

利用微生物混合培养技术生产聚羟基烷酸(PHA)研究

张 圆 孙雪南 陈 邦 董兆麟*

(西北大学生命科学院 陕西省生物技术重点实验室 西安 710069)

摘 要 研究了圆褐固氮菌(*Azotobacter chroococcum*)突变株 G-3 与巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)G-6 发酵生产聚羟基烷酸(PHA)的人工可配伍性,确定了它们混合培养的适宜条件,先将 G-3 菌株发酵培养 24~28 h 后,再以 15%(v/v)接种量接入 G-6 菌株并同时补加 0.5%(g/g)蛋白胨(FP)和 0.5%(g/g)NH₄NO₃,继续混合培养 42~46 h,细胞干重达 32 g/L,PHA 含量为 80%,再结合补料技术最终生物量可达 53 g/L,PHA 产生量达 42.4 g/L。糖对 PHA 的转化率为 0.32。人工混合培养成功地解决了固氮菌发酵生产 PHA 过程中,发酵液粘度过高,传质较差,补糖总量上不去等技术问题。

关键词 混合培养 生物量 PHA 圆褐固氮菌 巨大芽孢杆菌

中图分类号:Q93-335 文献标识码:A 文章编号:0001-6209(2003)06-0799-06

聚羟基烷酸(Polyhydroxyalkanoates,简称 PHA)是许多微生物合成的胞内能量和碳源贮藏物质^[1]。此物质是一种聚脂类物质,具有热塑性。同化学合成塑料相比,其不仅有很多相类似的理化性质,而且具有独特的生物可完全降解性。因此,它在替代化学合成塑料,消除“白色垃圾”对环境的污染,具有极为重要的意义。同时,PHA 生物合成还赋予它好的生物相容性、压电性等,它作为医疗植入和组织工程用可降解性高分子材料,也具有很好的发展前景。目前人们对 PHA 的研究开发多集中于 *Ralstonia*, *Azotobacter* 和 *Methylobacter* 中的某些种的单一菌株的纯培养^[2~4]。其中固氮菌以它产生的 PHA 分子量大,PHA 颗粒外无被膜使后续提取比较容易,而受到人们的关注。因此 20 世纪 80 年代,英国帝国化学公司(ICI)在工业规模生产 PHB 用菌株时,固氮菌也被初选为 3 种生产用菌株之一。但后因固氮菌在产 PHA 同时,还产荚膜多糖,给生产带来一些技术难题而被淘汰^[5]。本文报道了用固氮菌和产 PHA 的芽孢杆菌进行混合培养,通过芽孢菌向胞外分泌的多糖酶^[6],及时降解发酵液中的荚膜多糖,以改变固氮菌发酵生长过程中发酵液粘度高、传质较差、生长速度过低、糖的转化率不高等问题。

1 材料和方法

1.1 菌种

圆褐固氮菌(*Azotobacter chroococcum*)G-3 和巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)G-6,均来自本实验室。

基金项目:国家“863 计划”新材料领域(715-004-0160) 陕西教育厅重大产业化资助项目(01ZC03)

* 通讯作者。Tel:86-29-8302411; E-mail:zldong@nwnu.edu.cn.

作者简介:张 圆(1978-)女,湖南醴陵人,西北大学生命科学院硕士生,主要从事微生物工程和微生物次生代谢产物的研究。

收稿日期:2003-01-03,修回日期:2003-07-23

1.2 培养基

斜面培养基 :每升含甘露醇 20g ,K₂HPO₄ 1g ,MgSO₄·7H₂O 0.2g ,CaCO₃ 0.5g ,FeCl₃·7H₂O 0.25g ,Na₂MO₄·2H₂O 0.5g ,琼脂 15 g ,pH 7.2。液体培养基 :每升含蔗糖 20g ,K₂HPO₄ 0.8g ,KH₂PO₄ 0.2g ,MgSO₄·7H₂O 0.2g ,CaCO₃ 0.5g ,FeCl₃·7H₂O 0.125g ,Na₂MO₄·2H₂O 0.25g ,蛋白胨 (或 NH₄NO₃) 1g ,微量元素液 1 mL ,pH7.2。微量元素液 :H₃BO₃ 0.3g ,CoCl₂·6H₂O 0.2g ,ZnSO₄·7H₂O 0.1 g ,MnCl₂·4H₂O 30mg ,NiCl₂·6H₂O 30mg ,CuSO₄·5H₂O 10mg ,加水到 1000mL。

1.3 培养方式和条件

摇床培养 250 mL 三角瓶装培养液 30 ~ 40 mL ,30℃ ,220 r/min 进行培养。发酵罐培养 选用美国 VIRTIS 公司生产的 2L-G 型全自动发酵罐 ,温度 30℃ 自控 ,pH6.9 ~ 7.2 碱液间歇调控 ,初始搅拌速度和通气量分别为 600r/min 和 1:1 ,初始装液量 1.2 L ,接种量 10% (v/v) ,采用间歇补料方法进行培养 ,培养期间每隔一定时间测定罐内蔗糖浓度 ,当罐内蔗糖浓度降至 0.3% ~ 0.5%(g/g) 时 ,开启自动补料泵 ,用 30%(g/g) 蔗糖溶液补糖 ,使罐内蔗糖浓度保持在 2%(g/g) 左右。

1.4 分析方法

1.4.1 菌体生物量 :发酵液经离心(4000r/min) ,菌体水洗 1 ~ 2 次 ,乙醇洗一次 ,90℃ 恒温干燥 24h ,冷却后称量。

1.4.2 糖类测定 :蔗糖采用 Roe 测定法^[7] ,总糖采用蒽酮法^[8]。

1.4.3 PHA 的测定^[9] :定性采用苏丹黑 B 染色法 ,定量采用紫外分光光度计法。

1.4.4 发酵液粘度测定 :培养物经抽滤、除菌体 ,用乌氏粘度计测培养液的相对粘度^[10]。

1.5 正交实验

表 1 为正交实验设计方案。

表 1 正交试验因素和水平安排

Table 1 The arrangement of factors and levels of orthogonal design

| Level | Factor | | |
|-------|------------------------|----------------------|--|
| | G-6 inoculating time/h | Inoculating amount/% | Supplemental nitrogen source |
| 1 | 0 | 8 | 1% Peptone |
| 2 | 18 | 10 | 0.5% Peptone + 0.5 NH ₄ NO ₃ |
| 3 | 26 | 15 | 1% NH ₄ NO ₃ |

2 结果

2.1 圆褐固氮菌 G-3 菌株在人工发酵培养条件下的生长繁殖和积累 PHA 的规律

G-3 菌株分批补料发酵动态的研究 ,采用发酵罐培养方式进行。从图 1 可见 ,前期由于补料延长了细胞生长的对数期 ,使培养物的生物量迅速增加。但补料 3 次发酵至 26h 后 ,发酵液粘度急骤增加 ,使补料再无法进行下去。继续培养到 30h ,发酵液粘度达最高 ,测此时相对粘度为 4.71。同时 ,测其发酵液总糖量达 6% ,高粘度直接影响了营养物和氧的传递 ,使后期生物量没有明显变化。为了提高菌体 PHA 的产率 ,发酵至 36h 后 ,通过降低通气量 ,停止补加碱液 ,当 PH 值自然降至 6.5 时 ,菌体积累 PHA 迅速。至 42h PHA 占细胞干重的 80%(g/g) ,细胞干重最后达 18g/L ,细胞中 PHA 的生成速率为 0.36g/L·h。

2.2 巨大芽孢杆菌 G-6 菌株适宜的培养条件

上述发酵过程发酵液粘度增加的原因,主要是圆褐固氮菌在生长繁殖过程中向胞外分泌荚膜多糖所致。为了能够及时降解发酵液中的荚膜多糖,消除或减轻发酵液的粘度,我们采用能向胞外分泌多糖酶的芽孢杆菌^[6]与固氮菌混合培养,来解决这一问题。通过多株芽孢菌的初筛,实验发现巨大芽孢杆菌 G-6 菌株,在培养过程中,具有降解圆褐固氮菌 G-3 菌株荚膜多糖的特性。实验分两组进行,第一组在液体培养基中接入 G-6 菌株,第二组将 G-3 菌株培养至 26 h 的培养物灭菌后,接入 G-6 菌株,两组均在 30℃ 条件下进行摇床培养,并每隔一定时间测其各组培养物的菌体重量。由表 2 可见,在 16h 细胞干重均达到最大值,Ⅰ和Ⅱ组的最大值分别为 2.60g/L 和 8.8g/L,考虑到初始培养液中细胞量,两组细胞干重的净增长值分别为 2.51g/L 和 3.40g/L。芽孢菌 G-6 菌株在 G-3 菌株灭活培养液中生长情况良好,生物量比Ⅰ组有较大幅度的增加。又有实验证明,芽孢菌 G-6 菌株能很好的利用葡萄糖,而不易利用蔗糖、果糖等。由此推测,固氮菌 G-3 菌株产生的荚膜多糖,可能以葡聚糖为主。因此,芽孢菌 G-6 菌株,生长所需碳源可能是 G-3 菌株在胞外形成的多糖物质,其氮源、pH 值与 G-3 菌株相同。

表 2 巨大芽孢杆菌在不同培养液中生长情况的比较

| Table 2 The growth of <i>B. megaterium</i> G-6 in different culture medium | | | | | | | | |
|--|----|------|------|------|------|------|------|------|
| Culture time/h | | 0 | 4 | 8 | 12 | 14 | 16 | 18 |
| Dry cell weight (g/L) | I | 0.09 | 1.60 | 1.90 | 2.20 | 2.40 | 2.60 | 2.50 |
| | II | 5.40 | 6.10 | 6.80 | 7.20 | 8.60 | 8.80 | 8.50 |

Ⅰ. Liquid culture medium; Ⅱ. Sterilized G-3 culture Solution.

2.3 G-3 菌株和 G-6 菌株的可配伍性

从上述实验结果可知 G-6 菌株生长所需的碳源、氮源及 pH 值与 G-3 菌株具有配伍性。根据配伍性,设计混合培养方案为:G-3 菌株先在 2%(g/g)蔗糖为碳源的液体培养基培养至 26h,其间分两次补入 1.5g 蔗糖,再接入 10%(v/v) G-6 菌株种子培养物,同时加 NH₄NO₃ 和蛋白胨培养至 42h。对照分别为相同条件下的 G-3 菌株和 G-6 菌株单独培养在液体培养基中(表 3)。由表 3 可知,混合培养有利于培养菌株提高生物量和

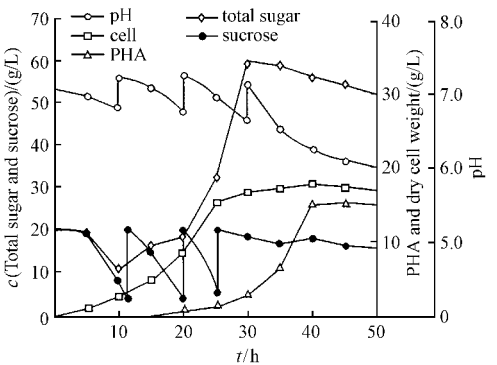


图 1 固氮菌 G-3 菌株生长繁殖和积累 PHA 的规律

Fig.1 Growing and PHA accumulating of *A. chroococcum* G-3

表 2 巨大芽孢杆菌在不同培养液中生长情况的比较

| Table 2 The growth of <i>B. megaterium</i> G-6 in different culture medium | | | | | | | | |
|--|----|------|------|------|------|------|------|------|
| Culture time/h | | 0 | 4 | 8 | 12 | 14 | 16 | 18 |
| Dry cell weight (g/L) | I | 0.09 | 1.60 | 1.90 | 2.20 | 2.40 | 2.60 | 2.50 |
| | II | 5.40 | 6.10 | 6.80 | 7.20 | 8.60 | 8.80 | 8.50 |

Ⅰ. Liquid culture medium; Ⅱ. Sterilized G-3 culture Solution.

2.3 G-3 菌株和 G-6 菌株的可配伍性

从上述实验结果可知 G-6 菌株生长所需的碳源、氮源及 pH 值与 G-3 菌株具有配伍性。根据配伍性,设计混合培养方案为:G-3 菌株先在 2%(g/g)蔗糖为碳源的液体培养基培养至 26h,其间分两次补入 1.5g 蔗糖,再接入 10%(v/v) G-6 菌株种子培养物,同时加 NH₄NO₃ 和蛋白胨培养至 42h。对照分别为相同条件下的 G-3 菌株和 G-6 菌株单独培养在液体培养基中(表 3)。由表 3 可知,混合培养有利于培养菌株提高生物量和

表 3 单独和混合培养 G-3 菌株与 G-6 菌株的生长和 PHA 的积累

Table 3 The growth and PHA accumulation of mixed and single culture of G-3 and G-6

| Strain | Culture time/h | Dry cell weight(g/L) | Content of PHA/% | Y _{s/s} |
|-----------|----------------|----------------------|------------------|------------------|
| G-3 | 42 | 14.8 | 80 | 0.37 |
| G-6 | 16 | 1.2 | 21 | 0.05 |
| G-6 + G-3 | 42 | 17.9 | 81 | 0.45 |

PHA 的产率。G-6 菌株和 G-3 菌株在混合培养中分别比单独培养生长良好。混合培养的培养液粘度 经测定相对粘度为 1.51 粘度降低了 68% 解除了对菌体生长繁殖的抑制作用 增加了菌体的生物量和后期补糖的机会 ,说明这两株菌具有良好、稳定的配伍性。

2.4 混合培养的适宜条件

G-3 菌株和 G-6 菌株的混合培养 ,以 G-3 菌株的培养为主 ,G-6 菌株主要是利用 G-3 菌株在培养过程中积累的多糖物质进行生长。G-6 菌株接入 G-3 菌株培养物中的时间、接种量、氮源为因素利用正交试验优化混合培养条件 ,实验结果及分析计算见表 4。氮源是混合菌株积累 PHA 和生长繁殖的主要因素。G-6 菌株接入 G-3 培养液中的时间对混合菌株生长繁殖影响显著。从 PHA 总产量考虑 ,试验的 A₃B₃C₂ 效果最好 ,当 G-3 菌株培养 26h 后将 G-6 菌株以 15%(v/v)接种量接入并同时补加 0.5%(g/g)蛋白胨和 0.5%(g/g)NH₄NO₃ 时 ,菌体产量为 14.2 g/L ,PHA 产量为 11.36 g/L。

表 4 混合培养正交分析计算表

| Table 4 The orthogonal analysis of mixed culture | | | | | | |
|--|-----------------------|-----------------------|--|--------------------|------------|----------------|
| Experi- mental no. | Inoculating time/h | Inoculating amount | Supplemental nitrogen source amount | Biomass (g/L) | PHA / % | PHA (g/L) |
| 1 | 1 | 1 | 1 | 10.6 | 67 | 7.1 |
| 2 | 1 | 2 | 2 | 13.2 | 77 | 10.16 |
| 3 | 1 | 3 | 3 | 11.4 | 77 | 8.78 |
| 4 | 2 | 1 | 2 | 13 | 70 | 9.1 |
| 5 | 2 | 2 | 3 | 10.6 | 75 | 7.95 |
| 6 | 2 | 3 | 1 | 11.4 | 70 | 7.98 |
| 7 | 3 | 1 | 3 | 11 | 78 | 8.58 |
| 8 | 3 | 2 | 1 | 11.2 | 80 | 8.96 |
| 9 | 3 | 3 | 2 | 14.2 | 83 | 11.73 |
| K ₁ | 35.2 | 34.6 | 33.2 | | | |
| K ₂ | 35.0 | 35.0 | 40.2 | | | |
| K ₃ | 36.4 | 37.0 | 33.0 | | | |
| k ₁ | 11.73 | 11.53 | 11.05 | | | |
| k ₂ | 11.66 | 11.66 | 13.4 | | | |
| k ₃ | 12.13 | 12.33 | 11.00 | | | |
| R | 0.47 | 0.8 | 2.4 | | | |
| I | 26.04 | 24.78 | 24.03 | | | |
| II | 25.02 | 27.06 | 30.99 | | | |
| III | 29.25 | 28.47 | 25.29 | | | |
| $\frac{I}{3}$ | 8.68 | 8.26 | 8.01 | | | |
| $\frac{II}{3}$ | 8.34 | 9.02 | 10.33 | | | |
| $\frac{III}{3}$ | 9.75 | 9.49 | 8.43 | | | |
| R | 1.41 | 1.23 | 2.32 | | | |

2.5 对混合培养发酵生产 PHA 的动态研究

根据上述实验确定的混合培养条件,混合培养采用 2L 全自动发酵罐进行补料分批发酵实验。起始培养条件:装量 1000mL 发酵培养基,起始糖浓度为 2%,起始 pH 值 7.2,通气量 1:1,搅拌速度 600r/min,温度 30℃,培养周期 42~46h,培养期间分 3 次进行补料,最终补糖总浓度为 7%,并根据发酵液的粘度,选用合适时间接种 15%(v/v)的 G-6 菌株进行混合培养。混合培养期间对发酵液的粘度、蔗糖浓度、总糖浓度、pH 值、生物量和 PHA 的产量,定时检测(图 2)。接入 G-6 菌株(图中箭头表示接入 15%(v/v) G-6 菌株时间)后,继续培养至 32~34h 后,发酵液变稀,测其相对粘度降到 1.5 以下,此时发酵液总糖浓度也急剧下降,延长了混合菌株的对数生长期。继续发酵至 36h 后,降低通气量,调节搅拌速度为 300r/min。停止补加碱液,当 pH 自然降至 6.5 以下时,PHA 积累迅速,发酵至 42~46h 后,当糖浓度降至 0.3%(g/g),停止发酵。最终发酵生物量达 32g/L,PHA 占细胞干重的 80%,产生量为 26.65g/L,糖对 PHA 的转化率为 0.38。明显提高了菌株的生长速率和 PHA 的产率。

2.6 补糖量对混合培养的影响

从上述结果可知,混合培养能解决 G-3 菌株因发酵液粘度过大总糖浓度过高,而引起的对菌体生长的抑制作用,为进一步通过增加补糖次数和提高补糖量,来增加菌体的生物量和增大 PHA 的积累量提供了条件。表 5 是混合培养至 32h 后又增加了 2 次补糖,使最终补糖次数增加到 5 次,最终总补糖量提高到 13%(g/g),菌体量最多达 53g/L,PHA 量达 42.4g/L,糖对 PHA 的转化率稳定在 0.32 左右。

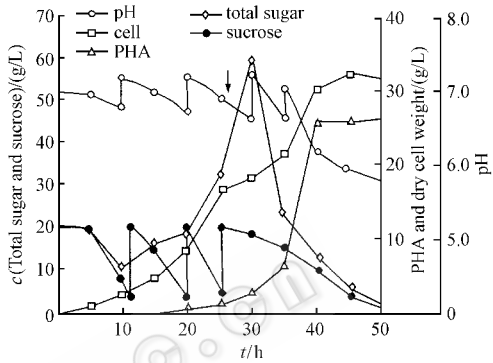


图 2 混合培养的动态研究

Fig.2 The dynamic research of mixed culture

表 5 增加混合培养补糖次数和补糖量的实验结果

| Table 5 The results of increasing the supplemental times and sucrose amounts in the mixed culture | | | |
|---|------------------|---------------------------|-----------------------|
| Total sucrose /% | Biomass (g/L) | Production of PHA(g/L) | Conversion rate /% |
| 5 | 23 | 18.03 | 36 |
| 7 | 32 | 25.63 | 36 |
| 10 | 45 | 35.10 | 35 |
| 13 | 53 | 42.40 | 32 |

3 讨论

圆褐固氮菌在生长繁殖过程中能产生大量的多糖物质作为它们荚膜物质的主要组成部分。因此,在采用圆褐固氮菌进行分批补料生产 PHA 的发酵过程中,补糖越多荚膜物质积累越多。荚膜物质积累达一定值时,影响发酵体系的氧和营养物质传递,抑制了菌的生长繁殖。巨大芽孢杆菌生长繁殖过程中,通过自身的代谢活动能向胞外分泌多糖酶。此酶能将环境内的多糖物质降解成单糖或双糖,作为芽孢杆菌自身的营养物质而利用,并将多余的糖在体内转变成 PHA 的形式积累起来。

根据上述两类菌各自的生理特性和它们均能产生 PHA 的优点。我们选用圆褐固氮

菌 G-3 菌株和巨大芽孢杆菌 G-6 菌株进行混合培养生产 PHA ,就是通过他们的糖代谢把这两株菌联系起来。在此混合培养体系中 ,利用蔗糖的圆褐固氮菌 G-3 菌株和产多糖酶的巨大芽孢杆 G-6 菌株形成代谢偶联。G-3 菌株在利用蔗糖的情况下积累多糖物质 ,作为 G-6 菌株生长所需的碳源。而 G-6 菌株在利用多糖物质作为营养进行生长繁殖的同时降低了发酵液的粘度 ,改善了发酵液的传质 ,为 G-3 菌株继续生长繁殖提供了良好的环境 ,增加了发酵过程中的补糖次数和最终补糖量 ,进一步提高了发酵生物量和 PHA 的产率。为固氮菌继续作为 PHA 研究开发的优良菌株 ,提供了一定的技术基础。

参 考 文 献

- [1] Anderson A J ,Dawes E A. Occurrence ,metabolism ,metabolic role ,and industrial use of bacterial polyh ydroxyalkanoates. *Microbiol Rev* ,1990 ,**54** :450 ~ 472.
- [2] Roland D ,Bernard W ,Thomas E. Accumulation of Poly[(R)-3-Hydroxyalkanoates]in *Pseudomonas oleovorans* during growth with octanoate in continuous culture at different dilution rates. *Applied and Environmental Microbiology* ,2000 ,**66** :3408 ~ 3414.
- [3] Liu S J ,Alexander S C. A novel genetically engineered pathway for synthesis of Poly (Hydroxyalkanoic Acids) in *Escherichia coli* . *Applied and Environmental Microbiology* 2000 ,**66** (2) :739 ~ 743.
- [4] Bernard W ,Qun R ,Nicolas S , *et al* . Properties of engineered Poly-3-Hydroxyalkanoates produced in recombinant *Escherichia coli* strains. *Applied and Enviromental Microbiology* 2000 ,**66** (4) :1311 ~ 1320.
- [5] 陈 琦 ,黄和容 ,易祖华 . 微生物合成生物降解塑料研究现状与展望 . 微生物学通报 ,1994 **21** (5) :297 ~ 303.
- [6] TD 布洛克 . 微生物生物学翻译组译 . 微生物生物学 . 北京 :人民教育出版社 ,1980. 493.
- [7] 蔡武城 ,袁厚积 . 生物物质常用化学分析法 . 北京 :科学出版社 ,1982. 15 ~ 16.
- [8] 北京大学生物系生物化学教研室 . 生物化学实验指导 . 北京 :高等教育出版社 ,1979. 30 ~ 31.
- [9] Ostle A G ,Holt J G. Nile blue A as a quorescent stain for Poly-*b*-hydroxybutyrate. *Applied and Environmental Microbiology* , 1982 ,**44** :238 ~ 241.
- [10] 孙尔康 ,徐维清 ,邱金恒 . 物理化学实验 . 南京 :南京大学出版社 ,1998. 108 ~ 109.

Production of Polyhydroxyalkanoates by a Mixed Culture

Zhang Yuan Sun Xuenan Chen Bang Dong Zhaolin*

(Life Science College of Northwest University ,Biotechnology Key Laboratory of Shanxi Province ,Xi 'an 710069 ,China)

Abstract : The feasibility of using a mixed culture of *A. chroococcum* G-3 and *B. megaterium* G-6 in the production of polyhydroxyalkanoates has been studied. The optimal conditions for the mixed culture were established. After the G-3 strain was incubated alone for 24 ~ 28 hours , the broth was inoculated with 15% (v/v) of the G-6 culture. 0.5% peptone and 0.5% NH_4NO_3 were added to the mixture. The mixed culture was proceed to 42 ~ 46 h. Final dry cell weight was up to 32 g/L and the content of PHA was up to 80% . Combined with the nutrient supplement , the dry cell weight increased to 53 g/L and the content of PHA increased to 42g/L. The conversion of sucrose to PHA is 0.32. The mixed culture solved the problems caused by the increase in viscosity , poor mass transfer , low supplemental sucrose amounts.

Key words : Mixed culture , Biomass , PHA , *Azotobacter chroococcum* , *Bacillus megaterium*

Foundation item : The new material field of " Chinese National Programs for High Technology Research and Development " (715-004-0160) ; the significant industrialization subsidy project of the Education Department of Shaanxi Province (01ZC03)

* Corresponding author . Tel : 86-29-8302411 ; E-mail : zldong@nwu . edu . cn

Received date : 01-03-2003

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