

(17) 448-451

固氮菌 B_{8-G} 菌株产聚- β -羟基丁酸发酵条件研究

董兆麟 史秀杰

TQ324.9

(西北大学生物学系, 710069, 西安, 第一作者 53 岁, 男, 副教授)

摘要 通过利用碳源、氮源实验, 发现固氮菌 B_{8-G} 菌株, 在以 NH_4NO_3 为氮源、蔗糖或甘露醇为碳源的发酵培养基中生长良好。在 30°C , 220 rpm 摇床培养 48 h, B_{8-G} 菌株的生物量可达 $9.51 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 以上, PHB 含量可达细胞干重的 74% 以上。同时对 B_{8-G} 菌株的培养条件也作了研究, 采用补料分批培养方法, 获得 B_{8-G} 菌株的生物量达到 $17.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, PHB 的含量达到 76.14%。

关键词 固氮菌 B_{8-G} 菌株; 补料分批培养; 生物量; 聚- β -羟基丁酸
分类号 Q93.97

聚羟基丁酸
发酵, 生物降解塑料

聚- β -羟基丁酸(Polvhdroxybntyrate, 简称 PHB)是与聚丙烯物理、化学性质相似, 具有热塑性的一类大分子生物塑料材料。但与聚丙烯不同的是, 它既是微生物体内合成积累的产物, 又可为微生物所降解, 在应用中不污染环境, 若进入人畜体内也易被机体代谢。正因为如此, 它有“生态绿色塑料”之称。它是替代化学合成塑料最具潜力的一种新型塑料。因此, 它在工、农、医、药及人类衣食住行等方面有着极其广泛的应用前景^[1~4]。

PHB 是许多微生物体内可积累的一种聚合物。固氮菌(*Azotobacter*)也是其中之一。本研究采用固氮菌 B_{8-G} 菌株, 应用摇瓶培养, 以培养物的生物量和细胞内 PHB 的含量为主要技术指标, 探讨了固氮菌 B_{8-G} 菌株对不同碳源、氮源的利用情况及其他培养条件的研究。提出了较佳的 PHB 的发酵条件, 为 PHB 的小型发酵和分批补料培养技术打下了基础。

1 材料与方法

1.1 实验菌株

固氮菌(*Azotobacter*) B_{8-G} , 来自西北大学生物系实验室。

1.2 培养基

1.2.1 种子培养基($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) 葡萄糖 20, K_2HPO_4 1.0, $\text{MgSO}_7 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2, CaCO_3 0.5, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.25, $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.5, 用蒸馏水配制, pH7.3~7.6。

1.2.2 发酵培养基($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.02, NaHCO_3 1.0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.1, K_2HPO_4 2.0, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.4, CaCO_3 0.5, 微量元素液 1 mL, 葡萄糖(或其他碳源)20~50, 用蒸馏水配制, pH7.3~7.6。

微量元素液($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$): $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 3980, $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 70, $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 68, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 2.3, $\text{CaSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 20, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 86, 重蒸馏水配制。

1.3 培养方法

1.3.1 斜面培养 将保藏菌种接 1 环于种子斜面培养基上, 30°C 培养 32 h, 染色镜检。

1.3.2 菌体发酵培养 将培养 32 h 的种子斜面培养物,用无菌水洗下,取 1 mL 接于装量为 40 mL 发酵培养液,并带有玻璃珠的 250 mL 三角瓶中,进行摇床培养,转速为 220 rpm,30℃培养 32~48 h。收集菌体,洗涤、干燥称量。

1.3.3 PHB 的合成培养 将菌体发酵培养至 32 h 的培养物,在无菌条件下离心、洗涤 2 次,再转入装有 50 mL 新鲜培养基的 250 mL 三角瓶中,在 220 rpm,30℃摇床培养 48 h,再继续静置培养 4~12 h。染色镜检,收集菌体,离心洗涤、抽提,并对抽提物进行 PHB 定量检测。

1.3.4 补料分批培养 将碳源 1% 的发酵培养基,分装于 15 个带有玻璃珠的 250 mL 三角瓶中,每瓶装量 50 mL,30℃,220 rpm 摇床培养 12 h,取下其中的一瓶,并向其余各瓶添加一定量的 30% 浓度的碳源溶液。后每隔 3 h 取下一瓶,并重复上述操作。同时,取下的培养物,要立即离心洗涤、干燥称量。

1.4 生物量及 PHB 的检测

1.4.1 菌体形态及 PHB 颗粒的观察 用苏丹黑 B 染色制片,在显微镜下直接观察。

1.4.2 生物量测定 烘干法:取发酵液 50 mL,4 000 rpm 离心 15 min,沉淀物一菌体用蒸馏水重复离心洗涤 2 次,将菌体烘干至恒重称量。

冷冻干燥法:经 2 次离心洗涤的菌体,用预冷的无水丙酮,先离心洗涤一次,再加入等体积的无水丙酮进行冷冻干燥,所得干燥的菌粉进行称量。

1.4.3 PHB 的测定 称量法:取干燥菌体,根据菌体含 PHB 的多少(以抽提物的粘度判断)加 20~80 倍体积的氯仿,在 60℃下进行抽提,离心分别收集上清液和沉淀物,再将沉淀物重复抽提 2~3 次,合并上清液,进行减压浓缩,低温干燥,得 PHB 固形物,进行干燥称量。

紫外检测法:取一定量的氯仿抽提液于试管中,加热除去氯仿,向试管中加入 10 mL 浓 H_2SO_4 ,100℃加热 10 min,冷却后用 235 nm 波长进行紫外测定,再由标准曲线求出 PHB 的含量^[6]。

2 结果与讨论

2.1 不同氮源对菌体生物量的影响

在发酵培养基中额外分别加入 0.1% 的 NH_4NO_3 , NH_4Cl , $(NH_4)_2SO_4$, 酵母膏和 1% 的豆饼粉作为氮源,在 30℃,220 rpm 进行摇床培养 32 h 或 48 h,测定各自的生物量和 PHB 的含量,结果列于表 1。

表 1 固氮菌 *B₅₆* 在不同氮源中的生长情况

Tab. 1 The Growth of *Azotobacter B₅₆* in Different Nitrogen Source

氮源种类	NH_4NO_3	NH_4Cl	$(NH_4)_2SO_4$	酵母膏	豆饼粉	对照
浓度(%)	0.1	0.1	0.1	0.1	1	无
培养时间(h)	32	32	32	32	48	32
细胞干重(g/L)	6.34	3.60	3.48	2.2	7.02	3.87
PHB 干重(g/L)	2.08	1.40	1.31	0.45	1.45	1.26
PHB 占细胞干重的百分率(%)	32.84	38.89	37.66	23.20	20.77	32.50

由表 1 可见,不同氮源对细胞的发酵生物量影响较大,而对 PHB 的积累基本上无影响。其中 NH_4NO_3 和豆饼粉从菌体生物量来看是较好的氮源,其生物量干重可达 6.34 g/L 和 7.02 g/L。酵母膏对菌体的生长有抑制作用,这同固氮菌本身的特性是一致的。由此看来,在 PHB 的发酵过程中,于菌体前期培养中加入 NH_4NO_3 或豆饼粉对 *B₅₆* 菌株获得大量的菌体细胞,在后期培养中提高 PHB 的单位体积产量是有利的。

2.2 不同碳源对 PHB 产生的影响

实验以 5% 的葡萄糖、果糖、蔗糖、甘露醇、乙醇、淀粉分别作为发酵培养基的唯一碳源。进行一步法发酵合成 PHB,30℃,220 rpm 摇床培养 48 h,检测生物量和 PHB 含量,结果见表 2。

表 2 固氮菌 B_{2-c} 在不同碳源培养基中的生长和 PHB 的产生情况Tab. 2 The Growth and Produce of PHB of B_{2-c} in the Media with Diffirent Carbon Souce

碳源种类	葡萄糖	果糖	蔗糖	甘露醇	乙醇	淀粉	对照
细胞干重(g/L)	4.95	2.71	9.51	11.61	3.00	4.30	0.30
PHB 干重(g/L)	2.23	0.51	7.20	8.55	0.14	2.05	未检出
PHB 占细胞干重的百分率(%)	45.15	18.90	75.71	74.04	4.60	47.88	—

由表 2 可见,不同碳源对 B_{2-c} 菌株的生长和 PHB 的积累有较大的影响。其中甘露醇和蔗糖是该菌株好的碳源。培养 48 h 菌体生物量分别可达 11.61 g/L 和 9.5 g/L; PHB 分别可达 74.04% 和 75.79%。

2.3 不同碳源浓度对 B_{2-c} 菌株生长的影响

分别选用 2% 和 5% 的葡萄糖、果糖、蔗糖和甘露醇,作为不同浓度的碳源进行摇瓶培养,结果见表 3。

表 3 不同浓度碳源对固氮菌 B_{2-c} 生长的影响Tab. 3 The Effects of Diffirent Carbon Concentration on the Growth of B_{2-c}

碳源浓度	葡萄糖	果糖	蔗糖	甘露醇
2% 生物量(g/L)	4.13	2.11	5.95	6.49
2% PHB 含量(%)	32.50	12.00	60.50	57.32
5% 生物量(g/L)	4.80	2.62	9.62	11.71
5% PHB 含量(%)	44.18	18.80	75.91	74.80

由表 3 可见,增加蔗糖和甘露醇的浓度有利于菌体生物量的增加和 PHB 在菌体内的积累。

2.4 活化剂和通气量对菌体生长的影响

在以葡萄糖为碳源的发酵培养基中,额外加入活化剂 $1 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$,另作一组对照。在 30°C , 220 rpm 条件下进行摇床培养 48 h,结果如表 4。由表 4 可见,活化剂对菌体的生长及 PHB 的积累有促进作用,其机理还不清楚。

同样,在上述培养条件下,再向三角瓶中放入多个玻璃珠,进行培养 48 h 后,结果如表 5 所示。由表 5 中数据分析,加玻璃珠的作用有两个:其一是可以增加氧的溶解度,有利于菌体的生长;其二可能玻璃珠在运动过程中打散了菌体表面的荚膜物质,有利于空气同细胞表面接触,增加了氧和营养素向细胞内的输入,提高了菌体培养的生物量。但对 PHB 量的增加不明显。

表 4 活化剂对固氮菌 B_{2-c} 生长的影响Tab. 4 The Effect of Activator on the Growth of B_{2-c}

	生物量($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	PHB 含量(%)
有活化剂	4.80	33.00
无活化剂	3.40	28.00

2.5 细胞产 PHB 的发酵实验

以 2% 的葡萄糖为碳源,采用 1.3.3 两步培养法进行发酵,后期进行静置培养结果见表 6。

由表 6 可见,停止摇床培养后,菌体生长速率明显减慢,随着时间的延长,生物量逐渐减少,这可能由于少数菌体自溶所致。但 PHB 含量却越来越大,静量 8~12 h PHB 含量可达 46.5%。可见在培养后期控制氮源有利于菌体内 PHB 的积累。这也进一步说明了 PHB 属菌体非生长连动型次生代谢产物。

表 5 通气量对固氮菌 B_{2-c} 生长的影响Tab. 5 The Effect of Added Glass Bead on the Growth of B_{2-c}

	生物量($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	PHB 含量(%)
有玻璃珠	5.53	34
无玻璃珠	4.76	32

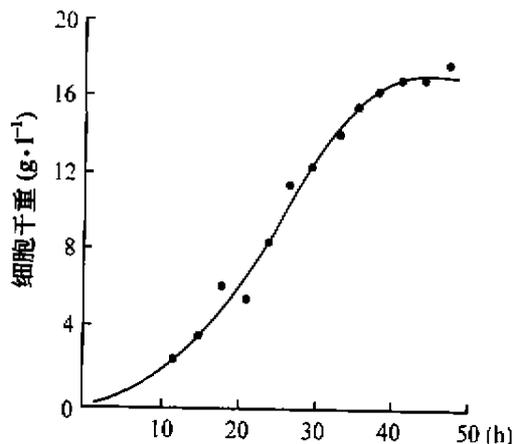
表 6 B_{2-c} 菌株静置培养对 PHB 的形成影响Tab. 6 Effects of Static Cultivation on Poly-3-hydroxybutyrate Production by B_{2-c} Strain

静置时间(h)	生物量($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	PHB 含量(%)
对照	5.9	26.0
4	5.4	35.2
8	5.26	45.7
12	4.0	46.5

2.6 补料分批培养实验

以1%的蔗糖为基础碳源,30%的蔗糖溶液为补加碳源,按1.3.4节的实验方法,每次加量3 mL,结果见附图。

由附图可见,采用补料分批培养的方式延长了细胞生长的对数期,补加碳源到第8次碳源总量达17%,培养时间为36 h时,生物量达 $16.8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。后再补加碳源,生物量增加不明显,证明菌体已进入稳定期。此时静置培养4~8 h,从测定结果看PHB的积累速率增加。到48 h终止发酵,生物量和PHB含量分别为 $17.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 和76.14%。



附图 补料分批培养实验结果

Fig. The Effect of Supplemented Batch Cultivation Test

3 小结

综合以上方法和实验结果, B_{8-G} 菌株产PHB的培养条件,应以蔗糖为碳源, NH_4NO_3 为氮源,并添加少量的活化剂,在高通氧的情况下,首先进行补料分批培养,以获得大量的菌体生物量,然后再进入PHB的合成发酵。在合成发酵的后期,静置培养控制氮源的过程是必要的,因为,此过程对提高PHB的得率有极为重要的意义。

参 考 文 献

- 1 Knowles Je. Development of Anatural aegradable polymer for orthopaedicuse. Journal of Medicol Engineering & Technology, 1993, 17(4),129~137
- 2 Gassner F, Owen A J. Polr (3-hydroxybvtvryate)-Poly(3-hydroxyvalerate) blends. Polymer rhter-haeional, 1996, 39(3),215~219
- 3 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
- 4 罗明典.生物降解技术与环保产业形成.生物工程信息快报,1996(8):29~32
- 5 李祖义,许兴妹.细菌产生的高分子材料—聚羟基丁酸.生物工程学报,1987,3(3):213

责任编辑 徐象平

The Study of the Culture Condition of B_{8-G} Strain (*Azotobacter*) Produced Poly- β -Hydro Butyric Acid

Dong Zhaolin Shi Xíujie

(Department of Biology, Northwest University, 710069, Xi'an)

Abstract By the tests of utilization of carbbon souce and nitrogen souce, it was found that the B_{8-G} strain (*Azotobacter*) can grow well in the medium, using NH_4NO_3 as nitrogen source and sucrose or mannitol as carbon source. The culture was cultivated for 48 h under the condition of 32°C and 220 rpm. The biomass of B_{8-G} could reach 9.51 g/l , the content of PHB was more than 74%. The orther culture condition of B_{8-G} strain was also studied. By the method of supplemented batch cultivation, the high biomass of B_{8-G} was obtained which was 17.2 g/l , and PHB content reached 76.14% of cell dry weight.

Key words poly- β -hydroty butyric acid; strain B_{8-G} (*Azotobacter*); biomass; supplemented batch cultivation