

黄原胶分批发酵过程中补加碳源的研究

王寿权,杜金锁,赵兴春,陈 健,司书锋,王新纲
(淄博中轩生化有限公司技术中心,山东淄博 255400)

摘 要:为了提高黄原胶发酵的产量和黏度,本文研究了黄原胶分批发酵过程中补加蔗糖的工艺条件,并比较了发酵过程中发酵参数的变化。研究发现,黄原胶发酵蔗糖的初始最佳浓度为 40g/L;补加蔗糖时最佳的方式为:在发酵 24h 时,每升发酵液补加 20g 蔗糖;比较一次补加蔗糖和多次补加蔗糖时发现,多次补加蔗糖对黄原胶产率的进一步提高没有什么影响;比较补加蔗糖发酵和分批发酵发现,补加蔗糖发酵的最高菌体浓度、黄原胶产率、发酵液粘度都有了较大提高。

关键词:黄原胶,补料,碳源,发酵

Study on production of xanthan gum by adding carbon sources during batch fermentation

WANG Shou-quan, DU Jin-suo, ZHAO Xing-chun, CHEN Jian, SI Shu-feng, WANG Xin-gang

(Technology Center of Deosen Biochemical Corporation Ltd., Zibo 255400, China)

Abstract: In order to improve the yield and viscosity through the fermentation of xanthan gum, adding sugar during batch fermentation of xanthan gum was studied, and the change of parameters was compared. The results showed that the best initial sugar concentration and adding time and feeding concentration were 40g/L, 24h and 20g/L. Further sugar addition or distributing the same final amount in smaller portions during the fermentation did not result in yield increasing. In addition, fed-batch fermentation parameters of the maximum cell concentration, the yield and the viscosity were prior to batch fermentation.

Key words: xanthan gum; fed-batch; carbon source; fermentation

中图分类号: TS201.7

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2010)09-0168-03

黄原胶又称黄胶、汉生胶,是由甘蓝黑腐病黄单胞杆菌(*Xanthomona scampestris*)或其他黄单胞菌属的菌株以碳水化合物为主要原料,经发酵产生的高分子酸性胞外杂多糖。黄原胶食用安全,易溶于水,是目前国际上集增稠、悬浮、乳化、稳定于一体,性能最优越的生物胶。国际上对黄原胶的需求以 7%~8% 的速度逐年增加^[1],黏度高、品质好的产品更是供不应求。国内虽然每年生产黄原胶数千吨,但产品距国际市场的要求尚有较大差距。目前,黄原胶工业生产均采用分批发酵的工艺,即一次性投料,一次性出料。在整个发酵过程中,随着黄原胶积累,发酵液的粘度迅速增加,会对发酵结果造成许多不利的影响,如溶解氧限制、发酵产品质量低、产胶率低等。为此,在新设备、新工艺方面人们开展了大量地研究来克服这些负面的影响^[2]。本文尝试采用补加碳源的方式来改善分批发酵工艺的不足,以提高黄原胶的产率。

1 材料与方法

1.1 实验材料

野油菜黄单胞杆菌(*Xanthomona scampestris*)

YG30-1 菌种为中轩生化有限公司生产所用菌株,由该公司技术中心保藏;种子培养基(g/L) 蔗糖 10、蛋白胨 5、牛肉膏 3、酵母膏 1、硫酸镁 1、碳酸钙 2、磷酸氢二钾 0.5、柠檬酸 0.001, pH7.0;发酵培养基(g/L) 蔗糖(根据实验要求添加)、蛋白胨 2、豆饼粉 3、硫酸镁 1、碳酸钙 2, pH7.0;补加培养基 蔗糖 400g/L, pH 7.0。

1.2 测定方法

1.2.1 黄原胶产率的测定 称取一定量的黄原胶发酵液,加入 2 倍体积的浓度在 80% 以上的酒精,充分混合,使得黄原胶脱水沉淀,滤出沉淀,再用浓度在 85% 以上的酒精洗涤沉淀 1~2 次。烘干沉淀,得到黄原胶样品的质量。

黄原胶产率(%)

$$= \frac{\text{黄原胶样品质量(g)}}{\text{黄原胶发酵液质量(g)}} \times 100\%$$

1.2.2 菌体含量的测定 称取一定量的黄原胶发酵液,用蒸馏水稀释 5~10 倍,离心 30min,使菌体沉淀,倒去上清液,离心所得的沉淀经消化后用微量凯氏定氮法测定总氮含量,然后按下式换算成菌体浓度^[3]。

$$\text{菌体浓度(g/kg)} = \frac{\text{总氮质量(g)}}{\text{发酵液质量(kg)}} \times \frac{1}{0.118}$$

式中:0.118 为黄原胶菌体含氮量。

收稿日期:2010-06-30

作者简介:王寿权(1985-),男,工程师,硕士,研究方向:生物多糖发酵的研究。

1.2.3 总糖含量的测定 称取一定量的黄原胶发酵液,加酸水解并中和,然后采用菲林试剂热滴定法测定还原糖含量,从而得出总糖含量。

1.2.4 粘度的测定 使用 NDJ-1 型粘度计测量粘度,使用 4 号转子,在转速 30r/min,室温下测定发酵液的粘度。

1.3 实验方法

1.3.1 种子培养 向灭菌完的培养基中接种斜面保藏的菌种,接种完后在 $28 \pm 2^\circ\text{C}$ 、180r/min 的条件下培养 24h 左右,到种子培养液开始产生粘度时停止。

1.3.2 发酵培养 向灭菌完的培养基中接种种子培养液,接种量为 5%,接种完后在 $28 \pm 2^\circ\text{C}$ 、220r/min 的条件下培养 72h。

1.3.3 补加方法 按照文中实验所要求的时间和所需要的量,向发酵培养基中加入一定体积的补加培养基,补加时保持严格无菌条件,防止染菌。

2 结果与分析

2.1 初始蔗糖浓度对黄原胶发酵的影响

以蔗糖作为黄原胶发酵培养基碳源,本文考察了不同的蔗糖初始浓度对黄原胶发酵的影响,结果见图 1。由图 1 可知,初始蔗糖浓度在 40g/L 时,黄原胶的产率最高,而浓度为 45~55g/L 时产率相当,较 40g/L 时略低,但是当蔗糖浓度超过 55g/L,再逐渐升高时,黄原胶的产率就随着蔗糖浓度的升高而逐渐降低,这可能的原因是由于初始的蔗糖浓度过高,导致了发酵液的碳氮比过高,从而使得黄原胶菌种的生长受到抑制^[4],因此初始蔗糖浓度过高反而不利于黄原胶的发酵;而从图 1 可以看出,当蔗糖浓度低于 40g/L 时,黄原胶产率是随着蔗糖浓度升高而提高的,这说明了在低的碳氮比时,影响黄原胶发酵的是碳源底物的浓度。因此,从黄原胶产率和蔗糖的利用效率来讲,蔗糖初始浓度为 40g/L 时,最利于黄原胶的发酵。

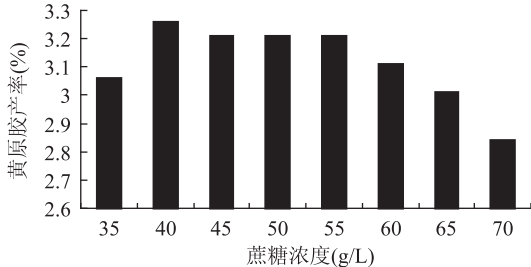


图 1 蔗糖的初始浓度对黄原胶发酵产率的影响

2.2 补加蔗糖量对黄原胶发酵的影响

在黄原胶发酵 20h 左右,发酵液开始产胶时,向发酵液中补加不同量的蔗糖,以考察补加蔗糖添加量对黄原胶发酵的影响,结果如图 2 所示。由图 2 可知,添加浓度从 10g/L 到 40g/L 时,各组黄原胶的产率都较未补加蔗糖的对照组有所提高,而当补加蔗糖量为 20g/L 时,黄原胶产率提高最多,较对照组的黄原胶产率提高了约 17%。由图 2 可以看出,黄原胶产率与补加蔗糖的量的图形呈正态分布趋势,即补加蔗糖浓度过高和过低时,黄原胶的产率都相对较低,在补加浓度小于 20g/L 时,黄原胶产率随补加

浓度提高而提高,而补加浓度大于 20g/L 时,黄原胶产率随补加浓度提高而降低,产生这个现象的原因可能是由于补加蔗糖量过高,容易抑制菌种的活性,而补加蔗糖量低,会使得黄原胶合成底物的量减少,从而使得黄原胶产率低。因此,由实验可知,蔗糖的最佳补加量为 20g/L。

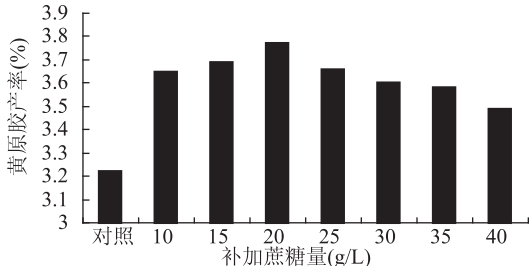


图 2 补加蔗糖的量对黄原胶产率的影响

2.3 补加蔗糖时间对黄原胶发酵的影响

在黄原胶发酵过程中,不同时间补加蔗糖对黄原胶发酵的影响如图 3 所示。由图 3 可知,在发酵 16~48h、按 20g/L 的量添加蔗糖都可以提高最终的黄原胶产率,其中在整个发酵过程前期(16、24、32h)添加,提高效果显著,均较未补加蔗糖的对照组提高 10% 以上,而在 24h 补加蔗糖,提高效果最佳。这主要是因为,在 20h 前,黄原胶发酵处于生长期,这个时期主要生长菌体,20~40h 时,黄原胶发酵处于稳定期,胶体主要在这个时期合成,40h 后发酵处于衰退期,胶体合成减慢^[3,5],因此,在稳定期开始时添加蔗糖有利于提高黄原胶产率。由以上实验可知,在发酵 24h 时添加蔗糖最为合适。

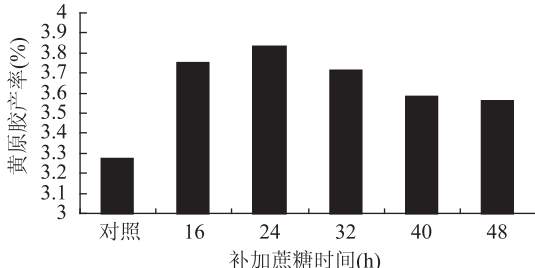


图 3 补加蔗糖的时间对黄原胶产率的影响

2.4 补加蔗糖的方法对黄原胶发酵的影响

为了提高黄原胶发酵的效率,进一步提高黄原胶产率,本文研究了进一步添加蔗糖或将相同量蔗糖分开少量多次在发酵过程中添加,其结果见表 1 (对照组为 24h 加 20g/L 蔗糖,其余 3 组分别在 24h 和 40h 添加蔗糖)。由表 1 可知,与对照相比,进一步添加蔗糖和将相同量蔗糖分开多次加入,并不能进一步提高黄原胶的产率。因此,我们只需要在发酵 24h 后,增加在黄原胶发酵液中补加 20g/L 的蔗糖这简单的一步,就能使得黄原胶发酵的产率得到较大提高。

表 1 不同补加碳源的方式黄原胶产率的比较

添加蔗糖 (g/L)	黄原胶产率 (%)
20 (对照)	3.79
10 + 10	3.71
20 + 10	3.72
10 + 20	3.65

2.5 黄原胶分批发酵与补加碳源发酵的比较

为了更好地比较黄原胶分批发酵和分批补料发酵这两种工艺的差别,本文研究了黄原胶在这两种工艺条件下发酵的一些参数的变化情况,其结果见图4~图6。图4和图5分别反映了分批发酵和分批补料发酵过程中菌体浓度和总糖含量的变化规律,从图4和图5可以看出,菌体含量的总体变化趋势相同,都包含了生长期、稳定期和衰退期,但是图5中菌体含量在补加蔗糖后又有所增加,使得生长期延长,从而使得补料发酵的最高菌体浓度比分批发酵的最高菌体浓度要高;总糖的变化情况都是呈下降趋势,而发酵在24~40h时总糖降低相对较多,这可能与在这个时期黄原胶大量合成有关;图6中显示了补料发酵和分批发酵的黄原胶产率和发酵液粘度随时间变化情况,由于在前24h,分批发酵和补料发酵采取步骤一样,所以黄原胶产率和发酵液粘度没有太大差别,并且黄原胶产率和粘度在前24h增加的都很少,24h后,黄原胶大量合成,经过补料后,发酵的产率和发酵液的粘度都比分批发酵的有了较大提高,这可能与发酵液中合成黄原胶的底物蔗糖浓度有较大关系,在24h后,经补料,底物浓度增加,这就更加利于黄原胶的合成,而分批发酵因为底物的消耗,最终影响了产物的合成。

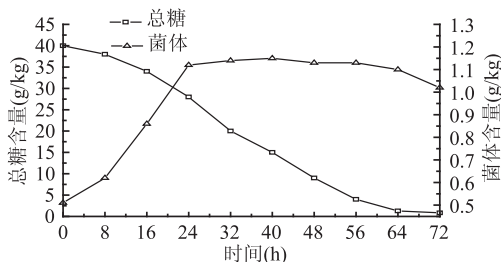


图4 黄原胶分批发酵过程中总糖和菌体含量的变化

3 结论

3.1 黄原胶分批发酵的最佳初始蔗糖浓度为40g/L,而发酵过程中,在24h时,补加20g/L的蔗糖能够较

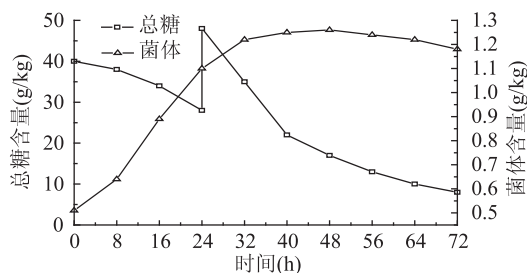


图5 黄原胶补料发酵过程中总糖和菌体含量的变化

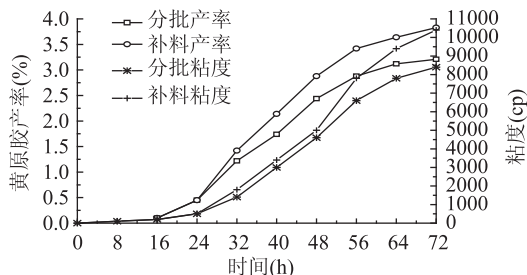


图6 黄原胶分批发酵和补料发酵过程中产率与粘度的变化
大地提高黄原胶的产率,产率能够提高17%。

3.2 研究黄原胶分批发酵和补料发酵的过程中发现,补加蔗糖发酵的发酵液中最高菌体浓度、黄原胶产率、发酵液粘度都较分批发酵有了较大提高。

参考文献

- [1] 颜震,吴尽,等.黄原胶发酵工艺条件的优化研究[J].食品与药品,2006,8(11):39-42.
- [2] 林剑,郑舒文,等.搅拌与溶氧对黄原胶发酵的影响[J].中国食品添加剂,2003(2):63-67.
- [3] 朱圣东.黄原胶发酵的动力学模型及过程模拟[J].化学反应工程与工艺,1992,8(2):149-156.
- [4] 常春,马晓建,等.气升式发酵罐发酵黄原胶新工艺的研究[J].食品科学,2004,25(2):111-114.
- [5] M Stredansky E, Conti C, Bertocchi L, et al. Fed-batch production and simple isolation of succinoglycan from *Agrobacterium tumefaciens* [J]. Biotechnology Techniques, 1999, 13(1):7-10.

35-39.

- [2] 李南薇,李宁.乳酸菌代谢产物对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌抑制作用的研究[J].中国酿造,2009(5):49-52.
- [3] 张刚.乳酸细菌—基础、技术和应用[M].北京:化学工业出版社,2007.
- [4] 林连祥,路福平.微生物学实验技术[M].北京:中国轻工业出版社,2005.
- [5] 姚丽娅,徐为民,诸永志,等.产细菌素乳酸菌的筛选及鉴定[J].2008(1):160-161,164.
- [6] J 萨姆布鲁克[美].分子克隆实验指南[M].第二版.北京:科学出版社,1992.
- [7] 黄靖宇,吴爱武.琼脂稀释法检测7种抗生素对临床分离铜绿假单胞菌的抗菌活性[J].中国卫生检验杂志,2009(4):858-861.
- [8] 张辉华,张飞明,冯小兴.抗病原乳酸菌的分离、药敏与质粒提取实验[J].广东畜牧兽医科技,2004(6):45-46.

参考文献

- [1] 汤务霞.乳酸菌及其应用[J].四川食品与发酵,2001(4):

(上接第167页)

究具有实际的指导意义。实验结果提示人们在食用乳酸菌制品时应考虑其使用效果,应该考虑个体是否同时正在食用某种抗生素,以回避同时食用。

乳酸菌对抗生素的不敏感并不意味着可以食用具有抗药性的乳酸菌的制品,因为抗药的乳酸菌可能对人体具有安全隐患。随着细菌分子生物学研究的不断深入,证实外源细菌进入动物肠道后可能将其携带的抗药性基因转移给肠道菌群,即存在抗药性基因在体内传播的危险^[8]。这三种乳酸菌表现的抗药性使其面临挑战,因为乳酸菌耐药性可能来自抗药基因的出现,抗药基因可被转移到人体内的某些致病菌中,导致致病菌具有抗药性,从而影响治疗效果。因此,乳酸菌在使用前应做好选种工作,尽量利用无抗药性或弱耐药性的菌株。