

## 氨水流加用于粪产碱杆菌热凝胶发酵

吴剑荣, 詹晓北, 刘惠, 郑志永

江南大学生物工程学院 工业生物技术教育部重点实验室, 无锡 214122

**摘要:** 热凝胶是粪产碱杆菌(*Alcaligenes faecalis*)在氮源限制条件下生成的水不溶性胞外多糖, 分泌到胞外后就附着在菌体外壁, 因此在细胞生长期提高生物量对促进热凝胶合成有重要意义。热凝胶分批发酵时, 起始  $\text{NH}_4\text{Cl}$  浓度提高到 3.6 g/L 时能促进菌体生长和热凝胶合成, 但是过量  $\text{NH}_4\text{Cl}$  会抑制热凝胶合成, 且生物量提高不是很明显。为了进一步提高菌体浓度, 在菌体生长期, 氨水取代 NaOH 溶液进行流加控制 pH 为 7.0, 随后又用 2 mol/L NaOH 控制 pH 5.6。实验表明, 氨水流加使菌体浓度大大提高, 流加 24 h 使菌体浓度达到 18.8 g/L。但是菌体浓度过高也会抑制热凝胶的合成, 在氨水流加 14 h 时, 菌体浓度在 11.9 g/L 左右, 热凝胶产量最高 (72 g/L)。

**关键词:** 热凝胶, 粪产碱杆菌, 分批发酵, 氨水

## Enhanced Production of Curdlan by *Alcaligenes faecalis* by Selective Feeding with Ammonia Water during the Cell Growth Phase of Fermentation

Jianrong Wu, Xiaobei Zhan, Hui Liu, and Zhiyong Zheng

The Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China

**Abstract:** Curdlan is a water insoluble exopolysaccharide produced by *Alcaligenes faecalis* under nitrogen-limiting conditions. After excretion, the polysaccharide is attached the cell wall. Thus enhancement of biomass production during the cell growth phase is important to curdlan production. A strategy of increasing nitrogen source to improve biomass production was adopted for curdlan production by *Alcaligenes faecalis* (ATCC 31749). In the batch fermentation of curdlan, a relatively higher  $\text{NH}_4\text{Cl}$  level of 3.6 g/L with continuous glucose feeding increased the cell density leading to improvement of curdlan production. However, excessive  $\text{NH}_4\text{Cl}$  would inhibit curdlan production and biomass production was not improved significantly. In addition, feeding of ammonia water at the initial phase replaced NaOH solution to control pH at 7.0. Subsequently, feeding of NaOH solution was resumed to control pH at 5.6 for curdlan production after ammonia was consumed. As a result, biomass production and curdlan yield were both enhanced remarkably. Feeding of ammonia water during the first 24 h led to biomass production of 18.8 g/L. However, higher cell density did not lead to increase in curdlan production. The maximum curdlan production (72 g/L) was obtained by feeding ammonia water for the first 14 h, during which the cell density was about 11.9 g/L.

**Keywords:** curdlan, *Alcaligenes faecalis*, batch fermentation, ammonium

**Received:** January 15, 2008; **Accepted:** March 12, 2008

**Supported by:** the Natural Science Foundation of China (No. 20676055), National High Technology Research and Development Program of China (No. 2006AA02Z207).

**Corresponding author:** Xiaobei Zhan. Tel: +86-510-85918299; E-mail: xbzhan@jiangnan.edu.cn

国家自然科学基金(No. 20676055)和国家高新技术 863 项目(No. 2006AA02Z207)资助。

热凝胶是一类由 *Agrobacterium species* 或 *Alcaligenes faecalis* 在氮源限制条件下产生的水不溶性 $\beta$ -(1, 3)葡聚糖<sup>[1]</sup>。目前, 已经有许多关于热凝胶特殊生物活性的报道, Jagodzinski 等<sup>[2]</sup> 报道了热凝胶的硫酸酯衍生物具有抗艾滋病病毒的活性, 并且副作用特别小。Mikio 等<sup>[3]</sup>发现热凝胶与缩水甘油反应生产的衍生物具有优良的抗病毒活性, 毒性很小。Evans 等<sup>[4]</sup>报道了一种低毒性热凝胶衍生物具有显著的抗裂殖细胞侵染活性, 是一种用以治疗疟疾的潜在辅助药物。因此, 热凝胶和其衍生物在医药产业具有广阔的应用前景。此外, 热凝胶具有加热成胶和亲水性, 在食品中也大量应用<sup>[5]</sup>。热凝胶溶液在加热冷却后可以形成坚固胶体; 加热 60°C 可以形成低固胶, 加热到 80°C 可以形成高固胶。

关于提高热凝胶产量的报道已经有很多。1982 年, Lawford 等<sup>[6]</sup>首先提出了一个两阶段热凝胶连续发酵工艺, 即第一个氮源限制恒化器的培养液进入到第二个有葡萄糖流加的体积放大的反应器。1997 年, Lee 等<sup>[7]</sup>用蔗糖或糖蜜进行热凝胶发酵研究, 使用两步补料发酵工艺, 其中第一步用来培养细菌, 第二步再以氮源限制来次级热凝胶合成。另外, 有其他几个研究小组研究了尿嘧啶添加、搅拌速率、磷酸盐和 pH 控制对热凝胶合成的影响<sup>[8-11]</sup>。1999 年, Kim 等<sup>[12]</sup>报道了氮源限制条件下细胞内高浓度的 UMP 可以促进碳源流向热凝胶的合成。随后 West<sup>[13]</sup>发现在 *Agrobacterium sp.* 发酵 48 h 后添加尿嘧啶或胞嘧啶可以提高热凝胶产量。近来, Kim 等<sup>[14]</sup>获得一个高产热凝胶的突变菌株, 在 300 L 中试发酵罐的热凝胶浓度可以达到 76 g/L。Zheng 等<sup>[15]</sup>对 *Alcaligenes faecalis* 产热凝胶的能量代谢进行分析, 发现细胞内部的能量效率决定了热凝胶合成的速率, 而不是底物供给。

在我们预实验中发现, 起始  $\text{NH}_4\text{Cl}$  浓度如果从 1.1 g/L 提高 3.6 g/L, 热凝胶的产量提高 52%且生物量提高 2 倍<sup>[16]</sup>。热凝胶是水不容性的微生物多糖, 且合成之后附着在菌体胞外。因此, 正如前人研究分阶段或者两步发酵那样, 必须先提高菌体浓度然后进入一个氮源限制状态才可以提高热凝胶产量。细胞生长需要有足够的氮源, 但是热凝胶的合成需要氮源限制的环境。本研究旨在提出一种新的 pH 控制和提高生物量的策略, 即使用氨水流加进行 pH 控制, 在菌体生长期提高生物量, 之后又回到 NaOH 控制 pH

并开始流加葡萄糖, 这样大大提高了热凝胶的产量。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株与培养基

菌种: 粪产碱杆菌 WX-C12(*Alcaligenes faecalis* var. *myxogenes*), 江南大学牛化工实验室保藏。

斜面培养基(g/L): 葡萄糖 40, 酵母膏 5.0, 琼脂 2,  $\text{CaCO}_3$  10, pH 7.0~7.2。

种子培养基(g/L): 葡萄糖 20, 酵母膏 1.0,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.74,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.05, pH 7.0。

发酵培养基(g/L): 葡萄糖 50, 酵母膏 1.0,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2.7,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5,  $\text{CaCO}_3$  5, 10 mL 无机盐浓缩液, pH 7.0~7.2。

### 1.2 培养条件

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

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, 30°C、200 r/min 摇床培养 18 h。

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°C 培养, 溶氧控制在 15%以上。在细胞生长期用 4 mol/L NaOH 或者 28%氨水控制 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

热凝胶产量测定: 取 20 mL 发酵液, 于 8000 r/min, 离心 20 min, 向离心得到的沉淀中添加 1 mol/L 的 NaOH 20 mL, 振荡放置 3 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, 得到半透明的凝胶。再离心, 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。

菌体浓度测定: 对于每批发酵结束后样品中的菌体量, 用干重法测定。同热凝胶分析方法, 对提取热凝胶后的沉淀物, 加 3 mol/L 盐酸溶解其中的  $\text{CaCO}_3$ , 反复洗涤, 烘干, 称量, 计算菌体浓度。

氨氮含量测定: 靛酚蓝-次氯酸钠分光光度法<sup>[19]</sup>

残糖测定: DNS 法<sup>[18]</sup>

### 1.4 凝胶强度测定

称取 2 g 粉末热凝胶样品, 用 100 mL 水溶胀 4 h, 将溶胀后的悬浮液在料理机中高速搅打 1 min, 再

90°C 沸水浴 10 min, 自来水冷却, 静置 30 min 后用 TA.XT21 物性测试仪测定凝胶强度。方式(Mode): Force, 探头(Probe): P 0.5 DIA CYLINDER EBONITE, 探头移动距离(Distance): 20 mm, 移动速度(Speed): 1 mm/s。

## 2 结果与讨论

### 2.1 粪产碱杆菌的热凝胶分批发酵

热凝胶是典型的次级代谢产物(如图 1), 当  $\text{NH}_4\text{Cl}$  消耗完, 细胞停止生长并维持一个稳定状态。热凝胶就是在氮源消耗完之后才开始合成的, 其产量持续增加, 直到葡萄糖被完全利用。最终的生物量和热凝胶分别是 2.5 g/L 和 28.8 g/L。热凝胶发酵是典型的两阶段发酵, 因此在细胞生长期提高  $\text{NH}_4\text{Cl}$  浓度可以促进菌体生长和热凝胶产量。

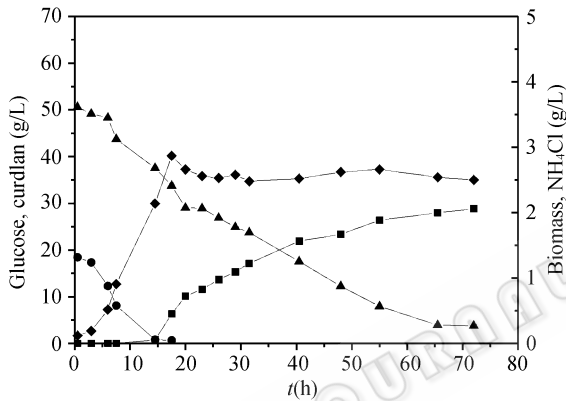


图 1 热凝胶分批发酵过程曲线

Fig. 1 Batch fermentation profile of curdlan by *Alcaligenes faecalis*  
(Initial  $\text{NH}_4\text{Cl}$  1.1 g/L; caption: ▲ glucose, ◆ biomass, ■ curdlan, ●  $\text{NH}_4\text{Cl}$ )

### 2.2 起始 $\text{NH}_4\text{Cl}$ 对热凝胶补料分批发酵的影响

为了提高生物量以促进热凝胶合成, 起始的  $\text{NH}_4\text{Cl}$  提高到 1.6 g/L 或 3.6 g/L, 并且当葡萄糖浓度低于 10 g/L 时添加葡萄糖(总共 400 g)。如图 1A 所示, 当起始  $\text{NH}_4\text{Cl}$  为 3.6 g/L 时, 热凝胶和生物量在 120 h 分别达到 39.6 g/L 和 5.1 g/L。对于起始  $\text{NH}_4\text{Cl}$  为 1.6 g/L 的热凝胶发酵, 热凝胶和生物量在 120 h 分别达到 30.9 g/L 和 3.0 g/L。前者, 葡萄糖快速消耗并在 24 h 降到 9.6 g/L; 对于后者, 葡萄糖消耗较为缓慢, 培养基中的葡萄糖到 48 h 才降到 9.6 g/L。根据以上结论, 较高的起始  $\text{NH}_4\text{Cl}$  浓度(3.6 g/L)能

更好的支持细胞生长, 提高热凝胶产量。但是, 根据我们以前的实验来看, 在热凝胶分批发酵中起始  $\text{NH}_4\text{Cl}$  浓度高于 3.6 g/L 时, 残留的铵离子会抑制热凝胶合成<sup>[12]</sup>。因此, 为了避免铵离子在培养基中积累, 我们采取了氨水流加策略以促进菌体生长, 并且在后期控制氮源限制条件, 以提高热凝胶产量。此外, 尽管分批式流加葡萄糖可以创造一个高 C/N 条件来促进多糖合成, 但是底物浓度的突然改变可能会造成细胞的不适应, 降低了细胞产热凝胶的活力。因此我们采用底物连续流加或者变速流加方式。

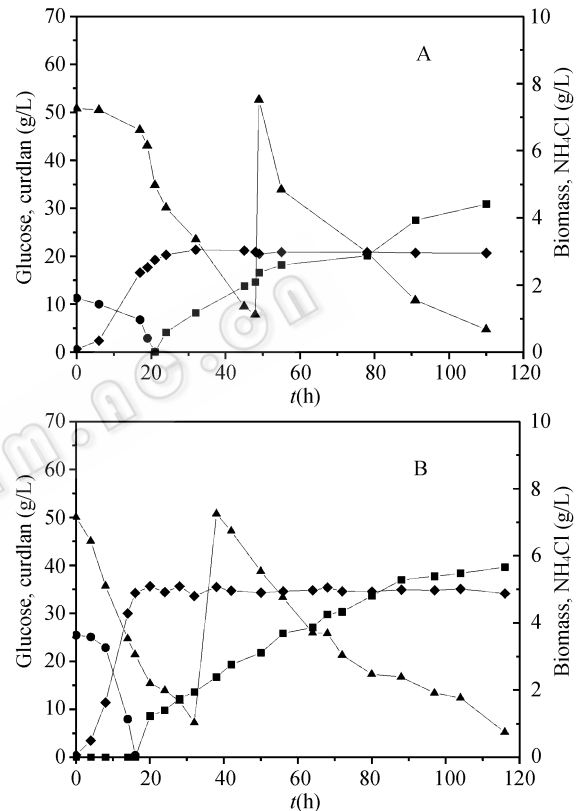


图 2 不同起始氮源对热凝胶补料分批发酵的影响

Fig. 2 Fed-batch fermentation profile of curdlan  
(A: initial  $\text{NH}_4\text{Cl}$  1.6 g/L; B: initial  $\text{NH}_4\text{Cl}$  3.6 g/L; C: ▲ glucose, ◆ biomass, ■ curdlan, ●  $\text{NH}_4\text{Cl}$ )

### 2.3 氨水流加控制 pH 对热凝胶发酵的影响

热凝胶分批发酵需要一个氮源限制条件以促进多糖合成。但是细胞生长需要消耗氮源, 如核酸、蛋白质等的合成需要氮源。以前我们控制 pH 都是用 NaOH 来控制菌体生长期 pH 为 7.0, 热凝胶合成期 pH 为 5.6。现在我们采用氨水流加来替代 NaOH 控制菌体生长期的 pH 值, 这样培养基中的铵离子可提供给细胞生长所需的氮源。在菌体生长期结束后, pH 控制又切换到 NaOH 来控制 pH 为 5.6。

为了维持 C/N 平衡和细胞生长, 起始  $\text{NH}_4\text{Cl}$  浓度和葡萄糖降低到 0.5 g/L 和 30 g/L。氨水自动连续流加进行 pH 控制, 并在 10 h、14 h、16 h、20 h 和 24 h 结束氨水流加。当培养基中葡萄糖浓度低于 20 g/L 时开始流加葡萄糖溶液。在菌体生长期, 葡萄糖浓度大概维持 15~20 g/L; 随后在热凝胶合成期, 葡萄糖流加固定在 1.2 g/(L/h)。

如图 3 所示, 菌体浓度随着氨水流加量增加而大大提高了, 最大菌体浓度出现在对数生长期结束时, 随后菌体几乎维持恒定。对应不同氨水流加时间, 最大菌体浓度分别是 7.5 g/L, 11.9 g/L, 15.2 g/L, 16.4 g/L 和 18.8 g/L。但是最大的热凝胶产量 72g/L 是在氨水流加 14h 中获得的。当氨水流加超过 14h, 菌体浓度虽然

提高了, 但是热凝胶产量却反而下降(如表 1)。

我们开始假设认为较高的细胞浓度将会提高热凝胶产量。但相反的是, 当细胞浓度超过 15.2 g/L, 热凝胶产量反而降低, 且热凝胶的凝胶强度也减少了。氨水的连续流加是可以提高菌体浓度, 但是它也可能破坏了培养基中一定的 C/N 平衡关系, 结果导致热凝胶产量的下降和凝胶强度的损失。凝胶强度是和分子量大小有关, C/N 平衡的破坏可能导致热凝胶分子合成的不完全。只有在合适的细胞生理状态(氮源限制), 细胞才能大量合成具有一定分子量的长链热凝胶聚合物。另外, 高细胞浓度也会造成发酵液粘稠状态, 造成传质和传氧不足, 导致细胞死亡和自溶。培养基中过量氮源也可能会刺激生长细胞活力, 阻碍

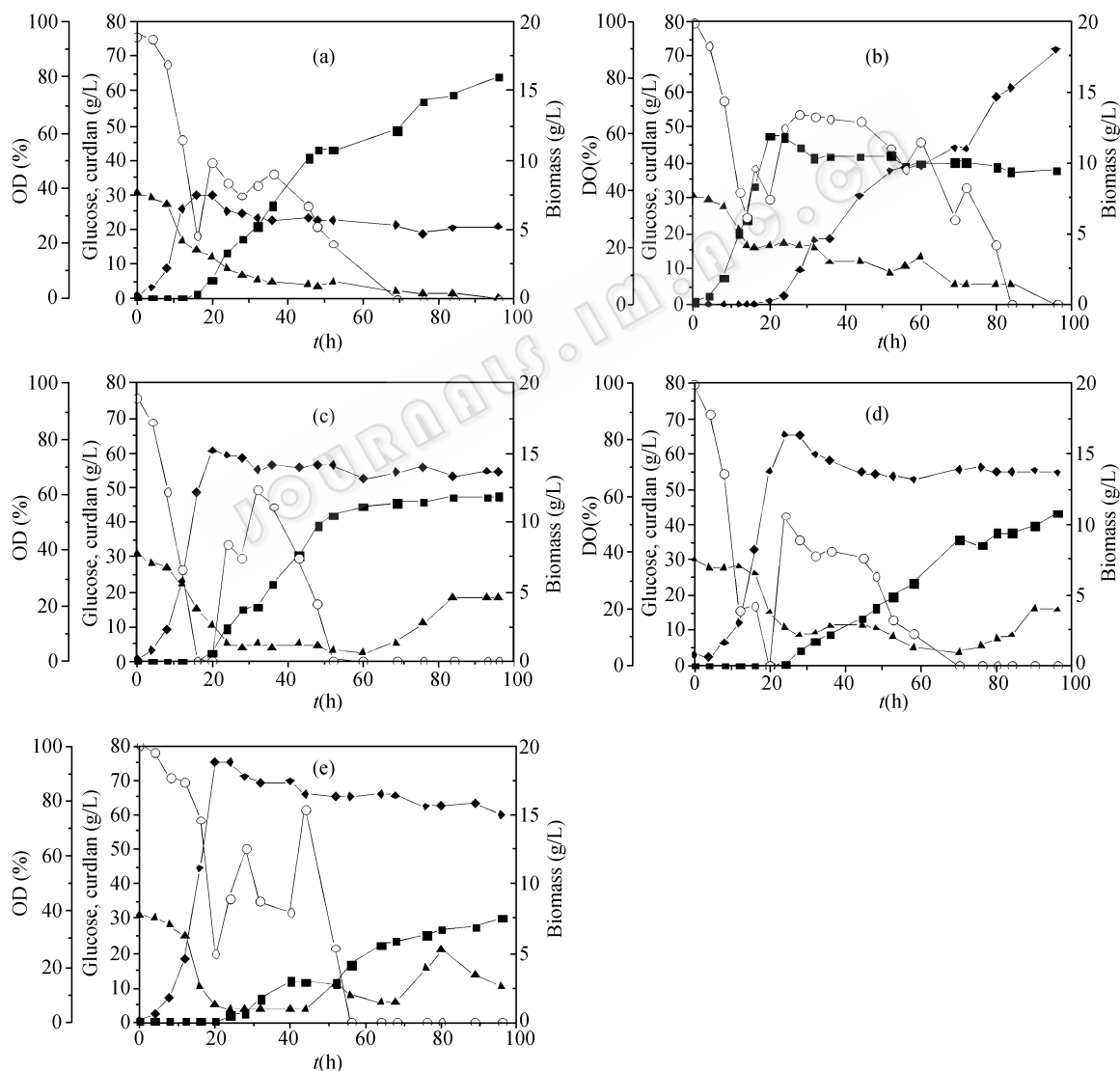


图 3 氨水流加 pH 控制对连续补料热凝胶分批发酵的影响

Fig. 3 Continuous fed-batch fermentation of curdlan with pH control by ammonia water feeding at initial cell growth phase Ammonia water feeding of 10 h (a), 14h (b), 16 h (c), 20 h (d), 24h (e); caption: ▲, glucose; ◆, biomass; ■, curdlan; ○, DO

表 1 氨水流加热凝胶分批发酵的动力学参数

Table 1 Kinetic parameters for fed-batch fermentation of curdlan with ammonia water feeding

Batch	Total glucose concentration (g/L)	Ammonia waterfeeding time (h)	Maximal cell density (g/L)	Final curdlan production (g/L)	Gel strength (g/cm <sup>2</sup> )	Yield (%)
1	123.3	10	7.5 ± 0.37	64.3 ± 3.0	910 ± 42	52.1
2	118.9	14	11.9 ± 0.62	72.0 ± 3.6	840 ± 40	60.6
3	125.9	16	15.2 ± 0.72	47.6 ± 2.5	560 ± 26	37.8
4	118.9	20	16.4 ± 0.74	43.2 ± 2.1	580 ± 28	36.3
5	125.9	24	18.8 ± 0.81	30.2 ± 2.4	550 ± 32	24.0

热凝胶的合成, 因此细胞膜的合成会占用大量的脂载体用于运载糖核苷酸。而且, 大量细胞的维持将会消耗大量的葡萄糖, 如图 3 所示残糖和 DO 曲线。在图 3e 中, 高细胞活力消耗大量氧气而导致 DO 在 56 h 降为零, 残糖在 80 h 时葡萄糖停止流加后很快就降低, 尽管期间热凝胶增加不多。

### 3 结论

对于热凝胶分批补料发酵, 较高的 NH<sub>4</sub>Cl 浓度可以提高菌体浓度和热凝胶产量, 且葡萄糖连续流加进一步促进热凝胶的产率。用氨水流加方式控制菌体生长期的 pH 大大提高了生物量, 并提高后期热凝胶产量。氨水流加到 14 h 时的生物量为 11.9 g/L, 相比于普通分批发酵, 热凝胶产量几乎翻倍。

### REFERENCES

- [1] Harada T, Fujimori K, Hirose S, *et al.* Growth and glucan 10C3K production by a mutant of *Alcaligenes faecalis* var. *myxogenes* in defined medium. *Agric Biol chem*, 1966, **30**: 764–769.
- [2] Jagodzinski PP, Wiaderkiewicz R, Kurzawski G, *et al.* Mechanism of the inhibitory effect of curdlan sulfate on HIV-1 infection *in vitro*. *Virology*, 1994, **202**: 735–745.
- [3] Mikio K, Yoshiro O, Hiroto O, *et al.* Water soluble  $\beta$ -(1,3)-glucan derivative and antiviral agent containing the derivative. Japan patent, 07228601, 1995.
- [4] Evans SG, Morrison D, Kaneko Y, *et al.* The effect of curdlan sulfate on development *in vitro* of *Plasmodium falciparum*. *Trans R So Trop Med Hyg*, 1998, **92**: 87–89.
- [5] Sutherland IW, Ellwood DC. Microbial exopolysaccharide-industrial polymers of current and future potential. In: Bull AT, Ellwood DC, Ratledge C (eds.). *Microbial Technology*. London: Society for General Microbiology, 1979.
- [6] Lawford HG, Phillips KR, Lawford GR. Two stage continuous process for the production of thermogelable curdlan-type exopolysaccharide. *Biotechnol Lett*, 1982, **4**: 689–694.
- [7] Lee IY, Seo WT, Kim MK, *et al.* Production of curdlan using sucrose or sugar cane molasses by two-step fed-batch cultivation of *Agrobacterium* species. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 1997, **18**: 255–259.
- [8] Lee JH, Lee IY, Kim MK, *et al.* Optimal pH control of batch process for production of curdlan by *Agrobacterium* species. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 1999, **23**: 143–148.
- [9] Kim MK, Lee IY, Lee JH, *et al.* Residual phosphate concentration under nitrogen-limiting conditions regulates curdlan production in *Agrobacterium* species. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2000, **25**: 180–183.
- [10] Lee JH, Lee IY. Optimization of uracil addition for curdlan ( $\beta$ -1 $\rightarrow$ 3-glucan) production by *Agrobacterium* sp. *Biotechnol Lett*, 2001, **23**: 1131–1134.
- [11] Lee IY, Kim MK, Lee JH, *et al.* Influence of agitation speed on production of curdlan by *Agrobacterium* species. *Bioprocess Eng*, 1999, **20**: 283–287.
- [12] Kim MK, Lee IY, Ko JH, *et al.* Higher intracellular levels of uridinemonomophosphate under nitrogen-limited conditions enhance metabolic flux of curdlan synthesis in *Agrobacterium* species. *Biotechnol Bioeng*, 1999, **62**: 317–323.
- [13] West TP. Pyrimidine base supplementation effects curdlan production in *Agrobacterium* sp. ATCC 31749. *J Basic Microbiol*, 2006, **46**: 153–157.
- [14] Kim MK, Ryu KE, Choi WA, *et al.* Enhanced production of  $\beta$ -(1,3)-D-glucan by a mutant strain of *Agrobacterium* species. *Biochem Eng J*, 2003, **16**: 163–168.
- [15] Zheng ZY, Lee JW, Zhan XB, *et al.* Effect of metabolic structures and energy requirements on curdlan production by *Alcaligenes faecalis*. *Biotechnol Bioproc Eng*, 2007, **11**: 395–365.
- [16] Sun YS, Wang L, Zhan XB, *et al.* Influence of nitrogen source NH<sub>4</sub>Cl concentration on curdlan production in *Alcaligenes faecalis*. *Chinese J Biotech*, 2005, **21**: 328–332. 孙永生, 王磊, 詹晓北, 等. 氮源 NH<sub>4</sub>Cl 浓度对粪产碱杆菌发酵生产热凝胶的影响. *生物工程学报*, 2005, **21**: 328–331.
- [17] Wang L, Zhan XB, Zhu YH, *et al.* Influence of pH control on the production of curdlan by *Alcaligenes faecalis*. *Chinese J Biotech*, 2002, **18**: 634–637. 王磊, 詹晓北, 朱一晖, 等. pH 控制对热凝胶发酵的影响. *生物工程学报*, 2002, **18**(5): 634–637.
- [18] Sumner JB, Somers GF. Dinitrosalicylic method for glucose. In: Sumner JB, Somers GF (eds.). *Laboratory Experiments in Biological Chemistry*. New York: Academic Press, 1949.
- [19] Harwood JE, Huysen DJ. Automated analysis of ammonia in water. *Water Res*, 1970, **4**: 695–704.