

# 真养产碱菌由丁酸积累聚 $\beta$ -羟基丁酸的研究\*

王 丽

(中国科学院微生物研究所,北京 100080)

清水浩 盐谷捨明 菅健一

(大阪大学,日本)

真养产碱菌 (*Alcaligenes eutrophus*) H16 (ATCC 17699) 能以丁酸为唯一碳源在无氮合成培养基中积累大量生物可降解的聚 $\beta$ -羟基丁酸 (PHB)。将此菌在丰富培养基中预培养 36 小时后转入无氮合成培养基中,在 30℃、pH8.0 条件下培养 48 小时,积累的 PHB 可达细胞干重的 63%(w/w)。较高浓度的丁酸对 PHB 的积累有抑制作用。采用丁酸自动流加法控制 pH 值的工艺可降低丁酸的抑制作用。此时 PHB 的产率达 0.4g/g 丁酸,PHB 比产生率 ( $\rho$ ) 达 0.1g·g 生物量<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>。

关键词 聚 $\beta$ -羟基丁酸 (PHB); 丁酸 (B. A.); 真养产碱菌

聚 $\beta$ -羟基丁酸是某些微生物贮存于胞内的一种生物可降解的大分子聚合物,其性质与目前普遍使用的合成塑料有许多相似之处。例如,PHB 可被塑造,可用无机物填充以增加其强度,可被拉成丝或制成不透气的薄膜等等,尤其因具有生物可降解特性,使聚 $\beta$ -羟基丁酸 (PHB) 在医学、药学等领域应用时更有其独特的优点。

自 1926 年首次发现 PHB 以来,各国学者对其进行了大量研究,包括产生 PHB 的微生物<sup>[1,2]</sup> PHB 的合成途径、结构、分子量以及生物降解性<sup>[3,4]</sup>及 PHB 形成的动力学等多方面的研究。PHB 是若干细菌在控制氮源<sup>[5]</sup>、氧气压力<sup>[6]</sup>和矿物离子浓度<sup>[7]</sup>等条件下的积累物。用于 PHB 积累的碳源包括二氧化碳<sup>[8]</sup>、甲醇<sup>[1]</sup>、乙酸、丁酸<sup>[9]</sup>、果糖和葡萄糖等。碳源的不同会引起生产工艺以及产品性质的差异。国外对 PHB 的研究较为深入且一直是十分活跃的研究领域,我国则还处于起步阶段。

## 材 料 和 方 法

### (一) 菌株

真养产碱菌 (*Alcaligenes eutrophus*) H16 (ATCC 17699)。

### (二) 培养基

1. 丰富培养基(g/L): 酵母自溶粉 10, 蛋白胨 10, 牛肉膏 5, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5, pH7.0。
2. 无氮合成培养基 (mg/L): CaCl<sub>2</sub> 10.29, NaHCO<sub>3</sub> 1008.12, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 123.24, FeCl<sub>3</sub> 16.2, MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O 3.98, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 4082.7, NiCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.07, CuCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.068, CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.0023, CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 0.02, Na<sub>2</sub>MnO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.048, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.086, 丁

本文于 1991 年 4 月 26 日收到。

\* 本研究受日本政府和 UNESCO 资助,特此致谢。

酸 1—20g/L, pH8.0。

### (三) 培养方法

细菌在丰富培养基中预培养 36 小时,离心收集菌体,用无离子水洗涤后转入无氮合成培养基中,在 30℃、pH8.0 下培养 48—72 小时。

自动流加过程采用 Mitsuwa KMJ-5A 生物反应器,工作容积 3L。用 NEC PC-9801-V 计算机控制丁酸流加,使 pH 值恒定在 8.0。

### (四) 分析方法

1. 生物量: 测定 660nm 光密度和使用滤膜测干重法 (Advantec, 0.2 $\mu$ m)。
2. 聚  $\beta$ -羟基丁酸: 采用 Ward 等<sup>[10]</sup>的分光光度法测定。

## 结果和讨论

### (一) 积累 PHB 的最适温度、pH 和预培养时间

1. 最适温度: 温度对 PHB 积累影响很大,从图 1-A 可看出,30℃ 对 PHB 产生最适合,此时 PHB 产量达细胞干重的 51%。而 25℃ 和 35℃ 则仅为 43% 和 45%。

2. 最适 pH: 分别于初 pH6.5—8.5 条件下积累 PHB,比较不同 pH 对 PHB 积累的影响,结果如图 1-B 所示。pH8.0 对 PHB 产生较适合,此时 PHB 达细胞干重的 52%。

3. 预培养时间对 PHB 积累的影响: 细菌于丰富培养基中分别预培养 24、36 和 48 小时后转入无氮合成培养基中,以比较 PHB 的积累。从图 1-C 看出,预培养时间对 PHB 的积累有很大影响,即不同生长期的菌体其积累 PHB 的能力有很大差异。预培养 36 小时细菌产 PHB 较高,达细胞干重的 63%,PHB 产率达 0.38g/g 丁酸。

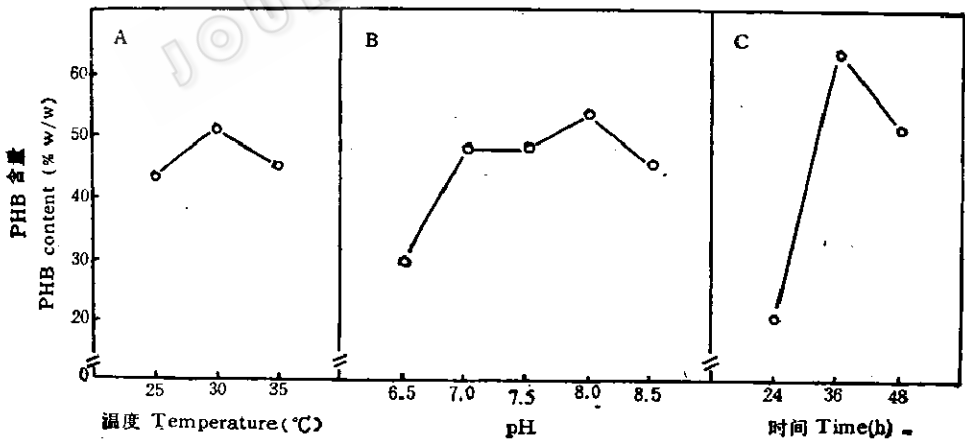


图 1 温度 (A)、pH(B) 和预培养时间 (C) 对 PHB 积累的影响

(在 30℃、pH8.0 下培养 48 小时,丁酸浓度为 0.2%)

Fig. 1 The effect of temperature (A), pH(B) and time of growth stage (C) on PHB production

(30℃, pH8.0, 48h, butyric acid 0.2%)

### (二) 氮源和丁酸浓度对 PHB 产生的影响

i. 硫酸铵浓度的影响: 以丁酸为唯一碳源产生 PHB 经两条途径, 其中一条不受氮源存在的阻遏<sup>[1]</sup>, 然而本实验中观察到氮源的存在显著影响了 PHB 的产生。不同硫酸铵浓度对 PHB 产生的影响如图 2-A 所示: 无  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  时, PHB 含量高达 25%, 但当  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  为 0.5g/L 时, PHB 含量为零。因此认为, 即使以丁酸为唯一碳源时硫酸铵存在仍然对 PHB 的合成有抑制作用。

2. 丁酸浓度的影响: 以丁酸为唯一碳源, 比较了不同丁酸浓度下 PHB 的产生。从图 2-B 看出, 丁酸浓度对 PHB 的积累有明显的影晌。当丁酸浓度为 0.1% 时, PHB 含量高达 39%, 此后随着丁酸浓度的增加, PHB 积累逐渐减少。当丁酸浓度为 0.7% 时, PHB 含量仅为 22%。由此可见高浓度丁酸对 PHB 的积累存在着抑制作用。将丁酸控制在低浓度是高效积累 PHB 的关键之一。有文献报道<sup>[9]</sup>, 他们以丁酸为碳源且其浓度高达 2% 时仍没有任何抑制作用。

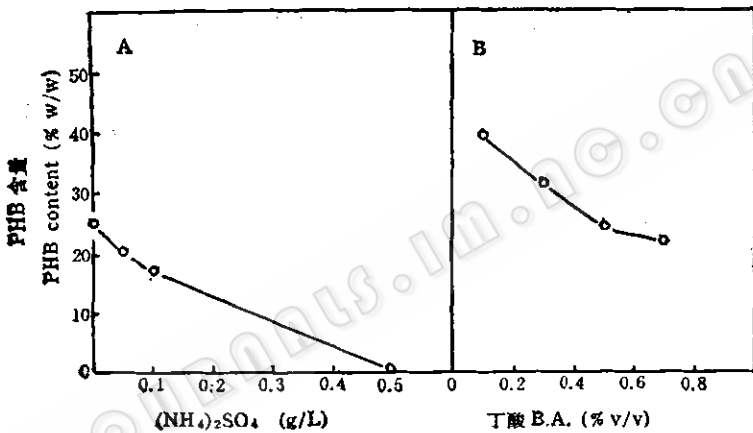


图2 硫酸铵浓度(A)和丁酸浓度(B)对 PHB 积累的影响  
(30°C, pH8.0, 48 小时, 在 A 中丁酸浓度为 0.1%)

Fig. 2. The effect of  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (A) and butyric acid concentration (B) on PHB production  
(30°C, pH8.0, 48h, 0.1% butyric acid in A)

### (三) 间歇流加和自动流加丁酸过程

1. 间歇流加丁酸过程中 PHB 的积累: 根据丁酸具有抑制作用的事实, 设计了间歇流加丁酸实验: 使丁酸总浓度相同(2%), 但流加方式不同。图 3 中曲线 1 为 2% 丁酸分 10 次加入, PHB 产量一直较高, 达到 2.2g/L。曲线 2 是丁酸分 4 次加入, PHB 产量为 1.5g/L。而曲线 3 是 2% 丁酸一次加入, PHB 产量仅为 1.0g/L。

图 3-B 为 PHB 的比产生速率与丁酸流加方式关系曲线, 其中以曲线 1 的值最高, 为  $0.011\text{g PHB}\cdot\text{g 生物量}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ , 而曲线 3 的最高值仅为  $0.002\text{g PHB}\cdot\text{g 生物量}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ 。

计算此过程中的 PHB 产率: 曲线 1 为  $0.11\text{g PHB/g B. A.}$ , 曲线 2 和曲线 3 则分别为  $0.06$  和  $0.044\text{g PHB/g B. A.}$ 。

由此得出结论: 虽然丁酸终浓度一致, 但少量多次流加丁酸要比多量少次流加对 PHB 积累效果更好。

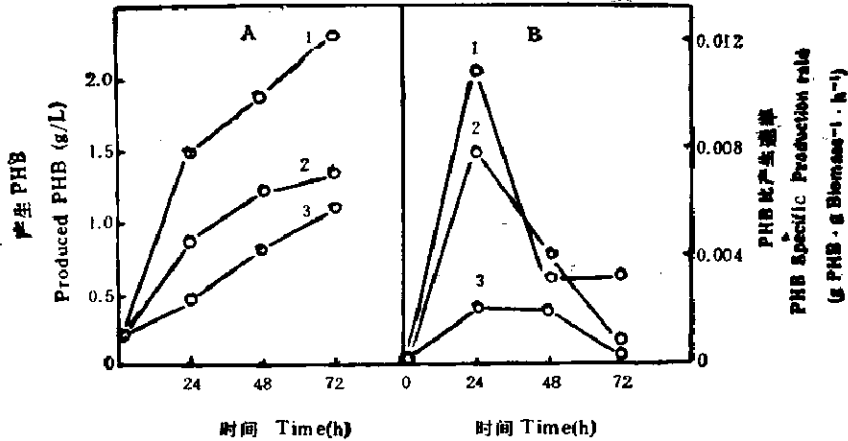


图3 间歇流加丁酸方式对 PHB 积累的影响

(A) PHB 含量; (B) PHB 比产生速率 (30°C, pH8.0, 72h, 2% 丁酸按曲线 1, 2, 3 分别以 10, 4 和 1 次方式加入)

Fig. 3 The effect of periodical feeding on PHB production

(A) PHB content, (B) PHB specific production rate (30°C, pH8.0, 72h, total 2% B. A. No. 1, 2, 3, feeding 10, 4, and 1 times, respectively)

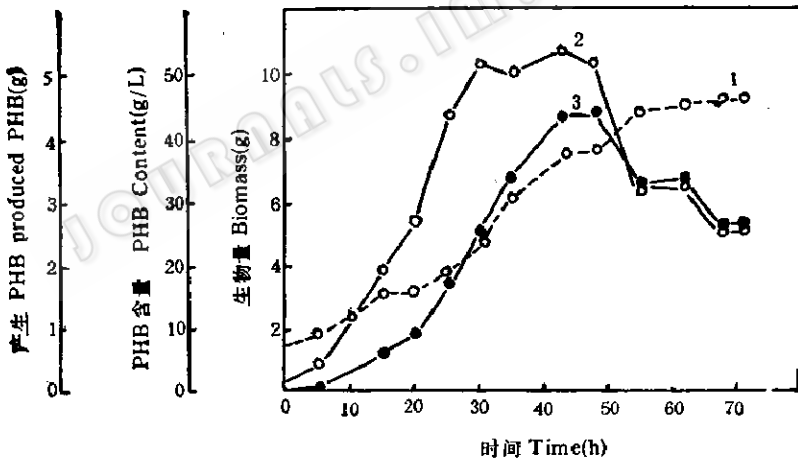


图4 在自动流加过程中生物量和 PHB 积累的变化

(30°C, pH8.0, 70h; 1. 生物量; 2. PHB 含量; 3. PHB 总量)

Fig. 4. The time course of biomass

(1), PHB content (2) and PHB accumulation (3) in automatic fed-batch by pH stat (30°C, pH8.0, 70h)

2: 自动流加丁酸过程中的 PHB 积累: 采用自动流加工工艺以控制基质中丁酸一直处于低浓度, 以期减少丁酸对 PHB 产生的抑制作用。通过流加 30% 丁酸无氮合成基质, 可使培养基质的 pH 值稳定于 8.0。自动流加过程中的生物量变化和 PHB 的积累过程见图 4。生物量从开始时的 1.44g 增加到 70 小时的 9.2g, 而 PHB 产量却增加了近 20 倍。PHB 含量分别为 2.46% (0h) 和 54.1% (43h)。

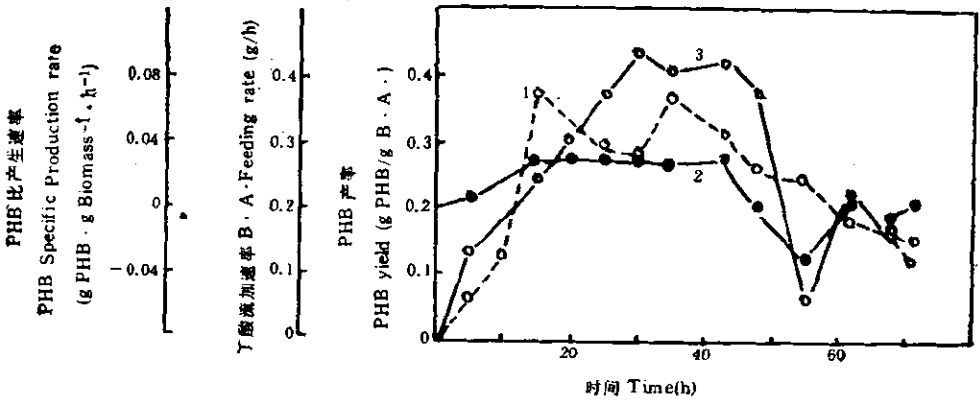


图5 自动流加过程中丁酸流加速率(1), PHB比产生速率(2)和 PHB产率(3)的变化  
(30℃, pH8.0, 70h)

Fig. 5 The time course of butyric acid feeding rate (1), PHB specific production rate (2) and PHB yield (3) in automatic fed-batch by pH stat  
(30℃, pH8.0, 70h)

图5所示为自动流加过程中的 PHB 产率、丁酸流加速率以及 PHB 比产生速率的变化。PHB 产率高达 0.4g PHB/g B. A.。但培养 48 小时后,产率迅速下降。PHB 比产生率在流加过程中一直有变化,从 13 小时至 43 小时的 30 个小时中恒定在 0.028g PHB·g 生物量<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>,而在培养的初期和后期都较低。

表1比较了自动流加与间歇流加过程中的 PHB 产率和 PHB 比产生速率,可以看出,在自动流加过程中 PHB 产率及比产生速率均较间歇流加过程高许多。它进一步说明了借控制 pH 值的以进行丁酸自动流加这种新工艺的可行性。

表1 自动流加与间歇流加过程中 PHB 产率及 PHB 比产生速率的比较

Table 1 The comparison of PHB yield, PHB specific production rate in automatic fed-batch process and those in periodical feeding process

过程 Process	自动流加 Automatic fed-batch	间歇流加 Periodical feeding
PHB 产率 PHB yield (g PHB/g B. A.)	0.40	0.11
PHB 比产生速率 PHB specific production rate (g PHB·g Biomass <sup>-1</sup> ·h <sup>-1</sup> )	0.028	0.011

在自动流加过程中,当培养到43小时后生物量仍继续增加,但 PHB 产量却不再增加,甚至开始减少。可以推测,PHB 产生并不是随着生物量增加而增加的,而是在 PHB 产量达到一定值后开始减少。所以实际生产中收获 PHB 应有特定时间,时间过长并不能使 PHB 收获量更高。同时还显示出,确定 PHB 收获时间并不能从生物量增加与否来

判断,所以寻找一种能迅速确定 PHB 收获时间的参数极为重要,这在目前有关文献中还未见到报道。从本实验结果(图5)中可推测丁酸的流加速率较生物量更能直接反映实际 PHB 积累情况,且是培养过程中可直接快速获得的参数。故我们认为以丁酸流加速率作参数来确定 PHB 的收获时间较为合适。

### 参 考 文 献

- [1] Suzuki, T. et al.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 24: 370, 1986.
- [2] Doi, Y. et al.: *Macromolecules*, 19: 2860, 1986.
- [3] Suzuki, T. et al.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 27: 487, 1988.
- [4] Kawaguchi, Y. et al.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 30: 569, 1989.
- [5] Emeruwa, A. C. et al.: *J. Bacteriol.*, 116: 989, 1973.
- [6] Ward, A. C. et al.: *J. Gen. Microbiol.*, 102: 61, 1977.
- [7] Suzuki, T. et al.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 23: 322, 1986.
- [8] Heinzle, E. et al.: *European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 11: 8, 1980.
- [9] Doi, Y. et al.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 28: 330, 1988.
- [10] Ward, A. C. et al.: *Analytical Biochemistry*, 52: 607, 1972.

## STUDIES ON THE PRODUCTION OF POLY- $\beta$ -HYDROXYBUTYRIC ACID FROM BUTYRIC ACID BY *ALCALIGENES EUTROPHUS* H16

Wang Li

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing 100080)

H. Shimizu S. Shioya K. Suga

(Osaka University, Osaka Japan)

Bacteria *Alcaligenes eutrophus* H16 (ATCC 17699) can utilize butyric acid as the sole carbon source to produce poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid (PHB) in nitrogenfree medium. The optimal conditions for PHB production were: 36 h of first stage cultivation; temperature, 30°C; pH 8.0; 48 to 72 h of the second state growth. The maximum content of PHB obtained in batch culture was 63% (w/w). There was the inhibition of butyric acid to PHB accumulation in batch culture. The fed-batch culture was proceeded by feeding butyric acid to keep pH at constant. The yield of PHB production was about 0.4 g PHB/g butyric acid, and the specific production rate of PHB was about 0.1 g PHB·g biomass<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>.

**Key words** Poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid (PHB); Butyric acid (B.A.); *Alcaligenes eutrophus* H16