

氮源流加对 *Alcaligenes eutrophus* 积累 聚 β -羟基丁酸的影响*

堵国成 陈 坚 尹洪波 高海军 伦世仪

(无锡轻工大学 生物工程学院 无锡 214036)

摘 要:以真养产碱杆菌(*Alcaligenes eutrophus*)为聚 β -羟基丁酸(PHB)的生产菌株,在分析了 PHB 发酵过程参数变化的基础上,进一步探讨了 PHB 合成期不同的硫酸铵流加速率对 PHB 合成的影响。研究表明,在 PHB 合成阶段,培养基中氮源的完全缺乏,导致细胞合成 PHB 能力的下降;在 PHB 合成期,不同的氮源流加速率对 PHB 合成过程存在着显著的影响,当流加速率较小时,尽管最终胞内 PHB 含量很高,但细胞干重、PHB 浓度和 PHB 生产强度都较低。当氮源流加速率过大时,会导致最终胞内 PHB 含量显著下降,使 PHB 浓度和 PHB 生产强度降低。当硫酸铵流加速率在 0.5g/h 左右时,可以得到较好的发酵效果。

关键词:真养产碱杆菌,聚 β -羟基丁酸,流加,积累

中图分类号: TQ92 文献标识码: B 文章编号: 0001-6209(2000)03-0290-95

聚 β -羟基丁酸(Polyhydroxybutyric acid,简称 PHB)是某些微生物在其营养不平衡时所积累的一类胞内碳源和能源的贮存物^[1]。由于 PHB 在具有与合成塑料聚丙烯相似性质的同时,还具有生物可相容性和生物可降解性,因此将广泛应用于包装、医疗、食品、化妆品等行业^[2],因而其正成为目前开发生物可降解材料的研究热点之一。近年来国内在 PHB 生物合成菌种及工艺条件方面均进行了大量研究^[3-7]。但与化工合成的塑料相比,PHB 的生产成本很高^[8],所以许多科研人员一直在致力于降低 PHB 生产成本的研究,以提高其市场竞争力。降低 PHB 的生产成本主要可通过其发酵成本和提取成本来实现,如提高 PHB 的生产率(包括选育高产菌株、采用合适发酵生产方式等),采用廉价基质以及改进提取、纯化技术(如不采用溶剂,简化提取步骤等),其中采用适宜的发酵生产方式是提高 PHB 的生产率和改进其质量的关键^[9]。本文在分析 PHB 发酵过程参数变化的基础上,结合 PHB 发酵生产的特点,进一步研究了 PHB 合成期不同的硫酸铵流加速率对 PHB 合成的影响,以期能得出较佳的限氮流加策略,提高 PHB 的生产率,降低其生产成本。

1 材料和方法

1.1 菌种

真养产碱杆菌(*Alcaligenes eutrophus*) WSH3(本研究室保藏)。

1.2 培养基

1.2.1 斜面培养基、种子培养基和无机元素液:与文献[10]相同。

* 国家自然科学基金项目(29677011) 轻工总会科技基金项目(95039)

作者简介 堵国成(1965-)男,江苏常州人,无锡轻工大学生物工程学院副教授,博士,研究方向为生物工程及环境生物技术

收稿日期:1998-11-24,修回日期:1999-06-08© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

1.2.2 发酵培养基:无机元素液中添加硫酸铵为氮源、葡萄糖为碳源, $pH7.0$ 。

1.3 培养方法

1.3.1 种子培养方法:见文献 [10]。

1.3.2 PHB 流加发酵过程的控制:2L 小罐(瑞士 INFOR 2L 台式发酵罐)装液量为 1.2L, 初糖浓度 2%、初始硫酸铵浓度 0.2%, 接种量为 10%, 通气量为 1.2~1.5vvm, 搅拌转速为 600~1200r/min, 以控制溶氧百分浓度在 20% 以上, 发酵温度(30 ± 0.5) $^{\circ}C$, 中间补加 50% 的葡萄糖溶液, 并控制适宜的流速, 维持葡萄糖浓度在 1%~2%。在菌体生长阶段, 以 28% 的氨水作为调节 pH 值和中间补氮的手段, pH 值控制在 7.0 ± 0.1 ; 在 PHB 合成阶段, 以 3mol/L 的 NaOH 代替氨水调节 pH 值, 为了研究 NH_4^+ 浓度对 PHB 合成过程的影响, 采用不同的硫酸铵流加速率进行氮源的流加, 其流加速率分别为 0g/h、0.25g/h、0.50g/h、0.75g/h、1.0g/h 和 1.25g/h。

1.4 分析方法

1.4.1 铵离子浓度的测定:采用修正的 Berthelot 反应法 [11]。

1.4.2 葡萄糖含量的测定:3,5-二硝基水杨酸法。

1.4.3 细胞生长量的测定:取发酵液 4.5mL, 6000r/min 离心 5min, 水洗 2 次, 真空干燥, 称重。

1.4.4 PHB 含量的测定:气相色谱法 [12]。

2 结果和讨论

2.1 PHB 发酵过程分析

在采用真养产碱杆菌合成 PHB 的过程中发现, PHB 发酵过程的前期主要为菌体生长阶段, 当培养基中氮源限制或缺乏时, 细胞进入 PHB 合成期, 开始大量合成 PHB; 且当细胞干重达到 25g/L 左右时, 停止氨水的流加, 最终可以得到较高的细胞干重和 PHB 浓度 [13]。

从图 1 中可以看出, 26h 停加氨水时, 培养液中所积累的 NH_4^+ 浓度为 0.91g/L, 随后

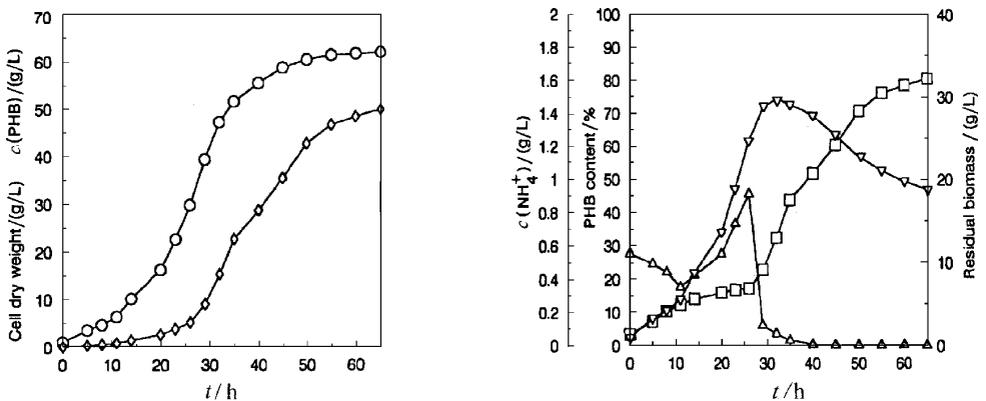


图 1 停加氨水时, 细胞干重、PHB 浓度、PHB 含量、 NH_4^+ 浓度和残留菌体浓度随时间的变化

Fig. 1 Changes of cell dry weight, PHB concentration, PHB content, ammonium ion and residual biomass when ammonia solution feeding was stopped at 26h

○ Cell weight; ◇ PHB concentration; □ PHB content; △ NH_4^+ ; ▽ Residual biomass.

NH_4^+ 浓度很快被细胞所消耗,当浓度基本接近零时,细胞生长停止,残留菌体浓度(残留菌体浓度 = 细胞干重 - PHB 浓度)不断下降。此时细胞开始大量积累 PHB,最终胞内 PHB 含量达到 80.5%,PHB 浓度达到 49.0g/L,细胞干重达到 61.9g/L。

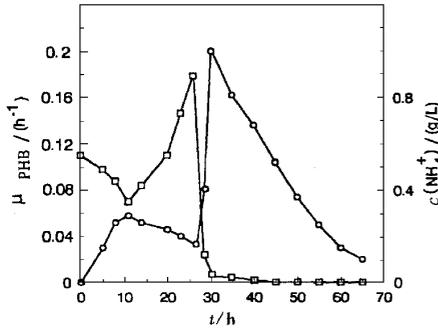


图2 PHB 生成比速和铵离子浓度随时间的变化关系

Fig.2 Changes of PHB specific synthetic rate and ammonium ion

□ NH_4^+ ; ○ μ_{PHB} .

中发现,当培养基中 NH_4^+ 浓度达到检测限以下时,PHB 的生成速率达到最大值,随着时间的进行很快下降至零。因而如能在停止氨水流加后,限量地补加氮源,使得 PHB 合成相关酶能较长时间地保持高活性,以延缓 PHB 生成比速下降的速率,缩短达到较高胞内 PHB 含量所需的时间,提高 PHB 的生产强度。

2.2 在 PHB 合成期不同硫酸铵流加速率对 PHB 形成的影响

从前面的研究结果可知,在 PHB 合成阶段,如果培养基中的氮源完全缺乏,PHB 合成比速达到最大值后会迅速下降,而限氮流加则可减缓 PHB 合成比速下降的速率。为了研究 PHB 发酵过程中控制不同氮源流速对 PHB 合成的影响,在停止氨水流加后的 PHB 合成阶段,采用一系列不同的硫酸铵流加速率进行限氮流加试验,结果见图 3 和图 4。

从图 2 看出,在菌体生长的最初阶段,PHB 合成比速(μ_{PHB})随氮源浓度的下降而增大,随着氨水的加入,培养基中的 NH_4^+ 浓度迅速增加,导致 PHB 的合成比速逐渐下降,停加氨水后,培养基中的 NH_4^+ 消耗很快,停加氨水后 2h,培养基中的 NH_4^+ 下降至细胞生长限制浓度以下(NH_4^+ 浓度小于 0.14g/L),与此同时,PHB 合成比速迅速增加,当 NH_4^+ 浓度接近零时,PHB 合成比速上升至最大值(0.20h^{-1}) 随后呈线性下降,这可能是随着时间的进行,由于培养基中氮源的完全缺乏,菌体活力下降,细胞中 PHB 合成的相关酶不断失活,使得细胞合成 PHB 的能力下降。Sonnleitner B.^[14]等在以氢、氧和二氧化碳为基质培养 *A. eutrophus* 过程中

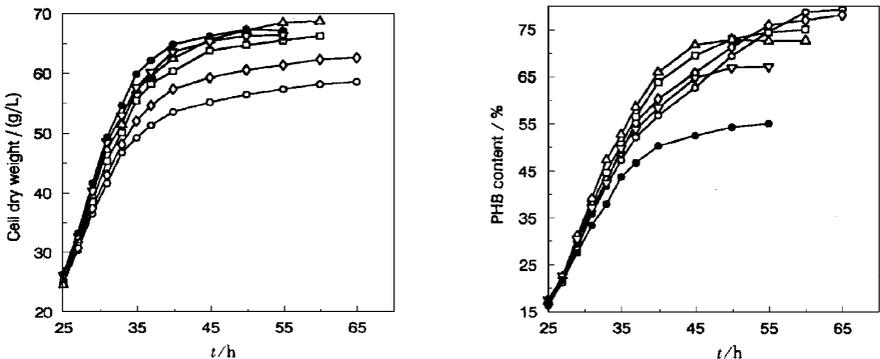


图3 停加氨水后,不同的硫酸铵流加速率对细胞干重(左)和 PHB 含量(右)的影响

Fig.3 Effects of different ammonium sulfate feeding rates on cell dry weight and PHB content after the stop of ammonia solution feeding

Ammonium sulfate feeding rate ○ 0g/h; □ 0.25g/h; △ 0.5g/h; ● 1g/h; ■ 2.5g/h

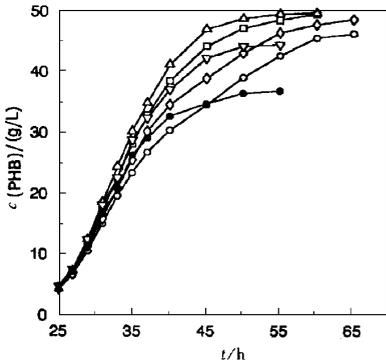


图4 不同硫酸铵流加速率对 PHB 浓度的影响

Fig. 4 Effect of different ammonium sulfate feeding rates on PHB concentration

Ammonium sulfate feeding rate \circ 0g/h; \diamond 0.25g/h; \square 0.5g/h; \triangle 0.75g/h; ∇ 1.0g/h; \bullet 1.25g/h.

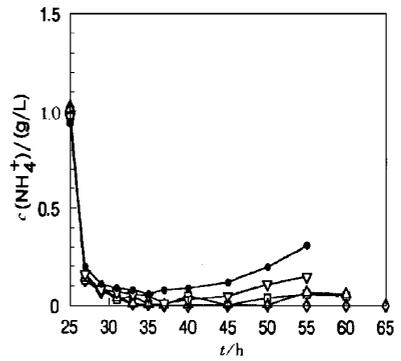


图5 不同硫酸铵流加速率下 NH_4^+ 浓度的变化

Fig. 5 Changes of NH_4^+ concentration at different ammonium sulfate feeding rates

Ammonium sulfate feeding rate \circ 0g/h; \diamond 0.25g/h; \square 0.5g/h; \triangle 0.75g/h; ∇ 1.0g/h; \bullet 1.25g/h.

从图3~4中可以看出,在硫酸铵的流加速率为0.75g/h时可得到最大细胞干重; PHB含量随硫酸铵流加速率的增加而减小,可见在PHB积累阶段所流加的硫酸铵的量越小,最终菌体中PHB的含量就越高;当硫酸铵的流加速率分别为0.25g/h、0.50g/h和0.75g/h时,所获得PHB浓度相差无几。

从图5看出,当硫酸铵的流加速率很低时,在整个PHB积累阶段, NH_4^+ 浓度几乎为零。随着硫酸铵流加速率的增加,发酵液中所积累的 NH_4^+ 浓度也逐渐增大,当硫酸铵的流加速率为1.0g/h和1.25g/h时,发酵液中 NH_4^+ 的积累很明显, NH_4^+ 浓度的上升影响了细胞内PHB的合成,尽管最终细胞干重略高,但胞内PHB含量和PHB浓度却较低。

2.3 PHB合成比速与硫酸铵流加速率的关系

图6为停止流加氨水后,不同硫酸铵的流加速率对PHB合成比速的影响。从图中可以看出,停止流加氨水后,PHB的生成比速在4h左右即达到最大值,硫酸铵的流加速率不同,PHB合成比速所达到的最大值也不相同,硫酸铵的流加速率越小, μ_{PHB} 的最大值越大,其值分别为 0.2h^{-1} 、 0.176h^{-1} 、 0.15h^{-1} 、 0.144h^{-1} 、 0.12h^{-1} 和 0.084h^{-1} ; μ_{PHB} 达到最大值后,呈线性下降趋势,且下降的快慢程度与硫酸铵的流加速率有关,其流加速率越大, μ_{PHB} 下降的速率越慢。由此可见,当硫酸铵的流加速率较大时,尽管可以得到较大的 μ_{PHB} 值,但其随后的下降速度很快;当硫酸铵的流加速率较大时,尽管 μ_{PHB} 下降速度较慢,但 μ_{PHB} 所能达到的最大值却相对较小;另外,从图中还可以看出,当硫酸铵的流加速率为1.0g/h和1.25g/h时,由于发酵液中氨离子的逐渐积累,使 μ_{PHB} 在PHB的合成后期下降较快,因

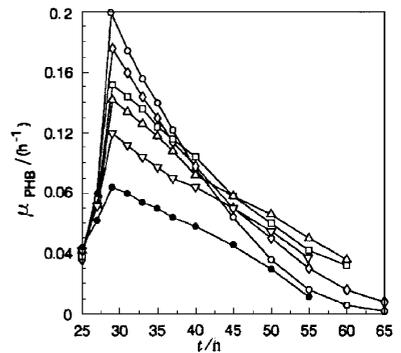


图6 不同的硫酸铵流加速率对 PHB 生成比速的影响

Fig. 6 Effects of different ammonium sulfate feeding rates on PHB specific synthetic rate
Ammonium sulfate feeding rate :
 \circ 0g/h; \diamond 0.25g/h; \square 0.5g/h;
 \triangle 0.75g/h; ∇ 1.0g/h; \bullet 1.25g/h.

而,在 PHB 合成前期,采用较大的硫酸铵流速有利于胞内 PHB 的快速积累,而在中后期应降低硫酸铵的流加速率,防止培养液铵离子的积累,以提高最终细胞内的 PHB 含量。

由此可见,在 PHB 积累阶段,控制适宜的硫酸铵流加速率非常重要,并且在停加氨水后至 μ_{PHB} 达到最大值期间,硫酸铵的流加速率应为零,这样可获得最大的 μ_{PHB} ,随后硫酸铵流加速率应控制在某一确当的范围,使 μ_{PHB} 缓慢下降,这样就有可能在同样的时间内获得较高的 PHB 含量、PHB 浓度和 PHB 生产强度。

2.4 不同硫酸铵流加速率对 PHB 生产强度和产率系数的影响

图 7 为停止加氨水后,不同的硫酸铵流加速率与最终 PHB 生产强度和 PHB 对葡萄糖

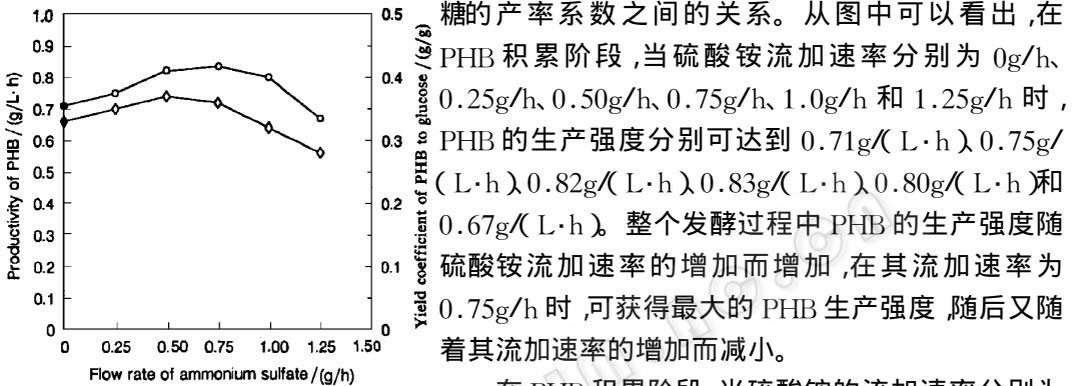


图 7 不同的硫酸铵流加速率与 PHB 生产强度和 PHB 对葡萄糖产率系数的关系

Fig. 7 Effects of different ammonium sulfate feeding rates on PHB productivity and yield coefficient of PHB to glucose
 ○ Productivity of PHB;
 ◇ Yield coefficient of PHB to glucose.

糖的产率系数之间的关系。从图中可以看出,在 PHB 积累阶段,当硫酸铵流加速率分别为 0g/h、0.25g/h、0.50g/h、0.75g/h、1.0g/h 和 1.25g/h 时,PHB 的生产强度分别可达到 0.71g/(L·h)、0.75g/(L·h)、0.82g/(L·h)、0.83g/(L·h)、0.80g/(L·h) 和 0.67g/(L·h)。整个发酵过程中 PHB 的生产强度随硫酸铵流加速率的增加而增加,在其流加速率为 0.75g/h 时,可获得最大的 PHB 生产强度,随后又随着其流加速率的增加而减小。

在 PHB 积累阶段,当硫酸铵的流加速率分别为 0g/h、0.25g/h、0.50g/h、0.75g/h、1.0g/h 和 1.25g/h 时,所获得的 PHB 对葡萄糖的产率系数分别为 0.33g/g、0.35g/g、0.37g/g、0.36g/g、0.32g/g 和 0.28g/g。当硫酸铵流加速率较小时,PHB 对葡萄糖的产率系数随其流加速率的增加而增加,在硫酸铵流加速率为 0.50g/h 时产率系数达到最大值,随后又随着其流加速率的增加而下降。

从上述的结果分析可以看出,在 PHB 发酵过程中的 PHB 合成期,为了有效地使细胞积累 PHB,必须采用较高的硫酸铵流加速率,使 PHB 合成比速的下降速率较小,以较长时间地保持较高的 PHB 合成比速,缩短 PHB 合成阶段所需的时间,提高 PHB 的生产强度;另一方面,为了得到较高的胞内 PHB 含量,提高 PHB 浓度,硫酸铵的流加速率必须设置在较小的值。因而,在 PHB 合成期,硫酸铵的流加速率需随时间而不断变化,在 PHB 合成初期,为保证获得较高的 PHB 合成比速,应采用较大的硫酸铵流加速率,而在 PHB 合成阶段的中后期,为了获得较高的胞内 PHB 含量,应采用较小的硫酸铵流加速率,这样才能在最短的时间内得到最大的 PHB 浓度,有关基质流加优化策略的确定正在进一步的研究之中。

参 考 文 献

- [1] Bitar A, Underhill S. *Biotechnology Letters*, 1990, 12(8): 563 ~ 568.
 [2] 易祖华, 黄和容, 翁维琦, 等. 微生物学通报. 1995, 22(1): 29. 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

- [3] 徐 浩,江慧修,周惠玲,等.微生物学报,1991,31(5):333~337.
- [4] 王 丽.微生物学报,1993,33(1):48~53.
- [5] 文 欣,庄国强,郑士民.微生物学报,1995,35(2):115~120.
- [6] 钱新民,王宇新,常 钟.微生物学报,1995,35(6):438~441.
- [7] 赵良启,田杰生,吴柏和,等.微生物学报,1996,36(5):351~359.
- [8] Kim B S, Lee S C, Lee S Y, et al. *Biotechnol and Bioengin*, 1994, 43: 892~898.
- [9] 堵国成,陈坚,高海军,等.生物技术,1996,4(4):5~10.
- [10] 堵国成,陈坚,高海军,等.应用与环境生物学报,1996,2(3):308~314.
- [11] Steinbuchel A, Hans G S. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1989, 31: 168~175.
- [12] 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.北京:化学工业出版社,1996.245~249.
- [13] 堵国成. *Alcaligenes eutrophus* 生物合成聚 β -羟基烷酸 (PHAs) 的研究.博士学位论文.无锡轻工大学,1997.
- [14] Sonnleitner B, Heinzle E, et al. *Eur J Appl Microbiol Biotechnol*, 1979, 7: 1~10.

EFFECTS OF NITROGEN FEEDING ON THE ACCUMULATION OF POLY- β -HYDROXYBUTYRATE WITH *ALCALIGENES EUTROPHUS* *

Du Guocheng Chen Jian Yin Hongbo Gao Haijun Lun Shiyi
(School of Biotechnology, Wuxi University of Light Industry, Wuxi 214036)

Abstract : On the basis of analysis of PHB fermentation processes, the effects of ammonium sulfate feeding rate at PHB formation period on the PHB accumulation by *Alcaligenes eutrophus* were investigated. It was shown that the complete absence of nitrogen source at PHB formation phase would lead to the decline of PHB synthetic activity, and the obvious influences of different nitrogen feeding rate on PHB synthesis were observed. Higher PHB content, but relative lower cell dry weight, PHB concentration and PHB productivity could be obtained at slower nitrogen feeding rate. The excessive nitrogen feeding rate resulted in the drop of PHB content, which led to the decrease of PHB concentration and PHB productivity. The better results could be achieved when the ammonium sulfate feeding rate was set at around 0.5g/h.

Key words : *Alcaligenes eutrophus*, Poly- β -hydroxybutyrate, Fed-batch, Accumulation

* Project Granted by Chinese National Science Fund(29677011), and Supported by Light Industry General Associate Science and Technology Fund Project(95039)