

蛹虫草菌胞外多糖发酵及其发酵动力学

李 信¹ 许 雷¹ 蔡昭铃²

¹(中国农业科学院研究生院生物化学教研室 北京 100081)

²(中国科学院化工冶金研究所 北京 100080)

摘 要 对蛹虫草菌(*Cordyceps militaris*)胞外多糖(EPS)的发酵过程和发酵动力学进行了研究。基于 Logistic 方程和 Luedeking-Piret 方程,得到了描述发酵过程的动力学数学模型和模型参数,同时对实验数据与模型进行了验证比较。模型计算与实验结果拟合良好,模型正确地反应了蛹虫草菌胞外多糖的发酵过程及其动力学机制。

关键词 蛹虫草菌,胞外多糖,数学模型,发酵动力学

分类号 TQ920.1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(1999)04-0507-11

多年来,国内外一直致力于虫草菌丝体的人工培养^[1]和虫草生物活性物质虫草多糖^[2,3]的研究,并对其理化特性、分子结构、生物学功能和药理作用进行了报道。但对其多糖的发酵特性,发酵动力学研究报道很少。本文以蛹虫草菌(*Cordyceps militaris*)为材料,对其胞外多糖(EPS)的发酵过程及其动力学进行了研究探讨。

1 实验材料与分析方法

1.1 供试菌株

蛹虫草菌(*Cordyceps militaris*)ACCC50405,由中国农科院菌种保藏中心提供。

1.2 培养基与发酵条件

1.2.1 发酵培养基(%):甜菜糖 6,硝酸钾 0.2,磷酸氢二钾 0.04,硫酸镁 0.02,硫酸亚铁 0.004,酵母粉 0.06,调至初始 pH7.0。

1.2.2 培养方法和发酵条件:培养基装量 100 mL/500 mL 三角瓶,每个重复 3 次,发酵周期为 120 h,每 6 h 取样一次进行菌丝体生长量、多糖产量、发酵液粘度、糖(甜菜糖)消耗测定;接种量 6%,发酵温度 28℃,摇床转数 200r/min。

1.3 分析检测项目及测定方法

1.3.1 菌体生长:菌体生长采用干重法:蛹虫草菌发酵液 10000r/h 离心 10 min 后,分离菌体水洗再离心 1 次,菌体在 105℃条件下烘干称重。

1.3.2 多糖产量:多糖产量也采用干重法:蛹虫草菌多糖发酵液 10000r/min 离心 10 h,离心上清液加 3 倍体积的 95%乙醇沉淀多糖,取多糖沉淀置于 60℃烘干 2 h 后称重。

1.3.3 多糖粘度测定:粘度测定用 NDJ-1 型旋转粘度计,3 号转子,转速 60 r/min。

1.3.4 碳源(甜菜糖)消耗量的测定:采用蒽酮法。

1.3.5 pH 值测定：采用精密 pH 试纸进行测定。

2 动力学模型

本文采用 Weiss 等^[4]所用的 Logistic 方程和 Luedeking-Piret 方程来描述蛹虫草菌胞外多糖发酵的动力学过程。菌体生长描述采用 Logistic 方程：

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

初条件 $t=0$ 时, $X = X_0$

式中 X_m 为最大菌体浓度, 比生长速度 μ 设为常数,
该方程的积分式为:

$$\mu t = \ln(X_m/X_0 - 1) + \ln[X/(X_m - X)] \quad (2A)$$

$$\text{或 } X(t) = X_0 \exp(\mu t) / [1 - (X_0/X_m)[1 - \exp(\mu t)]] \quad (2B)$$

由实验数据, 以 $\ln[X/(X_m - X)]$ 对 t 作图得的直线斜率即为 μ , 截距为: $\ln[X_0/(X_m - X_0)]$ 。

产物(多糖 P)的形成和底物(甜菜糖 S)消耗采用 Luedeking-Piret 方程:

$$dP/dt = m_1 X + m_2 (dX/dt) \quad (3)$$

$t=0$ 是 $P = P_0$

方程中 m_1 、 m_2 为模型参数, 依发酵条件的变化而不同。把方程(1)代入方程(3)得:

$$dP/dt = m_1 X + m_2 \mu X(1 - X/X_m) \quad (4)$$

方程(2)代入方程(4), 积分得方程(5):

$$P(t) = P_0 + m_2 [X(t) - X_0] + m_1 (X_m/\mu) \ln[1 - (X_0/X_m)(1 - \exp(\mu t))] \quad (5)$$

稳态时, $dX/dt = 0$ $X = X_m$

则由方程(3)得:

$$m_1 = (dP/dt)_{st}/X_m \quad (6)$$

方程(5)可写成如下形式:

$$P(t) = m_2 A(t) + m_1 B(t) + P_0 \quad (7A)$$

式中

$$A(t) = X(t) - X(0) \quad (7B)$$

$$B(t) = (X_m/\mu) \ln[1 - (X_0/X_m)(1 - e^{\mu t})] \quad (7C)$$

其中 μ 、 X_m 、 X_0 、 m_1 均已知。因此以 $[P(t) - P_0 - m_1 B(t)]$ 对 $A(t)$ 作图, 直线斜率即为 m_2 值。

发酵过程中的底物消耗主要与菌体生长和产物合成及其代谢有关, 因此, 底物消耗速度可由下式表示:

$$dS/dt = -[1 - (Y_{x/s})](dX/dt) - [1/(Y_{p/s})](dP/dt) - KeX \quad (8)$$

将(3)式代入方程(8), 可得:

$$dS/dt = -[m_1/Y_{p/s} + Ke]X - [1/(Y_{x/s}) + m_2/(Y_{p/s})](dX/dt) \quad (9)$$

或者:

$$dS/dt = -b_1 X - b_2 (dX/dt) \quad (10A)$$

$$t=0 \quad S = S_0$$

式中 $b_1 = m_1/Y_{p/s} + Ke$ 、 $b_2 = 1/Y_{x/s} + m_2/Y_{p/s}$, 依上述同一原理当菌体生长处于稳

态时,即 $dX/dt=0$,可利用(10A)式求得 $b_1 = -[(ds/dt)/X]_{\text{稳定}}$,进而对(10A)式积分得:

$$S(t) = S_0 - b_2 A(t) - b_1 B(t) \quad (10B)$$

依同样原理,即以 $[S_0 - S(t) - b_1 B(T)]$ 对 $A(t)$ 作图,所得直线斜率为 b_2 。

3 结果与讨论

3.1 蛹虫草菌胞外多糖发酵过程代谢变化

图1为采用优化后的发酵培养基配方和发酵条件,进行的蛹虫草菌胞外多糖发酵进程曲线。图中描述了菌体量(X)、多糖产量(P)、残糖消耗(S)、发酵液粘度和发酵过程pH随发酵进程时间(t)的变化情况。从图中可以看出,菌体开始生长速度较慢,24h后加快,36h进入指数生长,到72h菌体生长进入到稳定期。

与之相对应,底物糖消耗在此期间内下降很快,到72h糖消耗降到2.0%以下,pH值从初始的7.0降低到3.5。胞外多糖合成随菌体生长不断上升,到96h多糖产量达到最高,为5.4(g/L)。发酵初期粘度较低且增加缓慢,随着菌丝体的生长和多糖的快速合成,粘度也急剧上升,到96h多糖粘度到达最高峰,之后由于基质的消耗和环境因素的影响,多糖浓度趋于恒定,粘度也趋于稳定。

3.2 蛹虫草菌胞外多糖发酵过程动力学特征

3.2.1 蛹虫草菌丝体生长动力学:根据发酵过程的实验数据 $X_m = 22.5$ (g/L)和动力学模型方程(2A),以 $\ln[(X/X_m - X)]$ 对 t 作图得直线斜率,即模型参数:

$u = 0.082(11h)$, $x_0 = 2.455$ (g/L)。将模型参数代入方程(2B)求得发酵过程菌体生长的动力学模型如下:

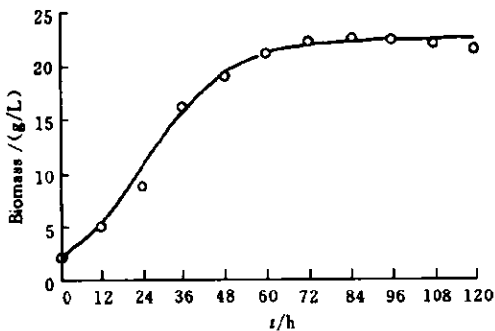


图2 蛹虫草菌胞外多糖发酵菌体生长动力学模型与实验数据拟合曲线

Fig.2 Comparison of eq. (2B) with batch biomass data for *C. militaris*

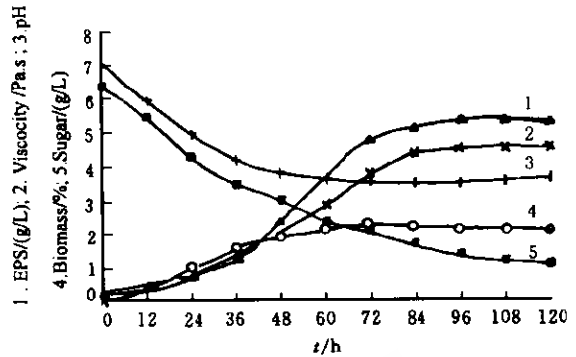


图1 蛹虫草菌胞外多糖发酵进程

Fig.1 Time-course of the exo-polysaccharide fermentation by *C. militaris*

$$X(t) = 2.455e^{0.082t} / [1 - (2.455/22.5) [-e^{0.082t}]] \text{ g/L} \quad (11)$$

(式中 t 以 h 表示)然后将模型计算值与实验数据点进行比较(见图2),最大相对误差为14.3%,平均相对误差为3.4%,表明实验结果与动力学模型值基本相符。

3.2.2 多糖生成动力学:依据动力学模型参数 $\mu = 0.082$, $X_0 = 2.455$, 和实验数据 $X_m = 22.5$, $P_0 = 0.3$ (g/L)及动力学模型方程(5),计算得到 $m_1 = 0.002$ (g/g/h)。以 $[P - P_0 - m_1 B(t)]$ 对 $A(t)$ 作图得发酵动力学模型参数 $m_2 = 0.095$ (g/g)。将模型参数代入方程(7A),即可

求得产物生成动力学模型:

$$P(t) = 0.3 + m_2[X(t) - 2.455] + 0.002 \{(22.5/0.082)\ln[1 - (2.455/22.5)(1 - e^{0.082t})]\} \text{g/L} \quad (12)$$

图3描述了动力学模型计算值与实验数据点的比较。模型拟合实验点的最大相对误差20.6%,平均相对误差5.6%。

3.2.3 底物(甜菜糖)消耗动力学:依方程(10B)条件下, $[S_0 - S - m_1B(t)]$ 对 $X(t) - X(0)$ 作图得到的直线斜率为蛹虫草菌胞外多糖发酵过程底物(糖)消耗模型参数, $b_2 = 2.78$, b_1 是根据(10A)式菌体生长处于稳态下的 $b_1 = (dS/dt)/X_m$ 方程作图计算得到, $b_1 = 0.0163$,从而获得底物消耗的动力学过程:

$$S(t) = 6 - 2.78[X(t) - 2.455] - 0.0163 \{(22.5/0.082)\ln[1 - (2.455/22.5)(1 - e^{0.082t})]\} \text{g/L} \quad (13)$$

图4显示了蛹虫草菌胞外多糖发酵过程底物(糖)消耗动力学模型与实验数据比较曲线,从图中可以看出,两者比较吻合,最大相对误差是10.5%,而平均相对误差只有5.1%。

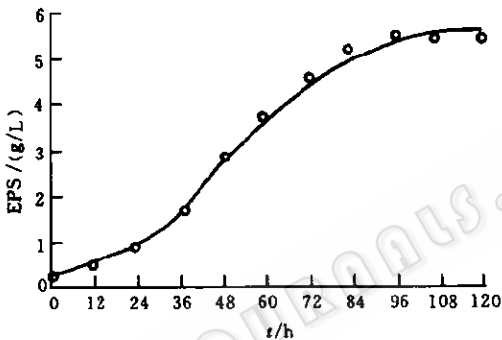


图3 蛹虫草菌发酵过程 EPS 合成动力学模型与实验数据的拟合曲线

Fig.3 Comparison of eq. (7)with EPS production data for *C. militaris*

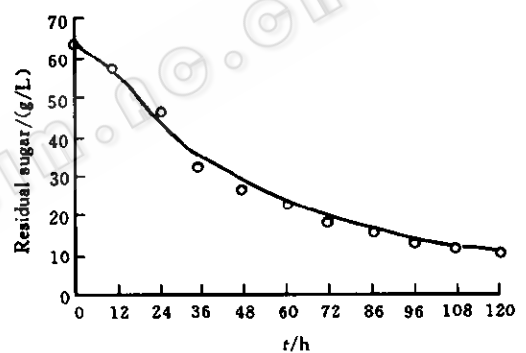


图4 蛹虫草菌发酵过程糖消耗动力学模型与实验数据的拟合曲线

Fig.4 Comparison of eq. (10B)with sugar consumption data for EPS production *C. militaris*

蛹虫草菌胞外多糖发酵与一般微生物胞外多糖发酵特性类似,发酵过程具有典型的假塑性非牛顿型流体特性,发酵后期的高粘度发酵液会影响氧的传递,而导致菌体生长的停止和多糖合成的抑制,可通过增加通气和加大搅拌速度来解决。采用 Logistic 和 L-P 方程对蛹虫草菌胞外多糖发酵得到了较好地理论描述,并取得了相关的动力学模型参数,阐明了蛹虫草菌胞外多糖发酵的动力学特征。

符号说明

b_1 动力学参数/g/(g·h)
 m_1 动力学模型参数/g/(g·h)
 P 多糖浓度/(g/L)
 P_m 最大多糖浓度/(g/L)
 S_0 初始底物浓度/(g/L)

X 菌体浓度/(g/L)
 X_m 最大菌体浓度/(g/L)
 b_2 动力学参数/(g/g)
 m_2 动力学模型参数/(g/g)
 P_0 初始多糖浓度/(g/L)

S 底物浓度/(g/L)

 X_0 初始菌体浓度/(g/L)

t 时间/h

 μ 动力学模型参数/(1/h)

参 考 文 献

- [1] 陈传盈, 冯观泉, 许尧兴等. 中草药, 1992, (8): 409~416.
- [2] 李 信, 许 雷, 裴鑫德. 核农学报, 1998, (1): 35~40.
- [3] Toshio Miyazaki, Naoko Oikawa, Haruki Yaamada. Studies on Fungal Polysaccharides. XX. Galactomannan of *Cordyceps sinensis*, 1997, 25(12): 3324~3328.
- [4] R. M. Weiss & D. F. Ollis. *Biotechnol. Bioeng.*, 1980, 22: 859~873.

Studies on Kinetics of *Cordyceps militaris* Fermentation for Production of Exopolysaccharide

Li Xin Xu Lei

(Division of Biochemistry, Graduate School, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081)

Cai Zhaoling

(Institute of Chemical Metallurgy, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080)

Abstract The exopolysaccharide (EPS) production by batch fermentation process with *Cordyceps militaris* as well as the kinetics for EPS production were studied, the mathematical kinetic models describing the course of EPS fermentation were obtained in this paper, which provide a reasonable description for biomass, product and substrate variation with time, calculated results on biomass, product and substrate are compared satisfactorily with the experimental data as function of fermentation time.

Key words *Cordyceps militaris*, exopolysaccharide, mathematical model, fermentation kinetics