

研究报告

利用糖蜜发酵生产生物降解塑料 PHB 的研究

翁维琦 易祖华 黄和容 陈 琦

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

摘要: 由 *Alcaligenes latus* 经单菌落分离, 从中筛选到一株高效利用糖蜜产聚羟基丁酸 (PHB) 的优良菌株 1018。在 6L 台式发酵罐 (N.B.S) 中, 进行了该菌利用甜菜糖蜜和甘蔗糖蜜积累 PHB 的分批补料培养的研究。结果表明, 培养 54h 左右发酵液中细胞干重达 70~85g/L, PHB 含量占细胞干重的 60%~70%, 生产强度 1.0gPHB/L/h 以上, 发酵液经非有机溶剂提取制得 PHB 产品, 纯度 95%, 提取收率 80% 以上。

关键词: 糖蜜, 肥大产碱杆菌, PHB

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654(1999)-05-0311-04

PRODUCTION OF POLY(3-HYDROXYBUTYRATE) BY *ALCALIGENES LATUS*
GROWN ON MOLASSES

WENG Weiqi YI Zuhua HUANG Herong CHEN Qi

(Institute of Microbiology Academia Sinica Beijing 100080)

Abstract: Production of poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) by fed-batch culture of *Alcaligenes latus* 1018 was investigated using beet and cane molasses in a 6L fermentor. In 54 hours the cell concentration and polymer content of dry cell weight reached 70~85g/L and 60%~70%, respectively, and the productivity was up to 1.0 gPHB/L/h. An aqueous digestion process was used for recovering the product from *A. latus* with the recovery of more than 80% and the purity of PHB was 95%.

Key words: Molasses, *Alcaligenes latus*, PHB

随着人类物质文明的不断提高, 保护地球、保护生存环境已日益受到重视。在合成塑料给人们带来诸多方便的同时, 也带来了日趋严重的白色污染, 这不仅影响到人们自身的生存空间, 更影响到人类的子孙后代。研究开发降解塑料已成为全世界关注热点, 其中以微生物发酵生产的聚羟基丁酸 (PHB) 被认为是替代化学合成塑料、攻克白色污染最具潜力的一种新的热塑性聚脂, 它的物理性质类似于聚丙烯, 能纺丝、压膜、注塑等, 但它具有化学合成

塑料所不具备的生物降解性 (彻底分解成 CO_2 与 H_2O) 和生物相容性 (对生物体无毒副作用), 不仅在工业、农业、食品和卫生方面是一种很好的天然绿色包装材料, 医学上可制成缓释药物载体、骨骼替代品、一次性医药器械等, 于生物医学材料方面更具广泛的应用前景。

在自然界中, 能合成 PHB 的微生物有产碱杆菌、固氮菌、甲基营养菌和红螺菌等, 研究最

收稿日期: 1998-10-15, 修回日期: 1999-05-27

多并具应用潜力的是产碱杆菌属中的真养产碱杆菌和肥大产碱杆菌以及棕色固氮菌。其中肥大产碱杆菌和棕色固氮菌能利用蔗糖为唯一碳源合成 PHB。在我国北方的新疆、内蒙和南方的两广、福建、四川等地都盛产蔗糖,利用废糖蜜发酵生产 PHB 一方面有利于降低 PHB 生产的原料成本,另一方面也可扩大糖蜜综合利用的范围。为此本文对这一课题进行了探索研究。

1 材料与方法

1.1 试验菌种

肥大产碱杆菌 (*Alcaligenes latus* ATCC 29721)。

1.2 培养基

斜面培养基 (g/L): 蔗糖 5, 磷酸氢二钠 4.8, 磷酸二氢钾 4.4, 氯化铵 1.2, 硫酸镁 0.5, 柠檬酸铁铵 0.025, 微量元素液^[1] 0.2mL, 用 NaOH 调 pH7.0, 1×10^5 Pa 灭菌 30min。

筛选培养基 (g/L): 糖蜜 20, 硫酸铵 1.6, 磷酸氢二钠 4.5, 磷酸二氢钾 1.5, 硫酸镁 0.2, 柠檬酸铁铵 0.025, 微量元素液 0.2mL, 用 NaOH 调 pH7.0, 1×10^5 Pa 灭菌 30min。

1.3 培养

菌种筛选: 250mL 三角瓶, 装入 20mL 糖蜜培养基, 接种后置旋转式摇床上, 30℃ 振荡培养 48~64h。

摇瓶条件试验: 30℃ 培养 20h 摇瓶种子液, 以 5% 接种量接入发酵摇瓶, 30℃ 培养 64h。发酵过程中以 4% NaOH 调节 pH 值 7.0 并流加糖液。

小罐发酵试验: 30℃ 培养 18h 摇瓶种子液, 以 15% 接种量接入初体积 1.8L 的 6 升台式发酵罐 (N. B. S) 中, 温度自控 $30^\circ\text{C} \pm 1$, 用碱调节控制 pH7.0, 发酵过程中连续补充糖蜜碳源。

1.4 方法

菌体细胞生长量: 文献 [1]。

还原糖测定: 样品经 HCl 水解后, 调 pH 为中性, 采用 3,5-二硝基水杨酸法测定。

PHB 测定: 取适量发酵液离心, 洗涤三次, 80℃ 24h 烘干后, 以苯甲酸作内标, 气相色谱法定量^[2]。

2 结果

2.1 利用糖蜜产 PHB 菌株的筛选

对肥大产碱杆菌 ATCC 29712 在蔗糖平皿上进行单菌落分离, 纯化的单菌落再用糖蜜培养基进行筛选, 从中得到一株利用糖蜜高产 PHB 的菌株 1018 No.4, 见表 1。以后实验均以 1018 No.4 菌 (简称 1018) 为试验菌。

表1 利用糖蜜的菌株筛选*

| 分离株号 | 生长 $OD_{620} \times 100$ | PHB产量 (g/L) |
|-----------|-----------------------------|----------------|
| 原株 | 0.523 | 17.52 |
| 1018 | 0.565 | 17.19 |
| 1010 No.1 | 0.600 | 18.36 |
| 1018 No.3 | 0.545 | 16.99 |
| 1018 No.4 | 0.630 | 20.06 |

* 所用糖蜜为甜菜糖蜜 (乌鲁木齐), 发酵过程中多次流加糖蜜, 总糖 (所测还原糖) 浓度为 8%, 30℃ 64h 培养

2.2 摇瓶条件试验

2.2.1 pH 对菌体细胞生长的影响: 蔗糖培养基培养种子, 30℃ 18h 后, 以 2% 的接种量接入糖蜜 (甘蔗糖蜜, 广东肇庆) 发酵摇瓶, 初始 pH 分别为 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 和 9.0, 30℃ 振荡培养 15h, 测定生长 OD_{620} , 结果如图 1。由图看出, 控制 pH7.0~8.0, 有利于菌体细胞生长, pH7.0 为最适 pH。

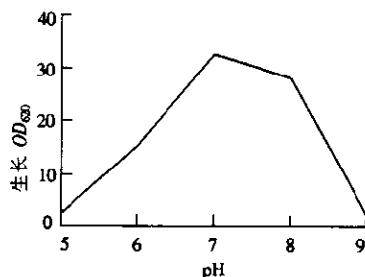


图1 pH对细胞生长的影响

2.2.2 通气量对菌体细胞生长的影响: 蔗糖培养基培养种子, 30℃ 18h 后, 以 2% 的接种量接入糖蜜 (甘蔗糖蜜, 广东肇庆) 发酵摇瓶, 250mL

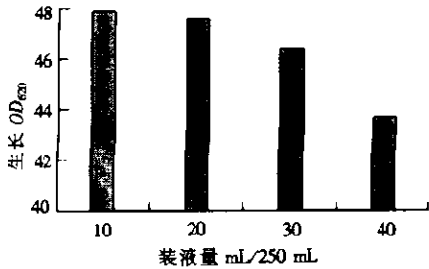


图2 通气量对细胞生长的影响

三角瓶装液量分别为 10mL, 20mL, 30mL 和 40mL, 30℃ 振荡培养 18h, 测定生长 OD_{620} , 结果如图 2。由图看出, 菌体细胞的生长对通气量较敏感, 通气量大, 有利于细胞生长。

2.2.3 不同硫酸铵浓度对细胞生长和 PHB 积累的影响:以甜菜糖蜜(乌鲁木齐生物药厂提供)为碳源, 在糖蜜发酵培养基中分别加入不同量的 $(NH_4)_2SO_4$: 0, 0.08%, 0.12%, 0.16%, 0.20%, 0.24% 和 0.30%, 30℃ 培养 64h, 测定摇瓶中的细胞干重及 PHB 含量, 结果见表 2。表 2 所示, 硫酸铵对细胞生长影响不大, 但对 PHB 的积累有一定影响, 故 $(NH_4)_2SO_4$ 浓度 0.16% 为宜。

表2 不同 $(NH_4)_2SO_4$ 浓度对细胞生长和PHB积累的影响

| $(NH_4)_2SO_4$ (%) | 细胞干重 (g/L) | PHB产量 (g/L) | PHB含量 (%) |
|--------------------|------------|-------------|-----------|
| 0 | 19.88 | 7.45 | 37.5 |
| 0.08 | 18.00 | 7.47 | 41.5 |
| 0.12 | 19.00 | 7.18 | 37.8 |
| 0.16 | 21.38 | 9.61 | 45.0 |
| 0.20 | 22.25 | 8.10 | 36.4 |
| 0.24 | 19.50 | 6.26 | 32.1 |
| 0.30 | 21.00 | 6.51 | 31.0 |

* 发酵过程中, 多次流加糖蜜, 总糖8%。

2.2.4 不同来源糖蜜对细胞生长和 PHB 积累的影响:分别以甜菜糖蜜(乌鲁木齐生物药厂、呼和浩特糖厂、伊犁糖厂提供)和甘蔗糖蜜(广东肇庆星湖味精厂提供)四种糖蜜作为碳源, 30℃ 培养 64h 后, 分别测定其细胞干重及 PHB 产量, 结果如表 3。从表 3 可以看出, 不同糖蜜甚至同是甜菜糖蜜的不同产地, 对细胞生长和 PHB 积累都有所不同, 甜菜糖蜜比甘蔗糖蜜更有利于 PHB 积累。可见, 糖蜜成分的复杂性, 增加了糖蜜发酵产 PHB 的不稳定性。

表3 不同来源糖蜜对细胞生长和PHB积累的影响

| 编号 | 糖蜜来源 | 细胞干重 (g/L) | PHB产量 (g/L) | PHB含量 (%) |
|----|------------|------------|-------------|-----------|
| 1 | 甜菜糖蜜(乌鲁木齐) | 30.00 | 9.43 | 31.4 |
| 2 | 甜菜糖蜜(呼和浩特) | 27.00 | 12.67 | 46.9 |
| 3 | 甜菜糖蜜(新疆伊犁) | 29.00 | 13.02 | 44.9 |
| 4 | 甘蔗糖蜜(广东肇庆) | 25.28 | 6.24 | 24.7 |

2.3 糖蜜发酵生产 PHB 台式小罐试验

2.3.1 甜菜糖蜜发酵:蔗糖斜面菌种经 30℃ 24h 培养后, 接种于 300mL 种子糖蜜(甜菜糖蜜, 新疆乌鲁木齐)培养基, 30℃ 振荡培养 20h 后, 接入初体积 2.0L 的 6L 台式发酵罐中。发酵过程中流加糖蜜以控制还原糖浓度 1.5%~2.5%, 用碱控制 pH7.0, 温度 30℃ ± 1, 溶解氧浓度通过通气和搅拌速度加以控制。发酵 48h, 细胞浓度达 67.5g(干重)/L, PHB 占细胞干重的 71.3%; 68h, 细胞干重达 73.1g/L, 其中含 PHB76.1%。结果见图 3(2, 3)。

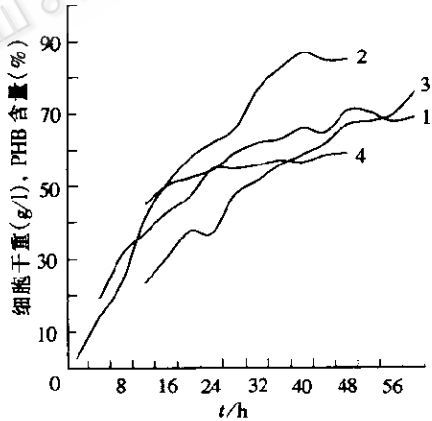


图3 糖蜜产PHB罐上发酵曲线
1, 2—细胞干重 (g/L),
3, 4—PHB含量 (%)

2.3.2 甘蔗糖蜜发酵:1018 菌种经 24h 斜面培养后, 接种于 300mL 种子糖蜜(甘蔗糖蜜, 广东肇庆)培养基, 30℃ 振荡培养 19h 后, 接入初体积 1.8L 的 6L 台式发酵罐中(培养基适当调整, 略), 发酵过程流加糖蜜和蔗糖以控制还原糖浓度 1.5%~2.5%, 用碱控制 pH7.0, 温度 30℃ ± 1, DO 通过通气和搅拌速度加以控制。47.5h 放罐时, 细胞干重达 85g/L, PHB 占细胞干重的 60%, 结果

见图 3(1, 4)。以上结果可以看出,利用甜菜糖蜜作为碳源,其细胞内的 PHB 含量较高。

3 讨论

目前世界上直接能利用糖蜜产 PHB 研究最多的菌种有肥大产碱杆菌(*Alcaligenes latus*)和棕色固氮菌(*Azotobacter vinelandii* UWD),奥地利的林兹化学有限公司利用肥大产碱杆菌,以甜菜糖蜜为原料发酵生产 PHB 已完成中试^[3],加拿大的 Page 利用固氮菌产 PHB 的工作申请了专利^[4],比较本文与国外有关糖蜜发酵的研究工作,本文的研究工作虽已达到了当前国际先进水平,但从 1018 利用糖蜜发酵生产 PHB 的生产效率、细胞中 PHB 含量等方面看,仍待于进一步提高。

利用糖蜜生产 PHB 的最大优势是原料价格便宜。有人认为利用甜菜糖蜜生产 PHB 会使发酵的原料价格减少一半^[4],因而极具吸引力。

糖蜜生产 PHB 中存在的一些技术问题:a.

糖蜜成分复杂,菌体生长和 PHB 积累不易控制;b.糖蜜中大量不为微生物利用的杂质给产物的后提取带来困难,也会增加环境治理的费用;c.糖蜜含糖量一般在 40%~50%,如欲作细胞的高密度培养以提高生产效率尚需补充部分纯糖;d.与其他碳源相比,糖蜜粘度大,传氧效果差,使高密度培养能耗增加。此外,糖蜜系季节性原料,储运也需一定费用。

致谢 本工作得到王秀玲老师的大力协助,特此致谢。

参 考 文 献

- [1] 翁维琦,易祖华,黄和容,等. 微生物学通报, 1995, 22(5): 271~275.
- [2] BrauneGG G *et al.* European J Appl Microbiol Biotechnol, 1978, 6: 29~37.
- [3] Lafferty R M. Eur. Pat. 0149744, 1984.
- [4] Page W J *et al.* Appl Environ. Microbiol, 1993, 59: 4236.