

## 自养黄杆菌合成羟基丁酸和羟基戊酸 共聚体的发酵研究

赵良启\* 田杰生 吴柏和 李季伦

(北京农业大学生物学院 北京 100094)

**摘 要** 采用本实验室从土壤中分离到的一株自养黄杆菌进行了羟基丁酸和羟基戊酸共聚体(P(HB-co-HV))的发酵试验。实验结果表明,该菌株是自养黄杆菌葡萄糖运输突变株,可以葡萄糖、果糖、蔗糖、麦芽糖、乙酸盐、乳酸盐和苹果酸盐作为唯一碳源,尤以葡萄糖和果糖效果最佳。硫酸铵、氯化铵和蛋白胨等不同氮源不影响其生长,却影响细胞中P(HB-co-HV)的含量和P(HB-co-HV)中HV/HB的比例。应用两阶段控制方式,经42h的补料分批发酵,细胞浓度达 $34.9\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,P(HB-co-HV)浓度达 $25.28\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。细胞和P(HB-co-HV)生产速率系数分别为 $0.83\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 和 $0.61\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 。以基质为基准的细胞得率系数( $Y_x/s$ )、产物得率系数( $Y_p/s$ )和以干细胞为基准的产物得率系数( $Y_p/x$ )分别为 $0.283(\text{g/g})$ 、 $0.174(\text{g/g})$ 和 $0.73(\text{g/g})$ 。改变培养基中碳氮源组分可将P(HB-co-HV)中HB的含量调节在24%~78%之间。

**关键词** 自养黄杆菌,补料分批发酵,羟基丁酸和羟基戊酸共聚体

多聚羟基烷酸(Polyhydroxyalkanoates,简称PHA)是许多原核生物在不平衡生长条件下合成的胞内能量和碳源贮藏性物质。近年来的研究表明,它是一类具有广阔应用前景的新型热塑材料。它不仅具有类似于化学合成塑料的理化性质,而且具有生物可降解性、生物相容性、压电性和光学活性等优良特性,以其制作医疗、食品、工业、农用产品,不仅种类繁多,而且不存在环境污染问题。因此PHA的研究受到人们密切关注<sup>[1,2]</sup>。

PHA是一类系列产物的总称。已报道的PHA有 $\beta$ -羟基丁酸同型多聚体(PHB)、 $\beta$ -羟基丁酸和 $\beta$ -羟基戊酸共聚体、 $\beta$ -羟基( $\text{C}_2\text{—C}_{12}$ )烷酸同型多聚体或异型共聚体及含有部分不饱和键的羟基烷酸多聚体。这些由不同单体构成的多聚体,其热塑性质有不同程度的差别,而正是这些差别造成了PHA实际用途的多样性<sup>[3~5]</sup>。

对于PHA的研究,进行得最广泛、最深入的要算PHB,现已进入一定规模的生产阶段,而其他类型的PHA均处在实验室研究阶段。在P(HB-co-HV)的研究方面,多数采用真养产碱菌或基因工程菌作试验菌株,以铵盐作氮源,糖类作碳源,在多聚体合成期间向发酵液中添加丙酸或戊酸,以改变其在糖类培养基上只形成PHB的特性而合成P(HB-co-HV)。然而由于丙酸或戊酸在较低浓度下即对菌体具有毒性,故增加了操作

\* 赵良启在山西大学生命科学系工作。

本文于1995年4月26日收到,1996年4月20日定稿。

难度并影响到 P(HB-co-HV) 中 HV/HB 的比例<sup>[4,6]</sup>, 而自养黄杆菌最大的特点是以葡萄糖等作唯一碳源就可以合成 P(HB-co-HV)。

本文对自养黄杆菌产生 P(HB-co-HV) 的发酵条件、产量和产率作了研究。

## 1 材料和方法

### 1.1 细菌菌株

自养黄杆菌 (*Xanthobacter autotrophicus*), 来自本实验室。

### 1.2 培养基

1.2.1 种子培养基 ( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ): 葡萄糖 1.0, 蛋白胨 5, 牛肉膏 3, 酵母膏 1, NaCl 5, 用蒸馏水定容, pH 7.0。

1.2.2 发酵培养基 ( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ):  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  9,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.5,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.2,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.02, 柠檬酸铁铵 0.06, 酵母水解粉 1, 微量元素液 1ml, 葡萄糖 (或其他碳源) 15~30, 硫酸铵 (或其他氮源) 3~6, 用蒸馏水定容, pH 7.0。

微量元素液 ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ):  $\text{HBO}_3$  300,  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  200,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  30,  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  30,  $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  30,  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  20,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  10, 蒸馏水 1000ml。

### 1.3 摇瓶试验

1.3.1 摇瓶种子液的制备: 将活化后的斜面菌种制成菌悬液接入种子培养基 (100ml 培养基 / 500ml 的摇瓶) 中, 于 THZ88-1 型台式多用恒温振荡器 (偏心距 4.0cm) 在  $30^\circ\text{C}$  120r/min 培养至对数期。

1.3.2 碳源试验: 以发酵培养基为基础, 用  $4\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  的硫酸铵作氮源, 分别以  $30\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  的糖类或  $18\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  的有机酸盐作唯一碳源。摇瓶装料系数为 0.2, 接种量为 10%, 于  $30^\circ\text{C}$  240r/min 条件下摇床 (同上) 培养, 在培养过程中以  $10\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  KOH 和  $10\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  HCl 调节 pH 7.0。

1.3.3 氮源试验: 以发酵培养基为基础, 以  $30\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  葡萄糖为碳源, 分别以  $4\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  的硫酸铵或相当铵含量的氯化铵、蛋白胨作氮源。培养条件同碳源试验。

### 1.4 分批发酵

使用美国 VIRTIS 公司生产的 2L-型发酵罐及全部配套测试和控制系统。发酵罐装料容积 2L, 两层六平直叶搅拌器, 双挡板。起始培养体积 1.2L, 硫酸铵和葡萄糖含量分别为  $6\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  和  $30\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 其他成分同发酵培养基。接种量 10%, 培养温度  $30^\circ\text{C}$ , 通气量 1:1, 搅拌转速 600~1000r/min, 溶氧控制在 100%~40%, 以  $10\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  KOH 和  $10\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  HCl 调节 pH 7.0。

### 1.5 补料分批发酵<sup>[7,8]</sup>

发酵罐同分批发酵或日本生产的 BIOPROCESS CONTROLLER MODEL MDIAC-S<sub>1</sub>-5L 全自动发酵罐。起始培养体积 1000ml 或 3000ml, 培养基成分、接种量、培养温度同分批发酵。所不同的是将发酵过程分为菌体生长和 PHA 积累两个阶段来控制。在第一阶段, 创造有利条件促使菌体增殖, 控制溶氧在 100%~40% 之间, 调节 pH 7.0。根据测定结果分次补入 50% 的葡萄糖、25% 的氯化铵 (或相应量的硫酸铵), 使糖和

铵离子的浓度分别保持在  $40\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \sim 10\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  和  $2.0\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \sim 0.3\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  之间。当细胞浓度达到  $OD_{600}$  总值 100 以上时,进行第二阶段操作,限制氮含量,使铵离子浓度趋近于零,流加 50% 的葡萄糖,使糖浓度保持在  $20\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  左右,调节 pH 6.5,控制溶氧在 30% ~ 20% 之间,胁迫菌体合成 P(HB-co-HV)。

1.6 检测

1.6.1 细胞形态及 PHA 颗粒的观察<sup>[9]</sup>:用苏丹黑染色法制片,在显微镜下直接观察细胞形态和 PHA 的形成情况。

1.6.2 生物量测定<sup>[10, 11]</sup>:取发酵液 20ml,  $3000 \times g$  离心 15min,蒸馏水洗涤菌体,再次离心,将菌体移至恒重的称量瓶中,  $90^{\circ}\text{C}$  烘干至恒重。

为快速简便起见,发酵过程中的细胞浓度以  $OD_{600}$  总值(N)来表示。测定方法为无菌操作取样,蒸馏水稀释,于 721-型或 752-型分光光度计上测定  $OD_{600}$ 。然后以下式计算  $OD_{600}$  总值。

$$N = OD_{600} \times m$$

式中 m 为稀释倍数,  $OD_{600}$  为稀释液的  $OD$  值,通过控制 m 使  $OD_{600}$  的实测值处在 0.2~0.5 范围之内。

1.6.3 葡萄糖测定:采用 3,5-二硝基水杨酸法(或蒽酮法)<sup>[12]</sup>。

1.6.4 铵离子测定:靛酚蓝比色法<sup>[13]</sup>。

1.6.5 P(HB-co-HV) 含量测定:用硫酸降解法<sup>[14~16]</sup>测定干细胞中 P(HB-co-HV) 的 HB 含量,再根据氢谱核磁共振测定的 HB / HV 的比例计算 P(HB-co-HV) 的含量。

1.6.6 HV / HB 的测定:参照文献<sup>[17]</sup>用次氯酸钠-氯仿法提取并精制 P(HB-co-HV) 得纯品。将 P(HB-co-HV) 纯品溶于  $\text{CDCl}_2$  中,用 JEDLFX-90Q 核磁共振谱仪,在  $55^{\circ}\text{C}$ 、89.55MHZ 测  $^1\text{H}$ -NMR,对照标准品按峰面积计算 HB / HV 比例<sup>[18, 19]</sup>。

2 实验结果

2.1 碳源试验

在摇床实验条件下, *X. autotrophicus* 试验菌株利用碳源的情况见表 1。

表 1 *X. autotrophicus* 试验菌株在不同碳源上的生长情况

Table 1 The growth of *X. autotrophicus* in the media containing different carbon sources

碳源		浓 度	培养时间	$OD_{600}$	细胞干重
Carbon source		$c / \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	$t / \text{h}$	$\times m^*$	Dry cell weight / $\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$
					$\times 10^2$
糖类	Sugar				
葡萄糖	Glucose	30	22	11.2	0.45
果糖	Fructose	30	22	10.0	0.39
蔗糖	Sucrose	30	22	2.2	0.08
麦芽糖	Maltose	30	22	2.9	0.11
乳糖	Lactose	30	46	0.75	0.027
木糖	Xylose	30	46	1.15	0.046
阿拉伯糖	Arabinose	30	46	0.8	0.026

续表 1

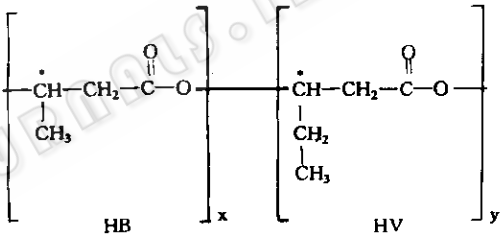
碳 源 Carbon source		浓 度 $c / g \cdot L^{-1}$	培 养 时 间 $t / h$	$OD_{600}$ $\times m^*$	细胞干重 Dry cell weight / $g \cdot ml^{-1}$ $\times 10^2$
有机酸盐类 Salt of the organic acid					
乙酸钠	Sodium acetate	18	34	4.8	0.155
丙酸钠	Sodium propionate	18	34	3.8	0.140
乳酸钠	Sodium lactate	18	34	6.0	0.200
丁酸钠	Sodium butyrate	18	46	0.56	0.020
苹果酸钠	Sodium malate	18	34	3.4	0.130
戊酸钠	Sodium valerate	18	46	0.5	0.018

\*m 为稀释倍数 \*m was the dilution times.

由表 1 可以看出, 试验菌株在营养生长时, 对于碳源的利用具有一定的选择性。当以糖类作唯一碳源时, 葡萄糖和果糖是其良好碳源, 蔗糖和麦芽糖次之, 乳糖、木糖和阿拉伯糖则很难被利用。当以有机酸盐作唯一碳源时, 乙酸盐、丙酸盐、乳酸盐和苹果酸盐可被利用, 但细胞的生长速率缓慢, 而丁酸盐和戊酸盐则对细胞生长呈现一定程度的抑制作用。

2.2 氮源试验

图 1 为从氮源试验细胞中分离纯化的 PHA 的  $^1H-NMR$  图谱。根据图谱和有关资料进行分子结构分析, 确定提取物的分子结构式如下:



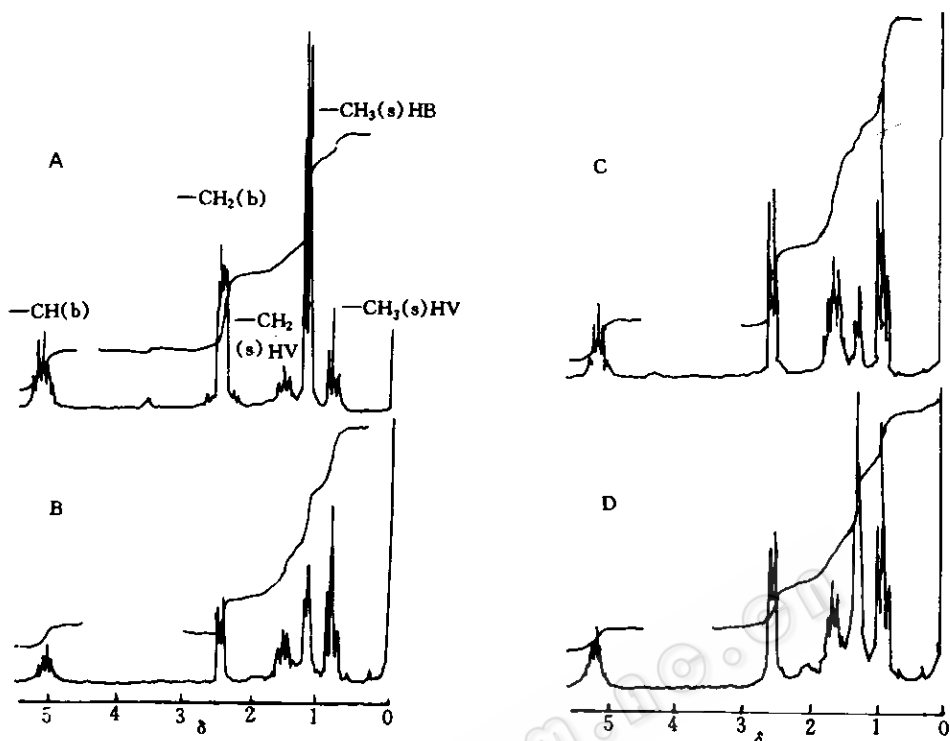


图 1 在 89.55MHz 下 P(HB-co-HV) 的  $^1\text{H}$ -NMR 图谱

A. 为标准 P(HB-co-HV) (Sigma 公司)  $^1\text{H}$ -NMR 图谱; B、C 和 D 分别为 *X. autotrophicus* 试验菌株在  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 $\text{NH}_4\text{Cl}$  和蛋白胨为氮源的培养基上产得的 P(HB-co-HV) 的  $^1\text{H}$ -NMR 图谱

Fig.1  $^1\text{H}$ -NMR spectra of P(HB-co-HV) at 89.55 MHz

A is  $^1\text{H}$ -NMR spectrum of the standard P(HB-co-HV) (Sigma Co.); B、C and D are  $^1\text{H}$ -NMR spectra of P(HB-co-HV) produced by *X. Autotrophicus* in the media using  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 $\text{NH}_4\text{Cl}$  and peptone as nitrogen sources, respectively.

表 2 表明, 不同氮源并不影响培养液中菌株的生长。经摇瓶培养 17h 后, 所试不同氮源培养液中细胞浓度  $OD_{600}$  总值均在 14.6~15.0 之间, 每 100ml 发酵液中的细胞干重在 0.53g 左右。然而不同氮源却影响 P(HB-co-HV) 的积累及 P(HB-co-HV) 内 HB、HV 单体的比例。以硫酸铵、蛋白胨为氮源, 试验菌株的  $Y_p/x$  及 P(HB-co-HV) 内的 HB 含量大致相同, 但其  $Y_p/x$  明显低于以氯化铵为氮源时的相应数值, 而其 P(HB-co-HV) 内 HB 的含量又明显高于以氯化铵为氮源时的相应数值。比较培养基成分, 主要区别在于氯化铵培养基中 S 含量低于其他两种氮源培养基的相应含量。或许 S 限量对菌体合成 PHA 有促进作用, 而对 HB 单体的合成有抑制作用, 有待进一步试验证明。

### 2.3 分批发酵实验

经 34h 的分批发酵, 细胞浓度  $OD_{600}$  总值达 36, 干细胞含量为  $10.75\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ , P(HB-co-HV) 含量为  $2.26\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 消耗葡萄糖  $29.8\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ; 消耗  $\text{NH}_4^+$   $1.5\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。细胞生长曲线、基质消耗曲线见图 2。在发酵过程中细胞浓度  $OD_{600}$  总值和细胞干重的平均

增长速率分别为  $1.06\text{h}^{-1}$  和  $0.316\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ , 而其最大增长速率分别为  $5.1\text{h}^{-1}$  和  $1.5\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ , 细胞倍增最短时间为  $1.9\text{h}$ ,  $\text{P}(\text{HB-co-HV})$  的平均合成速率为  $0.066\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ , 得率系数  $Y_{\text{x}}/s$ ,  $Y_{\text{p}}/s$  和  $Y_{\text{p}}/x$  分别为  $0.36$ ,  $0.076$  和  $0.21$ 。

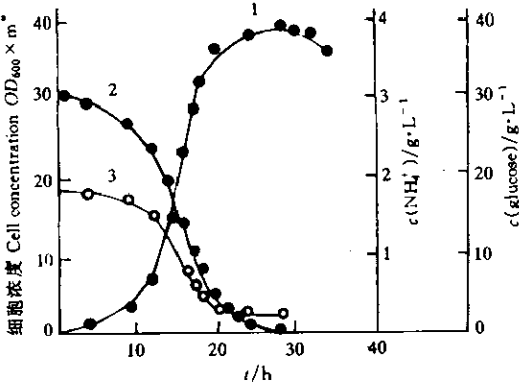


图 2 *X. autotrophicus* 的分批发酵

- 1. 细胞浓度; 2. 葡萄糖浓度;
- 3.  $\text{NH}_4^+$  浓度; \* m 为稀释倍数.

Fig.2 The batch of culture *X. autotrophicus*

- 1. The cell concentration;
- 2. Glucose concentration;
- 3.  $\text{NH}_4^+$  concentration;
- \* m was the dilution times.

2.4 补料分批发酵实验

结果见图 3(a, b)。由图 3-a 可以看出, 采用补料分批发酵的方式延长了细胞生长的对数期, 当发酵进行到  $32\text{h}$  时, 细胞浓度  $\text{OD}_{600}$  总值达到  $112$ , 细胞干重达到  $31.5\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $\text{P}(\text{HB-co-HV})$  达  $10.7\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。  $32\text{h}$  以后由于采取氮限量等胁迫措施, 细胞浓度增长不大, 到发酵终止时细胞浓度  $\text{OD}_{600}$  总值为  $124$ , 细胞干重为  $34.9\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。但是无论从形态观察, 还是从化验结果来看,  $\text{P}(\text{HB-co-HV})$  的积累速率加快。到  $42\text{h}$  发酵终止时,  $\text{P}(\text{HB-co-HV})$  的含量达  $25.48\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

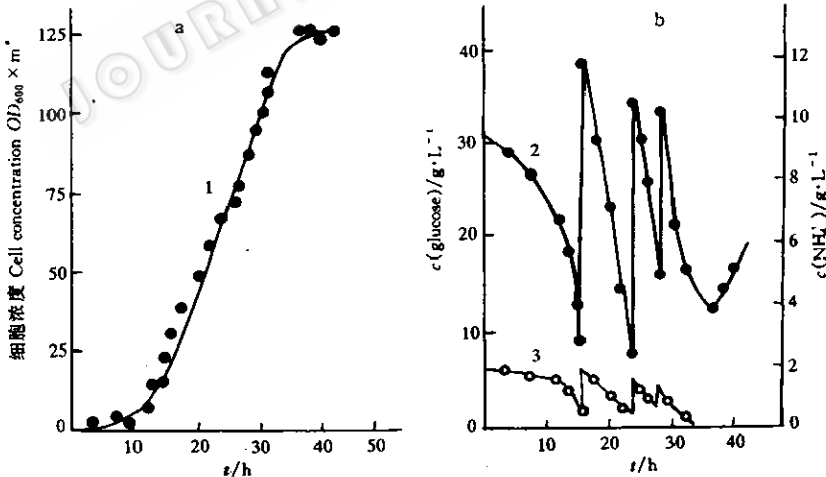


图 3 *X. autotrophicus* 的补料分批发酵

- a. 细胞生长曲线; b. 基质消耗曲线; 符号同图 2。

Fig.3 The fed-batch fermentation by *X. autotrophicus*

- a. The curve of cell growth; b. The curve of substrate consuming; Symbols are as in Fig.2

计算补料分批发酵的结果, 其细胞浓度  $\text{OD}_{600}$  总值和细胞干重的平均增长速率分别为  $2.95\text{h}^{-1}$  和  $0.83\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ , 而  $\text{P}(\text{HB-co-HV})$  的平均合成速率为  $0.61\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ,

得率系数  $Y_x/s$ 、 $Y_p/s$  和  $Y_p/x$  分别为 0.238、0.174 和 0.730。

3 讨论

3.1 试验菌株的糖代谢途径

碳源的利用与微生物具有的糖代谢途径有关。试验菌株不能利用乳糖,很可能其不合成  $\beta$ -半乳糖苷酶,而难以利用木糖和阿拉伯糖等五碳糖则是因为试验菌株缺乏磷酸戊糖途径(PK)。根据该菌株可以很好地利用葡萄糖、蔗糖、乙酸盐和苹果酸盐等碳源的情况和有关资料的介绍,可以推测 Entener-Doudoroff 途径和 TCA 循环可能是其降解糖的主要途径。然而要进一步确认,还需作酶学和放射性元素标记实验<sup>[20~23]</sup>。

3.2 P(HB-co-HV)的合成途径

关于 PHA 的生物合成途径,不少资料中作过讨论,认为合成 HB 单体的前体是乙酰 CoA,合成 HV 单体的前体是丙酰 CoA。采用诸多菌种进行 P(HB-co-HV)的发酵试验时需添加丙酸或戊酸以促进 HV 单体的合成。那么如何解释试验菌株在葡萄糖培养基上即可合成 HV 单体的现象呢?我们认为该菌株很可能具有由丙酮酸合成丙酸的途径。推测其由葡萄糖合成 P(HB-co-HV)的假定途径(图 4)。葡萄糖经 E. D 途径降解为丙酮酸后,丙酮酸可由丙酮酸脱氢酶催化生成乙酰 CoA。乙酰 CoA 进入 TCA 环,也可作为合成 HB 的前体。若丙酮酸经甲基丙二酰 CoA 转羧基酶催化,沿丙酮酸-丙酸途

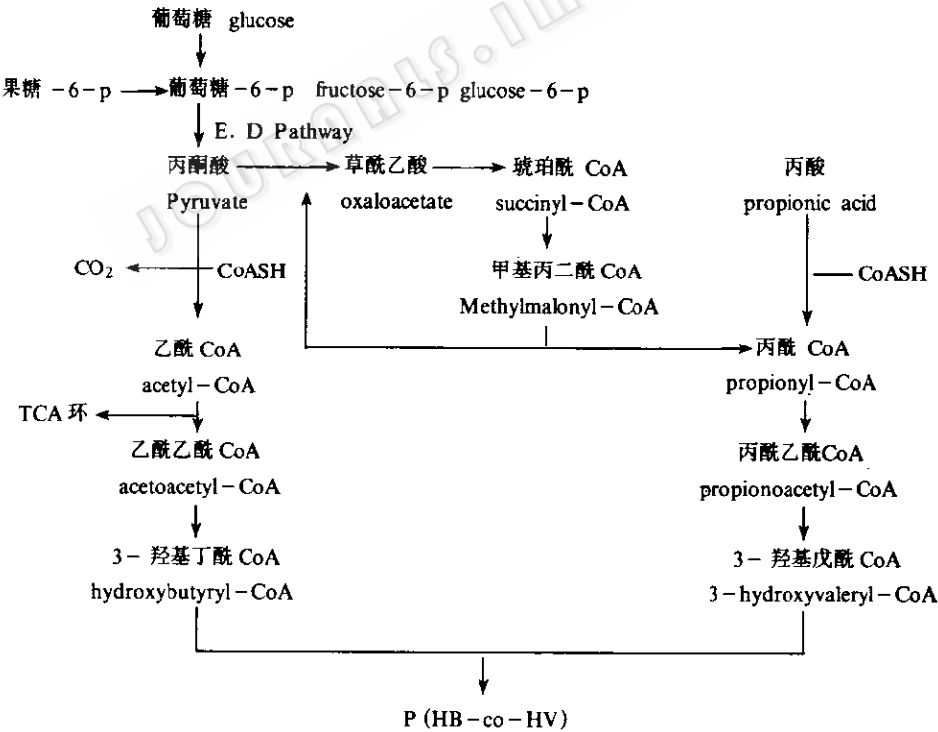


图 4 P(HB-co-HV)合成的假定途径

Fig.4 The supposed pathway of P(HB-co-HV)

径形丙酰 CoA, 则可以丙酰 CoA 作引物合成 HV 单体, 进而在聚合酶的催化下由 HB、HV 合成 P(HB-co-HV)<sup>[22, 23]</sup>。

### 3.3 合成 P(HB-co-HV) 的代谢调控

实验中发现在对数生长期细胞含有少量的 PHA 颗粒, 在稳定期或胁迫条件下细胞内 PHA 的含量增多。这种现象说明细胞能荷和还原力  $\text{NADPH} + \text{H}^+$  是合成 PHA 的重要调节因子。在菌体生长时, 细胞能荷和  $\text{NADPH} + \text{H}^+$  较低, 乙酰 CoA 主要流向 TCA 循环, 而当生长受到限制, 碳源又大量存在时, 细胞能荷和  $\text{NADPH} + \text{H}^+$  升高, 抑制了柠檬酸合成酶的活性, 从而促进了 PHA 的合成和积累。至于试验菌株合成 P(HB-co-HV) 时单体 HB、HV 比例的调节, 我们知道得还很少, 只发现以氯化铵代替硫酸铵和蛋白胨作氮源时, HB/HV 会更低, 而以乙酸盐代替葡萄糖作碳源时会将 P(HB-co-HV) 中 HB 的含量提高到 78%。推测这些变化与丙酮酸-丙酸途径的调节有关, 但调节机理尚需进一步研究。

### 参 考 文 献

- [1] Anderson A J, Dawes E A. *Microbiol Rev*, 1990, **54**: 450~472.
- [2] Ramsay B A, Ramsay J A, Copper D G. *Appl Environ Microbiol*, 1989, **55**: 548~589.
- [3] Huijberts G M, Eggink G, Huijberts G W et al. *Appl Environ Microbiol*, 1992, **58**: 536~544.
- [4] Zhong H, Obias V, Gonyer K et al. *Appl Environ Microbiol*, 1994, **60**: 1198~1205.
- [5] Lageveen R G, Huisman Q W, Preusting H et al. *Appl Environ Microbiol*, 1988, **54**: 2924~2932.
- [6] Kim B S, Lee S C, Lee S Y et al. *Enzyme Microb Technol*, 1994, **16**(7): 556~561.
- [7] Ramsay B A, Lomaliza K, Chavarie C et al. *Appl Environ Microbiol*, 1990, **56**: 2039~2098.
- [8] Kim B S, Lee S C, Lee S Y et al. *Biotechnol Bioeng*, 1994, **43**: 892~898.
- [9] 中国科学院微生物研究所细菌分类组编著. 一般细菌常用鉴定方法. 北京: 科学出版社, 1973. 193~198.
- [10] Yoo S, Kim W S. *Biotechnol Bioeng*, 1994, **43**: 1043~1051.
- [11] Bertrand J L, Ramsay B A, Ramsay J A et al. *Appl Environ Microbiol*, 1990, **56**: 3133~3138.
- [12] 张龙翔, 张庭芳, 李令媛. 生化实验方法和技术. 北京: 高等教育出版社, 1989. 9~11.
- [13] 李西开. 土壤农业化学常规分析法. 北京: 科学出版社, 1983. 96~98.
- [14] Karr D, Waters K J, Emerich D W. *Appl Environ Microbiol*, 1983, **49**: 1339~1344.
- [15] Ward A C, Dawes E A. *Anal Biochem*, 1973, **52**: 607~613.
- [16] Williamson D H, Wilkinson J F. *J Gen Microbiol*, 1958, **19**: 198~209.
- [17] Hahn S K, Chang Y K, Kim S B et al. *Biotechnol Bioeng*, 1994, **44**: 256~261.
- [18] Doi Y, Kawaguchi Y, Nakamura Y et al. *Appl Environ Microbiol*, 1989, **55**: 2932~2938.
- [19] Doi Y, Kunioka M, Nakamura Y et al. *Macromolecules*, 1986, **19**: 1272.
- [20] Krieg N R(Editor). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol. 1*. Baltimore: Williams and Wilkins Co. 1984. 325~332.
- [21] Haywood Q W, Anderson A L, Williams D R et al. *Int J Biol Macromol*, 1991, **13**(4): 83~88.
- [22] Byrom D. *Trends Biotechnol*, 1987, **5**: 246~250.
- [23] Yamane T. *Biotechnol Bioeng*, 1993, **41**: 165~170.



## STUDIES ON FERMENTATION OF SYNTHESIZING POLY(HYDROXYBUTYRATE-CO-HYDROXYVALERATE) BY *XANTHOBACTER AUTOTROPHICUS*

Zhao Liangqi \* Tian Jiesheng Wu Baihe Li Jilun

(College of Biology, Beijing Agricultural University, Beijing 100094)

**Abstract** Fermentation test of P(HB-co-HV) was carried out by a *Xanthobacter autotrophicus* strain which was isolated from soil by our laboratory. The results show that the strain is a transport mutant strain for glucose. Glucose, fructose, sucrose, maltose, acetate, propionate, lactate or malate was utilized as sole carbon source, but glucose and fructose were the best among carbon sources. The growth was not affected by  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  and peptone as different nitrogen sources, but P(HB-co-HV) content of dry cell and the HV / HB ratio of P(HB-co-HV) were affected. The fed-batch fermentation was carried out for 42h using two-stage controlling method. The final cell concentration of  $34.9 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  and the final P(HB-co-HV) concentration of  $25.48 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  were obtained in the glucose broth. The cell productivity and P(HB-co-HV) productivity were  $0.83 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  and  $0.61 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ , respectively. The yield of dry cell to the substrate ( $Y_x/s$ ), the yield of P(HB-co-HV) to the substrate ( $Y_x/s$ ) and the yield of P(HB-co-HV) to the dry cell ( $Y_p/x$ ) were  $0.283(\text{g/g})$ ,  $0.174(\text{g/g})$  and  $0.730(\text{g/g})$ , respectively. The HB content in the P(HB-co-HV) was adjusted from 24% to 78% by changing the carbon and nitrogen component of the medium.

**Key words** *Xanthobacter autotrophicus*, Fed-batch fermentation, P(HB-co-HV)

\* Present address: Department of Biological Science, ShanXi University.