

文章编号:2095-6002(2013)01-0046-05

引用格式:詹晓北,郑志永,古立谦,等. 系列食品微生物多糖的高黏度发酵关键技术. 食品科学技术学报,2013,31(1):46-50.

ZHAN Xiao-bei,ZHENG Zhi-yong, GU Li-qian, et al. Key Technologies in High Viscous Fermentation of Food Microbial Polysaccharides. Journal of Food Science and Technology, 2013,31(1):46-50.

# 系列食品微生物多糖的高黏度发酵关键技术

詹晓北<sup>1,3</sup>, 郑志永<sup>1</sup>, 古立谦<sup>2</sup>, 朱莉<sup>3</sup>, 吴剑荣<sup>1</sup>, 张洪涛<sup>1</sup>

(1. 江南大学生物工程学院/糖化学与生物技术教育部重点实验室,江苏无锡 214122;

2. 日照职业技术学院食品工程学院,山东日照 276826;

3. 江苏瑞光生物科技有限公司,江苏无锡 214125)

**摘要:**比较产热凝胶菌株生长和合成多糖阶段的能量代谢差异,特别是能量耗散的差异,构建了土壤杆菌 ATCC 31749 产热凝胶的代谢途径. 研究产生能量代谢差异的原因及其影响因素,利用分子生物学技术和生物信息学工具,构建了土壤杆菌电子呼吸链的传递途径. 研究高密度培养、高强度生产的两步法微生物多糖发酵工艺. 在预备罐中以低 C/N 营养条件,实现产多糖微生物的快速高密度培养. 在发酵罐中稀释细胞后以高 C/N 营养条件高强度生产微生物多糖. 研制工业规模下适用于高黏度发酵的高效生物反应器. 以结冷胶为高黏度发酵模型体系,研究该反应器在冷模条件下的传质、混合和流变行为特征,设计了新型高效生物反应器,放大至 50 m<sup>3</sup> 并应用于结冷胶发酵生产实践中.

**关键词:**微生物多糖;结冷胶;热凝胶;代谢途径;生物反应器

**中图分类号:** TS201.3

**文献标志码:** A

微生物多糖是近年来利用现代工业生物技术开发的新型产品,在食品、石油、医药等工业中具有广阔应用前景. 虽然我国已成为黄原胶的第一大生产国,但高品质和高性能微生物多糖的生产仍与国外先进技术存在较大差距:1) 常规反应器的传质和混合效率不能满足高黏度发酵的需要,气体分散效果不理想,生产过程的能耗占成本的比重较大<sup>[1]</sup>;2) 生产工艺以常规的分批发酵为主,产胶期的营养和能量供给结构没有与微生物的实际需求很好地匹配<sup>[2-3]</sup>;3) 微生物对氧的利用效率还有提高的空间,不能物尽其用<sup>[4]</sup>. 因此需要从微生物菌种的代谢工程、发酵工艺和生物反应器等方面克服高黏度发酵过程中存在的关键问题.

## 1 微生物多糖合成过程中的能量代谢途径

随着分子生物学和基因工程技术的迅速发展,微生物多糖合成的遗传背景和代谢途径的研究正逐

步深入. 研究人员发现<sup>[5-6]</sup>,微生物多糖在合成过程中存在着大量的能量耗散现象,即多糖合成过程中的能量效率远低于细胞生长过程的能量效率,影响着微生物细胞对氧气的有效利用. 因此,若要提高目标产物的转化率和产率,就需要从产能途径进行代谢工程改造,以提高能量的产生效率或降低能量代谢过程中的耗散. 好氧细菌的能量代谢包括底物水平磷酸化和氧化磷酸化两个方面,而后者是能量产生的主要方面. 迄今为止,对微生物多糖生产菌实施的代谢工程研究多着重于:1) 解除多糖合成途径的代谢调节<sup>[7]</sup>;2) 过量表达多糖合成途径关键酶的水平<sup>[8]</sup>. 除此之外,通过改善细胞膜的电子传递效率或产能效率来提高目标产物生产率和转化率也是另一可能的途径. 从糖酵解的代谢调控机理可知,微生物多糖合成的主要节点 6-磷酸葡萄糖激酶的活性受到细胞内能荷的调控,当磷酸烯醇式丙酮酸或 ATP 处于过量时,6-磷酸葡萄糖激酶的活性将受到抑制,此外,磷酸戊糖途径的葡萄糖-6-磷酸脱

收稿日期:2012-09-02

基金项目:国家高技术研究发展计划项目(2012AA021505,2011BAD23B04,2012AA021201);无锡市“130”计划项目.

作者简介:詹晓北,男,教授,博士,江南大学生物工程学院工业微生物与生物反应工程研究中心主任,主要从事发酵工程、生物反应工程方面的研究.

氢酶受还原力 NADH 的抑制. 这说明,当细胞内的能荷处于高位时,一方面糖酵解和磷酸戊糖循环将受到抑制<sup>[9]</sup>,代谢流将向微生物多糖合成的方向流动. 这表明保持细胞内的高能荷状态有利于微生物多糖的合成.

热凝胶产生菌土壤杆菌 ATCC 31749 在细胞生长阶段和产物合成阶段的能量消耗差异显著,根据文献[10]报道的电子传递链蛋白的保守序列,设计简并引物并通过 qTR-PCR 克隆土壤杆菌属中 DNA 部分序列<sup>[11]</sup>,通过基因比对分析法确定了包括氧化还原 NADH 辅酶 Q、琥珀酸复合脱氢酶 II、辅酶 Q 合成蛋白质 UbiB、细胞色素 d 末端氧化酶、细胞色素 bo 末端氧化酶、细胞色素 cbb3-型末端氧化酶、细胞

色素 caa3-型末端氧化酶、苹果酸脱氢酶 8 种电子传递链成分如图 1,比较分析了土壤杆菌 ATCC 31749 中 8 种电子传递链成分的基因,通过与根癌土壤杆菌 C58、葡萄土壤杆菌 S4 及放射状土壤杆菌 K84 相似度比较,发现土壤杆菌 ATCC 31749 与根癌土壤杆菌 C58 的相似度最高. 根据基因相似性及参考根癌土壤杆菌 C58 的电子传递链结构,提出了土壤杆菌 ATCC 31749 的电子传递链的基本框架图,如图 1 所示,发现该菌存在 4 个末端氧化酶,其中对氧低亲和性的 Cyto-bo 和 Cyto-caa3 末端氧化酶在高溶氧条件下激活,而对氧高亲和性的 Cyto-d 和 Cyto-cbb3 末端氧化酶在微氧环境下激活,表明该菌能根据不同的溶氧水平调控呼吸链途径和能量产生效率.

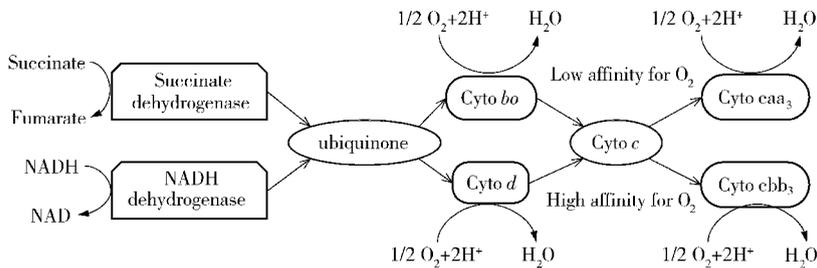


图 1 土壤杆菌 ATCC 31749 的电子呼吸链途径

Fig. 1 Electron respiratory chain pathways in *Agrobacterium* sp. ATCC 31749

大肠杆菌不具有细胞色素 c、细胞色素 bc1 复合体和复合体 IV(细胞色素 c 末端氧化酶),而只有细胞色素 bo 和细胞色素 d 复合体<sup>[12]</sup>,这与土壤杆菌 ATCC 31749 并不相同. 在呼吸链中,细胞色素 cbb3-型及细胞色素 caa3-型末端氧化酶复合体的有效能量效率比细胞色素 d 复合体和细胞色素 bo 复合体要高. 因此,在土壤杆菌 ATCC 31749 中存在细胞色素 cbb3-型及细胞色素 caa3-型末端氧化酶复合体可能是其具有高效 UDP-葡萄糖再生系统的原因之一. 在热凝胶合成过程中,pH 环境对土壤杆菌 ATCC 31749 合成热凝胶是至关重要的,热凝胶合成依赖于 ATP 能量支撑<sup>[6]</sup>,但是 ATP 的再生依赖于细胞膜上 H<sup>+</sup> 梯度. 其高效 ATP 再生系统的另一原因可能是:环境的酸胁迫产生的细胞膜内外 H<sup>+</sup> 梯度对 ATP 再生起到促进作用. 进一步通过 qRT-PCR 研究了溶氧对热凝胶合成相关途径中异柠檬酸脱氢酶、葡萄糖磷酸变位酶和 UDPG 尿嘧啶转移酶等 10 个有代表性的酶基因转录丰度的影响,考察了溶氧与热凝胶合成及其代谢途径中酶基因转录的影响关系<sup>[13]</sup>.

## 2 微生物多糖的营养需求与高效生产工艺

目前,在微生物多糖生产工艺方面的研究往往集

中于微生物的培养环境优化、补料工艺以及 pH 和溶氧控制方面<sup>[14-15]</sup>,对于微生物多糖等次级代谢产物而言,提高细胞生物量是高强度合成产物的基础. 微生物生长和多糖的合成都是高耗氧的过程,由于高黏度多糖的分泌既阻碍了细胞的生长,也限制了微生物多糖合成的产量和生产强度,多糖的产量一般在 25~40 g/L,生产强度一般在 0.25~0.50 g/(L·h). 随着现代智能控制技术的发展,高密度培养技术在大肠杆菌和毕赤酵母等微生物中得到广泛应用<sup>[16]</sup>. 虽然高密度培养技术在高黏度发酵过程中直接应用是不太现实的,但由于大部分微生物多糖均属于次级代谢产物,若将微生物细胞培养与多糖合成分为两个步骤进行,第一步在种子罐(预备罐)中以低 C/N 营养条件快速高密度培养微生物,第二步在发酵罐中稀释细胞后以高 C/N 营养条件高强度生产微生物多糖. 那么利用该工艺,一方面可减少大型发酵罐的占用时间、节省大型发酵罐在培养细胞过程的功率消耗和能量消耗,另一方面可提高细胞培养和多糖合成的生产强度,使生产过程达到工艺紧凑、节能降耗的要求.

热凝胶的分批发酵过程可分为两个步骤,即细菌生长期(第一步)和热凝胶合成期(第二步). 在菌体生长过程中,如图 2,初始葡萄糖质量浓度为 15 g/L,当葡萄糖质量浓度低于 2 g/L 时,利用恒速流

加葡萄糖的方法来实现土壤杆菌的高密度培养,经过 22.5 h 后,生物量达到 29 g/L. 热凝胶的合成速率取决于生物量,在菌体生长阶段结束后,高浓度菌体被引入第二步操作的发酵罐中,由于第二步操作的发酵罐中不存在氮源,菌体将迅速进入产胶阶段和热凝胶生产. 如图 3,通过改变第二步操作的发酵罐中培养基体积,从第一步培养获得的菌体在第二步操作的发酵罐中被培养基稀释至细胞质量浓度分别是 6, 11, 21.5 g/L,从而直接使微生物培养进入产胶期. 从图 3 可以看出热凝胶的产量随着时间而逐渐增加,但在菌体质量浓度为 11 g/L 时,热凝胶的产量达到最大,为 67 g/L,热凝胶的生产强度也达到最大,为 1.03 g/(L·h).

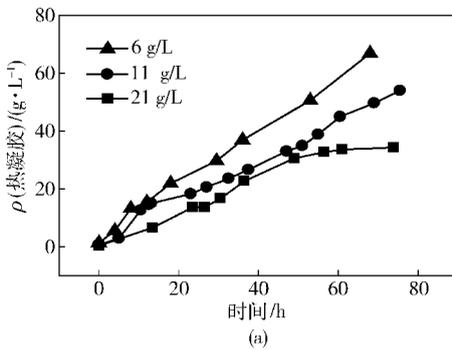


图 3 高 C/N 营养条件下不同生物量对热凝胶合成强度的影响

Fig. 3 Effect of various biomass concentrations on curdlan productivity under high C/N nutritional condition

### 3 针对高黏度发酵体系的生物反应器

在新型搅拌桨设计方面,设计了新型的锯齿形对称折叶涡轮搅拌桨(见图 4),并已申请中国专利<sup>[17]</sup>,搅拌桨属径流剪切桨,由于圆盘上下的斜叶片之间呈一定角度的夹角,适合大气量在液体中的分散,提高了液体的流动性. 由于上下两叶片的内缘形成一夹缝,并且夹缝的开度随搅拌桨半径增加而增加,可供一部分流体通过,避免了在叶片背面形成气穴,同时减少了搅拌功率的消耗. 在搅拌桨的斜叶片内缘和外缘设有锯齿,增加了边界的接触面,提高了流体剪切力,提高了气-液分散能力和对高黏度假塑性流体的剪切稀释作用,为高黏度的好氧发酵体系提供了有效的气-液传质保证,节省了高黏度流体搅拌过程的功率消耗,利用搅拌桨吐出场的压力变化及低动力叶轮的扬力使流体集中,产生了强大的剪断破坏作用. 通过小规模生物反应器实验中,冷模实验结果表明该桨具有高效的气液分散和传质能力.

图 5 是采用 CFD 方法模拟了 6 种搅拌系统中

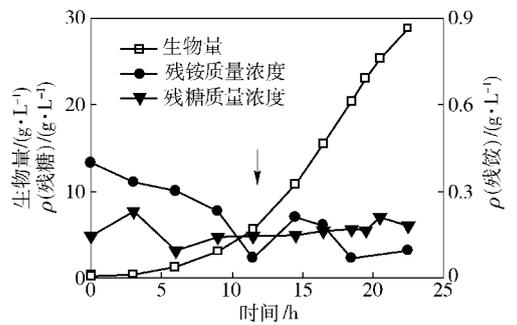


图 2 低 C/N 营养条件下土壤杆菌 ATCC 31749 的高密度培养过程

Fig. 2 High-density cultivation by *Agrobacterium* sp. ATCC 31749 under low C/N nutritional condition

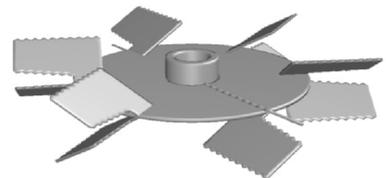
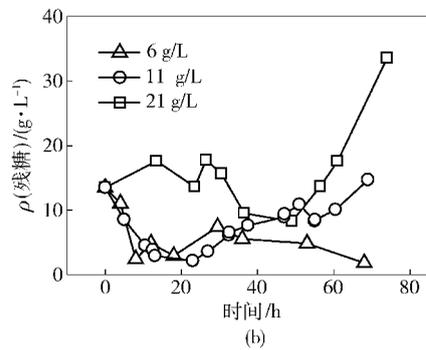


图 4 锯齿形对称折叶涡轮搅拌桨

Fig. 4 Pitched blade with symmetrical sawtooth turbine impeller

非牛顿流体运动的速度矢量图<sup>[18-19]</sup>,平板直叶搅拌桨和锯齿形对称折叶搅拌桨为径向流搅拌桨,形成双循环流型. 液体被搅拌桨从轴方向吸入而向与轴近似垂直的方向排出. 在槽内形成上下两个表观上被搅拌桨圆盘分隔的循环流动. 螺旋圆锥曲面搅拌桨为轴向流搅拌桨,液体在搅拌槽内形成了一个上下流动的大循环. 液体在桨叶区向外侧下方排出. 大部分液体在壁面附近转向上运动,然后循环回到桨叶区. 图 5a 中平板直叶搅拌桨和锯齿形对称折叶搅拌桨的径向流特征比较明显,图 5b、图 5c 中由于螺旋圆锥曲面搅拌桨的加入两径向流桨的径向流特征有所减弱. 图 6 采用 CFD 方法模拟了 6 种搅拌系统中非牛顿流体运动的  $k_L a$  分布图,虽然 SKK 搅

拌系统所提供的  $k_L a$  不是最高,但是其所需的搅拌功耗最低,因此其氧传质效率最高,比传统的 DDD 提高 23%,因此这种组合搅拌系统在高黏度发酵中有较好的应用前景。

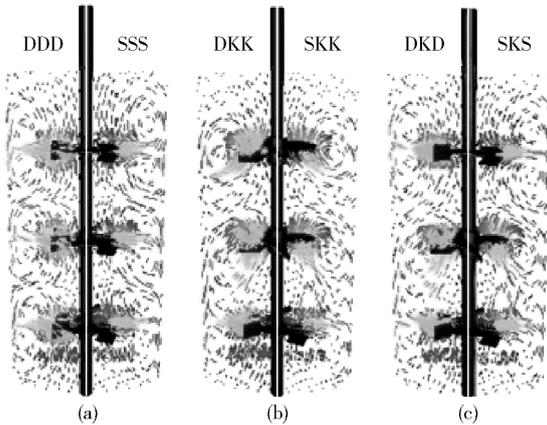


图5 组合搅拌系统速度矢量图

Fig. 5 Velocity vector of combined flow impeller

注: D 为平板直叶搅拌桨, S 为锯齿形对称折叶搅拌桨, K 为螺旋圆锥曲面搅拌桨

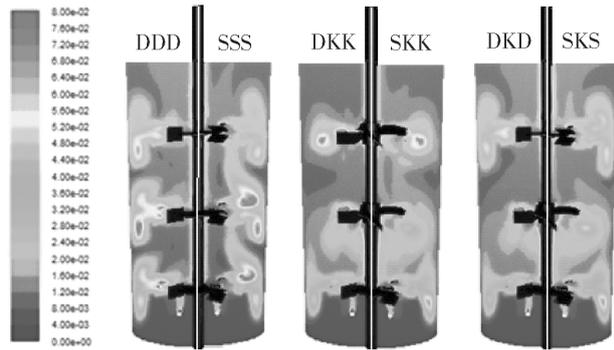


图6 组合搅拌系统的  $k_L a$  分布图

Fig. 6  $k_L a$  distribution of combined flow impeller

注: D 为平板直叶搅拌桨, S 为锯齿形对称折叶搅拌桨, K 为螺旋圆锥曲面搅拌桨

在针对高黏度发酵液的反应器系统设计研究方面,1)采用了计算流体力学的最新研究成果,整合了自主研发的锯齿形对称折叶涡轮搅拌桨和轴向分散混合性能优良的螺旋圆锥曲面搅拌桨,采用多档不同型式的搅拌桨组合系统,自下而上第二档以上采用高效轴向流搅拌桨,促进非牛顿流体做上下混合快速流动;2)针对非牛顿型流体在反应器中不易产生涡流的特点,在反应器上半部分减少挡板高度,以节省搅拌混合过程的能量损耗;3)为了同时满足发酵过程的高气液分散和高效混合,引入气升式反应器的优势特征,采用大高径比的罐体,延长气泡在罐内的停留时间和促进气液传质交换. 试制的生物反应器分别在小试规模(500 L)、中试规模(5 m<sup>3</sup>)和

生产规模(50 m<sup>3</sup>)下进行了试验,取得了预期的效果,结果表明,采用的新型搅拌系统比标准发酵罐节省电耗约 30%,同时体积传质系数提高 20% ~ 30%. 通过微生物多糖结冷胶的工业实践,使结冷胶发酵水平提高 20% 左右,50 m<sup>3</sup>生物反应器装置现已在合作工厂使用一年,效果显著。

#### 参考文献:

- [1] Garcia-Ochoa F, Gomez E. Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: an overview[J]. *Biotechnology Advances*, 2009, 27: 153 - 176.
- [2] Diaz A, Acevedo F. Scale-up strategy for bioreactors with newtonian and non-newtonian broths[J]. *Bioprocess Engineering*, 1999, 21: 21 - 23.
- [3] Rosalam S, England R. Review of xanthan gum production from unmodified starches by *Xanthomonas compestris* sp. [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2006, 39: 197 - 207.
- [4] Sauer U, Bailey J E. Estimation of P-to-O ratio in bacillus subtilis and its influence on maximum riboflavin yield [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 1999, 64: 750 - 754.
- [5] de Mattos M J T, Neijssel O M. Bioenergetic consequences of microbial adaptation to low-nutrient environments[J]. *Journal of Biotechnology*, 1997, 59 (1-2): 117 - 126.
- [6] Zheng Z Y, Lee J W, Zhan X B, et al. Effect of metabolic structures and energy requirements on curdlan production by *Alcaligenes faecalis* [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2007, 12(4): 359 - 365.
- [7] Correia I S, Fialho A, Videira P, et al. Gellan gum biosynthesis in *Sphingomonas paucimobilis* ATCC 31461: genes, enzymes and exopolysaccharide production engineering[J]. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2002, 29: 170 - 176.
- [8] Fialho A M, Moreira L M, Granja A T, et al. Occurrence, production and applications of gellan: current state and perspectives[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2008, 79: 889 - 900.
- [9] Boels I C, Kleerebezem M, de Vos W M. Engineering of carbon distribution between glycolysis and sugar nucleotide biosynthesis in *Lactococcus lactis* [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(2): 1129 - 1135.
- [10] Wood D W, Setubal J C, Kaul R, et al. The genome of the natural genetic engineer *Agrobacterium tumefaciens* C58[J]. *Science*, 2001, 294: 2317 - 2323.
- [11] Zhang H T, Setubal J C, Zhan X B, et al. Component identification of electron transport chains in curdlan-pro-

- ducing *Agrobacterium* sp. ATCC 31749 and its genome-specific prediction using comparative genome and phylogenetic trees analysis[J]. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2011, 38(6): 667-677.
- [12] Anraku Y, Gennis R B. The aerobic respiratory chain of *Escherichia coli* [J]. *Trends in Biochemistry Science*, 1987, 12:262-266.
- [13] Zhang H T, Zhan X B, Zheng Z Y, et al. Sequence and transcriptional analysis of the genes responsible for curdlan biosynthesis in *Agrobacterium* sp. ATCC 31749 under simulated dissolved oxygen gradients conditions[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2011, 91(1): 163-175.
- [14] Chaitali M, Kapadi M, Suraishkumar G K, et al. Productivity improvement in xanthan gum fermentation using multiple substrate optimization[J]. *Biotechnology Progress*, 2003, 19: 1190-1198.
- [15] Rosalam S, England R. New culture medium to xanthan production by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2006, 39:197-207.
- [16] Duan S, Shi Z P, Feng H, et al. An on-line adaptive control based on DO/pH measurements and ANN pattern recognition model for fed-batch cultivation [J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2006, 30(1):88-96.
- [17] 詹晓北, 郑志永, 吴剑荣, 等. 一种针对高黏度发酵过程的气液分散型搅拌桨: 中国, 200810242675.1 [P]. 2009-12-09.
- [18] 李晶, 詹晓北, 郑志永, 等. 不同型式搅拌桨对黄原胶水溶液搅拌效果的 CFD 数值模拟[J]. *过程工程学报*, 2009, 9(4):634-640.
- [19] 苏顺开, 季新跃, 郑志永, 等. 新型搅拌桨用于黄原胶溶液气液传质的计算流体力学模拟[J]. *化学工程*, 2010, 38(10): 28-34.

## Key Technologies in High Viscous Fermentation of Food Microbial Polysaccharides

ZHAN Xiao-bei<sup>1,3</sup>, ZHENG Zhi-yong<sup>1</sup>, GU Li-qian<sup>2</sup>, ZHU Li<sup>3</sup>, WU Jian-rong<sup>1</sup>, ZHANG Hong-tao<sup>1</sup>

(1. *School of Biotechnology/Key Laboratory of Carbohydrate Chemistry and Biotechnology of Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China;*

2. *School of Food Engineering, Rizhao Polytechnic College, Rizhao 276826, China;*

3. *Jiangsu Rayguang Biotechnology Co. Ltd., Wuxi 214125, China)*

**Abstract:** By comparing the energy metabolism differences between the cell growth phase and curdlan production phase, especially the differences in energy dissipation, the metabolic pathways of curdlan biosynthesis in *Agrobacterium* sp. ATCC 31749 was constructed. The differences in energy metabolism and its influencing factors were investigated. By using molecular biology techniques and bioinformatics tools, the electron respiratory chains in *Agrobacterium* sp. were constructed. A novel bioprocess involving high-density cell growth and high-productivity curdlan production was developed. Low C/N nutrition condition in the first fermenter was suitable for rapid cell growth. The cells in the first fermenter were diluted into the second fermenter to stimulate high productivity of curdlan under high C/N nutritional condition. A novel bioreactor for high viscous fermentation in industrial scale was developed. The mass transfer, mixing, and rheological behavior characteristics in gellan solution were investigated. A novel bioreactor was scaled up to 50 m<sup>3</sup> and was applied to gellan fermentation in commercial bioprocess.

**Key words:** microbial polysaccharides; gellan gum; curdlan; metabolic pathways; bioreactor

(责任编辑:叶红波)