

真养产碱菌利用甜菜糖蜜发酵产聚 β -羟基丁酸的研究

文欣 郑士民

(山东大学微生物研究所, 济南 250100)

陈琦

(中国科学院微生物研究所, 北京 100080)

摘要 探讨了以廉价原料甜菜糖蜜培养真养产碱菌 (*Alcaligenes eutrophus*) H16 生产聚 β -羟基丁酸 (PHB) 的可行性。对培养基优化试验表明, 菌体产量可达 20g/L, PHB 产量达 9.8g/L, 糖转化率为 27.5%。用 2 升自控发酵罐进行验证, 在良好的供氧条件和特定的 pH 值自控条件下发酵周期从 48 小时缩短到 40—42 小时, 菌体和 PHB 量都有提高。菌体最高产量 26g/L, PHB 最高产量 13g/L, 糖转化率为 20.4%。PHB 占细胞的含量, 摇瓶和罐上结果都在 50% 左右。

关键词 聚 β -羟基丁酸 (PHB), 甜菜糖蜜, 补料分批培养, 真养产碱菌

聚β-羟基丁酸作为新一代易降解生物塑料,因其具有广阔的应用前景,日益受到人们的重视^[1]。但是由于原料价格高、产量低及分离提纯困难而造成成本过高,目前,在市场上还不能与合成塑料竞争。因此,构建高产工程菌,选用廉价原料和改进提取工艺以降低成本已成为 PHB 研究的主要方向^[2]。

目前, PHB 工业性研究多集中于 *Alcaligenes*, *Azotobacter* 和 *Methylobacterium* 中的某些种。由于 *Alcaligenes eutrophus* 胞内 PHB 含量高和 PHB 分子量大而倍受重视^[3]。该菌合成 PHB 的碳源主要是果糖、葡萄糖(突变株)等碳水化合物。但尚未见到该菌利用糖蜜为原料生产 PHB 的报道。

本文从降低发酵成本出发,探讨了 *Alcaligenes eutrophus* 以廉价原料甜菜糖蜜发酵产 PHB 的条件。

1 材料与方 法

1.1 菌 种

真养产碱菌(*Alcaligenes eutrophus*)H16。

1.2 培养基和培养方法

基础培养基: A: 果糖 5g, B: (NH₄)₂SO₄ 1.7g, MgSO₄ · 7H₂O 0.2g, C: Na₂HPO₄ · 12H₂O 9.0g, KH₂PO₄ 1.5g, D: NaHCO₃ 0.5g, E: 柠檬酸铁氨 0.005g, CaCl₂ · 2H₂O 0.02g, F: Hoagland 溶液 2ml。总体积 1L, pH 6.8—7.0, 115℃ 湿热灭菌 30 分钟。

斜面种子培养基: 普通牛肉汁蛋白胨培养基。

糖蜜水解液: 甜菜糖蜜加稀酸加热水解, 水解后还原糖含量 25% 左右。

液体摇瓶培养基: 同基础培养基, 其中 A

改为糖蜜水解液 10% (v/v)。培养基中还原糖含量 25g/L ± 3。

发酵培养基: 同基础培养基, 其中 A 改为 10% (v/v) 的糖蜜水解液, B 改为 (NH₄)₂SO₄ 3.4g, MgSO₄ · 7H₂O 0.2g。

液体种子: 将培养好的斜面种子接两环到装有 50ml 培养基的 500ml 三角瓶中, 30℃ 旋转式摇床 (200r/min) 培养 20—22 小时。

摇瓶培养: 250ml 三角瓶装入 20ml 培养基, 接入 10% (v/v) 种子液, 30℃ 旋转式摇床 (200r/min) 培养, 培养过程中补加糖蜜水解液。

发酵罐培养: 日本茈菱 2L 自控发酵罐, 温度 30℃ 自控, pH7.0, 酸碱双向调控。初始装液量 600ml, 接种量 10% (v/v), 发酵过程中补入糖蜜水解液。

1.3 分析方法

菌体生长量: a. 菌体浓度: 发酵液经稀释后用 721 分光光度计测 620nm 处 OD 值。
b. 菌体干重: 发酵液经离心, 水洗二次, 80℃ 恒温 24 小时, 冷却后称重。

还原糖的测定: 3,5-二硝基水杨酸法。

PHB 的测定: 定性: 苏丹黑染色后镜检, 定量: 气相色谱法^[4]。

2 结果与讨论

2.1 糖蜜代替果糖培养 *Alcaligenes eutrophus* H16

H16 菌专性利用果糖。但果糖价格昂贵, 而糖蜜中主要成分为蔗糖, 其水解产物中果糖含量高。用 10% 的糖蜜水解培养该菌 24 小时后于无菌条件下补入 2ml 糖蜜水解液, 培养 48 小时。

表 1 甜菜糖蜜培养结果

| 原 料 | 培养时间 (h) | 0 | 8.5 | 24 | 48 |
|-----|-------------|------|------|------|------|
| 糖 蜜 | 发酵液 OD 值 | 0.5 | 10.5 | 32.7 | 45 |
| | 还原糖浓度 (g/L) | 28.6 | 23.6 | 13.8 | 20.4 |
| 果 糖 | 发酵液 OD 值 | 0.5 | 13.6 | 28.4 | / |
| | 还原糖浓度 (g/L) | 13.2 | 8.2 | <1 | / |

由表1得知,以10%糖蜜水解液中果糖含量14g/L左右培养该菌,24小时可达到与用果糖培养相当的菌体浓度,此时占总还原糖一半的果糖已被耗尽。当补入糖蜜水解液后,菌体浓度增加到一较高水平。取此时发酵液涂片镜检,看到菌体中PHB颗粒较多。说明用该糖蜜水解液培养该菌积累PHB是可行的。

表2 正交试验因素及水平安排

| 因素 水平 | A | B | C | | D |
|----------|----------|--|---|---------------------------------|-----------------------------|
| | 糖蜜浓度 (%) | (NH ₄) ₂ SO ₄ (g/L) | Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O, (g/L) | KH ₂ PO ₄ | NaHCO ₃ (g/L) |
| 1 | 10 | 0 | 9 | 1.5 | 0 |
| 2 | 10 | 2 | 4.0 | 3.5 | 0.25 |
| 3 | 10 | 5 | 1 | 2 | 0.5 |

试验结果表明,硫酸铵浓度是影响菌体生长及积累PHB的主要因素,2g/L硫酸铵浓度是菌体生长的最佳浓度,但不加硫酸铵时细胞内PHB含量较高。碳酸氢钠和磷酸盐的浓度影响较小,减少基础培养基中二者的量对菌体生长及积累PHB均有利。从PHB总产

2.2 利用正交试验优化培养条件

2.2.1 培养基组成的优化:糖蜜中无机盐成分复杂,并含有相当量的氮和磷盐^[5],而过剩的氮和磷不利于PHB的积累^[6]。故需对基础培养基中无机盐成分重新优化。选择四因素三水平正交表L₉(3⁴) (表2)。将A因素糖蜜浓度固定为10%的糖蜜水解液。

量考虑,试验B₁C₃D₂效果最好(Na₂HPO₄ 1g/L KH₂PO₄ 2g/L, NaHCO₃ 0.25g/L)此时菌体产量为6.69g/L, PHB产量2.70g/L。

2.2.2 补料培养条件的优选:初始培养基按表2配制。将补料方式作为表2中A因素考虑,其三水平安排见表3。

表3 补料培养正交试验中A因素的三水平安排

| | |
|-----|--|
| 水平1 | 分批培养至22小时,加入发酵液体积6.5%的糖蜜水解液 |
| 水平2 | 分批培养至22小时,加入发酵液体积6.5%糖蜜水解液,培养至32小时,再加入8%的糖蜜水解液 |
| 水平3 | 分批培养至22小时,加入发酵液体积6.5%的糖蜜水解液,培养至32小时,再加入12%的糖蜜水解液 |

试验结果表明,影响菌体和PHB产量的主要因素是补糖方式,补糖量大是高产量的保证;硫酸铵和磷酸盐的量影响次之,碳酸氢钠的影响较小,可省去该成分。试验组A₃B₂C₁,即(NH₄)₂SO₄ 2g/L, Na₂HPO₄ 9g/L, KH₂PO₄ 1.5g/L,培养22—32小时时,分别补入6.5%和12%的糖蜜水解液是补料培养的最佳条件。此时,菌体产量19.9g/L, PHB产量9.8g/L,糖转化率为27.5%。

2.3 台式自控发酵罐的培养

以摇瓶试验为依据,采用低初糖发酵,中

期补料的培养方法,探索在2L自控发酵罐上补料分批培养条件,着重研究了发酵过程中供氧条件和补料速度对菌体及PHB产量的影响。

2.3.1 补料分批培养的供氧条件对产量的影响:PHB发酵过程中,菌体生长是需氧过程,而过高的氧分压对PHB的积累有抑制作用^[6]。本试验通入罐内的压缩空气为恒定压力,故供氧条件只由搅拌速度和空气流量决定,两种供氧条件的控制见下页图1、2。发酵结果见下页图3。

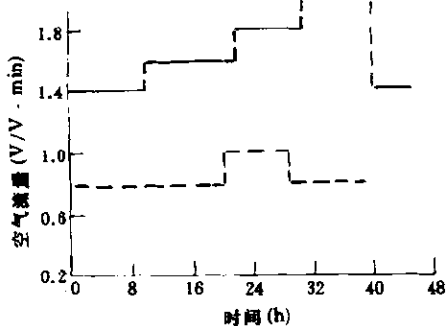


图1 发酵过程中空气流量随时间的变化
—— 试验 I 的空气流量 —— 试验 II 的空气流量

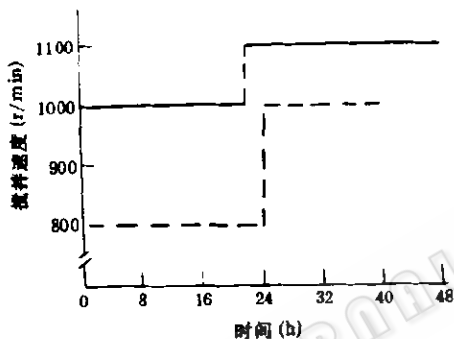


图2 发酵过程中搅拌速度随培养时间的变化
—— 试验 I 的搅拌速度 —— 试验 II 的搅拌速度

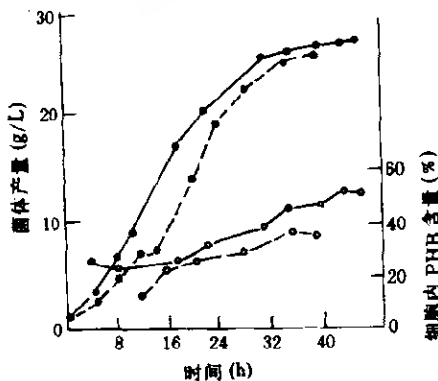


图3 不同供氧条件下菌体及 PHB 产量随培养时间的变化

●—● 试验 I 菌体产量 ○—○ 试验 I 细胞内 PHB 含量
●—● 试验 II 菌体产量 ○—○ 试验 II 细胞内 PHB 含量

结果表明, 供氧相对充足的试验 I, 即高

空气流量和高搅拌速度, 不仅菌体生长迅速, 而且胞内 PHB 的百分含量也高。说明该试验条件下供氧量并没有达到抑制 PHB 积累的临界值, 而低供氧量的试验 II, 不仅菌体生长缓慢, 而且胞内百分含量也低。因此, 可在试验 I 的基础上在前期继续提高供氧量, 用来增加菌体量, 从而达到最终提高 PHB 产量的目的。

2.3.2 补料分批培养中补料速度的控制: 由于 H16 菌对糖蜜中的葡萄糖不利用, 使补料速度较难控制。一方面需不断加入糖蜜供给菌体生长所需的果糖; 另一方面补料速度不能过快, 避免葡萄糖在发酵液中大量积累而产生的抑制作用。

本试验采用控制发酵液中果糖浓度趋于零, 而葡萄糖浓度缓慢增加的变流速补料方式 (图 4), 发酵结果见图 5。

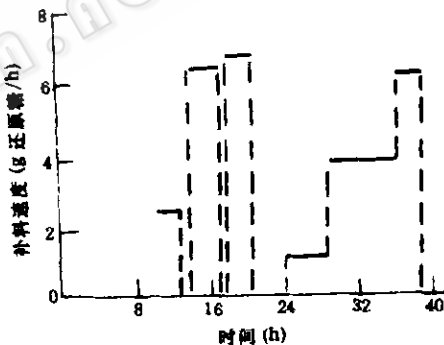


图4 补料速度随培养时间的变化

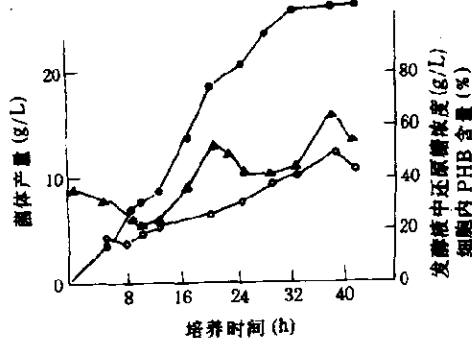


图5 发酵过程中菌体产量、还原糖浓度和 PHB 含量的变化

●—● 菌体产量 ▲—▲ 还原糖浓度
○—○ 细胞内 PHB 含量

结果表明,补料后,随着补料速度的增加,菌体生长加快,发酵液中还原糖浓度逐渐升高。培养20小时后,补料速度已达到6.86g还原糖/h,此时发酵液中还原糖浓度高达52g/L。停止补料,待发酵液中还原糖浓度降低(即果糖浓度趋于零时),再缓慢增加补料速度。发酵结果:菌体产量26g/L,PHB产量13g/L,细胞内PHB含量为50%,PHB对果糖的转化率为20.4%。

通过7批次补料分批发酵,平均产量:菌体23g/L,PHB12g/L。

发酵罐的菌体和PHB产量均高于摇瓶结果,但PHB对果糖的转化率只有20.4%,低于摇瓶试验27.0%的结果,这可能是由于罐补料量大,造成难以利用的葡萄糖在发酵液中大量积累,从而抑制了菌体对果糖的利用。

本试验中PHB对果糖的转化率为20.4—27.0%,但按总糖计算,转化率只有10—

14%。因此,若糖蜜作为大规模生产PHB的原料,尚需要研究如何把发酵液中高浓度的残余葡萄糖加以综合利用,以期降低发酵成本。

感谢毛桂震先生对本工作的支持,徐晓春同志参加部分实验工作。

参 考 文 献

- [1] Byrom D. *Trend in Biotechnology*, 1987. **5**: 246—248.
- [2] 乔宝义. *生物工程进展*, 1990. **10** (6): 43—46.
- [3] Alistair J A. *Microbiol reviews*, 1990. **54** (4): 450—472.
- [4] Braunegg G *et al.* *Europen J Appl Microbiol Biotechnol*, 1987. **6**: 29—37.
- [5] 华南工学院等. *酒精与白酒工艺学*. 北京: 轻工业出版社. 1982. 246—248.
- [6] Takahiro Suzuki. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1986. **24**: 366—369.