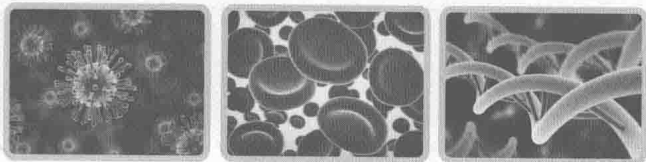


基于 H^+ 定向诱导强化细菌纤维素 代谢耐酸适应性、 高产育种及性质改良

雷虹 著

张外信

中国农业科学技术出版社



基于 H^+ 定向诱导强化细菌纤维素 代谢耐酸适应性、 高产育种及性质改良

雷虹 著

中国农业科学技术出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

基于 H^+ 定向诱导强化细菌纤维素代谢耐酸适应性、高产育种及性质改良 / 雷虹著. —北京: 中国农业科学技术出版社, 2016. 10

ISBN 978 - 7 - 5116 - 2780 - 3

I. ①基… II. ①雷… III. ①细菌 - 纤维素 - 研究 IV. ①Q539

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2016) 第 241161 号

责任编辑 贺可香
责任校对 马广洋

出版者 中国农业科学技术出版社
北京市中关村南大街 12 号 邮编: 100081
电 话 (010) 82106638 (编辑室) (010) 82109702 (发行部)
(010) 82109709 (读者服务部)
传 真 (010) 82106638
网 址 <http://www.castp.cn>
经 销 者 各地新华书店
印 刷 者 北京富泰印刷有限责任公司
开 本 787mm × 1 092mm 1/16
印 张 10.25
字 数 280 千字
版 次 2016 年 10 月第 1 版 2016 年 10 月第 1 次印刷
定 价 56.00 元

— 版权所有 · 翻印必究 —

目 录

绪言	(1)
1 细菌纤维素耐酸适应性发酵优化及代谢途径调控	(3)
1.1 引言	(3)
1.2 材料与仪器	(4)
1.3 试验方法	(6)
1.4 结果与分析	(13)
1.5 讨论	(54)
1.6 结论与创新点	(56)
参考文献	(57)
附录	(59)
2 基于 H^+ 诱导的细菌纤维素高产菌株定向选育	(60)
2.1 引言	(60)
2.2 材料与仪器	(61)
2.3 试验方法	(65)
2.4 结果与分析	(72)
2.5 讨论	(92)
2.6 结论与创新点	(94)
参考文献	(95)
附录	(97)
3 酸定向调控改良细菌纤维素物理性能	(99)
3.1 引言	(99)
3.2 材料与仪器	(100)
3.3 试验方法	(101)
3.4 结果与分析	(103)
3.5 讨论	(125)
3.6 结论与展望	(126)

参考文献	(128)
4 酸定向调控对细菌纤维素发酵代谢的影响	(129)
4.1 引言	(129)
4.2 材料与仪器	(130)
4.3 试验方法	(131)
4.4 结果与分析	(133)
4.5 讨论	(142)
4.6 结论与展望	(143)
参考文献	(145)
附录	(148)

绪 言

纤维素是自然界中分布最广、含量最多的一种多糖，作为地球上最为丰富的自然资源，早在几千年前就被人们发现，现已用于生产生活的各个方面，以满足人类衣食住行的需求。根据来源不同，纤维素可分为植物纤维素、动物纤维素、细菌纤维素 (Liang *et al.*, 2015)。目前，工业用途的纤维素大多来自植物，如树木、竹、稻秸、麦秆、黄麻、苧麻、大麻、亚麻和棉花等。动物纤维素又称甲壳素，是一种多糖类生物高分子，在自然界中广泛存在于低等生物菌类、藻类，节肢动物、昆虫的外壳、蟹以及软体动物的内脏和软骨中。

细菌纤维素 (Bacterial Cellulose, 简称 BC) 是一类由微生物产生的纯纤维素。细菌纤维素和植物纤维一样，都是由 β 一类由葡萄糖通过 β 葡萄糖通过生糖苷键结合组成的直链，直链彼此之间平行，无分支结构，又称 β 苷键结合组葡聚糖。但从物理、化学、机械性能来看，细菌纤维素具有自己独特的性质。因为与植物纤维相比，细菌纤维素不含木质素和半纤维素 (Phisalaphong *et al.*, 2008)，使用时不需提取纯化，更重要的是具有优良的生物亲合性、生物相容性、生物适应性和生物可降解性，以及精细的网状结构、高结晶度、高抗张强度等独特性质 (Phisalaphong *et al.*, 2008)，因此被世界公认为是高安全性、性能优异、实用价值好的新型纳米生物材料，现已广泛应用于食品、造纸、医学材料、声学材料、石油开采等各个领域，近年来关于细菌纤维素的研究和开发应用已成为新的微生物合成材料的研究热点之一 (Bottan *et al.*, 2014; Zang *et al.*, 2014; Rajwade *et al.*, 2015)。

细菌纤维素是醋杆菌分泌合成的一种胞外多糖，在其生物合成过程中会产生大量葡萄糖酸、乙酸等代谢副产物，恶化发酵环境 pH，影响菌体生理代谢以及产物性质，是造成细菌纤维素产量降低的重要原因。加强细菌纤维素产生菌代谢特性的深入了解，在此基础上进行育种，增强酸耐受性，是提高细菌纤维素产量的一条重要途径。在掌握细菌纤维素代谢模式后，可进行定向调控，从而增加产量、调控产物性质，使其性质更优异、应用更高效。

本专著著者在此思路的引领下，通过代谢通路分析确定耐酸高产关键节点，结合代谢调控试验阐明了细菌纤维素高产合成的能量代谢模式及酸平衡机制；基于 GC-MS、HPLC 代谢组平台分析了不同耐酸菌株胞外代谢物的时空动态变化规律，同时通过复合诱变结合质子自杀法筛选了 3 株高产耐酸的菌株，运用 AFLP 技术确定 5 个细菌纤维素高产相关基因，并结合代谢途径和代谢物进行了基因功能初步阐释。采用酸扰动方法对细菌纤

纤维素的合成进行原位生物改性, 进行细菌纤维素性质改良, 构筑适应于多种领域的特定性质的细菌纤维素。在上述研究基础上, 采用 GC-MS 手段分析酸扰动下汉氏葡糖醋酸杆菌发酵产细菌纤维素过程的胞外代谢组, 考察酸扰动对菌体生理代谢及细菌纤维素产物合成的影响。

参考文献

- Bottan S, Robotti F, Jayathissa P, *et al.* 2014. Surface-structured bacterial cellulose with guided assembly-based biolithography (GAB) [J]. *ACS nano*, 9 (1): 206-219.
- Liang H W, Wu Z Y, Chen L F, *et al.* 2015. Bacterial cellulose derived nitrogen-doped carbon nanofiber aerogel: An efficient metal-free oxygen reduction electrocatalyst for zinc-air battery [J]. *Nano Energy*, 11: 366-376.
- Phisalaphong M, Jatupaiboon N. 2008. Biosynthesis and characterization of bacteria cellulose-chitosan film [J]. *Carbohydrate Polymers*, 74 (3): 482-488.
- Rajwade J M, Paknikar K M, Kumbhar J V. 2015. Applications of bacterial cellulose and its composites in biomedicine [J]. *Applied microbiology and biotechnology*, 99 (6): 2 491-2 511.
- Zang S, Zhuo Q, Chang X, Qiu G, *et al.* 2014. Study of osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells (HASCs) on bacterial cellulose [J]. *Carbohydrate polymers*, 104: 158-165.

1 细菌纤维素耐酸适应性发酵优化及代谢途径调控

1.1 引言

细菌纤维素由于具有优秀的生物亲和性、生物相容性、生物适应性和良好的生物可降解性,被公认为世界上安全的性能优异的新型生物材料。在食品、造纸、声学器材、石油开采和人造皮肤、医用材料等领域有着广泛的应用前景,近几年在组织工程(人造血管、仿生材料和软骨组织支架)、电子纸张、燃料电池、固定化酶、渗透汽化、改性等方面进行了尝试性的拓展应用。

细菌纤维素的研究和开发应用课题,作为当今新的微生物合成材料的研究热点之一,国外已经开始将研究工作发展到对其的改性、修饰和制备其复合材料上,通过对纤维素的修饰,制备了性能各异的纤维素衍生物,但目前这方面的研究还处于起步阶段,国内在这方面的研究工作略显薄弱。如今细菌纤维素产业在日本、美国已初步形成年产值上亿美元的市场,在东南亚尤其在食品工业方面也拥有广泛的市场前景。国内对细菌纤维素的研究刚刚起步,仅仅停留在实验室水平,与国外的差距还非常大。

拓展细菌纤维素的应用,有赖于其生产成本的降低和生产规模的扩大。但当前的问题是发酵技术水平低,使得发酵生产细菌纤维素成本高,细菌纤维素产量和产率低,价格高,其应用仅局限在一些高附加值产品的制造中,限制了其工业化生产和推广应用。因此,针对当前问题,为了提高其产量,进一步选育或构建纤维素高产菌株、寻找适合菌株生长代谢的营养源以及发酵方式、优化发酵培养基、改善发酵工艺、寻找更廉价更好的细菌纤维素生产原料从而进一步提高细菌纤维素合成的效率和产量等,仍是细菌纤维素研究的基础,这将是未来研究工作努力的方向(Lin *et al.*, 2013)。

细菌纤维素的生物合成是一个复杂的过程,加强对纤维素生物合成机制的深入了解,利用代谢工程手段对生产菌进行改造提高其产量和对葡萄糖的转化率也是今后需要继续探讨的重要内容(Li *et al.*, 2012)。采用育种及基因工程手段,对菌株进行定向改造,同时利用代谢通量分析方法了解代谢途径流量,通过调控手段使碳代谢流更多的流向细菌纤维素的合成方向,从而筛选出含有较少代谢副产物,高产细菌纤维素菌株。并在增加产量和降低成本的基础上,通过改性,将其应用于不同领域,更多更好的细菌纤维素产品将不断问世。

所以利用微生物发酵生产细菌纤维素将是一项具有较高学术价值和广泛应用前景的课

题。一方面开发新的发酵技术,设计合理的生物反应器,优化发酵条件,改善发酵工艺;另一方面加强对纤维素生物合成机制的深入了解,利用代谢工程方法进行改造。将其应用于食品工业、造纸工业、医药和生物工程领域,必将推动细菌纤维素产业快速发展。

本研究采用从水果中分离筛选并经过鉴定的汉氏葡糖醋杆菌,从代谢控制发酵入手进行发酵产 BC 的研究。用人工神经网络模型描述发酵培养基与产物的关系,并由此模型预测产物产量,用遗传算法优化培养基配方,以期能有效地提高产物浓度,显著地降低培养基成本,而且可大大减少烦琐的实验工作量并缩短研究周期;从代谢机理的角度分析了 BC 生物合成的调节机制,构建 BC 生物合成的代谢网络模型;并基于该菌株代谢途径,运用现代代谢工程理论及代谢通量、酶学、代谢物组学等分析方法对其发酵代谢规律进行研究,以期找到控制发酵的手段,从而为提高 BC 产物得率找到依据和方法。具体研究内容如下。

(1) 以培养 24h 的菌浓作为指标,考察种子活力,通过单因素及正交试验找到最佳种子培养基及培养条件。

(2) 进行单因素实验,初步确定最适合菌体生产 BC 的培养基配方及发酵条件;正交和均匀设计实验方案,进行发酵生产,收集实验结果,用于神经网络训练;应用人工神经网络构建细菌纤维素发酵模型,进行发酵过程模拟及产量预测;应用遗传算法全局寻优,优化发酵培养基。

(3) 研究细菌纤维素的生物合成途径及代谢机理,构建细菌纤维素生物合成的代谢网络模型;应用发酵数据,通过代谢通量计算,对细菌纤维素生物合成进行代谢通量分析;找到关键节点,并对关键节点进行刚性评估和代谢流分析。

(4) 基于途径分析进行代谢调控;比对不同发酵阶段关键酶酶活和代谢物变化;根据酶活数据及代谢图谱对发酵代谢途径进行分析。

1.2 材料与仪器

1.2.1 菌种

汉氏葡糖醋杆菌 (*Gluconacetobacter hansenii*), 由食品分析实验室从腐烂猕猴桃中分离获得并保藏。保藏号: CCTCC No. M2010332。

1.2.2 培养基配方

(1) 固体培养基: 葡萄糖 3%, 酵母膏 0.5%, 蛋白胨 0.5%, 柠檬酸 0.1%, Na_2HPO_4 0.2%, K_2HPO_4 0.1%, MgSO_4 0.025%, 琼脂 2%, pH 值为 5.8, 115℃ 高压灭菌 30min。

(2) 液体种子培养基: 蔗糖 2%, 酵母膏 0.3%, 蛋白胨 0.5%, KH_2PO_4 0.2%, MgSO_4 0.015%, 自然 pH, 115℃ 高压灭菌 30min。

(3) 基础发酵培养基: 葡萄糖 5%, 酵母膏 0.5%, 蛋白胨 0.5%, 柠檬酸 0.1%, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 0.2%, K_2HPO_4 0.1%, MgSO_4 0.025%, pH 值为 5.8, 115℃ 高压灭菌 30min。

(4) 适合菌体生长的 10 种培养基：①蔗糖 2%，酵母膏 0.5%，蛋白胨 0.5%， Na_2HPO_4 0.5%；②蔗糖 2%，酵母膏 0.5%，蛋白胨 0.3%， KH_2PO_4 0.2%， MgSO_4 0.01%；③甘露醇 2.5%，酵母膏 0.5%，胰蛋白胨 0.3%；④葡萄糖 2%，酵母膏 0.5%，蛋白胨 0.5%， Na_2HPO_4 0.27%，柠檬酸 0.15%， MgSO_4 0.5%；⑤葡萄糖 7%，酵母膏 0.5%， KH_2PO_4 0.5%， MgSO_4 1.5%，乙醇 2%；⑥葡萄糖 2%，酵母膏 0.5%，胰蛋白胨 0.5%， Na_2HPO_4 0.5%；⑦葡萄糖 2%，酵母膏 0.5%，蛋白胨 0.5%，柠檬酸 0.1%， Na_2HPO_4 0.5%；⑧葡萄糖 2%，蛋白胨 0.4%，柠檬酸 0.2%， Na_2HPO_4 0.27%， MgSO_4 0.025%；⑨葡萄糖 2%，酵母膏 0.5%，蛋白胨 0.5%，柠檬酸 0.115%， Na_2HPO_4 0.27%；⑩葡萄糖 5%，酵母膏 0.5%，蛋白胨 0.5%， Na_2HPO_4 0.2%， K_2HPO_4 0.1%，柠檬酸 0.1%， MgSO_4 0.025%。

1.2.3 生化试剂

生化试剂详见表 1-1。

表 1-1 主要生化试剂

试剂名称	生产厂家	试剂名称	生产厂家
蔗糖	天津市天力化学试剂有限公司	乙醇	天津市天力化学试剂有限公司
葡萄糖	天津市光复科技发展有限公司	硫酸镁	天津市光复科技发展有限公司
果糖	天津市光复科技发展有限公司	氢氧化钠	天津市津北精细化工有限公司
乳糖	天津市光复科技发展有限公司	氯化钠	天津市津北精细化工有限公司
麦芽糖	天津市光复科技发展有限公司	纤维素酶	国药生化试剂有限公司
牛肉膏	北京奥博星生物技术责任有限公司	丙酮酸	国药集团化学试剂有限公司
酵母膏	北京奥博星生物技术责任有限公司	琥珀酸	国药集团化学试剂有限公司
蛋白胨	北京奥博星生物技术责任有限公司	柠檬酸	天津光复精细化工研究所
硫酸铵	天津东丽区天大化学试剂厂	乙酸	天津光复精细化工研究所
尿素	天津市化学试剂三厂	丙酮酸钠	天津科密欧化学试剂有限公司
磷酸氢二钠	天津市光复科技发展有限公司	氯化镁	天津科密欧化学试剂有限公司
磷酸二氢钠	天津市光复科技发展有限公司	MTT	Sigma
磷酸氢二钾	天津市东丽区天大化学试剂厂	PMS	Sigma
磷酸二氢钾	天津市东丽区天大化学试剂厂	TPP	Sigma
柠檬酸	天津市化学试剂三厂	六磷酸葡萄糖	Sigma
六磷酸葡萄糖脱氢酶	Solarbio	尿苷二磷酸葡萄糖	Sigma
乳酸	天津市化学试剂三厂	DTT	Sigma
NADH	比利时 ACROS	乙酸	天津市天力化学试剂有限公司
ATP	比利时 ACROS		

注：试剂均为国产分析纯

1.2.4 主要仪器

实验用的主要仪器详见表 1-2。

表 1-2 主要实验仪器

仪器名称	型号	生产厂家
电子分析天平	AB104-N	梅特勒-托利多仪器上海有限公司
生化培养箱	LRH-250	上海一恒科技有限公司
超净工作台	FLC-3	上海申安医疗器械厂
自动电热压力蒸汽灭菌器	ZDX-35B	上海申安医疗器械厂
控温摇床	HZQ-C	哈尔滨东联电子技术公司
紫外分光光度计	UV-2550	日本岛津
酸度计	PHS-250	上海精科雷磁
数显恒温水浴锅	HH-6	国华电器有限公司
漩涡混合器	MVS-1	北京金北德工贸有限公司
高速离心机	LD5-2A	北京医用离心机厂
高效液相色谱仪	LC-20A	日本岛津公司
生物显微镜	SP-15B	深圳市西派克光学仪器有限公司
高速冷冻离心机	Allegra25R	BECKMAN 公司

1.3 试验方法

1.3.1 细菌纤维素的培养方法

- (1) 菌种平板活化：从冰箱中将冷冻保存的汉氏葡糖醋杆菌接种到新的固体培养基上，在 30℃ 的恒温电热培养箱中培养 18~24h。
- (2) 种子培养：用接种环挑取斜面培养的菌株转接到装有 50ml 汉氏葡糖醋杆菌种子培养基的 150ml 三角瓶中，于 30℃ 下在 150r/min 的恒温振荡培养箱中培养约 24h。
- (3) 发酵培养：按 7% 的接种量将种子培养液接入装有 100ml 汉氏葡糖醋杆菌发酵培养液的 250ml 三角瓶中，静置于 28℃ 下的恒温电热培养箱中培养 7d 后收集纤维素。

1.3.2 细菌纤维素的处理

恒温静置培养 7d 后生成的细菌纤维素膜浮于液面。膜取出后，用水多次冲洗，除去膜表面培养基及杂质。再将膜浸泡于 0.1mol/L 的 NaOH 溶液，100℃ 煮沸 20min，去除膜中的菌体和残留培养基，膜呈乳白色半透明。然后用蒸馏水多次冲洗，用 pH 试纸轻压膜测 pH 值，约为 7.2。80℃ 干燥至恒重，进行称重。纤维素的产量表示为：g/L。

1.3.3 分析方法

1.3.3.1 残糖的测定

采用 HPLC 测定。

(1) 色谱条件：反相 C18 (250mm × 4.6mm)；流动相 0.05mol/L H_2SO_4 ；流量 1ml/min；waters 示差折光检测器；柱温 65℃；进样量 20μl。

(2) 发酵样品的 HPLC 分析：取汉氏葡萄糖醋杆菌的发酵液 10ml，10 000r/min 离心 5min，去除菌体，上清液待测，然后吸取少量上清液，用双蒸水稀释 50 倍，用 0.22μm 滤膜过滤后进样分析。

1.3.3.2 发酵液 pH 的测定

采用 pH 酸度计直接测定。

1.3.3.3 生物量测定

用 0.85% 的生理盐水配制 pH 值为 4.6 ~ 4.8 的 0.1mol/L 的醋酸钾 - 醋酸缓冲液 100ml，取纤维素酶 2g 溶于缓冲液中活化，置冰箱中备用。测定时，每次取活化好的纤维素酶液 2ml 在 50℃、pH 值为 5.0 条件下充分水解细菌纤维素膜 2h，释放菌体，适当稀释后，于 420nm 波长下测吸光值 OD_{420} 值 (Li *et al.*, 2012)。

取水解液 5ml，10ml，15ml，20ml，不满 20ml 的用去离子水补足，适当稀释后，于波长 420nm 下测吸光度。再分别取水解液 5ml，10ml，15ml，20ml，多次用蒸馏水洗涤、离心，弃上清液，剩余物 80℃ 烘干至恒重，称量并记录，绘制菌体干重与 OD_{420} 的校正曲线，结果如图 1-1 所示。

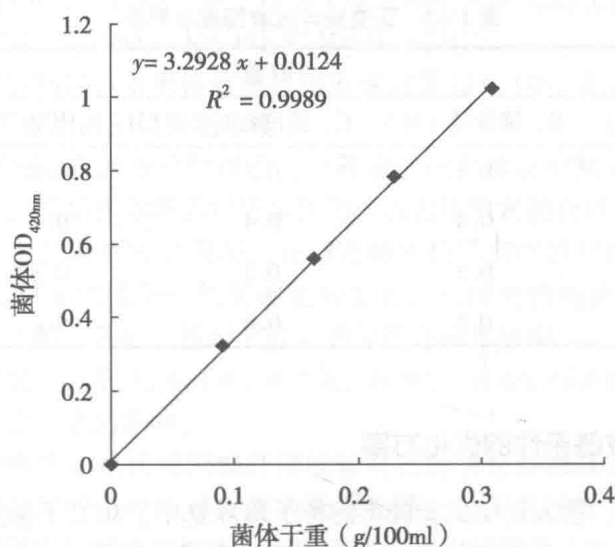


图 1-1 菌体干重对 OD 值校正曲线

1.3.4 种子培养基优化的试验方案

从资料查找适合该菌株生长的 10 种培养基配方，分别以上述 10 种培养基配方作为种子培养基，以培养 24h 的菌浓作为指标，考察种子活力，进而通过比较种子活力，选取其中活力最大的一种配方作为该菌株的初始种子培养基。

1.3.4.1 单因素设计

以培养 24h 的菌浓作为指标，分别改变初始种子培养基中（蔗糖 2%，酵母膏 0.5%，蛋白胨 0.3%，磷酸二氢钾 0.2%，硫酸镁 0.01%）的 5 个因素，考察各因素对种子活力的影响，各因素水平设置如下：

- ①蔗糖：1%、2%、3%、4%、5%、6%；
- ②酵母膏：0.3%、0.4%、0.5%、0.6%、0.7%；
- ③蛋白胨：0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%；
- ④磷酸二氢钾：0.1%、0.2%、0.3%、0.4%；
- ⑤硫酸镁：0.01%、0.02%、0.03%、0.04%。

1.3.4.2 正交试验设计

培养基成分对对菌体生长及纤维素产量有很大影响，涉及因素较多，而且各因素之间存在交互作用，仅仅用简单的单因素试验，只能得到各个因素的最佳水平，忽略了因素间的交互作用，从整体而言，往往不能得到最佳培养基配方。因此，采用经典的正交试验设计优化种子培养基组成。按照 L16（4⁵）正交表进行正交试验设计，各因素水平详见表1-3。

表 1-3 正交设计试验因素水平表

水平	因素				
	A、蔗糖（%）	B、酵母膏（%）	C、蛋白胨（%）	D、K ₂ HPO ₄ （%）	E、MgSO ₄ （%）
1	1	0.3	0.3	0.1	0.01
2	2	0.4	0.4	0.2	0.015
3	3	0.5	0.5	0.3	0.02
4	4	0.6	0.6	0.4	0.025

1.3.5 细菌纤维素发酵条件的优化方案

取活化好的种子，接入正交试验确定的种子培养基中，30℃下振荡培养 24h，然后接种到基础发酵培养基中，静置培养 7d。分别改变接种量、接种龄、摇床转速、培养温度、pH，以纤维素干重为指标，考察种子活力和纤维素生产能力，以获得最佳细菌纤维素发酵条件。各因素水平设置如下。

- (1) 接种龄（h）：12、18、24、30、36、48。

(2) 接种量 (%) : 1、3、5、7、9、15、20。

(3) 摇床转速 (r/min) : 90、120、150、180。

(4) 培养温度 (°C) : 4、20、25、30、37。

(5) pH 值 : 4、5、5.5、6、6.5、7、8。

1.3.6 发酵培养基优化的试验方案

1.3.6.1 培养基组分单因素优化设计

(1) 碳源确定: 糖类是一般微生物较容易利用的良好的碳源和能源物质, 而对于醋酸杆菌, 糖类又直接是合成纤维素的前体。因此本实验根据汉氏葡萄糖醋杆菌特性分别选用葡萄糖、蔗糖、果糖、乳糖、麦芽糖为单一碳源, 以实验室现有发酵培养基 1.2.2 作为基础培养基, 以细菌纤维素产量干重作为评价指标, 确定最佳碳源。

发酵液的糖含量过高会使发酵液的黏度增大不利于细菌的生长及细菌纤维素的合成, 因此确定最佳碳源后, 需确定糖的浓度以期得到获得更高产量。实验中葡萄糖浓度分别为 2%、4%、6%、8%、10% 进行培养, 确定糖的适合浓度。

(2) 氮源确定: 大多数细菌以有机氮 (如蛋白陈、牛肉膏、酵母膏、玉米浆等) 或无机氮 (硫酸铵、硝酸铵等) 为氮源。本实验分别选用蛋白陈、酵母膏、牛肉膏、尿素、硫酸铵为氮源, 进行发酵培养以确定最佳氮源。

筛选出最佳氮源后, 分别以 0.2%、0.4%、0.6%、0.8%、1.0% 的氮源浓度进行培养, 确定氮源的适合浓度。

(3) 其他无机盐的确定: 汉氏葡萄糖醋杆菌在合成细菌纤维素时会产生葡萄糖酸、乙酸等酸性物质, 使发酵液的 pH 值下降, 从而影响到纤维素的合成。往发酵液中加入磷酸盐可以平衡发酵液的 pH 值, 而钠、钾、镁离子是细菌生长所需的无机元素, 故无机盐选用 NaH_2PO_4 、 Na_2HPO_4 、 K_2HPO_4 、 KH_2PO_4 和 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 。

根据文献资料及前期试验结果将磷酸盐的浓度设置为 0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5% 来确定纤维素产量最高的磷酸盐浓度。

(4) 有机酸的确定: 在细菌产纤维素的过程中, 往发酵液中加入有机酸不是将其作为生产纤维素的底物, 而是作为能源物质起作用。因为纤维素的合成与细胞生长有一定的联系, 添加有机酸使之参与 TCA 以循环, 在细菌的生长早期促进代谢流从纤维素的合成转向 TCA 循环, 产生更多的能量, 加速细胞的生长, 从而整体地提高了纤维素的产量。本实验选用柠檬酸、乙酸、乳酸, 进行实验来确定适合的有机酸。

确定最适有机酸后, 分别 0、0.1%、0.2%、0.3%、0.4% 等浓度梯度进行试验, 考察有机酸对细菌纤维素产量的影响。

(5) 乙醇浓度的确定: 汉氏葡萄糖醋杆菌能够将乙醇氧化转换成乙酸, 对醋酸菌纤维素的生长有促进作用。另外乙醇也可以作为能源物质, 为细菌纤维素的生物合成提供能量。故向汉氏葡萄糖醋杆菌发酵液中加入乙醇以期提高细菌纤维素的产量。

分别选取乙醇浓度为 0、0.5%、1.5%、2%、2.5%、3.5% 来确定适合的乙醇浓度。

1.3.6.2 正交及均匀设计

根据前期试验数据及经验, 确定 6 种对发酵影响显著的培养基组分, 分别为: 葡萄糖

(A)、牛肉膏 (B)、酵母膏 (C)、磷酸二氢钠 (D)、磷酸二氢钾 (E)、乙醇 (F)。在单因素确定的培养基组分的浓度范围内进行正交及均匀试验设计。正交试验采用 L18 (3⁶) 进行试验设计, 表 1-4 即为正交试验的因素水平表。均匀设计表采用 U10 (10⁸) 中 1, 2, 3, 5, 6, 8 六列, 其中 D=0.2994, 得到表 1-5 试验方案。按上述两表方案进行试验, 然后收集实验数据, 用于神经网络的训练。

表 1-4 正交设计试验因素水平表

水平	因素					
	A (%)	B (%)	C (%)	D (%)	E (%)	F (%)
1	2	0.2	0.3	0.2	0.1	1
2	5	0.5	0.6	0.3	0.2	2
3	8	0.8	0.9	0.4	0.3	3

表 1-5 均匀设计试验方案

试验号	因素					
	A (%)	B (%)	C (%)	D (%)	E (%)	F (%)
1	1	0.2	0.3	0.25	0.35	5
2	2	0.4	0.6	0.5	0.15	4.5
3	3	0.6	0.9	0.2	0.5	4
4	4	0.8	0.1	0.45	0.3	3.5
5	5	1	0.4	0.15	0.1	3
6	6	0.1	0.7	0.4	0.45	2.5
7	7	0.3	1	0.1	0.25	2
8	8	0.5	0.2	0.35	0.05	1.5
9	9	0.7	0.5	0.05	0.4	1
10	10	0.9	0.8	0.3	0.2	0.5

1.3.6.3 人工神经网络建模

根据培养基组分因素数及优化指标, 设计神经网络的结构。收集优化发酵培养基的正交及均匀设计共 28 组试验数据, 以其中前 23 组数据作为 BP 神经网络的学习样本, 进行网络训练, 使网络结构达到所需精度, 成功构建神经网络模型。

神经网络训练过程如下:

- ①随机抽取初始权值;
- ②输入学习样本, 学习速率, 误差水平;
- ③依次计算各层输出;
- ④修正权值, 前馈调节, 经 k 次迭代权值, 若训练误差小于设定误差则训练停止, 否则转③继续, 直至达到最大训练次数终止。

通过冗余 5 组样本验证来表征此神经网络的泛化能力, 证明人工神经网络构建成功与

否,然后以此模型作为下一步遗传算法过程中的适应度函数,进行全局寻优。

1.3.6.4 遗传算法的描述及实现

遗传算法在整个进化过程中的遗传操作是随机性的,但它所呈现出的特性并不是完全随机搜索。它能有效地利用历史信息,推测下一代期望性能有所提高的寻优点集。这样一代代的不断进化,最后收敛到一个最适应环境的个体上,求得问题的最优解。

遗传算法所涉及的五大要素包括:参数编码、初始群体的设定、适应度函数的设计、遗传操作的设计和控制参数的设定。

遗传算法的运行过程为一个典型的迭代过程,其具体工作内容和基本步骤如下:

- ①选择编码策略,把参数集合 x 和域转换为位串空间 s ;
- ②定义适应值函数 $s(X)$;
- ③确定遗传策略,包括选择群体大小 n ,选择、交叉、变异方法,以及确定交叉概率,变异概率等参数;
- ④随机初始化生成群体 P ;
- ⑤计算群体中个体位串解码后的适应值 $s(X)$;
- ⑥按照遗传策略,运用选择、交叉、变异算子作用于群体,形成下一代群体;
- ⑦判断群体性能是否满足于某一指标,或者已完成预定迭代次数;若不满足则返回步骤⑥,或者修改遗传策略再返回步骤⑥。

本文以构建好的神经网络模型作为适应度函数,进行培养基全局优化。

1.3.7 代谢网络及代谢流平衡模型构建

根据已有文献报道(李飞等,2009;Zhong *et al.*, 2013)和相关生化知识,结合汉氏葡糖醋杆菌代谢途径及生理代谢特征,构建其生物合成细菌纤维素的代谢网络和代谢通量方程。

1.3.8 代谢通量分析

采用优化前后培养基进行细菌纤维素发酵生产,实时收集发酵数据,包括葡萄糖残余量、乙酸生成量、细菌纤维素产量、生物量。对其求导得到各因素瞬时反应速率。根据胞外反应速率,采用 Joseph H. J. Vallino (1992) 的方法,进行矩阵计算和方程求解,从而得到代谢网络中的代谢通量分布。

对比优化前后发酵中后期代谢通量分布及关键节点分析,以期找出提高细菌纤维素产量的调控手段。

1.3.9 代谢调控策略

按照 1.2.1 培养方法,分别原始培养基和优化培养基,进行发酵培养,发酵 7d,每隔 1d 取样测定发酵参数,包括残糖、生物量、pH 值、细菌纤维素产量以及丙酮酸、乙酸、甘油、柠檬酸等代谢副产物浓度和关键酶活。以优化培养基为对照,分别添加 6mmol/L 和 12mmol/L 的 Mg^{2+} 和 0.2g/L 的丙酮酸钠、柠檬酸钠、乙酸钠,进行发酵培养,

测定发酵参数。对比不同条件下代谢物及酶活变化，分析细菌纤维素高产代谢途径代谢流量变化。

1.3.10 代谢物测定

采用高效液相色谱仪测定发酵液中的葡萄糖、丙酮酸、乙酸、甘油、柠檬酸浓度，具体方法条件同 1.2.3.1。

1.3.11 酶活测定

取 50ml 发酵液，5 000r/min 离心 10min，去上清液，收集菌体，用 20mmol/L 磷酸钾缓冲液洗涤两次，将菌体悬浮于 1ml 磷酸钾缓冲液中，加入 1ml 1% (v/v) 乙醚，振荡 1min，4℃ 下 12 000r/min 离心 5min，缓冲液洗涤菌体两次，0.5ml 磷酸钾缓冲液悬浮，-20℃ 保存待测。所有实验操作均在冰浴中进行。

己糖激酶酶活测定参照 Martinez Barajas 等 (1998) 的方法，葡萄糖-6-磷酸脱氢酶酶活测定方法参考 Bergmeyer (1983)，丙酮酸激酶酶活采用南京建成研究所专用试剂盒进行测定，丙酮酸脱氢酶酶活测定参考何亚辉 (2007) 方法。

样品测定在 25℃ 下，采用 UV2550 紫外分光光度计进行。葡萄糖-6-磷酸脱氢酶、丙酮酸激酶、丙酮酸脱氢酶酶活测定样品 340nm 处吸光度的变化，己糖激酶的酶活测定样品 566nm 处吸光度的变化。酶活单位 (U) 定义为每分钟氧化或还原 1μmol 辅酶所需的酶量。比酶活单位为酶活力 (U/ml) / 蛋白浓度 (mg/ml)，即 U/mg。

蛋白含量标准曲线和样品蛋白浓度测定采用考马斯亮蓝法 (石庆华, 2006)。标准曲线见图 1-2。

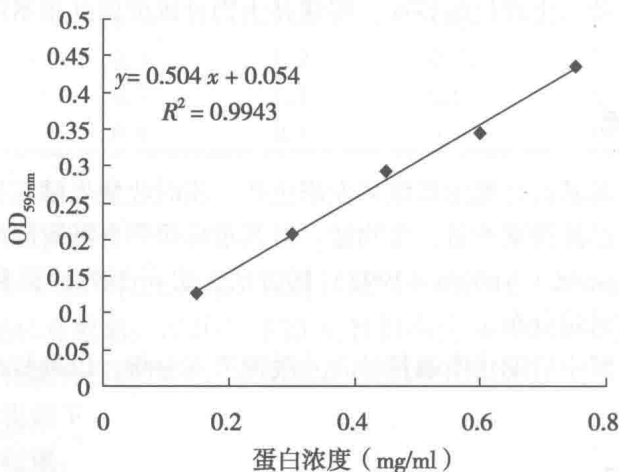


图 1-2 蛋白含量标准曲线

取待测样品，适当稀释，取 1ml 加入试管，再加入考马斯亮蓝 G-250 试剂 5ml 混匀，静置 2min，测定其 595nm 处的吸光值，对照标准曲线求出样品中蛋白含量。