

文章编号 :1009-038X(2000)03-0240-04

核黄素产生菌的补料发酵*

陆文清, 章克昌, 吴佩琮

(无锡轻工大学生物工程学院,江苏无锡 214036)

摘 要:通过分析核黄素产生菌 *E. ashbyii* 在发酵过程中菌体量、糖质量浓度、pH 值、核黄素质量浓度和粘度的变化及菌体形态与核黄素生物合成之间的联系,发现 pH 值对菌体生长有显著的影响,菌体浓度过高会导致发酵液粘度过大,通风供氧困难,菌体活力下降.采用先低浓度培养菌体,然后根据发酵液 pH 值的变化进行多次适量补料,不仅可以控制菌体的过度增殖,缓解通风供氧不足造成的困难,而且还可以保持菌体活力,增加核黄素的产量.

关键词:核黄素;补料发酵;阿氏假囊酵母

中图分类号:Q563.2

文献标识码:A

Batch-fed Fermentation of Riboflavin Producing Strain *E. ashbyii*

LU Wen-qing, ZHANG Ke-chang, WU Pei-cong

(School of Biotechnology, Wuxi University of Light Industry, Wuxi, 214036)

Abstract: By analyzing biomass, saccharide, pH, riboflavin and viscosity of the broth during riboflavin producing strain *E. ashbyii* fermentation process and the relationship between the strain profile and riboflavin biosynthesis, it was found that pH has great effect on the strain reproducing and higher biomass leading to higher viscosity of the broth which resulted in difficulties on broth aeration and lower activity of the strain. By culturing *E. ashbyii* with lower nutrient then feeding the broth with higher nutrient culture several times according to the pH of the broth, not only over-reproducing of the strain could be avoided, the difficulties of broth aeration be alleviated and higher activity of the strain be maintained, but also the yield of riboflavin could be improved.

Key words: riboflavin; batch-fed fermentation *E. ashbyii*

核黄素是人和动物自身不能合成的一种必需维生素,在糖类、脂类和蛋白质代谢过程中起着极其重要的作用.在医药、食品和饲料等行业有着广泛的用途^[1,2].

核黄素的工业化生产有微生物发酵法和化学合成法两种,目前以微生物液态深层发酵法为主.生产用的菌种主要有阿氏假囊酵母(*Eremothecium*

ashbyii 简称 *E. ashbyii*)和棉病阿舒囊霉(*Ashbya gossypii* 简称 *A. gossypii*),它们均为好氧的丝状真菌.发酵液粘度很大,呈非牛顿特性,通风供氧困难.而充足的溶氧是发酵高产核黄素的关键之一.作者以 *E. ashbyii* 为试验菌,采用逐步补料的方法,通过控制菌体质量浓度来缓解通风供氧不足造成的困难,进一步提高核黄素的产量,降低生产成本.

* 收稿日期:1999-12-13;修订日期:2000-03-16.

作者简介:陆文清(1968年2月生)男,江苏太仓人,工学博士.

1 材料与方法

1.1 试验菌种

阿氏假囊酵母 *E. ashbyii* 无锡轻工大学生物工程学院诱变筛选获得.

1.2 分批发酵培养液组成

豆油 30 mL/L,葡萄糖 30 g/L,骨胶 30 g/L,玉米浆 20 mL/L,NaCl 3 g/L,KH₂PO₄ 3 g/L,MgSO₄·7H₂O 0.2 g/L,pH 7.0(灭菌前).

1.3 实验设备

显微镜 上海江南仪器厂产品;NDJ1 型旋转式粘度计 上海天平厂产品;酸度计 上海天达仪器有限公司产品;721 型分光光度计 上海第三分析仪器厂产品;往复式摇瓶机 锡山市生化器械厂产品;超净工作台 苏州净化设备厂产品;20 升全自动发酵罐 瑞士 Infer 公司产品;冷冻高速离心机 日本 Hitachi 公司产品;高压灭菌锅 锡山市第二医疗器械厂产品;恒温干燥箱 上海医疗器械厂产品.

1.4 测定方法

核黄素含量测定 分光光度法^[3];糖含量测定 费林定糖法^[4];菌体浓度:干重法^[5]

2 结果与讨论

2.1 分批摇瓶发酵试验

摇瓶培养 *E. ashbyii*(500 mL 三角瓶装液 50 mL,30 ℃ 冲程 84 mm,频率 100 次/分).测定不同时间的菌体量、葡萄糖质量浓度、核黄素质量浓度和粘度 结果如图 1~图 3 所示:

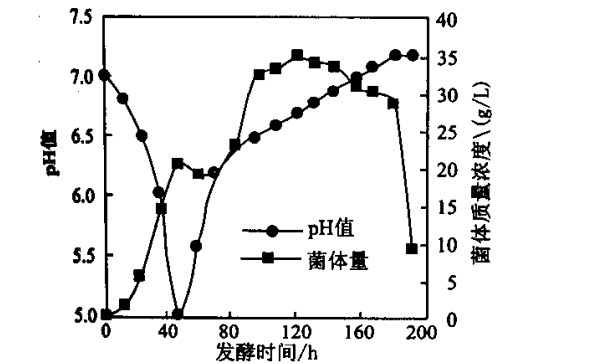


图 1 pH 值和菌体量随时间的变化
Fig.1 The change of pH and biomass vs. time

发酵 160 h 以后残糖降为 3.2 g/L,核黄素不再增加,最高质量浓度为 6.4 g/L 左右.发酵液的最大粘度为 0.762 Pa·s.

显微镜检测发现,菌体形态与核黄素的合成速度及发酵液的粘度之间存在着密切的联系.根据摇

瓶发酵和显微镜观测获得的结果,可把 *E. ashbyii* 的发酵过程粗略地分为四个阶段^[6].

第一阶段(0~24 h)菌丝逐渐增多,菌丝体细长,相互缠绕在一起,美蓝染色很深.发酵液的颜色由棕色变成乳白色,粘度迅速上升,但还没有核黄素产生.

第二阶段(24~48 h)菌体生长旺盛,菌丝体逐渐膨大,内容物明显增多,并有少量特别黄亮的粗短菌丝体出现,美蓝染色极浅.发酵液由白色转为黄色,有少量核黄素产生.发酵液的粘度继续上升.

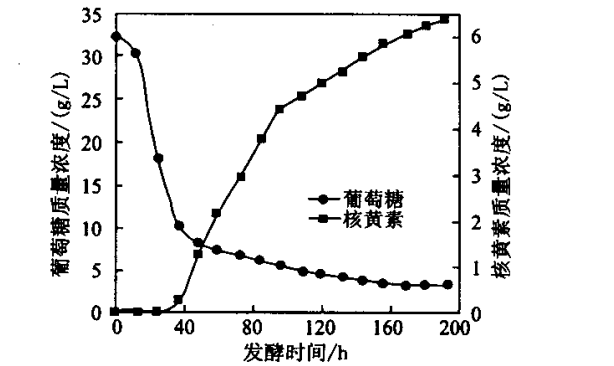


图 2 葡萄糖质量浓度和核黄素质量浓度随时间的变化
Fig.2 The change of concentration of glucose and riboflavin vs. time

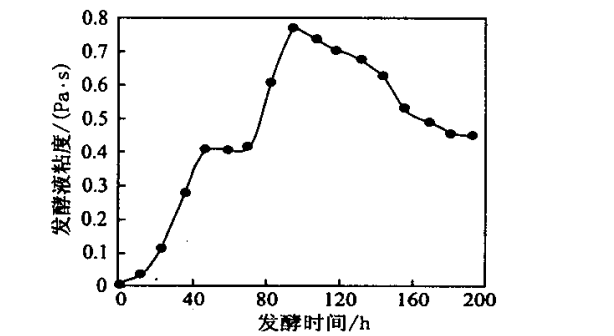


图 3 发酵液粘度随时间的变化
Fig.3 The change of viscosity vs. time

第三阶段(48~96 h)核黄素大量合成,膨大菌丝体缓慢收缩,美蓝染色逐渐加深,有针状的核黄素晶体出现.发酵液的粘度逐渐升到最大值.

第四阶段(96~160 h)菌体开始解体自溶,发酵液的粘度迅速下降.断菌丝和游离孢子逐渐增多,核黄素的合成逐渐趋于停止.

核黄素的生物合成需要消耗大量 ATP,*E. ashbyii* 是高耗氧的丝状酵母.但是在核黄素合成的高峰期(即发酵的第三阶段),溶液的粘度很大,给发酵液的通风供氧造成了很大困难.在生产实践中,缓解液态发酵供氧不足的方法主要有三种^[8]:1)调整搅拌转速和通风量,设法提高体积传氧系数 K_{la} .

2) 加大罐压. 3) 通入纯氧和富氧气体. 体积传氧系数受设备能力限制, 一般不易改变. 加大罐压虽然可以提高发酵液的平衡溶氧浓度, 但同时也加大了 CO_2 在水中的溶解度 (在水中 CO_2 的溶解度是 O_2 的 30 倍左右). HCO_3^- 浓度过高会对某些菌体产生毒害作用. 经试验发现, 在 20 L 小罐培养 *E. ashbyii* 罐压维持在 0.1 MPa (表压), 菌体生长很慢, 通风培养 60 h 菌体质量浓度仅为 4.6 g/L, 而且基本不产核黄素. 采用通入纯氧和富氧气体的方法不仅成本高, 而且操作繁琐. 如果菌体高耗氧的时间比较短, 设备的供氧能力也已经达到极限而尚不能满足供氧要求时, 采用富氧方法改善供氧是比较合理的. 但 *E. ashbyii* 在发酵合成核黄素的过程中高耗氧的时间长达 60 h 以上, 采用富氧气体的方法显然是不合适的. 既然供氧一方存在困难, 那么可从需氧一方进行考虑, 设法降低发酵过程中菌体的需氧量来缓解供氧的困难.

2.2 pH 值对菌体生长的影响

配制不同 pH 值的 *E. ashbyii* 培养液 (不含豆油, 其余组份同发酵液). 500 mL 三角瓶装液 70 mL 接种 1 mL 30 ℃ 摇瓶培养 24 h (冲程 84 mm, 频率 80 次/分). 结果如图 4 所示:

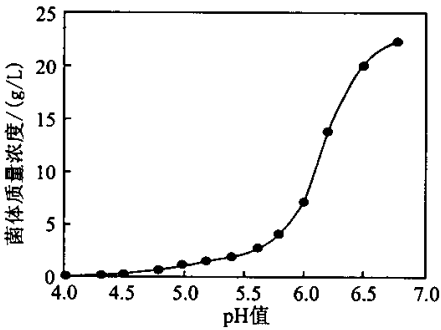


图 4 pH 值对菌体生长的影响

Fig. 4 Effect of pH on growth of *E. ashbyii*

pH 值对菌体生长有显著影响, 当 pH 值低于 5.0 时菌体生长几乎停止. pH 值大于 6.2 以后菌体生长明显. 可通过控制 pH 值的变化来控制菌体过度增殖, 降低溶液粘度和菌体耗氧量, 从而缓解通风供氧的困难.

2.3 摇瓶补料发酵试验

配制组分浓度为分批培养液 4 倍的溶液 500 mL (pH 值不变), 平均分成两部分. 其中一部份用无菌水稀释至 2 L, 然后分装在 500 mL 的三角瓶中, 装液量为 45 mL. 灭菌、冷却、接种, 30 ℃ 摇瓶培养 (冲程 84 mm, 频率 100 次/分). 另一部分灭菌后留作补料用. 在第 48 h 补料 3 mL, 在第 72 h 和 96 h 各补料 2 mL, 发酵 200 h. 结果如图 5~7 所示. 菌体

量最大值为 28.5 g/L, 比原来下降了 18.6%. 在核黄素合成的高峰期, 溶液的粘度为 0.628 Pa·s, 比原来有所下降, 体积传氧系数有所提高. 虽然菌体量下降了, 但菌体膨大期延长了. 发酵至 192 h, 核黄素的产量达 8.14 g/L, 比原来提高了 25% 左右.

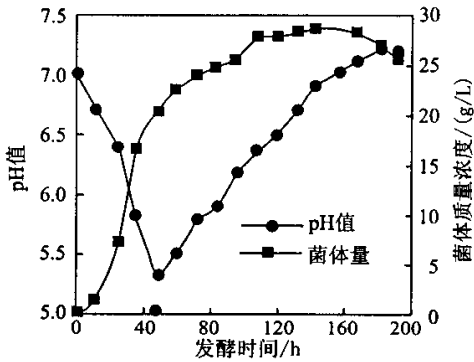


图 5 pH 值和菌体量随时间的变化

Fig. 5 The Change of pH and biomass vs. time

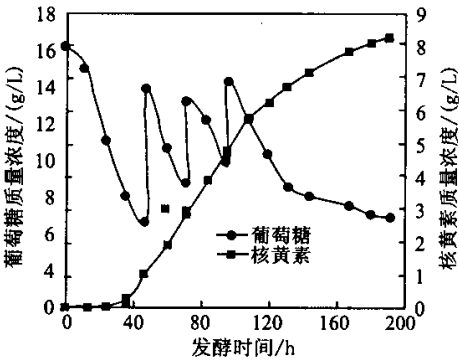


图 6 葡萄糖和核黄素质量浓度随时间的变化

Fig. 6 The change of concentration of saccharide and riboflavin vs. time

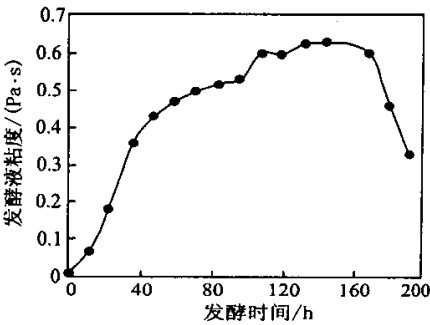


图 7 发酵液粘度随时间的变化

Fig. 7 The change of viscosity vs. time

2.4 小罐补料发酵试验

配制浓度为分批发酵培养液 1/2 的 *E. ashbyii* 培养液 12 L, 灭菌、冷却, 接种在 20 L 小型发酵罐中进行搅拌通气培养, 发酵液的通气量为 0.014 ~ 0.02 m³/(s·m³), 搅拌转速为 450 ~ 550 r/min. 分别在 40 h、60 h 和 80 h 补料 3 次. 补料液的浓度是分

批培养液的 4 倍.结果如图 8 和图 9 所示 :

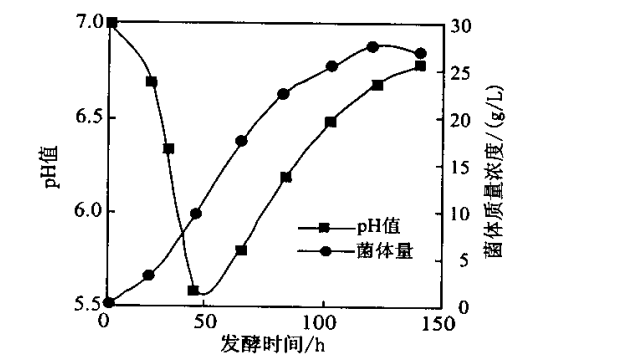


图 8 pH 值和菌体量随时间的变化

Fig.8 The change of pH and biomass vs. time

发酵 140 h 核黄素的质量浓度达 56 g/L ,发酵液的最高粘度为 0.620 Pa·s ,此时溶液的溶氧质量分数为 0.42 mg/kg .若采用不补料发酵 ,培养液浓度与摇瓶分批培养液相等 ,即使把搅拌转速调到 600 r/min ,发酵液的通气量调至 0.024 m³/(s·m³) 通风供氧仍显得困难 ,在最高粘度时溶液的溶氧仅为 0.23 mg/kg ,而在此条件下测得 Na₂SO₃ 溶液的体积传氧系数 K_{la} 高达 1 000/h 左右.虽然大罐氧的利用率比小罐高 ,但是采用不补料发酵高浓度培

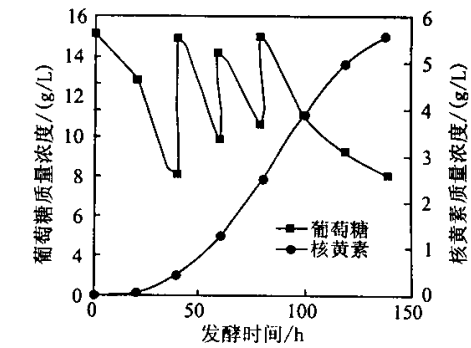


图 9 葡萄糖和核黄素质量浓度随时间的变化

Fig.9 The Change of concentrations of saccharide and riboflavin vs. time

养 *E. ashbyii* 生产核黄素对于实际使用的发酵设备来说仍存在着较大的困难.

3 结 论

采用低浓度培养液培养 *E. ashbyii* ,然后根据培养液 pH 值的变化进行多次适量补料 ,不仅可以控制菌体的过度增殖 ,缓解供氧困难 ,而且还有利于提高核黄素的产量 ,对实际生产具有指导意义.

参考文献

[1] 无锡轻工业学院等编.工业发酵(下册) [M].北京 :财政经济出版社 ,1960.
[2] 蔡辉益编.家禽营养需要 [M].北京 :中国农业出版社 ,1994.
[3] 蔡武城,袁厚积主编.生物物质常用分析方法 [M].北京 :科学出版社 ,1982.
[4] 张龙翔.生化试验方法与技术 [M].北京 :高等教育出版社 ,1981.
[5] 余俊红.阿氏假囊酵母发酵核黄素工艺条件的研究 [D].无锡 :无锡轻工大学 ,1996.
[6] 俞俊棠,唐孝宣编.生物工艺学(下册) [M].上海 :华东化工学院出版社 ,1992.

(责任编辑 朱 明)