

短梗霉多糖发酵过程特征的研究

邱宏伟* 杨守志

(中国科学院化工冶金研究所, 北京)

本文针对短梗霉多糖发酵过程, 经研究建立了基于逻辑方程和 Luedeking-Piret 方程的动力学模型:

$$\begin{aligned} dX/dt &= \mu X(1 - X/X_m) \\ dP/dt &= m_1 X + m_2 (dX/dt) \\ dS/dt &= -b_1 X - b_2 (dX/dt) - b_3 (dP/dt) \end{aligned}$$

其流变特性由初始时的牛顿流体转变为典型的假塑性非牛顿流体并遵从指数方程, 即: $\tau = K\dot{\gamma}^n$ 随发酵过程进行, 发酵液的表现粘度增大, 体积氧传质系数减小。搅拌转速的增加有利于提高体积氧传质系数。流变指数 n 、稠度系数 K 、气液传质系数 kLa 与菌体浓度 X 、多糖浓度 P 、搅拌转速 N 及表现粘度 η_a 间分别有如下经验方程:

$$\begin{aligned} K &= 1.2 \times 10^{-2} X^{2.43} \\ n &= 0.461(P/P_m)^{0.07} (X/X_m)^{0.216} \\ \frac{kLaD_i^2}{D} &= 1.48 \times 10^4 \left(\frac{D_i N^2}{g}\right)^{0.71} \left(\frac{\eta_w}{\eta_a}\right)^{0.15} \end{aligned}$$

关键词 短梗霉; 微生物多糖; 发酵; 流变学; 氧传递

短梗霉胞外多糖系借助菌体发酵制取的一种生物高分子聚合物, 其独特的物性和生理功能使之广泛地应用于食品、医药、石油和轻工等行业。

在发酵过程中, 由于菌体的繁殖和短梗霉多糖的积累, 发酵液由初始的牛顿流体逐渐转变为高粘的非牛顿流体, 这种物性的变化直接影响体系的混合热、质传递等。从而对微生物的生长和产品的产量与质量产生影响。

前人曾对微生物胞外多糖的流变性质进行过研究^[1,2], 但尚未涉及对发酵过程的流变性质、氧的质量传递及菌体、多糖浓度间的关系进行探讨。为此, 本文从生化反应器的设计及发酵过程的控制考虑, 针对短梗霉多糖, 研究其发酵过程中体系的动力学参数、流变性质及氧的质量

传递的变化规律, 确立合适的反应动力学方程, 建立发酵过程中流变性质、体积氧传质系数与操作变量间的关联式, 为今后工业化反应器的设计和发酵过程控制提供依据。

理论分析和实验方法

(一) 动力学模型

Weiss等^[3]用逻辑方程和Luedeking-Piret方程描述了黄单胞多糖发酵过程动力学, 在他们提出的动力学模型的基础上, 我们提出短梗霉多糖发酵过程动力学模型如下:

$$dX/dt = \mu X(1 - X/X_m) \quad (1)$$

本文于1989年8月18日收到。

* 现在国家科委中国农村技术开发中心。

$$dP/dt = m_1 X + m_2 (dX/dt) \quad (2)$$

$$dS/dt = -b_1 X - b_2 (dX/dt) - b_3 (dP/dt) \quad (3)$$

$$\text{初始条件: } t=0, X=X_0, P=P_0, S=S_0 \quad (4)$$

X_m, X, P, S 随时间的变化由实验确定, $\mu, m_1, m_2, b_1, b_2, b_3$ 可由实验数据拟合模型方程求出^[4]。

(二) 流变方程

采用指数方程描述发酵过程的流变特征, 方程形式如下:

$$\tau = K \dot{\gamma}^n \quad (5)$$

表观粘度定义为:

$$\eta = K \dot{\gamma}^{n-1} \quad (6)$$

$n=1$, 为牛顿流体; $n>1$, 为胀松型非牛顿流体; $n<1$, 为假塑型非牛顿流体。

(三) 氧的传递

发酵过程中液相溶解氧的质量平衡方程为:

$$dC/dt = k_L a (C_s - C) - Q \quad (7)$$

稳态时, $dC/dt=0$, 由方程(7)得:

$$k_L a = Q / (C_s - C) = R / (1 - C/C_s) \quad (7a)$$

当停止通气时, 方程(7)右式第一项为零, 由此得:

$$\frac{d(C/C_s)}{dt} = -R$$

当发酵液中的溶解氧浓度大于微生物生长的临界溶解氧浓度 C^* 时, R 为常数, 式中 C/C_s 为对比溶氧浓度, 即为溶氧电极的输出 $E(t)$, 上式积分, 并令 $t=0, C(0)=C_1$, 得:

$$C/C_s = C_1/C_s - Rt \quad (7b)$$

方程(7b)描述了理想状态时, 停气阶段溶氧输出与停气时间的线性关系, 但真实状态下, 因存在电极滞后效应, 停气后电极的输出与停气的时间成非线性关系, 为了

消除电极滞后引进的误差, 这里引用由传递函数法导出的改进数学模型^[5,6], 方程如下:

$$\frac{C}{C_s} = \frac{C_1}{C_s} - R \left[t - T - \frac{1}{k} (1 - \exp(-k(t-T))) \right] \quad (7c)$$

式中, T 为电极的死区时间, k 为电极的响应系数, 可从阶跃响应实验中确定。由实验数据拟合方程(7c)得到的 R 值, 代入(7a), 即可根据该条件下的溶氧电极输出值 C/C_s 求得 $k_L a$ 。

(四) 实验方法

1. 设备: 本实验在 NBS 公司生产的 GEN-II 型 16L 的发酵罐及华东化工学院生产的 MBF-III-10 型发酵罐中进行, 工作体积分别为 10L 及 6L。

2. 菌种: 出芽短梗霉 (*Aureobasidium pullulans*) AS 3.2756, 由中国科学院微生物所提供。

3. 培养条件: 培养基成分(%): 蔗糖 5, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.02, $(NH_4)_2SO_4$ 0.04, NaCl 0.1, KH_2PO_4 0.2, 酵母膏 0.2, pH=6.0。转速 400—700rpm, 罐压: 4.9×10^4 Pa, 通气比: 0.5—1.0vvm, 温度: 28°C。菌种在摇瓶中培养 24h 后, 作为上罐用的种液, 接种量为 5%。

4. 测定: 发酵过程中定期取样, 以分析菌体浓度和多糖浓度, 前者用干重法测定, 后者采用总碳法^[4]测定。在不同的发酵时期, 读取稳态时的溶氧读数, 并测定停止通气时发酵液中溶解氧浓度随时间的变化, 进而可利用(7a)、(7b)式计算体积氧传质系数 $k_L a$ 。溶氧电极系 NBS 公司的原电池型电极, 利用阶跃响应实验, 测得电极常数分别为死区时间 $T=17$ (s), 响应系数 $k=0.04$ (s⁻¹)。发酵液的流变性质在东德产的 Rheotest 2.1 型转筒式流变

仪中测定。

结 果 与 分 析

(一) 发酵过程动力学特征

短梗霉多糖发酵代表性的时间曲线如图 1。发酵过程中, 维持恒温, 固定转速及通风量等不变情况下, 底糖浓度随时间而逐渐下降, 初期慢, 后期快, 菌体生长很快即进入对数生长期, 48h 后增长缓慢。pH 初期迅速下降, 至 4 左右, 48h 后又略有回升, 溶氧浓度的变化也大致相似。

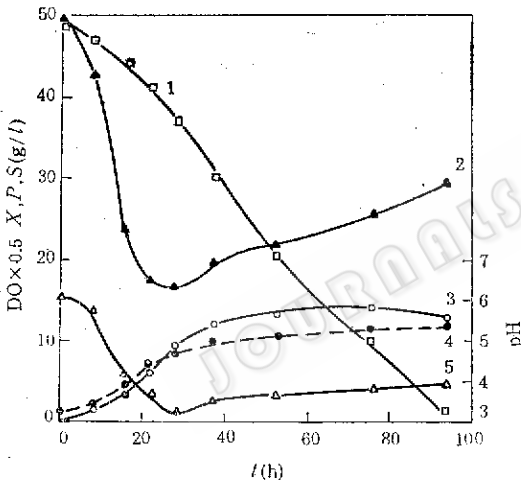


图 1 发酵过程中各参数的变化

Fig.1 The changing of process-parameters during the fermentation process

600rpm, 1vvm

1. 蔗糖 Sucrose 2. 溶解氧 Dissolved oxygen
3. 多糖 Polysaccharide 4. 菌体 Biomass
5. pH

将实验中得到的动力学数据, 即不同发酵时期的菌体浓度 X 、多糖浓度 P 、残糖浓度 S , 对方程(1)、(2)、(3)进行拟合, 给定模型初值为: $X_0 = 2.0$; $X_m = 12.0$; $P_0 = 0.4$; $S_0 = 49.3 \text{g/L}$, 得模型参数如下: $\mu = 0.073$; $m_1 = 0.00214$; $m_2 = 1.16$; $b_1 = 0.013$; $b_2 = 0.162$; $b_3 = 0.042$ 。

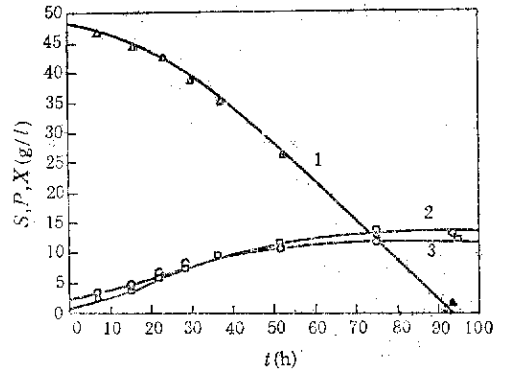


图 2 动力学模型与实验数据的拟合

Fig.2 Comparison of the kinetic model and the experimental data

600rpm, 1vvm 1. S, 底物 Substrate

2. P, 产物 Product 3. X, 菌体 Biomass

图 2 为动力学数据点和模型曲线拟合程度的比较。上述模型拟合实验点的最大相对误差为 20%, 平均相对误差为 12%。

在多糖的合成过程中, 如果它主要是与非生长型机制相联系的, 即: $m_1 X \gg m_2 dX/dt$, 则方程(2)可简化为:

$$dP/dt = m_1 X \quad (8)$$

上式积分, 取初始条件:

$$t = 0, X(0) \approx X_1, P(0) \approx 0$$

$$\text{令: } t = t, P(t) = P_{m1}(t)$$

得:

$$P_{m1}(t) = m_1 \left(\frac{X_m}{\mu} \right) \ln \left[1 - \frac{X_1}{X_m} \cdot (1 - \exp(\mu t)) \right] \quad (9)$$

若多糖的合成主要是与生长型机制相联系的, 即: $m_2 dX/dt \gg m_1 X$, 则方程(2)为:

$$dP/dt = m_2 dX/dt \quad (10)$$

上式积分, 取初始条件:

$$t = 0, X(0) \approx X_1, P(0) \approx 0$$

$$\text{令: } t = t, P(t) = P_{m2}(t)$$

得:

$$P_{m2}(t) = m_2 X_1 \left[\frac{\exp(\mu t)}{1 - (X/X_m)(1 - \exp(\mu t))} - 1 \right] \quad (11)$$

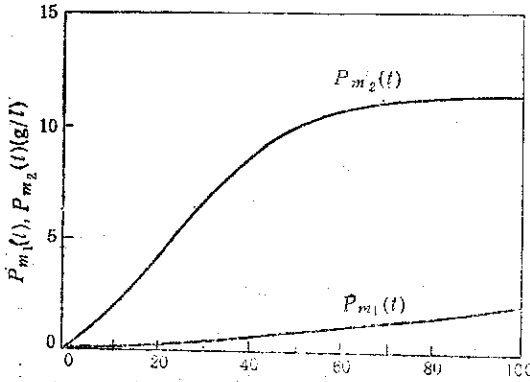


图 3 $P_{m_1}(t)$ 与 $P_{m_2}(t)$ 相对大小比较
Fig.3 Comparison of $P_{m_1}(t)$ and $P_{m_2}(t)$
600rpm, 1vvm

将 $P_{m_1}(t)$ 、 $P_{m_2}(t)$ 对时间的变化作图，如图 3 所示，图中可见， $P_{m_2}(t)$ 始终大于 $P_{m_1}(t)$ ，且在发酵进行至 16h 后，表现更加显著，由此可得出，多糖的形成过程主要是与生长型机制相联系，随发酵过程中供氧强度的增大， $P_{m_1}(t)$ 和 $P_{m_2}(t)$ 的差别将更大。因此，在发酵的前期，提高发酵液中的氧传递，可增大菌体生长速率，有利于提高产量。

(二) 发酵液的流变特征

在剪切速率为 $145.8(s^{-1})$ 至 $1312(s^{-1})$ 范围内，短梗霉多糖发酵液主要表现为假塑性非牛顿液体。从图 4 中可见，在发酵开始时为牛顿流体；当发酵进入加速期时，发酵液表现为宾汉型非牛顿流体；进入对数生长期后，发酵液完全表现为假塑型非牛顿流体。随发酵时间的增大，相同剪切速率下的剪切内应力随之增大，但在发酵的后期，剪切内应力却又随之略有减小。发酵液的表现粘度随发酵期的增加而增大，在发酵的前期，其增加较缓慢，在发酵中期增加较快，至发酵后期趋于恒定甚至下降。发酵液的表现粘度受多糖浓度、多糖分子量及菌体生长形态的影响，随发酵过程的进行，发酵液中多糖

浓度逐渐增大，菌体也由酵母菌落发展成丝状菌，因此表现粘度逐渐增大，发酵后期，表现粘度的下降可能是因短梗霉多糖解聚酶的作用所致。

当发酵液受剪切时，随剪切速率的增大，表现粘度迅速下降，表现出发酵液显著的假塑性特征。随剪切速率的继续增大，表现粘度的下降趋于平缓。当剪切速率增大到一定值时，发酵液将表现为牛顿型流体特征。

图 5 为发酵过程中稠度系数 K 、流变指数 n 的变化曲线。图中可见，随发酵的进行， K 值迅速增大， n 则急剧减小，发酵后期， n 值通常低于 0.5，以后则基本趋于常数。在发酵后期， K 值下降、 n 值也略有上升，该现象也与发酵液中短梗霉多糖解聚酶的出现有关。

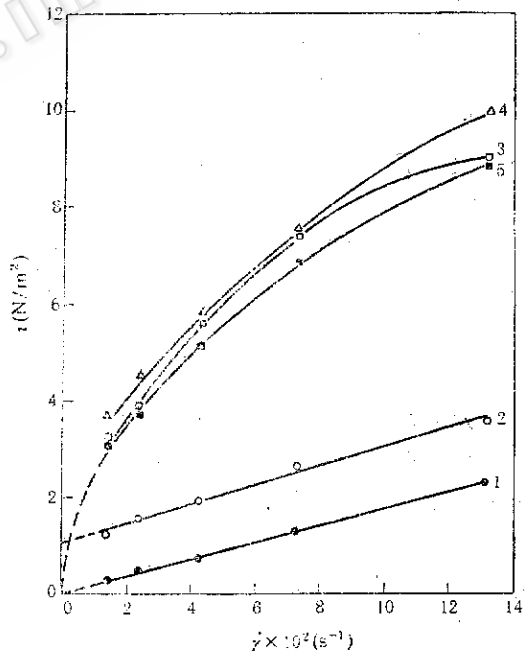


图 4 不同发酵时期发酵液的流变特性
Fig.4 Rheogram of fermentation broth
500rpm, 1vvm

1. 0h 2. 12h 3. 33h 4. 57h 5. 21h

由于流变特性主要受菌体浓度、多糖浓度的影响，因此，将流变指数 n 、稠度

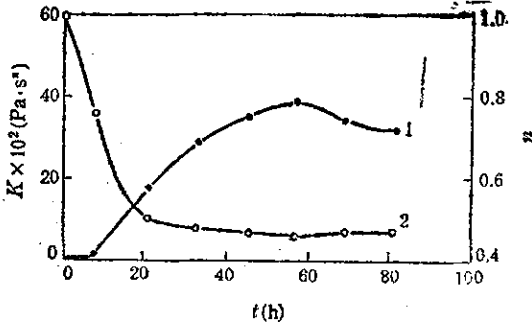
图 5 K, n 随发酵时间的变化

Fig.5 Variation of the K, n value during the fermentation process

500rpm, 1vvm 1. $K-t$ 2. $n-t$

系数 K 与菌体浓度 X 、多糖浓度 P 进行了关联, 得到经验方程如下:

$$n = 0.461(X/X_m)^{0.218}(P/P_m)^{0.07} \quad (12)$$

该方程的复相关系数为 0.94, 平均相对误差为 15%。

关联结果, K 只与菌体浓度有关, 与多糖浓度无关, 关联式如下:

$$K = 1.2 \times 10^{-2} X^{2.43} \quad (13)$$

该方程的复相关系数为 0.95, 平均相对误差为 14%。

在经验方程中, 未考虑多糖分子量的影响。个别实验测得发酵后期多糖分子量为 $1-2 \times 10^4$ 。

(三) 发酵过程中的氧传递特征

发酵过程中体积氧传递系数 $k_L a$ 的变化, 参见图 6。随发酵过程的进行, 发酵液的粘度和菌体的“结构化”程度增大, 氧的传递阻力增大, $k_L a$ 值减小。发酵后期, 因发酵液粘度的降低, 使 $k_L a$ 略有回升。搅拌速率的增大, 提高了溶液中的混和效果, 降低了溶液中的表观粘度, 从而使 $k_L a$ 值增大。

在本实验的条件下, 影响较显著的无因次数群为: $\frac{k_L a D_i^2}{D}$, $\frac{D_i N^2}{g}$, $\frac{\eta_w}{\eta_o}$,

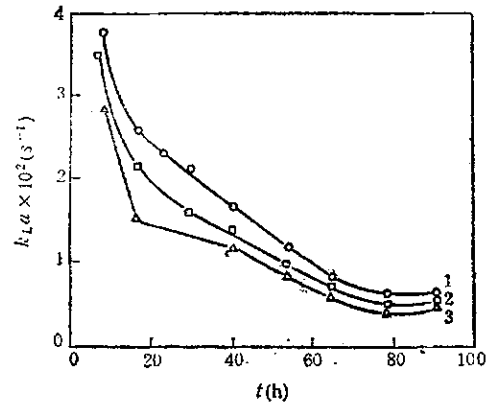


图 6 发酵过程中体积氧传质系数的变化

Fig.6 Variation of the volumetric oxygen mass transfer coefficient during the fermentation process

1. 700rpm, 1vvm; 2. 600rpm, 1vvm;
3. 500rpm, 1vvm

$$\frac{D_i U \rho_G}{\eta_G}$$

由于本实验条件未对气量作大幅度变化, 故只限于对转速及粘度进行关联。这里设 D 为常数, 其值由文献^[7]查得为 $1.91 \times 10^{-5} \text{cm}^2/\text{s}$, η_o 为单位剪切速率 (即 $\dot{\gamma} = 1.0 \text{s}^{-1}$) 下的表观粘度, 即 $\eta_o = K$ 。

通过对三轮实验中的 66 组数据进行逐步回归, 得到回归方程如下:

$$\frac{k_L a D_i^2}{D} = 1.48 \times 10^4 \left(\frac{D_i N^2}{g} \right)^{0.71} \times \left(\frac{\eta_w}{\eta_o} \right)^{0.15} \quad (15)$$

回归的复相关系数为 0.91, 其最大相对误差为 13%, 平均相对误差为 1.78%。回归的复相关系数不高, 其主要原因是: 若发酵液中的粘度较大, 停气测量溶氧浓度的变化时, 发酵液中的气泡不能很快逸出, 使微生物耗氧速率的测定存在一定误差, 从而给 $k_L a$ 拟合计算带来误差, 另一原因是在上述关联式中假设扩散系数 D 为常数, 实际发酵过程中, 该值也是变化的。

符号说明

a 气液比表面积 (m^2/m^3), b_1 动力学参数 ($\text{g底物}/\text{g菌体}\cdot\text{h}$), b_2 动力学参数 ($\text{g底物}/\text{g菌体}$), b_3 动力学参数 ($\text{g底物}/\text{g多糖}$), C 溶解氧浓度 (mgO_2/L), C_s 饱和溶解氧浓度 (mgO_2/L), C_1 稳态时, 发酵液中的溶解氧浓度 (mgO_2/L), C^* 发酵液中的临界氧浓度 (mgO_2/L), D 氧在发酵液中的扩散系数 (m^2/s), D_i 搅拌浆直径 (m), g 重力加速度 (m/s^2), K 稠度系数 ($\text{Pa}\cdot\text{s}^n$), k 电极特性参数 (s^{-1}), k_{LA} 体积氧传质系数 (s^{-1}), m_1 动力学模型参数 ($\text{g多糖}/\text{g菌体}\cdot\text{h}$), m_2 动力学模型参数 ($\text{g多糖}/\text{g菌体}$), N 搅拌转速 (s^{-1}), n 流变指数, P 多糖浓度 ($\text{g多糖}/\text{L}$), P_0 初始多糖浓度 ($\text{g多糖}/\text{L}$), P_m 最大多糖浓度 ($\text{g多糖}/\text{L}$), Q 微生物耗氧速率 ($\text{mgO}_2/\text{L}\cdot\text{s}$), $R/R = Q/C_1$ (s^{-1}), S 底物浓度 ($\text{g底物}/\text{L}$), S_0 初始底物浓度 ($\text{g底物}/\text{L}$), T 电极特性参数 (s), t 时间 (s), U 表观气速 (m/s), X 菌体浓度 ($\text{g菌体干重}/\text{L}$), X_0 初始菌体浓度 ($\text{g菌体干重}/\text{L}$), X_m 最大菌体浓度 ($\text{g菌体干重}/\text{L}$), γ 剪切速率 (s^{-1}), η 表观粘度 ($\text{Pa}\cdot\text{s}$), η_a 单位剪切速率下的表观粘度 ($\text{Pa}\cdot\text{s}$), η_w 水的粘度 ($\text{Pa}\cdot\text{s}$), μ 动力学参数模型 (h^{-1}), ρ 密度 (kg/m^3), τ 剪应力 (N/m^2)

参 考 文 献

- [1] Charles, M.: *Advances in Biochemical Engineering*, 8:1, 1978.
 [2] LeDuy, A. et al.: *Biotech. & Bioeng.*, 16:61, 1974.
 [3] Weiss, R.M. and Ollis, D.F.: *Biotech. & Bioeng.*, 22:859, 1980.
 [4] 邱宏伟: 中国科学院化工冶金研究所硕士论文, 1989年6月。
 [5] Yang, X.M. et al. *Biotech & Bioeng.*, 31:1006, 1988.
 [6] 杨晓明, 毛维颖: *生物工程学报*, 3(1):64, 1987.
 [7] Ju, L. K. and Ho, C. S.: *Biotech & Bioeng.*, 31:995, 1988.

THE CHARACTERISTICS OF AUREOBASIDIUM PULLULANS FERMENTATION PROCESS

Qiu Hongwei Yang Shouzhi

(Institute of Chemical Metallurgy, The Chinese Academy of Sciences, Beijing)

Fermentation kinetics, rheological property and oxygen mass transfer coefficient were studied during the fermentation process of *Aureobasidium pullulans*. A mathematical kinetic model based on the logistic equation and Luedeking-Piret model has been established with the experimental results. The rheology of the fermentation broth behaves as pseudoplastic non-Newtonian fluid. The oxygen mass transfer coefficient decreases during the fermentation process, an exponential equation has been postulated to describe the relationship among the oxygen mass transfer coefficient, the agitation speed and the apparent viscosity of the broth.

Key words

Pullulan, polysaccharide, fermentation, rheology, oxygen mass transfer