

# 核黄素产生菌 T<sub>30</sub>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,无锡 214036)

**摘要** 对核黄素产生菌 T<sub>30</sub>补料发酵进行了研究。结果表明,发酵液呈非牛顿特性,充足的溶氧是核黄素高产的关键。补料发酵可以提高核黄素的产量,补料以补糖为主,补单糖或双糖均可。补糖时间与发酵液的 pH值和菌体生长情况密切相关。发酵 48 h以后,控制发酵液的 pH值在 5.4~6.2之间,多次少量补糖,核黄素的产量可提高 20%~30%。经补糖发酵后,T<sub>30</sub>的核黄素产量可达 8 g/L以上。

**关键词** 核黄素;补料发酵;产量;阿氏假囊酵母

**分类号** TQ467.2

## 0 前 言

补料发酵是指在分批培养过程中间歇或连续地补加新鲜培养基的培养方法,是介于间歇发酵与连续发酵之间的一种发酵形式<sup>[1]</sup>。补料发酵可以使发酵液维持较低的基质浓度,解除高浓度底物的阻遏效应;菌体浓度保持在适当的范围内,不再加剧供氧的困难;减少培养基中有毒代谢物的积累。与连续发酵相比,补料发酵对发酵过程的无菌要求相对较低<sup>[2]</sup>。T<sub>30</sub>是丝状酵母,培养基过于丰富时会使菌体生长过于旺盛,发酵液非常粘稠,传质状况很差,不利于菌体的生存和代谢。另外,高浓度基质会引起碳分解代谢物的阻遏现象,形成阻遏产物。有关核黄素补料发酵的报导较多<sup>[3,4]</sup>,但效果明显的不多,所得的结论也不一致。由于核黄素发酵周期较长,发酵过程中的各种参数相互影响,而且均处于变化之中,必须针对生产菌种的代谢特性,研究菌体生长、基质消耗与产物形成之间的关系,联系生产实际,选择恰当的反馈参数,采用合适的方法进行补料,才能取得良好的效果。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

菌种: T<sub>30</sub>(属阿氏假囊酵母 *E. ashbyii*);

发酵培养液: 葡萄糖 30 g/L,骨胶 30 g/L,玉米浆 20 mL/L,豆油 30 mL/L,蛋白胨 5 g/L, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 3 g/L, NaCl 3 g/L, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.2 g/L, pH值 7.0~7.2;

补料用高浓糖液质量浓度: 500 g/L;

多组分补料液:按发酵用培养基中各组分的浓度比例配制的高浓培养液(豆油除外);  
 培养条件: 28~ 30℃, 往复式摇床,  $K_{La} \geq 410 \text{ h}^{-1}$  ( $\text{Na}_2\text{SO}_3$  氧化法测定);  
 接种量: 2% ~ 3% .

## 1.2 方法

核黄素含量测定: 分光光度法<sup>[5]</sup>;

菌体浓度测定: 干重法<sup>[6]</sup> (文中的菌体量和菌体浓度均以干重计);

糖含量测定: 费林定糖法<sup>[6]</sup> .

## 2 结果与讨论

### 2.1 补料预备试验

2.1.1 核黄素发酵进程曲线的测定 培养液接种  $T_{30}$ , 摇瓶发酵 200 h, 测得糖质量浓度、菌体量、pH值和核黄素产量等参数随时间的变化曲线。见图 1。

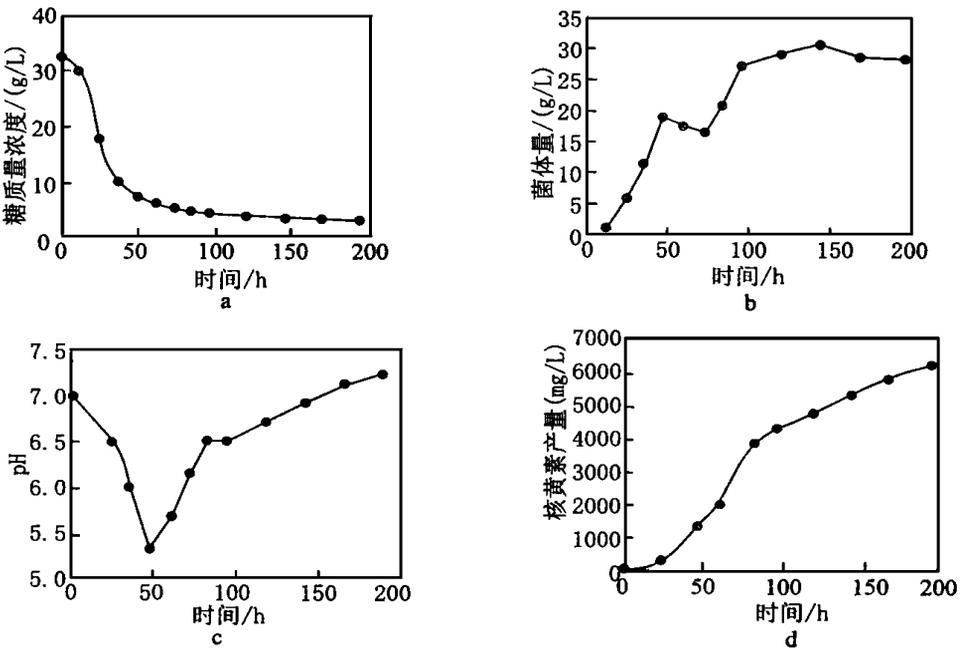


图 1 核黄素发酵曲线

糖质量浓度在前 30 h 内迅速下降, 62 h 基本消耗完全。在糖质量浓度迅速下降的同时, pH 值也随之下降, 42~ 45 h 时 pH 降至最低点 5.2, 随后开始回升, 至发酵第 8 天上升到最高值 7.2。菌体量在前 48 h 内迅速增加, 以后又有所下降, 在 120~ 160 h 菌浓处于平衡状态, 160 h 以后菌体量逐渐减少。发酵开始第 1 天没有核黄素产生, 30 h 后开始有核黄素合成, 48 h 以后合成速度大大加快, 到第 8 天达到最大值。发酵液的 pH 值由起始 7.0 下降到 5.2 的过程中会释放出较强的酸味, 用纸层析法的分析结果表明, 发酵过程中 pH 值下降是由于在培养液中积累了丙酮酸和少量甲酸、乙酸<sup>[7]</sup>。随着核黄素的不断积累和  $\text{NH}_4^+$  不断

产生,导致发酵液的 pH 值不断上升,在发酵后期可闻到明显的氨味,用 Nessler's 试剂检测也证实有氨放出

**2.1.2 pH 对菌体生长的影响** 接种  $T_{30}$  入不同 pH 值的种子培养液,培养 30 h 后,测定在不同 pH 值下获得的菌体生长量,见图 2

pH 值低于 5.0 时菌体生长基本趋于停止, pH 值低于 6.0 时菌体生长受抑制。

**2.1.3 补糖对核黄素产量的影响** 接种  $T_{30}$  入发酵培养液,分别在 24 h, 48 h 和 72 h 时用灭菌后的高浓糖液补糖 10 g/L,发酵 160 h,测得核黄素产量见表 1。

表 1 核黄素产量

补糖时间/h	核黄素产量/(mg/L)	增幅/%
对照	4456	
24	4400	-1.2
48	5320	19.4%
72	4590	3%

在发酵 48 h 时补糖,核黄素产量提高了 19.4%,效果比较明显。在 24 h 时和 72 h 时补糖,核黄素的产量基本没有变化。参照发酵进程曲线,在 24 h 时,糖质量浓度正在迅速下降, pH 值在 6.2 左右,菌体处于迅速生长期,所补的糖主要用于菌体生长。在 48 h 时糖降已结束, pH 值处于最低点 (5.0~5.2),菌体生长趋于停止,所补的糖用于合成核黄素的可能性较大,所以核黄素的产量会提高。在 72 h 时,发酵液的 pH 值又上升至 6.2 左右,所补的糖用于菌体的生长和呼吸氧化的可能性较大,所以最终的核黄素产量并不提高。

由上述实验结果可知: pH 值对 *E. ashbyii* 的生长及核黄素的合成均有显著影响,选择合适的发酵 pH 值必须既有利于菌体生长又有利于产物合成,而菌体生长的最适 pH 值与产物合成的最适 pH 值往往是不同的<sup>[6]</sup>。观察摇瓶试验获得的发酵进程曲线,发现菌体 *E. ashbyii* 合成核黄素较快的 pH 值区域为 5.4~6.2,所以补料工艺应根据这一特性,控制 pH 值在这个区域有较长的停留时间,使补料尽可能多地转化成核黄素。

在青霉素发酵中,有人曾对比了 2 种不同的控制 pH 值的方法,一种是根据生产菌种的代谢需要,通过改变加料速率来控制 pH 值,另一种是恒速补料, pH 值由加酸碱来进行调节。这二种情况的总加料量相同,但是采用按需补料控制 pH 值可获得持久的青霉素高产,最终比恒速补料的青霉素产量提高 25% 左右<sup>[8]</sup>。这个对比试验证明:控制发酵的理想途径应该根据菌体细胞的自身代谢需要通过逐步补料来实现。

另外,培养液中的溶氧,糖浓度和菌体浓度也是核黄素发酵的重要反馈参数,溶氧不足、糖浓度过高和菌体浓度过高均会导致发酵的失败<sup>[3]</sup>,所以在控制 pH 值的同时必须兼顾上述参数的变化和允许范围才能使发酵生产得以顺利进行。

## 2.2 摇瓶补料发酵试验

在 *E. ashbyii* 发酵过程中,补料时间和补料方式对核黄素的产量和菌体活力都有显著影响,如果补料时间选择不当,容易造成菌体浓度过高,供氧不足,导致菌体自溶。若一次补料太多,往往会造成 pH 值急剧下降,发酵液过酸,菌体活力大大降低,核黄素合成停止。只有在适当的 pH 值范围内,选择合适的时间,进行多次少量补料才能获得理想的效果<sup>[9]</sup>。

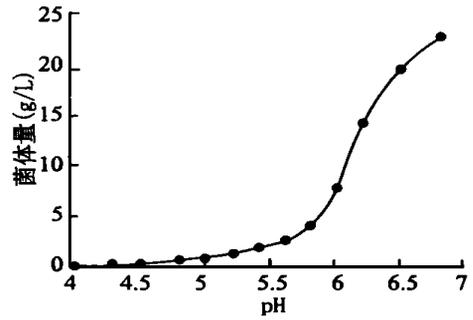


图 2 pH 值对菌体生长的影响

在发酵 48 h 时补糖,核黄素产量提高了 19.4%,效果比较明显。在 24 h 时和 72 h 时补糖,核黄素的产量基本没有变化。参照发酵进程曲线,在 24 h 时,糖质量浓度正在迅速下降, pH 值在 6.2 左右,菌体处于迅速生长期,所补的糖主要用于菌体生长。在 48 h 时糖降已结束, pH 值处于最低点 (5.0~5.2),菌体生长趋于停止,所补的糖用于合成核黄素的可能性较大,所以核黄素的产量会提高。在 72 h 时,发酵液的 pH 值又上升至 6.2 左右,所补的糖用于菌体的生长和呼吸氧化的可能性较大,所以最终的核黄素产量并不提高。

由上述实验结果可知: pH 值对 *E. ashbyii* 的生长及核黄素的合成均有显著影响,选择合适的发酵 pH 值必须既有利于菌体生长又有利于产物合成,而菌体生长的最适 pH 值与产物合成的最适 pH 值往往是不同的<sup>[6]</sup>。观察摇瓶试验获得的发酵进程曲线,发现菌体 *E. ashbyii* 合成核黄素较快的 pH 值区域为 5.4~6.2,所以补料工艺应根据这一特性,控制 pH 值在这个区域有较长的停留时间,使补料尽可能多地转化成核黄素。

在青霉素发酵中,有人曾对比了 2 种不同的控制 pH 值的方法,一种是根据生产菌种的代谢需要,通过改变加料速率来控制 pH 值,另一种是恒速补料, pH 值由加酸碱来进行调节。这二种情况的总加料量相同,但是采用按需补料控制 pH 值可获得持久的青霉素高产,最终比恒速补料的青霉素产量提高 25% 左右<sup>[8]</sup>。这个对比试验证明:控制发酵的理想途径应该根据菌体细胞的自身代谢需要通过逐步补料来实现。

另外,培养液中的溶氧,糖浓度和菌体浓度也是核黄素发酵的重要反馈参数,溶氧不足、糖浓度过高和菌体浓度过高均会导致发酵的失败<sup>[3]</sup>,所以在控制 pH 值的同时必须兼顾上述参数的变化和允许范围才能使发酵生产得以顺利进行。

另外,培养液中的溶氧,糖浓度和菌体浓度也是核黄素发酵的重要反馈参数,溶氧不足、糖浓度过高和菌体浓度过高均会导致发酵的失败<sup>[3]</sup>,所以在控制 pH 值的同时必须兼顾上述参数的变化和允许范围才能使发酵生产得以顺利进行。

在 *E. ashbyii* 发酵过程中,补料时间和补料方式对核黄素的产量和菌体活力都有显著影响,如果补料时间选择不当,容易造成菌体浓度过高,供氧不足,导致菌体自溶。若一次补料太多,往往会造成 pH 值急剧下降,发酵液过酸,菌体活力大大降低,核黄素合成停止。只有在适当的 pH 值范围内,选择合适的时间,进行多次少量补料才能获得理想的效果<sup>[9]</sup>。

**2.2.1 补糖发酵试验** 接种  $T_{30}$ 入发酵培养液,在 48 h 72 h和 96 h时各补糖 10 g/L,发酵 200 h,测得糖质量浓度、核黄素和菌体量随时间的变化如图 3,图 4所示。与对照样(不补糖发酵)相比,核黄素产量提高近 25%。

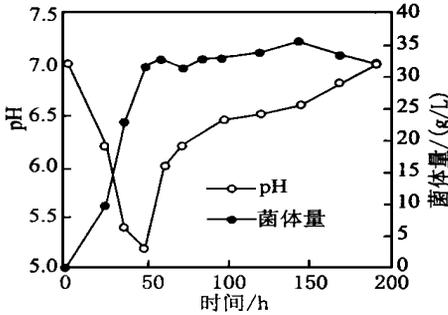


图 3 pH及菌体量的变化

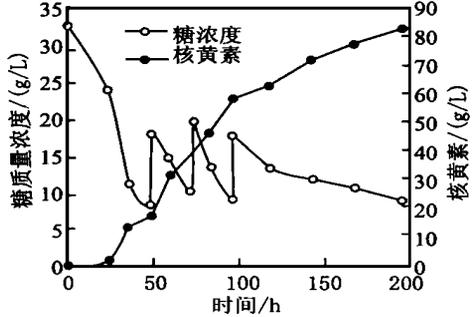


图 4 糖质量浓度及核黄素产量的变化

**2.2.2 多组分补料试验** 将发酵液作适当稀释(100 mL发酵液加 30 mL无菌水),以糖浓度为示踪参数(补料液是除豆油以外按培养基配比配制而成的高浓培养液,豆油预先一次性加入有利于提高核黄素的产量<sup>[6]</sup>),测定培养过程中的 pH值,菌体浓度和核黄素产量随时间的变化见图 5,图 6。

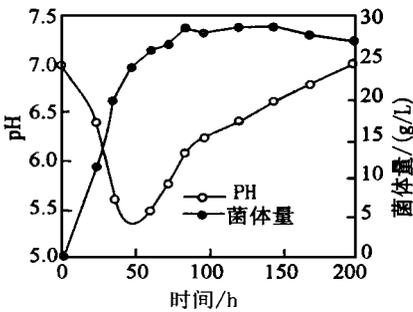


图 5 pH及菌体量的变化

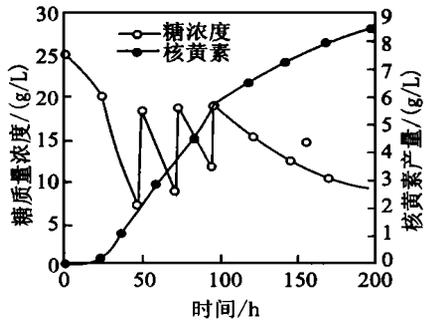


图 6 糖质量浓度及核黄素产量的变化

分批补料发酵把低 pH值区间扩展了近 30 h,最终的核黄素产量比一次性不补料发酵提高 30%左右,与补糖发酵的结果相差不多,但菌体浓度降低了,最高菌浓不超过 28.5 g/L,发酵液的粘度和单位体积发酵液的耗氧量均有明显降低,这对于保持菌体的活力和缓解设备通风供氧的困难都是极其有利的<sup>[5]</sup>。

**2.2.3 双糖补料发酵试验** 在摇瓶培养核黄素产生菌 *Eaw* 95.1时发现,用双糖代替部分葡萄糖可以提高核黄素的产量<sup>[9]</sup>。选用蔗糖和麦芽糖与葡萄糖作补糖对比试验,接种  $T_{30}$ ,摇瓶培养 200 h后测得最终核黄素产量见表 2。补蔗糖和麦芽糖和补葡萄糖的效果基本一致

表 2 补糖对比试验结果 g/L

补料液组分	葡萄糖	蔗糖	麦芽糖
核黄素	8235	8580	8640

### 3 结 论

- 1) 发酵液 pH 是重要的补料控制参数,对菌体生长和核黄素的合成均有显著影响。
- 2) 通过补料可以使发酵液的 pH 值控制在一个合适的范围内 (5.4~6.0),既能限制菌体的过度繁殖,又能维持菌体活力,促进产物合成。
- 3) 补料以补糖为主,但多组分限量补料可以控制菌浓,缓解供氧困难。
- 4) 多次补糖发酵比一次性投料发酵可提高核黄素产量 20%~30%, T<sub>30</sub>经补料发酵后,核黄素的产量可达 8 g/L 以上。

#### 参 考 文 献

- 1 华南工学院,大连轻工业学院编. 发酵工程与设备. 北京:轻工业出版社,1981
- 2 宫衡. 赖氨酸发酵的优化与控制的研究: [学位论文]. 无锡:无锡轻工大学,1994
- 3 焦瑞身,王文仲. 阿氏假囊酵母核黄素高产发酵的研究(II). 医药工业,1980,(10): 14~17
- 4 无锡轻工大学主编. 微生物学. 北京:轻工业出版社,1988
- 5 陆文清. 核黄素发酵及提取技术的研究: [学位论文]. 无锡:无锡轻工大学,1997
- 6 蔡武成,袁厚积主编. 生物物质常用分析方法. 北京:科学出版社,1982
- 7 乔成亚. 核黄素发酵与提取技术的研究. [学位论文]. 无锡:无锡轻工大学,1997
- 8 俞俊棠,唐孝宣主编. 生物工艺学(上册). 上海:华东化工学院出版社,1992
- 9 余俊红. 核黄素发酵工艺的研究. [学位论文]. 无锡:无锡轻工大学,1996

## Studies on the Feed-batch Fermentation by Riboflavin Producing Strain T<sub>30</sub>

Lu Wenqing Zhang Kechang Wu Peicong

(School of Biochemical Engineering, WuXi University of Light Industry, Wuxi 214036)

**Abstract** Riboflavin producing strain T<sub>30</sub> was a thread-like fungi which was high-oxygen demanded. Its fermentation broth was behaved as non-new toin characteristics. Sufficient oxygen in broth was quite critical for high productivity of riboflavin. Batch-feeding could improve riboflavin productivity. Sugar was the predominant component in feeding culture. There was no difference between feeding monosaccharide and disaccharide. The time for feeding was firmly associated with pH of the broth and microorganism growth. By controlling pH within the range of 5.4~6.2 after 48 hrs cultivation and feeding several times with a small amount of sugar each time, the riboflavin yields could be improved by 20%~30%. More than 8000mg/L of riboflavin in the broth could be obtained by batch-fed cultivating T<sub>30</sub>.

**Key words** riboflavin; batch-feeding fermentation; productivity; *E. ashbyii*

(责任编辑:陈 娇)