaviour. *Chaos in Biological Systems*, Plenum press, New York, 1987

Dynamic Variance of Intracellular Metabolic Energies Under Rhythmical Control for Dissolved Oxygen in PHB Mixed Cultivation

QIAN Zi-Wen^{1*} TOHYAMA Masayuki² HUA Qiang² SHIMIZU Kazuyuki²

¹(National Laboratory of Biochemical Engineering of China, Beijing 100080, China)

²(Department of Biochemical Engineering, Kyushu Institute of Technology, Fukuoka 820-8602, Japan)

Abstract The mixed cultivation using cheaper carbon source-wasted food material contained glucose and lactate at the same time was conducted in 5L fermentor, within which glucose was converted to lactate by *L. delbrueckii* in anaerobic condition and the lactate was converted to PHB by *R. eutropha* in aerobic condition. Considering dissolved oxygen concentration may affect the level of intracellular ATP and NADPH of the metabolic pathways for *R. eutropha* in lactate under autotrophy or heterotrophy, rhythmical oscillated control for DO based on chaos control method was consequently presented. This method was employed to satisfy two strains for opposite oxygen preferences, moreover, excite the intracellular metabolic energy simultaneously. The values examined through spectrophotofluorimetry represented that both ATP and NADPH exhibited fluctuations in accordance with the DO rhythm. By means of this control design, the concentration of PHB can be doubled than the usual under stable DO control.

Key words PHB mixed cultivation, dissolved oxygen oscillation, rhythmical control, ATP and NADPH, cellular physiological state

Received: January 12, 2001

This work was supported by grant from National Natural Sciences Foundation of China (29876042).

* Corresponding author. Tel 86-10-82627073; Fax 86-10-62561813; E-mail: zqwqian@263.net

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