

# 真氧产碱杆菌在双营养(碳、氮)限制区内 合成聚羟基烷酸酯

严群 堵国成 陈坚\*

(江南大学工业生物技术教育部重点实验室, 无锡 214036)

**摘要** 研究了真氧产碱杆菌以混合有机酸为碳源, 硫酸铵为氮源, 在双营养(碳、氮)限制区内聚羟基烷酸酯的生物合成。结果表明, 双营养限制区的长度与聚羟基烷酸酯的产量呈正相关。同时, 在对两种不同的双营养限制区实现方式进行比较后发现, 首先限制碳源的双营养限制方式比首先限制氮源的双营养限制方式更有利于聚羟基烷酸酯的合成, 在这两种不同营养限制方式下, PHAs 的最高产量分别为 3.72 g/L 和 2.55 g/L。

**关键词** 真氧产碱杆菌, 聚羟基烷酸酯, 双营养限制区, 生物合成

中图分类号 Q935 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2003)04-0497-05

和哺乳动物细胞中的糖原以及植物细胞内的淀粉一样, 微生物将会在培养基中碳、氮、氧、磷、硫、镁和钾等营养元素分别或其中两种甚至三种同时受到限制时合成聚羟基烷酸酯(Polyhydroxyalkanoates, PHAs)作为其碳源和能源储备。PHAs 主要包括由食油假单胞菌(*Pseudomonas oleovorans*)等所合成的中链 PHAs(Medium-chain-length-PHAs, mcl-PHAs)和真氧产碱杆菌(*Ralstonia eutropha*)等所合成的短链 PHAs(Short-chain-length-PHAs, scl-PHAs)。引入瞩目的, PHAs 由于其独特的生物可降解性而被称为“可降解塑料”, 并有望部分代替源于石油的传统塑料以减轻对环境的污染<sup>[1,2]</sup>。

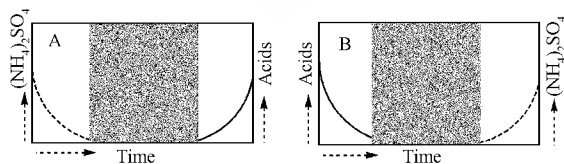


图 1 图解两种不同方式的双营养(碳、氮)限制方式

Fig. 1 Illustration of two different manners of dual-nutrient limitation

A and B refer to the two different manners of dual-nutrient limitation discussed as below. Real curve shows the residual concentration of carbon source (mixed acids); dotted curve shows the residual concentration of nitrogen source ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ). Shaded areas refer to the dual-nutrient limited zone.

由于在微生物合成 PHAs 所需限制性营养条件中, 当培养基内碳源过剩, 并且氮源受到限制时, 微生物可以合成占细胞干重最大比例的 PHAs, 因而这种单营养限制条件下的

PHAs 合成已成为目前普遍采用的 PHAs 生产方式。近年来的研究表明, *P. oleovorans* 在合成 mcl-PHAs 时其细胞量和细胞组成受到碳、氮双重营养限制的影响, 并且双重限制区的宽度将直接决定胞内 mcl-PHAs 量的多少, 而双重限制区的宽度又是由稀释率决定的。Zimm 还研究了在三重营养限制(碳、氮、磷)的条件下 *P. oleovorans* 合成 mcl-PHAs 的过程<sup>[3,4]</sup>。但对于由 *R. eutropha* 在双营养限制区(碳、氮)内合成 scl-PHAs 的研究, 到目前为止国内外尚无这方面的报道。

为了深入了解 PHAs 的合成过程, 以及探求有效提高有机酸作碳源时的 PHAs 产量的途径, 本文研究了 *R. eutropha* 以混合有机酸为碳源, 硫酸铵为氮源, 在 A、B 两种不同的双营养限制区实现方式下合成 PHAs 的情况(图 1)。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

- 1.1.1 菌种: 真氧产碱杆菌 *Ralstonia eutropha* ATCC 17699。
- 1.1.2 斜面培养基和种子培养基: 参见文献[7]。
- 1.1.3 发酵培养基: 参见表 1。碳源、氮源流加液浓度分别为 100 g/L、20 g/L, 混合有机酸比例为: 乙酸: 乳酸: 丙酸: 丁酸 = 1:1:3:3(质量比)<sup>[8]</sup>。其他与种子培养基同。

### 1.2 方法

1.2.1 双营养限制培养方式的实现方法(见表 1): 5 L 发酵罐(KBT 韩国)装液 3 L(发酵装置见图 2), 接种量 10%, 搅拌转速 400 r/min, 通气量 4.5 L/min, 通过自动流加 3 mol/L 盐酸或氢氧化钠溶液调节 pH 值为 7.0, 发酵时间 48 h。

收稿日期: 2003-01-06, 修回日期: 2003-04-17。

基金项目: 江苏省国际合作基金资助(No. BZ2002056)。

\* 通讯作者。 Tel/Fax: 86-510-5888301; E-mail: jchen@sytu.edu.cn

1.2.2 细胞干重(Dry cell weight ,DCW) PHAs 测定均按文献[8]方法。

1.2.3 有机酸的测定 液相色谱法(Agilent 1100 美国<sup>[8]</sup>)。

1.2.4 硫酸铵的测定 纳氏试剂分光光度法<sup>[9]</sup>。

表 1 两种不同的双营养限制区实现策略\*

Batch	A1, A2, A3	B1, B2, B3
$C_0$ (g/L)	0	2
$N_0$ (g/L)	1.5	0
$F_{\text{carbon}}$ (mL/h)	0~6 h	12, 18, 25
	6~48 h	12, 18, 25
$F_{\text{nitrogen}}$ (mL/h)	0~6 h	0
	6~48 h	11

\* 1)  $C_0$ ,  $N_0$  refer to the initial concentration of carbon and nitrogen sources.  $F_{\text{carbon}}$  and  $F_{\text{nitrogen}}$  refer to the feeding rates of carbon and nitrogen sources.

2) A1, A2, A3 and B1, B2, B3 stand for the three batches of PHAs fermentation with different feeding strategies of carbon and nitrogen sources so as to maintain the corresponding dual-nutrient limitation manners of A and B, respectively.

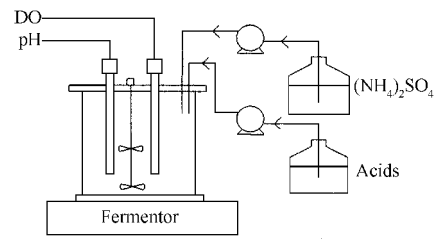


图 2 双营养限制发酵方式的结构示意图

Fig. 2 Schematic illustration of dual-nutrient limitation fermentation

## 2 结果与讨论

### 2.1 *R. eutropha* 在 A 方式下的 PHAs 发酵

A 方式是指发酵培养基内起初加入一定量的氮源(硫酸铵),但不加入碳源,作为碳源的有机酸从发酵过程起始即由流加方式进入发酵罐,以此达到限碳的目的,随着细胞生长进入对数期和 PHAs 的大量合成,流加到培养基中的硫酸铵和有机酸大部分被消耗,因而发酵进入双营养限制阶段(图 3-A2, A3),最后,由于碳源、氮源不断流加到发酵培养基,以及细胞生长周期进入衰亡期,培养基内的有机酸以及硫酸铵浓度逐渐升高,最终使得双营养限制区结束。

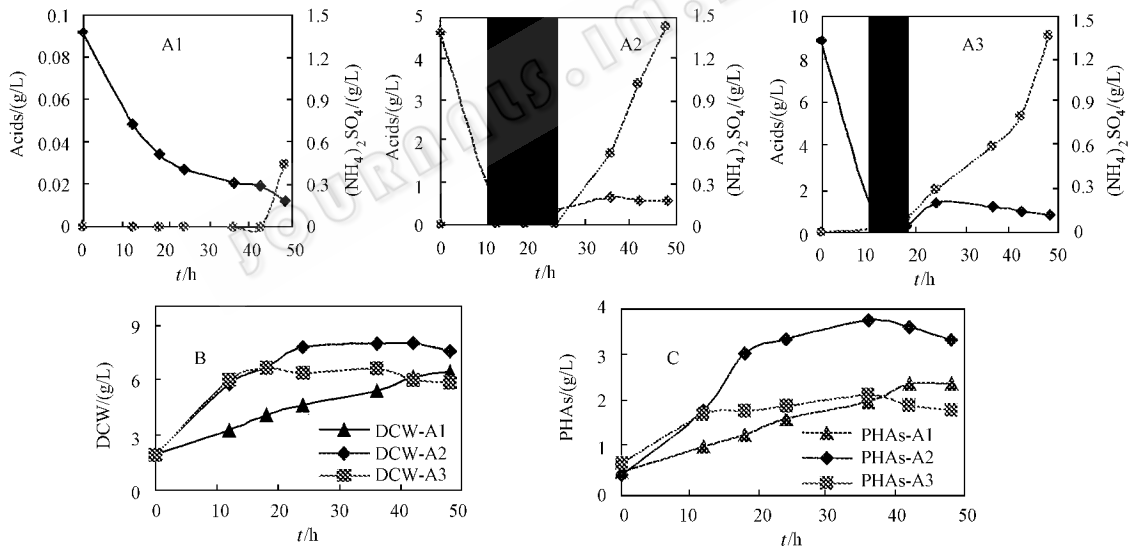


图 3 *R. eutropha* 在 A 方式下的发酵 PHAs 过程

Fig. 3 Time course of PHAs fermentation by *R. eutropha*

● Acids; ◆  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; Shadow: dual-nutrient-limitation zone

Fig A1, A2, A3 indicate the corresponding time course of the utilization of carbon and nitrogen sources of the three batches of PHAs fermentation described as Table 1, respectively

图 3-A1、A2、A3 比较了 3 种不同的有机酸流加速率对该方式下双营养限制区域以及 PHAs 合成的影响。由图 3-A2 可知,当有机酸的流加速率为 18 mL/h 时,双营养限制区域的长度最大,从发酵过程的第 8 h 开始,到第 25 h 结束,总长度约为 17 h;当有机酸的流加速率为 12 mL/h (图 3-A1) 时,基本无双营养限制区域出现;而当有机酸的流加速率为 25 mL/h 时(图 3-A3),双营养限制区域的长度仅为 10 h 左右。图 3-B、

C 为 3 种发酵方式下细胞生长(DCW)和 PHAs 合成过程曲线,由图可知,当有机酸流加速率为 18 mL/h 时,该发酵方式可以取得最大 DCW 和 PHAs 产量,分别为 8 g/L(36 h)和 3.72 g/L(42 h),其中在双营养限制区内所合成的 PHAs 量大约为 1.5~1.7 g/L,约占整个发酵过程中总 PHAs 增量的 50% 左右。而当有机酸的流加速率为 12 mL/h 时,由于整个发酵过程中培养基内残留有机酸的浓度太多低于检测限(图 3-

A1) 因而不足以维持 *R. eutropha* 细胞的生长甚至 PHAs 的合成, 最终使得该发酵过程结束后的 DCW 和 PHAs 产量均较低; 当有机酸的流加速率为 25 mL/h 时(图 3-A3), 从第 20 h 左右, 基质内的残留有机酸浓度已高于 2 g/L, 并逐渐升高至发酵过程结束, 由于超过一定浓度的有机酸在培养基中将会抑制微生物的生长<sup>[10]</sup>, 因而该发酵过程的 DCW、PHAs 产量也较低。

这表明, PHAs 合成过程中的碳源或者氮源受到限制并非指培养基内的有机酸或者硫酸铵被刻意控制在一个极低的浓度, 而是指流加到发酵罐内有有机酸以及硫酸铵的量与细胞的生长以及产物形成所需碳源的量大体相当, 从而出现培养基中剩余碳源以及氮源浓度较低, 甚至接近或低于检测限度的现象, 因而形成所谓“双营养限制”的情形。

## 2.2 *R. eutropha* 在 B 方式下的 PHAs 发酵

和 A 方式相反, B 方式是指发酵培养基内起初加入一定量的碳源, 但不加入氮源, 作为氮源的硫酸铵从发酵过程一

开始由流加方式进入发酵罐以达到限氮的目的, 其余与 A 同。

图 4-B1、B2、B3 比较了 3 种不同的有机酸流加速率对该方式下双营养限制区域以及 PHAs 合成的影响。由图 4-B2 可知, 当有机酸的流加速率为 18 mL/h 时, 双营养限制区域的长度最大, 从发酵过程的第 10 h 开始, 到第 40 h, 总长度约为 30 h; 当有机酸的流加速率为 12 mL/h 时(图 4-B1) 基本无双营养限制区域出现, 而当有机酸的流加速率为 25 mL/h 时(图 4-B3), 与图 3-A3 所示类似, 双营养限制区域的长度同样仅为 10 h 左右。图 4-A、C 为上述 3 种发酵方式的细胞生长(DCW)和 PHAs 合成过程曲线, 同样地, 当有机酸流加速率为 18 mL/h 时, 该发酵方式可以取得最大 DCW 和 PHAs 产量, 分别为 8.28 g/L(42 h) 和 2.55 g/L(42 h), 其中在双营养限制区内所合成的 PHAs 量大约为 0.8~1.0 g/L, 约占整个发酵过程中总 PHAs 增量的 40% 左右。而当有机酸的流加速率为 12 mL/h 和 25 mL/h 时, 出现与 A1 以及 A3 类似的情形。

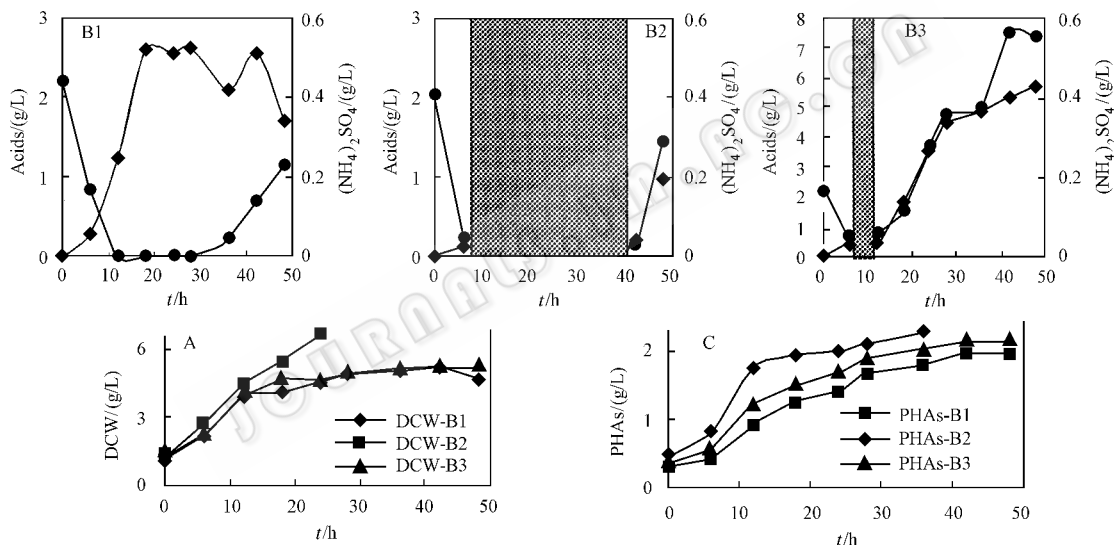


图 4 *R. eutropha* 在 B 方式下的发酵 PHAs 过程

Fig.4 Time course of PHAs fermentation by *R. eutropha*

● Acids ; ◆  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

Fig B1, B2, B3 indicate the corresponding time course of the utilization of carbon and nitrogen sources of the three batches of PHAs fermentation described as Table 1, respectively

与 A2 相比, 方式 B2 的双营养限制区域虽然较长, 并且最终 DCW 亦稍高于 A2, 然而这种方式的 PHAs 产量较低, 两者相差最大为 30% 左右。这种差别显然是由于不同方式的双营养限制过程造成的, 即首先限碳的双营养限制方式比首先限氮的双营养限制方式更有利于 PHAs 的合成。由图 3-B、C 和图 4-A、C 可知, 在细胞生长方面, 方式 A2 的 DCW 从发酵过程开始后就高于 B2, 直到第 36 h 左右。在 PHAs 的合成方面, 从 0~12 h, 二者的 PHAs 变化趋势基本一致, 然而从第 12 h 开始, A2 中 PHAs 的合成速度开始高于 B2, 直到发酵过程的第 36 h, 其中第 12-24 h 正是 A2 中双营养限制区域的主要

组成部分, 对 B2 而言, 尽管该方式下 PHAs 合成一直持续到第 42 h, 并且整个 PHAs 合成过程也大部分包含在双营养限制区域内, 但最终 PHAs 产量仍大大低于 A2。

这可能是由于, 无论是由 *P. oleovorans* 合成 mcl-PHAs, 还是由 *Methylobacterium rhodesianum*、*Azotobacter vinelandii* 或 *R. eutropha* 合成 scl-PHAs, 细胞内与 PHAs 合成相关的中间产物池 (Metabolite pools) 首先应处于饱和状态, 此时任何的代谢溢出 (Overflow metabolism) 将直接导致 PHAs 前体物质和 PHAs 的合成<sup>[11]</sup>。在细胞生长的前期及中期, 首先限氮的双营养限制方式中, 由于氮源的相对缺乏, 造成细胞内 PHAs 合成酶系的

相对不发达,也就是不能够使得中间产物池处于相对饱和,因而最终导致较低的 PHAs 产量。当然,更进一步的原因尚有待深入研究。

### 3 结 论

1. 与双营养限制方式下的 PHAs 分批发酵相比,在同样的条件下,采用单营养限制方式的 PHAs 分批发酵,最高 PHAs 产量仅为 1.5 g/L 左右<sup>[7,8]</sup>;而在双营养限制条件下,PHAs 的最高产量为 3.72 g/L;

2. PHAs 的合成主要是在双营养限制区内进行的。在给定的实现双营养限制方式下,双营养限制区域的长度往往与 PHAs 的合成呈正相关,这就为进一步提高细胞量和 PHAs 产量开辟了新的思路;

3. 在两种不同实现双营养限制的方式中,首先限碳的实现方式(方式 A)显然由于其较高的合成效率因而对 PHAs 的合成更为有利。

### REFERENCES(参考文献)

- [ 1 ] Madison L L , Huisman G W . Metabolic Engineering of Poly( 3-Hydroxyalkanoates ) from DNA to Plastics . *Microbiol Mol Biol Rev* , 1999 , **63** : 21 - 53
- [ 2 ] Asenjo J A , Schmidt A S , Anderson P R *et al* . Effect of single nutrient limitation on poly- $\beta$ -hydroxybutyrate molecular weight distribution in *Alcaligenes eutrophus* . *Biotech Bioeng* , 1995 , **46** : 497 - 502
- [ 3 ] Zinn M S . Dual( C , N ) nutrient limited growth of *Pseudomonas oleovorans* . Dissertation of Ph. D. 1998 . Swiss Federal Institute of Technology Zurich , Swiss

- [ 4 ] Durner R A . Feast and starvation : accumulation of bioplastic in *Pseudomonas oleovorans* . Dissertation of Ph. D. 1998 . Swiss Federal Institute of Technology Zurich , Swiss
- [ 5 ] Choi J , Lee S Y . Process Analysis and Economic Evaluation for Poly( 3-hydroxybutyrate ) Production by Fermentation . *Bioprocess Eng* , 1997 , **17** : 335 - 342
- [ 6 ] Argelier S , Delgenes J-Ph , Moletta R . Design of Acidogenic Reactors for the Anaerobic Treatment of the Organic Fraction of Solid Food Waste . *Bioprocess Eng* , 1998 , **18** : 309 - 315
- [ 7 ] YAN Q( 严群 ) , DU G C( 堵国成 ) , CHEN J( 陈坚 ) . Studies on biosynthesis of polyhydroxyalkanoates by *Ralstonia eutropha* with short-chain-length organic acids . *Chin J Process Eng*( 过程工程学报 ) , 2002 , **5** : 483 - 488
- [ 8 ] YAN Q( 严群 ) , DU G C( 堵国成 ) , CHEN J( 陈坚 ) . Biosynthesis of polyhydroxyalkanoates by *Ralstonia eutropha* with mixed organic acids as carbon sources . *J Chem Ind Eng( China )*( 化工学报 ) in press )
- [ 9 ] National Environment Protect Bureau( 国家环保局 ) . Method of Examining and Analyzing the Water and Waste Water( 水和废水分析方法 ) . 3<sup>rd</sup> ed . Beijing , China Environmental Science Press , 1989 , pp. 254 - 256
- [ 10 ] Suzuki T , Yamane T , Shimizu S . Kinetics of Nitrogen Source Feeding on Production of Poly-hydroxybutyric by Fed-batch Culture . *Appl Microbiol Biotech* , 1986 , **24** : 366 - 369
- [ 11 ] Roland A D , Bernald W , Thomas E . Accumulation of poly[( R )-3-hydroxyalkanoates ] in *Pseudomonas oleovorans* during growth with octanoate in continuous culture at different dilution rates . *Appl Environ Microbiol* , 2002 , **66** : 3408 - 3414

## Formation of Polyhydroxyalkanoates During the Dual-nutrient-limited Zone by *Ralstonia eutropha*

YAN Qun DU Guo-Cheng CHEN Jian \*

( Ministry of Education , Key Laboratory of Industrial Biotechnology , Southern Yangtze University , Wuxi 214036 , China )

**Abstract** Polyhydroxyalkanoates ( PHAs ) are a class of polyesters biosynthesized by microorganisms ( esp. *Ralstonia eutropha* ) under an unbalanced growth condition , and which are supposed to partly take the place of traditional plastics made from petroleum in the near future since they are harmless to the environment and biodegradable . Organic acids ( mainly butyrate , lactate , propionate and acetate ) produced from anaerobic digested food wastes , industrial wastes and sewage may be used as cheap carbon sources since the large amounts of the above wastes disposed by industry and family each year . In order to better understand the process of PHAs formation with acids as carbon sources , so as to increase the yields of PHAs . Biosynthesis of PHAs by *R. eutropha* during the dual nutrient-limitation-zone was investigated with mixed organic acids ( the mass ratio of the four component acids was butyrate : propionate : acetate : lactate = 3 : 3 : 1 : 1 , which was simulated as once the result of anaerobic digestion of food wastes ) as carbon sources and ( NH<sub>4</sub> )<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> as nitrogen source . Two different manners of maintaining the dual-nutrient-limitation zone were adopted by feeding mixed acids and ( NH<sub>4</sub> )<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> at determined rates to the fermentation culture which were free of carbon sources ( manner A ) or nitrogen sources ( manner B ) firstly . The results suggest that , first of all , the meaning of the limitation of mixed acids or ( NH<sub>4</sub> )<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> does not mean to limit the supply of them , but mean to feed as more as possible of carbon and nitrogen sources in order to meet the cell growth and PHAs formation of *R. eutropha* to the largest extent . However

it's indispensable to make the residual concentration of carbon and nitrogen sources as low as possible since organic acids are inhibitive to the cell growth, and most importantly, only under the presence of nitrogen during the PHAS formation period of the fermentation could *R. eutropha* produce more PHAs than any other unbalanced growth condition. Secondly, with the increase of the width of the dual-nutrient-limitation zone, the yield of PHAs would also increase, it suggests that most of the PHAs were biosynthesized during the dual-nutrient-limitation zone. Finally, in contrast with the dual-nutrient-limitation manner of limiting the nitrogen source at first (manner B), the dual-nutrient-limitation manner of limiting the carbon source at first (manner A) was more favorable for the production of PHAs, and the maximum production of PHAs of these two manners are 3.72 g/L and 2.55 g/L, respectively. It may be because that PHAs formation required enzymes could not be well developed when *R. eutropha* grow under the state of nitrogen limitation from the beginning of fermentation. Besides, yield of PHAs produced by the dual-nutrient-limitation fermentation is larger than that of the single-nutrient-limitation batch culture. Therefore, it seems that to increase the output of PHAs production, the strategy of maintaining as wide as possible the width of dual-nutrient (C, N)-limitation zone may be effective.

**Key words** *Ralstonia eutropha*, PHAs, dual-nutrient-limitation zone, biosynthesis

Received : 01-06-2003

This work was supported by Grant from International Cooperation Project of Jiangsu Province, China (No. BZ2002056).

\* Corresponding author. Tel/fax : 86-510-5888301 ; E-mail : jchen@sytu.edu.cn