

黄原胶生物合成的研究进展

杨春玉¹, 王霞¹, 苏海军², 江伯英¹, 许平¹

(1. 山东大学微生物技术国家重点实验室, 山东 济南 250100;

2. 山东大学数学与系统科学学院, 山东 济南 250100)

摘要:结合有关黄原胶的研究报道, 针对黄原胶黏度大影响溶氧等问题, 从黄原胶的发酵工艺、反应器等方面讨论了目前的研究方向和热点。阐述了解决黏度问题的工艺方案, 讨论了碳源和氮源对黄原胶产量的影响, 指出了分批流加工艺在黄原胶发酵中的重要性。最后从发酵动力学角度讨论了影响黄原胶发酵产量的因素, 阐述了有关黄原胶发酵的动力学模型及其对黄原胶发酵的指导意义。

关键词:黄原胶; 黏度; 发酵工艺; 生物反应器; 发酵动力学

中图分类号: TQ920; TS202.3

文献标识码: A

文章编号: 0253-4320(2005)02-0021-04

Recent advances in xanthan gum biosynthesis

YANG Chun-yu¹, WANG Xia¹, SU Hai-jun², JIANG Bo-ying¹, XU Ping¹

(1. State Key Laboratory of Microbial Technology, Shandong University, Jinan 250100, China;

2. Institute of Mathematic and Systematic Science, Shandong University, Jinan 250100, China)

Abstract: With problems, such as poor dissolved-oxygen caused by the high viscosity of xanthan gum in mind, the present research directions and hotspots of fermentation techniques and reactors are discussed. Schemes to solve the viscosity problem are proposed and the effects of carbon and nitrogen sources on the production of xanthan gum are discussed. The importance of fed-batch technique in xanthan gum production is pointed out as well. Factors affecting the production of xanthan gum are investigated from the point of fermentation dynamics, and the dynamic models and their significance to the xanthan gum fermentation are discussed.

Key words: xanthan gum; viscosity; fermentation technology; bioreactor; dynamics of fermentation

黄原胶是由葡萄糖、甘露糖和葡萄糖醛酸以 2.8:2:2 的摩尔比组成的一种微生物胞外杂多糖, 其“五糖重复单元”主链由 2 个 D-葡萄糖分子经 β -1,4 糖苷键连接而成, 具有类似纤维素的骨架结构, 每 2 个葡萄糖中的一个碳三上连接有一个由 2 个甘聚糖和 1 个葡萄糖醛酸组成的三糖侧链。黄原胶独特的分子结构赋予了它众多卓越的理化性能, 如良好的增稠性、触变性、乳化性、假塑性等。它还有一个重要的特性是能够与其他多聚糖产生交互作用导致黏度增加^[1-2], 同时还是一种经反复确认的无毒安全的绿色物质, 因此成为食品工业中广泛使用的第一种细菌多糖和目前国际上性能最优越的生物胶之一。

自 20 世纪 60 年代初美国 Kelco 公司投入工业化生产以来, 黄原胶产品在食品、轻工、医药、纺织、化妆品、石油开采和消防等领域得到了非常广泛的应用。在 20 世纪 80 年代以后, 科学技术的发展尤

其是生物工程技术对黄原胶的发展起了重大的推动作用, 基因工程、酶工程、发酵工程技术的更新、膜分离等分离技术的发展使黄原胶的应用价值得到了更充分的展示。

1 生产菌株

黄原胶的生产菌株为黄单孢菌属 (*Xanthomonas campestris*) 的几个种, 目前工业化生产用菌株主要为甘蓝黑腐病黄单孢杆菌。1961 年 Jeanes 等首先从甘蓝黑腐病斑中分离出甘蓝黑腐病黄单孢杆菌, 赵大建等在 1986 年也得到了编号为 N.K-01 的甘蓝黑腐病黄单孢杆菌。

2 发酵工艺

目前国内外都在黄原胶的发酵工艺方面开展了很多研究, 以提高产量和质量, 国内的研究主要集中在培养基配方和工艺改进方面, 而国外的研究热点

收稿日期: 2004-08-18; 修回日期: 2004-11-08

作者简介: 杨春玉 (1975-), 女, 硕士, 讲师; 许平 (1961-), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向为应用与环境微生物技术和生物过程工程, 通讯联系人, 0531-8564003, pingxu@sdu.edu.cn。

则为黄原胶的发酵动力学和代谢网络分析,从各个角度阐述黄原胶的高产机理,并在此基础上改进工艺,使产量得到提高。

2.1 培养基组成

2.1.1 碳源

碳源对黄原胶产量有非常重要的影响,一般所用碳源以葡萄糖和蔗糖为多,研究表明较高的葡萄糖浓度能够抑制细胞生长及黄原胶的产量^[3-5],因此很多工艺采取了流加碳源的方法,黄原胶产量可以得到显著提高。Funahashi 等的研究表明,当葡萄糖初始质量浓度高于 50 g/L 时,既抑制细胞生长也会使胶产量大幅度降低,初始质量浓度不高且将葡萄糖质量浓度保持在 30~40 g/L 的水平,则可以得到 43 g/L 的胶产量,而在分批发酵中只能得到 30 g/L 的胶,但缺点是发酵周期长,从而使得黄原胶的总体产量很低($0.36 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)^[5]。Peters 等通过持续流加葡萄糖、盐和氮的发酵方式获得了高浓度的菌体,最终葡萄糖质量浓度为 50 g/L,并且得到了极高的总体产量($0.9 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$),但发酵过程需要极高的溶氧,因此对转速要求非常高($1\ 500 \text{ r/min}$)^[6]。

Amanullah 等验证了 Funahashi 的观点,即在葡萄糖初始质量浓度为 54 g/L 时胶产量很低;发现在氮源基本耗尽的情况下进行流加的效果非常显著;并比较了初始葡萄糖质量浓度为 40 g/L,每隔 8 h 流加一次和连续流加 2 种方式,结果表明间隔加入的发酵周期短,总体产量高($0.72 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$),但所需溶氧也比较高(转速达 950 r/min)^[7]。

从大批量生产的角度出发,各国研究者都在碳源种类的选择上进行了大量研究。从生产上考虑,黄原胶发酵所用碳源多为玉米糖浆,但也有研究者提出了用于黄原胶生产的其他一些价廉易得的碳源。例如,Yoo 等在黄原胶发酵生产中加入废甜菜根作为蔗糖的补充,在一定培养条件下,黄原胶产量比单纯的蔗糖发酵提高了约 70%,具有较大的经济效益^[8]。

2.1.2 氮源

氮源的种类和浓度对黄原胶的产量和质量都会产生显著的影响。李卫旗和饶恕通过正交实验表明氮源对黄原胶的产量具有极其显著的影响,碳源次之^[9];赵学明等研究了在发酵罐中流加葡萄糖条件下,以硫酸铵为氮源对细胞生长量和黄原胶产量的影响,结果表明氮源浓度对黄原胶合成速率、最终胶浓度、得率都有重要的影响,在改良设备、提高供氧

的情况下,黄原胶质量浓度在 55 h 内可达到 40 g/L ^[10]。

丙酮酸是黄原胶分子链上的侧链基团,它的存在可赋予黄原胶许多优良性能如流变学特性等^[11]。黄原胶的质量(可以通过黏度来衡量)不仅受其浓度和分子质量的影响,还与丙酮酸盐的含量有关。Candia 和 Deckwer 通过实验证实了这一点,并提出丙酮酸盐的含量和黄原胶的分子质量及实验所用氮源氯化铵的浓度有关,当氯化铵质量浓度较高时(5 g/L),丙酮酸盐的产量和黄原胶的分子质量很低,从而降低了黄原胶的流变学特性,使其黏度降低,只有氯化铵质量浓度在 0.6~3.5 g/L 的范围内进行培养时才能得到较高的分子质量和丙酮酸盐浓度,使黄原胶的质量得到提高^[12]。

2.2 黏度的解决方案

黄原胶溶液的黏度即使在浓度较低的情况下也会非常大^[13],提高黄原胶产量的一个最大阻碍是发酵后期发酵液黏度的增加,从而使物料的混合及氧的分散能力大大下降,导致供氧不足,限制了黄原胶产量的进一步提高,同时也增加了后提取的难度,最终影响产品的产量和质量。目前主要可以从以下几个方面着手解决黏度问题。

2.2.1 消泡剂的应用

发酵液黏度的增大使得代谢产生的 CO_2 无法及时逸出,液面产生大量泡沫,严重影响溶氧并会导致染菌。发酵过程中一般都加入化学消泡剂聚氧乙烯聚氧丙烯季戊四醇醚(PPE)来解决泡沫问题,但 PPE 的加入也会导致染菌的发生。马忠海采用混合消泡剂(化学消泡剂和植物油并用)取得了较好的效果^[14]。李卫旗等以菜油替代 PPE 作为消泡剂取得了更加满意的效果^[15]。

2.2.2 固定化合成

利用固定化细胞生产黄原胶可以使产胶过程与黏度极大的发酵液分离,从而使细胞能够得到充足的溶氧。早在 1988 年,Robinson 等就尝试利用多孔的硅藻土作为载体来发酵生产黄原胶^[16];还有文献报道以多孔的聚亚氨酯塑料为固定化材料可以得到 56 g/L 的黄原胶^[17];近年来 Yang 课题组^[18]比较了棉毛巾和聚酯纤维等 4 种不同载体材料的吸附效果,结果表明棉毛巾对细胞的吸附率要比聚酯纤维高 30%~40%。他们还在一种离心式棉毛巾填充床反应器中进行黄原胶发酵,发酵 50 h 后几乎所有细胞都被吸附并且黄原胶产量也继续增加,但对于不同载体固定化合成的黄原胶产量没有作比较。

随着固定化方法的成熟发展,固定化细胞生产黄原胶应该是一种切实可行的方法,如果选择好吸附效率高、价格低、来源广的固定化材料,黄原胶的生产将产生实质性的飞跃。

2.2.3 诱导合成

一些自由基如羟基等是植物抵抗外来微生物侵犯的重要因素,甘蓝黑腐病黄单孢杆菌在对植物的攻击过程中分泌黄原胶就是其中的一例。研究发现黄原胶的水平与植物的病况直接相关,这也是应用甘蓝黑腐病黄单孢杆菌来开发黄原胶的原因所在^[19]。

基于上述理论,Rao等利用能够产生自由基的次氯酸作为诱导剂,对甘蓝黑腐病黄单孢杆菌进行胞外处理,然后研究对细胞生长和黄原胶产量及质量的影响。结果表明,同野生型相比,诱导处理后细胞量没有大的变化,但发酵液中黄原胶产量由原来的3.1 g/L提高到6.5 g/L,为相同条件下野生型产量的210%,同时衡量还原剂质量的黏度也比野生型提高了20%。测定发酵液中醋酸盐和丙酮酸盐的浓度变化可以看出,诱导后的细胞能够产生更多的丙酮酸盐和更少的醋酸盐^[20],这与Hassler等提出的黄原胶的黏度随丙酮酸盐含量的增加和醋酸盐含量的减少而增加是一致的^[21]。

利用次氯酸作为诱导剂还可以诱导细胞内活性氧的生成,从而为细胞生长和黄原胶的生成提供氧源^[22]。

3 生物反应器研究

毫无疑问,溶氧在黄原胶发酵中具有非常重要的作用,通常发酵液中的溶氧浓度影响到黄原胶产生菌的生长速率、黄原胶的生成率以及黄原胶的质量。而溶氧浓度的高低则与生物反应器的结构有着直接而重要的关系。

传统的反应器为搅拌式反应器(STR),大部分的反应都是通过这种反应器来完成的,只是为了提高黄原胶产量,有些研究者对工艺条件作了一些改进。从不同角度分析问题,陆续提出了其他类型的反应器,如许平1990年提出用泵式静态混合循环反应器可增加氧气在高黏度发酵液中的传递速率,从而使黄原胶产量得到提高^[23-24];而气升式反应器能有效解决发酵过程中的通气和搅拌所带来的热量问题,适合连续培养生产黄原胶^[25]。

近几年对反应器的研究主要是在Yang等1996年发明的一种离心式填充床反应器(CPBR)的基础

上进行的,该反应器利用一种旋转的纤维床来使菌体分散固定化并与养分和氧气接触,同时还产生离心力使黄原胶与菌体分离,从而获得高的氧传递速率和胶产量(总体产量可达 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$),而一般的搅拌式反应器只能达到 $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$,并且减轻了后提取中菌体分离的压力,这种反应器结构对石油输送具有重要意义^[26];然后通过实验比较了使用STR和CPBR的黄原胶产量,其中CPBR又分为2种操作方式,即将整个细胞基质浸没在发酵液中(CPBR-LC)和置于发酵液之上(CPBR-GC),结果表明CPBR-GC方式下可以得到的总体产量最高($1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$),并且葡萄糖的转化率最低,STR的总体产量最低而葡萄糖转化率高^[27]。CPBR-GC方式能够避免发酵液黏度高而限制溶氧的问题,如果将它用于工业生产,应该具有较好的应用前景。

4 发酵动力学研究

了解黄原胶的发酵动力学特性是实现黄原胶生产过程中定量优化控制的必要基础,人们建立了很多动力学模型来描述黄原胶的发酵动力学过程。早期的动力学模型以经典的发酵动力学模型为基础,同时考虑氮源消耗对黄原胶生长的限制作用,一般包括以下4个方程式:①描述菌体生长的动力学方程,通常多采取Monod型或者Logistic型方程;②描述黄原胶生成的产物动力学方程,通常采取Luedeking-Piret型方程;③描述碳源消耗的动力学方程;④描述氮源消耗的动力学方程。

近年来,人们认识到溶氧、温度、pH值等发酵环境对于黄原胶生产的重要影响,开始建立一些包含这些因素的更为复杂的动力学模型。这方面的工作主要由Garcia等给出。1995年,Garcia等将溶氧作用引入模型,建立了包含5个常微分方程式的描述菌体、碳源、氮源、溶氧以及产物随时间变化的非结构动力学模型,并提出黄原胶最适宜的发酵条件为:温度 28°C ,质量分数为 2.57×10^{-4} 的铵离子以及足够充分的溶氧^[28]。在此基础上,Garcia等进一步研究了碳源以及氮源的细胞代谢作用,将细胞代谢作用引入模型方程,提出了一个描述黄原胶发酵的代谢结构动力学模型,并对不同温度下的实验结果都给出了较好的拟合^[29]。最近Garcia等则进一步以铵离子氮源、DNA、RNA、细胞内蛋白质以及黄原胶产量为基本研究对象,提出了一个全新的生化结构动力学模型。这个模型不仅能够刻画不同初始氮源浓度对黄原胶产量的影响,同时还能对不同反应条

件下的产量给出较好的预测^[30]。

在此期间, Serrano 等根据黄原胶的假塑性特性, 研究了不同转速下黄原胶流变学特性的改变对其产量的影响, 并引入了反应器有效容积的概念, 提出了一个非结构动力学模型^[31]。2003 年 Letisse 等考虑多种氮源对于黄原胶生产的影响, 提出了一个新的非结构动力学模型^[32]。

5 结语

提高黄原胶产量主要是从上述几个方面进行的, 发酵配方的改进始终是非常重要的部分并比较成熟, 但从动力学方面来研究培养基组成对黄原胶产量的影响应该给我们一些新的启示和思路。高黏度始终是困扰黄原胶产量的一个问题, 采用固定化细胞生产, 并在反应器中通入纯氧, 可能会获得较好的结果; 诱导合成方法只见报道而在生产中没有被应用, 有必要进行深入研究; 同时新型反应器的研制也是提高黄原胶产量的一个较好的途径。最后应该指出的是作为食品添加剂, 黄原胶的质量也是非常重要的, 因此改进发酵工艺的同时也要兼顾质量, 否则一些改进会增加后处理的压力, 反而会提高生产成本。

参考文献

- [1] Maier H, Anderson M, Karl C, *et al.* Guar, locust bean, tara, and fenugreek gums [A]. In: Whistler L, BeMiller J N. Industrial Gums: Polysaccharides and Their Derivatives [M]. 3rd ed. San Diego: Academic Press, 1993.
- [2] Casas J A, Garcia-Ochoa F. [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 1999, 79(1): 25 - 31.
- [3] Souw P, Demain A L. [J]. Journal of Fermentation Technology, 1980, 58(5): 411 - 416.
- [4] De Vuyst L, Vanloo J, Van Damme E J. [J]. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 1987, 39(4): 263 - 273.
- [5] Funahashi H, Yoshida T, Taguchi H. [J]. Journal of Fermentation Technology, 1987, 65(5): 603 - 606.
- [6] Peters H U, Suh I S, Schumpe A. [J]. Canadian Journal of Chemical Engineering, 1992, 70(4): 742 - 750.
- [7] Amanullah A, Satti S, Nienow A W. [J]. Biotechnology Progress, 1998, 14(2): 265 - 269.

- [8] Yoo S D, Hareum S W. [J]. Bioresource Technology, 1999, 70(1): 105 - 109.
- [9] 李卫旗, 饶恕. [J]. 杭州大学学报, 1996, 24(3): 280 - 284.
- [10] 赵学明, 马红武. [J]. 化工学报, 1997, 48(2): 247 - 251.
- [11] Torres L G, Brito E, Galindo E, *et al.* [J]. Journal of Fermentation and Bioengineering, 1993, 75(1): 58 - 64.
- [12] Candia J L F, Deckwer W D. [J]. Biotechnology Progress, 1999, 15(3): 446 - 452.
- [13] Cottrell I W, Kang K S, Kovacs P. Xanthan gum [A]. In: Davidson R L. Handbook of Water-soluble Gums and Resins [M]. New York: McGraw-Hill, 1980.
- [14] 马忠海. [J]. 微生物学杂志, 1993, 13(1): 77 - 78.
- [15] 李卫旗, 吴雪吕, 姚恕. [J]. 工业微生物, 1996, 26(1): 17 - 21.
- [16] Robinson D K, Wang D I C. [J]. Biotechnology Progress, 1988, 4(4): 231 - 241.
- [17] Anselmo R J, Viora A, Carletti S. [J]. Revista Argentina De Microbiologia, 1992, 24(2): 86 - 90.
- [18] Yang Shang-Tian, Lo Yang-Ming, Chattopadhyay D. [J]. Biotechnology Progress, 1998, 14(2): 259 - 264.
- [19] Sriram G, Rao Y M, Suresh A K, *et al.* [J]. Biotechnology and Bioengineering, 1998, 59(6): 714 - 723.
- [20] Rao Y M, Sureshkumar G K. [J]. Biotechnology and Bioengineering, 2001, 72(1): 62 - 68.
- [21] Hassler R A, Doherty D H. [J]. Biotechnology Progress, 1990, 6(3): 182 - 187.
- [22] Rao Y M, Suresh A K, Suraishkumar G K. [J]. Process Biochemistry, 2003, 38(9): 1301 - 1310.
- [23] Xu P, Lin J Q, Lin J Q, *et al.* [J]. Biotechnology Letters, 1994, 16(5): 523 - 526.
- [24] 山东大学. 一种高黏度生物反应器 [P]. CN 1056895A, 1991 - 12 - 11.
- [25] 洪厚胜, 万红贵, 欧阳平凯. [J]. 南京化工大学学报, 2000, 22(6): 23 - 26.
- [26] Yang S T, Lo Y M, Min D B. [J]. Biotechnology Progress, 1996, 12(5): 630 - 637.
- [27] Hsu C H, Lo Y M. [J]. Process Biochemistry, 2003, 38(11): 1617 - 1625.
- [28] Garcia-Ochoa F, Santos V E, Alcon A. [J]. Enzyme Microbial Technology, 1995, 17(3): 206 - 217.
- [29] Garcia-Ochoa F, Santos V E, Alcon A. [J]. Enzyme Microbial Technology, 1998, 23(1 - 2): 75 - 82.
- [30] Garcia-Ochoa F, Santos V E, Alcon A. [J]. Enzyme Microbial Technology, 2004, 34(6): 583 - 594.
- [31] Serrano-Carreón I, Corona R M, Sanchez A, *et al.* [J]. Process Biochemistry, 1998, 33(2): 133 - 146.
- [32] Letisse F, Lindley N D, Roux G. [J]. Biotechnology Progress, 2003, 19(3): 822 - 827. ■

你了解粉体加工技术及相关行业信息吗?

请浏览 中国粉体工业信息网 www.chinapowder.cn

粉碎 分级 纳米颗粒制备 混合 分散 改性 造粒 干燥 烧结 散料输送 贮存 粉体检测 粉尘爆炸控制等

010 - 62772725 62772135(Fax)

清华大学材料系逸夫技术科学楼 2713 室