

文章编号 :1009-038X(2001)04-0347-04

一株粪产碱杆菌(*Alcaligenes faecalis*) 产热凝胶的发酵条件

詹晓北¹, 韩 杰¹, 李珍雨², 朱 莉³, 王 磊¹, 朱一晖¹

(1. 无锡轻工大学 工业生物技术教育部重点实验室,江苏 无锡 214036;2. Division of Biotechnology, Donga University, Pusan 604-714, Korea;3. 无锡轻工大学 中央研究所,江苏 无锡 214036)

摘 要:通过对一株粪产碱杆菌 WX-C12(*Alcaligenes faecalis*)的摇瓶发酵研究,确定了其最佳发酵培养基组成及最适摇瓶发酵工艺条件.摇瓶实验确定的最佳培养基组成为(g/L):葡萄糖 50, NH₄Cl 1.07, KH₂PO₄ 2.72, K₂HPO₄ 1.71, MgSO₄·7H₂O 0.49, 酵母膏 1, 少量无机盐溶液.最佳工艺条件为:初始 pH 7.0, 装液量为 60 mL/250 mL 摇瓶, 摇床转速为 220 r/min, 温度为 30 ℃. 15 L 自动机械搅拌罐放大试验结果表明,在不改变操作参数的情况下,经 60 h 发酵,热凝胶产量可达 2.2%, 转化率超过 50%.

关键词:产碱杆菌;热凝胶;发酵

中图分类号:TQ464.1

文献标识码:A

The Fermentation Conditions of Curdlan by *Alcaligenes faecalis* Strain

ZHAN Xiao-bei¹, HAN Jie¹, LI Zhen-yu², Zhu Li³, WANG Lei¹, ZHU Yi-hui¹

1. Key Laboratory of Industrial Biotechnology of Ministry of Education, Wuxi University of Light Industry, Wuxi 214036, China;2. Division of Biotechnology, Donga University, Pusan 604-714, Korea;3. Central Research Institute, Wuxi University of Light Industry, Wuxi 214036, China)

Abstract: With a strain of *Alcaligenes faecalis* WX-C12, the optimal medium and culture condition for curdlan production was investigated. The optimal medium was established as follows(g/L): glucose 50; NH₄Cl 1.07; KH₂PO₄ 2.72; K₂HPO₄ 1.71; MgSO₄·7H₂O 0.49; Yeast extract 1 and trace amount of salt solution. The optimal culture conditions were that: initial pH 7.0, volume 60 mL/250 mL, shaking speed 200 r/min, temperature 30 ℃. With this medium, batch culture was conducted in a 15 L fermentor equipped with sensing/control devices. After 60 hours fermentation, the production and yield of curdlan was 22 g/L and 50%, respectively.

Key words: *Alcaligenes faecalis*; curdlan; fermentation

收稿日期 2001-01-04; 修订日期 2001-04-21.
基金项目 江苏省科技攻关(国际合作)项目(BS99719)资助课题.
作者简介 詹晓北(1962-),男,北京人,工学硕士,副教授.

热凝胶(Curdlan)是一种新型的微生物胞外多糖,由 *Alcaligenes faecalis* var. *myxogenes* 发酵生产^[1],其分子式为($C_6H_{10}O_5$)_n,分子内由葡萄糖结构单元以 β -1,3-键连接.由于热凝胶具有独特的热成胶性能,在食品工业,特别是高温制作的食品领域具有广阔的应用前景.目前,热凝胶在日本已得到广泛的商业化研究,在美国、加拿大、英国、澳大利亚等国也都有报道^[2],但在我国尚未有生产方面的报道.1996 年,美国的 FDA 批准热凝胶作为一种食品添加剂应用,为热凝胶开辟了更为广阔的应用前景.作者对本实验室保藏的一株粪产碱杆菌 WX-C12(*Alcaligenes faecalis* var. *myxogenes*)进行了研究,确定了其最佳发酵培养基组成及发酵工艺条件,并进行了 15 L 自动机械搅拌罐的放大试验.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种 一株粪产碱杆菌 WX-C12 (*Alcaligenes faecalis* var. *myxogenes*),由无锡轻工大学生化工程实验室保藏.

1.1.2 斜面培养基(g/L) 葡萄糖 40,酵母膏 5, CaCO₃ 10,琼脂 20, pH 7.0.

1.1.3 种子培养基(g/L) 葡萄糖 20,酵母膏 10, CaCO₃ 3, pH 7.0.

1.1.4 发酵培养基(g/L) 葡萄糖 40,酵母膏 1, NH₄Cl 1.5, CaCO₃ 5,无机盐离子, pH 7.0~7.2, MgSO₄·7H₂O 0.5 g/L, KH₂PO₄ 2.72 g/L, K₂HPO₄ 1.71 g/L.

1.2 培养条件

1.2.1 种子培养 将一环活化好的斜面种子接入种子培养基,于 30℃,200 r/min 摇床培养 16~18 h.

1.2.2 摇瓶发酵 250 mL 三角瓶装 50 mL 培养基,以 5% 接种量接入培养好的液体种子,于 30℃,200 r/min 培养 3 d.

1.3 分析方法

1.3.1 热凝胶产量确定 5 mL 发酵液,于 7 000 r/min 离心 30 min,向离心得到的沉淀中添加一定浓度的 NaOH,搅拌使热凝胶充分溶解,离心,取上清液,用 HCl 调 pH 至中性,得到凝胶.离心,向沉淀中加蒸馏水洗涤、离心 3 次,在 85℃ 烘干至恒重,称重,计算产量.

1.3.2 菌体量的确定 按 1.3.1 的方法,向提取热凝胶后得到的沉淀中添加 5 mL 浓度为 1 mol/L 的

HCl,多次洗涤,烘干至恒重,称量.

2 结果与讨论

2.1 碳源种类对发酵的影响

在基础培养基中添加 4% 的不同种类的碳源,发酵结果如图 1 所示.

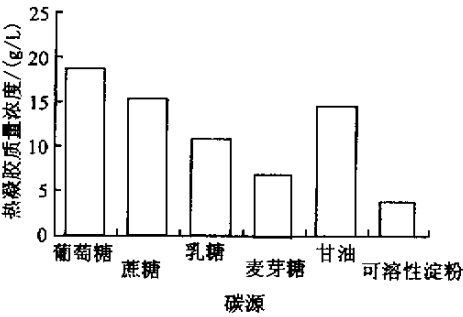


图 1 不同碳源对发酵的影响

Fig.1 Effects of various carbon sources on fermentation

可知,在所选的碳源中,葡萄糖、蔗糖、甘油可以获得较高的热凝胶产量,其中以葡萄糖为碳源时热凝胶产量最高,这是由于菌体优先利用葡萄糖参与到热凝胶的合成中.考虑到经济性及日后产业化的要求,确定葡萄糖为最佳碳源.

2.2 最佳碳源浓度的确定

在培养基中添加不同浓度的葡萄糖,发酵结果如图 2 所示.可以看出,葡萄糖质量浓度为 50 g/L 时热凝胶产量最高.在葡萄糖质量浓度较低时,由于碳源过早消耗完,影响到后期热凝胶的进一步合成,而较高浓度的葡萄糖则抑制了菌体生长及产物的合成.热凝胶产量较低,影响到最终产量.所以,最佳葡萄糖质量浓度为 50 g/L.

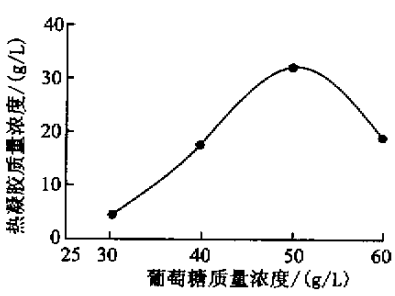


图 2 葡萄糖浓度对发酵的影响

Fig.2 Effect of glucose concentration on fermentation

2.3 氮源种类对发酵的影响

不同种类的无机氮源对发酵的影响见表 1.由表 1 可知,用 NH₄Cl 和 KNO₃ 为氮源时可获得较高的热凝胶产量,其它氮源发酵的产量都较低,这可能跟氮源被利用时 pH 变化从而引起代谢途径改变

有关. 发酵液加热后, 比较所得凝胶的强度可知, 以 NH_4Cl 为氮源时, 发酵液的热凝性明显优于其它氮源, 故选 NH_4Cl 为最佳无机氮源做进一步研究.

表 1 不同氮源对发酵的影响

氮 源	热凝胶产量/(g/L)
NH_4Cl	15.78
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	10.26
$(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$	5.32
$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	8.79
NH_4NO_3	4.53
$(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$	5.2
KNO_3	13.46
NaNO_3	10.64
草酸铵	8.65

2.4 最佳氮源质量浓度的确定

在培养基中添加不同浓度的 NH_4Cl , 发酵结果见图 3.

从图 3 可以看出, 当 NH_4Cl 质量浓度较低时, 产生菌体量较少, 热凝胶合成速率较慢, 导致发酵周期较长, 发酵产量较低. 随着 NH_4Cl 质量浓度的增加, 生成的菌体量增加, 热凝胶产量在 NH_4Cl 质量浓度为 1.1 g/L 时达到最高. 当 NH_4Cl 质量浓度继续升高时, 热凝胶产量反而下降, 这是由于用于菌体生长及维持菌体代谢消耗的碳源量过多, 从而影响到热凝胶的合成.

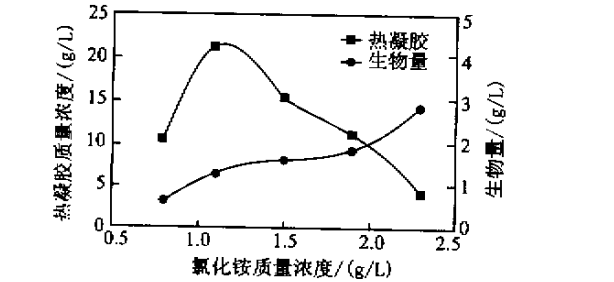


图 3 氯化铵质量浓度对发酵的影响

Fig.3 Effect of ammonium chloride concentration on fermentation

2.5 酵母膏添加量的确定

据文献 [3] 报道, 在培养基中添加少量酵母膏可以促进菌体的生长, 其中所含的生长因子对发酵后期产物的合成也有促进作用. 选取不同质量浓度的酵母膏作为有机氮源添加, 试验结果如图 4 所示.

可以看出, 当酵母膏的添加量为 1 g/L 时, 热凝胶产量最高. 酵母膏质量浓度的继续增加会导致菌体量的增加, 但热凝胶的产量反而下降.

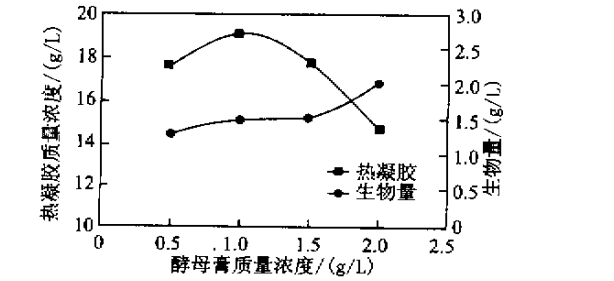


图 4 酵母膏添加量对发酵的影响

Fig.4 Effect of YE addition on fermentation

可以看出, 当酵母膏的添加量为 1 g/L 时, 热凝胶产量最高. 酵母膏质量浓度的继续增加会导致菌体量的增加, 但热凝胶的产量反而下降.

通过单因素实验, 初步确定培养基组成为: 葡萄糖 50 g/L, NH_4Cl 1.1 g/L, 酵母膏 1 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g/L, KH_2PO_4 2.72 g/L, K_2HPO_4 1.7 g/L. 以此培养基考察发酵条件的影响.

2.7 培养基初始 pH 值对发酵的影响

培养基的 pH 水平会对微生物的生长和产物的合成产生明显的影响, 因此考察了初始 pH 对发酵的影响. 结果见图 5. 由发酵结果可知, 不同的初始 pH 对热凝胶的产量影响较大. 起始 pH 在 7.0 时热凝胶产量最高, 当 pH 低于 6.5 或高于 9 时, 热凝胶产量较低. 在 pH 7.0 两侧, 随着 pH 减小, 热凝胶产量的下降程度要大于 pH 增加时热凝胶产量的下降, 因此当 pH 在一定范围内维持较高水平对热凝胶的合成有利.

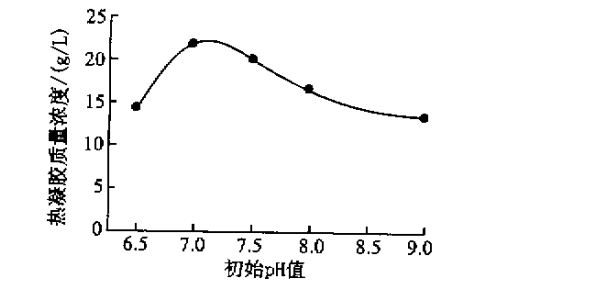


图 5 初始 pH 对发酵的影响

Fig.5 Effect of initial pH on fermentation

2.7 装液量对发酵的影响

在 250 mL 三角瓶中添加不同体积的培养基, 考察装液量对发酵的影响, 结果见图 6.

当装液量为 60 mL 时, 热凝胶产量最高. 装液量过小, 发酵液中溶氧过高, 菌体呼吸旺盛, 造成菌体过早衰亡, 影响后期对碳源的利用及产物的合成. 当装液量增加, 发酵液中溶氧水平降低至适当

范围,对产物的合成有利,过低的溶氧同样影响菌体的生长及产物合成.

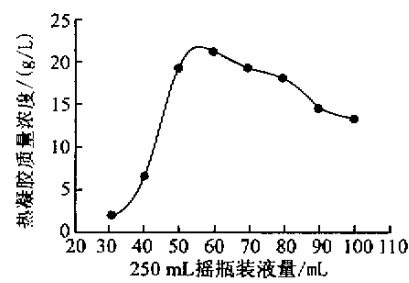


图 6 不同装液量对发酵的影响

Fig.6 Effect of volume on fermentation

2.8 摇床转速对发酵的影响

用 YPW-1 型回转式摇床考察摇床转速对发酵的影响,结果见图 7.

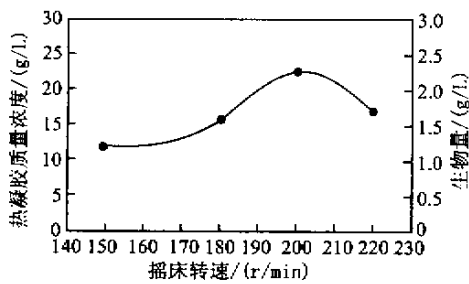


图 7 不同摇床转速对发酵的影响

Fig.7 Effect of shaking speed on fermentation

可以看出,当摇床转速较低时,由于供氧不足,造成发酵缓慢,热凝胶产量不高.当摇床转速为 220 r/min 时,过高的溶氧导致热凝胶产量下降,其原因与装液量类似,故最适转速为 200 r/min.

2.9 温度对发酵的影响

温度对菌体生长和热凝胶合成的影响见图 8.

从图 8 可以看出,当温度在 28~32 ℃ 之间时,热凝胶产量较高.低温时,菌体生长缓慢,碳源利用速度也较慢,影响热凝胶的合成;较高的温度会对菌体内的酶活产生影响,最终影响菌体生长和热凝胶的合成.因此,温度控制在 30 ℃ 比较合适.

参考文献:

[1] HARADA T, MASADA M, FUJIMORI K, et al. Production of a firm, resilient gel-forming polysaccharide by a mutant (10C3k) of *Alcaligenes faecalis* var. *myxogenes*[J]. *Agric Biol Chem*, 1966, 30(2): 196~198.

[2] PHILIPS K R, PIK J, LAWFORD H G. Production of curdlan-type polysaccharide by *Alcaligenes faecalis* in batch and continuous culture[J]. *Can J Microbiol*, 1983, 29 :1331~1338.

[3] LEE JIN W, WALTER G. Exopolymers from curdlan production: incorporation of glucose-related sugars by *Agrobacterium* Sp. Strain ATCC31749[J]. *Can J Microbiol*, 1997, 43 :149~156.

在最佳条件下进行了 3 批摇床发酵实验,结果表明,50 g/L 的葡萄糖经 72 h 发酵可得到 30 g/L 的热凝胶,转化率达 60%.

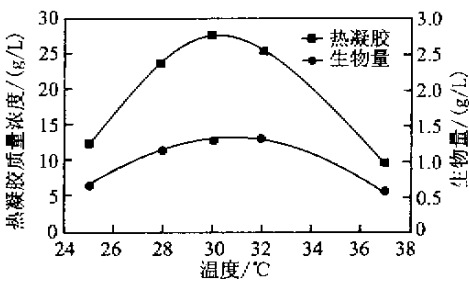


图 8 不同温度对发酵的影响

Fig.8 Effect of temperature on fermentation

2.10 上罐发酵

在摇瓶发酵的基础上,用 15 L 的 Biostat C10-3 自动发酵罐进行了放大试验,初始 pH 为 7.0,温度为 30 ℃,通气量 1 L/(L · min),搅拌转速 400 r/min. 结果表明,在发酵过程中不改变操作参数的情况下,经 60 h 的发酵,43 g/L 的葡萄糖中热凝胶的产量可达 22 g/L,转化率超过 51%. 通过改变发酵条件对发酵过程进行优化,热凝胶产量将有更大的提高.

3 结 论

1)初步确定了该菌株发酵培养基为(g/L):葡萄糖 50, NH₄Cl 1.07, KH₂PO₄ 2.72, K₂HPO₄ 1.71, MgSO₄ · 7H₂O 0.5, 酵母膏 1, 少量无机盐溶液.

2)摇瓶培养的最佳工艺条件为:培养基初始 pH 为 7.0,装液量 60 mL/250 mL 摇瓶,摇床转速为 200 r/min,培养温度为 30 ℃. 摇瓶实验结果表明,热凝胶产量可以达到 30 g/L,上罐发酵结果证明了该工艺条件是可行的.

3)通过对摇瓶发酵结果分析可知:发酵液的 pH 是影响发酵结果的重要因素,这为以后的放大培养中优化发酵过程,提高热凝胶产量开辟了新的思路.