

丁醇对发酵生产 3-羟基丁酸与 3-羟基己酸共聚酯(PHBHHx) 单体组成的影响*

李 荷¹ 欧阳少平² 吴 琼^{2**} 陈国强²

(1 河南省平顶山高等师范专科学校化学系 平顶山 467000 2 清华大学生物科学与技术系 北京 100084)

摘要 3-羟基丁酸与 3-羟基己酸共聚酯(PHBHHx)是由微生物合成的完全可降解高分子材料,其材料性能与 3-羟基己酸(3HHx)在共聚物中的含量有关。嗜水性气单孢菌 *A. hydrophila* 4AK4 合成的 PHBHHx 中,3HHx 含量通常都在 12~15mol% 之间。通过在培养基中添加正丁醇,降低了 PHBHHx 中 3HHx 的含量。在摇瓶培养中获得了含 3HHx 为 5.8mol% 的 PHBHHx;在 6L 发酵罐中 54h 的发酵培养,获得 40g/L 的细胞干重(CDW),并将 3HHx 的含量在发酵过程中有效地降低到 5~10mol%。

关键词 嗜水性气单孢菌 正丁醇 月桂酸 豆油 3-羟基己酸

3-羟基丁酸与 3-羟基己酸共聚酯(PHBHHx)作为第 3 代生物可降解材料以其优良的机械性能而引起人们广泛的兴趣^[1]。它具备塑性好、熔点较低、断裂伸长率高、容易加工等诸多优点^[2]。近年的研究发现,PHBHHx 的材料性能与 3HHx 单体的含量有密切关系^[3]。随着 3HHx 含量的提高,PHBHHx 的熔点降低、柔软性和断裂伸长率增加^[4]。不同 3HHx 含量的 PHBHHx 具有不同的加工性能和材料特性,可在塑料工业中得以推广应用,也可能在医疗、制药、电子等高附加值领域得到广泛应用^[5]。

利用 *Aeromonas hydrophila* 4AK4 生产的 PHBHHx,3HHx 在 PHBHHx 中的含量通常在 12~15mol% 之间^[6~8]。由于 *Aeromonas hydrophila* 4AK4 合成 PHBHHx 的途径仅依赖于脂肪酸的 β 氧化过程^[2],改变碳源、改变发酵条件等方法对 3HHx 含量几乎没有任何影响^[9]。为降低这一比例,得到不同 3HHx 单体含量的 PHBHHx,本文研究了在培养基中添加各种低级醇类对 PHBHHx 中 3HHx 含量的影响。

1 材料与方法

1.1 菌种及实验装置

菌种:嗜水性气单孢菌 4AK4 (*Aeromonas hydrophila* 4AK4),清华大学微生物实验室收藏。实验装置:自动控制的 6L 发酵罐 NBS 3000 (NBS, New Brunswick, 美国)。摇床 (NBS Series 25D, New Brunswick, 美国)。

1.2 摇瓶培养基及培养条件

培养基成分包括 (g/L): 月桂酸 4, 豆油 16, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 9.65, KH_2PO_4 1.5, 酵母粉 1, 微量元素溶液 I 10m/L 和微量元素 II 1m/L。其中,微量元素溶液 I 含 (g/L): CaCl_2 0.02, Fe Citrate 0.05 和 1mol/L HCl ; 微量元素溶液 II 含 (g/L) $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.03, H_3BO_3 0.3, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.2, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.01, $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.02, $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.03 和 6mol/L HCl 。

培养条件为:在 500ml 摇瓶中加入 100ml 的培养基。30℃, 48h, 摇床转速 200r/min。

1.3 实验方法

1.3.1 在培养基中添加低级醇类对 PHBHHx 中 3HHx 的含量的影响 在培养基中加入甲醇、乙醇、丙醇、丁醇、戊醇、己醇、辛醇各 4g/L 进行摇瓶培养。

收稿日期:2003-04-11 修回日期:2003-09-04

* 国家“863”计划重大基金资助项目(2002AA213051)

** 通讯作者, 电子信箱: wuqiong@mail.tsinghua.edu.cn

1.3.2 在培养基中添加不同浓度正丁醇对 PHBHHx 中 3HHx 的含量的影响 在培养基中加入浓度分别为 0、2、4、6、8g/L 的正丁醇进行摇瓶培养。

1.3.3 在培养基中添加 4g/L 正丁醇在发酵罐中进行发酵实验 发酵罐培养基及培养条件: 发酵罐培养基由 (g/L): 月桂酸 4, 豆油 16, (NH₄)₂SO₄ 4, MgSO₄·7H₂O 0.4, Na₂HPO₄·12H₂O 2.0, KH₂PO₄ 1.85, 酵母粉 1, 10mL/L 微量元素溶液 I 和 1mL/L 微量元素溶液 II 组成。

发酵罐培养条件: 发酵有效体积 3L, 30℃, 48h, pH= 6.5, 溶氧 D.O. 控制在 15%, 通气 5L/min 过滤空气。分批补料培养。

补料操作: 补料中含(g/L) 月桂酸 4, 豆油 16 和 (NH₄)₂SO₄ 4, 于发酵 12h 之后每隔 4h 补料一次。

1.3.4 在培养基中添加 6g/L 正丁醇在发酵罐中进行发酵实验 发酵罐培养基及培养条件: 发酵罐培养基由 (g/L): 月桂酸 10, (NH₄)₂SO₄ 4, MgSO₄·

7H₂O 0.4, Na₂HPO₄·12H₂O 2.0, KH₂PO₄ 1.85, 酵母粉 1, 10mL/L 微量元素溶液 I 和 1mL/L 微量元素溶液 II 组成。

发酵罐培养条件: 发酵有效体积 3L, 30℃, 54h, pH= 6.5, 溶氧 D.O. 控制在 15%, 通气 5L/min 过滤空气。分批补料培养。

补料操作: 补料中含(g/L) 月桂酸 10, 发酵 16h 至 28h 每 8h 补一次, 发酵 28h 以后每 4h 补一次, (NH₄)₂SO₄ 4, 发酵 16h 之后每隔 8h 补料一次。

1.4 分析方法

CDW, PHBHHx 含量测量方法见文献[9]。

2 结果和讨论

2.1 在培养基中添加低级醇类降低了 PHBHHx 中 3HHx 的含量

从图 1 可以看出在培养基中加入甲醇、乙醇、丙醇和正丁醇时, 得到的细胞干重基本相同, 都在

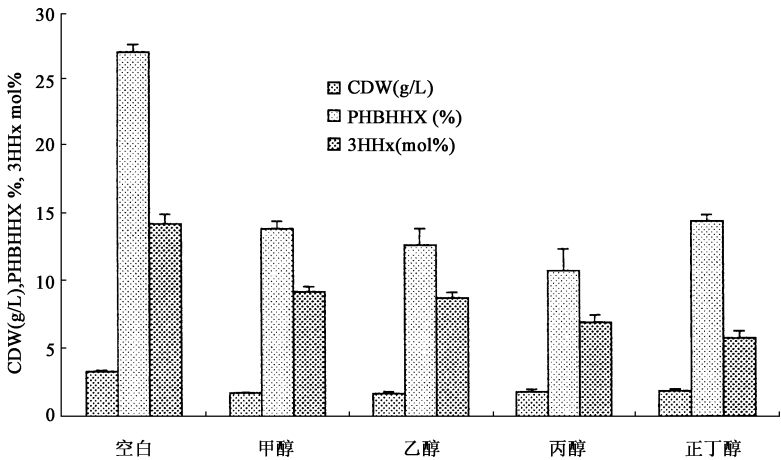


图 1 几种醇类对积累 PHBHHx 的影响

1.8g/L 左右, 但随醇类碳原子数增加, 3HHx 在 PHBHHx 中的含量随之降低, 分别为 9.35、8.84、7.03 和 5.85mol%。与没有添加任何醇类的对照, 其 3HHx 在 PHBHHx 中的含量则为 14.4mol%。但随着添加的醇类碳原子数进一步增加, 无论是细菌生长还是 PHBHHx 的积累都受到一定的抑制, 至戊醇及辛醇细菌几乎不能生长。所以本文选择了正丁醇为调节剂。醇类能降低 PHBHHx 中 3HHx 含量可能是因为醇类抑制 3HHx 的生成, 其机理还需要进一步的研究。

2.2 不同正丁醇添加量对 PHBHHx 中 3HHx 含量的影响

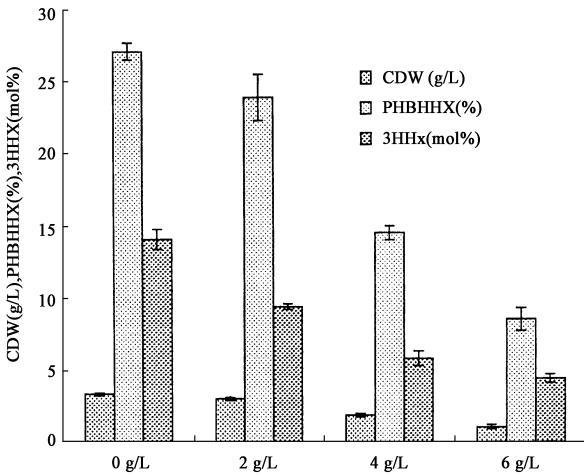


图 2 正丁醇用量对积累 PHBHHx 的影响

加量的增加, 3HHx 在 PHBHHx 中的含量逐渐降低。当正丁醇的添加量分别为 0、2、4、6g/L 时, 3HHx 含量分别为 14.4、9.4、5.8 和 4.4mol%; 但与此同时, 细胞干重也随之降低, 分别为 3.37、3.05、1.87 和 1.0g/L, 相应的 PHBHHx 占细胞干重的百分比也逐渐下降。当加入正丁醇添加量达到 8g/L, 细菌不能生长。可见高浓度的正丁醇对细菌生长和 PHBHHx 的积累都有一定的抑制作用。根据摇瓶的结果, 在发酵罐实验中选择 4g/L 和 6g/L 为正丁醇的使用浓度。

在发酵罐中添加正丁醇的发酵实验: 从图 3 (a) 可以得到在发酵培养基中添加 4g/L 正丁醇, 在 6L 发酵罐中对 *A. hydrophila* 4AK4 进行 32h 发酵培养, 最终得到 20g/L 细胞干重, PHBHHx 在细胞中的含量为 10%, PHBHHx 中 3HHx 含量为 8.5mol%。发酵罐中的发酵实验得到的细胞干重及 PHBHHx 含量不高, 原因是细菌利用豆油为碳源生长状况不够良好, 同时考虑到丁醇调节 3HHx 含量的效果未

充分发挥, 因而选择以月桂酸为单一碳源, 并将丁醇的用量提高到 6g/L。

图 3 (b) 结果显示在以月桂酸为碳源发酵培养基中添加 6g/L 正丁醇, 在 6L 发酵罐中对 *A. hydrophila* 4AK4 进行 54h 发酵培养, 获得 40g/L 细胞干重, PHBHHx 在细胞中的含量为 40%, PHBHHx 中 3HHx 含量为 10mol%。由于用月桂酸发酵, 细胞干重及 PHBHHx 在细胞中含量都大大提高。而发酵 20h 的 3HHx 的含量由 5mol% 上升至发酵 54h 的 10mol%, 丁醇对 PHBHHx 中 3HHx 含量的调节作用虽然没有达到摇瓶实验中的水平, 这是由于发酵罐中菌体生长密度高, 剧烈通气和搅拌引起丁醇逐渐挥发等多种因素造成的, 但监控整个发酵过程, 丁醇已起到了对 PHBHHx 的合成调节作用, 同时细胞仍能较好地积累生物量, 因而可以通过进一步的发酵工艺改进而得到完善。因此通过丁醇对 *A. hydrophila* 4AK4 合成 PHBHHx 进行调节是切实可行的。

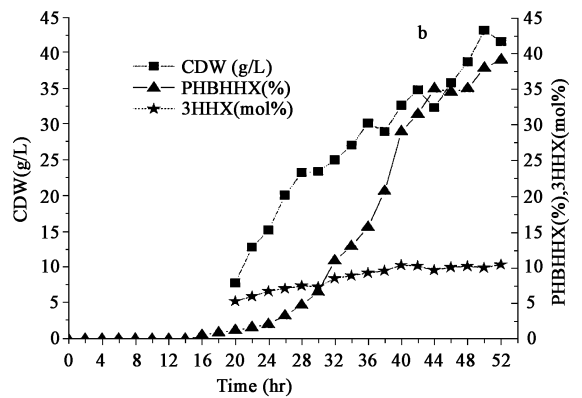
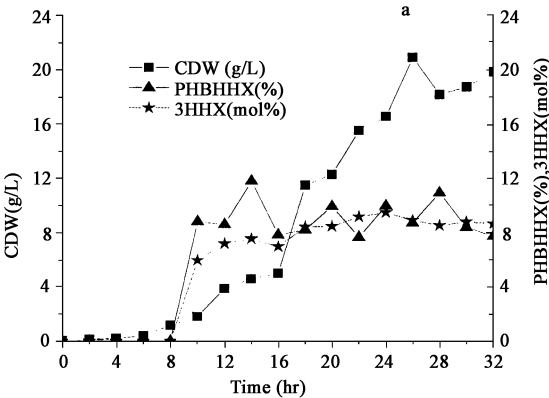


图 3 添加正丁醇对 *A. hydrophila* 4AK4 发酵生产 PHBHHx 的影响

(a) 添加 4g/L 正丁醇 (b) 添加 6g/L 正丁醇

3 结论

在 *Aeromonas hydrophila* 4AK4 发酵生产 PHBHHx 的过程中, 往培养基中添加低级醇类, 如甲醇、乙醇、丙醇和丁醇等, 都可以不同程度地降低 PHBHHx 发酵中的 3HHx 含量。其降低的程度随着醇类碳原子数的增加而增加。但醇类碳原子数大于 5 之后, 细菌几乎不能生长。因此, 正丁醇是最合适的添加剂。不同的正丁醇添加浓度对 3HHx 含量的影响也不一样, 3HHx 含量随着正丁醇浓度的增加而降低, 与此同时, 细胞干重和

PHBHHx 的含量也逐渐下降。在摇瓶培养中, 培养基中加入 4g/L 正丁醇培养 48h, 3HHx 由原来的 14.4mol% 降至 5.8mol%。这一结果在 6L 发酵罐培养中也得到了验证。32h 的发酵培养, 获得 20g/L 的细胞干重, 并将 3HHx 的含量有效地降低到 8.5mol%。为提高细胞干重及 PHBHHx 在细胞中的含量, 以月桂酸为碳源添加 6g/L 正丁醇发酵 54h, 得到细胞干重 40g/L, PHBHHx 含量为 40%, 发酵过程中 3HHx 含量为 5~10mol%, 实现了对 PHBHHx 合成的初步调控, 可通过进一步的发酵工艺改进寻求最佳的调控方式。

参考文献

- [1] Doi Y, Kitamura S, Abe H. Microbial synthesis and characterization of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate). *Macromolecules*, 1995, 28: 4822~ 4828
- [2] Anderson A J, Dawes E A. Occurrence metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiol Rev*, 1990, 54: 450~ 472
- [3] Tian G, Wu Q, Sun S Q, et al. Study of pre-melting and crystallization process of biosynthesized poly(3-hydroxybutyrate) using two-dimensional fourier transform infrared spectroscopy. *Chem J Chinese Universities*, 2002, 8: 1627~ 1631
- [4] Abe H, Kikkawa Y, Aoki H. Crystallization behavior and thermal properties of melt-crystallized poly[(R)-3-hydroxybutyric acid-co-6-hydroxyhexanoic acid] films. *Int J Biol Macromolecules*, 1999, 25: 177~ 183
- [5] Chen G Q, Page W J. Production of poly-β-hydroxybutyrate by *Azotobacter vinelandii* UWD in a two-stage fermentation process. *Biotechnol Bioengineering*, 1997, 11: 347~ 350
- [6] Chen G Q, Zhang G, Park S J, et al. Industrial scale production of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate). *Appl Microbiol Biotechnol*, 2001, 57: 50~ 55
- [7] 张瑾, 吴琼, 张广, 等. 嗜水气单胞菌利用豆油生产 3-羟基丁酸和 3-羟基己酸共聚物. *食品与生物技术*, 2002, 21: 76~ 79
- [8] Lee S H, Oh D H, Ahn W S. Production of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) by high cell-density cultivation of *Aeromonas hydrophila*. *Biotechnol Bioeng*, 2002, 67: 240~ 244
- [9] Page W J. Production of poly-β-hydroxybutyrate by *Azotobacter vinelandii* UWD during growth in molasses and other complex carbon sources. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1989, 31: 329~ 333

Effect of n-Butanol on Microbial Production of Copolyesters
Consisting of 3-Hydroxybutyrate and 3-Hydroxyhexanoate
by *Aeromonas hydrophila* 4AK4

Li He¹ Ouyang Shaoping² Wu Qiong² Chen Guoqiang²

(1 Department of Chemistry The Pingdingshan Normal College Pingdingshan 467000)

(2 Department of Biological Sciences and Biotechnology Tsinghua University Beijing 100084)

Abstract Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) (PHBHHx) is a new type of biodegradable material synthesized by *Aeromonas hydrophila* 4AK4. The PHBHHx material properties depend very much on its 3HHx fraction. The n-butanol added to the culture media could reduce 3HHx fraction in the PHBHHx from 12–15 mol% to 5.8 mol% in the flask culture; and PHBHHx of 5~10 mol% 3HHx fraction was obtained in 54 hours of fermentation in 6 liter fermentor, corresponding to 40 g/L cell dry weight.

Key words *Aeromonas hydrophila* n-butanol Lauric acid Soybean oil 3-hydroxyhexanoate