

氮源 NH_4Cl 浓度对粪产碱杆菌发酵生产热凝胶的影响

Influence of Nitrogen Source NH_4Cl Concentration on Curdlan Production in *Alcaligenes faecalis*

孙永生, 王磊, 詹晓北*, 郑志永, 陈远志

SUN Yong-Sheng, WANG Lei, ZHAN Xiao-Bei*, ZHENG Zhi-Yong and CHEN Yuan-Zhi

江南大学工业生物技术教育部重点实验室生物工程学院, 无锡 214036

Key Laboratory of Industrial Biotechnology of Ministry of Education, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China

摘 要 研究了利用粪产碱杆菌(*Alcaligenes faecalis*)发酵生产热凝胶的发酵条件, 氮源是菌体生长的限制性底物, 单纯地提高初始底物(氮源)浓度并不一定能促进细菌的生长和产物的合成。在分批发酵过程中, 底物消耗导致培养环境 pH 的改变也是影响细菌进一步生长和产物合成的重要因素。通过增加培养基中初始氯化铵的浓度并同时控制发酵过程的 pH 条件, 得到了较高的菌体浓度, 热凝胶的合成水平也得到了显著提高。当培养基中 NH_4Cl 浓度提高到 3.6 g/L 时, 菌体浓度达到 7.2 g/L, 热凝胶合成的产量可达 30.5 g/L, 比原来 NH_4Cl 浓度为 1.1 g/L 时提高了 51.7%。提高菌体浓度意味着需要提高溶氧水平来满足细菌的生长和代谢。初始氮源 NH_4Cl 浓度的增加虽然能使菌体浓度得到提高, 但发酵过程对溶氧的需求也相应增加, 需要提高搅拌转速和通风以增加供氧水平。但高搅拌速率产生的高剪切力对热凝胶的凝胶性能将产生破坏作用, 因此在发酵过程中需要综合考虑细菌培养密度对合成热凝胶产量和质量的影响。

关键词 粪产碱杆菌, 热凝胶发酵, 氯化铵, 菌体浓度

中图分类号 TQ92 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2005)02-0328-04

Abstract The effect of initial ammonium chloride level on production of curdlan in *Alcaligenes faecalis* was investigated. It was found that ammonium chloride was the limiting substrate for cell growth during the batch fermentation process. However, the cell growth and curdlan production could not be enhanced by solely increasing the initial ammonium chloride level. The pH drop in the broth due to the consumption of ammonium chloride also effected the cell growth and curdlan production. By simultaneously increasing the initial ammonium chloride concentration and implementing an optimal pH control strategy, which is to control pH at 7.0 in the growth phase, and then shift to 5.6 in the production phase, the biomass and curdlan production in batch fermentation were increased markedly. If the initial ammonium chloride concentration was increased from 1.1 g/L to 3.6 g/L, biomass concentration of 7.2 g/L was obtained, and the final curdlan concentration reached 30.5 g/L, which was 51.7% higher than that of the former case. As the cell growth was improved due to the increase of the initial ammonium chloride concentration, the agitation speed and aeration rates must be enhanced to suit the higher oxygen uptake requirement. However, as curdlan molecules is subject to the structural breakage due to the high shear stress at higher agitation speed, an overall optimal condition for both productivity and quality of curdlan should be considered comprehensively.

Key words *Alcaligenes faecalis*, curdlan fermentation, ammonium chloride

Received: September 23, 2004; Accepted: November 10, 2004.

This work was supported by Grant from Jiangsu International Cooperation Research Contract (No. BS99719).

* Corresponding author. Tel: 86-510-5864640; E-mail: biogum@sytu.edu.cn

江苏省科技攻关(国际合作)项目基金资助(No. BS99719)。

热凝胶(Curdlan)又称凝结多糖、热凝多糖、凝乳糖,是继黄原胶、结冷胶之后又一种新的微生物发酵生产的多糖^[1]。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。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、面条、可食用纤维以及新型减肥食品^[2]。热凝胶也可用于提高混凝土的流动性能,并提高其分离稳定性^[3]。此外,热凝胶的胶体可以控制药物的扩散,所以可以用来作为药物释放的多聚物^[4]。热凝胶的硫酸酯可以应用于抵抗人类 HIV 病毒的感染^[5]。1996 年美国 FDA 批准热凝胶作为一种食品添加剂,为热凝胶在食品中的安全使用提供了规范并进一步促进了热凝胶的应用。

粪产碱杆菌一般是在氮源耗尽之后合成热凝胶^[6]。本实验室在前期的研究^[7]表明,利用粪产碱杆菌发酵生产热凝胶过程中,培养基中的氮源 NH_4Cl 是影响菌体生长的限制性因素,热凝胶发酵生产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,而前期菌体生长对于后期热凝胶合成势必会产生影响。因此,在第一阶段中提高菌体的生长密度而在第二阶段强化目标产物热凝胶的合成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。由于氮源 NH_4Cl 在发酵的第一阶段对于菌体的合成是必需的,而在第二阶段又将会抑制产物的合成,因此,研究氮源营养条件对粪产碱杆菌发酵过程的影响将为优化热凝胶的生产提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种:粪产碱杆菌 WX-C12(*Alcaligenes faecalis* var. *myxogenes*),江南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 5.0,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, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, pH 7.0。

1.1.4 发酵培养基(g/L):葡萄糖 50,酵母膏 1.0, KH_2PO_4 2.7, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, CaCO_3 5, 10 mL 无机盐浓缩液, pH 7.0~7.2, NH_4Cl 浓度见结果与讨论部分。

1.2 培养条件

1.2.1 一级种子培养:从试管斜面上挑取一环菌,接入装有 60 mL 种子培养基的 250 mL 三角瓶中, 30℃, 200r/min 摇床培养 17~18 h。

1.2.2 二级种子培养:将 5 mL 一级种子接入装有 100 mL 种子培养基的 500 mL 三角瓶中, 30℃, 200r/min 摇床培养 18 h。

1.2.3 摇瓶培养:三角瓶装入培养基后, 8 层纱布扎口, 0.08 MPa 灭菌 20 min, 以 5% 的接种量接入种子, 30℃, 200r/min 摇床培养 5 d。

1.2.4 15 L 发酵罐培养:将 500 mL 二级种子接入装有 9 L 发酵培养基的 15 L Biostat C10-3 自动控制发酵罐, 30℃ 培养, 通

气条件见结果与讨论。在细胞生长期用 4 mol/L NaOH 控制 pH 至 7.0, 在氮源耗尽后用 3 mol/L 盐酸调 pH 至 5.6, 并保持恒定。

1.3 分析方法

1.3.1 热凝胶含量测定^[11]。

1.3.2 细胞浓度测定^[10]。

1.3.3 葡萄糖浓度测定:3,5-二硝基水杨酸法(DNS法)^[8]。

1.3.4 NH_4Cl 浓度测定:靛酚蓝-次氯酸钠分光光度法^[9]。

1.3.5 溶氧监测:通过 Biostat C10-3 自动控制发酵罐上所配备溶氧电极在线控制。

2 结果与讨论

2.1 分批发酵过程中初始氮源 NH_4Cl 浓度对发酵的影响

2.1.1 不同初始氮源 NH_4Cl 浓度对菌体生长及底物利用的影响:本实验室已研究了在摇瓶条件下初始氮源 NH_4Cl 浓度对热凝胶发酵的影响^[11],发现当培养基中氯化铵浓度增加到 1.5 g/L 以上时,热凝胶合成期 pH 值比较低,热凝胶合成的产量也很小;当培养基中氯化铵浓度增加到 2.3 g/L 时,发酵后期 pH 降到 4.3,热凝胶不再合成。培养基中大量的铵离子被利用后引起 pH 下降并超出培养体系的缓冲能力,在较低的 pH 环境下菌体生长及热凝胶合成受到抑制。因此,在研究氮源 NH_4Cl 浓度对热凝胶发酵影响的同时要控制发酵过程的 pH,以避免 pH 值下降得过低而影响热凝胶的合成。

在 15 L 自动控制发酵罐中进行热凝胶发酵,采用两阶段 pH 控制^[10,11]。培养基中氯化铵浓度分别为 1.1、1.6、2.4 和 3.6 g/L,通气搅拌培养 50 h,研究不同初始氮源 NH_4Cl 浓度对菌体生长及底物利用的影响。

图 1、图 2 和图 3 分别是不同 NH_4Cl 浓度下菌体生长、 NH_4Cl 消耗和磷酸盐消耗的过程曲线。从这三个图可看出:当发酵过程用酸碱流加控制 pH 值后,随着 NH_4Cl 初始浓度的提高(1.1 g/L→3.6 g/L),菌体生长的时间相应从 11.2 h 延长至 18.8 h,菌体细胞干重也相应从 2.2 g/L 提高到 7.2 g/L(图 1)。氮源耗尽、细胞停止生长时得到的菌体细胞浓度与培养基中 NH_4Cl 的初始浓度成正比。当限制性底物 NH_4Cl 消耗殆尽时,菌体的生长随之停止,而此时发酵液中的葡萄糖和磷酸盐都仍有较多剩余(如在 NH_4Cl 初始浓度为 3.6 g/L 一组中,细胞生长停止时,葡萄糖和磷酸盐的剩余量分别为 32 g/L 和 2.17 g/L),因此氮源 NH_4Cl 是粪产碱杆菌生长的限制性底物。而氮源的耗尽能保证在发酵的第二阶段时热凝胶合成不受残留 NH_4Cl 的抑制,与此同时,菌体生长停止后培养基中剩余的葡萄糖等营养物可用于第二阶段产胶期时热凝胶的合成和细菌代谢功能的维持。比较图 1 和图 2、图 3 可以看出,在不同的初始 NH_4Cl 浓度下,菌体对 NH_4Cl 和磷酸盐的消耗随菌体生长达到的最终浓度的增加而增加。在本实验的各初始 NH_4Cl 浓度下,菌体的生长基本上遵循以下规律:合成 1 g 菌体需消耗 0.5 g NH_4Cl 、2.5 g 左右的葡萄糖以

及 0.07 g 左右的磷酸盐。根据这个规律,可以通过 NH_4Cl 的加量来限定菌体浓度,以及计算出磷酸盐的加量使热凝胶合成期残留磷酸盐浓度维持在一个比较低的值,使得生产处于一个比较经济的状态。

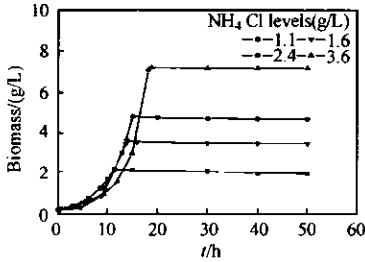


图 1 初始氯化铵浓度对菌体生长的影响

Fig.1 Effect of initial NH_4Cl concentration on cell growth

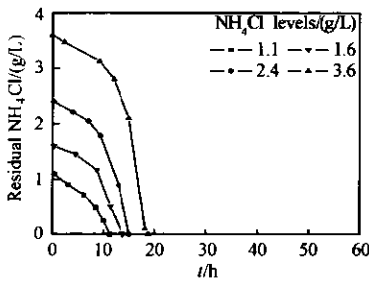


图 2 不同初始氯化铵浓度下菌体对氯化铵的利用

Fig.2 Consumption of NH_4Cl by *Alcaligenes faecalis* at various ammonium chloride levels

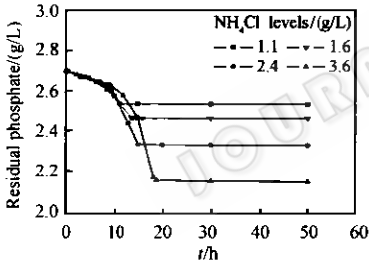


图 3 不同初始氯化铵浓度下细菌对磷酸盐的利用

Fig.3 Consumption of phosphate by *Alcaligenes faecalis* at various ammonium chloride levels

2.1.2 菌体浓度对热凝胶合成的影响:在摇瓶试验中虽然提高了培养基中氮源 NH_4Cl 的浓度,但由于发酵过程 pH 不能控制,在产胶期中 pH 过低,使得菌体浓度并未提高,热凝胶的合成反而受到了抑制而降低了目标产物的合成量。在 15L 自动发酵罐中,培养过程中的 pH 条件得到了有效地控制,根据细菌生长期和产胶期不同的最适 pH 条件分别进行控制。在此基础上,提高培养基中氮源 NH_4Cl 的浓度,采用一定的溶氧控制策略,得到较高的菌体浓度,并且热凝胶合成期内无 NH_4Cl 残留,这样就可以研究菌体浓度对热凝胶合成产量、单位菌体比产胶速率 Q_p (每克细菌每小时产热凝胶的毫克数, $\text{mg}/(\text{h} \cdot \text{g-cell})$) 的影响。图 4 为不同菌体浓度下热凝胶合成的各项指标比较,随着菌体浓度的提高,发酵液中热凝胶的含量得到明显提高,从原来菌体浓度 2.2 g/L 时的

20.1 g/L 提升到菌体浓度 7.2 g/L 时的 30.5 g/L,提高了 51.7%,但同时可以发现,随着菌体浓度的提高,单位菌体的比产胶速率 Q_p 有所下降,但相对于发酵液中热凝胶含量的提高来说是可以接受的。但是若要继续提高菌体浓度,发酵过程对设备供氧的要求也更高,一般需要通过提高搅拌速率来实现有效供氧,动力的消耗相应增大,因而过高地提高菌体浓度以求一个更高的生产强度是并不可取的,也是不经济的;与此同时,高搅拌速率下产生的高剪切力对于目标产物热凝胶的凝胶性能的保持是不利的^[12]。因此,在提高菌体浓度的过程中,对溶氧供给条件、热凝胶的产量及质量等因素需要进行综合考虑。

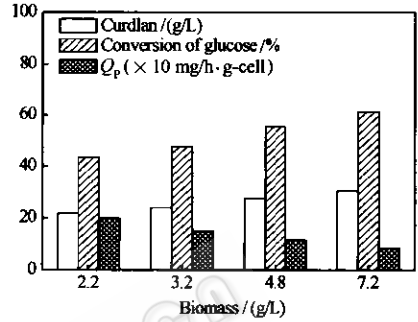


图 4 不同菌体浓度对热凝胶发酵的影响

Fig.4 Effect of cell concentration on curdlan fermentation

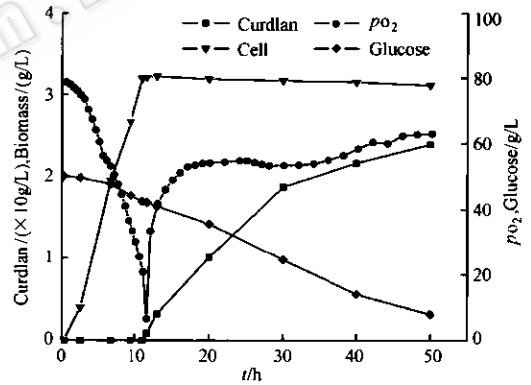


图 5 热凝胶分批发酵过程曲线(初始氮源 NH_4Cl 浓度 1.6 g/L, 搅拌转速 400r/min)

Fig.5 The batch profile during curdlan fermentation

The initial concentration of NH_4Cl was 1.6 g/L

and the agitation speed was 400r/min.

2.2 提高菌体浓度过程中的溶氧控制策略

热凝胶发酵过程的耗氧情况可分为两个阶段进行研究:细菌生长期和热凝胶合成期。图 5 是热凝胶发酵过程曲线,从图中可知细菌生长期随着细胞浓度的增加,对氧的需求也不断增加,溶氧不断降低;而在氮源耗尽后的热凝胶合成期,溶氧迅速上升然后保持相对稳定。图 5 的这种溶氧变化趋势表明,菌体由细胞生长期进入热凝胶合成期呼吸强度降低了。Lawford 等^[13]的研究也证实了热凝胶发酵过程中菌体呼吸强度降低的生理变化,他们对热凝胶分批发酵过程中反应器尾气成分进行分析,计算出细菌在对数生长期的比耗氧速

率为 7mmol O₂/(h·g-cell),热凝胶合成期的比耗氧速率为 2.7mmol O₂/(h·g-cell)。

表 1 示出了不同初始氮源 NH₄Cl 浓度对热凝胶合成的影响及溶氧控制条件。从表 1 所示的实验结果可知,提高培养基中氮源 NH₄Cl 浓度,所得的菌体生物量随之增加,但对溶氧的需求也相应增加,这就需提高发酵过程中的搅拌转速和通气量以增加供氧水平。若细菌生长期溶氧下降的过低(细菌生长期低于 5%),则可能使细菌在生长过程中的呼吸受到抑制,影响了菌体细胞的生理活性,热凝胶的合成也因此而受到影响(表 1 初始氮源 NH₄Cl 浓度 2.4g/L,搅拌转速 400r/min 的操作条件下菌体生长结束时溶氧下降到 0.8%与相同初始 NH₄Cl 浓度下搅拌转速为 500r/min 的情况相比,

热凝胶产量较低)。另外,在培养基中初始氮源 NH₄Cl 浓度为 3.6g/L 的分批发酵过程中搅拌转速采取分阶段控制(细菌生长期搅拌转速 600r/min,热凝胶合成期搅拌转速 500 r/min,通风 1.5vvm),在这样的溶氧操作条件下菌体细胞生物量及热凝胶产量都达到了较高水平,菌体生物量达到 7.2g/L,热凝胶产量达到 30.5g/L。因此,对于热凝胶发酵,当提高培养基中菌体生长的限制性底物氮源 NH₄Cl 的浓度从而使菌体生物量提高到一定程度后,由于细菌生长期的呼吸强度大于热凝胶合成期,可以在细菌生长期采用较高搅拌转速以保证该阶段不受溶氧限制,而在热凝胶合成期则采用较低的搅拌转速以减少发酵过程动力消耗,并减少搅拌剪切力对热凝胶性能的破坏。

表 1 不同初始氮源 NH₄Cl 浓度对热凝胶生产的影响及溶氧控制条件

Table 1 Effect of initial NH₄Cl concentrations on curdlan production and dissolve oxygen operating conditions

Initial NH ₄ Cl concentration/(g/L)	Biomass /(g/L)	Agitation speed /(r/min)	Aeration rates/(vvm)	Pressure (×101325 Pa)	Terminal DO during cell growth phase/%	DO during curdlan formation phase/%	Curdlan concentration/(g/L)
1.1	2.2	300	0.5	1.0	0.5	54~60	20.1
		400	0.5	1.0	10.1	62~70	21.8
1.6	3.2	400	1.1	1.0	6.5	63~75	23.9
2.4	4.8	400	1.1	1.38	0.8	56~63	25.1
		500	1.1	1.38	38.2	80~98	27.6
		600					
3.6	7.2	500*	1.3	1.48	41.3	82~99	30.5

* Agitation speed was set at 600, 500r/min during cell growth phase and curdlan formation phase respectively.

REFERENCES(参考文献)

[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. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1966, 30(2): 196~198

[2] Takeda Technical Report. Pureglucan: Basic Properties and Food Application. Takeda Chemical Industries Ltd., Japan, 1997

[3] Haze A, Yamauota Y, Miyanagi K *et al.* Preparation of a segregation-reducing agent for hydraulic composition. European Patent 588665, 1994

[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*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 1995, 18: 1154~1158

[5] Takeda HN, Neoh LP, Akimoto H *et al.* Role of curdlan sulfate in binding of HIV-1 gp120 to CD4 molecules and the production of gp120-mediated TNF-alpha. *Microbiology and Immunology*, 1997, 41:741~745

[6] Harada T, Fujimori K, Hirose S *et al.* Growth and β-Glucan (10C3K) production by a mutant of *Alicaligenes faecalis* var. *myxogenes* in defined medium. *Agricultural Biological Chemistry*, 1966, 30(8):764~769

[7] Zhan XB(詹晓北), Han J(韩杰), Wang L(王磊) *et al.* Study on the fermentation conditions of Curdlan by *Alcaligenes faecalis* Strain. *Journal of Wuxi University of Light Industry*(无锡轻工大学学报), 2001,20(4):347~350

[8] Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 1959, 31: 426~428

[9] Lee JH, Lee IY, Kim MK *et al.* Optimal pH control of batch processes for production of curdlan by *Agrobacterium* species. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 1999, 23: 143~148

[10] Lawford HG. New beta-1,3-glucan expolysaccharide and process for its preparation, European Patent 0322393, 1989

[11] Wang L(王磊), Zhan XB(詹晓北). Influence of pH control on the production of curdlan by *Alcaligenes faecalis* strain. *Chinese Journal of Biotechnology*(生物工程学报), 2002, 18(5):634~637

[12] Lee IY, Kim MK, Lee JH *et al.* Influence of agitation speed on production of curdlan by *Agrobacterium* species. *Bioprocess Engineering*, 1999,20:283~287

[13] Lawford HG, Rousseau JD. Production of β-1, 3-glucan expolysaccharide in low shear systems. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 1992, 34: 597~611