

双碳源单细胞蛋白高密度培养

刘刚 郑重鸣 宋达 岑沛霖*

(浙江大学二次资源化工实验室 杭州 310027)

单细胞蛋白 (SCP) 培养具有增殖速度快、原料来源广、蛋白质含量高等优点,正在成为重要的蛋白质来源之一。生产 SCP 的原料包括烷烃^[1]、低碳醇类^[2]及碳水化合物^[3]。由碳水化合物,尤其是由各种农副产品加工的废料、造纸工业废水及木质纤维素水解产物等,生产 SCP 属于废弃资源的综合利用,具有重要的经济和社会意义。这类原料中常含有多种碳源,例如,在木质纤维水解液中,有以木糖为主的五碳糖,也有以葡萄糖为主的六碳糖,木糖与葡萄糖之比约为 1:2。这样,木糖的利用就成了一个关键问题。葡萄糖对木糖代谢的抑制作用随葡萄糖比例的降低而减轻^[4],Slinger 和 Bothast^[5]研究了用混合糖培养 *Candida shehetae* 的过程,当木糖与葡萄糖的比例为 3:1 及 1:1 时,葡萄糖的利用速度分别比木糖高 1.6 倍及 3.4 倍;在低还原势时,酵母产酒精速率降低而细胞增长速率加快,可以达到较高细胞浓度^[6]。

高细胞浓度可以减少细胞分离过程的能耗及废水量,但到目前为止,研究都集中在以葡萄糖为底物的 SCP 高密度培养。一般采用流加操作^[7]及强化氧传递^[8]达到这一目标,文献报道的最高干细胞密度为 138g/L^[9]。

本文将模拟的木质纤维素水解液(葡萄糖:木糖=2:1)为混合碳源,进行 SCP 的间歇培养及流加培养研究,以获得较优的培养条件及较高的细胞密度。

1 材料及方法

菌种为热带假丝酵母 *Candida tropicalis* 和树状假丝酵母 (*Candida arborea*),所有的发酵均在国产 2L 发酵罐上进行。发酵培养基:每升 A 液含 (g): $MgCl_2$ 2, $CaCl_2$ 0.3, NaCl 0.5, 一定量的单糖或混合糖。每升 B 液含 (g): $(NH_4)_2SO_4$ 2, 酵母膏 3, 维生素溶液 15ml, KH_2PO_4 7, 一定量的尿素。A 液与 B 液分别灭菌后以 2:1 的比例混合。流加培养基每升 A 液含混合糖 200g, 每升 B 液含尿素 45g, 分别灭菌后以 2:1 的比例混合。每升维生素溶液含 (g): 生物素 0.04, 维生素 B₁ 0.08, 维生素 B₂ 2, 泛酸钙 1, 肌醇 20。

总还原糖的浓度采用斐林滴定法测量,葡萄糖浓度用葡萄糖氧化酶法测定。木糖浓度的测定则从总还原糖与葡萄糖浓度的差值计算得到。细胞浓度采用比色法测定。

2 结果与讨论

2.1 双碳源 SCP 间歇培养的典型增长曲线

以葡萄糖和木糖的混合糖为底物,对 *C. arborea* 和 *C. tropicalis* 进行间歇培养的典型增长曲线如图 1,2 所示。两种微生物都具有显著的二次增长特征,对于这种现象,许多学者进行了分析和讨论^[10,11]。值得注意的是两种不同的微生物以双碳源为底物培养时的差别。*C. tropicalis* 的生长及代谢速度要大于 *C. arborea*,*C. tropicalis* 的葡萄糖和木糖消耗速率分别为 3.11 和 2.23g/(L·h),而 *C. arborea* 的相应值仅为 2.14 及 1.30g/(L·h)。对于 *C. arborea*,第二个迟滞期的时间比较短,细胞增长与底物消

此项目受国家自然科学基金资助。

* 通讯联系人。

本文于 1994 年 5 月 4 日收到。

耗同步,而对于 *C. tropicalis*,第二个迟滞期的时间比较长,在木糖耗完后菌体还会继续生长。*C. tropicalis* 在葡萄糖浓度较高时 ($\approx 4.0\text{g/L}$) 开始代谢木糖,而 *C. arborea* 只有当葡萄糖浓度降低到约为 1.0g/L 时开始代谢木糖。

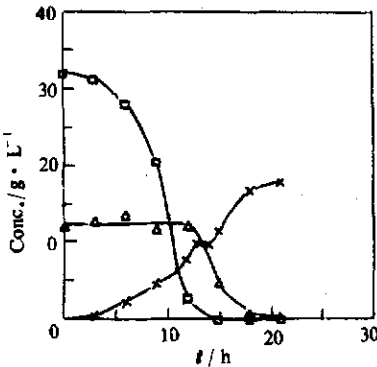


图 1 *C. arborea* 混合糖培养的典型的生长曲线

□葡萄糖浓度, △木糖浓度, +细胞浓度

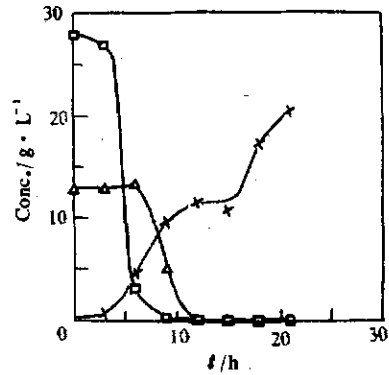


图 2 *C. tropicalis* 混合糖培养的典型的生长曲线

图例同 Fig. 1

2.2 温度对双碳源 SCP 培养的影响

表 1 不同温度下的混合糖间歇培养

温度/℃	葡萄糖消耗速率 $/\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$		木糖消耗速率 $/\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$		转化率/%		生产能力 $/\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$		菌体得率/%	
	(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)
28	1.42	1.89	1.21	0.94	1.00	1.00	0.62	0.77	0.42	0.41
32	2.14	3.11	1.30	2.23	0.99	1.00	0.85	0.97	0.40	0.50
35	1.79	3.40	0.57	0.58	0.84	0.90	0.62	0.63	0.30	0.22

(1) *C. arborea*, (2) *C. tropicalis*

从表 1 可以看到,在 28°C 及 32°C 时混合碳源的转化率几乎都接近 1,而且在该温度范围内糖的消耗速度和菌体的增长速率都随温度的升高而增加。当温度提高到 35°C 时,木糖不能被完全利用,糖的转化率明显降低,说明参与木糖代谢的酶对温度比较敏感,两种菌的最适培养温度为 32°C 。

2.3 碳氮比对 SCP 培养的影响

表 2 列出了不同碳氮比的实验结果,以尿素为氮源,对于不同碳氮比,两个菌种对糖的转化都很完全,但菌体生长速率和菌体得率都有明显差别。无论是哪一个菌种,碳氮比为 4:1 时的菌体生长速率及菌体得率都是最高的。

2.4 初始糖浓度对 SCP 间歇培养的影响

表 2 不同培养条件下的混合糖间歇培养结果

培养条件	生产能力/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$		转化率/%		菌体得率/%		菌体干重/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$		
	(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)	
碳氮比	3:1	0.59	0.84	1.00	1.00	0.29	0.35	12.6	15.8
	4:1	0.85	0.97	0.99	1.00	0.40	0.50	17.8	20.4
	5:1	0.63	0.91	1.00	1.00	0.39	0.40	15.3	16.4
初糖	20 ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	0.42	0.51	0.91	0.98	0.53	0.57	7.84	7.68
	50 ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	0.85	0.97	0.99	1.00	0.40	0.50	17.8	20.4
通空气		0.85	0.97	0.99	1.00	0.40	0.50	17.8	20.4
通纯氧		1.09	1.29	1.00	1.00	0.56	0.56	26.2	25.8

(1) *C. arborea*, (2) *C. tropicalis*

表2还列出了以不同初糖浓度培养的实验数据,在较低的初始总还原糖浓度下,菌体的增长速率较小而得率较高,培养液中最终能获得的菌体干重也较低。较低的菌体干重会增加菌体分离过程的能耗,但较高的菌体得率又会使SCP培养中碳源的成本下降。对这两种相反的影响综合考虑,以50g/L的初始总糖浓度较好。另外,在低的初始糖浓度下,不出现二次增长现象,但微生物还是优先代谢葡萄糖。

2.5 氧分压对SCP培养的影响

假丝酵母必须在有氧的条件下才能代谢木糖,因此,氧传递对于双碳源SCP培养尤其是双碳源SCP高密度培养非常重要。本文研究了用纯氧化替空气进行鼓泡的方法以强化氧传递,菌体生长速率及菌体得率都有较大的提高,见表2。

2.6 用流加的方法进行双碳源SCP高密度培养

用流加方法进行SCP高密度培养时,葡萄糖的存在对木糖的利用存在着抑制作用,葡萄糖和木糖能否同时被利用是双碳源流加培养成功的关键。根据前人的研究结果⁽⁴⁾及我们的双碳源SCP间歇培养结果,在双碳源中的葡萄糖浓度降低到4.0g/L或1.0g/L以下时,所用的两种微生物就开始代谢木糖。因此,在流加培养时,控制培养液中葡萄糖浓度低于上述水平,就能使葡萄糖和木糖同时被代谢,防止产生木糖的积累。

*C. arborea*的耗糖速度相对来说比较慢,在流加培养的过程中,葡萄糖浓度因不断改变流速而有些波动,但从整个过程来看木糖并不积累。*C. tropicalis*的耗糖速度较快,在整个培养过程中,糖浓度维持在较低的水平上,葡萄糖和木糖被同时利用。在菌体浓度较高时,由于氧的传递不足导致了菌体的自溶。流加培养的最大菌体浓度可达48.0g/L,见图3,4。对于*C. tropicalis*,出现了前面提到的现象,在糖耗尽后菌体还能继续生长,根据其代谢特点应推迟收获时间。流加培养的增长速率及能达到的最大菌体干重都大大高于间歇培养,树状假丝酵母的菌体得率有所下降,而热带假丝酵母仍保持在较高的水平,表3比较了流加培养与间歇培养的实验结果。

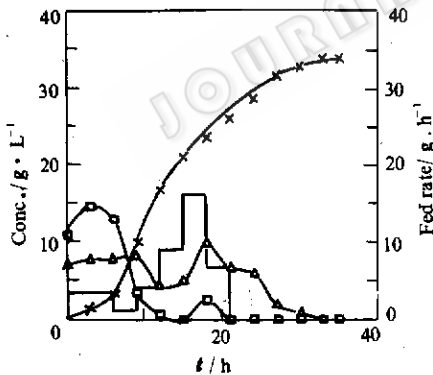


图3 *C. arborea*混合糖流加培养

□葡萄糖浓度, △木糖浓度, +细胞浓度, —流加速率

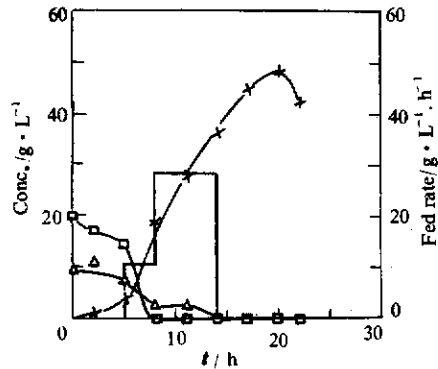


图4 *C. tropicalis*混合糖流加培养

图例同图3。

表3 不同培养方式混合糖培养的比较

培养方式	菌体得率/%		生产能力/ $g \cdot h^{-1} \cdot L^{-1}$		菌体干重/ $g \cdot L^{-1}$	
	(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)
流加	0.42	0.56	1.46	2.37	44.4	48.0
间歇	0.57	0.56	1.09	1.09	26.2	25.8

(1) *C. arborea*, (2) *C. tropicalis*

参 考 文 献

- (1) Einsele A. In: Dellweg H ed, *Biotechnology*, Verlag Chemie, Weinheim, 1983, Vol. 3, pp. 43~59.
- (2) Faust U, Prave P. In: Dellweg H ed, *Biotechnology*, Verlag Chemie, Weinheim, 1983, Vol 3, pp. 83~91.
- (3) Oura E. In: Dwellweg H ed, *Biotechnology*, Verlag Chemie, Weinheim, 1983, pp. 3~21.
- (4) Tyree R W, Clausen C, Gaddy J L. *Biotechnol Letter*, 1990, 12 (1): 51~56.
- (5) Sliniger P J, Bothast R J. *Biotechnol Bioeng*, 1987, 32: 1104~1112.
- (6) du Preez J C, van Driessel B, Prior B A. *Biotechnol Letter*, 1988, 10 (12): 901~906.
- (7) Shimizu N, Yano T, Kobayashi T. *J Ferment Technol*, 1982, 60 (6): 487~493.
- (8) Beth H J, Hatton T A, Daniel I C W *et al.* *Biotechnol Bioeng*, 1990, 35: 578~585.
- (9) Mori H, Yano T, Misutani S *et al.* *J Chem Eng (Japan)*, 1986, 19: 111~116.
- (10) Stanier R T, Standing C N. *The Microbiol World*, 3rd ed, Prentice Hall Inc. Englewood Cliffs, 1979, pp. 308~317.
- (11) Kompala D S, Ramkrishna D, Tsao G T *et al.* *Biotechnol Bioeng*, 1984, 26: 1272~1281.

High Cell Density Cultivation of SCP with Double Carbon Sources

Liu Gang Zheng Zhongming Song Da Cen Peilin

(Laboratory of Secondary Resources Chemical

Engineering Zhejiang University, Hangzhou 310027)

Abstract The batch and fed-batch processes of single cell protein (SCP) cultivation were studied with double carbon sources (glucose+xylose). The effects of various operation conditions, such as temperature, ratio of carbon and nitrogen, initial total reduced sugars and aeration mode, on batch SCP cultivation were examined. Based on the results of batch process, a fed-batch process was proposed. The maximum dried cell density in the broth can reach as high as 48.0g/L.

Key words Glucose, xylose, SCP, batch and fed-batch