固定化产絮菌生产生物絮凝剂的研究

杨基先[1]，张笑晨[1]，李 昂[1]，马 放[1]，王金娜[1]，邢 洁[1]，孙 冰[2]，杨淑娟[2]

（1. 哈尔滨工业大学 城市水资源与水环境国家重点实验室，150090 哈尔滨；
2. 大庆油田公司第二采油厂规划设计研究所，163000 黑龙江 大庆）

摘 要：为降低发酵成本及实现生物絮凝剂的连续发酵生产，采用吸附法固定化生物絮凝剂产生菌，发酵生产生物絮凝剂. 从载体稳定性、生物絮凝剂产量、发酵液絮凝率等方面对比颗粒活性碳、聚氨酯泡沫和菌丝球3种固定化载体性能，并优化了活性碳和菌丝球两种载体的固液比. 结果表明：颗粒活性碳、聚氨酯泡沫和菌丝球均可有效固定化产絮菌F+，采用颗粒活性碳和菌丝球两种载体固定化发酵的生物絮凝剂产率高于聚氨酯泡沫载体. 载体吸附试验表明：菌丝球载体对于产絮菌F+的24 h吸附率高于颗粒活性碳载体；使用菌丝球固定化发酵时，固液比1.0 g/L，发酵时间24 h，粗提生物絮凝剂2.234 g/L，比传统分批发酵生物絮凝剂的产量提高14%. 摇瓶试验表明，3种载体均可连续使用15次以上. 从发酵液絮凝率和成本两方面考虑，确定活性碳和菌丝球两种载体的最适固液比均为1 g/L.

关键词：生物絮凝剂；固定化；固定化载体；固液比；菌丝球；活性碳；聚氨酯泡沫
中图分类号：X5 **文献标志码**：A **文章编号**：0367－6234(2013)06－0053－06

Production of bioflocculant using immobilized bioflocculant-producing bacteria

YANG Jixian[1], ZHANG Xiaochen[1], LI Ang[1], MA Fang[1], WANG Jinna[1], XING Jie[1], SUN Bing[2], YANG Shujuan[2]

(1. State Key Laboratory of Urban Water Resource and Environment, Harbin Institute of Technology, 150090 Harbin, China;
2. The Second Oil Production Plant Institute of Planning and Design, Petrochina Daqing Oilfield, 163000 Daqing, Heilongjiang, China)

Abstract: To reduce fermentation costs and achieve continuous fermentation of bio-flocculant, the immobilized fermentation to produce bioflocculant was used. The performances of the carriers including activated carbon, pllyurethane foam and mycelial pellets were contrasted by comparing the carrier stability, bio-flocculant production and bio-flocculant activity. The solid-liquid ratio of activated carbon and mycelial pellets were optimized. The results show that the activated carbon, polyurethane foam and mycelial pellets could adsorb bioflocculant-producing bacteria F+ and retain high flocculanting activity for long time. The yields of activated carbon and mycelial pellets were higher than that of polyurethane foam. The adsorption rate of mycelial pellets in 24 h was higher than that of granular activated carbon. Under the optimized conditions (solid-liquid ratio 1.0 g/L; the fermentation time 24 h), the crude bio-flocculant yield of immobilized fermentation by mycelial pellets (2.234 g/L) increased 14%. The shake flask experiments show that the three carriers could produce bioflocculant more than 15 batches. The solid-liquid ration was optimized as 1.0 g/L by considering the flocculation rate and cost.

Key words: bioflocculant; immobilized; immobilized carrier; solid-liquid ratio; mycelial pellets; activated carbon; polyurethane foam

生物絮凝剂是一种高效、无毒、无二次污染的絮凝剂，但其成本较高、产量较低的缺点制约了生物絮凝剂的工业化生产[1－3]. 固定化细胞技术是一种高效的发酵技术，近年来广泛用于发酵[4－6]、环保[7－9]、能源[10－12]等领域. 使用载体吸附产絮

收稿日期：2012－05－18.
基金项目：国家高技术研究发展计划项目(2009AA062906)；国家创新研究群体科学基金资助项目(51121062)；第46批中国博士后科学基金项目(20090460901)；第四批中国博士后科学基金特别资助项目(201104430)；城市水资源与水环境国家重点实验室(哈尔滨工业大学)自主课题(2010TS03，2010DX09).
作者简介：杨基先(1964—)，男，博士，教授，博士生导师；
马 放(1963—)，男，博士，教授，博士生导师.
通信作者：马 放，mafang@hit.edu.cn.

菌生产生物絮凝剂充分发挥了固定化细胞发酵的优势,即多代发酵只需一次接种,不需要微生物菌体多次培养、扩大,缩短了发酵生产周期,提高生物絮凝剂生产能力,降低了生物絮凝剂成本[13-14]. 目前国内仅有王兰等[15]对于固定化技术生产生物絮凝剂的技术进行了研究. 菌丝球作为生物载体因其无二次污染[16-20]、生物相容性好[21-26]等优点,成为近年来研究热点.

本研究应用固定化细胞发酵技术生产生物絮凝剂,通过对比 3 种不同类型固定化载体发酵生产生物絮凝剂效果,发现新型生物质载体 - 菌丝球在菌株吸附率、粗提发酵液生物絮凝剂产量方面具有优势,是一种无毒无二次污染的前景广阔的载体,为生物絮凝剂工业化生产提供了新思路.

1 实 验

1.1 实验材料

菌种:取自城市水资源与水环境国家重点实验室保存的高效絮凝菌 F2 (*Agrobacterium tumefaciens*) 和 F6 (*Bacillus sphaeicus*), 两种产絮菌组成复合产絮菌 F + [27]. 用于形成菌丝球的菌株为 *Aspergillus niger* Y3, 由本实验室分离得到,黑曲霉 Y3 能够在液体淹没振荡条件下自絮凝成为菌丝球[21].

产絮液体培养基: 葡萄糖 10 g/L, K_2HPO_4 5 g/L, KH_2PO_4 2 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 g/L, NaCl 0.1 g/L, 尿素 0.5 g/L, 酵母膏 0.5 g/L, pH = 7.5, 115 ℃灭菌 30 min.

菌丝球液体培养基: 葡萄糖 10 g/L, KH_2PO_4 2 g/L, NH_4Cl 1 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g/L, 115 ℃灭菌 30 min.

颗粒活性碳为河南佰科活性炭厂生产的煤质颗粒活性碳(40 目);聚氨酯泡沫为上海烁得建筑材料有限公司生产的聚氨酯泡沫.

1.2 实验方法

1.2.1 产絮菌 F + 固定化方法

聚氨酯泡沫载体事先剪成适当大小的立方块,在 0.1 MPa、121 ℃条件下灭菌 20 min,冷却后备用. 颗粒活性碳处理方法与聚氨酯泡沫相同. 载体菌丝球的制备采用孢子悬液定量接种的方法: 在无菌操作台中,用接种环在长满孢子的固体培养基上刮取适量孢子,接入到无菌水中. 振荡一段时间后使孢子均匀分布,用可见分光光度计在波长 620 nm 下测其吸光度. 按下述接种量公式将孢子接种至菌丝球液体培养基中,在 160 r/min、33 ℃摇床中培养 72 h 后成球,使用前用无菌水冲洗 3 遍后即可使用.

$$\text{接种量} = \frac{0.250 \times 0.10\% \times \text{液体培养基体积}}{\text{孢子悬液吸光度}}.$$

在活化后的 F2、F6 斜面上分别挑取少许菌落,接种至产絮培养基中,于 33 ℃、160 r/min 下培养 24 h,得到产絮菌种子液. 在产絮培养基中分别放入适量上述预处理后的载体,产絮菌种子液按 5% 接种量接种,培养 24 h 后,菌体就可吸附于载体表面.

1.2.2 摇瓶半连续培养方法

将已经吸附产絮菌的一定量载体投加到产絮培养基中,于 33 ℃、160 r/min 下培养一定时间后,采用每隔 24 h 更换发酵培养基的方法半连续生产生物絮凝剂.

1.2.3 固液比实验方法

分别用不同质量的载体吸附产絮菌投加到产絮培养基中,以发酵时间 24 h 为一代进行摇瓶半连续培养,监测每代发酵液菌浊、发酵液絮凝率等指标.

1.3 测定方法

1.3.1 絮凝率测定方法

采用自来水配制的高岭土悬浊液(5 g/L)作为实验水样. 在 1 L 待测水样中,按照顺序投加一定量的发酵液、1.5 mL 10% $CaCl_2$(质量分数),然后用2 mol/L NaOH溶液调节水样 pH 至 7.2. 同时,以相同条件下不投加生物絮凝剂发酵液的水样作为空白对照. 在六联搅拌机中以一定搅拌条件(第一段搅拌速度 160 r/min,搅拌时间 2 min;第二段搅拌速度 40 r/min,搅拌时间 2 min)进行搅拌后,静沉 20 min.

用紫外可见光分光光度计在 550 nm 处测定上清液的吸光度. 絮凝效果用絮凝率表示,即

$$\mu = (D_A - D_B)/D_A \times 100\%.$$

式中: D_A 为空白水样上清液 550 nm 吸光度; D_B 为待测水样上清液 550 nm 吸光度; μ 为絮凝率.

1.3.2 葡萄糖测定方法

取一定量的发酵液,于 4 ℃、8 900 r/min 条件下离心 20 min,取一定量的发酵上清液,用蒸馏水进行适当稀释 (以满足生物传感器的测量范围),利用生物传感器测定葡萄糖的含量.

1.3.3 菌浊测定方法

用蒸馏水作空白对照,用紫外可见分光光度计测定发酵液在 600 nm 波长的吸光度,菌浊较大的发酵液应先用蒸馏水稀释一定倍数再进行测定.

1.3.4 生物絮凝剂粗提干质量测定方法

生物絮凝剂主要成分是由多糖组成的胞外物

质，因此，以多糖含量表示生物絮凝剂有效成分含量，粗提方法如下：将发酵液置于超速大容量离心机进行离心处理，使菌体和胞外代谢产物分离，离心参数：温度 4 ℃、转速 12 000 r/min、时间 20 min，并收集上清液备用. 在离心后的上清液中加入其两倍体积 4 ℃预冷的无水乙醇，轻微搅拌，出现白色丝状絮体. 挑出白色絮体，倒掉上层乙醇溶液，再加入一倍体积 4 ℃预冷的无水乙醇，轻微搅拌，再次出现白色丝状絮体，将两次收集的白色絮体放到 105 ℃烘箱中烘干后测干质量.

2　结果分析

2.1　不同类型载体对生物絮凝剂产量的影响

采用 1.2.1 固定化方法进行摇瓶重复发酵实验，载体固液比均为 1 g/L，对比单批发酵液絮凝率和粗提生物絮凝剂产量，结果如图 1 所示. 可以看出，无机载体活性碳、有机载体聚氨酯泡沫和生物质载体菌丝球的生物絮凝剂产量（干质量）均为 2.0 g/L 左右，发酵液絮凝率均在 80% 以上，其中菌丝球载体的生物絮凝剂产量和发酵液絮凝率均为最高，产量为 2.234 g/L，发酵液絮凝率为 92.86%.

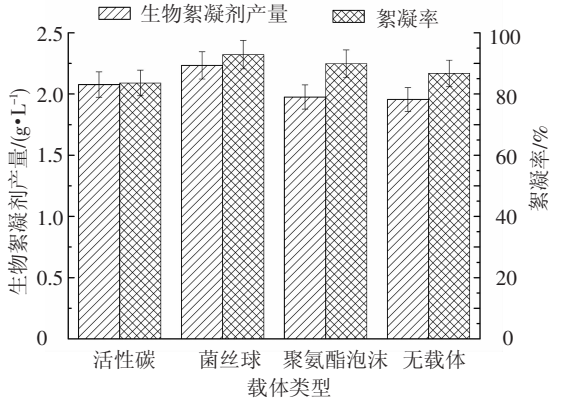
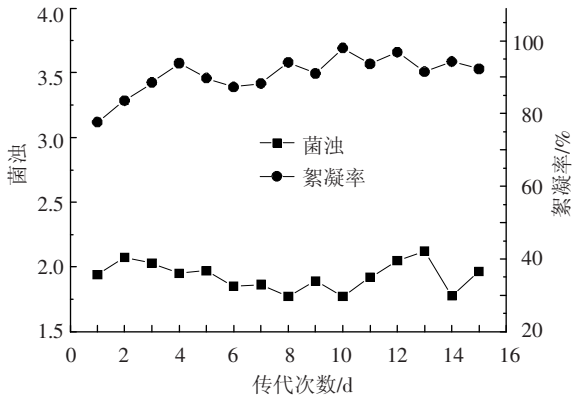


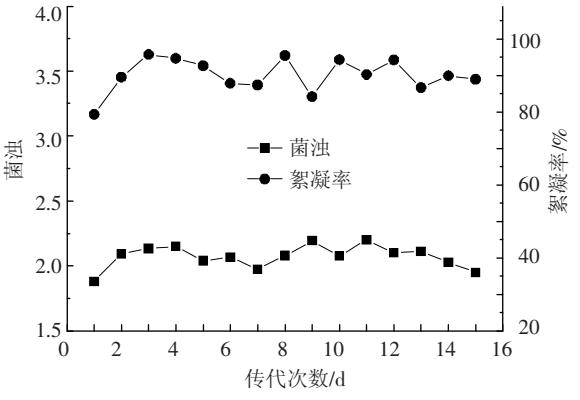
图 1　不同类型载体对于生物絮凝剂产量的影响

采用 1.2.2 方法进行载体固定化发酵稳定性试验，结果见图 2. 可以看出，3 种载体每代发酵液絮凝率均为 90% 左右，发酵液菌浊为 2.0 左右. 3 种载体均可稳定使用 15 代以上.

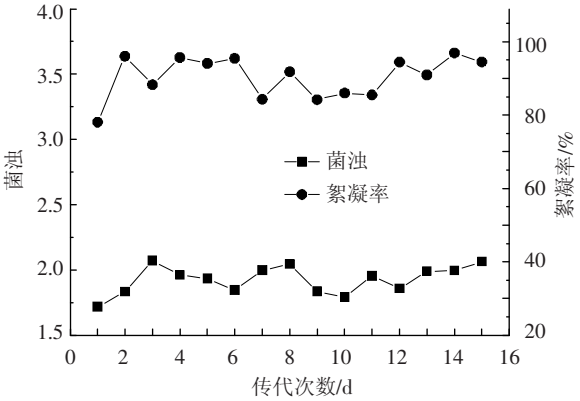
分别向已配制一定浓度的絮凝菌悬液中按照 1 g/L固液比投加菌丝球和颗粒活性碳，在 33 ℃、160 r/min 条件下吸附，测量 24 h 吸附后菌悬液吸光度，计算出两种载体 24 h 吸附率. 结果见表 1. 可以看出，菌丝球载体对于产絮菌 F + 的 24 h 吸附率为 37.30%，高于颗粒活性碳的吸附率. 菌丝球对于产絮菌 F + 的吸附能力更强主要是菌丝球特殊的结构特性导致的，菌丝球除了具有表面电荷的静电力吸附以外，由于菌丝细胞会在菌丝表面分泌一种多糖、蛋白为主，黏性较大的胞外聚合物薄膜，使菌丝球表面具有较大的黏附力，相对于其他生物载体更利于细菌吸附[21]，从图 3（a）可以看出，产絮菌 F + 大量被吸附到菌丝上；另外从图 3（b）可以看出，与颗粒活性碳的微孔结构不同，菌丝球内部空隙较大，利于细菌的进入和吸附. 菌丝球对于产絮菌 F + 的较强吸附力，使得菌丝球作为载体固定化发酵生产生物絮凝剂的产量比无载体分批发酵产量提高了 14%.



（a）活性碳



（b）聚氨酯泡沫

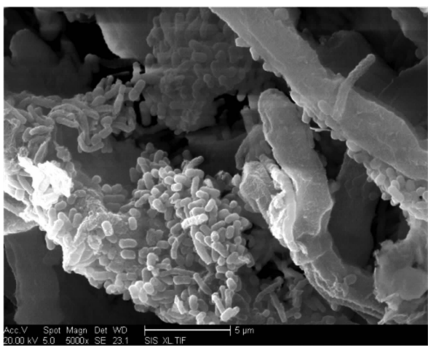


（c）菌丝球

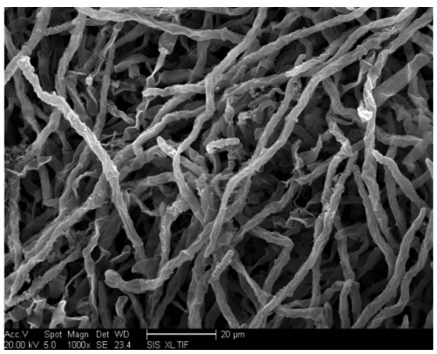
图 2　载体固定化发酵稳定性

表 1 菌丝球与活性碳吸附率对比

载体	菌悬液初始 D_{600}	24 h 吸附后菌悬液 D_{600}	24 h 吸附率/%
活性碳	0.241	0.203	15.77
菌丝球	0.244	0.153	37.30



(a)菌丝球吸附产絮菌 F + (×10 000)



(b)菌丝结构(×1 000)

图 3 菌丝球结构

对于产絮菌 F + 从生物絮凝剂产量来说,菌丝球和活性碳是比较理想的固定化载体. 颗粒活性碳作为一种传统的生物载体,具有较高的机械强度、廉价等优点;而菌丝球对于产絮菌 F + 的吸附能力强于颗粒活性碳,密度略大于水,在水流作用下可以在水中均匀分布,静置状态下易于分离,并且具有一定的机械强度,无二次污染,是一种前景广阔的生物载体[22].

2.2 固液比对于颗粒活性碳和菌丝球固定化生产生物絮凝剂的影响

从图 4 可以看出,活性碳固液比对于产絮菌 F + 的第 1 代发酵液絮凝效果影响不大,5 种固液比的第 1 代发酵液效果均良好,发酵液菌浊均在 2.0 左右,絮凝率均在 90% 左右;从图 5 可以看出,以 24 h 为 1 代,3 种固液比的发酵液菌浊在前 4 代基本相同,但是在第 5 代发生变化,固液比为 1 g/L 的菌浊依然维持较高水平(为 2.1),而固液比为 0.5 和 0.3 g/L 时则下降到 1.9;在第 6 代固液比为 1 g/L 时继续稳定在 2.0 以上,而固液比为 0.5 和 0.3 g/L 时继续下降. 选择合理的固液比需要综合考虑发酵稳定性和经济因素两方面因素,固液比过小会使固定的菌量不足,进行多次固定化发酵使用时,发酵液菌浊下降,影响固定化发酵稳定性;而固液比过大会导致发酵成本的增加,综合考虑选择 1 g/L 作为活性碳固定化发酵制备生物絮凝剂的最佳固液比.

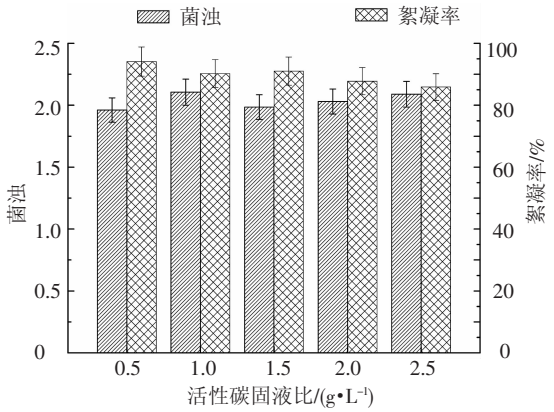


图 4 活性碳固液比对产絮菌 F + 的菌浊和其发酵液絮凝率的影响

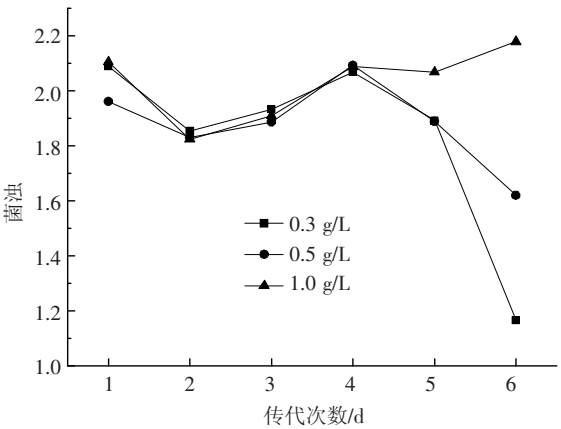


图 5 传代次数对产絮菌 F + 菌浊的影响

从图 6 可以看出,菌丝球 5 种固液比发酵液菌浊均在 2.0 以上,但是发酵液絮凝率有一定的差异,固液比为 1.0 和 2.0 g/L 的发酵液絮凝率较高,达 85% 以上,而固液比 0.5 和 2.5 g/L 的发酵液絮凝率较低,仅为 80% 左右. 从表 2 可以看出,由于活性碳是无机载体,其对于底物葡萄糖的消耗很少,而菌丝球本身是一种生物体,会消耗一定的底物葡萄糖. 固液比较低时,絮凝剂产量较少,致使絮凝率较低;而固液比过大时,由于菌丝球是一种生物质载体,不同于活性炭,其本身也消耗培养基中的营养物质,投加过多的菌丝球会使培养基中的营养不能满足载体上不断增多的产絮菌合成生物絮凝剂的需要,而导致部分菌体死亡,

进而使生物絮凝剂产量下降，发酵液絮凝效果降低，并且投加过量的菌丝球还会增加运行成本. 因此，综合考虑选择 1 g/L 作为最佳菌丝球固液比.

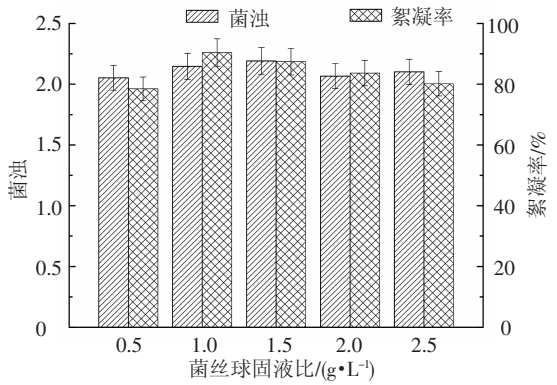


图 6　菌丝球固液比对于产絮菌 F + 絮凝效果的影响

表 2　菌丝球与颗粒活性碳 24 h 底物葡萄糖消耗对比

载体	葡萄糖初始质量浓度/($g \cdot L^{-1}$)	24 h 后葡萄糖质量浓度/($g \cdot L^{-1}$)	24 h 葡萄糖消耗率/%
菌丝球	4.43	2.93	33.86
活性碳	4.50	4.18	7.10

3　结　论

1）分别利用颗粒活性碳、聚氨酯泡沫和菌丝球吸附产絮菌 F + 进行固定化发酵生产生物絮凝剂，证明固定化发酵生产生物絮凝剂是可行的.

2）颗粒活性碳载体在固液比为 1 g/L，发酵周期 24 h，发酵液絮凝率为 90.26%，粗提生物絮凝剂 2.176 g/L，保证发酵稳定性的前提下可以连续使用 15 代以上.

3）菌丝球对于产絮菌 F + 的吸附能力强于颗粒活性碳，菌丝球固液比为 1.0 g/L 时，发酵时间 24 h，发酵液粗提生物絮凝剂 2.234 g/L，比无载体分批发酵生产生物絮凝剂产量提高了 14%，在保证发酵稳定性前提下可以连续使用 15 代以上.

参考文献

[1] 王珊，孙玉梅，曹芳，等. 活性炭固定化产脂肪酶的发酵性丝孢酵母细胞的研究[J]. 中国酿造，2010，2：42 – 45.

[2] 李冀新，张超，高虹. 固定化细胞技术应用研究进展[J]. 化学与生物工程，2006，23(6)：5 – 7.

[3] 白京生，王兰. 微生物絮凝剂连续化生产及其稳定性研究[J]. 生物技术，2007，17(1)：75 – 78.

[4] MALISOM C，SUNTOMSUK W. Improved β-carotene production of *Rhodotorula glutinis* in fermented radish brine by continuous cultivation [J]. Biochemical Engineering Journal，2009，43(1)：27 – 32.

[5] SALCHIZADCH S，SHOJAOSADATI A. Extracellular biopolymeric flocculants recent trends and biotechnological importance [J]. Biotechnology Advances，2001，19(5)：371 – 385.

[6] ZHANG Jianfa，LIU Zhili，WANG Ruiyong，*et al.* Characterization of a bioflocculant produced by the marine myxobacterium *Nannocystis* sp. NU – 2 [J]. Applied Microbiology and Biotechnology，2002，59(4/5)：517 – 522.

[7] 周成林，李彦锋，白雪，等. 固定化微生物工艺处理印染废水[J]. 兰州大学学报：自然科学版，2008，44(5)：63 – 68.

[8] HE Ning，LI Yin，CHEN Jian，*et al.* Identification of a novel bioflocculant from a newly isolated *Corynebacterium glutamicum* [J]. Biochemical Engineering Journal，2002，11：137 – 148.

[9] SUH H H. Characterization of bioflocculant produced by *Bacillus* sp. DP – 152 [J]. Journal of Fermentation and Bioengineering，1997，184(2)：108 – 112.

[10] DERMLIM W，PRASERTSAN P，DOELLE H. Screening and characterization of bioflocculant produced by isolated *Klebsiella* sp. [J]. Applied Microbiology and Biotechnology，1999，52：698 – 703.

[11] LI Zhong，CHEN Ruowei，LEI Hengyi，*et al.* Charaterization and flocculating properties of a novel bioflocculant produced by *Bacillus circulans* [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology，2009，25：745 – 752.

[12] 黄锦丽，龙敏南，傅雅婕，等. 产酸克雷伯氏菌的吸附固定及其产氢研究[J]. 厦门大学学报：自然科学版，2005，44(5)：710 – 713.

[13] 罗大珍，林稚兰. 现代为生物发酵及技术教[M]. 北京：北京大学出版社，2006：148 – 150.

[14] SMIDSROD O，SKJAK – BRIK G. Aliginate as immobilization matrix for cells [J]. Trends in Biotechnology，1990，8(3)：71 – 78.

[15] 王兰，赵璇. 微生物絮凝剂产生菌固定化条件的优化[J]. 微生物学杂志，2011，31(2)：48 – 53.

[16] ZHAO Lei，CAO Guangli，WANG Aijie，*et al.* Enhanced bio-hydrogen production by immobilized *Clostridium* sp. T2 on a new biological carrier [J]. International Journal of Hydrogen Energy，2012，37：162 – 166.

[17] ZHANG Si，LI Ang，CUI Di，*et al.* Performance of enhanced biological SBR process for aniline treatment by mycelial pellet as biomass carrier [J]. Bioresource Technology，2011，102(6)：4360 – 4365.

[18] ZHANG Si, LI Ang, CUI Di, *et al*. Biological improvement on combined mycelia pellet for aniline treatment by tourmaline in SBR process [J]. Bioresource Technology, 2011, 102(19): 9282 – 9285.

[19]张斯, 马放, 山丹,等. 混合菌丝球苯胺净化效能研究[J]. 哈尔滨工程大学学报, 2010, 31(6): 786 – 790.

[20]张斯, 段姝悦, 陈旭,等. 菌丝球传代方法的研究[C]//第十四次全国环境微生物学术研讨会. 厦门: 化学工业出版社, 2011.

[21]张斯. 菌丝球生物载体的构建及其强化废水处理效能研究[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学市政环境工程学院, 2011: 7 – 42.

[22]赵立军, 马放, 山丹,等. 曲霉菌丝球 Y3 对细菌的固定化效能[J]. 江苏大学学报: 自然科学版, 2007, 28(5): 446 – 449.

[23] WU Juan, YU Hanqing. Biosorption of 2,4-dichlorophenol from aqueous solution by *Phanerochaete chrysosporium* biomass: isotherms, kinetics and thermodynamics [J]. Journal of Hazardous Materials, 2006, 137(1): 498 – 508.

[24] TASKIN T, ERDAL S. Reactive dye bioaccumulation by fungus *Aspergillus* niger isolated from the effluent of sugar fabric – contaminated soil [J]. Toxicology and Industrial Health, 2010, 26(4): 239 – 247.

[25] VAN WEZEL GP, KRABBEN P, TRAAG B A, *et al*. Unlocking Streptomyces spp. for use as sustainable industrial production platforms by morphological engineering [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 72(8): 5283 – 5288.

[26] VECHT-LIFSHITZ S E, SASSON Y, BRAUN S. Nikkomycin production in pellets of *Streptomyces tendae* [J]. Journal of Applied Bacteriology, 1992, 72(3): 195 – 200.

[27] WANG Lili, MA Fang, QU Yuanyuan, *et al*. Characterization of a compound bioflocculant produced by mixed culture of *Rhizobium radiobacter* F2 and *Bacillus sphaeicus* F6 [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2011, 27: 2559 – 2565.

(编辑 刘 彤)