

发酵过程中溶氧浓度对 D-核糖发酵的影响

于志萍¹ 王昌禄^{1,2} 顾晓波¹ 杨志岩¹

(天津科技大学食品科学与生物工程学院 天津 300222)¹

(天津大学化工学院 天津 300057)²

摘要: 通过固定不同溶氧浓度 (DOT) 对短小芽孢杆菌 (*Bacillus pumilus*) 进行分批发酵的过程参数变化的比较, 发现发酵前期与后期对氧的需求不尽相同, 探讨了氧代谢途径及溶氧浓度对核糖发酵的影响机理, 并提出分阶段供氧模式。结果表明, 发酵时间 44 h 后, 整个发酵过程保持了较高的核糖产率和葡萄糖消耗率, 最终核糖产量和细胞生成量分别提高了 5.0% 和 18.8%。

关键词: 溶氧浓度, D-核糖, 短小芽孢杆菌

中图分类号: TQ 939.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2004) 03-0021-05

The Effect of Dissolved Oxygen Tension on the Fermentation of D-ribose

YU Zhi-Ping¹ WANG Chang-Lu^{1,2} GU Xiao-Bo¹ YANG Zhi-Yan¹

(Department of Food Science and Biology Engineering, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300222)¹

(Department of Chemistry Engineering, Tianjin University, Tianjin 300057)²

Abstract: After comparing the varieties of parameters in batch culture under different dissolved oxygen tension by *Bacillus pumilus*, we found that the demand of cell on oxygen in different phase isn't consistent. Based on the analysis of the metabolic pathway of oxygen and the mechanism of the effect of dissolved oxygen tension on fermentation of D-ribose, a two-stage oxygen-supply control mode was proposed and experimentally proved to be available. High ribose yield and high glucose consumption rate were achieved during whole process for 44h, and the ultimate ribose concentration and cell concentration were 5.0% and 18.8% higher than former respectively.

Key words: Dissolved oxygen tension, D-ribose, *Bacillus pumilus*

D-核糖是生物体内核糖核酸 (RNA) 的重要组成成分, 也是各种核苷酸辅酶的组成糖, 具有重要的生理作用^[1,2]。在工业生产中, 人们以 D-核糖为原料通过半合成法生产核黄素, 能够大大降低生产成本。此外, 它还可以作为合成其他药物的前体。近年来, 核酸药物的发展带动了由 D-核糖合成抗病毒、抗肿瘤核苷酸药物的研究, 使得可作为原料的 D-核糖显得更加重要^[3]。D-核糖本身也具有一定的医疗作用, 研究表明 D-核糖具有护心、养心功能, 可以加速心肌和骨骼肌中 ATP 的合成、促进能量代谢, 对提高运动员的竞技水平以及对心血管疾病患者的治疗具有良好的疗效^[4]。所以工业化生产 D-核糖技术的开发具有广泛的应用前景。

溶氧浓度 (DOT) 作为通风发酵控制中的一个关键参数, 直接影响着生产过程和生产成本, 一直受到工业生产和实验室研究的重视, 由于短小芽孢杆菌转酮酶缺失突变

株属于好氧微生物,虽然溶氧较高相对会好,但在不同 DOT 条件下仍具有不同的生理特性,深入探讨溶氧水平对核糖发酵的影响十分必要。

1 材料与方 法

1.1 菌株

短小芽孢杆菌转酮酶缺失突变株 SY-5,由短小芽孢杆菌 FBL 04 (*his⁻*, *ade⁻*) 诱变而得(天津科技大学食品生物技术研究室保藏)。

1.2 培养基

1.2.1 种子培养基:葡萄糖 20.0 g,玉米浆 20.0 g,磷酸氢二钾 3.0 g,磷酸二氢钾 1.0 g,定容至 1 L, pH 值 7.0~7.2。

1.2.2 发酵培养基:葡萄糖 180.0 g,玉米浆 28.0 g,硫酸锰 0.3 g,硫酸镁 0.3 g,硫酸铵 13.0 g,碳酸钙 20.0 g,定容至 1 L, pH 值 7.0~7.2。

1.3 培养方 法

在新鲜斜面上接一环菌入种子培养基(50 mL/500 mL 三角瓶),37℃、180 r/min 下培养至对数后期,以 10% 接种量接入 5 L 发酵罐。装液量 2.5 L,通气量 200 L/h。在发酵过程中通过控制不同搅拌转速来实现不同的溶氧浓度(DOT)进行发酵。

1.4 分析方 法

1.4.1 D-核糖测定方 法:苔黑酚显色法^[5]。

1.4.2 葡萄糖测定方 法:SBA 生物传感仪测定。

1.4.3 乳酸、乙酸、2,3-丁二醇:气相色谱法检测(GC-7890 II),柱类型为 GDX-401,柱规格为 2 m×3 mm, FID 检测器。

1.4.4 细胞干重的测定:干重法:将发酵液适当稀释离心后取沉淀,80℃干燥 24h 至恒重,称取重量,计算细胞浓度。比色法:发酵液稀释一定倍数,测得 OD_{600} 数值,其 OD 值与同样条件下干重法获得的数值成线性关系。

2 结果与讨论

2.1 临界溶氧浓度的确定

在发酵过程中停止供气,通过观察发酵体系中 DOT 的变化可以大致确定细胞生长的临界溶氧浓度。从图 1 可以看出,当 DOT 低于 30% 后,耗氧速率开始降低,细胞代谢速率减慢,呼吸强度降低。因此可以认定为 30% 是细胞生长的临界 DOT。

2.2 不同 DOT 下 *B. pumilus* 发酵生产 D-核糖的动力学特征

图 2~4 为在不同 DOT (40%、60% 和 80%)

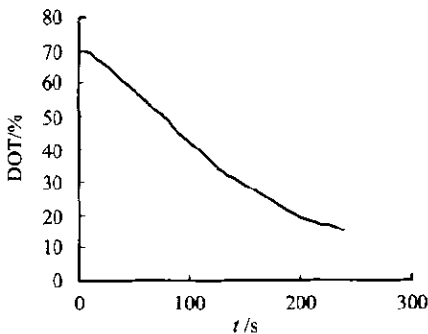


图 1 停止供氧后发酵体系中 DOT 的变化

下 *B. pumilus* 发酵生产 D-核糖过程中细胞干重、葡萄糖、核糖质量浓度的变化曲线。另外,根据式 $Y_{x/s} = dx/ds \approx \Delta x/\Delta s$ 可得到发酵过程中核糖产率的变化曲线,如图 5 所示。

从图 2~5 可以看出:(1)就细胞生长而言,在发酵前期,细胞在适中的 DOT

(60%) 时,表现出较高的生长速率,比生长速率 μ 远远超过其它两种情况;但随着发酵时间的延长,高溶氧浓度显然更加满足细胞对氧的需求,使之长时间保持继续生长的能力,最终细胞干重达到 11.8 g/L。(2) 与之相对应,发酵前期溶氧浓度为 60% 条件下,葡萄糖消耗速度最快,核糖生成速率也最高,但 20 h 以后,高溶氧浓度下葡萄糖继续迅速消耗,且快速生成核糖,最高产量可达 60.4 g/L。(3) 核糖产率随着 DOT 的升高而增大,最高产率分别为 0.2、0.58 和 0.7,只是高溶氧浓度要在发酵中后期才能显示出优势。

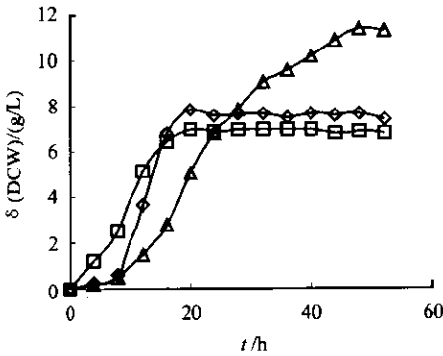


图2 不同 DOT 下的细胞干重的变化曲线
 ◆ 40%, □ 60%, ▲ 80%

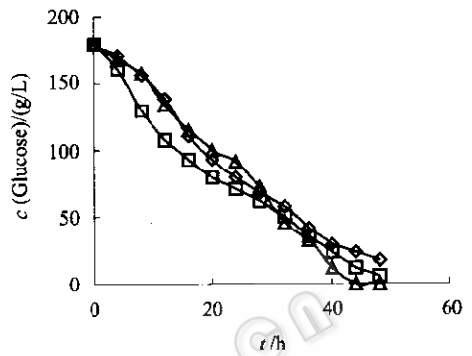


图3 不同 DOT 下葡萄糖浓度的变化曲线
 ◆ 40%, □ 60%, ▲ 80%

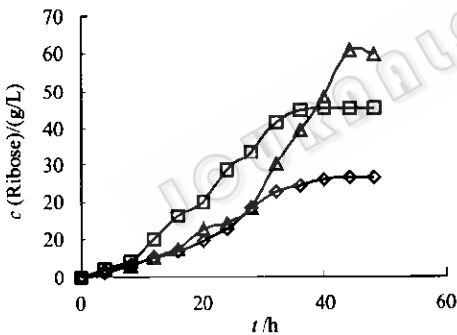


图4 不同 DOT 下核糖浓度的变化曲线
 ◆ 40%, □ 60%, ▲ 80%

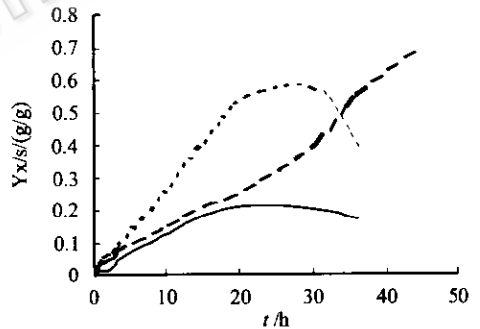


图5 不同 DOT 下核糖产率的变化曲线
 ◆ 40%, □ 60%, ▲ 80%

2.3 氧代谢途径及溶氧浓度影响核糖发酵的机理

在以往对核糖发酵的研究中,关于溶氧如何影响核糖发酵的机理探讨较少。以葡萄糖为底物进行发酵的过程中,核糖的生成在 HMP 途径的氧化阶段,需要经过葡萄糖脱氢酶、6-磷酸葡萄糖脱氢酶和 6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶等 3 种脱氢酶所催化的反应,所以显而易见,从底物生物合成产物微生物需要消耗大量的能量,能量代谢必须畅通。从这个角度出发,核糖发酵应该在高溶氧水平下进行,所得数据证明了该理论。

在芽孢杆菌属细菌中,葡萄糖脱氢酶是一种孢子特有的酶。在高溶氧条件下,葡萄糖脱氢酶的活力增强,随之而来的是不仅核糖的产量会提高而且也增加了孢子产生的可能性。从以往的研究可以知道,在进行核糖发酵时,孢子的形成程度对核糖积累

影响很大，在孢子形成率超过 40% 的培养中，培养液泡沫多，耗糖缓慢，核糖的积累明显减少，因此必须设法抑制孢子形成。这就带来一对矛盾，即既要维持葡萄糖脱氢酶高活力又要抑制孢子生成。

木下—幹^[6]指出在 AICAR (s) 发酵过程中对孢子形成影响较大的期间是发酵培养后 8~12 h，若限制此期间的供氧，就能抑制孢子生成。他认为在由营养细胞形成孢子的一系列反应中，包括有需能较多的反应步骤，存在于菌的对数生长期，若该期间氧不足，就会造成 ATP 的产生不足，抑制孢子形成，结果使菌始终保持营养细胞状态。

从本实验数据及菌体状态发现，虽然在高溶氧情况下，并未生成大量孢子，但细胞生长缓慢，这可能是由于细胞生长初期菌体不茁壮，为了维持高 DOT 而加大转速对菌体有机械损伤作用，从而影响了细胞生长能力。因此在发酵前期 (0~10 h) 营养细胞快速生长的时候，可以考虑采用适中的溶氧浓度。

另有研究表明^[7]，芽孢杆菌属在生产核酸类物质时，主要副产物为：乙酸、2, 3-丁二醇、3-羟基丁酮和乳酸，还有报道可生成苹果酸、柠檬酸和丙酮酸等有机酸。氧的摄取程度直接影响副产物的种类和含量。从测得的副产物来看，低溶氧浓度下，副产物种类及含量较多，以 2, 3-丁二醇、3-羟基丁酮为主的副产物含量较高，乙酸含量不高，但奇怪的是乳酸含量也不是很高，由此推测在限氧情况下，有较多底物经 EMP 途径流经 TCA 循环生成有机酸。随着溶氧浓度的升高，HMP 氧化途径成为主流途径，副产物含量明显降低，只是乙酸产量增大。

2.4 分阶段供氧模式的提出及验证

从图 2~5 发酵过程中各种参数的变化曲线及氧代谢分析可以得出，在发酵过程中控制恒定的溶氧水平，并不能完全达到高产量、高生产强度和高产率的统一。菌体量的生长与产物的形成在某一段时期会发生矛盾，为解决该矛盾，探索更加适宜的供氧方式，作者采用 0~10 h 控制较低的 DOT (60%)；10 h 至发酵结束，提高 DOT 至 80% 且稍增大通风量的方法进行分批发酵，其发酵变化过程曲线如图 6 所示。

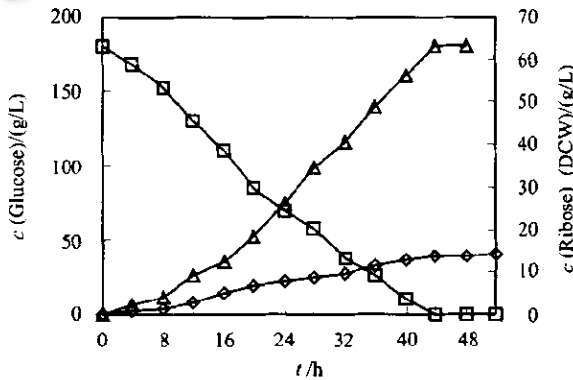


图 6 分阶段控制溶氧发酵过程曲线

—△— Glucose, —◇— DCW, —△— Ribose

由图 6 可以看出，采用分阶段供氧控制模式，能够保持较高的耗糖速度，并且细胞产量 (14.02 g/L) 及核糖产量 (63.1 g/L) 都有所提高，整个发酵过程保持了较高的核糖产率和细胞合成产率，发酵时间约 44 h，与恒定 DOT 在 40%、60% 和 80% 的分批发酵过程比较，表现出较好的发酵状态。

参考文献

- [1] Levene P A, Jacobs W A. *Über Inosinseure Ber*, 1909, **42**: 1198 ~ 1203.
- [2] De Wulf P, Vandamme E J. *Appl Micro Biotechnol*, 1997, **48**: 141 ~ 148.
- [3] 邱蔚然, 高淑红. *工业微生物*, 2000, **30** (1): 58 ~ 62.
- [4] Witter J, Gallagher P, Williamson D, *et al*. Presentation at American College of Sports Medicine 46th Annual Meeting, 1999, 6.
- [5] 伍时华, 张健, 方杰, 等. *广西工学院学报*, 2000, **4**: 55 ~ 60.
- [6] 木下一幹, 丹羽国守, 佐木弘, 等. *农化*, 1973, **47**, 793.
- [7] Dauner M, Sauer U. *Biotechnol and Bioeng*, 2001, **76**: 132 ~ 143.