

普鲁兰的底物流加补料发酵研究

孙万儒 周铁锁 谢浩旭 江宁 任永娥

(中国科学院微生物研究所 微生物资源国家重点实验室 北京 100080)

摘要 在批式发酵优化条件基础上,通过对流加补料方式、流加起始时间、批式流加间隔时间、补料液的组成等对发酵过程的各种参数,如产物量、转化率、生物量、溶氧、发酵液 pH、发酵液黏度以及产物分子量等的影响进行了研究,确定了普鲁兰流加补料发酵的优化条件,使发酵转化率达到 70% 以上,产物平均分子量在 10 万以上。

关键词 普鲁兰,流加补料发酵,淀粉水解物

分类号 Q 939.97 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(1999)02-0183-88

普鲁兰(Pullulan)在医药、食品、日化、印刷、电子、粘结等工业上作为改进产品性能,提高技术水平,促进产品更新换代的新颖高分子材料受到广泛注意。许多国家对其发酵过程的生物学、生物化学、发酵动力学、发酵条件和各种因素进行了广泛研究^[1~3]。大量文献报道的是以 5% 蔗糖为发酵底物,其最高转化率不超过 50%,而以淀粉水解物为发酵底物的研究较少,早在 1972 年 K. Kato 等发表专利^[1],利用淀粉水解物为底物发酵最高转化率可达 76%,但产物分子量低。而其它研究者进行同样的研究却远未达到 Kato 专利水平^[4~7]。我们利用 10% 淀粉水解物进行普鲁兰批式发酵,在优化条件下,转化率最高为 52%,虽然比报道的水平高,但未能达到 Kato 专利水平。依据普鲁兰批式发酵的结果,对流加补料发酵的条件进行了优化研究,获得了满意结果。

1 材料与方 法

1.1 菌种和培养基

1.1.1 菌株: 普鲁兰高产菌种出芽短梗霉(*Aureobasidium pullulans*) No. 325 由本实验室筛选得到。

1.1.2 斜面培养基: 土豆-麦芽汁斜面培养基。

1.1.3 摇瓶种子培养基(%): 蔗糖 5.0, 蛋白胨 1.0, 酵母膏 0.5, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.02, K_2HPO_4 0.5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02, NaCl 0.1, pH6.5, 于 0.05MPa 下灭菌 30min。

1.1.4 发酵基础培养基(%): 除了用 DE 值为 40~60 的淀粉水解物代替蔗糖外,其它培养基成分与摇瓶种子培养基相同。

1.1.5 流加液(%): 根据需要配制含有 15%~40% 的 DE 值为 40~60 的淀粉水解物和一定浓度的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 溶液,于 0.05MPa 下灭菌 30min,冷却到 28℃ 待用。

1.2 设备与试剂

1.2.1 发酵罐: NBS 的 16L 全自动发酵罐。

收稿日期:1998-07-17,修回日期:1998-12-02。

1.2.2 试剂：淀粉为北京淀粉厂产品，葡萄糖、蕙酮及其它为市售分析纯试剂。

1.3 方法

1.3.1 斜面种子培养：用接种针取 1 环细胞接种在斜面培养基上，于 28℃ 下培养 5d。

1.3.2 种子摇瓶培养：500mL 的摇瓶加入 50mL 种子培养基，灭菌。在 25mL 的斜面种子试管中加入 10mL 无菌水，使细胞悬浮，每个摇瓶接入 1.0mL 菌悬液，于 28℃ 下，在转速为 200r/min 的旋转摇床上培养 24~48h。

1.3.3 罐上发酵：在 16L 全自控发酵罐内加入 8L 发酵基础培养基和适量的消泡剂，于 0.06MPa 下灭菌 30min，冷却到 28℃，接入 250mL 摇瓶种子进行发酵，通气量为 0.5~1.0 V/V，搅拌速度为 500~900r/min，罐压为 0.025MPa，发酵温度为 28±1℃。发酵到一定时间开始按要求的方式流加灭菌后冷却到 28℃ 的补料液，补料结束后，继续发酵一定时间。发酵过程中按时取样进行分析测定。

1.3.4 生物量测定：定量取发酵液，加入蒸馏水稀释 5 倍，于 4000r/min 下离心 20min，倾出上清液用于其它测定，用蒸馏水洗涤菌体 2 次，后于 100℃ 下干燥至恒重，称量法测定菌体量。

1.3.5 总糖测定：离心的上清液继续适当稀释，用蕙酮法直接测定总糖^[8]。以葡萄糖做标准物制作标准曲线。

1.3.6 普鲁兰的测定：取一定量的离心上清液，加入 5 倍的甲醇使多糖沉淀，离心后溶解，稀释到适当倍数后，用蕙酮法测定^[8]。以右旋糖苷为标准样品制作标准曲线。

1.3.7 发酵液黏度测定：用 Brookfield 黏度计(LVT)的 1 或 2 号转头测定。

1.3.8 普鲁兰分子量测定：利用黏度法测定^[9]。

2 结果与讨论

2.1 选择补料发酵的依据

在批式发酵研究中发现，普鲁兰积累与菌体量增加属于半偶联型，发酵 40h 后菌体量增长趋势减缓，但普鲁兰的合成速度基本没有变化，而底物以线性速度减少，120h 后，因底物消耗殆尽普鲁兰合成出现负增长，分子量降低，作为碳源被细胞利用^[10]。这种情况表明只要继续供给足够的底物，微生物细胞仍然有能力不断合成普鲁兰，采用流加补料的

发酵方式可能充分利用细胞的普鲁兰合成能力，提高普鲁兰的产量、转化率和生产效率。

2.2 补料时机的选择

以含有 7% 左右的淀粉水解物的基础培养基进行发酵，分别在发酵 36, 48, 60 和 72h 时开始进行间歇流加补料，每隔 12h 流加 500mL，共流加 4 次后，继续发酵 48h，发酵结束后进行测定，其结果(见表 1)。表明发酵 60h

表 1 不同起始补料时间对发酵的影响

Table 1 Effect of feed time on fermentation of pullulan

Fed time /h	36	48	60	72
Conc. of starch hydrolyste in the medium / %	7.1	7.7	7.6	7.1
Conc. of starch hydralyste in the feed solution / %	31.0	30.2	29.3	30.1
Fermentation time /h	132	144	156	168
Conc. of pullulan in the	36.8	42.5	68.8	55.2
Fermentation broth(mg/mL)	31.0	35.1	57.6	47.3
Conversion yield / %				
Residual sugar/(mg/mL)	58.3	50.8	6.6	3.0

时开始流加补料要比其它时间开始流加补料更有利,可获得较高的转化率和较低的残糖。在 60h 补料时,发酵液中的生物量较高,普鲁兰的合成能力较强,多糖的产量增加,两者之间有相应的关系。

2.3 补料液中 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的作用

在发酵过程中 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 作为氮源可被微生物利用,因此检验了流加补料时对普鲁兰合成的影响。保持其它条件和流加方式不变,在流加补料液中加入不同量的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 进行发酵,结果(见表 2)表明在流加补料液中除了淀粉水解物以外,加入 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 可以提高普鲁兰的产量和发酵转化率,最适用量为 0.125% ~ 0.150%。 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 作为氮源具有增加生物量的作用,但超过最适用量生物量反而有所降低,也说明适当增加生物量对普鲁兰的合成是有利的。

表 2 补料液中 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 含量对发酵的影响

Table 2 Effect of concentration of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ in feed solution on fermentation

Conc. of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ in the feed solution/ %	0	0.05	0.10	0.125	0.150	0.175
Conc. of starch hydrolyste in the basic medium/ %	6.6	6.46	6.97	6.83	7.43	7.06
Conc. of starch hydralyste in the feed solution/ %	29.3	30.2	30.5	29.8	32.0	30.3
Conc. of pullulan in the fermentation broth/(mg/mL)	64.17	72.85	77.53	80.54	83.61	66.74
Conversion yield/ %	57.6	65.0	66.4	70.5	70.0	57.0
Residual sugar /(mg/mL)	6.6	9.2	6.2	0.5	7.0	14.3
Biomass/(g/L)	24.9	26.8	28.5	27.2	27.7	25.4
Final pH	3.4	3.6	3.5	3.5	3.8	3.5

2.4 淀粉水解物的 DE 值对发酵的影响

通过控制淀粉水解条件制备不同 DE 值的淀粉水解物,用于配制发酵基础培养基和补料液,在相同的发酵和补料条件下进行发酵,其结果如表 3。

表 3 淀粉水解物的 DE 值对补料发酵的影响

Table 3 Effect of DE value of starch hydrolyste on fermentation of pullulan

DE of starch hydralyste in the basic medium	30.3	34.8	41.3	45.7	50.4	59.4	41.3	41.3
DE of starch hydralyste in the feed solution	57.1	57.1	57.1	59.4	59.4	59.4	50.4	41.3
Fermentation time/h	144	144	144	144	168	168	168	168
Conc. of pullulan in the fermentation broth/(mg/mL)	81.0	87.6	86.6	81.4	84.7	77.5	91.1	73.5
Coverion yield / %	70.4	76.0	73.0	67.6	71.5	65.2	75.2	63.0
Residual sugar/(mg/mL)	7.0	9.8	9.2	6.6	0.1	4.6	5.2	9.2
Biomass/(g/L)	27.7	24.7	26.7	24.9	26.9	27.3	25.4	25.0
Final pH	3.8	3.8	3.6	3.4	3.5	3.8	3.8	3.0

结果表明发酵基础培养基的淀粉水解物 DE 值的变化对转化率的影响较小,在 30~50 范围内均可,流加补料液的淀粉水解物 DE 值需略高些,以 50~60 为宜。在发酵基础培养基中淀粉水解物 DE 值为 35~40,流加补料液淀粉水解物 DE 值为 50~60 时发酵转化率较高,可达 76%;如果基础培养基和流加补料液中的淀粉水解物 DE 值相同时,转化率较低。淀粉水解物的 DE 值的变化对发酵终了的生物量、pH 和残糖无明显地影响。

2.5 流加补料方式的比较

在培养基、发酵条件、补料液组成等基本相同的条件下,采用不同流加方式进行补料发酵。分别采用以下流加方式:

间歇定量流加:发酵到 60h,开始每隔 12h 流加 500mL 补料液,共流加 4 次。

间歇递减流加:发酵到 60h,开始每隔 12h 流加补料液,每次分别为 800、600、400 和 200mL。

连续恒速流加:在批式发酵过程中,测得的底物消耗速率为 708.3mg/(L·h)。在发酵到 60h 时开始按此速度流加补料液,维持发酵液中的底物浓度约为 50mg/mL 的水平,流加到 120h。其结果列于表 4。

在 3 种流加方式中,间歇定量流加发酵的残糖最低,其它 2 种流加方式发酵的残糖基本相同;流加方式对多糖发酵没有十

表 4 流加方式对发酵的影响

Table 4 Effect of feed model on fermentation of pullulan

Feed model	FBF	SBF	CCF
Conc. of starch hydralyste in the basic medium/ %	6.73	6.94	6.33
Conc. of starch hydralyste in the feed solution/ %	28.8	29.3	27.2
Finished feed time/h	96.0	96.0	120.0
Conc. of pullulan in the fermentation broth/(mg/mL)	70.5	66.7	60.0
Conversion yield/ %	63.3	61.2	60.3
Residual sugar (mg/mL)	0	5.1	5.6
Biomass/(g/L)	26.7	27.1	24.3
Final pH	3.5	3.6	3.7

FBF: Fixed batch feed, SBF: Successive batch feed, CCF: Continuous constant feed

分明显地影响,相比之下间歇定量流加的转化率略高些;流加方式对发酵过程的生物量和 pH 无明显影响。从流加操作的复杂程度来比较,间歇定量流加补料最简单,易操作。

2.6 流加间隔时间的影响

按间歇定量流加方式补料,控制流加补料的间隔时间,其结果如表 5。

补料流加间隔时间在 4~12h 范围内,增加补料间隔时间普鲁兰发酵的转化率略有增加,间隔时间超过 12h,增加到 16h 时,转化率下降,残糖也会增加;

表 5 流加间隔时间对发酵的影响

Table 5 Effect of feed interval on fermentation of pullulan

Feed interval/h	4	8	12	16
Conc. of starch hydralyste in the basic medium/ %	6.64	6.79	6.93	6.25
Conc. of starch hydralyste in the feed solution/ %	28.6	26.4	27.8	29.5
Volume of feed solution for every time/L	0.20	0.33	0.5	0.67
Finished feed time/h	96	100	96	108
Conc. of pullulan in the fermentation broth/(mg/mL)	62.29	67.27	70.5	63.98
Conversion yield/ %	61.50	62.80	64.15	58.70
Residual sugar/(mg/mL)	4.20	5.30	0.00	8.80
Biomass/(g/L)	25.80	26.10	26.70	24.60
Final pH	3.5	3.7	3.5	3.5

流加间隔时间加大使每次流加的补料液量增加,发酵液中的底物量高低波动大,过量的底物对发酵有一定的抑制作用,对产物的合成不利。从表中的结果也可以看出,每次流加补料液的最适体积为 500mL,如果超过这个数量,即使延长补料间隔时间,也不利于多糖的发酵。除了在淀粉水解物 DE 值对发酵影响的研究中,在发酵基础培养基和流加补料液中使用了 DE 值不同的淀粉水解物外,其它研究中均使用了相同的 DE 值的淀粉水解物。从其结果比较中可以发现,在发酵基础培养基和流加补料液中使用相同 DE 值的淀粉水解物时普鲁兰发酵转化率较低,在批式发酵中也反映出这种现象。说明在菌体生长和合成产物初期需要较低 DE 值的淀粉水解物,在菌体生长完成之后,进入产物合成期,需要 DE 值较高的底物。

2.7 流加补料发酵过程

在以上实验确定的最适发酵体积下,间歇流加补料发酵实验,定时取样进行测定,较高如图 1。在普鲁兰流加补料发酵过程中,补料之前的 60h 之内底物消耗很快,消耗速率达到 $0.923\text{g}/(\text{L}\cdot\text{h})$,生物量和多糖基本呈指数状态增加,60h 之后,开始流加补料,生物量增加速度趋于缓慢,而多糖合成速度进一步增加,补料流加完毕,发酵到 120h,由于底物充足,多糖合成速度基本保持不变。之后,底物浓度在 $25\text{mg}/\text{mL}$ 以下,多糖的合成速度很快降低。这一事实说明充分利用发酵前期产生的细胞合成产物的能力,供给足够的底物可以推动产物合成,提高产量、底物转化率和生产效率。在发酵的前 24h 内,发酵液的 pH 快速下降,以后逐渐趋于稳定在 $\text{pH}3.5$,这为后期发酵和流加补料防止污染有一定好处。

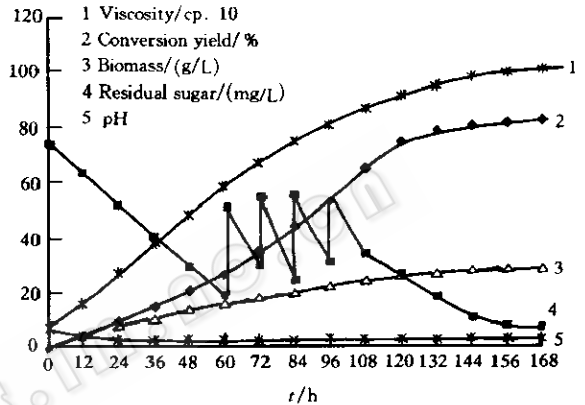


图 1 流加补料发酵过程

Fig. 1 Course of feed-batch fermentation of pullulan

参 考 文 献

- [1] S. Yuen. *Process Biochemistry*, 1974, Nov. 7~10.
- [2] Paul Francon. *Biotechnol. Adv.*, 1986, 4(2):245~59.
- [3] P. A. J. Gorin, J. B. Berhter. In: G. O. Aspinall ed, *The Polysaccharides*, New York: Academic Press, 1983, Vol. 2:412~490.
- [4] I. W. Sutherland. *Biotechnology of Microbial Exopolysaccharides*, Cambridge: Cambridge University Press, 1990.
- [5] 孙万儒. *淀粉水解工业*, 1992, 2:24~26.
- [6] 徐纯锡,任永娥,淡家林. *微生物学通报*, 1983, 10(3):109~112.
- [7] Y. Chul Shin. *Biotechnol Letts*, 1987, 9:612~624.
- [8] 张惟杰,《复合多糖的生化研究技术》,北京:科学出版社,1998, pp. 1~9.
- [9] 江 宁,孙万儒. *生物工程学报*, 1991, 7(3):252~256.
- [10] 孙万儒,周铁锁,谢浩旭等. *生物工程学报*, 1994, 10(4):346~350.

Studies on Feed Batch Fermentation of Pullulan

Sun Wanru Zhou Tiesuo Xie Haoxu Jiang Ning Ren Yonge

(*State Key Laboratory of Microbial Resource, Institute of Microbiology, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080*)

Abstract Investigation for effect of feed model, start feed time, feed interval and composition of feed solution on parameters of fermentation process such as concentration of pullulan in the fermentation broth, conversion yield, biomass, dissolved oxygen, pH and viscosity of the fermentation broth, as well as molecular weight of produced pullulan were carried out by optimization of batch fermentation. Optimum condition for batch feed fermentation of pullulan were determined. It found that the fixed batch feed was the best model which 30% DE 50~60 starch hydrolysate solution contained 0.125%~0.15% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ was feed in the interval time 12h after 60h of fermentation. 70% of conversion yield and 100kD of average molecular weight of produced pullulan were achieved.

Key words Pullulan, feed batch fermentation, starch hydrolysate