DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20250415005
引用格式: 姚博伟, 陶鹏, 常忠义, 等. 补料分批发酵优化土壤杆菌 A02 产可得然胶工艺[J]. 食品安全质量检测学报, 2026, 17(7): 93–100.
YAO BW, TAO P, CHANG ZY, *et al*. Optimization of fed-batch fermentation process for curdlan production by *Agrobacterium* sp. A02 [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2026, 17(7): 93–100. (in Chinese with English abstract).

补料分批发酵优化土壤杆菌 A02 产可得然胶工艺

姚博伟[1*], 陶　鹏[2], 常忠义[2], 高红亮[2*]

(1. 宁夏计量质量检验检测研究院, 银川　750200; 2. 华东师范大学生命科学学院, 上海　200241)

摘　要: 目的　提升土壤杆菌 A02 发酵产可得然胶产量, 对其补料分批发酵工艺进行优化。**方法**　对土壤杆菌在 15 L 发酵罐中分批发酵过程进行放料后一次补加碳源、放料后连续补加培养基和放料后一次补加培养基 3 种补料分批发酵工艺, 探究其对可得然胶产量的影响。**结果**　放料后一次补加碳源效果最差, 连续补加补加培养基补料工艺效果最好。连续补加培养基和一次补加培养基可得然胶产量分别为 66.69 g/L 和 66.51 g/L, 较一次补加碳源可得然胶产量(53.69 g/L)分别提高了 23.97%和 24.31%; 生产强度均为 0.69 g/(L・h), 较一次补加碳源[0.56 g/(L・h)]提高 23.2%。连续补加培养基产胶速率为 0.11 g/(h・g-cell), 较一次补加碳源和一次补加培养基工艺[0.09 g/(h・g-cell)]提升 22.2%。连续补加培养基和一次补加培养基转化率为 44.31%、40.67%, 分别是和一次补加碳源培养基(40.59%)的 1.1 倍和 1.0 倍。**结论**　对比 3 种补料分批发酵工艺, 在发酵中期放料后连续补加培养基的发酵工艺可得然胶产量、生产强度、比产胶速率和转化率最高, 优于其余两种发酵工艺, 为可得然胶工业化生产提供了理论支撑。

关键词: 土壤杆菌; 可得然胶; 补料分批发酵; 发酵工艺

Optimization of fed-batch fermentation process for curdlan production by *Agrobacterium* sp. A02

YAO Bo-Wei[1*], TAO Peng[2], CHANG Zhong-Yi[2], GAO Hong-Liang[2*]

(1. *Ningxia Academy of Metrology & Quality Inspection*, *Yinchuan* 750200, *China*; 2. *School of Life Sciences*, *East China Normal University*, *Shanghai* 200241, *China*)

ABSTRACT: Objective　To improve the production of curdlan by *Agrobacterium* sp. A02 during fermentation, and optimize the fed-batch fermentation process. **Methods**　The 3 kinds of fed-batch fermentation processes were carried out for *Agrobacterium* sp. during the batch fermentation process in a 15 L fermenter, including a single supplementation of carbon source after discharging the fermentation broth, continuous feeding of the culture medium after discharging, and a single supplementation of the culture medium after discharging. The effects of these processes on the production of curdlan were investigated. **Results**　The single supplementation of carbon source

收稿日期: 2025-04-15
基金项目: 宁夏自然科学基金项目(2023AAC03735); 2023 年度宁夏回族自治区青年科技托举人才培养项目(宁科协发组字〔2024〕6 号); 宁夏科技惠民项目(2024CMG03049)
第一作者/*通信作者: 姚博伟(1993—), 女, 硕士, 工程师, 主要研究方向为应用微生物及食品质量安全。E-mail: ybw2016@sina.com
***通信作者:** 高红亮(1973—), 男, 博士, 副教授, 主要研究方向为应用微生物与酶学研究。E-mail: hlgao@bio.ecnu.edu.cn

after discharging had the worst effect, while the continuous feeding of the culture medium had the best effect. The curdlan production obtained by continuous medium supplementation and one-time medium supplementation was 66.69 g/L and 66.51 g/L respectively. Compared with the curdlan production obtained by one-time carbon source supplementation (53.69 g/L), it increased by 23.97% and 24.31% respectively. The production intensity was all 0.69 g/(L • h), which was 23.2% higher than the one-time carbon source supplementation [0.56 g/(L • h)]. The curdlan production rate of continuous medium supplementation was 0.11 g/(h • g-cell), which was 22.2% higher than the process of one-time carbon source supplementation and one-time medium supplementation [0.09 g/(h • g-cell)]. The conversion rates of continuous medium supplementation and one-time medium supplementation were 44.31% and 40.67% respectively, which were 1.1 times and 1.0 times that of one-time carbon source supplementation (40.67%). **Conclusion** By comparing the 3 kinds of fed-batch fermentation processes, the fermentation process of continuous feeding of the culture medium after discharging in the middle stage of fermentation has the highest production of curdlan, production intensity, specific curdlan production rate and conversion rate, which is superior to the other 2 kinds of fermentation processes. This study provides useful information for enhancing the industrial production of curdlan.

KEY WORDS: *Agrobacterium* sp.; curdlan; fed-batch fermentation; fermentation process

0 引 言

可得然胶，又称为热凝胶多糖，它是由根瘤菌(*Rhizobium* sp.)[1]、土壤杆菌(*Agrobacterium* sp.)[2]或粪产碱杆菌(*Alcaligenes faecalis*)[3]合成的一种微生物胞外多糖，由 *β*-1,3-*D*-葡萄糖苷连接而成[4–5]，由于其加热成胶性、持水性、无毒性、可降解性等性能受到食品行业和生命医学等行业的广泛关注[6–8]。

可得然胶水悬浮液可在不同温度(高温和低温)形成两种结构不同的凝胶，分别称为高凝固热不可逆凝胶和低凝固热可逆凝胶[9]。相较于其他亲水胶体，可得然胶具有独特的加热流变性和保水性能，目前已被美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)于 1995 年[10]、我国于 2006 年[11]批准作为食品添加剂在工业食品中使用。可得然胶可作为稳定剂、持水剂、增稠剂、乳化剂等广泛应用在面制品[12]、肉制品[13]、乳制品[14]、脂肪替代食品[15–16]、速冻食品[17]、复合食品添加剂中[18–19]。

国内近年来在微生物发酵产可得然胶方向也报道了诸多研究成果，如于婷婷等[20]构建了 *exoK* 基因缺失菌株，并通过耐高糖筛选得到一株高凝胶强度可得然胶生产菌株，其凝胶强度较野生菌株提高了 17.6%；李学朋等[21]通过对发酵工艺和凝胶制备工艺优化提高可得然胶凝胶强度约 220%；万婕等[22]通过研究不同类型搅拌桨对可得然胶发酵影响，提升可得然胶产量至 58.2 g/L。

发酵就是指在分批发酵过程中，以某种方式补加一定的物料，但是又不连续放出发酵培养基，这是介于分批发酵和连续发酵之间的一种发酵手段[23]。补料方式有很多种，根据补料方式的不同，可以分为连续补料、半连续补料和周期性补料。按照补料成分划分，可以分为单组分补料和多组分补料，补料一般是在菌体大量生长阶段或者产物生成阶段[24]。菌体生长阶段，氮源大量消耗，初始氮源无法满足菌体生长需求时，会根据需要进行选择性补加氮源[25]。随着产物合成，发酵液中碳源无法满足产物合成需要，需要在适当时候补加碳源，以满足产物何合成需要[26]。俞晓芸等[27]通过补料麦芽糖、葡萄糖等，提升阿卡波糖中试发酵产量 20.4%。郭建敏等[28]通过补料葡萄糖和硫酸铵，提高 *γ*-聚谷氨酸产量 38%左右。熊华仪等[29]通过优化补料发酵工艺，提升乳酸链球菌素效价 67%。

补料分批发酵的关键是对补料控制方法的优化[30]，本研究针对产可得然胶土壤杆菌 A02 分批发酵过程，在 15 L 发酵罐中探究放料后一次补加碳源、放料后连续补加培养基和放料后一次补加培养基 3 种补料分批发酵工艺对可得然胶产量的影响，为提升可得然胶产量、降低生产成本和工业化生产提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

土壤杆菌 A02 由华东师范大学生命科学学院微生物实验室保存。

蔗糖、酵母粉、牛肉膏、琼脂粉、3,5-二硝基水杨酸(3,5-dinitrosalicylic acid, DNS)、四水酒石酸钾钠、苯酚、无水亚硫酸钠、NaCl、NaOH、HCl、KH_2PO_4、$(NH_4)_2HPO_4$、$MgSO_4 \cdot 7H_2O$、$CaCO_3$(分析纯，国药集团上海试剂有限公司)。

1.2 仪器与设备

R1-250 型低温恒温培养箱、SorvallRC-6plus 型冷冻离心机(美国 Thermo Fisher Scientific 公司)；PB-10 型 pH 计、SQP 型电子天平(精度 0.0001 g)、BIOSTART-C PLUS 型 15 L 发酵罐(德国赛多利斯公司)；DKY-II型恒温调速回

转式摇床(上海知楚设备有限公司) ; SW-CJ-2D 超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司); Milli-Q 去离子水发生器(美国 Millipore 公司); UV-2600i 型分光光度计(日本岛津公司); Cytation1 型酶标仪(美国安捷伦科技有限公司); MLS-3781L-PC 高压蒸汽灭菌器(日本松下电器有限公司)。

1.3　试验方法

1.3.1　培养基的配制

种子培养基: 蔗糖 20.0 g/L, KH_2PO_4 1.5 g/L, $(NH_4)_2HPO_4$ 5.0 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1.0 g/L, $CaCO_3$ 3.0 g/L, 调 pH 至 7.0。

斜面培养基: 采用文献[31]中描述的配方。

发酵培养基: 蔗糖 100.0 g/L, $(NH_4)_2HPO_4$ 3.0 g/L, KH_2PO_4 2.0 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1.0 g/L, 酵母粉 4.5 g/L, $CaCO_3$ 2.0 g/L, 消泡剂 0.5 g/L, 调 pH 至 7.0。

1.3.2　土壤杆菌的活化与培养

从–80 ℃取出土壤杆菌 A02 菌株冻存管, 接种于种子培养基中(50/250 mL), 250 r/min, 30 ℃振荡培养 20 h 进行活化。把活化后的菌液在斜面培养基试管上划线, 将试管斜面放置在 30 ℃培养箱中培养 24 h。用接种环从培养好的试管斜面上刮取一环接种到种子培养基中(100/500 mL), 250 r/min, 30 ℃振荡培养 18 h。

1.3.3　补料分批发酵

将 1.3.2 中的种子液以 5% (*V*:*V*)接种量接入到 15 L 全自动发酵罐中, 装液量为 9 L, 初始搅拌转速为 500 r/min, 通气量为 1 vvm, 30 ℃培养 96 h。0~12 h 每隔 3 h 取样一次, 测定发酵液 OD_{600} 和氨态氮含量, 以监测菌种生长和氨态氮消耗情况。从 24 h 开始每隔 12 h 取样一次, 测定可得然胶含量和剩余蔗糖含量。本研究团队前期研究发现, 土壤杆菌 A02 菌株在分批发酵 48~60 h 时间段产胶强度最高, 蔗糖消耗速率最快[32], 因此本研究中选择分批发酵 48 h 和 60 h 时作为放料补料时间点。

1.3.4　放料后一次补加碳源发酵工艺

在 0~12 h 时间段控制 pH 至 7.0, 12~96 h 时间段控制 pH 至 5.5, 在 60 h 时放料 2 L, 一次补加蔗糖溶液(270 g/L) 2 L。其他发酵条件同 1.3.3。

1.3.5　放料后连续补加培养基发酵工艺

在 0~12 h 时间段控制 pH 至 7.0, 12~96 h 时间段控制 pH 至 5.5, 在 48 h 时放料 2 L, 一次补加蔗糖溶液(270 g/L) 2 L, 使发酵体系中的蔗糖质量浓度达到 60 g/L 以上。补加结束后, 以恒定速率补加除去蔗糖和 $CaCO_3$ 的发酵培养基(1.3.1 中所述), 补加速率为 28 mL/h, 补加时间为 36 h。

1.3.6　放料后一次补加培养基发酵工艺

在 0~12 h 时间段控制 pH 至 7.0, 12~96 h 时间段控制 pH 至 5.5, 在 48 h 时放料 2 L, 一次补加去除 $CaCO_3$ 的发酵培养基(1.3.1 中所述)2 L, 使发酵体系中的蔗糖质量浓度达到 60 g/L 以上。

1.3.7　发酵过程参数测定方法

菌体生长量的测定: 采用干重法测定[31]。

发酵液中蔗糖含量的测定: 采用 DNS 法测定[33]。

可得然胶产量的测定: 参照文献[31]中描述的方法稍作修改, 准确量取 10 mL 发酵液, 加入 150 mL、1 mol/L NaOH 溶液, 200 r/min 摇床振荡 3 h。待可得然胶充分溶解后, 9000 r/min, 离心 10 min, 取上清液, 将上清液用 6 mol/L HCl 溶液调 pH 至中性, 而后将调制中性的混合液 9000 r/min, 离心 10 min, 将沉淀水洗 3 次, 每次加入水 150 mL, 9000 r/min, 离心 10 min; 沉淀 60 ℃、12 h 烘干后称重, 计算可得然胶产量。

发酵液中氨态氮含量的测定: 按照文献[33]所述方法进行发酵液中氨态氮含量的测定。

1.4　数据处理

所有实验均重复 3 次, 使用 Origin 2018 和 Excel 2010 对数据进行统计、作图, 采用 SPSS 22.0 对数据进行显著性差异分析, 以 $P<0.05$ 为显著性差异, $P<0.01$ 为极显著性差异。

2　结果与分析

2.1　放料后一次补加碳源对可得然胶发酵的影响

土壤杆菌 A02 使用一次补加碳源发酵工艺在 15 L 发酵罐分批发酵产可得然胶过程中, 对发酵液中菌体干重、蔗糖含量、氨态氮含量、可得然胶产量的动态变化情况进行检测, 所得结果如图 1 所示。

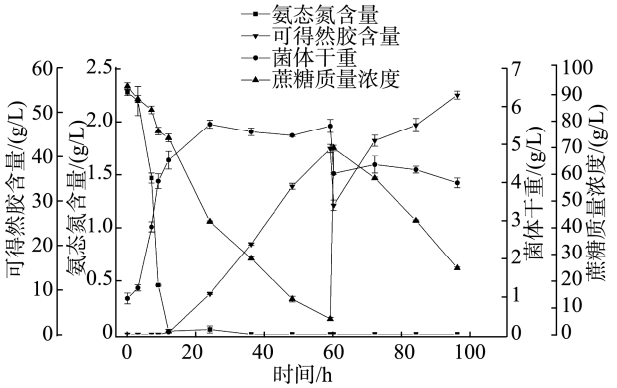


图1　放料后一次补加碳源发酵工艺代谢曲线

Fig.1　Metabolic curves of fermentation process with one-time carbon source supplementation after inoculation

可得然胶的分批发酵过程分为两个阶段, 前期为菌体生长期, 后期为可得然胶合成期, 在分批发酵过程中, 前期菌体生长消耗氮源, 当氮源耗净时进入产胶期。从图 1 的发酵代谢曲线可以看出, 0~12 h 时间段菌体快速生长, 菌体量从 0 h 的 0.7 g/L 增加到 12 h 的 4.1 g/L, 在 24~60 h 时, 菌体量基本保持稳定, 为 5.5 g/L 左右; 在 60 h 时, 放料 2 L,

占总体积的 20%, 而后一次补加 270 g/L 质量浓度的蔗糖溶液 2 L, 继续发酵。在放料 2 L 后, 菌体干重降低为 4 g/L, 是因为放料的同时把菌体也放走了一部分。

0~12 h 时间段氨态氮消耗速度很快, 12 h 后氨态氮也基本消耗完全, 从最初的 2.3 g/L 下降到 0.1 g/L 左右。在 0~60 h 时间段, 蔗糖消耗迅速, 从最初的 97 g/L 降到了 60 h 的 5.6 g/L, 补加蔗糖后, 蔗糖质量浓度约为 70 g/L, 随后蔗糖又开始快速消耗。可得然胶在 12 h 后开始合成, 在 12~72 h时间段的合成速率较快, 在 72 h以后开始放缓, 可能是因为菌体量减少和菌体活性降低的原因。发酵 96 h 时可得然胶产量达到了 53.69 g/L。

对发酵期间各时间段发酵效果分析见表 1。可以看出 12~24 h、24~48 h 区间内可得然胶生产强度和比产胶速率均维持在较高的水平, 分别为 0.75 g/(L • h)、0.13 g/(h • g-cell) 和 1.01 g/(L • h)、0.16 g/(h • g-cell), 但 48 h 后均开始下降, 发酵 48~96 h时生产强度降到 0.43 g/(L • h), 比产胶速率降到 0.10 g/(h • g-cell)左右。在 24~96 h 区间内蔗糖消耗速量先降低后增加, 但可得然胶的合成速率逐渐降低, 转化率也从 83.27%降到 30.50%。表明该补料方式对可得然胶发酵没有促进效果。

表 1 一次补加碳源发酵工艺对可得然胶发酵的影响

Table 1 Effects of one-time carbon source supplementation fermentation process on curdlan fermentation

发酵时间/h	生物量/(g/L)	可得然胶产量/(g/L)	蔗糖消耗量/(g/L)	可得然胶生产强度/[g/(L • h)]	比产胶速率/[g/(h • g-cell)]	转化率/%
0~12	4.56	0	19.50	0	0	0
>12~24	5.76	9.00	31.34	0.75	0.13	28.72
>24~48	6.49	33.15	29.00	1.01	0.16	83.27
>48~72	4.43	43.40	18.60	0.43	0.10	55.11
>72~96	3.96	53.69	33.74	0.43	0.11	30.50

2.2 放料后连续补加培养基对可得然胶发酵的影响

土壤杆菌 A02 使用放料后连续补加培养基发酵工艺在 15 L 发酵罐分批发酵产可得然胶过程中, 对发酵液中菌体干重、蔗糖含量、氨态氮含量、可得然胶产量的动态变化情况进行检测, 所得结果如图 2 所示。

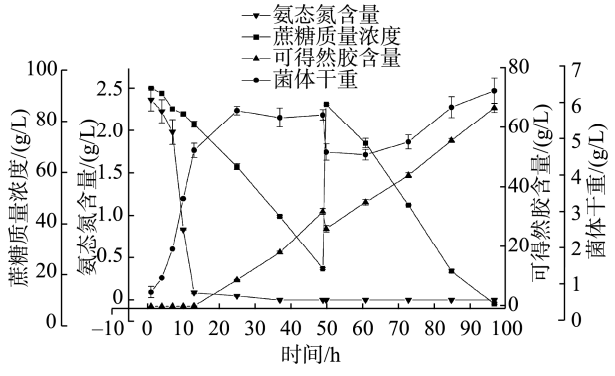


图2 放料后连续补加培养基发酵工艺代谢曲线

Fig.2 Metabolic curves of fermentation process with continuous medium supplementation after inoculation

由图2可知, 0~12 h时间段, 菌体快速生长, 伴随着氮源快速消耗, 在 24~48 h 时间段, 菌体稳定在 5.6 g/L 左右。48 h时放料 2 L, 同时一次补加 270 g/L 质量浓度的蔗糖溶液 2 L, 此后以 28 mL/h 的恒定速率补加不含蔗糖和 $CaCO_3$ 的培养基。放料后, 菌体干重为 4.5 g/L 左右, 随着培养基的补加, 菌体干重开始缓慢增加, 到 96 h 时, 菌体量增加到了 6.3 g/L 左右。这说明在可得然胶发酵中后期补加培养基成分可以增加生物量, 达到了菌体二次生长的目的。发酵 96 h 时可得然胶产量达到了 66.69 g/L。

对发酵期间各时间段发酵效果分析见表 2。可以看出 12~24 h、24~48 h 区间内可得然胶生产强度和比产胶速率均维持在较高的水平, 分别为 0.74 g/(L • h)、0.13 g/(h • g-cell) 和 0.96 g/(L • h)、0.17 g/(h • g-cell), 但 48 h 后均开始下降, 发酵 48~72 h 区间内生产强度降到 0.51 g/(L • h), 比产胶速率降至 0.10 g/(h • g-cell)。但在 72~96 h 区间, 生产强度和比产胶速率分别升至 0.94 g/(L • h)和 0.15 g/(h • g-cell)。在 24~96 h 区间内蔗糖消耗速量基本不变, 但可得然胶的合成速率先降低后增加, 转化率也从 57.02%到 58.01%, 在 72~96 h 时间段基本升至 24~48 h 区间水平, 最终发酵可得然胶产量为 66.69 g/L。连续补加培养基, 由于一直有新鲜氮源的加入, 菌体活性维持较好, 在发酵末期还能保持一个较高的生产强度。表明该补料方式使得发酵末期菌体得以二次生长, 增加了可得然胶发酵产量, 对可得然胶发酵有一定的促进效果。

2.3 放料后一次补加培养基对可得然胶发酵的影响

土壤杆菌 A02 使用放料后一次补加培养基发酵工艺在 15 L 发酵罐分批发酵产可得然胶过程中, 对发酵液中菌体干重、蔗糖含量、氨态氮含量、可得然胶产量的动态变化情况进行检测, 所得结果如图 3 所示。由图 3 可知, 0~12 h 时间段, 菌体快速生长, 伴随着氮源快速消耗, 氮源在 12 h 基本消耗完毕, 菌体量的增加开始放缓, 慢慢进入稳定期, 菌体干重在 24~48 h 时间段达到了 6.5 g/L。随着碳源的快速消耗, 在 48 h 时放料 2 L, 补加 2 L 完全培养基, 其中包含了发酵所需的碳源和其他营养成分。由于补充了新的氮源,

表 2　连续补加培养基发酵工艺对可得然胶发酵的影响

Table 2　Effects of continuous medium supplementation fermentation process on curdlan fermentation

发酵时间/h	生物量/(g/L)	可得然胶产量/(g/L)	蔗糖消耗量/(g/L)	可得然胶生产强度/[g/(L・h)]	比产胶速率/[g/(h・g-cell)]	转化率/%
0~12	4.73	0	14.29	0	0	0
>12~24	5.83	8.92	16.69	0.74	0.13	53.44
>24~48	5.71	31.91	40.32	0.96	0.17	57.02
>48~72	4.96	44.04	39.75	0.51	0.10	30.54
>72~96	6.38	66.69	39.05	0.94	0.15	58.01

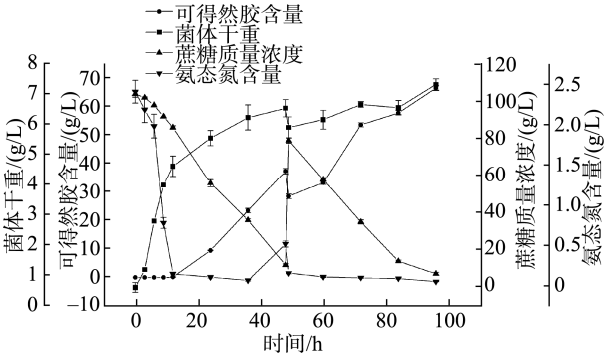


图3　放料后一次补加培养基发酵工艺代谢曲线

Fig.3　Metabolic curves of fermentation process with one-time medium supplementation after inoculation

菌体量在 48 h 后又开始增加, 到了 96 h, 菌体量达到了 7 g/L 左右。48~72 h 时间段可得然胶的合成速率也出现了加快, 可能是补加培养基后, 菌体浓度增加, 同时菌体活性也得到了提高。在 72 h 时, 可得然胶产量达到了 53.64 g/L。72 h 以后, 可得然胶合成速率出现放缓, 这是随着可得然胶产量的增加, 发酵液传质变差的原因。发酵 96 h 可得然胶的产量达到了 66.51 g/L。

对发酵期间各时间段发酵效果分析见表 3。可以看出与一次补加碳源和连续补加培养基补料工艺一致, 12~24 h、24~48 h 区间内可得然胶生产强度和比产胶速率均维持在较高的水平, 分别为 0.79 g/(L・h) 、0.14 g/(h・g-cell)和 1.16 g/(L・h)、0.18 g/(h・g-cell), 但 48 h 后均开始下降, 发酵 48~72 h 区间内生产强度降到 0.67 g/(L・h), 较连续补加工艺同时段生产强度[0.51 g/(L・h)]提高了 31.4%, 比产胶速率则降至 0.10 g/(h・g-cell)。在 72~96 h 区间, 生产强度和比产胶速率继续下降至 0.54 g/(L・h)和 0.07 g/(h・g-cell)。但最终发酵可得然胶产量为 66.51 g/L , 这与连续补加培养基工艺基本一致。在 24~72 h 区间内蔗糖消耗速量基本不变, 转化率从 63.38%降至 36.85%; 72~96 h 区间内蔗糖消耗量降至 28.15 g/L, 转化率增加至 45.72%, 可得然胶生产强度为 0.54 g/(L・h), 低于同阶段连续补加培养基生产强度[0.94 g/(L・h)], 降低了 74.1%, 转化率和产胶速率也相应低于同时间段连续补加工艺[58.01%、0.15 g/(h・g-cell)], 但高于同阶段一次补加碳源发酵工艺的值[30.50%、0.43 g/(L・h)], 这可能是因为一次补加培养基后, 菌体快速生长, 可得然胶合成速率升高, 但随着发酵的继续, 可得然胶的增多, 发酵环境趋于恶化, 导致菌体活性受到影响, 从而导致发酵末期生产强度和产胶速率降低。实验结果仍表明该补料方式对可得然胶发酵具有一定的促进效果。

2.4　不同发酵工艺对可得然胶发酵的影响

土壤杆菌 A02 分别使用放料后一次补加碳源、连续补加培养基、一次补加培养基 3 种发酵工艺在 15 L 发酵罐分批发酵产可得然胶过程中对发酵液中菌体生物量动态变化情况进行检测, 所得结果如图 4 所示。

由图 4 可知, 在 0~24 h 阶段, 菌种快速生长, 菌体量在 24 h 达到了一个稳定的状态, 在 48 h 以后, 由于放料的影响, 3 种补料方式都出现了菌体量的下降。一次补加碳源方式在菌体量出现下降以后, 由于没有新增氮源, 所以菌体量基本不再变化, 维持在 4 g/L 左右; 连续补加培养基方式在 48 h 以后, 由于发酵体系中有了新的氮源, 菌体量逐渐增加, 并且在 96 h 时增加到了 6.3 g/L 左右; 一次补加培养基的发酵罐在得到氮源补充后, 也出现了菌体量的增加, 96 h 时菌体量增加到了 7.3 g/L 左右。由此证明, 在可得然胶发酵过程中补加培养基成分能引起菌种的二次生长, 这对于维持发酵后期菌体量和菌体活力有很大促进意义。

表 3　一次补加培养基发酵工艺对可得然胶发酵的影响

Table 3　Effects of one-time medium supplementation fermentation process on curdlan fermentation

发酵时间/h	生物量/(g/L)	可得然胶产量/(g/L)	蔗糖消耗量/(g/L)	可得然胶生产强度/[g/(L・h)]	比产胶速率/[g/(h・g-cell)]	转化率/%
0~12	4.63	0	18.01	0	0	0
>12~24	5.56	9.47	29.64	0.79	0.14	31.95
>24~48	6.54	37.40	44.07	1.16	0.18	63.38
>48~72	6.38	53.64	44.07	0.67	0.10	36.85
>72~96	7.33	66.51	28.15	0.54	0.07	45.72

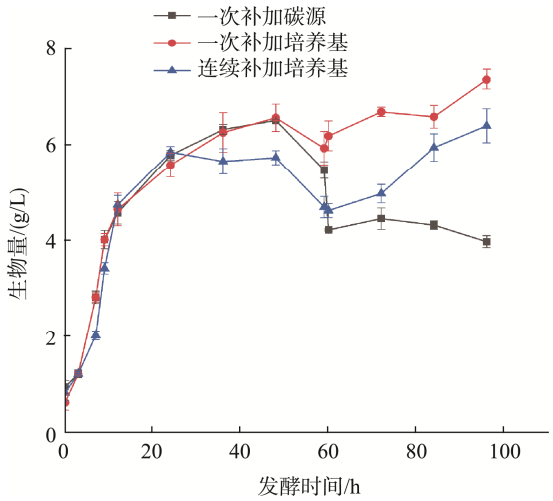


图4 不同补加方式对可得然胶发酵菌体量的影响

Fig.4 Effects of different supplementation methods on the biomass of curdlan fermentation

对 3 种补料发酵工艺发酵结果进行比较(表 4)，放料后单纯补加蔗糖的发酵工艺 96 h 最终的可得然胶产量为 53.69 g/L，放料后连续补加培养基和一次补加培养基 96 h 时可得然胶产量一致，均为 66 g/L 左右，分别为 66.69 g/L 和 66.51 g/L，较单纯补加碳源可得然胶产量分别提高了 23.97%和 24.31%。从生产强度和比产胶速率来看，连续补加培养基和一次补加培养基补料方式生产强度相同，均为 0.69 g/(L • h)，较一次补加碳源工艺[0.56 g/(L • h)]提高 23.2%；连续补加培养基比产胶速率为 0.11 g/(h • g-cell)，较一次补加碳源和一次补加培养基工艺[0.09 g/(h • g-cell)]提升 22.2%。转化率方面，连续补加培养基转化率为 44.31%，一次补加培养基为 40.67%，分别是一次补加碳源补料方式(40.59%)的 1.1 倍和 1.0 倍。这表明发酵中期放料后连续补加培养基方式要优于其他两种发酵工艺。

表 4 不同补料发酵工艺对可得然胶发酵的影响

Table 4 Effects of different feeding fermentation processes on curdlan fermentation

发酵工艺	可得然胶产量/(g/L)	可得然胶生产强度/[g/(L • h)]	比产胶速率/[g/(h • g-cell)]	转化率/%
一次补加碳源	53.69	0.56	0.09	40.59
放料后连续补加补加培养基	66.51	0.69	0.11	44.31
放料后一次补加培养基	66.69	0.69	0.09	40.67

3 讨论与结论

可得然胶作为一种新型微生物胞外多糖，因其热成胶性和流变性被用于食品工业和生命医学等行业，我国目前暂时无法实现可得然胶完全自主化生产，究其原因是产量低、凝胶强度低等瓶颈问题[34]。为提升可得然胶发酵产量，众多学者在可得然胶分批发酵优化方面进行了诸多探索。如刘恩华等[35]探究了不同单一碳源补料发酵工艺对土壤杆菌发酵产可得然胶的影响，确定了一种半连续补料发酵工艺，其可得然胶产量较连续补料发酵工艺提高 1.69 倍。刘惠等[36]通过在菌体生长期补加氨水，可得然胶产生期补加葡萄糖，可得然胶产量较分批发酵提高 157%。LEE 等[37]通过在土壤杆菌发酵 46 h 时补加尿嘧啶和蔗糖，其发酵所得可得然胶产量为 93 g/L，较分批发酵提升 79%。PULIGA 等[38]在发酵 36 h 时通过补加 H_2O_2，可得然胶产量也提高了 15%左右。孙京云等[39]通过连续补料补加葡萄糖的方式提升可得然胶产量至 33.88 g/L。目前可得然胶补料分批发酵工艺优化研究集中在补加碳源、微量元素、氨水和尿嘧啶等，直接补加完全培养基的研究暂未见相关报道。

为提升可得然胶产量以满足工业化生产，本研究探讨了可得然胶补料分批发酵工艺优化，比较了发酵中期放料后一次补加碳源、连续补加培养基、一次补加培养基 3 种发酵工艺对可得然胶产量的影响。结果表明，放料后一次补加和连续补加发酵培养基，可得然胶产量均为 66.6 g/L 左右，较一次补加碳源(53.6 g/L)提高 24%左右。但从生产强度和产胶速率来看，在 48~72 h 阶段，连续补加培养的发酵工艺的可得然胶生产强度为 0.51 g/(L • h)，而培养基通过一次补加的方式，可得然胶的生产强度为 0.67 g/(L • h)，比连续补加方式提高了 31.4%。在 72~96 h 阶段，连续补加培养的发酵工艺的可得然胶生产强度为 0.94 g/(L • h)，而培养基通过一次补加的方式，可得然胶的生产强度为 0.54 g/(L • h)，比连续补加方式降低了 74.1%。造成这种差异可能是一次补加培养基后，菌体快速生长，可得然胶合成速率较高，随着发酵的继续，可得然胶的增多，发酵环境的恶化，导致菌体活性受到影响。而连续补加培养基，由于一直有新鲜氮源的加入，菌体活性维持得较好，在发酵末期还能保持一个较高的生产强度。这种差异对于将来可得然胶大规模发酵来说是非常有意义的，因为可得然胶的生产强度决定了发酵时间，可得然胶合成速率越高，发酵的时间就可以越短，从而最大程度节约成本。整个发酵过程中，放料后连续补加培养基和一次补加培养基发酵工艺可得然胶生产强度均为 0.69 g/(L • h)，比产胶速率分别为 0.11 g/(h • g-cell)和 0.09 g/(h • g-cell)。转化率方面，连续补加培养基转化率为 44.31%，一次补加培养基为 40.67%，分别是一次补加碳源补料方式(40.59%)的 1.1 倍和 1.0 倍。这表明发酵中期放料后连续补加培养基方式要优于其他两种发酵工艺。与现有可得然胶分批发酵工艺[32]相比(34 g/L)，连续补加培养基发酵 96 h 时(66.6 g/L)可得然胶产量提升 95%，对于提升可得然胶产量，降低生产成本具有重要意义，具有一定的工业化应用前景。但连续补加培养基工艺操作较一次补加碳源和培养基工艺更为复杂，在未来中试放大发酵培养和工

业化应用中还需进一步优化发酵流程和工艺并验证其长期稳定性。

本研究探索性地发现了土壤杆菌 A02 菌株在可得然胶发酵中后期, 适当补加含有氮源的培养基会有利于可得然胶的合成。可得然胶属于次级代谢产物, 它的合成是土壤杆菌在环境恶劣的条件下(氮源限制)的一种自我保护机制[40], 但是菌体长期处于恶劣环境中, 会出现菌体活力下降的可能, 所以, 在发酵后期补加适量培养基, 保持菌体活力, 可能使得菌体可以保持高效合成可得然胶的状态, 对于了解土壤杆菌 A02 在发酵过程中的变化规律具有重要意义, 为可得然胶进一步放大中试和工业化生产提供理论支持。

参考文献

[1] PHILLIPS KR, PIK J, LAWFORD HG, *et al*. Production of curdlan-type polysaccharide by *Alcaligenes faecalis* in batch and continuous culture [J]. Canadian Journal of Microbiology, 1983, 29(10): 1331–1338.

[2] NAKANISHI I, KIMURA K, SUZUKI T, *et al*. Demonstration of curdlan-type polysaccharide and some other *β*-1,3-glucan in microorganisms with aniline blue [J]. Journal of General and Applied Microbiology, 2006, 22(1): 1–11.

[3] GHAI S, HISAMATSU M, AMEMURA A, *et al*. Production and chemical composition of extracellular polysaccharides of *Rhizobium* [J]. Journal of General and Applied Microbiology, 1981, 122: 33–40.

[4] GAO H, YANG L, TIAN J, *et al*. Characterization and rheological properties analysis of the succinoglycan produced by a high-yield mutant of *Rhizobium radiobacter* ATCC 19358 [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020(166): 61–70.

[5] YUAN M, FU G, SUN YM, *et al*. Biosynthesis and applications of curdlan [J]. Carbohydrate Polymers, 2021, 273: 118597.

[6] 杨镕, 臧一宇, 吴鹏, 等. 多糖类食品胶体的功能特性及其在食品加工中的应用研究进展[J]. 食品科学, 2024, 45(5): 283–292.
YANG R, ZANG YY, WU P, *et al*. Research progress on functional properties of polysaccharide-based food colloids and their application in food processing [J]. Food Science, 2024, 45(5): 283–292.

[7] 刘正才, 叶志伟, 李垄清, 等. 可得然胶与生物大分子的相互作用及其研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2025, 16(5): 52–61.
LIU ZC, YE ZW, LI LQ, *et al*. Research progress on the interaction between curdlan and biomacromolecules [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2025, 16(5): 52–61.

[8] GHIMICI L, NAFUREANU MM, CONSTANTIN M, *et al*. Application of some cationic pullulan and curdlan derivatives as flocculants in fungicides-containing wastewater purification [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2024, 283(P1): 137408–137408.

[9] VERMA DK, NIAMAH AK, PATEL AR, *et al*. Chemistry and microbial sources of curdlan with potential application and safety regulations as prebiotic in food and health [J]. Food Research International, 2020, 133: 109136.

[10] SPICER E, GOLDENTHAL EI, IKEDA T. A toxicological assessment of curdlan [J]. Food and Chemical Toxicology, 1999, 37(4): 455–479.

[11] 陈艳燕, 孙瑾, 尹胜利, 等. 新型食品添加剂增稠剂-可得然胶在食品工业中的应用[J]. 中国食品添加剂, 2007(3): 134–138.
CHEN YY, SUN J, YIN SL, *et al*. A new type of thickener-curdlan and itsusein in foodindustry [J]. China Food Additives, 2007(3): 134–138.

[12] LIANG Y, QU ZT, LIU M, *et al*. Effect of curdlan on the quality of frozen-cooked noodles during frozen storage [J]. Journal of Cereal Science, 2020, 95: 103019.

[13] VASIEE A, JAMAB SM, FALAH F, *et al*. Microbial production of curdlan in sugar beet molasses medium: Effects on physicochemical attributes of reduced-fat frankfurter sausages [J]. LWT-Food Science and Technology, 2025, 216: 117310.

[14] 姜放文, 赵若冰, 赵金瑶, 等. 可得然胶与瓜尔豆胶的复配特性及其在酸奶中的应用[J]. 中国食品添加剂, 2023, 34(4): 23–32.
JIANG FW, ZHAO RB, ZHAO JY, *et al*. Blending characteristics of curdlan gum and guar gum and their application in yogurt [J]. China Food Additives, 2023, 34(4): 23–32.

[15] 陈欢, 曹婷, 唐清苗, 等. 基于碳水化合物的低热量脂肪模拟物研究进展[J]. 中国粮油学报, 2021, 36(11): 187–195.
CHEN H, CAO T, TANG QM, *et al*. Progress of the research on carbohydrate-based low-calorie fat subsyitute [J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2021, 36(11): 187–195.

[16] HOU G, HAN Y, ZHOU F, *et al*. Enhancing pork meat batter with curdlan gum-guar gum composite microgels: Impact of fat replacer on gel properties, water distribution, and sensory perception [J]. Food Chemistry, 2025, 470: 142706.

[17] 陈道春, 陆志娟, 齐自元. 预处理可得然胶对速冻牛肉饼食用品质的影响[J]. 食品科技, 2022, 47(9): 88–93.
CHEN DC, LU ZJ, QI ZY. Effect of pretreated curdlan on the eating quality of quick-frozen beef patty [J]. Food Science and Technology, 2022, 47(9): 88–93.

[18] SUN X, LIU Y, LI X, *et al*. Curdlan inclusion modifies the rheological properties and the helix-coil transition behavior of gelatin and increases the flexibility of gelatin films [J]. Food Chemistry, 2025, 469: 142567.

[19] ZENG X, ZHONG W, HE F, *et al*. Tailoring structural and mechanical properties of konjac glucomannan/curdlan composite hydrogels by freeze-thaw treatment [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2024, 282(P5): 137116.

[20] 于婷婷, 韩鸿宇, 张永刚, 等. 高凝胶强度可得然胶生产菌的构建筛选与发酵工艺优化研究[J]. 食品与发酵工业, 2024, 50(18): 82–90.
YU TT, HAN HY, ZHANG YG, *et al*. Construction and screening of high gel strength curdlan production bacteria and optimization of fermentation medium [J]. Food and Fermentation Industries, 2024, 50(18): 82–90.

[21] 李学朋, 王中凯, 李树标, 等. 高凝胶强度可得然胶的发酵及提取工艺优化研究[J]. 工业微生物, 2024, 54(6): 49–52.
LI XP, WANG ZK, LI SB, *et al*. Optimization of fermentation and extraction process of high gel strength curdian [J]. Industrial Microbiology, 2024, 54(6): 49–52.

[22] 万婕, 王贻峰, 高红亮, 等. 搅拌桨组合对土壤杆菌产可得然胶的影响[J]. 工业微生物, 2020, 50(3): 24–29.
WAN J, WANG YF, GAO HL, *et al*. Effects of impeller combination on curdlan production by *Agrobacterium* sp. [J]. Industrial Microbiology, 2020, 50(3): 24–29.

[23] 魏凤, 段力萌. 微藻二十二碳六烯酸菌种选育和发酵培养技术研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(23): 7973–7980.
WEI F, DUAN LM. Study on breeding and fermentation technology of microalgae docosahexaenoic acid strain [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2019, 10(23): 7973–7980.

[24] 蔡谨, 孙章辉, 王隽, 等. 补料发酵工艺的应用及其研究进展[J]. 工业微生物. 2005, 35(1): 42–48.
CAI J, SUN ZH, WANG J, *et al*. Application of fed-batch fermentation process and its research progresses [J]. Industrial Microbiology, 2005, 35(1): 42–48.

[25] WU J, ZHAN X, LIU H, *et al*. Enhanced production of curdlan by *Alcaligenes faecalis* by selective feeding with ammonia water during the cell growth phase of fermentation [J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2008, 24(6): 1035–1039.

[26] WU D, LI A, MA F, *et al.* Genetic control and regulatory mechanisms of succinoglycan and curdlan biosynthesis in genus *Agrobacterium* [J]. Applied Microbiology & Biotechnology, 2016, 100(14): 6183–6192.

[27] 俞晓芸, 李娜, 高双玉. 一种提升阿卡波糖发酵水平的补料控制方法[J]. 发酵科技通讯, 2023, 52(4): 191–195.
YU XY, LI N, GAO SY. A feeding control method to improve the fermentation level of acarbos [J]. Bulletin of Fermentation Science and Technology, 2023, 52(4): 191–195.

[28] 郭建敏, 郭利飞, 赵廷彬, 等. 地衣芽孢杆菌分批补料发酵 γ-聚谷氨酸[J]. 食品研究与开发, 2022, 43(18): 191–198.
GUO JM, GUO LF, ZHAO TB, *et al*. Fed-batch fermentation of γ-polyglutamate by *Bacillus licheniformis* [J]. Food Research and Development, 2022, 43(18): 191–198.

[29] 熊华仪, 陈曦, 刘月锋, 等. 补料策略优化促进乳酸乳球菌 HB03 发酵合成 Nisin[J]. 食品科学, 2023, 44(22): 218–224.
XIONG HY, CHEN X, LIU YF, *et al*. Optimization of fed-batch culture strategy for improved synthesis of Nisin by *Lactococcus lactis* HB03 [J]. Food science, 2023, 44(22): 218–224.

[30] 许媛, 韩建邦, 祝晨琳, 等. 高产维生素 B 乳酸菌的筛选、鉴定及培养优化的研究[J/OL]. 微生物学杂志, 1–8. [2025-04-09]. http://kns.cnki.net/kcms/detail/21.1186.q.20250319.2009.004.html
XU Y, HAN JB, ZHU CL, *et al*. Screening, identification and culture optimization of *Lactic acid* bacteria with high yield of vitamin B [J/OL]. Journal of Microbiology, 1–8. [2025-04-09]. http://kns.cnki.net/kcms/detail/21.1186.q.20250319. 2009.004.html

[31] 刘晓霞. 土壤杆菌产可得然胶发酵工艺优化及其性质的研究[D]. 上海: 华东师范大学, 2017.
LIU XX. The research of fermentation process optimization and properties of curdlan by *Agrobacterium* sp. [D]. Shanghai: East China NormaL University, 2017.

[32] 姚博伟, 陶鹏, 高红亮. 土壤杆菌 A02 分批发酵产可得然胶动力学模型的建立[J]. 食品安全质量检测学报, 2025, 16(9): 40–47.
YAO BW, TAO P, GAO HL. Establishment of kinetic model for the batch fermentation production of curdlan by *Agrobacterium* sp. A02 [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2025, 16(9): 40–47.

[33] MILLER GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar [J]. Analytical Chemistry, 1959, 31(3): 426–428.

[34] 俞珊, 段孟霞, 童彩玲, 等. 可得然胶功能性质及其在食品中的应用研究进展[J]. 食品科学, 2022, 43(19): 277–284.
YU S, DUAN MX, TONG CL, *et al.* Progress in research on functional properties of curdlan and its application in food [J]. Food Science, 2022, 43(19): 277–284.

[35] 刘恩华, 杨雪霞, 陶鹏, 等. 可得然胶补料发酵工艺优化[J]. 食品与发酵科技, 2018, 54(2): 69–74.
LIU ENH, YANG XX, TAO P, *et al*. The optimization of feeding process in curdlan production [J]. Food and Fermentation Sciences & Technology, 2018, 54(2): 69–74.

[36] 刘惠, 詹晓北, 吴剑荣. 不同的底物流加补加方式对 *Alcaligenes faecalis* 发酵生产热凝胶的影响[J]. 生物技术, 2008(4): 78–81.
LIU H, ZHAN XB, WU JR. Curdlan production by *Alcaligenes faecalis* with varied feeding strategy [J]. Biotechnology, 2008(4): 78–81.

[37] LEE JH, LEE IY. Optimization of uracil addition for curdlan (*β*-1→3-glucan) production by *Agrobacterium* sp [J]. Biotechnology Letters, 2001, 23(14): 1131–1134.

[38] PULIGA SL, HANDA S, GUMMADI SN, *et al*. Enhancement and scale-up of *β*-(1,3) glucan production by *Agrobacterium* sp [J]. International Journal of Food Engineering, 2010, 6(1): 1736.

[39] 孙京云, 张琴, 张雷达, 等. 搅拌桨组合与葡萄糖流加工艺相结合的凝胶多糖发酵工艺优化[J]. 华东理工大学学报(自然科学版), 2019, 45(4): 585–592.
SUN JY, ZHANG Q, ZHANG LD, *et al*. Optimization of curdlan fermentation process by combining impeller combinations and glucose fed-batch modes [J]. Journal of East China University of Science and Technology, 2019, 45(4): 585–592.

[40] JIANG LF. Effect of nitrogen source on curdlan production by *Alcaligenes faecalis* ATCC3174 [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2013, 52: 218–220.

(责任编辑: 安香玉 蔡世佳)