文章编号: 1673-1689(2010)03-0448-05

纳他霉素高产菌株发酵罐发酵条件研究

魏宝东, 林雨舒
(沈阳农业大学 食品学院, 辽宁 沈阳 110161)

摘 要: 考察溶氧量、补糖及 pH 值等因素对纳他霉素高产菌株发酵罐生产纳他霉素的影响。以摇瓶发酵结果为依据,确定了发酵罐发酵的最适条件为: 控制溶氧在 30%~35%, 补糖控制在发酵液糖质量浓度约为 2 g/dL, 在纳他霉素大量合成阶段, 维持发酵液中的 pH 值在 5.2~5.4。该发酵条件下纳他霉素产量从分批发酵的 3.01 g/L 提高到 5.32 g/L。

关键词: 纳他霉素; 发酵罐; 发酵条件; 产量
中图分类号: TQ 920.1 文献标识码: A

Study of Natamycin High-Yield Strains Fermenter Fermentation Condition

WEI Bao-dong, LIN Yu-shu
(College of Food Science, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, China)

Abstract: The effect of the nutrition and environmental conditions, including dissolved oxygen, pH, added sugar and other factors on Natamycin production by Streptomyce natalensis SY-4795 were careful investigated, and the optimum conditions listed as follows: the dissolved oxygen 30%~35%, the constant sugar concentration in fermentation broth keep at 2%, pH 5.2~5.4. With the optimum fermentation conditions, natamycin production increase 3.01 g/L to 5.32 g/L in batch fermentation.

Key words: natamycin, fermenter, fermentation condition, yield

摇瓶发酵用于实验室较适宜, 从摇瓶到发酵罐上的放大是发酵产品开发中的一个非常重要的环节。大多数发酵产品的工业化生产都必须在发酵罐上进行, 且一般都采用搅拌式发酵罐。而产品也是通过在实验室摇瓶中菌种选育和培养基及培养条件的优化, 然后在小试、中式逐步得到验证、放大, 获得适合发酵罐发酵的工艺。因此有必要在摇瓶发酵的基础上, 在 7 L 发酵罐中进行发酵试验研究。

1 材料与仪器

1.1 菌种

纳他霉素生产菌株 *Streptomyce. natalensis* SY-4795。

1.2 培养基

1.2.1 发酵培养基(组分 g/L) 葡萄糖 40, 大豆

收稿日期: 2009-09-08
基金项目: 辽宁省教育厅科研项目(2008662)。
作者简介: 魏宝东(1969-), 男, 辽宁沈阳人, 副教授, 农学博士, 硕导, 主要从事食品制造与保藏方面的研究。
Email: bdwei2003@yahoo.com

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

蛋白胨 20, 酵母粉 4. 5, pH 7. 5。

1. 2. 2　斜面保藏培养基(组分 g/L)　酵母浸粉 2 0, 可溶性淀粉 10, 琼脂 15, pH 7. 3。

1. 2. 3　种子培养基(组分 g/ L)　葡萄糖 20. 0, 大豆蛋白胨 10. 0, 酪蛋白胨 6. 0, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1. 0, NaCl 2 0, KH_2PO_4 0. 5, pH 7. 3。

1. 3　试验仪器

BGZ-7 智能型机械搅拌发酵罐: 上海保兴生物设备工程有限公司制造; KQ-C 型全自控蒸汽灭菌锅 TH-3560: 上海奉贤协新机电厂制造; ZWD-0. 05/7 全无油空气压缩机: 宁波鄞州展翅全无油空压机有限公司制造。

2　试验方法

2 1　溶解氧浓度的确定

在摇瓶发酵过程中, 控制溶解氧的量, 满足生产菌对氧的需要是提高发酵产量的重要因素之一。试验采用 250 mL 三角瓶, 固定转速, 改变装液量分别为 25、30、35、40、45、50、55、60 mL 来确定最佳溶解氧浓度。

2 2　**7 L** 自动罐分批发酵参数设定

根据摇瓶发酵的研究结果, 在 BGZ-7 L 全自动发酵罐中各过程参数控制设定值为: 培养温度 29 ℃, 罐压 0. 01 MPa, 装液量 5 L, 接种体积分数 2%, 消泡剂为聚醚, 发酵时间 120 h。

起始转速为 200 r/ min, 当溶氧下降时, 增加转速维持溶氧在 30% ~ 35%, 最高转速达到 400 r/ min, 进入抗生素分泌期, 适当降低搅拌转速, 维持溶解氧水平在 30%~ 35%。

2 3　控制 **pH** 值的 **7 L** 自动罐间歇补料分批发酵

2 3 1　*确定发酵液中葡萄糖的质量浓度*　流加时间以发酵液中还原糖水平为控制指标, 发酵液初始葡萄糖质量浓度均为 4 g/ dL, 当发酵液中葡萄糖质量浓度分别降至 3、2. 5、2、1. 5 g/ dL 时开始, 平均每隔 6 h 补糖一次, 使葡萄糖质量浓度各自维持在 3、2 5、2、1. 5 g/ dL, 确定能够获得最高产量的发酵液葡萄糖质量浓度。

2 3 2　*补糖种类及方式*　补加碳源为 50%的葡萄糖, 根据 2 3. 1 结果, 选择在葡萄糖降至 2 0 g/ dL 以下时开始补糖, 并维持葡萄糖质量浓度为在 2. 0 g/ dL。

2 3 3　*pH 值控制*　发酵液初始 pH 值为 7. 5。当 pH 值降至 5. 2 时, 控制 7 L 自动罐开始流加 2 mol/ L 的 NaOH 来调节 pH 值, 使抗生素分泌期的 pH 值维持在 5. 2~ 5. 4 之间, 直到发酵结束。

3　结果与分析

3 1　溶解氧浓度对发酵的影响

由图 1 可知, 当装液量由 25 mL 增大到 50 mL, 纳他霉素产量增加了 52. 90%, 继续增大装液量, 纳他霉素产量开始下降。在装液量为 60 mL 时, 纳他霉素产量达到最低值。装液量对菌体生长影响不大, 在装液量为 25~ 30 mL 时, 菌体干重在 10 g/ L 左右波动; 当装液量为 35~ 60 mL 时, 菌体干重在 11. 45 g/ L 左右波动, 纳他霉素产量随装液量的增加表现为先增加后减少的趋势; 当装液量为 50 mL 时, 溶解氧水平维持在 30%~ 35% 左右, 达到最高值。

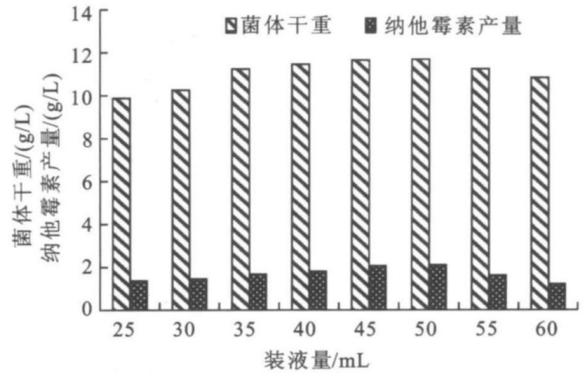


图 **1**　不同装液量对菌体干重和纳他霉素产量的影响

Fig. 1　**Effect of loading capacity on strain dry weight and yield of Natamycin**

3 2　自动罐分批发酵工艺参数的确定

3 2. 1　*搅拌转速和空气流量对菌体干重和纳他霉素产量的综合影响*　根据摇瓶发酵结果, 从搅拌转速和空气流量两个方面同时控制溶氧在 30% ~ 35%, 使搅拌转速不超过 400 r/ min, 空气流量随时调整(不超过 8 L/ min), 结果见图 2。在对数生长期, 空气流量最高达 6 L/ min, 可满足要求。进入稳定期后, 空气流量和搅拌速度均下降, 最终分别维持在 3 L/ min 和 300 r/ min, 结果纳他霉素产量同摇瓶发酵相当。

3 2. 2　*消泡剂的应用效果*　发酵过程中泡沫会带来许多不利因素, 为确定聚醚类消泡剂对菌体生长和纳他霉素合成有无影响, 在摇瓶发酵条件下将未添加消泡剂和添加了聚醚消泡剂的摇瓶进行比较, 结果见图 3。应用聚醚类消泡剂菌体干重达到 11. 01 g/ L, 比对照(11. 26 g/ L) 减少了 0. 25 g/ L; 产量达到 2 10 g/ L, 比对照减少 0. 03 g/ L; 消泡剂的添加对菌体生长和纳他霉素合成均无影响。7 L 自动罐可通过泡沫液位检测电极自动控制消泡剂的添加, 维持发酵的正常进行。

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

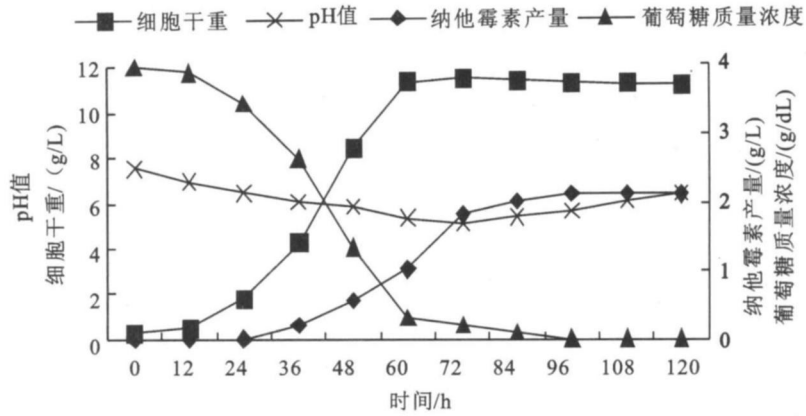


图 2 搅拌速度和空气流量对纳他霉素产量的影响

Fig. 2 Effect of stirring rotation speed and airflow on yield of Natamycin

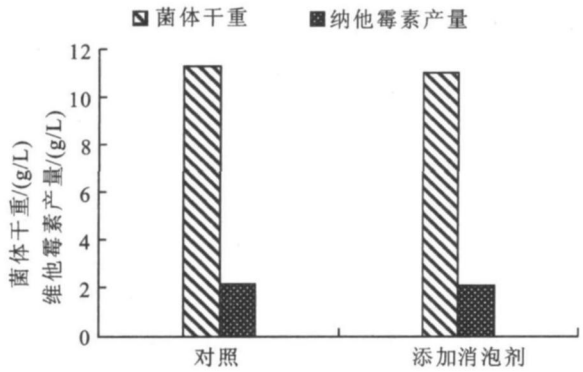


图 3 摇瓶发酵聚醚类消泡剂对菌体干重和产量的影响

Fig. 3 Effect of polyether on strain dry weight and yield of Natamycin in shaking flask

3.2.3 7 L 自动罐分批发酵 在控制发酵过程的搅拌转速、通气流量等前提下，进行7 L 自动罐分批发酵试验，发酵过程中葡萄糖、pH 值、菌体干重和纳他霉素产量等参数的变化见图 4。

如图 4 所示，发酵过程中存在两个典型的生理阶段，即菌体生长阶段和代谢产物合成阶段。在菌体生长阶段，发酵液中碳源质量浓度迅速下降，pH 值也下降较快，生物量迅速增加，并伴随极少量纳他霉素的产生。当发酵液中葡萄糖质量浓度消耗到 1 g/dL 以下时，菌体生长速度减慢，纳他霉素开始大量合成，即由菌体生长阶段转变为次级代谢产物合成阶段，此阶段产生的纳他霉素约占总量的 80%～90%。但随着糖质量浓度的不断降低，菌体逐渐衰老甚至自溶，pH 值上升。因碳源的供给不足，不能继续合成纳他霉素，在分批发酵中，纳他霉素产量为 3.01 g/L。

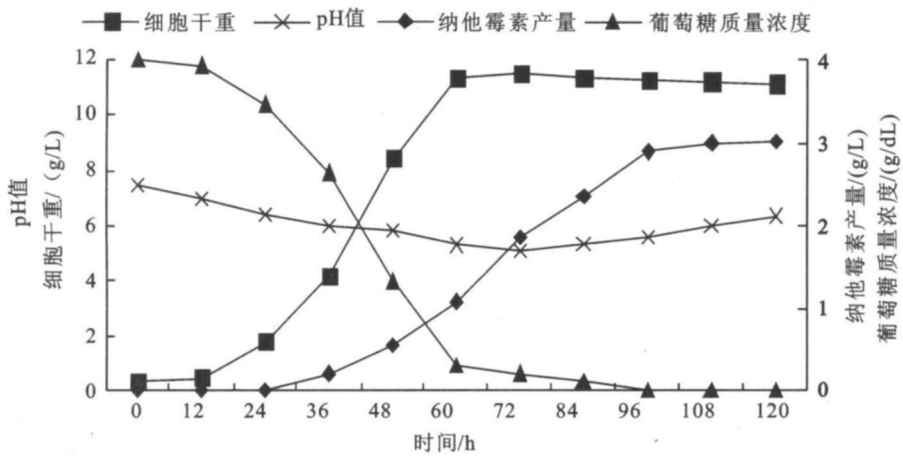


图 4 7 L 自动发酵罐分批发酵代谢曲线

Fig. 4 Metabolism curve of fermentation in batches in 7L automatic fermenter

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

3.3　控制 pH 值的 7 L 自动罐间歇补料分批发酵试验结果

3.3.1　*发酵液中葡萄糖适宜质量浓度的确定*　由表 1 可知, 当葡萄糖质量浓度降至 3 g/dL 和 2.5 g/dL时补糖, 由于时间过早, 发酵液中葡萄糖质量浓度过高, 导致抗生素产量的增加; 而维持 1.5 g/dL 的糖质量浓度又不能满足纳他霉素大量合成的需要, 纳他霉素的产率最低; 当还原糖质量浓度降至 2 g/dL时, 补糖并维持糖质量浓度可延长抗生素分泌期, 使纳他霉素以最大的生产速率不断合成。

表 1　发酵液中葡萄糖适宜质量浓度的选择结果

Tab.1　Optimal glucose concentration in fermentation solution

维持葡萄糖质量浓度/(g/dL)	相应开始补糖时间/h	葡萄糖总流加量/(g/L)	菌体干重/(g/L)	纳他霉素产量/(g/L)
3.0	30	60	12.96	3.12
2.5	37	45	12.66	3.86
2.0	42	30	12.31	4.93
1.5	46	20	12.12	2.87

3.3.2　*补糖指标控制*　以发酵液中葡萄糖水平作为补糖指标, 发酵液初始葡萄糖质量浓度为 4 g/dL, 当葡萄糖质量浓度降至 2 g/dL 时开始补糖, 平均每隔 6 h 补糖一次, 葡糖糖的流加量控制在发酵液糖质量浓度约为 2 g/dL, 菌体浓度基本不变, 使产生菌的代谢趋于大量合成纳他霉素。从 84 h 停止补糖后, 葡萄糖消耗速度减缓, 菌体量开始下降, 此时流加停止。在整个发酵过程中, 葡萄糖总流加量为 40 g/L。

3.3.3　*补糖对 pH 值的影响*　如图 5 所示, 在菌体生长阶段(24~ 60 h), 由于葡萄糖代谢用于菌体增值, 产生的有机酸使 pH 值下降较快, 两条曲线的趋势基本相同。在抗生素分泌期(60~ 84 h), 分批发酵 pH 值随着葡萄糖的分解产酸不断下降, 最低时可降至 4.7, 直到发酵后期, 随着碳源的耗尽, 菌体分解培养基中的蛋白质, 利用氨基酸作为能源和碳源, 导致 pH 值上升。而间歇补料分批发酵, 由于碳源的间歇补入, 菌体很快大量合成纳他霉素, 而不会由于分解葡萄糖产酸使 pH 值下降较多, 此时发酵液中的 pH 值基本维持在 5.2~ 5.4, 说明该 pH 值范围适合纳他霉素的生产。84 h 补糖停止, pH 值下降, 但随着碳源的耗尽, 又呈现后期 pH 值上升的趋势。

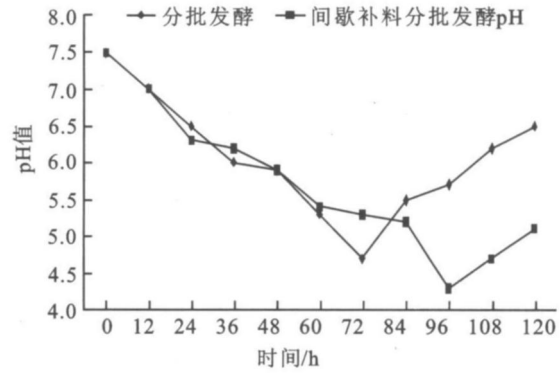


图 5　分批发酵和间歇补料分批发酵中 pH 值的变化

Fig.5　The comparison of pH change between fermentation in batches and by interval adding glucose

3.3.4　*搅拌转速和空气流速控制*　搅拌转速和空气流速的控制与自动罐分批发酵相似。发酵起始搅拌转速 200 r/min, 控制空气流量 2 L/min; 菌体生长阶段, 为满足菌体生长所需的氧浓度, 转速最高时达 400 r/min, 空气流速 8 L/min, 维持溶解氧水平不低于 30%, 最终获得较高的生物量。抗生素分泌期, 由于碳源的间歇补入, 对溶解氧水平有一定的影响。一般在补糖后产生菌的需氧量略有增加。此阶段菌体浓度略有增加, 纳他霉素大量合成, 维持溶解氧水平在 30%~ 35%。

3.3.5　*控制 pH 值的 7 L 自动罐间歇补料分批发酵*　如图 6 所示, 菌体生长曲线呈现 S 形。在发酵 24~ 60 h, 干重增长最快, 为对数生长期。60 h 以后缓慢上升了一段时间后即停止生长, 直至结束。纳他霉素产量从开始到 36 h 缓慢增长, 从 36~ 108 h 呈直线上升, 这是纳他霉素主要产生和积累阶段, 108 h 后不再上升。由此, 将补料分批发酵周期延长至 120 h, 使发酵液中葡萄糖基本耗尽。纳他霉素产量达到 5.32 g/L, 发酵罐的生产力从分批发酵的 0.002 9 g/(L·h) 提高到 0.006 3 g/(L·h), 设备利用率和纳他霉素产量均有所提高。

4　结　语

以 7 L 自动罐分批发酵各参数为依据, 确定了控制 pH 值的 7 L 自动罐间歇补料分批发酵的试验结果。从搅拌转速和空气流量两个方面同时控制溶氧在 30%~ 35%, 并加入聚醚做消泡剂。葡萄糖的流加量控制在维持发酵液糖质量浓度约为 2 g/dL, 发酵周期 120 h。通过添加碱液控制发酵过程的 pH 在 5.2~ 5.4, 从而获得更高的纳他霉素产量。此发酵生产工艺中纳他霉素产量达 5.32 g/L, 发酵罐的生产力从分批发酵的 0.002 9 g/(L·h) 提高到 0.006 3 g/(L·h)。

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

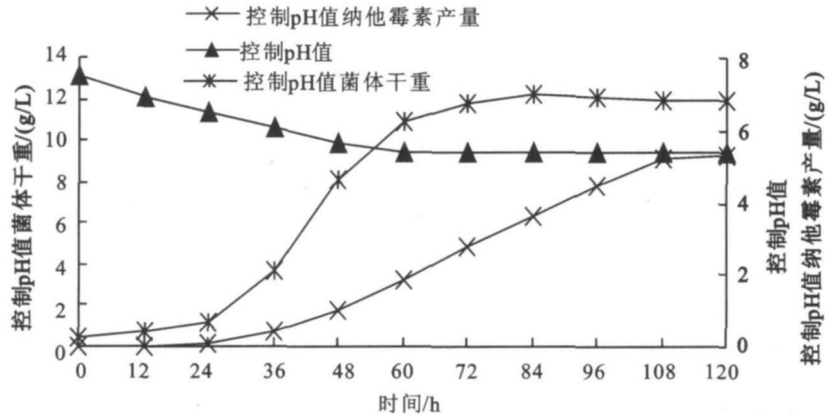


图 6 间歇补料分批发酵和控制 pH 间歇补料分批发酵菌体干重及纳他霉素产量的比较

Fig. 6 The comparison of strain dry weight and yield of Natamycin between fermentation in batches by interval adding glucose and pH controlled condition

参考文献(References):

[1] 陈冠群,杨东靖,杜连祥. 纳他霉素高产菌株的选育及其发酵条件的研究[J]. 食品与发酵工业, 2003, 29(3): 19- 23.
CHEN Guan-qun, YANG Dong-jing, DU Lian-xiang. Study on the breeding of high Natamycin producing strains and their fermentation conditions[J]. **Food and Fermentation Industries,** 2003, 29(3): 19- 23. (in Chinese)

[2] 魏杰,孟宪军. 金褐霉素高产菌株的选育及发酵条件的优化[J]. 食品与生物技术学报, 2009, 28(2): 240- 242.
WEI Jie, MENG Xian-jun. Study on the breeding of high aureofuscin producing strains and their fermentation conditions [J]. **Journal of Food Science and Biotechnology,** 2009, 28(2): 240- 242. (in Chinese)

[3] 何艳玲,邬建国,路福平. 间歇补料分批发酵提高纳他霉素产量[J]. 药物生物技术, 2001, 9(4): 224- 226.
HE Yan-ling, WU Jian-guo, LU Fu-ping. Fed-Batch fermentation to improve the yield of Natamycin[J]. **Pharmaceutical Biotechnology,** 2002, 9(4): 224- 226(in Chinese)

[4] 杨东靖, 陈冠群, 王敏, 等. 纳他霉素高产菌株的链霉素抗性选育及其发酵工艺的优化[J]. 药物生物技术, 2003, 10(2): 84- 87.
YANG Dong-jing, CHEN Guan-qun, WANG Min, Streptomycin resistance breeding of high Natamycin producing strains and optimization on their fermentation conditions[J]. **Pharmaceutical Biotechnology,** 2003, 10(2): 84- 87. (in Chinese)

[5] Harry Brik. Natamycin Analytical Profiles of Drug Substances[M]. New York: Academic Press Inc, 1994: 514- 557.

(责任编辑:李春丽)

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net