补料培养提高真养产碱杆菌产 3-羟基丁酸和 3-羟基戊酸共聚物生产强度的研究

蔡以滨 刘墨青 易祖华 陈 琦 翁维琦*

(中国科学院微生物研究所,北京 100080)

摘 要 对 *Alcaligenes eutrophus* 进行高密度培养,研究表明在发酵过程中进行有效控制,可以较大幅度地提高 3-羟基丁酸和 3-羟基戊酸共聚物[P(3HB-co-3HV)]的生产强度。实验中选择使用限氮的方法积累 P(3HB-co-3HV),分别采用丙酸和戊酸为 3HV 前体,对摇瓶种子生长状态,停氮时机对菌体生产 P(3HB-co-3HV)的影响以及补酸(3HV 前体)策略进行了研究,在 6.6L 罐中,以葡萄糖为碳源,以丙酸为 3HV 前体培养 50h,细胞干重,PHA 产量,PHA 含量分别达到 149.9g/L,124.9g/L,83.3%(其中 3HV 组分占 PHA 的 12.4mol%),生产强度达到 2.50($g\cdot h^{-1}\cdot L^{-1}$);以戊酸为 3HV 前体培养 45h,细胞干重,PHA 产量,PHA 含量分别达到 160.2g/L、119.0g/L、74.2%(其中 3HV 组分占 PHA 的 17.7mol%),生产强度达到 2.64($g\cdot h^{-1}\cdot L^{-1}$)。

关键词 真养产碱杆菌,3-羟基丁酸和 3-羟基戊酸共聚物,生产强度

中图分类号 Q81 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2001)05-0510-05

聚羟基烷酸(PHAs)是许多原核生物在非平衡生长条件(N,P,S,Mg 限制或 O_2 限制)下合成的细胞内能量与碳源储存物。近年来,这一类高分子聚酯以其独特的生物降解性和生物相容性而受到各国学者的广泛关注,成为生物可降解聚酯研究的焦点。其中的聚羟基丁酸(PHB)是一种特性与聚丙烯相似的高熔点结晶的热塑材料;但较之聚丙烯,PHB 脆性较大,而且在稍高于其熔点的温度下即可发生热降解,因此使熔点加工过程难以控制。这些问题可以通过合成 3-羟基丁酸和 3-羟基戊酸共聚物[P(3HB-co-3HV)]得到一定程度的解决,HV 单体插入到 HB 主链中能显著降低熔点;聚酯的机械性能也有一定程度的改善,P(3HB-co-3HV)因此被认为是目前最具生产和应用潜力的聚羟基烷酸[1~3]。

研究中发现,真养产碱杆菌(*A. eutrophus*),产碱肥大肝菌(*A. latus*),蜡状芽孢杆菌(*B. cereus*),洋葱假单胞菌(*P. cepacia*)等在补加丙酸或戊酸时均可积累 P(3HB-co-3HV)[4,5];自养黄杆菌(*Xanthobacter autotrophicus*)利用葡萄糖作为唯一碳源可直接产生 P(3HB-co-3HV)[6];采用基因重组大肠杆菌生产 P(3HB-co-3HV)的研究也取得了很大的进展[2]。英国的帝国化学工业公司率先于 1990 年采用真养产碱杆菌小批量生产 P(3HB-co-3HV),商品名"Biopol",年产 1000t。

但就 P(3HB-co-3HV)制品大量进入市场,成为真正的商品而被消费者普遍认同而言,生产成本仍是主要的限制因素,为此,我们进行了提高真养产碱杆菌 P(3HB-co-3HV)生产强度的研究,其结果报告如下。

1 材料和方法

1.1 菌种

真养产碱杆菌(*Alcaligenes eutrophus*)利用葡萄糖突变株 65-7,本课题组保藏。

1.2 培养基

摇瓶培养基(%):$Na_2HPO_4\cdot 12H_2O$ 0.9,KH_2PO_4 0.15,$(NH_4)_2SO_4$ 0.25,$NaHCO_3$ 0.05,$MgSO_4\cdot 7H_2O$ 0.02,$CaCl_2\cdot 2H_2O$ 0.002,柠檬酸铁铵 0.0005,酵母膏 0.15,葡萄糖 2.0,痕量元素液 0.1mL。

发酵初始培养基(%):$Na_2HPO_4\cdot 12H_2O$ 0.9,KH_2PO_4 0.15,$(NH_4)_2SO_4$ 0.2,$NaHCO_3$ 0.05,$MgSO_4\cdot 7H_2O$ 0.02,$CaCl_2\cdot 2H_2O$ 0.002,柠檬酸铁铵 0.0005,痕量元素液 0.1mL,酵母膏 0.1,葡萄糖 2.0,pH6.8,初始装液 1.8L。

收稿日期:2001-03-09,修回日期:2001-06-28。
基金项目:国家九五攻关项目(96-C03-03-02)。
* 通讯作者。Tel:86-10-62564697;Fax:86-10-62560912;E-mail:wengwq@sun.im.ac.cn

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

补料液Ⅰ(g/L):葡萄糖700,硫酸铵2.5,痕量元素液10mL/L,补料液体积500mL。

补料液Ⅱ(g/L):葡萄糖700,补料液体积1500mL。

1.3 培养方法

种子摇瓶培养:采用30℃,200r/min培养15~21h。

分批补料培养:采用6.6L台式发酵罐(Bioflo Ⅲ:New Brunswick Scientific Co.)。6瓶共300mL种子液接入1800mL发酵初始培养基,30℃,停氮前采用氨水控制pH6.8,停氮后采用丙酸或戊酸控制pH6.5~6.8。通过搅拌转速变化(200~1000r/min)自动控制前期溶氧分别处于25%,补糖速率由蠕动泵控制,每2h离线检测1次,并校正补糖速率,停氮控制残糖1.0~2.0;停氮后以丙酸为3HV前体控制残糖1.0~2.5,以戊酸为3HV前体控制残糖0.5~1.0。采用不同种龄的摇瓶种子以研究不同干重、PHB含量和菌体形态的种子对菌体生长和聚酯积累的影响;菌体生长达到不同的细胞干重时停止氮源(氨水)的加入,并补加3HV前体,以确定停氮的最佳时机。

1.4 分析方法

细胞干重:发酵液离心,水洗1次,80℃干燥24h称重。

还原糖测定:3,5-二硝基水杨酸法。

PHBV测定:以苯甲酸为内标,气相色谱法[8]。

2 结　果

2.1 摇瓶种子的生长状况对菌体生长的影响

A,B,C三组摇瓶分别培养15,18和21h后将摇瓶种子液分别接入装有1800mL基础培养基的6.6L发酵罐中继续培养,摇瓶种子液体积350mL。其中A组摇瓶培养15h,细胞干重5.52g/L,胞内基本无空泡;B组摇瓶培养18h,细胞干重6.65g/L,胞内空泡较明显,有少量聚酯积累;C组摇瓶培养21h,细胞干重7.85g/L,胞内有较大空泡,聚酯积累较多。

图1分别为三组摇瓶种子接入6.6L发酵罐后的发酵曲线,均为停止流加氨水前的情况。第一组(种龄15h)培养30h,第二组(种龄18h)培养29h和第三组(种龄21h)培养28h细胞干重分别达到95.8g/L、69.8g/L和52.6g/L。

2.2 发酵过程中不同时间停止流加氮源对PHA积累的影响

图2分别为选择在发酵过程中始终不停氮以及选择在不同菌体量(细胞干重)的情况下停氨的发酵曲线。从图2可见:整个发酵过程中始终补加氨水(图2-A),细胞干重达到130.3g/L(37h)时停止补加氨水(图2-B),细胞干重达到76.3g/L(27h)后停氮(图2-C)以及细胞干重32.1g/L(24h)时即停止补加氨水(图2-D),发酵结束时P(3HB-co-3HV)的生产强度分别为1.81、1.98、2.15和1.70($g\cdot h^{-1}\cdot L^{-1}$)。研究发现细胞干重60~90g/L时停止补氮,有利于P(3HB-co-3HV)生产强度达到较高水平,可以获得较好的发酵结果。

2.3 分别以丙酸和戊酸为3HV前体生产P(3HB-co-3HV)

采用培养15h摇瓶种子,接种量15%,进行分批补料培养,控制生长期溶氧25%,流加氨水控制发酵液pH值6.8~7.0,细胞干重达60~90g/L后停止流加氨水,采用流加丙酸或戊酸调节pH值的策略,将pH值控制在6.5~6.8之间。图3为流加丙酸的实验结果,发酵50h,细胞干重,PHA产量,PHA含量分别达到149.9g/L,124.9g/L,83.3%(其中3HV组分占PHA的12.4mol%),PHA生产强度达到2.50($g\cdot h^{-1}\cdot L^{-1}$),丙酸的摩尔转化率为40.2%。

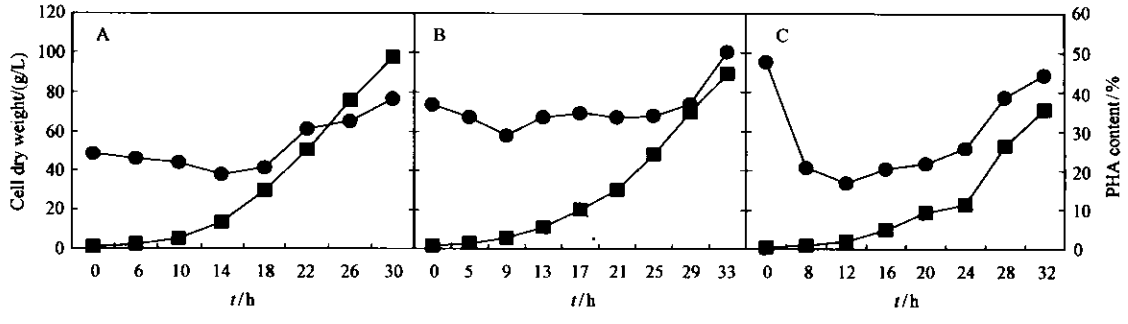

图1　种子生长状况对菌体生长的影响

Fig.1　The effect of seed situation on cell growth. The result of fermentaion for about 30 hours in 6.6L fermentator after inoculation. A, B, C show the result of different seeds that prepared for 15h, 18h and 21h in flask culture, respectively

■ Cell dry weight;　● PHA Content

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

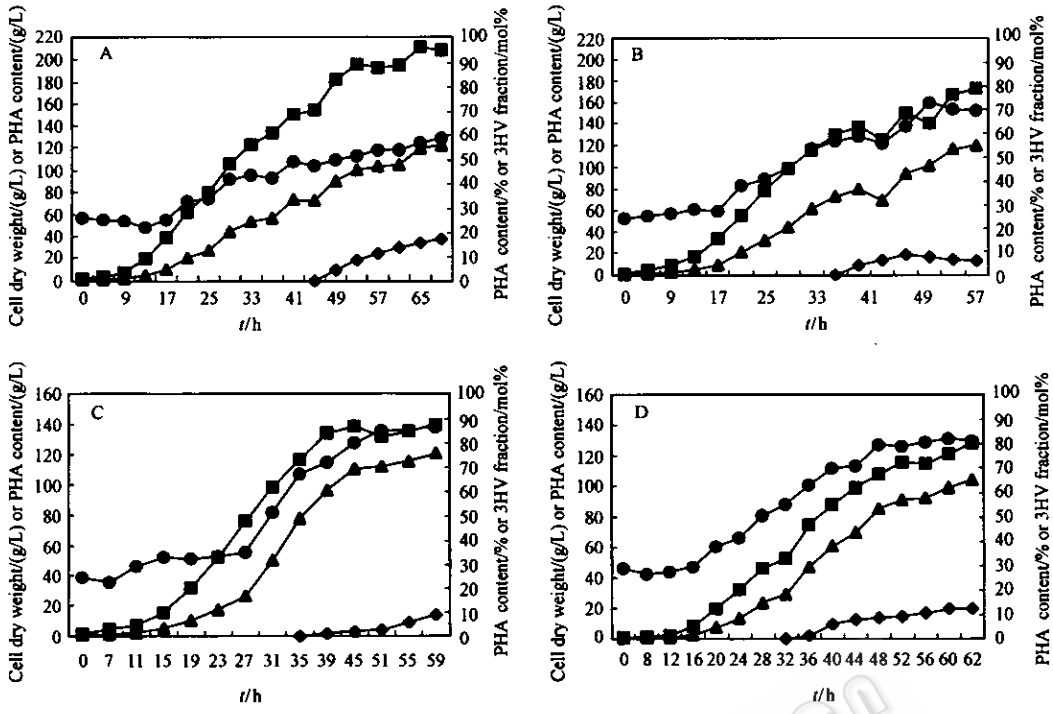

图 2 不同时间停氨对 P(3HB-co-3HV)积累的影响

Fig.2 The effect of stopping feeding Ammonia in different time to production PHB during fermentation.

A. Hasn't stopped feeding Ammonia; B、C、D. Ammonia feeding was stopped when DCW reached 130.3g/L、76.3g/L and 32.1g/L, respectively

■ Cell dry weight; ▲ PHA; ● PHA content; ◆ 3HV fraction

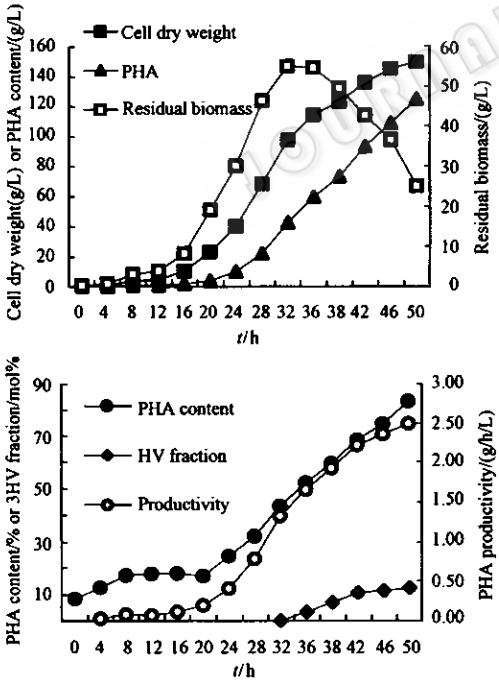

图 3 以丙酸为 3HV 前体发酵生产 P(3HB-co-3HV)结果

Fig.3 Fed-batch culture of *A. eutrophus* with precusor of propioic acid

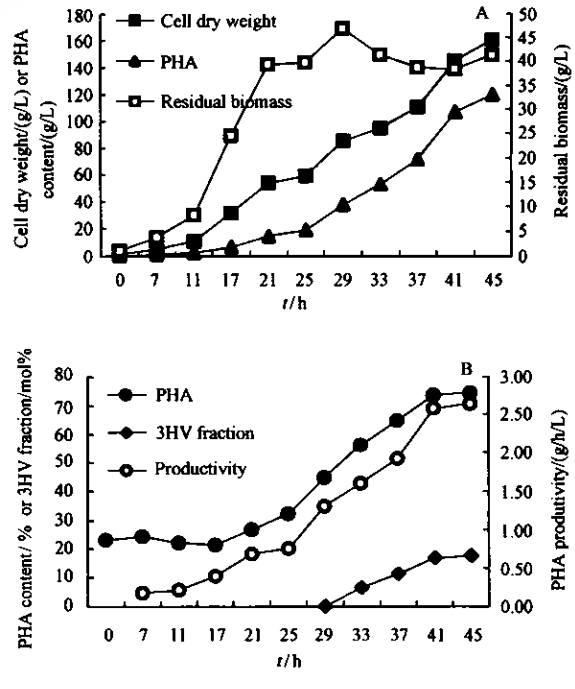

图 4 以戊酸为 3HV 前体发酵生产 P(3HB-co-3HV)结果

Fig.4 Fed-batch culture of *A. eutrophus* with precusor of valeric acid

图 4 为流加戊酸的实验结果，发酵 45h，细胞干重，PHBV 产量，PHBV 含量分别达到 160.2g/L，119.0g/L，74.2%（其中 3HV 组分占 PHA 的 17.7mol%），PHA 生产强度达到 2.64gh^{-1}L^{-1}，戊酸

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

的摩尔转化率达到75.3%。

3 讨　论

由于真养产碱杆菌(*Alcaligenes eutrophus*)生产P(3HB-co-3HV)过程中菌体生长和聚酯积累的最适条件不同,因此多采用二步法进行培养[3,5]。生长期提供适量的氧气和充足的营养物质,使菌体获得尽量高的生长速率;聚酯积累期则采用非平衡生长条件,大量产生P(3HB-co-3HV)。从图1可以看出,在适合的条件下,菌体生长期细胞中PHB含量一直保持在20%~30%左右(如图1-A),如果种子PHB含量较高,发酵过程中菌体生长相对较慢(如图1-C)。这可能是由于细胞内较大的PHB颗粒从生理上阻碍了菌体分裂,降低了菌体的生长速率。可见种子的干重并非越高越好,随着摇瓶培养基中氮源的消耗,C/N逐渐升高,菌体在出现氮源限制后开始大量积累PHB;制备具有一定数量(干重)和较低PHB含量(20%左右)的处于快速分裂状态的种子,可以有效缩短接种后的生长迟滞期,提高菌体生长速率,使菌体尚处在具有较高活力时转入积累期,从而缩短整个发酵周期,有利于生产强度的提高。

从发酵过程中不同时间停止流加氨水对PHA合成的影响(图3)看,不停氮或停氮较晚虽然可以获得较高的细胞干重,但P(3HB-co-3HV)含量较低,生产强度也相对较低,且提取聚酯相对困难,破壁和去除残余细胞需消耗更多溶剂。另外从提高前体的转化率看,丙酸和戊酸应该在停氮后加入,否则可能成为菌体生长的碳源;如果停氨较晚,则前体的加入量较少,3HV组分比例较低。选择细胞干重较低时停氨虽然可以获得较高的PHA含量,但细胞干重有限,生产强度相对较低。而选择细胞干重达到60~90g/L时停氨可以获得较高的P(3HB-co-3HV)含量和较高的生产强度。

从图2,图3和图4均可看出,停氨后P(3HB-co-3HV)在较短时间内大量产生,含量上升很快,而残余细胞总量则基本保持不变,单位体积的残余细胞量由于发酵液体积的增加而略有下降。而当PHA含量大于细胞干重的70%以后,由于细胞内部的空间限制,PHA的合成速率将逐渐降低。

真养产碱杆菌以丙酸和戊酸为前体均可合成3HV单体,但两者的合成途径并不相同。丙酸需要通过碳链的延长成为5碳单体,而戊酸则通过脂肪酸β-氧化途径转化为3HV单体,并最终聚合为P(3HB-co-3HV)。由于戊酸生成3HV过程中没有其它支路,往往可以获得较高的3HV比例,因此后者的摩尔转化率可以达到70%以上;而以丙酸为前体时,虽然继续流加葡萄糖以保证有足够的乙酰CoA产生,以期丙酸主要流向丙酰CoA方向,但是其摩尔转化率一般达不到50%。这可能是由于真养产碱杆菌中的脱羧酶有较高的活性,使丙酸脱羧生成乙酰CoA;而3-酮硫解酶和3-羟乙酰CoA脱氢酶虽然同时催化乙酰CoA合成D(-)3-羟基丁酰CoA以及催化丙酰CoA合成D(-)3-羟基戊酰CoA,但前者的合成速率要高于后者的合成速率。

由于有机酸即使在较低浓度下也会对真养产碱杆菌产生毒害作用[4,8],使菌体积累PHA的活力降低,无法获得较高的细胞干重和PHA含量,所以培养过程中必须尽量保持发酵液中的丙酸或戊酸处于较低浓度。Kim等的报道中采用在线葡萄糖分析仪将发酵液中的残糖控制在10~20g/L,生长期流加葡萄糖;停氨后流加丙酸和葡萄糖的混合液,混合液采用不同丙酸对葡萄糖比例(PG ratio),丙酸葡萄糖比为0.17时,PHA生产强度达到2.55($g\cdot h^{-1}\cdot L^{-1}$),3HV组分占PHA的4.3mol%;但采用PG比0.52以提高PHA中3HV组分达到14.3mol%时,PHA生产强度降低到1.67($h\cdot g^{-1}\cdot L^{-1}$)[5],这是由于实验中无法对发酵液中的丙酸浓度进行控制,丙酸浓度的积累使PHA合成受到了抑制,因此同时获得较高的3HV组分比例和生产强度比较困难。我们在实验中采取控制pH值的策略进行丙酸或戊酸的流加,当前体进入菌体细胞,发酵液的pH值上升后,再继续流加,使前体的流加速率与菌体利用前体的速率相适应,从而减轻了抑制作用,使菌体保留较高的活力。研究中我们采用该补料策略,并通过对整个发酵过程进行有效控制,同时达到了真养产碱杆菌的高密度培养,P(3HB-co-3HV)的高产和较高的3HV比例:以丙酸为3HV前体,发酵50h,细胞干重,P(3HB-co-3HV)产量和含量分别达到149.9g/L,124.9g/L,83.3%;3HV组分占PHA的12.4mol%,PHA生产强度达到2.50($h\cdot g^{-1}\cdot L^{-1}$)。以戊酸为3HV前体,发酵45h,细胞干重、P(3HB-co-3HV)产量和含量分别达到160.2g/L,119.0g/L,74.2%,3HV组分占PHA的17.7mol%,PHA生产强度达到2.64($g\cdot h^{-1}\cdot L^{-1}$)。在采用*Alcaligenes eutrophus*生产P(3HB-co-3HV)研究中,同时达到如此高的生产强度和3HV组分比例,还未见有文献报道。

致　谢　实验中得到王秀岭和黄和容两位同志的大

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

力帮助,特此致谢。

REFERENCES(参考文献)

[1] CHEN Q(陈琦), HUANG H R(黄和容), YI Z H(易祖华). Advance of studies on biodegradable plastics synthesized by microorganisms. *Microbiology*, 1994, **21**(5): 297 ~ 303

[2] CHOI J L, LEE S Y. High-level Production of Poly (3-Hydroxybutyrate-co-3-Hydroxyvalerate) by Feb-Batch Culture of Recombinant *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol*, 1999, **65**(10): 4363 ~ 4368

[3] Doi Y. Microbial Polyesters. VCH, New York, 1990.

[4] Bruce A R, Kanda L, Claude C *et al*. Production of Poly (β-Hydroxybutyric-co-β-Hydroxyvaleric) Acids. *Appl Environ Microbiol*. 1990, **56**(7): 2093 ~ 2098

[5] Kim B S, Lee S C, Lee S Y *et al*. Production of Poly (3-Hydroxybutyric-co-3-Hydroxyvyvaleric acid) by fed-batch culture of *Alcaligenes entrophus* with substrate control using on-line glucose analyzer. *Enzyme Microb Technol*. 1994, **16**: 556 ~ 561

[6] ZHAO L Q(赵良启), TIAN J S(田杰生) *et al*. Studies on fermentation of synthesizing Poly (Hydroxybutyrate-co-Hydroxyvalerate) by *Xanthobacter Autotrophicus*. *ACTA Microbiologica Sinica*. 1996, **36**(6): 351 ~ 359

[7] Braunegg G, B Sonnleitner, R M Lafferty. A rapid gas chromatographic method for the determination of poly-β-hydroxybutyric acid in microbial biomass. *Eur J Appl Microbiol Biotechnol*, 1978, **6**: 29 ~ 37

[8] WENG W Q(翁维琦), YI Z H(易祖华) *et al*. Studies on copolyer consisting of 3-Hydroxybutyrate and 3-Hydroxyvalerate by the mutant 65-7 of *Alcaligenes entrophus*. *Microbiology*, 1995, **22**(5): 271 ~ 275

High-level Production of Poly (3-Hydroxybutyrate-co-3-Hydroxyvalerate) by Feb-batch Culture of *Alcaligenes eutrophus*

CAI Yi-Bin LIU Mo-Qing YI Zu-Hua CHEN Qi WENG Wei-Qi*

(*Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing* 100081, *China*)

Abstract Fermentation strategies for production P (3HB-co-3HV) from glucose and propionic (or valeric) acid by *Alcaligenes eutrophus* were studied. During the culture, we controlled pH of the broth by feeding precusors of 3HV- propionic or valeric acid after Ammonia feeding stopped. When propionic acid were used as the precusor, for 50 hours, we obtained a cell dry weight, a P (3HB-co-3HV) concentration, a P(3HB-co-3HV) content and a 3HV fraction of 149.9g/L, 124.9g/L, 83.3% and 12.4mol%, respectively, with a PHA productivity of 2.50 $gh^{-1}L^{-1}$. When valeric acid were used as the precusor, for 45 hours, we obtained a cell dry weight, a P(3HB-co-3HV) concentration, a P(3HB-co-3HV) content and a 3HV fraction of 160.2g/L, 119.0g/L, 74.2% and 17.7mol%, respectively, with a PHA productivity of 2.64 $gh^{-1}L^{-1}$. Prior to this study, it hasn't been reported to obtain such high level productivity and 3HV fraction at the same time by *Alcaligenes eutrophus*.

Key words *Alcaligenes eutrophus*, P(3HB-co-3HV), productivity

Received: March 9, 2001

This work was supported by the Grant from the National "9th five-year project" of Key Problem of China(96-C03-03-02).

Corresponding author. Tel: 86-10-62564697; Fax: 86-10-62560912; E-mail: wengwq@sun.im.ac.cn

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