

球形红杆菌积累聚 β -羟基链烷酸 (PHA) 的研究

钱新民 王宇新 常 钟

(山东大学微生物研究所 济南 250100)

摘 要 通过对球形红杆菌 (*Rhodobacter sphaeroides*) 生长和积累聚 β -羟基链烷酸 (PHA) 条件的研究, 确定采用两段培养法提高 PHA 的产量。第一阶段提供适合菌体生长的条件: 以葡萄糖作碳源, 尿素为氮源, 光照微好氧培养。第二阶段则提供使菌体积累 PHA 的条件: 补加乙酸钠厌氧光照培养。经两段培养后菌体 PHA 含量可占细胞干重的 45%, PHA 产量每升发酵液可达 1.7g。

关键词 球形红杆菌, 聚 β -羟基链烷酸, 两阶段培养

目前, 全球以石油为原料合成塑料的产量已达一亿 t 以上, 而这类合成塑料在自然条件下不易被微生物降解, 因此废弃的塑料制品已造成公害, 被称为“白色污染”。

聚 β -羟基链烷酸 (简称 PHA) 是一类聚合物的总称, 它具有生物分解性、生物体亲和性、光学活性和压电性等特性, 能制成可被微生物分解的“无公害”塑料, 给解决“白色污染”带来希望。国内外相继开展了生物可降解聚合物的研究, 80 年代英国 ICI 公司已有商品出售。

近几年国内在真养产碱杆菌 (*Alcaligenes*) 积累 PHA 的原理及工艺条件方面均有较细致的研究^[1,2]。对于光合细菌积累 PHA 的条件及机制国外已有研究^[3,4], 但国内迄今未见正式报道。对球形红杆菌 (*Rhodobacter sphaeroides*) 积累 PHA 的条件本实验室做了初步探讨。采用双底物两段培养法, 克服了一般培养方法菌体生长条件同 PHA 积累条件不一致的矛盾, 使 PHA 得率大为提高, 并大大降低了生产成本。

1 材料和方法

1.1 菌株

球形红杆菌 (*Rhodobacter sphaeroides*) S₁ 由本室提供。

1.2 培养基

RCVBN 培养基^[5]。

1.3 培养方法

采用美国 NBS 公司生产的 2L 透明发酵罐, 温度自控, pH 通过流加控制, 光照采用外源白炽灯照射, 由变压器调节光照强度, 以通气量和搅拌速度控制溶氧浓度。

1.4 分析方法

1.4.1 生物量: 测定 660nm 处光密度和恒重法。

1.4.2 PHA 含量: 用 Brandl 等^[6]的气相色谱法。

1.5 菌体生长条件的确定

1.5.1 不同碳源和培养条件对菌体生长的影响: 用乙酸钠 0.8%、葡萄糖 0.4%、苹果酸 0.4% 分别代替 RCVBN 培养基中的碳源, 在光照厌氧 (1000Lx, $DO \leq 0.05\text{mg/L}$)、光照微好氧 (1000Lx, $DO \approx 0.5\text{mg/L}$)、黑暗好氧 (0Lx, $DO \geq 1\text{mg/L}$) 条件下 30℃ 培养达稳定期时测菌体量。

1.5.2 不同碳源浓度对菌体生长的影响: 分别用 0.25、0.5、0.75、1、1.25、1.5 和 2% 的葡萄糖及 0.1% 尿素代替 RCVBN 培养基中的碳源和氮源, 光照微好氧 30℃ 培养达稳定期测菌体量。

1.5.3 不同氮源对菌体生长的影响: 在用葡萄糖作碳源的条件下、分别用硫酸铵、尿素、氯化铵作氮源, 光照微好氧培养, 测定菌体生长曲线。

1.5.4 磷酸缓冲液浓度、光照强度及 pH 对菌体生长的影响: 在培养基中加入 0.3mol/L 磷酸缓冲液 1、1.5、2.0 和 2.5%, 培养达稳定期比较菌体得量。分别在 0、200、500、1000、1500Lx 光照条件下培养光合细菌, 达稳定期测菌体量。调整培养基的初始 pH 至 5.0、6.0、7.0 和 8.0, 培养 48h 测菌体量。

1.6 菌体积累 PHA 条件的确定

1.6.1 补加不同碳源在不同条件下对 PHA 积累的影响: 培养菌体达稳定期后, 分别补加终浓度为 1% 的乙酸钠、葡萄糖、苹果酸, 光照微好氧、光照厌氧、黑暗好氧条件下继续培养 48h 后测定 PHA 含量。

1.6.2 补加不同浓度的乙酸钠对菌体积累 PHA 的影响: 培养菌体达稳定期后, 补加乙酸钠使终浓度分别为 0.25、0.5、0.75、1.0、1.25 和 2%, 继续培养 48h, 测菌体 PHA 含量。

2 结果和讨论

2.1 菌体生长条件的确定

2.1.1 不同碳源和培养条件对菌体生长的影响: 由图 1 可见在光照微好氧条件下三种碳源的菌体量较大, 这说明光合磷酸化道路乃是球形红杆菌主要产能方式, 此道路有利于将底物高效转化为细胞物质; 由于该菌为兼性菌, 它仍需要氧化磷酸化道路为其提供一些中间代谢物, 所以对菌体生长而言, 在光照微好氧条件下生长要优于光照厌氧及黑暗好氧条件, 这与有关的报道^[6]相似。

在光照微好氧条件下培养 48h, 苹果酸作碳源菌体量最高, 但考虑到苹果酸较贵, 因此选用葡萄糖作碳源可大大降低生产成本。

2.1.2 不同碳源浓度对菌体生长的影响: 由图 2 可见, 当葡萄糖浓度为 1% 时可获得最多的菌体, 葡萄糖浓度过低

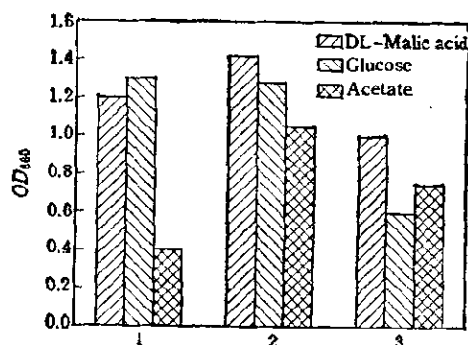


图 1 不同碳源及培养条件对菌体生长的影响

Fig. 1 Effect of different carbon sources and cultural conditions on growth

1. 黑暗好氧 Dark aerobic; 2. 光照微好氧 Light micro-aerobic; 3. 光照厌氧 Light-anaerobic.

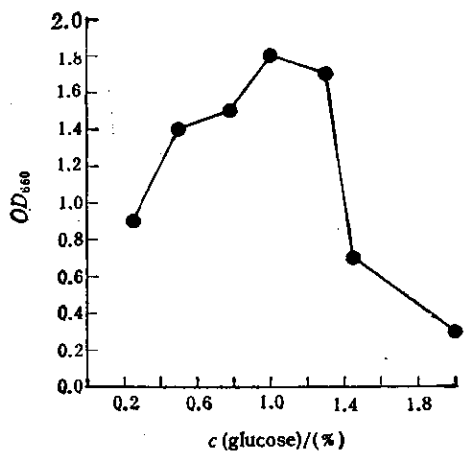


图 2 不同葡萄糖浓度对菌体生长的影响
Fig. 2 Effect of different glucose concentration on growth

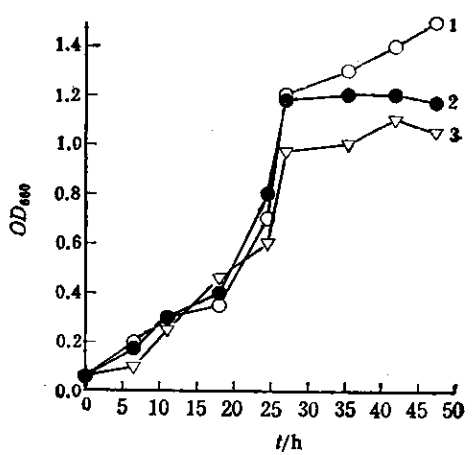


图 3 不同氮源对菌体生长的影响
Fig. 3 Effect of different nitrogen source on growth

1. $\text{H}_2\text{N}-\overset{\text{O}}{\overset{\parallel}{\text{C}}}-\text{NH}_2$; 2. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 3. NH_4Cl .

限制了菌体的生长,而浓度过高则对生长又有抑制作用,因此选用 1% 的葡萄糖浓度作为生长菌体的最适浓度。

2.1.3 不同氮源对菌体生长的影响: 由图 3 可见,用葡萄糖作碳源时,尿素为最佳氮源。在培养过程中用尿素作氮源 pH 基本稳定在 7.0 左右,而用 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 和 NH_4Cl 作氮源时随着培养时间的延长,pH 降低,因此选用尿素作为氮源。

2.1.4 磷酸缓冲液浓度、光照强度和 pH 的确定: 通过实验确定用 1.5% 磷酸缓冲液 (0.3mol/L),初始 pH7.0,光照强度在 500Lx 以上时随着光照强度的增加,菌体得率有

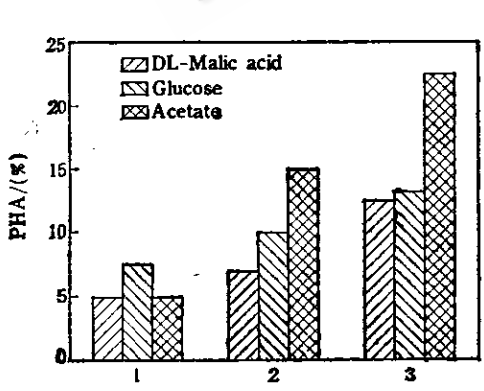


图 4 补加不同碳源在不同培养条件下对菌体 PHA 积累的影响
Fig. 4 Effect of adding different carbon sources and different cultural conditions on accumulation of PHA

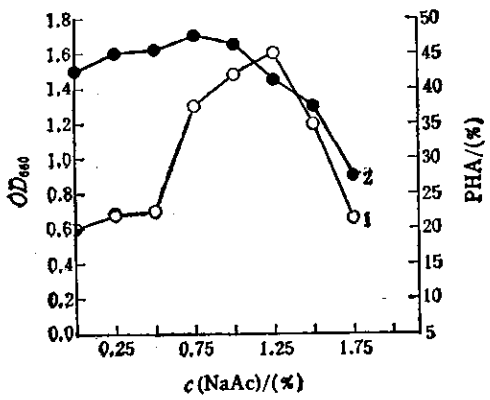


图 5 补加不同乙酸钠浓度对积累 PHA 的影响
Fig. 5 Effect of adding different acetate concentration on the accumulation of PHA
1. PHA(%); 2. OD₆₆₀.

图注同图 1 Legend is the same as that of Fig.1.

增加的趋势, 但超过 1500Lx 对菌体生长影响不大, 出现“光饱和现象”, 因此选 1500Lx 作为菌体生长的光照强度。

2.2 菌体积累 PHA 的条件

2.2.1 补加不同碳源在不同培养条件下对 PHA 积累的影响: 由图 4 可见, 在光照厌氧条件下, 补加乙酸钠可获得最高的 PHA 含量, 这与有关报道^[3]吻合。

2.2.2 补加乙酸钠浓度的确定: 由图 5 可见补加乙酸钠使终浓度达 1.25% 时, PHA 含量最高, 占干重的 45%, 这时 PHA 产量每升发酵液可达 1.7g。

参 考 文 献

- [1] 徐浩, 江慧修, 周惠玲, 等. 微生物学报, 1991, 31(5): 333~337.
- [2] 王 丽, 清水浩, 盐谷裕明, 等. 微生物学报, 1993, 33(1): 48~53.
- [3] Liebergessel M, Hustede E, Timm A *et al.* *Arch Microbiol.* 1991, 155: 415~421.
- [4] Weaver P F, Wall J D, Gest H. *Arch Microbiol.* 1975, 105: 207~216.
- [5] Brandl H, Richard A. G, Robert W L *et al.* *Arch Microbiol.* 1991, 155: 337~340.
- [6] 顾祖宜. 中国环境科学, 1988, 8(1): 50~54.

IMPROVEMENT OF CULTURE CONDITIONS FOR ACCUMULATION OF POLY (3-HYDROXYALKANOATES) BY *RHODOBACTER SPHAEROIDES*

Qian Xinmin Wang Yuxin Chang Zhong

(Institute of Microbiology, Shandong University, Jinan 250100)

Abstract Through investigating the culture conditions of *Rhodobacter sphaeroides*, a two-stage culture technique was developed for the accumulation of poly (3-hydroxyalkanoates) (PHA) by this microorganism. In the first stage, to provide suitable conditions for the microbial growth glucose and urea were supplied as carbon and nitrogen sources, respectively, keeping a microaerobic light culture. In the second stage, the culture was supplemented with sodium acetate to create an anaerobic light culture condition for the accumulation of PHA. By this technique, the PHA content accumulated in the microbial cells mounted up to 45% of cellular dry weight, and a high yield of 1.7g PHA/L fermenting liquor was achieved.

Key words *Rhodobacter sphaeroides*, Poly (3-hydroxyalkanoates), Two-stage culture technique