

放射形土壤杆菌 Q9415 发酵产胞外多糖动力学研究*

张宁¹ 彭志英²(暨南大学食品科学与工程系 广州 510632)¹ (华南理工大学食品与生物工程学院 广州 510640)²

摘要:放射形土壤杆菌 Q9415 产胞外多糖 PS-9415 的发酵为混合型发酵。应用 logistic 方程和 L-P 方程对 PS-9415 发酵过程的菌体生长、多糖合成以及底物消耗的动力学进行了讨论。研究发现: logistic 方程和 L-P 方程建立的动力学模型较好地拟合了实验数据。

关键词:放射形土壤杆菌 (*Agrobacterium radiobacter*) Q9415, 胞外多糖, 发酵, 动力学

中图分类号: Q939.97 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2003) 04-0020-04

KINETICS STUDIES ON PRODUCTION OF EXOPOLYSACCHARIDES BY
AGROBACTERIUM RADIOBACTER Q9415

ZHANG Ning¹ PENG Zhi-Ying²(Departments of Food Science and Engineering, Jinan University, Guangzhou 510632)¹(College of Food and bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640)²

Abstract: Logistic equation and L-P equation was applied to the kinetics studies of EPS production. Mathematical kinetic model describing the course of EPS fermentation were established. The experimental data and the models were compared.

Key words: *A. radiobacter* Q9415, Exopolysaccharides, Fermentation, Kinetics study

发酵动力学是研究发酵过程中菌体生长、基质消耗、产物生成的动态平衡及其内在规律^[1]。动力学研究是发酵产胞外多糖研究的重要内容之一。建立动力学模型并对发酵过程的数据进行分析有助解决工业化生产中将会遇到的许多问题^[2~7]。Q9415 是从自然界筛选出的产胞外多糖 (PS-9415) 的放射形土壤杆菌, 其发酵液加热形成白色热可逆的凝胶, 具有良好的粘弹性^[8]。本文在对 Q9415 发酵培养条件研究的基础上, 进一步对 Q9415 发酵产胞外多糖的动力学进行了研究^[8,9]。

1 材料与amp;方法

1.1 菌种 Q9415

华南理工大学生物科学与工程研究中心从自然界中筛选。

1.2 基础培养基

蔗糖 30g, 蛋白胨 1g, K₂HPO₄ 0.5g, MgSO₄ 0.1g, MnSO₄ 0.1g, NH₄NO₃ 1g, 溶于蒸馏水并定容至 1,000 mL, 调 pH 值为 7.0~7.2, 0.7 × 10⁵ Pa 灭菌 20min。

1.3 生长及产胶曲线测定

在 18 支 500mL 三角瓶中装入优化后的发酵培养基, 按 2% (v/v) 接菌量加入菌悬

* 广东省科技攻关资助项目 (No. 粤财工 98-278)

广东省自然科学基金 (No. 96257)

收稿日期: 2002-07-24, 修回日期: 2002-10-10

液, 在 32℃、180r/min 振荡培养 24h 后 28℃ 培养至 96h, 每隔 12h 取样, 分别测定其生物量、产胶量、蔗糖含量、pH 和粘度, 绘制关系曲线。

1.4 菌体生长 Logistic 方程^[5,6]

采用 Logistic 方程来描述胞外多糖发酵菌体生长的动力学过程:

$$dX/dt = f(X) = \mu X (1.0 - X/X_m) \quad (1)$$

初始条件 $t=0$ 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:

$$\text{或} \quad \begin{cases} \mu t = \ln (X_m/X_0 - 1) + \ln [X / (X_m - X)] & (2-1) \\ X(t) = X_0 e^{\mu t} / \{1 - (X_0/X_m) [1 - e^{\mu t}]\} & (2-2) \end{cases}$$

上述方程式同时可表达对数生长期和稳定期的菌体生长, 微生物胞外多糖在这两个阶段都有生成。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: $\ln [X_0 / (X_m - X_0)]$ 。

1.5 产物形成 Luededing-Piret 方程^[5,6]

产物 (多糖 P) 的形成和底物 (蔗糖 S) 消耗采用 Luededing-Piret 方程:

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

$t=0$ 时 $P=P_0$ 。方程中 m_1 、 m_2 为模型参数, 依发酵条件 (温度、pH 等等) 的变化而改变。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:

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

稳态时, $(dX/dt)_{\text{stat}}=0$, $X=X_m$, 则由方程 (3) 得: $m_1 = (dP/dt)_{\text{stat}} / X_m$ (6)

方程 (5) 可写成如下形式: $P(t) = m_2 A(t) + m_1 B(t) + P_0$ (7-1)

式中: $A(t) = X(t) - X_0$ (7-2)

$$B(t) = X_m / \mu \ln [1 - X_0 / X_m (1 - e^{\mu t})] \quad (7-3)$$

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。

1.6 底物消耗^[5,6]

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:

$$dS/dt = (1/Y_x) dX/dt - (1/Y_p) dP/dt - KeX \quad (8)$$

将 (3) 式代入方程 (8), 可得:

$$dS/dt = - [m_1 / Y_p + Ke] X - [1/Y_x + m_2 / Y_p] dX/dt \quad (9)$$

或者: $dS/dt = -b_1 X - b_2 dX/dt$ (10-1)

$t=0$ 时 $S=S_0$, 式中 $b_1 = m_1 / Y_p Ke$ 、 $b_2 = 1/Y_x + m_2 / Y_p$, 依上述同一原理当菌体生长处于稳态时, 即 $(dX/dt)_{\text{stat}}=0$, 可利用 (10-1) 式求得 $b_1 = - [(ds/dt) / X]_{\text{stat}}$, 进而对 (10-1) 式积分得: $S(t) = S_0 - b_2 A(t) - b_1 B(t)$ (10-2)

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 。

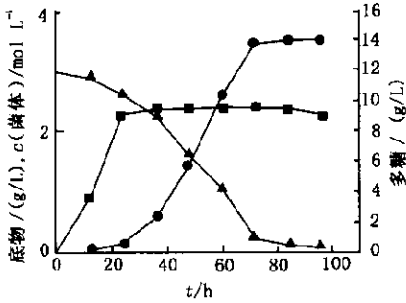


图1 发酵进程图
 ▲ 底物, ■ 生物量, ● 产物

2 结果与讨论

2.1 Q9415 菌产胞外多糖发酵进程

PS-9415 的发酵进程曲线见图1。图中描述了生物量(X)、多糖产量(P)、底物消耗(S)、发酵液粘度和 pH 随发酵进程时间(t)的变化情况。该菌发酵至 24h 菌体生长趋于到达生长稳态期,60h 达最大生物量 2.38g/L,之后进入衰亡期。发酵初期发酵液粘度较低且增加缓慢,随着菌体生长和多糖的快速合成,粘度也急剧上升。从对 PS-9415 的发酵进程的分析中,我们认为 PS-9415 的发酵生产与其他许多微生物胞外多糖类似,菌体生长与产物形成只有部分联系,属于混合型发酵^[2-7]。

根据实验数据,在整个发酵过程中,底物蔗糖的消耗与产物多糖的合成成线性关系,方程为:

$$(P - P_0) = 0.48 (S_0 - S) \tag{11}$$

基于 PS-9415 发酵过程属于混合型发酵的特点。本论文采用了 Logistic 方程和 Lu-eding-Piret 方程对摇瓶分批发酵的动力学进行了研究。

2.2 菌体生长动力学

发酵过程实验数据 X_m (2.38g/L) 和动力学模型方程(2-1),以 $\ln[(X/X_m - X)]$ 对 t 作图得到的直线斜率,即模型参数比生长速率: $\mu = 0.343h^{-1}$, 从直线的截距计算得 $X_0 = 0.027$ (g/L)。将模型参数代入方程(2-2)求得发酵过程菌体生长的动力学模型如下:

$$X(t) = 0.027e^{0.343t} / [1 - 0.011(1 - e^{0.343t})] \tag{12}$$

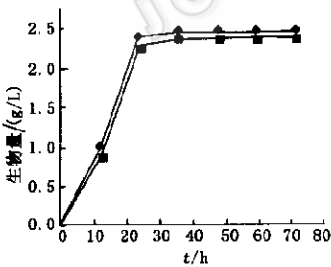


图2 Q9415 生长动力学
 模型与实验数据
 ◆ 模型值, ■ 实验值

式中 t 以 h 表示。 μ 是最初的比生长速率,是细胞浓度的变化与细胞浓度的比值。它与微生物的菌株,培养温度、pH、培养基成分及限制性基质浓度等因素有关。根据上式将模型计算值与实验数据点进行比较(见图2)。结果表明模型值与试验值最大相对误差为 10.56%, 平均相对误差为 5.03%, 表明实验结果与动力学模型值基本相符。

2.3 产物合成动力学

依据动力学模型参数 $\mu = 0.343h^{-1}$, $X_0 = 0.027g/L$, 和实验数据 $X_m = 2.38g/L$ 及动力学模型方程(6), $m_1 = (dP/dt)_{max} / X_m$ 作图得到 $m_1 \cdot X_m = 0.286$ 计算得到 $m_1 = 0.12g/g \cdot h$, 表示每小时、每克菌体细胞产生 0.12g 的产物。以 $[P - P_0 - m_1 B(t)]$ 对 $A(t)$ 作图得发酵动力学模型参数 $m_2 = -1.394g$ 多糖/g 细胞。 m_1, m_2 分别反映了非生长关联与生长关联的产物合成能力。将模型参数代入方程(7-1),即可得动力学方程如下:

$$P(t) = P_0 + 0.12(2.38/0.343) \ln [1 - 0.027/2.38(1 - e^{0.343t})] - 1.394[X(t) - 0.027] \tag{13}$$

根据以上方程式计算得模型值。图3比较了模型计算数据和实验数据。从图中可看出,发酵初期对数生长期模型值和实验数据差别较大,对数生长期拟合较好。这可能

是L-P方程在描述产物合成方面需进一步修正。有研究表明,用L-P方程描述微生物胞外多糖的产物合成和底物消耗,方程中的参数 m_2 、 b_2 与底物的初始值 S_0 有关^[10,11]。此外,试验中发酵初期产物合成少,测定时的误差也可能对结果造成较大影响。

2.4 底物消耗动力学

根据方程(10-1)菌体生长处于稳态时 $b_1 = - (dS/dt)_{\text{max}}/X_m$ 方程作图得到: $b_1 = 0.23\text{g/g}\cdot\text{h}$ 。 b_1 表示单位重量的菌体在单位时间内消耗的底物重量。再以 $[S_0 - S - b_1 \cdot B(t)]$ 对 $X(t) - X_0$ 作图得到的直线斜率为蝇虫草菌胞外多糖发酵过程底物(糖)消耗模型参数 $b_2 = -1.9\text{g底物/g细胞}$ 。反映出停滞期,底物消耗用于产物合成和维持已经达到最大细胞浓度的菌体的代谢。从而获得底物消耗的动力学方程:

$$S(t) = 3 - 0.23(2.38/0.343) \ln [1 - 0.027/2.38 (1 - e^{0.343t})] + 1.91 [X(t) - 0.027] \quad (14)$$

由上式得到一组模型值。图4显示了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,最大相对误差是17.33%,而平均相对误差为7.75%。

3 结论

本文根据Q9415发酵产多糖过程中各个参数的变化,确定其为混合型发酵。应用logistic方程和L-P方程对PS-9415发酵过程的菌体生长,多糖合成以及底物消耗的动力学进行了讨论。研究发现,logistic方程和L-P方程建立的混合型动力学模型较好地拟合了实验数据。但是产物合成动力学模型,在发酵前期与试验数据拟合不好,这可能是由试验测定误差造成也可能产物的生成与其他的参数也有关,模型方程有待进一步修正。

符号说明: X_0 :初始菌体浓度/(g/L), X :菌体浓度/(g/L), X_m :最大菌体浓度/(g/L), S_0 :初始底物浓度/(g/L), μ :比生长速率/($1/h^{-1}$), S :底物浓度/(g/L), P :多糖浓度/(g/L), b_1 :动力学模型参数/(g/g·h), P_m :最大多糖浓度/(g/L), b_2 :动力学模型参数/(g/g), m_1 :动力学模型参数/(g/(g·h)), Y_p :产物得率系数(g/g), m_2 :动力学模型参数/(g/g), Y_x :生得率系数(g/g), t :时间(h), K_c :细胞维持系数(g/g·s)。

参考文献

- [1] 李艳主编. 发酵工业概论. 北京: 中国轻工业出版社, 1999. 161~162.
- [2] 赵学明, 马红武, 唐寅杰, 等. 高校化学工程学报, 1997, 11(4): 394~399.
- [3] Garcia O, Santos F, Alcon E, et al. Enzyme and microbial technology, 1998, 23(1): 75~82.
- [4] Anthony P, Leslie J. Pallent Biotechnol. Bioengineering, 1986, 28(2): 1484~1496.
- [5] Becca M B, Ollis F D. Biotechnology and bioengineering, 1980, 22(1): 859~873.
- [6] Thomson N, Ollis F D. Biotechnology and bioengineering, 1980, 22(1): 875~883.
- [7] 里景伟主编. 微生物多聚糖黄原胶生产与应用. 北京: 中国农业科技出版社, 1995. 61~69.
- [8] 钟颖麟, 彭志英, 李少霞, 等. 华南理工大学学报, 2000, 28(8): 70~76.
- [9] 张宁, 彭志英, 李少霞, 等. 中国食品学报, 2002, 2(2): 4~7.
- [10] Dussap C G, Vita D D, Pons A. Biotechnol & Bioeng, 1991, 38(1): 65~74.
- [11] Anthony P, Leslie J. Pallent Biothec and Bioeng, 1986, 28(2): 1484~1986.

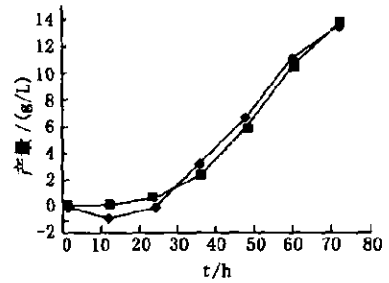


图3 产物合成模型与实验的比较

◆ 模型值, ■ 实验值

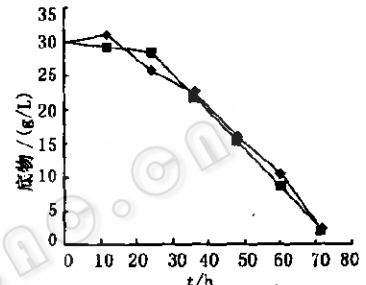


图4 底物消耗动力学模型与实验数据比较

◆ 模型值, ■ 实验值