

pH 控制对热凝胶发酵的影响

王 磊¹ 詹晓北^{1*} 朱一晖¹ 李珍雨² 杨 焯¹

¹(江南大学工业生物技术教育部重点实验室, 无锡 214036)

²(Division of Biotechnology, Donga University, Pusan 604-714, Korea)

关键词 产碱杆菌, 热凝胶发酵, pH 控制, 两阶段

中图分类号 TQ92 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2002)05-0634-04

热凝胶(Curdlan)是一种直链结构的 β -1,3-葡聚糖,由 *Alcaligenes faecalis* var. *myxogenes* 发酵生产而来,是一种新型的微生物胞外多糖^[1],其分子量在 50 万左右。热凝胶在中性条件下不溶于水,但能溶于碱溶液中。加热含有热凝胶的水浊液可形成两种类型的凝胶,一种是弹性较低的类型琼脂的可逆胶;另外一种为凝胶强度大、弹性好的热不可逆胶。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。热凝胶的胶体可以包容和控制药物的扩散,所以可以用来作为药物传递的多聚物^[2]。热凝胶的硫酸盐(CRDS),可以用于抗病毒剂,以防止一些人类至今不能攻克的病毒感染的感染^[3]。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。

作者曾报道过,通过对本实验室保藏的一株粪产碱杆菌 WX-C1X (*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实验^[4]。本实验室正与相关企业合作在对这一产品进行中试研究,并准备使之工业化。而要产业化,必须使之在价格上比其它类似产品有竞争力,所以提高生产强度和糖转化率以降低生产成本是很重要的。

在热凝胶生产中,影响热凝胶生产强度和糖转化率的因素很多,pH 就是其中一个最重要的因素之一。在摇瓶实验中,pH 控制主要是靠调初始 pH 和在培养体系中加入缓冲盐类来进行的。细胞的最适生长 pH 与最适发酵 pH 是往往不一样的,而通过前面的这种方法控制 pH 进行发酵,不可能使体系一直处于一个最佳的 pH 状态。在这篇文章中,作者把整个热凝胶发酵过程分成两个阶段,即菌体生长期和热凝胶合成期,在 15 L 的自动控制发酵罐上用酸碱流加控制两个阶段的 pH,研究了 pH 对菌体生长和热凝胶生产的影响。

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*),作者所在研究室保藏。

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, pH 7.0。

1.1.4 发酵培养基(g/L):葡萄糖 50,酵母膏 1.0, NH₄Cl 1.1, 无机盐离子, pH 7.0。

1.2 培养条件

1.2.1 一级种子培养:将一环活化好的斜面种子接入装有 60 mL 种子培养基的 250 mL 三角瓶中,于 30 °C, 200 r/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,于 30 °C, 200 r/min 培养 18 h。

1.2.3 15L 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 的 Biostat C10-3 自动控制发酵罐,30 °C 培养。在细胞生长期用 4 mol/L NaOH 控制 pH 至 7.0,在氮源消耗殆尽,细胞生长结束后,用 3 mol/L HCl 调 pH 至一定值,并保持恒定。搅拌转速为 400 r/min,通气量为 0.5 L/(L·min)。

1.3 分析方法

1.3.1 热凝胶产量测定:5 mL 发酵液,于 7000 r/min 离心 20 min,向离心得到的沉淀中添加 2 mol/L NaOH 10 mL,搅拌静置 1 h,使热凝胶充分溶解,离心,取上清液,用 3 mol/L HCl 调 pH 至中性,得到凝胶。离心,向沉淀中加蒸馏水洗涤,离心若干次,在 85 °C 烘干至恒重,称重,计算产量。

1.3.2 细胞浓度的测定:按 1.3.1 的方法,向提取热凝胶后得到的沉淀中添加 1 mol/L HCl 10 mL,振荡离心,沉淀再用蒸馏水洗涤若干次,在 85 °C 烘干至恒重,称量。

1.3.3 葡萄糖浓度测定:3,5-二硝基水杨酸法(DNS 法)^[5]。

1.3.4 氯化铵浓度测定:改良的靛酚蓝-次氯酸钠分光光度法。

1.3.5 $pO_2\%$ (溶解氧百分浓度)测定:Biostat C10-3 自动发酵罐自带溶氧电极测定,通气量为 $4.5\text{ L}(\text{L}\cdot\text{min})$,罐内压力为 0,搅拌转速 400 r/min ,稳定 10 min 后调百分比。

2 结果与讨论

2.1 热凝胶发酵过程分析

图 1 是 15 L 自动控制发酵罐进行热凝胶发酵过程曲线图,其 pH 控制跟摇瓶实验一样是靠培养液中的磷酸盐和 CaCO_3 缓冲作用自然下降来调节的。从图中可见,热凝胶发酵菌体生长和热凝胶合成是非偶联的,整个发酵过程可以分成两

个阶段:前 10 h 是菌体生长期,10 h 后氯化铵被消耗殆尽,热凝胶开始合成,至发酵结束是热凝胶合成期(简称产胶期)。在菌体生长期,氯化铵作为氮源迅速被利用,菌体快速生长, $pO_2\%$ 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 也迅速下降。10 h 左右,氯化铵被消耗殆尽,菌体质量浓度达到最大值, $pO_2\%$ 和 pH 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, $pO_2\%$ 开始上升并保持在 70% 左右,pH 在磷酸盐缓冲作用以及 CaCO_3 调节作用下稳定在 5.6~5.9 之间。120 h 左右作为底物的葡萄糖被消耗殆尽,菌体的代谢受到限制, $pO_2\%$ 迅速回升,此时可判断为发酵结束。

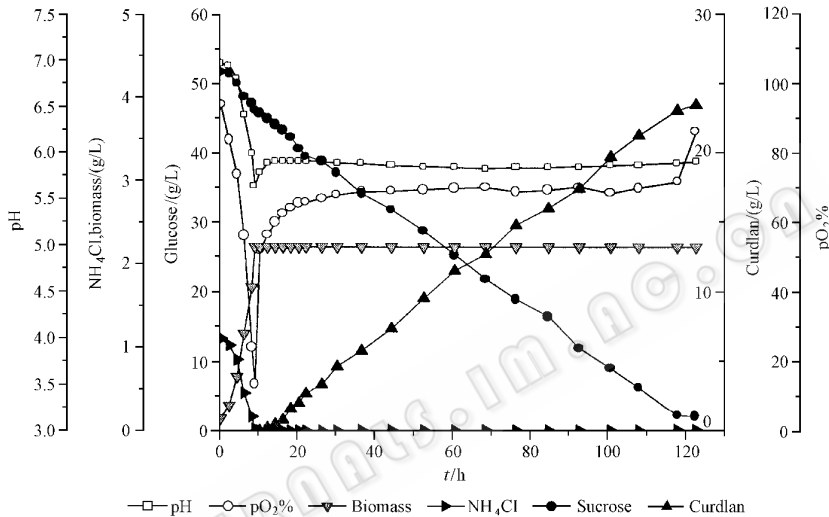


图 1 热凝胶发酵过程

Fig. 1 The batch profile of curdlan fermentation

□pH ○ $pO_2\%$

2.2 pH 控制对热凝胶发酵的影响

作者已研究了不同起始 pH 值对热凝胶发酵的影响^[7],发现低起始 pH 值和高起始 pH 值均不利于热凝胶合成,当起始 pH 值为 7.0 时热凝胶产量最高,产胶期发酵液的 pH 值一般维持在 5.4~6.0 之间。而当起始 pH 值低于 6.5 时,产胶期(发酵后期)发酵液的 pH 值降得较低,在 5.0~5.3 左右,热凝胶产量很低,pH 值降得更低的,热凝胶不再合成,而起始 pH 值高于 7.5 时,产胶期发酵液的 pH 值较高,在 6.0 以上,随着 pH 值的升高,热凝胶产量逐渐降低,而残糖浓度增加。

发酵过程中,培养液的 pH 值影响菌体对基质的利用速度、细胞结构以及细胞内各种酶的活性从而影响菌体的生长和产物的合成。由于发酵是多酶复合反应系统,各酶的最适 pH 值也不相同,因此同一菌体,其生长最适 pH 值很有可能与产物合成的最适 pH 是不一样的^[6]。Lawford 等报道^[7],热凝胶生产菌 *Alcaligenes faecalis var. myxogenes* 的生长最佳 pH 在 7.0 左右,而 pH 值在 5.7~6.2 之间比较适合热凝胶合成。作者也发现起始 pH 值 7.0 时菌体生长较好,产胶期 pH 维持在 5.4~6.0 之间时,能得到较高的热凝胶产量。但是作者同

时也发现由于发酵过程中 pH 波动较大的,产量及产率也不是很稳定。作者把热凝胶发酵过程分成菌体生长期和产胶期两个阶段,两个阶段 pH 值分别控制,这样就可以分别研究 pH 变化对菌体生长及热凝胶合成的影响了。在 15L 的 B. Braun Biostat C10-3 自动控制发酵罐上,先在菌体长期用 4 mol/L NaOH 把培养液的 pH 值恒定控制在 7.0,等氮源氯化铵消耗殆尽,溶氧开始回升后,再用 3 mol/L HCl 把发酵液的 pH 值降到某一值(6.2、5.9、5.6、5.3)并控制恒定,以考察 pH 控制对菌体生长和热凝胶合成的影响。

2.2.1 pH 控制对菌体生长的影响 图 2 是分两阶段 pH 控制下热凝胶发酵过程曲线,图 1 和图 2 比较可以发现,菌体生长期的 pH 恒定控制在 7.0 情况下,碳氮源的消耗及菌体的生长情况与只调起始 pH 7.0 的情况基本上没有什么区别,菌体生长期都在 10 h 左右结束,菌体质量浓度都为 2.2 g/L 左右(见表 2)。这可能是因为在 pH 自然下降的条件下,由于培养基中磷酸盐和 CaCO_3 的缓冲作用以及氯化铵浓度不大,铵离子被利用完后引起的 pH 下降幅度不是很大,对菌体生长影响不大。虽然在本实验的氮源浓度下,两种 pH 控制方式下菌体都能很好的生长,但是作者在研究氮源浓度对热凝

胶发酵的过程发现(见表1),当把培养基中氯化铵浓度增加到1.5 g/L以上时,产胶期发酵液中就开始有氯化铵残留,最终pH值也比较低,虽然有热凝胶生成,但产量很小;当氯化铵浓度增加到2.3 g/L时,发酵后期pH降到4.3,热凝胶不再合成。分析可能就是因为大量铵离子被利用后引起pH下降幅度较大,而在较低pH条件下菌体生长受到抑制,虽然培养

液中还有铵离子存在,但菌体已不再生长,并开始合成热凝胶,但是由于铵离子存在以及较低的pH值下,热凝胶合成已受抑制。为了进一步提高热凝胶的生产强度,就不得不考虑在培养基中增加氮源浓度以增加菌体浓度来提高热凝胶的生产强度。在这样的情况下,菌体生长期进行pH控制是非常有必要的了。

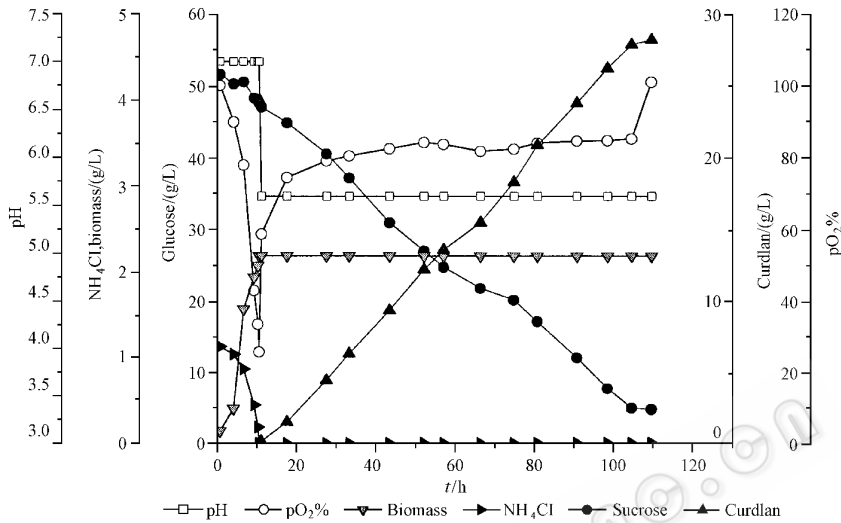


图2 两阶段pH控制条件下热凝胶发酵过程

Fig.2 The batch profile of cell growth and curdlan production under two-stage pH controlled condition

表1 不同氯化铵浓度对热凝胶发酵的影响

Table 1 Effect of NH_4Cl level on curdlan fermentation

NH_4Cl (g/L)	Curdlan (g/L)	Terminal pH
1.1	22	5.8
1.5	17	5.0
1.9	8	4.6
2.3	0	4.3

2.2.2 pH控制对热凝胶合成的影响:表2比较了控制不同产胶期pH条件下热凝胶生产的各项指标。可以看出,两阶段pH控制条件下,热凝胶产量、热凝胶生产强度以及 Q_p 和 $Y_{p/s}$ 比pH自然下降的都要有不同程度的提高,在控制产胶期pH 5.6的情况下比pH自然下降的分别提高了20.4%、38.1%、38.1%和29.5%。在两阶段pH控制的热凝胶发酵

中,考察产胶pH范围(6.2~5.3)内,pH变化对产胶期各项指标的影响。如图1可发现,随着产胶期pH值的下降,葡萄糖消耗速率和 Q_s 也逐渐增大,这说明产胶pH范围内,热凝胶生产菌在低的pH值条件下利用葡萄糖能力要比高pH值条件下大。热凝胶生产强度、 Q_p 以及 $Y_{p/s}$ 在pH 5.6处出现最大值,可能5.6是菌体合成热凝胶的酶系的最适pH值,最适合热凝胶的合成,所以 Q_p 和 $Y_{p/s}$ 都比其它pH值下要高。热凝胶生产菌 *Alcaligenes faecalis* var. *myxogenes* 除了产热凝胶外,同时还能合成另外两种非热凝胶型的水溶性多糖A和B^[8]。在pH大于5.6的条件下,菌体利用葡萄糖的能力相对较低,所以热凝胶合成也较慢;而在pH小于5.6的条件下,虽然菌体利用葡萄糖的能力随着pH的下降而增大,但是相对较低的pH条件容易使代谢途径向合成另外两种非热凝胶型的水溶性多糖偏移,降低了菌体合成热凝胶的能力。

表2 不同pH控制条件对热凝胶发酵结果的影响

Table 2 Effect of different pH control manners on batch fermentation of curdlan

pH		Biomass (g/L)	Curdlan (g/L)	Rate of glucose consumption (mg/L·h)	Rate of curdlan production (mg/L·h)	Q_s (Specific rate of glucose consumption) (mg/L·h·g)	Q_p (Specific rate of curdlan production) (mg/L·h·g)	$Y_{p/s}$ (Q_p/Q_s) (g/g)
Cell growth stage	6.2	2.2	24.2	370.2	209	168.3	95	0.564
	5.9	2.2	24.62	389.2	238	176.9	108.2	0.612
	5.6	2.2	28.19	441.5	291	200.7	132.3	0.659
	5.3	2.3	25.16	521.4	273	226.7	118.7	0.523
Initial pH 7.0, falling uncontrolled		2.2	23.42	397.2	210	180.5	95.4	0.528

从上面的研究结果可知,把热凝胶发酵过程分成两个阶段,菌体生长期 pH 恒定控制在 7.0,热凝胶合期 pH 恒定在 5.6 可以得到最大的热凝胶产量、生产强度及转化率。实验证明热凝胶的两阶段 pH 控制发酵不但可行,而且比 pH 自然下降的效果显著,还为后面进一步对热凝胶产量、热凝胶生产强度的研究提供新的方式和可能。当我们在两阶段 pH 控制条件下,把氯化铵浓度提高到 1.6 g/L,培养 80 h,热凝胶产量 23 g/L,热凝胶生产强度达到 348 mg(L·h), Q_p 为 110 mg(L·h·g),生产强度得到很大提高。为了提高热凝胶产量及其生产强度,国外研究者也作了很多研究,他们有的研究通风和搅拌速率对热凝胶生产的影响,通过改进搅拌桨等方法把 Q_p 从原来的 72 mg(L·h·g) 提高至 100 mg(L·h·g)^[9];有的研究者通过分批添加尿嘧啶和葡萄糖把热凝胶产量提高到 93 g/L^[10]。但是为了降低生产成本,更好地工业化,还有很多的工作需要我们去做的。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Harata T, Masada M, Fyhumiru K *et al.* Production of a firm, resilient gel-forming polysaccharide by a mutant (10C3k) of *Alcaligenes faecalis* var. *myxogenes*. *Agric Biol Chem*, 1966, **30**(2): 196 ~ 198
- [2] Kanke M, Tanabe E *et al.* Application of curdolan to controlled drug delivery: III. Drug release from sustained release suppositories *in vitro*. *Boil Pharm Bull*, 1995, **18**: 1154 ~ 1158
- [3] Takeda H N, Neoh L P, Akimoto H, Kaneko H *et al.* Role of curdolan

sulfate in the binding of HIV-1 gp120 to CD4 molecules and the production of gp120-mediated TNF- α . *Microbiol Immunol*, 1997, **41**: 741 ~ 745

- [4] ZHAN X B (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
- [5] Department of Biochemistry, Beijing University (北京大学生物化学教研室). Guide to Biochemistry Experiment (生物化学实验指导), Beijing: People's Education Press, 1980, pp. 22 ~ 24
- [6] XIONG Z Q (熊宗贵). Process Principle of Fermentation (发酵工艺原理), Beijing: Science and Technology of Medicament Press of China, 1995
- [7] Lowford. New beta-1,3-glucan exopolysaccharide and process for its preparation, EP 0322393, 1989
- [8] Lee J W, Yeomans W G *et al.* Microbial production of water-soluble non curdlan type exopolymer-B with controlled composition by agrobacterium sp. *Biotechnology letters*, 1997, **19**: 1217 ~ 1221
- [9] Lee I Y, Kim M K, Lee J H. Influence of agitation speed on production of curdlan by *Agrobacterium* species. *Bioprocess Engineering*, 1999, **20**: 83 ~ 287
- [10] Lee J H, Lee I Y. Optimization of uracil addition for curdlan (β -1,3-glucan) production by *Agrobacterium* sp. *Biotechnology letters*, 2001, **23**: 131 ~ 1134

Influence of pH Control on the Production of Curdlan by *Alcaligenes faecalis* Strain

WANG Lei¹ ZHAN Xiao-Bei^{1*} ZHU Yi-Hui¹ LI Zhen-Yu² YANG Ye¹

¹(Key Laboratory of Industrial Biotechnology of Ministry of Education, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

²(Division of Biotechnology, Donga University, Pusan 604-714, Korea)

Abstract A two-stage pH control method was employed in batch fermentation of curdlan by *Alcaligenes faecalis* WX-C12 where cell-growth stage was constantly controlled at pH 7.0 and stationary stage was controlled at a constant pH as well. The influence of pH control on the curdlan production was investigated. The optimal pH control of batch process for curdlan production was obtained when cell-growth stage was controlled at pH 7.0 and stationary stage was constantly controlled at pH 5.6. Production and productivity of curdlan, Q_p and Y_p/S reached 28.19 g/L, 291 mg(L·h), 132.27 mg(L·h·g) and 0.659, an improvement of 20.4%, 38.1%, 38.1% and 29.5% compared to a pH uncontrolled operation respectively.

Key words *Alcaligenes faecalis*, curdlan fermentation, pH control, two-stage

Received: 04-15-2002

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

* Corresponding author. Tel: 86-0510-5864640; Fax: 86-0510-5805597, E-mail: biogum@wxuli.edu.cn

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>