

学校编码: 10384

分类号 _____ 密级 _____

学 号: 20620091151289

UDC _____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

真养产碱杆菌利用乙酰丙酸合成羟基丁酸
和羟基戊酸共聚物的发酵工艺

Fermentation Conditions for
Poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) Accumulation by
Ralstonia eutropha Using Levulinic Acid

陈荣辉

指导教师姓名: 何宁教授

专业名称: 生物化工

论文提交日期: 2012年6月

论文答辩时间: 2012年6月

学位授予日期: 2012年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2012年6月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

摘要

聚羟基烷酸酯 (Polyhydroxyalkanoates, PHAs) 是微生物体内合成的一类生物聚酯, 其不仅具有与传统合成塑料相似的材料性质, 还具有生物可降解性、生物相容性、压电性等特性, 具有广泛的应用前景。其中羟基丁酸和羟基戊酸共聚物 (Poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate), PHBV) 具有更优的性能, 因而成为研究热点。本文以乙酰丙酸为原料, 对真养产碱杆菌合成 PHBV 的发酵工艺进行优化, 以提高 PHBV 的产量。

本文考察了不同营养成分对真养产碱杆菌利用乙酰丙酸合成羟基丁酸和羟基戊酸共聚物的影响。以乙酰丙酸为单一碳源, 菌体生长被抑制, 最大菌体干重仅为 1.38 g/L, 添加葡萄糖为辅助碳源, 可以在保证菌体生长的基础上, 得到羟基丁酸和羟基戊酸共聚物。确定了真养产碱杆菌利用乙酰丙酸合成羟基丁酸和羟基戊酸共聚物的最佳培养基组成为: 葡萄糖 25 g/L, 乙酰丙酸 4 g/L, 酪蛋白胨 2.0 g/L, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 3.0 g/L, NH_4Cl 0.5 g/L, KH_2PO_4 0.5 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g/L, 微量元素液 10 mL/L。微量元素液组成为: $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10 mg/L, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 3 mg/L, H_3BO_3 30 mg/L, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 20 mg/L, $\text{CuCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1 mg/L, $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 2 mg/L, $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 3 mg/L。最适初始 pH 为 7, 最佳接种量为 5%。此条件下, 菌体干重达到 5.75 g/L, PHBV 产量达到 3.83 g/L。

将上述所得培养基在 2 L 发酵罐中进行放大, 恒转速分批培养获得的最大菌体干重和 PHBV 产量分别为 6.00 g/L 和 3.47 g/L。将发酵液的溶氧控制在 30% 以上, 获得的最大菌体干重为 7.69 g/L, 较恒转速分批培养提高了 28.2%, 但是最大 PHBV 产量只有 2.86 g/L, 比恒转速分批发酵降低了 17.6%。用乙酰丙酸将发酵液的 pH 控制在 7, 获得的最大菌体干重和 PHBV 产量分别达到 13.41 g/L 和 11.08 g/L, 比恒转速分批培养分别提高了 123.5% 和 219.3%。控制 pH 的条件下, 将初始葡萄糖浓度降为 10 g/L, 并在发酵开始 36 h 后补加 20 g/L 葡萄糖, 获得的最大菌体干重和 PHBV 产量分别达到 16.43 g/L 和 12.45 g/L, 比恒转速分批培养分别提高了 173.8% 和 258.8%。控制溶氧和 pH 可以获得与补加葡萄糖相近的效果, 最大菌体干重可以达到 15.53 g/L, 最大 PHBV 产量为 12.61 g/L, 占菌体干重的 81.2%, PHBV 中羟基戊酸单体的百分含量为 54.0%。

初步考察了“两步法”培养真养产碱杆菌合成 PHBV 的条件。发现采用“两步法”，真养产碱杆菌利用单一乙酰丙酸的能力有所改善，但是 PHBV 产量仍只有 0.63 g/L。添加 40 g/L 的葡萄糖作为辅助碳源，随着培养基中乙酰丙酸浓度的变化，可以获得羟基戊酸单体含量从 0 到 41.4% 的 PHBV 样品。对提取的 PHBV 样品进行初步表征，核磁共振定性分析结果表明，提取的 PHBV 样品与标准品的结构基本一致。热重分析结果表明，不同组成的 PHBV 样品具有比较接近的热分解性质，起始分解温度约为 200 °C，温度达到 275 °C 以上都完全分解。

关键词：真养产碱杆菌；羟基丁酸和羟基戊酸共聚物；乙酰丙酸；发酵工艺

Abstract

Polyhydroxyalkanoates (PHAs) are a kind of bio-polyesters synthesized by micro-organisms within the cells. PHAs not only possess the same properties as traditional petrochemical plastics but also have other advantages such as being biodegradable, biocompatible, piezoelectric etc., which make them suitable for many applications. Among the family of PHAs, poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) (PHBV) becomes a research focus due to its additional advantages compared with polyhydroxybutyrate (PHB). In the present work, levulinic acid (LA) was used as raw material to synthesize PHBV by *Ralstonia eutropha* and the fermentation conditions were optimized to enhance the PHBV accumulation.

The effects of different nutrients on PHBV accumulation by *Ralstonia eutropha* were investigated in shaking flasks. The cell growth and accumulation of PHBV were inhibited when LA was used as sole carbon source, with the highest dry cell weight (DCW) of 1.38 g/L. The cell growth and PHBV accumulation were both improved when glucose was added as a supplementary carbon source. The optimized medium for PHBV accumulation from LA consisted of 25 g/L glucose, 4 g/L LA, 2.0 g/L casein peptone, 3.0 g/L Na₂HPO₄ · 12H₂O, 0.5 g/L NH₄Cl, 0.5 g/L KH₂PO₄, 0.1 g/L MgSO₄ · 7H₂O and 10 mL/L trace element solution. The trace element solution consisted of 10 mg/L ZnSO₄ · 7H₂O, 3 mg/L MnCl₂ · 4H₂O, 30 mg/L H₃BO₃, 20 mg/L CoCl₂ · 6H₂O, 1 mg/L CuCl₂ · 6H₂O, 2 mg/L NiCl₂ · 6H₂O and 3 mg/L NaMoO₄ · 2H₂O. The optimal initial pH and inoculum size were 7 and 5%, respectively. The DCW reached 5.75 g/L and the PHBV production was 3.83 g/L under these conditions.

Furthermore, *Ralstonia eutropha* was cultivated in the optimized medium using a bioreactor with a volume of 2 L. The highest DCW and PHBV production obtained by batch cultivation under stirr-stat control (stirr-stat batch cultivation) were 6.00 g/L and 3.47 g/L, respectively. When the dissolved oxygen (DO) was maintained above 30%

during the cultivation, the highest DCW was 7.69 g/L, 28.2% higher than that of the stirr-stat batch cultivation whereas the highest PHBV production was only 2.86 g/L, 17.6% lower than that of the stirr-stat batch cultivation. When the pH was maintained at 7 by adding LA, the highest DCW and PHBV production were obtained as 13.41 g/L and 11.08 g/L, respectively, which when compared with those of stirr-stat batch cultivation were enhanced by 123.5% and 219.3%, respectively. When the initial glucose concentration was reduced to 10 g/L and 20 g/L glucose was supplemented after 36 h, the highest DCW and PHBV were 16.43 g/L and 12.45 g/L, which were 173.8% and 258.8% higher than those of the stirr-stat batch cultivation, respectively. Similar results were obtained when the pH value and DO were controlled simultaneously. Specifically, the highest DCW was 15.53 g/L, and the highest PHBV production was 12.61 g/L, which was around 81.2% of the DCW, with an HV content of 54.0%.

Besides, the conditions of two-stage cultivation were investigated. It was found that the ability to use LA as sole carbon source by *Ralstonia eutropha* was improved by two-stage cultivation, though the PHBV production was only 0.63 g/L. With 40 g/L glucose using as supplementary carbon source, PHBV samples with HV contents varying from 0 to 41.4%, could be obtained when different concentrations of LA were added. The PHBV samples were extracted and characterized by nuclear magnetic resonance (NMR) and TG analysis. The NMR results confirmed that thus-synthesized PHBV had the same structure as the standard sample. The TG results showed that the PHBV samples with different HV contents possessed similar thermal decomposition properties, with initial weight-loss temperature observed as 200 °C and the complete decomposition temperature 275 °C.

Key Words: *Ralstonia eutropha*; Poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) (PHBV); Levulinic Acid (LA); Fermentation Conditions

目 录

摘 要.....	I
第一章 文献综述	1
1.1 聚羟基烷酸酯 (PHAs) 概述	1
1.1.1 PHAs 的结构、组成及分类.....	1
1.1.2 PHAs 的理化性质.....	2
1.1.3 PHAs 的应用.....	4
1.2 PHAs 的生物合成途径	4
1.3 PHAs 的发酵生产现状	6
1.3.1 <i>Ralstonia eutropha</i> 发酵生产 PHAs	7
1.3.2 <i>Alcaligenes latus</i> 发酵生产 PHAs.....	8
1.3.3 重组 <i>E. coli</i> 发酵生产 PHAs.....	8
1.4 羟基丁酸和羟基戊酸共聚物 (PHBV) 的研究现状.....	9
1.4.1 PHBV 概述.....	9
1.4.2 以乙酰丙酸合成 PHBV 研究现状.....	10
1.5 本论文的研究内容和意义	11
第二章 实验材料与方法	12
2.1 实验材料	12
2.1.1 实验菌种.....	12
2.1.2 主要实验试剂及仪器.....	12
2.1.3 培养基.....	12
2.2 培养方法	12
2.2.1 菌种的保藏.....	12
2.2.2 种子培养.....	13
2.2.3 摇瓶培养.....	13

2.2.4 发酵罐培养.....	13
2.2.5 “两步法”培养.....	13
2.3 实验分析方法	13
2.3.1 菌体干重的测定.....	13
2.3.2 葡萄糖的测定——3,5-二硝基水杨酸（DNS）法	14
2.3.3 PHBV 的测定——气相色谱法（FID）	15
2.3.4 PHBV 的提取.....	17
2.3.5 PHBV 的表征.....	17
第三章 真养产碱杆菌利用乙酰丙酸的摇瓶培养	18
3.1 辅助碳源种类对真养产碱杆菌利用乙酰丙酸合成 PHBV 的影响.....	18
3.2 葡萄糖浓度对真养产碱杆菌利用乙酰丙酸合成 PHBV 的影响.....	19
3.3 乙酰丙酸浓度对真养产碱杆菌利用乙酰丙酸合成 PHBV 的影响.....	20
3.4 单一氮源种类及浓度对真养产碱杆菌利用乙酰丙酸合成 PHBV 的影响.....	21
3.5 复合氮源种类及浓度对真养产碱杆菌利用乙酰丙酸合成 PHBV 的影响.....	22
3.6 磷酸盐浓度对真养产碱杆菌利用乙酰丙酸合成 PHBV 的影响.....	24
3.7 硫酸镁浓度对真养产碱杆菌利用乙酰丙酸合成 PHBV 的影响.....	25
3.8 氯化钙浓度对真养产碱杆菌利用乙酰丙酸合成 PHBV 的影响.....	25
3.9 初始 pH 对真养产碱杆菌利用乙酰丙酸合成 PHBV 的影响.....	26
3.10 接种量对真养产碱杆菌利用乙酰丙酸合成 PHBV 的影响.....	28
3.11 小结.....	28
第四章 真养产碱杆菌利用乙酰丙酸的放大培养	29
4.1 真养产碱杆菌利用乙酰丙酸合成 PHBV 的恒转速分批培养	29
4.2 真养产碱杆菌利用乙酰丙酸合成 PHBV 的恒溶氧分批培养	30

4.3 真养产碱杆菌利用乙酰丙酸合成 PHBV 的恒 pH 分批培养.....	31
4.4 同时控制溶氧和 pH 分批培养真养产碱杆菌合成 PHBV.....	35
4.5 小结	37
第五章 真养产碱杆菌利用乙酰丙酸的“两步法”培养及产物初步表 征.....	39
5.1 真养产碱杆菌以乙酰丙酸为单一碳源的“两步法”培养	39
5.2 不同葡萄糖浓度对“两步法”培养真养产碱杆菌的影响	39
5.3 不同乙酰丙酸浓度对“两步法”培养真养产碱杆菌的影响	41
5.4 PHBV 的提取	41
5.5 PHBV 的核磁共振分析	42
5.6 PHBV 的热分解性质	45
5.7 小结	46
第六章 结论与建议	48
6.1 结论	48
6.2 建议	49
参考文献	51
附 录.....	65
在学期间的科研成果	67
致 谢.....	68

Contents

Abstract.....	I
Chapter 1 General Introduction.....	1
1.1 Overview of Polyhydroxyalkanoates (PHAs)	1
1.1.1 Structure, Composition and Classification of PHAs.....	1
1.1.2 Properties of PHAs	2
1.1.3 Applications of PHAs	4
1.2 Biosynthetic Pathways of PHAs.....	4
1.3 Research Status of PHAs Production	6
1.3.1 PHAs Production by <i>Ralstonia eutropha</i>	7
1.3.2 PHAs Production by <i>Alcaligenes latus</i>	8
1.3.3 PHAs Production by Recombinant <i>E. coli</i>	8
1.4 Research Status of Poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) (PHBV).9	
1.4.1 Overview of PHBV	9
1.4.2 Research Status of PHBV Production from Levulinic Acid.....	10
1.5 Contents and Meaning of the Thesis	11
Chapter 2 Materials and Methods	12
2.1 Materials	12
2.1.1 Strain	12
2.1.2 Main Reagents and Instruments.....	12
2.1.3 Media	12
2.2 Methods.....	12
2.2.1 Strain Preservation	12
2.2.2 Seed Cultivation.....	13
2.2.3 Flask Cultivation.....	13
2.2.4 Bioreactor Cultivation.....	13

2.2.5 Two-stage Cultivation	13
2.3 Analysis Methods of Experiment	13
2.3.1 Determination of Dry Cell Weight	13
2.3.2 Determination of Glucose Concentration	14
2.3.3 Determination of PHBV—GC(FID).....	15
2.3.4 Extraction of PHBV	17
2.3.5 Characterizations of PHBV.....	17
Chapter 3 Shake Flask Cultivations of <i>R. eutropha</i> Using Levulinic Acid.....	18
3.1 Effects of Supplementary Carbon Sources on PHBV Accumulation by <i>R. eutropha</i> Using LA.....	18
3.2 Effect of Glucose Concentration on PHBV Accumulation by <i>R. eutropha</i> Using LA	19
3.3 Effect of Levulinic Acid Concentration on PHBV Accumulation by <i>R. eutropha</i> Using LA.....	20
3.4 Effects of Sole Nitrogen Sources and Concentration on PHBV Accumulation by <i>R. eutropha</i> Using LA	21
3.5 Effects of Compound Nitrogen Sources and Concentration on PHBV Accumulation by <i>R. eutropha</i> Using LA	22
3.6 Effect of Phosphates Concentration on PHBV Accumulation by <i>R. eutropha</i> Using LA.....	24
3.7 Effect of Magnesium Sulfate Concentration on PHBV Accumulation by <i>R. eutropha</i> Using LA.....	25
3.8 Effect of Calcium Chloride Concentration on PHBV Accumulation by <i>R. eutropha</i> Using LA.....	25
3.9 Effect of Initial pH on PHBV Accumulation by <i>R. eutropha</i> Using LA ..	26

3.10 Effect of Inoculum Size on PHBV Accumulation by <i>R. eutropha</i> Using LA	28
3.11 Summary	28
Chapter 4 Bioreactor Cultivations of <i>R. eutropha</i> Using Levulinic Acid	29
4.1 Batch Cultivation of <i>R. eutropha</i> for PHBV Accumulation Using LA under Stirr-stat Control	29
4.2 Batch Cultivation of <i>R. eutropha</i> for PHBV Accumulation Using LA under DO-stat Control	30
4.3 Batch Cultivation of <i>R. eutropha</i> for PHBV Accumulation Using LA under pH-stat Control	31
4.4 Batch Cultivation of <i>R. eutropha</i> for PHBV Accumulation Using LA under DO-stat and pH-stat Simultaneously Control	35
4.5 Summary	37
Chapter 5 Two-stage Cultivations of <i>R. eutropha</i> Using Levulinic Acid and Characterizations of PHBV	39
5.1 Two-stage Cultivation of <i>R. eutropha</i> Using Levulinic Acid as Sole Carbon Source	39
5.2 Effect of Glucose Concentration on Two-stage Cultivation of <i>R. eutropha</i>	39
5.3 Effect of Levulinic Acid Concentration on Two-stage Cultivation of <i>R. eutropha</i>	41
5.4 Extraction of PHBV	41
5.5 NMR Analysis of PHBV	42
5.6 TG Analysis of PHBV	45

5.7 Summary.....	46
Chapter 6 Conclusions and Suggestions	48
6.1 Conclusions.....	48
6.2 Suggestions.....	49
References	51
Appendixes.....	65
Publications and Patents	67
Acknowledgements	68

第一章 文献综述

塑料制品因其质轻价廉、强度高、耐腐蚀等优良特性在人类生活和工农业生产中获得了广泛的应用，然而由于化工塑料在自然界中难以降解，并且在降解过程会产生毒素，在给人们生活带来便利的同时，也造成了严重的环境污染^[1, 2]。因此，采用环境友好材料来生产塑料，即生物塑料，从而替代化工塑料引起了广泛的研究兴趣^[3]。此外，化工塑料的生产主要依赖于石油，而全球化的石油危机也使生物塑料倍受亲睐。其中，聚羟基烷酸酯由于其具有生物可相容性和生物可降解性而受到广泛的关注。

1.1 聚羟基烷酸酯（PHAs）概述

聚羟基烷酸酯（Polyhydroxyalkanoates, 简称 PHAs）广泛存在于微生物体内，是微生物在营养不均衡条件下，在细胞内合成的一类高分子生物聚酯，在生物体内主要作为碳源和能源的贮藏性物质^[4-8]。1926 年，Lemoigne 从巨大芽孢杆菌中分离出了一种亲苏丹染料、可溶于氯仿的类脂肪包涵体，其组成被鉴定为聚 3-羟基丁酸酯（PHB），这是最早被发现的 PHAs^[9]。其后近三十年，几乎没有 PHAs 的相关报道，直到 1958 年，Macrae 和 Wilkinson 首次报道了 PHB 的降解性能^[10]，从而掀起了 PHB 的研究热潮。此后，随着其他与 PHB 具有相似结构的生物聚酯相继被发现，涌现了许多关于 PHAs 生物合成以及潜在应用的报道^[11-14]。

1.1.1 PHAs 的结构、组成及分类

PHAs 是由羟基烷酸单体组成的线性聚合酯，其结构通式如图 1.1 所示。其中 m 可为 1、2、3 或者 4，通常情况下 m 为 1，即为聚 3-羟基烷酸酯。 n 表示聚合度，决定 PHAs 分子量的大小，一般为 200000~3000000 Da^[15]。 R 是可变基团，可为饱和或者不饱和，直链或含侧链及取代基的脂肪族或芳香族基团。单体的侧链 R 基团不同，形成的 PHAs 也不同，其中最常见的是侧链为甲基的聚 3-羟基丁酸酯（polyhydroxybutyrate, PHB）。

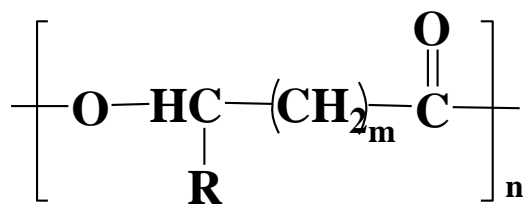


图 1.1 PHAs 的结构通式

Fig.1.1 Structure formula of PHAs

除了 3-羟基丁酸 (3HB) 单体, 还有其他碳原子数不同的单体, 如 3-羟基戊酸 (3HV)、3-羟基己酸 (3HHx)、3-羟基辛酸 (3HO) 以及 3-羟基癸酸 (3HD) 等^[16-19]。迄今为止, 已发现超过 150 种不同结构的 PHAs^[5], 其中, 大多是由链长为 3~14 个碳原子的 3-羟基烷酸单体组成。此外, 还有 4-羟基烷酸、5-羟基烷酸等羟基连接于不同位置的单体以及 R 基团中含有 1~2 个不饱和键或者带有甲基侧链的 3-羟基烷酸单体^[5]。

根据单体的碳原子数, 过去通常把 PHAs 分为两类^[4]: 单体含有 3~5 个碳原子的短链 PHAs (short-chain-length PHAs, SCL PHAs) 和单体含有 6~14 个碳原子的中长链 PHAs (medium-chain-length PHAs, MCL PHAs)。前者以聚羟基丁酸酯和聚羟基戊酸酯 (polyhydroxyvalerate, PHV) 等为代表, 后者包括聚羟基己酸酯 (polyhydroxyhexanoate, PHHx)、聚羟基辛酸酯 (polyhydroxyoctanoate, PHO) 等^[20]。一般情况下, PHAs 合酶的底物特异性决定着 PHAs 单体的碳原子数^[21, 22], 因此, 大多数微生物只能在细胞内合成 SCL PHAs 或 MCL PHAs 中的一种。但是, 研究发现, 有极少数微生物能够合成短链和中长链单体共聚形成的 PHAs (SCL-MCL PHAs)^[23-27], 从而 PHAs 的分类可以扩展为 SCL PHAs、MCL PHAs 和 SCL-MCL PHAs 三种。

根据单体的种类, PHAs 又可以分为同聚物 (homopolymer) 和共聚物 (copolymer) 两类。而根据组成方式的不同, 共聚物又有共聚和共混两种方式。共聚指的是不同的单体连接在同一个碳链骨架上无规则重复而形成的聚合物, 而共混指的是两种以上的同聚物混合在一起形成的聚合物。这两种形式的共聚物由于在 PHA 分子改性方面有重要意义, 近年来备受关注。

1.1.2 PHAs 的理化性质

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库