

# 氧化葡萄糖杆菌合成右旋糖酐糊精酶的 pH 两阶段控制策略

王舒<sup>1</sup> 毛相朝<sup>2\*</sup> 李福利<sup>1</sup> 魏东芝<sup>3</sup>

- (1. 中国科学院青岛生物能源与过程研究所 中国科学院生物燃料重点实验室 山东 青岛 266101)  
(2. 中国海洋大学 食品科学与工程学院 山东 青岛 266003)  
(3. 华东理工大学 生物反应器工程国家重点实验室 鲁华生物技术研究所 上海 200237)

**摘要:** 为了进一步提高氧化葡萄糖杆菌右旋糖酐糊精酶的产量, 在 3 L 发酵罐水平上考察了 pH (3.5–6.0) 对菌体生长和产酶的影响。基于不同 pH 发酵过程中菌体生长及产物合成的变化, 确定了 pH 两阶段控制策略, 即 0–6 h 时控制 pH 5.0, 6 h 后将 pH 调至 4.0。通过采用这一优化策略, 右旋糖酐糊精酶酶活有了较大的提高, 可达 4.03 U/mL, 比不控制 pH 模式下提高了 38.5%, 是摇瓶水平的 12.5 倍, 同时发酵时间从 47 h 缩短为 15 h。

**关键词:** 氧化葡萄糖杆菌, 右旋糖酐糊精酶, 右旋糖酐, pH 分段控制策略

## Two-stage pH control strategy of dextran dextrinase production by *Gluconobacter oxydans* DSM 2003

WANG Shu<sup>1</sup> MAO Xiang-Zhao<sup>2\*</sup> LI Fu-Li<sup>1</sup> WEI Dong-Zhi<sup>3</sup>

- (1. Key Laboratory of Biofuels, Qingdao Institute of Bioenergy and Bioprocess Technology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao, Shandong 266101, China)  
(2. College of Food Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao, Shandong 266003, China)  
(3. State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, New World Institute of Biotechnology, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China)

**Abstract:** In order to enhance the yield of dextran dextrinase (DDase) produced by *Gluconobacter oxydans* DSM 2003, the effects of pH from 3.5 to 6 on cell growth and DDase activity were investigated in a 3 L fermentor. Based on time courses of cell growth and DDase activity, we developed a two-stage pH control strategy, in which pH was controlled at 5.0 for the first 6 h and then 4.0 for remaining time. Under the optimized strategy, the production of DDase had a significant improvement. Moreover, the maximal DDase activity reached 4.03 U/mL, 38.5% and 1147% more than that from the strategy with-

out pH control and in the 250 mL shake flasks, respectively. Meanwhile, the fermentation time of DDase in the fermentor was also shortened from 47 h to 15 h compared to that in 250 mL shake flasks.

**Keywords:** *Gluconobacter oxydans*, Dextran dextrinase, Dextran, pH control strategy

右旋糖酐(Dextran), 又名葡聚糖, 是蔗糖经肠膜状明串珠菌发酵后生成的高分子葡萄糖聚合物。它是最早发现的微生物多糖, 也是美国 FDA 批准的第一种可用于食品的微生物胞外多糖, 是世界上第一个工业化生产的微生物多糖。

右旋糖酐在医药、食品、化工工业均有广泛的应用。医药上右旋糖酐的应用相当普遍, 右旋糖酐胶体液具有扩充血容量、维持血压的功效, 供出血及外伤休克时急救用<sup>[1-2]</sup>。低热的右旋糖酐具有复杂的支链结构, 又称难消化糊精, 是水溶性食物纤维的一种。利用其持水性、粘稠性, 作为低热量食品添加剂, 已用于清凉饮料、果汁饮料、果子酱等的生产<sup>[3]</sup>。在石油工业中, 右旋糖酐可作为油井钻泥添加剂。它也可应用于精细化工, 制成交联葡聚糖凝胶, 目前已广泛应用于分子筛色谱技术中<sup>[2]</sup>。

右旋糖酐糊精酶(Dextran dextrinase, DDase)是 *G. oxydans* 利用麦芽糊精和淀粉部分水解物合成右旋糖酐代谢途径中的关键酶。该酶可催化供体非还原性末端上的  $\alpha$ -1,4 或  $\alpha$ -1,6-吡喃葡萄糖基转移到受体的非还原性末端上, 形成  $\alpha$ -1,4-或  $\alpha$ -1,6-糖苷键<sup>[4]</sup>。近年来, 这种特殊的转糖基酶吸引了越来越多的关注, 日本和比利时等几个研究小组分别对该酶进行了深入的研究, 但其研究主要集中于酶的纯化、催化活性及产物结构等<sup>[5-12]</sup>, 在发酵条件优化及控制方面的研究较少。本文以 *G. oxydans* DSM 2003 为研究对象, 着重考察了不同 pH 控制策略对菌体生长和产酶的影响, 并通过实验证明了 pH 两阶段控制策略的可行性。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株

*Gluconobacter oxydans* DSM 2003, 由本实验室保藏。

### 1.2 培养基

1.2.1 种子培养基(g/L): D-山梨醇 80, 酵母浸粉

20,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5, 初始 pH 6.0。

1.2.2 发酵培养基(g/L)<sup>[13]</sup>: 葡萄糖 17.67, 麦芽糖 30, 胰蛋白胨 12.20, 酵母浸粉 13.53, 硝酸铵 15,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0.01,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.01, NaCl 0.009, 初始 pH 6.0。

### 1.3 培养方法

1.3.1 种子培养: 将保藏菌种接种于装有 50 mL 种子培养基的 250 mL 摇瓶, 置 30 °C、200 r/min 恒温摇床培养 27 h。

1.3.2 摇瓶培养: 按 12.5% (V/V) 的接种量将种子液转接到装 50 mL 发酵培养基的 250 mL 摇瓶中, 置 30 °C、200 r/min 恒温摇床培养。

1.3.3 发酵罐培养: 将培养好的种子以 12.5% (V/V) 的接种量接入四联 3 L 全自动发酵罐(New Brunswick Scientific Co. Inc., 美国)中, 装液量为 1.5 L, 搅拌转速 800 r/min, 通气量 1.0 vvm, 温度 30 °C, 以 NaOH (2 mol/L)和稀盐酸(2 mol/L)调节发酵过程的 pH。

### 1.4 分析方法

1.4.1 菌体浓度的测定: 取发酵液稀释一定倍数, 以用蒸馏水稀释相同倍数的发酵培养基为空白对照, 在波长 600 nm 处测定光密度  $OD_{600}$ 。

1.4.2 DDase 酶活的测定: 将一定量的透性化细胞悬液<sup>[14]</sup>加入到含底物对硝基苯- $\alpha$ -D-吡喃葡萄糖苷(NPG)的磷酸缓冲液(50 mmol/L, pH 6.5)中, 混匀后于 30 °C 保温 30 min, 然后加入碳酸盐缓冲液(1 mol/L, pH 10.7)终止反应并强化显色。10 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 以不含透性化细胞的反应液(用相同体积的透性化试剂代替酶液)为空白对照, 用分光光度计测定  $OD_{410}$ , 计算对硝基酚生成量<sup>[15]</sup>。

酶活单位定义: 在上述反应条件下, 每分钟生成 1  $\mu\text{mol}$  对硝基酚所需要的酶量定义为 1 个酶活单位(U)。

1.4.3 菌体比生长速率计算方法: 菌体比生长速率

用公式  $\mu = \frac{1}{x} \frac{dx}{dt}$  表示, 其中  $x$  为  $OD_{600}$ ,  $t$  为时间(h)。

先对菌体的生长数据进行非线性拟合后进行插值计算, 再求解得到不同时刻的比生长速率  $\mu$ 。

## 2 结果与讨论

### 2.1 摇瓶水平上氧化葡萄糖杆菌合成右旋糖酐糊精酶的特性

在摇瓶水平上考察了氧化葡萄糖杆菌合成 DDase 的过程。从图 1 中可以看出, 酶的合成与菌体生长偶联, 在指数生长期两者同步增长, 酶活在 47 h 时达到最大值(0.323 U/mL)。

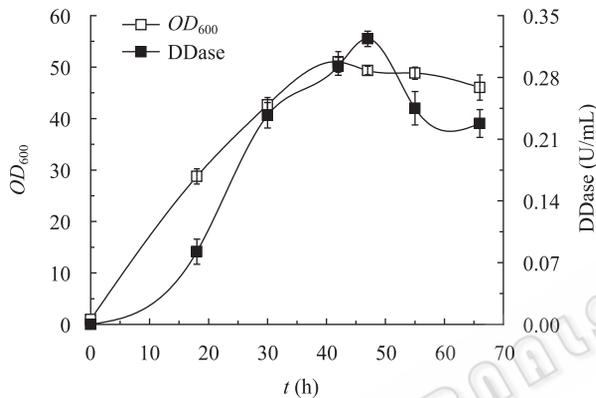


图 1 250 mL 摇瓶水平右旋糖酐糊精酶的合成过程  
Fig. 1 DDase production by *G. oxydans* DSM 2003 in 250 mL shake flasks

### 2.2 3 L 发酵罐水平上 pH 控制策略研究

**2.2.1 未控制 pH 下氧化葡萄糖杆菌合成右旋糖酐糊精酶的特性:** 在 3 L 发酵罐上考察了发酵初始 pH 7.0 时菌体生长和产酶的变化(图 2)。结果表明: 菌体量和酶活分别在 19 h 和 16 h 时达到峰值, 比摇瓶分别缩短了 55% 和 66%, DDase 酶活最大值高达 2.91 U/mL, 是摇瓶水平(0.323 U/mL)的 9 倍, 可见充足的供氧有利于菌体生长和酶的合成。此外, 发酵前期 pH 逐渐下降, 在 6–16 h 之间 pH 快速下降时期, 氧化葡萄糖杆菌大量合成 DDase, 原因可能是较低的 pH 对酶的合成有较大的促进作用, 因此有必要考察不同 pH 值对菌体生长和产酶的影响。

**2.2.2 pH 恒定控制模式下氧化葡萄糖杆菌合成右旋糖酐糊精酶的特性:** 图 3 和图 4 为不同 pH 对菌体生长和最大比生长速率的影响。从图 3 可以看出, 将 pH 控制在 5–6 时, 菌体生长在 16 h 左右就达到了最大值, 比 pH 3.5 到 pH 4.5 及 pH 不控制模式均提前 3 h。根据对图 3 菌体生长数据处理得到的不同 pH 对菌体最大比生长速率的影响(图 4)可知, pH 5.0 时发酵初期菌体生长最快, 6 h 时最大比生长速率高达  $1.16 \text{ h}^{-1}$ , 因此发酵前期(0–6 h)控制 pH 5.0 有利于菌体较好地适应发酵环境, 缩短延滞期并快速生长, 相应的发酵周期缩短。

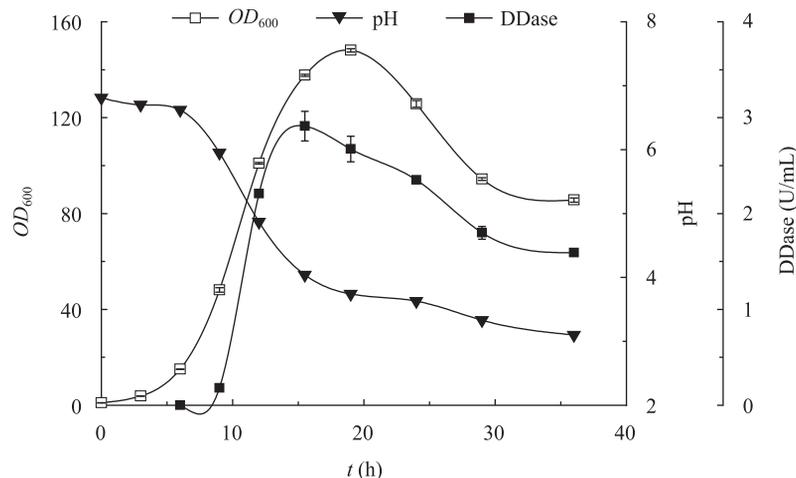


图 2 未控制 pH 时右旋糖酐糊精酶的合成过程  
Fig. 2 DDase production by *G. oxydans* DSM 2003 without pH control

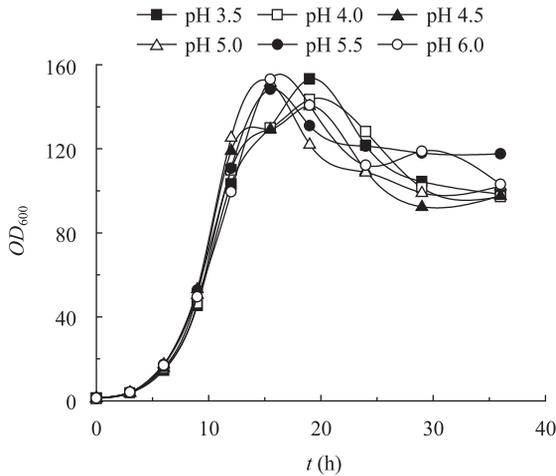


图3 pH对菌体生长的影响

Fig. 3 Effect of different pH on cell growth of *G. oxydans* DSM 2003

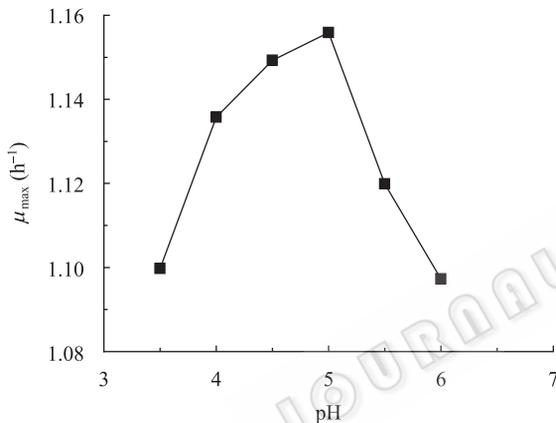


图4 pH对菌体最大比生长速率的影响

Fig. 4 Effect of different pH on the maximal growth rate of *G. oxydans* DSM 2003

图5为控制不同pH对氧化葡萄糖杆菌合成右旋糖酐糊精酶的影响。从图5可以看出,当发酵时间小于6h时菌体几乎不合成DDase,菌体生长进入对数期后DDase大量合成,并在16~19h达到酶活最大值,这也再一次说明氧化葡萄糖杆菌右旋糖酐糊精酶的合成属于生长偶联型。此外,在发酵过程中维持较低的pH(pH 4.0及pH 4.5)也有利于DDase的合成,其中当pH控制为4.0时酶活最大值高达3.38 U/mL(16h),比pH不控制模式(2.91 U/mL)提高了16.2%。因此在发酵中后期控制pH恒定为4.0可以提高菌体合成DDase的能力,获得高活性的DDase。

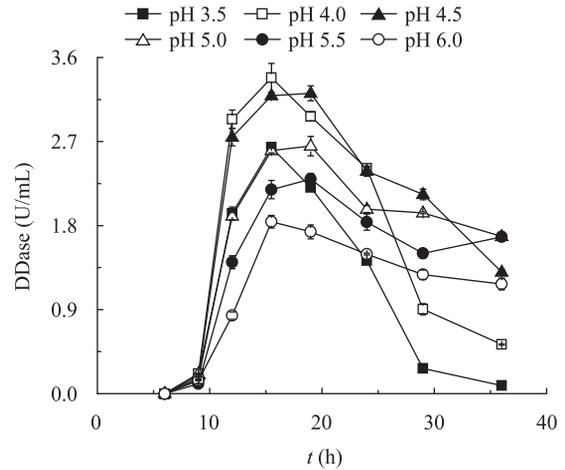


图5 pH对菌体合成右旋糖酐糊精酶的影响

Fig. 5 Effect of different pH on the activity of DDase produced by *G. oxydans* DSM 2003

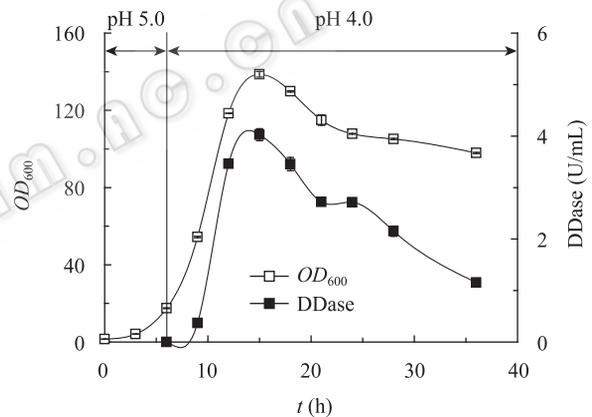


图6 pH两阶段控制策略下右旋糖酐糊精酶的合成过程

Fig. 6 DDase production by *G. oxydans* DSM 2003 under two-stage pH control strategy

**2.2.3 氧化葡萄糖杆菌合成右旋糖酐糊精酶过程分阶段pH控制策略的确定:**前期的实验结果表明,菌体生长和DDase的合成具有不同的最适pH值,因此在氧化葡萄糖杆菌合成DDase过程中需要采用pH分阶段控制策略。即发酵前期(0~6h)控制pH 5.0,缩短延滞期并维持菌体快速生长;在发酵中后期控制pH 4.0,有利于增强DDase的合成,提高终产量。

图6为采用上述pH两阶段控制策略下右旋糖酐糊精酶的合成过程。在酶快速合成阶段,该过程菌体生长及最大比生长速率均优于恒定pH 4.0控制下的相应参数,菌体生长在15h时达到最大值,比

恒定 pH 4.0 及 pH 不控制模式均提前 4 h。此外, DDase 的最大酶活高达 4.03 U/mL (15 h), 分别比恒定 pH 4.0 (3.38 U/mL) 及 pH 不控制模式 (2.91 U/mL) 提高了 19.2% 和 38.5%。

### 3 结论

本研究对具有右旋糖酐糊精酶合成能力的菌株 *Gluconobacter oxydans* DSM 2003 在 3 L 发酵罐水平上的 pH 分阶段控制策略进行了初步探索。实验表明, pH 对菌体生长及产酶均有重要影响, 两者的最适 pH 不同, 分别为 5.0 和 4.0。针对这一特性, 我们提出了 pH 两阶段控制策略: 即发酵前期 (0–6 h) 控制 pH 5.0, 在发酵中后期控制 pH 4.0。在此策略下, 右旋糖酐糊精酶的最大酶活达到 4.03 U/mL, 相对于 pH 不控制模式 (2.91 U/mL) 提高了 38.5%, 是摇瓶水平 (0.323 U/mL) 的 12.5 倍, 同时发酵时间缩短 68% (47 h→15 h)。

基于 pH 两阶段控制策略, *Gluconobacter oxydans* DSM 2003 合成右旋糖酐糊精酶的能力显著提高, 为下一步酶的分离纯化、鉴定以及异源表达奠定了基础。研究表明, 应用右旋糖酐糊精酶是一条优良的右旋糖酐合成途径。氧化葡萄糖杆菌右旋糖酐的结构特性与市售右旋糖酐有很多差异, 其粘度较低、含热值较低, 是一种优良的低热量食品添加剂。该种产品还有许多潜在的应用领域亟待开发, 如新型食品添加剂、淀粉基甜味剂、低脂肪食物替代品等。因此, 通过该新酶源酶法制备右旋糖酐、提高右旋糖酐的产品品质及产率均具有重要意义。

### 参考文献

- [1] 刘卫东, 张启祥. 人工胶体血浆代用品的分类和临床应用比较[J]. 中国药业, 2006, 15(12): 62–63.
- [2] 旺达姆, 贝特斯, 斯泰因比歇尔. 生物高分子 (第五卷 多糖 I-原核生物多糖)[M]. 陈代杰, 金飞燕, 译. 北京: 化学工业出版社, 2004: 305–320.
- [3] 张力田. 碳水化合物化学[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1988: 377.

- [4] Naessens M, Cerdobbel A, Soetaert W, et al. Dextran dextrinase and dextran of *Gluconobacter oxydans*[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2005, 32(8): 323–334.
- [5] Masayuki S, Takehiro U, Gentaro O. Simple purification and characterization of an extracellular dextrin dextranase from *Acetobacter capsulatum* ATCC 11894[J]. J Appl Glycosci, 1999, 46(4): 469–473.
- [6] Suzuki M, Unno T, Okada G. A kinetic study of an extracellular dextrin dextranase from *Acetobacter capsulatum* ATCC 11894[J]. J Appl Glycosci, 2000, 47(1): 27–33.
- [7] Yamamoto K, Yoshikawa K, Kitahata S, et al. Purification and some properties of dextrin dextranase from *Acetobacter capsulatus* ATCC 11894[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 1992, 56(2): 169–173.
- [8] Yamamoto K, Yoshikawa K, Okada S. Detailed action mechanism of dextrin dextranase from *Acetobacter capsulatus* ATCC 11894[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 1993, 57(1): 47–50.
- [9] Yamamoto K, Yoshikawa K, Okada S. Dextran synthesis from reduced maltooligosaccharides by dextrin dextranase from *Acetobacter capsulatus* ATCC 11894[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 1993, 57(1): 136–137.
- [10] Yamamoto K, Yoshikawa K, Okada S. Structure of dextran synthesized by dextrin dextranase from *Acetobacter capsulatus* ATCC 11894[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 1993, 57(9): 1450–1453.
- [11] Yamamoto K, Yoshikawa K, Okada S. Effective production of glycosyl-steviosides by  $\alpha$ -1,6 transglucosylation of dextrin dextranase[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 1994, 58(9): 1657–1661.
- [12] Mountzouris KC, Gilmour SG, Jay AJ, et al. A study of dextran production from maltodextrin by cell suspensions of *Gluconobacter oxydans* NCIB 4943[J]. J Appl Microbiol, 1999, 87(4): 546–556.
- [13] Mao XZ, Liang XT, Wang S, et al. Enhanced production of intracellular dextran dextrinase from *Gluconobacter oxydans* using statistical experimental methods[J]. Afr J Biotechnol, 2010, 9(8): 1180–1189.
- [14] 王舒, 毛相朝, 张鲁嘉, 等. 应用细胞透性化技术快速提取氧化葡萄糖杆菌胞内右旋糖酐糊精酶[J]. 生物加工过程, 2010, 8(3): 35–39.
- [15] Naessens M, Vercauteren R, Vandamme EJ. Three-factor response surface optimization of the production of intracellular dextran dextrinase by *Gluconobacter oxydans*[J]. Process Biochem, 2004, 39(10): 1299–1304.