

文章编号:1673-1689(2008)05-0067-06

粪产碱杆菌在不同底物限制性条件下连续培养

史其峰^{1,2}, 詹晓北^{*1,2}, 郑志永^{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: 为了提高菌体阶段菌体的生长密度、对分批发酵有一些优化指导作用, 对菌体本身特性进行了研究。以葡萄糖、氯化铵分别为限制性底物, 对粪产碱杆菌进行了连续培养, 模拟了粪产碱杆菌在不同的营养条件下的发酵情况, 并对连续培养特性和动力学性质进行了分析。结果表明: 在葡萄糖限制条件下粪产碱杆菌的比生长速率与限制性底物浓度的关系符合 Monod 方程, 建立了相应的模型方程; 同时还建立了两种限制条件下的葡萄糖的消耗动力学模型; 并对两种限制条件下的维持系数、菌体产率进行了比较。比较表明: 葡萄糖限制对菌体产率的影响比氯化铵限制时大, 在氯化铵限制条件下菌体产率最大为 0.4 g/(h·L), 而葡萄糖限制条件下菌体产率最大只为 0.3 g/(h·L) 左右; 氯化铵限制条件下的维持系数是葡萄糖限制条件下的 2 倍, 说明发酵过程中主要的维持消耗是在产胶期热凝胶的合成过程中。

关键词: 粪产碱杆菌; 动力学; 连续培养; 热凝胶

中图分类号: Q 815

文献标识码: A

Continuous Cultivation of *Alcaligenes faecalis* in Medium Containing Different Sole Limited Substrates

SHI Qi-feng^{1,2}, ZHAN Xiao-bei^{*1,2}, ZHENG Zhi-yong^{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: In order to increase the density of cell and give more guides to optimization of batch fermentation, a Study on the characteristics of *Alcaligenes faecalis* should be carried out. In this paper, with continuous cultivation simulating fermentations in different nutritional conditions, continuous cultivation of *Alcaligenes faecalis* with glucose and ammonium chloride as a sole limited substrate were carried out respectively, and kinetics and characteristics of continuous cultivation were investigated. The experimental results showed that Monod equation can express the relationship between the specific growth rate and the glucose concentration under limited glucose, and then model equation was built. Besides, under two sole limited substrates, model equations of glucose consumption were built and comparison of the biomass yield, the growth

收稿日期: 2008-07-11.

基金项目: 国家 863 计划项目(2006AA02Z207), 国家自然科学基金项目(20676055).

作者简介: 史其峰(1984-), 男, 安徽宿松人, 生物化工硕士研究生.

* 通讯作者: 詹晓北(1962-), 男, 北京人, 工学博士, 教授, 博士生导师. 主要从事生化工程的研究. Email: xbzhan@jiangnan.edu.cn

maintenance coefficient were carried out. The comparison showed that the biomass yield under limited glucose, 0.3 g/(h L), is smaller than that under limited ammonium chloride, 0.4 g/(h L). And the growth maintenance coefficient under limited glucose is two times than that under limited ammonium chloride. So the glucose consumption for maintenance is mainly in the stage for curdlan production.

Key words: *Alcaligenes faecalis*; kinetics; continuous cultivation; curdlan

热凝胶(Curdlan)又称凝结多糖、凝乳糖,是继黄原胶、结冷胶之后又一种新型的微生物发酵生产的多糖^[1],它是一种直链结构的 β -1,3-葡聚糖。一般由粪产碱杆菌(*Alcaligenes faecalis* var. *myxogenes*)或土壤杆菌(*Agrobacterium species*)在氮源限制性培养基中发酵生产而得。1996年美国FDA批准热凝胶作为一种食品添加剂。由于热凝胶具有独特的流变学特性和热成胶性能,因此可作为食品成分用以生产果冻、新型减肥食品^[2]。其次它还可以减小混凝土组分的分凝作用,提高混凝土稳定性^[3]。在药物应用方面,热凝胶的胶体因为可以控制药物的扩散而作为药物的缓释剂^[4];热凝胶的硫酸酯还可以应用于抵抗HIV病毒的感染^[5]。

作者所在实验室前期的研究^[6]表明,粪产碱杆菌发酵生产热凝胶过程是一个典型的非生长偶联型过程,整个发酵过程可分为菌体生长期和产物合成期两个阶段。提高菌体阶段中菌体的生长密度,将有助于提高整个发酵过程中热凝胶的生产水平和生产强度。所以,为了提高菌体阶段菌体的生长密度、对分批发酵能有更多的优化指导,应该对粪产碱杆菌(*Alcaligenes faecalis*)在不同底物限制性条件下的生长特性进行研究。

作者在3 L全自动发酵罐中分别以葡萄糖和氯化铵作为限制性底物对粪产碱杆菌进行了连续培养研究。得到了粪产碱杆菌在两种限制条件下菌体产率、底物消耗的规律,估算得到了饱和常数、维持系数等连续培养的动力学参数,并进行了比较分析。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 粪产碱杆菌(*Alcaligenes faecalis* var. *myxogene*) WX-C12,由江南大学生化工程与反应器研究室保藏。

1.1.2 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。

1.1.3 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 7.0~

7.2。

1.1.4 碳源限制性培养基(g/L) 葡萄糖 10, 酵母膏 0.5, NH_4Cl 3.6, KH_2PO_4 2.0, 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%, 消泡剂 0.2 mL; pH 7.0~7.2。

1.1.5 氮源限制性培养基(g/L) 葡萄糖 10.5, 酵母膏 0.5, NH_4Cl 0.7, KH_2PO_4 2.0, 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%, 消泡剂 0.2 mL; pH 7.0~7.2。

1.2 培养方法与条件

1.2.1 种子培养 从活化的斜面菌种上挑取单菌落接入装有 100 mL 种子培养基的 500 mL 的锥形瓶中, 30 °C, 200 r/min 下摇床培养 18~19 h。

1.2.2 连续培养方法 将 100 mL 的种子按体积分数 5% 的接种量接入装有 2 L 发酵培养基的 3 L 容积 Bioengineering KLF2000 型自动控制发酵罐中, 30 °C 恒温培养, 连续培养期间使用 4 mol/L NaOH 控制 pH 在 7.0, 起始通气条件为 2.0 L/(L · min), 起始搅拌速度 600 r/min, 通过调节通气量和搅拌转速使整个恒化过程溶氧(DO)质量分数始终大于 20%。

1.2.3 连续培养实验装置 如图 1 所示, 实验中通过进料口处的蠕动泵来调控补料流量, 连续从出料口卸料, 以维持发酵罐内发酵液体积的恒定。

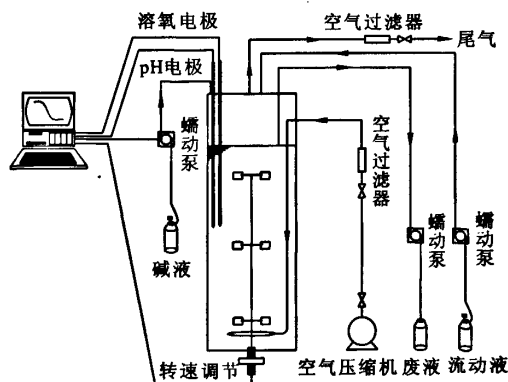


图1 粪产碱杆菌连续培养装置图

Fig.1 The apparatus of continuous culture of *A. faecalis*

1.3 分析方法

1.3.1 葡萄糖浓度的测定 二硝基水杨酸法^[7]。

1.3.2 NH_4Cl 浓度的测定 水杨酸钠-次氯酸钠比色法^[8]。

1.3.3 细胞浓度的测定 称干重法^[9]。

1.3.4 胶体浓度的测定 称干重法^[9]。

1.3.5 pH和溶氧测定 通过Bioengineering自动控制发酵罐配备的pH电极和溶氧电极在线测定。

1.3.6 连续培养拟稳态的确定 连续培养过程中只需3个参数指标连续12 h保持变化波动在5%范围内,即认为已经达到连续培养拟稳态状态。本实验通过离线参数菌体浓度、残糖浓度、残留 NH_4Cl 浓度以及在线参数溶氧连续4次(每4 h一次)取样测定结果波动在5%内时,即确定连续培养系统达到拟稳态状态。

2 结果与讨论

2.1 连续培养培养基中碳源和无机氮源需求比例的确定

热凝胶在氮源受限制时才能合成,在分批发酵过程中,当菌体生长至氮源消耗完毕时,发酵就会进入菌体产胶期阶段,因此氮源耗尽是产胶期到来的信号。在连续培养中,必须使培养基中某种底物成为限制性。先进行分批培养实验以确定菌体生长的营养需求比例,根据这种比例关系来确定连续培养基的组成。图2显示在分批培养菌体生长时葡萄糖和氯化铵的消耗情况。

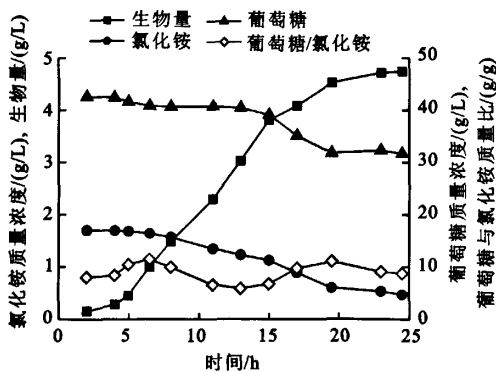


图2 分批培养下菌体生长阶段营养物趋势

Fig. 2 The trend of nutrient in cell growing stage of batch fermentation

从图2中可以计算出葡萄糖、氯化铵的质量需求比例是9:1。控制葡萄糖和氯化铵的质量比例小于9:1则可以做到以葡萄糖为限制性底物;控制葡萄糖和氯化铵的质量比例大于9:1则可以做到以氮源为限制性底物。所以此实验中葡萄糖限

制性连续培养的培养基组成是葡萄糖与氯化铵质量之比为3:1左右,小于9:1;氯化铵限制性连续培养的培养基组成是葡萄糖和氯化铵的质量比例为14:1左右,大于9:1。

2.2 不同底物限制性连续培养的营养物、产物的变化趋势

葡萄糖限制条件下的连续培养因为存在充足的氯化铵,所以只有菌体的生长,没有热凝胶的生成。如图3所示,葡萄糖限制条件下的葡萄糖在比生长速率较小的一段范围内维持在一个很低的水平,即处于限制性状态,当比生长速率大于0.12后,葡萄糖的质量浓度开始增大,这是由于培养的稀释度较大将菌体尚未利用的葡萄糖洗出,当稀释度增大为0.20时,葡萄糖质量浓度变化更大,比较接近洗出状态;而随着比生长速率的增大,对应的菌体量一直表现为递减的趋势,前期变化表现得比较平缓,后期下降的幅度增大。

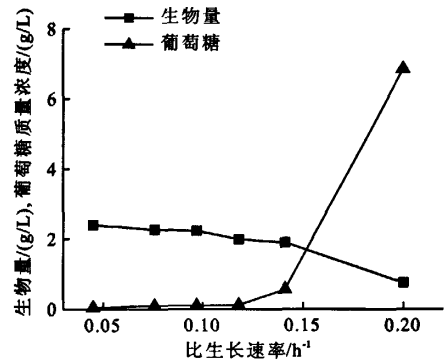


图3 葡萄糖限制条件下不同比生长速率对葡萄糖浓度、菌体量的影响

Fig. 3 Effect of different the specific growth on glucose and biomass under limited glucose

图4表示的是氯化铵限制条件下菌体量、热凝胶浓度以及胶体产率在不同比生长速率下的变化趋势。如图中所示,随着比生长速率的增大,菌体量、热凝胶浓度都呈现下降趋势,其中菌体量与葡萄糖限制条件下的菌体量变化趋势比较类似;热凝胶浓度与比生长速率成反比,其变化趋势与菌体量的变化趋势刚好相反,前期下降的幅度较大,后期下降幅度较小。而胶体产率则在较宽的比生长速率范围内恒定。

2.3 连续培养下动力学模型的建立及有关参数的估算

2.3.1 葡萄糖限制连续培养条件下菌体生长动力学模型 碳源作为限制性底物、产物抑制不明显的连续培养的情况下,Monod方程具有广泛的通用性。对粪产碱杆菌进行不同稀释度的连续培养,利

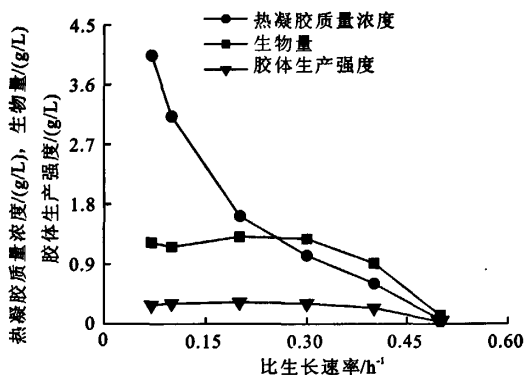


图4 氯化铵限制条件下菌体量、胶体浓度、胶体产率与比生长速率的关系

Fig. 4 The relationship between biomass, curdian, Curdian yield and specific growth under limited NH_4Cl

用L-B作图法求取参数^[10]。

从图5可以看出, $1/C_s$ 与 $1/\mu$ 成较好的线性相关性, 得 $1/C_s$ 与 $1/\mu$ 的拟合方程如图5所示。由拟合方程得 $\mu_{\max} = 0.227 \text{ (h}^{-1}\text{)}$, $K_s = 0.177 \text{ (g/L)}$ 。

因此, 粪产碱杆菌 *A. faecalis* 在葡萄糖限制性条件下的生长动力学模型为 $\mu = \frac{0.227C_s}{0.177 + C_s}$ 。

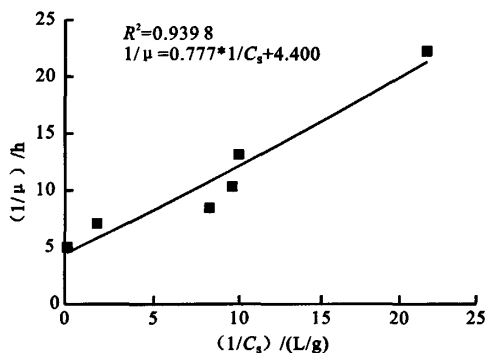


图5 葡萄糖限制条件下 $1/C_s$ 与 $1/\mu$ 关系图

Fig. 5 The relationship between $1/C_s$ and $1/\mu$ under limited glucose

2.3.2 不同底物限制性连续培养下维持系数的比较 细胞维持系数(m)是指细胞维持正常的生命活动所消耗的能量底物, 从细胞经济学角度来看, 由于维持生长的碳源是非生产碳源, 即维持系数的大小可作为评价菌株优劣的一个指标。维持系数越大, 说明菌体细胞用于维持的碳源比例越大, 而用于生长和生产产物的碳源比例相对就减少; 维持系数越小, 菌株则越具有高密度培养的潜力。

一般情况下, 能量底物的消耗, 主要是用于菌体细胞的组成、产物的合成, 以及细胞维持生命活动所需的能量维持这3个部分。由物料衡算得到

基质的消耗公式, 用比速率表示为

$$q_s = \frac{\mu}{Y_{x/s}} + m_s + \frac{q_p}{Y_{p/s}} \quad (2)$$

由于产热凝胶的粪产碱杆菌是菌体生长与产物合成非偶联型的, 在葡萄糖限制的连续培养中只有菌体生长, 则 $q_p = 0$, 公式(2)化简为

$$q_s = \frac{\mu}{Y_{x/s}} + m_s \quad (3)$$

由图6可以拟合出 q_s 与 μ 的拟合方程。得 $Y_{x/s} = 0.230 \text{ g/g}$; $m_s = 0.021 \text{ g/(h} \cdot \text{g)}$, 则葡萄糖限制条件下的葡萄糖消耗动力学模型为 $q_s = 4.338 \mu + 0.021$ 。

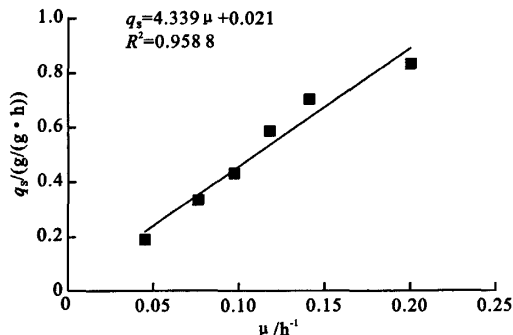


图6 葡萄糖限制条件不同比生长速率对葡萄糖比消耗速率的影响

Fig. 6 Effect of different the specific growth on the specific consumption rate of substrate under limited glucose

在氯化铵限制的连续培养中既有菌体的生长, 又有胶体的生成, 关系可由公式(2)表示, 其中理论产物得率系数 $Y_{p/s}$ 应为常数, Zheng 文献^[11]曾报道通过线性拟合的方法测得的 $Y_{p/s}$ 为 0.693 g/g , 而由 Luedeking-Piret 方程^[10]可得 $q_p = \beta$ 也为常数, 则方程(2)在氯化铵限制条件下可简化为 $q_s = \frac{\mu}{Y_{x/s}} + b$,

其中常数 $b = m_s + \frac{q_p}{Y_{p/s}}$ 。

由图7通过线性拟合的方法进行求解, 得到氯化铵限制连续培养条件下的有关参数 $Y_{x/s} = 0.256 \text{ g/g}$, $m_s = 0.048 \text{ g/(h} \cdot \text{g)}$ 。可以看出在氯化铵限制条件下虽然菌体的得率系数略有增大, 而维持系数却比葡萄糖限制条件下的大2倍左右, 此次实验的结果比 Phillips 等人^[12]报道的限制性底物为氮源的连续培养下的菌体维持系数是 $0.072 \text{ g/(h} \cdot \text{g)}$ 偏小; Zheng 等人^[11]报道的分批培养产胶阶段中菌体的维持系数是 $0.031 \text{ g/(h} \cdot \text{g)}$, 可见菌体产胶期中用于菌体维持所需的碳源比例更大, 分批发酵过程中维持碳源的消耗主要是用于热凝胶的合

成阶段。

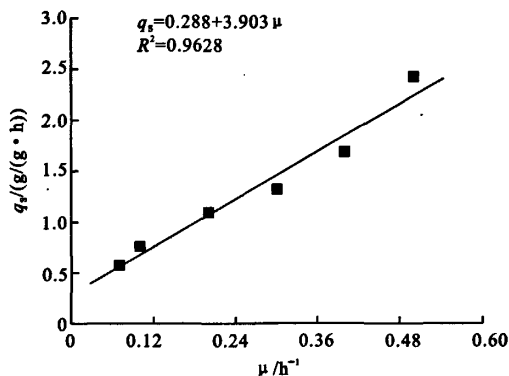


图7 氯化铵限制条件下不同比生长速率对葡萄糖比消耗速率的影响

Fig. 7 Effect of different the specific growth on the specific consumption rate of substrate under limited NH_4Cl

2.3.3 不同底物限制性连续培养下菌体产率的比较 在单级的CSTR中,细胞反应过程符合简单的Monod模型,一般都是以菌体产率 P_x 为优化的目标函数。

图8所示葡萄糖、氯化铵两种限制性连续培养中的菌体产率曲线都具有相同的变化趋势,前期增大后期减小,都存在一个最大值。在氯化铵限制条件下菌体产率最大可以达到 $0.4 \text{ g}/(\text{h} \cdot \text{L})$,而葡萄糖限制条件下的菌体产率表现得相对较低,最大只有 $0.3 \text{ g}/(\text{h} \cdot \text{L})$ 左右;菌体在葡萄糖限制条件下的比生长速率是较小的,这不利于菌体浓度的提高;在氯化铵限制条件下时较大,所以葡萄糖的限制条件对于菌体的比生长速率的影响相比之下显得更为明显。

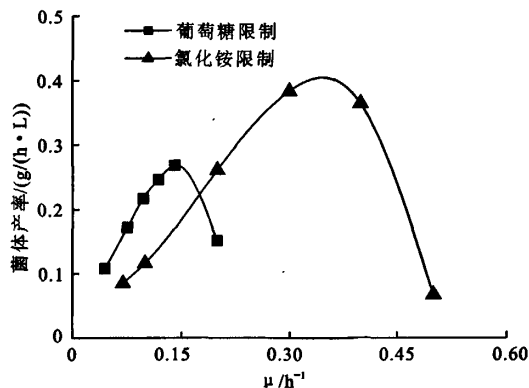


图8 不同限制性底物下菌体产率曲线

Fig. 8 The curves of biomass yield under different limited substrates

图9表示的是分批培养不同时间下的菌体产

量曲线。整个分批发酵在13 h的时候菌体产率为最大的 $0.407 \text{ g}/(\text{h} \cdot \text{L})$,然后从13 h到菌体停止生长23 h这个时间段内,菌体产率一直在降低,因此在分批发酵的过程中特别是在菌体生长期,维持氯化铵在一个低浓度水平能够保持较高的菌体产率。

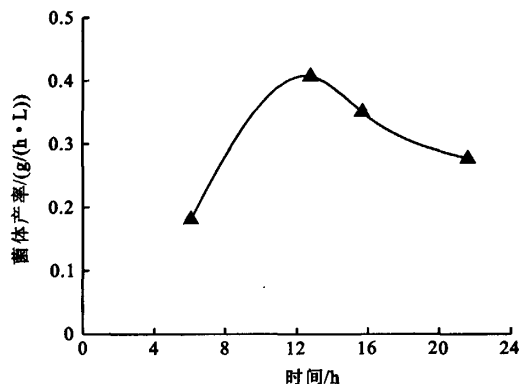


图9 分批培养下不同时间的菌体产率曲线

Fig. 9 The curve of biomass yield under different time in batch fermentation

因此在分批发酵的过程中特别是在菌体生长期,应该维持氯化铵在一个低浓度水平的同时,尽可能地提供充足的葡萄糖,使得菌体在一个高菌体产率条件下生长,但也不宜过高。葡萄糖过高时,除可能引起葡萄糖抑制外,还可能引起代谢副产物的增多。

由 Monod 方程和连续培养稳态时物料平衡式可得菌体的葡萄糖限制条件下的最大产率 $(P_x)_{\max}$ 以及对应的最适理论稀释率 D_{opt} 和最佳的加料速率 V_{opt} 。得到菌体的最大产率是 $0.366 \text{ g}/(\text{h} \cdot \text{L})$,对应的连续培养下的最佳稀释率和最佳的加料速率分别为 0.179 h^{-1} 和 $0.358 \text{ L}/\text{h}$ 。

3 结 语

利用连续培养对粪产碱杆菌(*A. faecalis*)生长特性进行了葡萄糖限制和氯化铵限制条件下的研究。

1)葡萄糖限制条件下的比生长速率 μ 与限制性底物葡萄糖的浓度 C_s 的关系符合 Monod 方程,其模型方程为 $\mu = 0.227C_s / (0.177 + C_s)$;葡萄糖的消耗动力学模型为 $q_s = 4.338\mu + 0.021$;菌体的最大产率 $(P_x)_{\max} = 0.366 \text{ g}/(\text{h} \cdot \text{L})$,对应的最佳稀释率为 $D_{\text{opt}} = 0.179 \text{ h}^{-1}$,最佳的加料速率 $V_{\text{opt}} = 0.358 \text{ L}/\text{h}$,氯化铵限制条件下的葡萄糖消耗动力学模型为 $q_s = 3.903\mu + 0.288$ 。

2)通过葡萄糖限制性条件下维持系数 0.021

$\text{g}/(\text{h} \cdot \text{g})$ 与氯化铵限制性条件下维持系数 0.048 $\text{g}/(\text{h} \cdot \text{g})$ 的比较,发现产胶期的维持系数比菌体生长期的维持系数大 2 倍左右,说明发酵过程中维持碳源的消耗主要是用于热凝胶的合成阶段。

3)结合两种底物限制条件下的菌体产率的分析结果,提出在发酵过程中菌体生长阶段维持低氮的同时,提供充足的葡萄糖的策略。即可以同时流加葡萄糖和氯化铵来控制菌体的比生长速率 μ ,从而达到发酵过程代谢调控和优化的目的。

附录:符号与公式说明

D 稀释速率, h^{-1}

D_{opt} 最适理论稀释率, h^{-1}

K_s 底物糖对菌体的饱和系数, g/L

R 线性相关系数

m_s 菌体的维持系数, $\text{g}/(\text{g} \cdot \text{h})$

C_s 限制性底物的质量浓度, g/L

μ 菌体的比生长速率, h^{-1}

$Y_{x/s}$ 菌体对物质的得率系数, g/g

μ_{max} 菌体的最大比生长速率, h^{-1}

q_s 底物的比消耗速率, $\text{g}/(\text{h} \cdot \text{g})$

$(P_x)_{\text{max}}$ 菌体的最大产率, $\text{g}/(\text{h} \cdot \text{L})$

q_p 胶体的比生成速率, $\text{g}/(\text{h} \cdot \text{g})$

参考文献(References):

- [1] Harada T, Masada K, Fujimori K, et al. Production of a firm, resilient gel-forming polysaccharide by a mutant of *Alcaligenes faecalis* var. myxogenes 10C3[J]. **Agricultural and Biological Chemistry**, 1966, 30(2):196—198.
- [2] Takeda Technical Report. Pureglucan: Basic Properties and Food Application[M]. Japan Osaka: Takeda Chemical Industries Ltd, 1997.
- [3] Haze A, Yamauota Y, Miyanagi K, et al. Preparation of a segregation-reducing agent for hydraulic composition; European Patent, 588665[P]. 1994-08-28.
- [4] Kanke M, Tanabe E, Katayama H, et al. Application of curdlan to controlled drug delivery: III. Drug release from sustained release suppositories in vitro[J]. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, 1995, 18:1154—1158.
- [5] Takeda H N, Neoh L P, Akimoto H, et al. Role of curdlan sulfate in binding of HIV-1 gp120 to CD4 molecules and the production of gp120-mediated TNF- α [J]. **Microbiology and Immunology**, 1997, 41:741—745.
- [6] 詹晓北, 韩杰, 李珍雨, 等. 一株粪产碱杆菌(*Alcaligenes faecalis*)产热凝胶的发酵条件[J]. 无锡轻工大学学报(食品与生物技术学报), 2001, 20(4):347—350.
ZHAN Xiao-bei, HAN Jie, LI Zen-yu, et al. The Fermentation conditions of curdlan by *Alcaligenes faecalis* strain[J]. **Journal of Wuxi University of Light Industry**, 2001, 20(4):347—350. (in Chinese)
- [7] Miller G L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar[J]. **Analytical Chemistry**, 1959, 31: 426—428.
- [8] 张佳程, 张丽娟. 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-chen, ZHANG Li-juan. Study on salicylate-hypochlorite colorimetric determination of total kjeldahl nitrogen [J]. **Scientia Agricultura Sinica**, 1999, 32(1):85—88. (in Chinese)
- [9] 王磊. 微生物多糖——热凝胶发酵工艺的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2002.
- [10] 戚以政, 王叔雄. 生化反应动力学与反应器[M]. 第2版. 北京: 化学工业出版社, 1999: 147—160.
- [11] Zheng Z Y, Lee J W, Zhan X B, et al. Effect of Metabolic Structures and Energy Requirements on Curdlan Production by *Alcaligenes faecalis*[J]. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, 2007(12):359—365.
- [12] Phillips K R, Lawford H G. Theoretical maximum and observed product yields associated with curdlan production by *Alcaligenes faecalis*[J]. **Canadian Journal of Microbiology**, 1983, 29:1270—1276.

(责任编辑:秦和平)