

文章编号:1673-1689(2008)05-0039-06

基于高密度培养的两阶段发酵技术 生产热凝胶的研究

马立伟^{1,2}, 詹晓北^{*1,2}, 吴剑荣^{1,2}

(1. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122)

摘 要: 根据热凝胶发酵过程中不同时间和空间对氧传质的不同需求, 实施两阶段发酵工艺: 第 1 阶段在种子罐中实施高密度培养, 第 2 阶段在 2 级发酵罐中稀释细胞密度, 使微生物直接进入产胶阶段, 同时解除氧传质对产热凝胶的限制作用, 达到高强度发酵生产热凝胶的目的。通过对两阶段发酵工艺的构建和优化, 结果表明该工艺较好地满足菌体生长和热凝胶合成对营养和氧传质的不同要求, 热凝胶产量达到 66 g/L, 相对于分批发酵工艺产胶量提高了 106%, 比产胶速率提高了 20%, 并且在菌体生长阶段发酵规模比分批发酵缩小了 75%, 因此节约了能量, 降低了功率消耗。

关键词: 粪产碱杆菌, 热凝胶; 两阶段发酵; 高密度培养

中图分类号: Q 815

文献标识码: A

Curdlan Production by a Two-stage Fermentation Process with High Cell Density Cultivation

MA Li-wei^{1,2}, ZHAN Xiao-bei^{*1,2}, WU Jian-rong^{1,2}

(1. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China;
2. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: A two-stage fermentation process was established based on the different oxygen transfer demand during the curdlan fermentation. Firstly, high cell density culture was performed in the inoculant fermenter. Secondly, inoculant cultures were diluted into the next larger fermenter for curdlan production, in which glucose was fed as sole carbon source. The results showed that the fermentation strategy could meet the oxygen and nutrients requirements for cell growth and curdlan production. A yield of 66 g/L curdlan was achieved, higher 106% than that of batch fermentation. The specific production rate was improved by 20% and the fermentation volume was reduced by 75% than those of batch fermentation. Meanwhile, the power consumption was reduced obviously in the cell culture stage.

Key words: *Alcaligenes faecalis*; curdlan; two-stage fermentation; high cell density culture

收稿日期: 2008-08-25.

基金项目: 国家 863 计划项目(2006AA02Z207).

作者简介: 马立伟(1984-), 男, 江苏南京人, 发酵工程硕士研究生.

* 通讯作者: 詹晓北(1962-), 男, 北京人, 教授, 博士生导师. 主要从事微生物多糖和生物反应器方面的研究.

Email: xbzhan@jiangnan.edu.cn

热凝胶是由粪产碱杆菌(*Alcaligenes faecalis* var. *myxogene*)在氮源限制条件下生成的胞外多糖,是一种水不溶性的 β -(1,3)-D-葡聚糖,具有独特的热成胶特性,在食品中具有广泛的应用^[1]。

国内外关于热凝胶生产的研究主要集中在营养物质添加、pH值控制、搅拌速度和反应器设计对热凝胶产量的影响^[2,3,4,5]。热凝胶是一种典型的非生长偶联性产物, Lee 等人^[6]提出了结合 pH 值控制和提高生物量的两阶段发酵观点,首先通过调节氮源的数量来控制菌体浓度,接着进行热凝胶发酵。本实验室前期研究^[7]是通过提高分批发酵中初始 NH_4Cl 浓度的办法来提高生物量,从而提高热凝胶的产量;然而过高的 NH_4Cl 浓度会不利于细菌的生长,发酵液中残留的铵离子,还会抑制热凝胶的合成。

微生物多糖发酵属于高粘度发酵,在发酵过程中产生的高传氧阻力限制了高密度发酵技术在发酵过程中的直接应用,但由于大部分微生物多糖均属于次级代谢产物,若将微生物细胞培养与多糖合成分为两个阶段进行,第1阶段在种子罐中以低 C/N 营养条件促进快速高密度培养微生物,第2阶段在二级发酵罐中稀释细胞后以高 C/N^[8] 营养条件高强度生产微生物多糖,使细菌直接进入产胶期,既解除发酵体系高传氧阻力与细胞高耗氧需求的矛盾,又满足微生物多糖合成阶段与菌体生长阶段的不同营养需求。采用在不同规模发酵罐中实施的两阶段发酵工艺,一方面将减少菌体培养阶段的设备规模,节省大型发酵罐在发酵过程中的功率消耗和能量消耗,另一方面将提高细胞培养和多糖合成的生产强度,使生产过程达到节能降耗的目的。

1 材料与方法

1.1 菌种

粪产碱杆菌 WX-C12 (*Alcaligenes faecalis* var. *myxogene*),由江南大学生化工程实验室保存。

1.2 培养基

1.2.1 斜面培养基(g/L) 葡萄糖 40,酵母膏 5,琼脂 20, CaCO_3 10; pH 7.0~7.2。

1.2.2 摇瓶种子培养基(g/L) 葡萄糖 20,酵母膏 10, KH_2PO_4 1.74, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.49; pH 值 7.0。

1.2.3 摇瓶发酵培养基(g/L) 葡萄糖 50,酵母粉 1, KH_2PO_4 2.7, K_2HPO_4 1.7, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5; 无机盐浓缩液体积分数 1%, pH 值 7.0~7.2。

1.2.4 分批发酵培养基(g/L) 葡萄糖 80,酵母膏

2.0, NH_4Cl 3.6, KH_2PO_4 2.0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5; 无机盐浓缩液体积分数 1%, pH 值 7.0~7.2。

1.2.5 无机盐浓缩液(g/L) FeCl_3 1.0, MnCl_2 1.0, NaCl 1.0, CaCl_2 1.0。

1.2.6 两阶段发酵法的培养基组成:

1) 种子罐培养基(g/L): 葡萄糖 15,酵母膏 1.0, NH_4Cl 0.5, KH_2PO_4 2.5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, 无机盐浓缩液体积分数 0.3%, pH 值 7.0。

2) 种子罐补料液: 葡萄糖 400 g/L, 氨水体积分数 5%。

1.2.7 二级发酵罐培养基 葡萄糖 30,酵母膏 1.0, KH_2PO_4 0.5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5; 无机盐浓缩液体积分数 0.3%, pH 值 6.0。

1.2.8 二级发酵罐补料液 葡萄糖 500 g/L。

1.3 实验方法

1.3.1 种子培养 将一环活化好的斜面种子接入装有种子培养基 100 mL 的 500 mL 的三角瓶中, 30 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 摇床培养 18 h。

1.3.2 分批发酵 将 500 mL 二级种子液, 接入装有 8 L 分批发酵培养基的 15 L 的发酵罐(Bioengineering NLF)中, 发酵温度为 30 $^{\circ}\text{C}$, 搅拌转速为 600 r/min, 气体流量为 1.5 L/(L $\cdot$ min), 罐压 1.5×10^5 Pa, 通过 3 mol/L NaOH 将 pH 值维持在 7.0, NH_4Cl 消耗结束时, 用 3 mol/L HCl 调 pH 值至 5.6 并保持恒定。

1.3.3 两阶段发酵法 两阶段发酵流程见图 1。

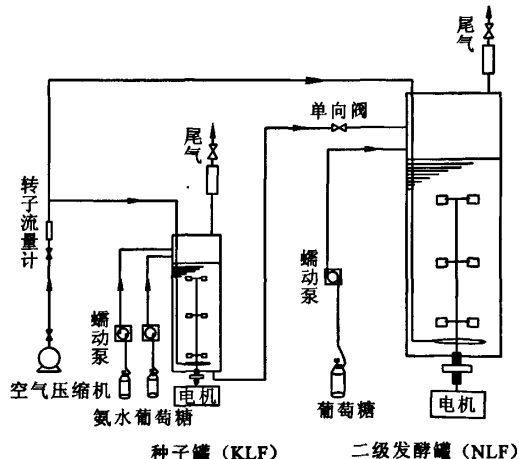


图1 两阶段发酵流程示意图

Fig.1 Schematic of the two-stage system for curd fermentation

种子罐发酵条件: 将 100 mL 二级种子液, 接入装有 1.7 L 种子罐培养基的 3 L 的发酵罐(Bioengineering KLF)中, 发酵温度为 30 $^{\circ}\text{C}$, 初始搅拌转速

为 400 r/min, 气体流量为 1.5 L/(L·min), 罐压 1.5×10^5 Pa, 氨水(氮源)自动流加控制 pH 值在 7.0。当 DO 值迅速上升, 意味着葡萄糖耗尽, 开始流加种子罐补料液, 发酵过程中通过提高转速来增加溶氧使 DO 值维持在 10% 以上。

二级发酵罐发酵条件: 将第 1 阶段的种子液泵入装有一定发酵培养基的 25 L 二级发酵罐(Bioengineering NLF)中, 初始葡萄糖浓度为 30 g/L, 发酵温度为 30 ℃, 发酵过程中通过 4 mol/L NaOH 和 3 mol/L HCl 将 pH 维持在 5.6, 搅拌转速为 400 r/min, 气体流量为 1 L/(L·min), 罐压 4×10^4 Pa, 当葡萄糖浓度低于 10 g/L 时, 流加发酵补料液。

1.4 测定方法

1.4.1 热凝胶含量测定 参见文献[4]。

1.4.2 菌体干重的测定 参见文献[4]。

1.4.3 葡萄糖浓度测定 3,5-二硝基水杨酸法(DNS 法)[9]。

1.4.4 铵氮浓度测定 水杨酸钠-次氯酸钠比色法[10]。

1.4.5 溶氧监测 通过 Bioengineering 自动控制发酵罐上所配备的溶氧电极在线记录。

2 结果与讨论

2.1 热凝胶分批发酵过程

热凝胶的分批发酵过程可分为两个阶段: 细菌生长期和热凝胶合成期。采取两阶段 pH 值控制法进行热凝胶发酵[4], 菌体生长期通过 3 mol/L NaOH 将 pH 维持在 7.0, 热凝胶合成期通过 3 mol/L HCl 将 pH 值维持在 5.6。图 1 表示的是热凝胶分批发酵的过程曲线, 从图中可见, 热凝胶发酵过程中菌体生长和热凝胶合成是非偶联的。整个发酵过程可以分为两个阶段: 前 16 h 是菌体生长期, 16 h 后 NH_4Cl 被消耗殆尽, 热凝胶开始合成, 至发酵结束是热凝胶合成期。在菌体生长期, NH_4Cl 作为氮源被迅速利用, 菌体快速生长, 溶氧直线下降, 由于铵离子作为氮源被菌体利用而释放出质子以及发酵过程中产生有机酸, 培养液中的 pH 值也迅速下降, 这时通过流加碱液的办法将 pH 值维持在 7.0(菌体生长最适 pH); 16 h 左右, 氯化铵被消耗殆尽, 菌体浓度达到最大值, 溶氧降至最低点, 菌体生长结束。此后进入热凝胶合成期, 由于在这一时期内菌体对氧气的需求低于生长期, 溶氧开始上升并保持质量分数在 80% 左右, pH 值通过流加 HCl 稳定在 5.6。110 h 左右, 热凝胶产量达到了 32 g/L, 葡萄糖转化率为 40%。

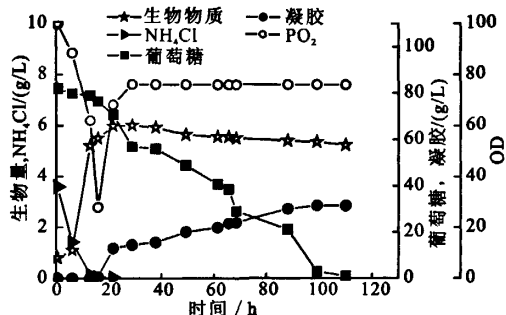


图2 热凝胶分批发酵过程曲线

Fig. 2 Time courses of curdlian fermentation

2.2 种子罐中粪产碱杆菌高密度培养方法的比较

生物量是合成热凝胶的基础, 一些文献也报道认为较高生物量对热凝胶合成有利[7]。本研究利用粪产碱杆菌的生长与热凝胶的生产是非偶联的特点, 提出了两阶段发酵法生产热凝胶: 第1阶段是利用种子罐进行粪产碱杆菌的高细胞密度培养, 在细胞生长期, 通过流加氨水的方法将 pH 值维持在最适值 7.0, 并提供无机氮源, 溶氧的变化可以反映碳源消耗情况。当碳源消耗殆尽, 细胞呼吸停止时, 溶氧会突然上升。实验中比较了 3 种补料分批发酵方式(fed-batch1, fed-batch2, fed-batch3)对粪产碱杆菌的培养效果, 实验方法如表 1 所示。

图 3-a 所示的是 3 种补料分批发酵方式对菌体生长的影响。在菌体生长阶段(0~22 h), 通过葡萄糖恒速流加(fed-batch3)的方法得到的菌体质量浓度明显高于其他两种补料分批方式(fed-batch1, fed-batch2)和分批培养(batch)。在培养 22 h 左右, 恒速流加葡萄糖(fed-batch3)的方法得到的菌体质量浓度在 27 g/L 左右, 而在同一时间, 使用葡萄糖一次性添加(fed-batch1)的方法, 得到的菌体质量浓度为 18 g/L, 同分批培养(batch)时的细胞质量浓度只有 6 g/L 相比, 都有较大提高。

图 3-b 反映的是菌体生长过程中葡萄糖浓度的变化。通过将葡萄糖流加的方法(fed-batch2, fed-batch3)可以将残糖控制在一个较低的水平。由于在葡萄糖一次性添加(fed-batch1)及分批发酵的方式中, 葡萄糖处于较高的浓度, 导致葡萄糖效应的发生而不利于菌体的生长。

图 3-c 反映的是菌体培养过程中 NH_4^+ 浓度的变化, 可以看出采取流加氨水的方法来提供无机氮源可以将 NH_4^+ 维持在一个较低的水平, 同一次性加入 NH_4Cl 的分批发酵(batch)相比, 可以有效减小 NH_4^+ 对菌体生长的抑制作用, 实现菌体的快速增长。

图 3-d 表示的是这 3 种方式下的比生长速率的

变化。初始糖质量浓度为 15 g/L 的补料分批发酵有着较高的比生长速率,而在分批发酵过程中(batch)过高的葡萄糖浓度和 NH_4^+ 浓度抑制了菌体的快速增长。通过葡萄糖恒速流加(fed-batch3)的方式对粪产碱杆菌进行培养,在培养 22 h 后,菌体质量浓度达到 27 g/L,与分批发酵的相比(6 g/

L),提高了 4.5 倍,实现了粪产碱杆菌的高细胞密度培养。由于采取的是流加氨水的方式补充氮源, NH_4^+ 的存在使得粪产碱杆菌处于细胞生长阶段,通过第一阶段的种子罐细胞培养可以得到大量适合热凝胶发酵的粪产碱杆菌。

表 1 种子罐中采取的不同补料方式

Tab. 1 The various fed-batch methods in the seed fermenter

种子罐补料方式	初始葡萄糖 质量浓度/(g/L)	初始 NH_4Cl 质量浓度/(g/L)	流加补料液方式	
			葡萄糖补料液体积/mL	氨水体积分数 5%
分批培养(对照)	50	3.6	/	/
葡萄糖一次性添加	50	0.5	/	自动流加
葡萄糖间歇流加	15	0.5	12,16,19 各流加 90 mL	
自动流加葡萄糖恒速流加	15	0.5	12~22 h,27 mL/h	自动流加

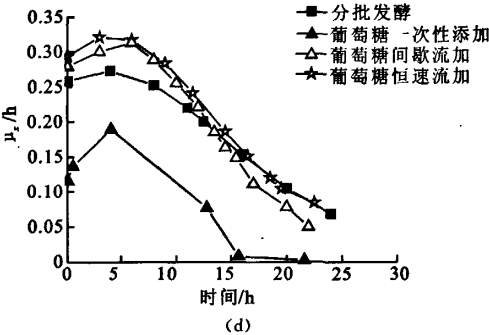
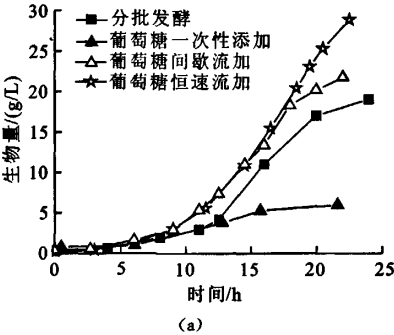


图 3 不同初始葡萄糖浓度及补料方式对菌体培养的影响

Fig. 3 Effect of initial glucose and feeding method on high-density culture of *A. faecalis*

2.3 二级发酵罐中不同生物量对热凝胶发酵的影响

影响热凝胶产量的主要因素是生物量,在比较了三种培养方式对菌体生长影响的基础上,我们确立了初始葡萄糖质量浓度为 15 g/L,当葡萄糖质量浓度低于 2 g/L 时,利用恒速流加葡萄糖的方法(fed-batch3)来实现粪产碱杆菌的高密度培养,培养 22 h,菌体质量浓度达 24 g/L。实验中通过在种子罐中实现高细胞密度培养的基础上,最终提高热凝胶的产量。由于热凝胶的生产分为两个阶段:菌体生长阶段(种子罐中进行)和产胶阶段(二级发酵罐中进行),所以在菌体生长阶段结束后,高浓度菌体被引入发酵罐,由于发酵罐中不存在氮源,菌体将迅速进入产胶阶段,进行热凝胶生产。结果如表 2 及图 4-a 所示,通过改变二级发酵罐培养基体积,得到的菌体质量浓度分别是 2.3、6、11 和 21.5 g/L。从表 2 中可以看出,随着菌体质量浓度的增加,

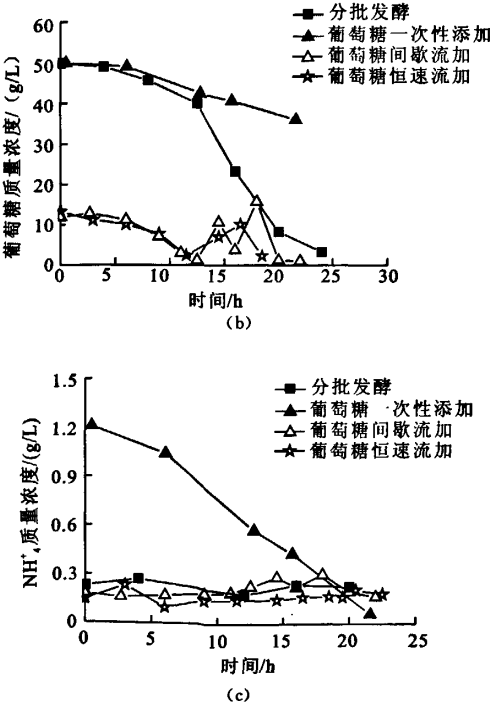


表 2 不同生物量下二级发酵罐中发酵过程的参数
Tab. 2 Time courses of curdian fermentation

发酵方式	种子罐体积/L	发酵罐体积/L	稀释倍数	生物量/(g/L)	热凝胶质量浓度/(g/L)	搅拌转速/(r/min)	通气量/(L·min)	葡萄糖消耗量/(g/L)	转化率(%)
两阶段发酵	2	20	10	2.3	25	400	1.5	56.2	39.3
	2	8	4	6	55	400	1.5	140	38.6
	2	5	2.5	11	66	600	1.5	180	36.5
	2	2.5	1.2	21.5	33	900	2	170	19.4
分批发酵	—	8	—	6	32	600	1.5	80	40

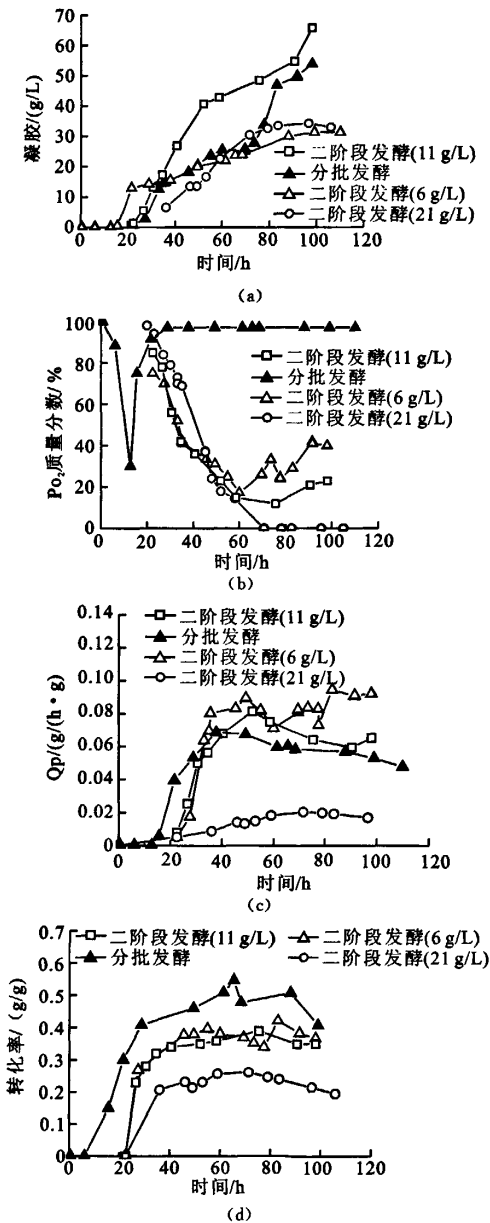


图 4 不同生物量对二级发酵罐中热凝胶发酵的影响
Fig. 4 Effect of different biomass on the curdian production in the second fermenter

热凝胶的产量也在增加,在菌体浓度为 11 g/L 时,热凝胶的产量达到最大,达到 66 g/L。然而,当进一步缩小二级发酵罐中培养基体积,继续提高二级发酵罐中菌体浓度时,热凝胶的产量反而下降(在菌体质量浓度为 21 g/L 时,热凝胶的产量为 33 g/L)。这其中可能由以下两个主要原因引起的:一是由于菌体浓度升高的同时,随着胞外多糖合成的进行,细胞周围的不溶性胞外多糖对氧气从液相中转移到细胞内造成了障碍,并且由于发酵液粘度的升高,使得发酵罐内氧传递受阻(如图 4-b),而热凝胶的生产菌高度需氧,氧传质受阻将影响胞内电子传递呼吸链生成 ATP,从而减缓了热凝胶的合成(UDP-葡萄糖是合成热凝胶的前体物质,合成 UDP-葡萄糖所需 UTP 是由 ATP 转化);另外一个可能原因是由于在生物量较高的情况下,用于细胞代谢维持消耗了过多的葡萄糖^[6]。

图 4-c 所示的是在热凝胶发酵过程中,在不同初始菌浓情况下,比产胶速率 Q_p (每克细菌每小时产热凝胶的质量, $g/(h \cdot g)$) 的比较。可以发现,通过改变种子罐和二级发酵罐培养基的 C/N 质量比(种子罐中低碳氮质量比,二级发酵罐中高 C/N),确实能够提高菌体的 Q_p 。在菌体质量浓度 6 g/L 时, Q_p 维持在 0.08 $g/(h \cdot g)$ 。在菌体浓度 11 g/L 时,开始时 Q_p 达到 0.08 $g/(h \cdot g)$,随着发酵的进行,逐渐下降到 0.06 $g/(h \cdot g)$ 左右,同分批发酵相比(0.06 $g/(h \cdot g)$)均有所提高。根据 Brooks D 等人的观点^[11],在发酵液中过高的葡萄糖底物,会一定程度上阻止细胞生长速度,并对多糖合成酶的数量形成抑制。因此,在菌体生长阶段的低 C/N 质量比环境有利于提高菌体的比产胶速率。在较高菌体质量浓度条件下(21 g/L),可能是细胞所需代谢维持较高,从而造成比产胶速率较低,这一点和 Lee 等人的报道相一致^[6]。

另外,在两阶段发酵法中(图 4-d),随着菌体浓度的提高,热凝胶对葡萄糖的转化率有所下降,这

可能与两方面原因有关,一是由于发酵环境突然改变的影响;另一方面原因就是由于随着菌体浓度的提高,发酵液粘度的增加,溶解氧不足。

3 结 语

氮源限制是刺激热凝胶生产最重要的手段,在两阶段发酵法中,在菌体生长阶段(种子罐中进行),使用流加氨水提供氮源可以使发酵液中残氮(NH_4^+)含量一直维持较适宜质量浓度(0.2 g/L),有利于菌体的快速生长,同时可以避免氮源在培养基中积累,有利于后期热凝胶的合成。葡萄糖采用流加的方法可以使发酵液维持较低的葡萄糖浓度,可以有效地去除葡萄糖对细胞内某些酶的合成阻

碍。在两阶段发酵法的第2阶段(二级发酵罐中进行),通过提供一个较高葡萄糖浓度,氮源限制的环境,使得热凝胶产量和生产强度得到提高。在菌体质量浓度为11 g/L时,热凝胶产量达到66 g/L,比分批发酵(菌体质量浓度6 g/L,热凝胶产量32 g/L)增加了106%。并且在两阶段发酵法中,通过在种子罐中进行菌体培养(培养体积2 L),二级发酵罐进行热凝胶发酵(发酵体积8 L,生物量为6 g/L),同普通的分批发酵相比(发酵体积8 L,生物量为6 g/L),在细胞培养阶段缩小了培养体积达75%,节约了能耗。同时也看到两阶段发酵工艺中,热凝胶对葡萄糖的转化率有所下降,这是热凝胶生产的一种新工艺,有指导实际生产的意义。

参考文献(References):

- [1] Laroche C, Michaud P. New developments and prospective applications for β -(1,3) glucans[J]. *Recent Patents on Biotechnology*, 2007(1): 59-73.
- [2] Lee J H, Lee I Y. Optimization of uracil addition for curdlan production by *Agrobacterium sp*[J]. *Biotechnology Letters*, 2001, 23: 1131-1134.
- [3] Kim M K, Lee I Y, Lee J H, et al. Residual phosphate concentration under nitrogen-limiting conditions regulates curdlan production in *Agrobacterium species*[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2000, 25: 180-183.
- [4] 王磊, 詹晓北, 朱一晖, 等. pH 控制对热凝胶发酵的影响[J]. 生物工程学报, 2002, 18(5): 634-637.
WANG Lei, ZHAN Xiao-bei, ZHU Yi-hui, et al. Influence of control on the production of curdlan by *Alcaligenes faecalis* strain[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2002, 18(5): 634-637. (in Chinese)
- [5] Lee I Y, Kim M K, Lee J H, et al. Influence of agitation speed on production of curdlan by *Agrobacterium species*[J]. *Bioprocess Engineering*, 1999, 20: 283-287.
- [6] Lee I Y, Kim M K. Production of curdlan using sucrose or sugar cane molasses by two-step fed-batch cultivation of *Agrobacterium species*[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 1997, 18: 255-259.
- [7] 孙永生, 王磊, 詹晓北, 等. 氮源 NH_4Cl 浓度对粪产碱杆菌(*Alcaligenes faecalis*)发酵生产热凝胶的影响[J]. 生物工程学报, 2005, 21(2): 328-331.
SUN Yong-sheng, ZHAN Xiao-bei, WANG Lei, et al. Influence of nitrogen source NH_4Cl concentration on curdlan production in *Alcaligenes faecalis*[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2005, 21(2): 328-331. (in Chinese)
- [8] Lo Y M, Yang S T, Min D B. Effects of yeast extract and glucose on xanthan production and cell growth in batch culture of *Xanthomonas campestris*[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1997, 47: 689-694.
- [9] Miller G L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar[J]. *Analytical Chemistry*, 1959, 31: 426-428.
- [10] 张佳程, 骆承庠, 张丽娟, 等. 水杨酸钠-次氯酸钠比色法测定食品中总凯氏氮的研究[J]. 中国农业科学, 1999, 32(1): 85-88.
ZHANG Jia-cheng, LUO Cheng-xiang, et al. Study on salicylate-hypochlorite colorimetric determination of total kjeldahl nitrogen[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 1999, 32(1): 85-88. (in Chinese)
- [11] Church B D. Two staged continuous fermentation process for production of heteropolysaccharide, 美国专利: 858204[P], 1977-06-11.

(责任编辑: 杨 萌)