

文章编号:1673-1689(2007)05-0044-04

鼠李糖脂分批式发酵动力学模型

沈 薇^{1,2}, 唐仕荣³, 杨树林²

(1. 南京农业大学 理学院, 江苏 南京 210095; 2. 南京理工大学 生物工程研究所, 江苏 南京 210094; 3. 徐州工程学院 食品工程系, 江苏 徐州 221008)

摘 要: 根据 3.7 L 瑞士 Bioengineer KLF2000 型发酵罐分批发酵的实验数据, 利用 GraphPad Prism 软件对假单胞菌 BS-03 产鼠李糖脂生物表面活性剂的发酵动力学模型进行非线性拟合, 说明 Logistic 模型和 L-P 模型能较好的描述假单胞菌 BS-03 发酵过程中的菌体生长、鼠李糖脂合成和限制性基质的消耗动力学。

关键词: 假单胞菌; 鼠李糖脂; 生物表面活性剂; 分批发酵动力学

中图分类号: Q 935; Q 546

文献标识码: A

Kinetics Study on Batch Production of Rhamnolipid by *Pseudomonas* sp. BS-03

SHEN Wei^{1,2}, TANG Shi-rong³, YANG Shu-lin²

(1. Science of College, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2. Biotechnology Institute, Nanjing University of Science and Technology, Nanjing 210094, China; 3. Department of Food Engineering, Project Institute of Xuzhou, Xuzhou 221008, China)

Abstract: Base on the experimental data of batch fermentation in 3.7L Bioengineer KLF2000 fermentation reactor, the non-line fit was employed to model the kinetics of fermentation by software GraphPad Prism. It showed that the logistic and L-P equations can be used to describe the kinetics of cell growth, rhamnolipid production and consumption of limied material during the process.

Key words: *Pseudomonas* sp.; rhanmolipid; biosurfactant; kinetics of batch fermentation

利用微生物发酵技术制备的生物表面活性剂(包括糖脂、磷脂、脂肽及脂多糖等)具有低毒和生物可降解性,使其在食品、环境生物修复和农业领域有着广阔的应用前景^[1]。其中研究最多的是由微生物分泌到胞外的糖脂类生物表面活性剂,如由铜绿假单胞菌产的鼠李糖脂^[2]。然而目前鼠李糖脂的研究主要集中在菌种筛选和发酵条件优化以提高产量,对于产鼠李糖脂的发酵动力学研究报道

较少^[3]。作者在对自筛选的假单胞菌 BS-03 产鼠李糖脂发酵培养条件优化的基础上^[4-6],进一步对其发酵动力学进行探讨,为工业化应用研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌种

假单胞菌(*Pseudomonas* sp.) BS-03 分离自南京炼油厂采集的油污中,由南京理工大学生物工程

收稿日期:2006-12-14.

基金项目:南京农业大学青年科技创新基金项目(KJ06024).

作者简介:沈薇(1977-),女,江苏苏州人,讲师,工学博士,主要从事微生物学与有机合成研究。

通讯作者:杨树林(1953-),男,黑龙江依安人,教授,博导,主要从事微生物代谢及基因工程研究。

Email: yshulin@mail.njust.edu.cn

研究所保存。

1.2 发酵培养基

质量分数(%):甘油 6,尿素 0.2, Na_2HPO_4 0.11, KH_2PO_4 0.09, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.002。

1.3 发酵装置

采用瑞士产全自动原位灭菌 3.7 L Bioengineer KLF2000 型玻璃发酵罐(搅拌通气式)进行动力学测定,工作体积为 2.5 L,罐高 32 cm,内径 11 cm。通气量用转子流量计测量。转速、溶氧进行手动、自动调节,整个发酵过程的控制参数由 Biologic 控制软件进行实时记录。

1.4 测定方法

1.4.1 生物量测定 结合浊度法和细胞干重法来测定细胞浓度。根据菌悬液在 620 nm 处测定吸光值。以吸光值与菌体干重的关系曲线,将吸光度值转化为菌体干重。

1.4.2 糖脂含量的测定 参照文献[5]进行。

1.4.3 表面张力的测定 采用吊环法测定表面张力,仪器为 DT-102 型全自动界面张力仪(博山同业

分析仪器厂产品)。

1.4.4 pH 值的测定 采用 PHS-25C 型数字酸度计测定。

1.4.5 甘油含量的测定 参照文献[6]进行。

1.4.6 尿素含量的测定 参照文献[7]进行。

1.5 动力学模型拟合

采用 GraphPad Prism 软件对细胞生长动力学、产物合成动力学及限制性基质消耗动力学模型进行拟合,从而确定各动力学参数。

2 结果与讨论

2.1 3.7 L 发酵罐中分批式发酵产生物表面活性剂的过程

虽然该菌株采用植物油作为碳源时,糖脂产量最高,但烃类发酵过程涉及的两相乳化及界面传递现象十分复杂,因而选用水溶性底物甘油(产量仅次于植物油)来研究生物表面活性剂合成的动力学模型。整个发酵过程中定时取样测定表面张力、糖脂产量、细胞干重、pH 值、溶氧量、尿素、甘油含量,结果见图 1。

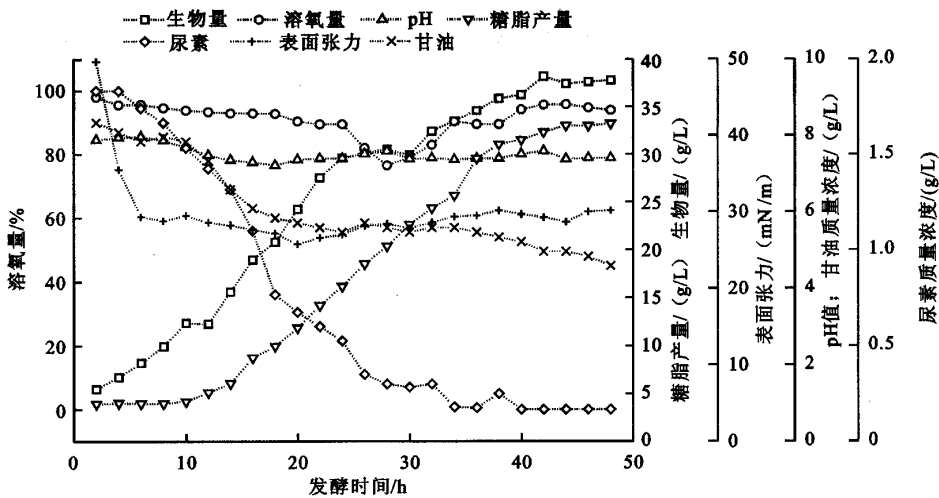


图 1 甘油为碳源的发酵过程

Fig. 1 The fermentation process of rhamnolipid production based on glycol as sole carbon source

图 1 表明:发酵过程中表面张力在最初的 5~6 h 内就可将发酵液起始表面张力从 52.6 mN/m 降至 30.0 mN/m 左右,并且在此后的发酵过程中表面张力基本保持在 30.0 mN/m 左右。溶氧量随着菌体的生长而降低,降至 71.2% 后又有小幅度的上升。发酵过程中 5~17 h 之间 pH 值随着糖脂的生成而逐渐降低,当 pH 降至 7 后基本维持不变,说明微碱性的发酵液环境适合菌体产生大量的生物表面活性剂。发酵液中氮含量几近耗尽时(发酵 30

h),甘油含量仍在逐步减少一直延续至发酵结束,在此期间,发酵液中糖脂产量呈快速增长趋势,在 45 h 后达到最大值,同时发酵液中细胞浓度达到最大值正是在发酵体系中氮源耗尽时。

2.2 菌体生长动力学

Logistic 方程能很好地反映分批发酵过程中菌体浓度的增加对自身生长的抑制作用,这种抑制作用在分批发酵中是普遍存在的。该方程是一个典型的 S 型曲线,用于拟合分批发酵中菌体的生长过

程具有广泛的适用性,因此选用它来描述糖脂发酵过程中菌体的生长情况。

$$\frac{dX}{dt} = \mu_m X \left(1 - \frac{X}{X_m}\right) \quad (1)$$

Logistic 方程可积分代数方程,积分后变为:

$$X = \frac{X_0 X_m e^{\mu_m t}}{X_m - X_0 + X_0 e^{\mu_m t}} \quad (2)$$

用 GraphPad Prism 软件按式(2)进行非线性拟合得到以下结果 $X_0 = 2.317 \text{ g/L}$, $X_m = 34.05 \text{ g/L}$, $\mu_m = 0.1492 \text{ h}^{-1}$ 。因此将参数代入式(2)即可得到菌体干重随时间变化的函数为:

$$X = \frac{78.89e^{0.1492t}}{31.73 + 2.32e^{0.1492t}} \quad (3)$$

图2即是用 Logistic 方程来模拟 3.7 L 发酵罐中假单胞菌菌体干重随时间的变化过程。该模型方程对实验数据拟合的 $R^2 = 0.9903$ 。由图 2.2 拟合的结果可知,式(3)的计算值与试验数据非常吻合。因此 Logistic 方程能够很好地描述假单胞菌分批式发酵生产鼠李糖脂时菌体的生长情况。

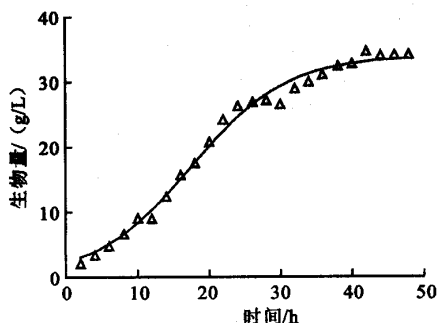


图2 Logistic 模型拟合菌体生长曲线

Fig. 2 Time course of dried biomass

2.3 糖脂合成动力学

Luedeking 和 Piret 总结出下式来描述产物形成与细胞生长的关系(以下简称 L-P 模型)

$$\frac{dP}{dt} = \alpha \frac{dX}{dt} + \beta X \quad (4)$$

当 $\alpha \neq 0, \beta = 0$ 时,产物形成为生长耦联型;当 $\alpha \neq 0, \beta \neq 0$ 时,产物形成为部分生长耦联型;当 $\alpha = 0, \beta \neq 0$ 时,产物的形成与细胞生长无关。将式(1)和式(2)代入到式(4)并积分可得式(5)。

$$P = P_0 + \frac{X_m \beta}{\mu_m} \ln \frac{X_m - X_0 + X_0 e^{\mu_m t}}{X_m} - \frac{\alpha X_m (X_m - X_0)}{\mu_m (X_m - X_0 + X_0 e^{\mu_m t})} + \frac{\alpha (X_m - X_0)}{\mu_m} \quad (5)$$

将菌体生长动力学模型拟合得到的参数 $X_0 = 2.317 \text{ g/L}$, $X_m = 34.05 \text{ g/L}$, $\mu_m = 0.1492 \text{ h}^{-1}$ 。代

入到式(5)中可得式(6)为:

$$P = P_0 + 212.7\alpha - \frac{7241.3\alpha}{31.73 + 2.317e^{0.1492t}} + 228.2\beta \ln \frac{31.73 + 2.317e^{0.1492t}}{34.05} \quad (6)$$

因此可以依据式(6)将糖脂的产出建立起函数关系,从而可以利用此关系模拟出糖脂的产出过程。根据式(6)对 3.7 L 搅拌型发酵罐中的分批式发酵的产糖脂实验数据进行非线性拟合可得到如下结果为 $\alpha = 19.54 \text{ mg/L}$, $\beta = 4.91 \text{ mg/(L} \cdot \text{h)}$, $P_0 = -0.573 \text{ g/L}$ 。该方程对实验数值拟合的相关系数 $R^2 = 0.9899$ 。将这些数值代入式(6)可得到产物随时间变化的函数为:

$$P = 40.98 - \frac{141.5}{31.73 + 2.317e^{0.1492t}} + 1.12 \ln \frac{31.73 + 2.317e^{0.1492t}}{34.05} \quad (7)$$

该模型对实验数据的拟合见图3。由图可知,该模型对于实验数据的拟合较为理想,大致可以反映出实际的糖脂的产出过程。虽然该模型并不能真正反映出发酵到后阶段糖脂产出的变化情况(此时实验测得的糖脂量已基本稳定,而该模型的预测值却难以反映出),但从此拟合结果 $\alpha = 19.54 \text{ mg/L}$, $\beta = 4.91 \text{ mg/(L} \cdot \text{h)}$, 可以大致判断出该糖脂的发酵属于 Gaden 发酵的第二种类型,即产物形成与生长部分耦联。

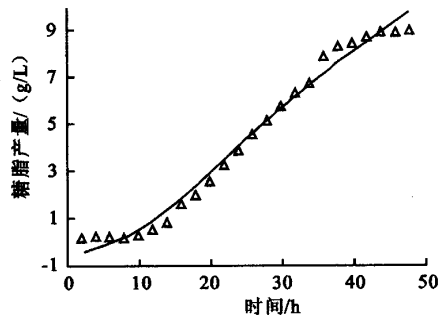


图3 L-P 模型拟合产糖脂曲线

Fig. 3 Time course of production of glycolipid

2.4 限制性基质(尿素)的消耗动力学

发酵过程中,根据物料平衡,限制性基质(尿素)消耗主要有3个方面:1)细胞生长的消耗,用以合成新的细胞;2)细胞维持基本生命活动的消耗;3)用于合成代谢产物的消耗。因此底物消耗可用如下动力学模型表示:

$$-\frac{dS}{dt} = \frac{1}{Y_{x/s}} \cdot \frac{dX}{dt} + mX + \frac{1}{Y_{p/s}} \cdot \frac{dP}{dt} \quad (8)$$

将产物合成的动力学模型式(4)代入式(8),可得式(9):

$$-\frac{dS}{dt} = \left(\frac{1}{Y_{x/s}} + \frac{\alpha}{Y_{p/s}} \right) \cdot \frac{dX}{dt} + \left(m + \frac{\beta}{Y_{p/s}} \right) X \quad (9)$$

对式(9)积分得式(10):

$$S_0 - S = \left(\frac{1}{Y_{x/s}} + \frac{\alpha}{Y_{p/s}} \right) \cdot (X - X_0) + \left(m + \frac{\beta}{Y_{p/s}} \right) \frac{X_m}{u_m} \cdot \ln \left[1 - \frac{X_0}{X_m} \cdot (1 - e^{u_m t}) \right] \quad (10)$$

令:

$$\frac{1}{Y_{x/s}} + \frac{\alpha}{Y_{p/s}} = k_1 \quad (11)$$

$$\left(m + \frac{\beta}{Y_{p/s}} \right) \frac{X_m}{u_m} = k_2 \quad (12)$$

因此上式简化为:

$$S_0 - S = k_1 \cdot (X - X_0) + k_2 \ln \left[1 - \frac{X_0}{X_m} \cdot (1 - e^{u_m t}) \right] \quad (13)$$

用 GraphPad Prism 软件按式(13)拟合 3.7 L 发酵罐中假单胞菌的利用限制性氮源—尿素的基质消耗的变化过程,如图4所示。

拟合结果为 $R^2 = 0.9912$, $k_1 = 0.067$, $k_2 = 0.072$, 因此将参数代入式(13)即可得到限制性基质—尿素的消耗模型:

$$S = S_0 - 0.067 \cdot (X - X_0) - 0.072 \cdot \ln \left[1 - \frac{X_0}{X_m} \cdot (1 - e^{0.1492t}) \right] \quad (14)$$

从图4中可看出,模型拟合值与实验数据较吻合,说明可以用该模型来描述糖脂发酵过程中尿素的消耗规律。

参考文献(References):

- [1] Siegmund Lang. Biological amphiphiles(microbial biosurfactants)[J]. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 2002, 7: 12-20.
- [2] Turkovskaya O V, Dmitrieva T V, Muratova A Y. A biosurfactant-producing *Pseudomonas aeruginosa* strain[J]. *Appl Biochem Microbio*, 2001, 37(1): 71-75.
- [3] M Benincasa, J Contiero, M A Manresa, et al. Rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI growing on soapstock as the sole carbon source[J]. *Journal of Food Engineering*, 2002, 54: 283-288.
- [4] 宁长发, 沈薇, 孟广荣, 等. 生物表面活性剂产生菌的筛选[J]. 微生物学通报, 2004, 31(7): 55-58.
NING Chang-fa, SHEN Wei, MENG Guang-rong, et al. A Rapid Screening Model for Biosurfactant Producing Strains[J]. *Microbiology*, 2004, 31(3): 55-58. (in Chinese)
- [5] 沈薇, 杨树林, 李校望, 等. 电喷雾质谱法分析假单胞菌(*Pseudomonas sp.*) BS-03 的代谢产物鼠李糖脂[J]. 分析化学, 2006, 34(1): 69-72.
SHEN Wei, YANG Shu-lin, LI Xiao-kun. Identification of rhamnolipids produced by *Pseudomonas sp.* BS-03 with Electrospray Ionization-Mass Spectrometry[J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2006, 34(1): 69-72 (in Chinese)
- [6] 徐秀丽, 成立军, 刘伦. 分光光度法测定甘油合剂中甘油的含量[J]. 泰山医学院学报, 2002, 23(3): 247-248.
XU Xiu-li, CHEN Li-jun, LIU Lun. Determination of glycerin content in glycerin mixture by Spectrophotometry[J]. *Journal of Taishan Medical College*, 2002, 23(3): 247-248. (in Chinese)
- [7] 徐凤梅. 紫外分光光度法测定尿素乳膏含量[J]. 天津药学, 2002, 14(2): 61-62.
XU Feng-mei. Determination of urea cream content by UV Spectrophotometry[J]. *Tianjin Pharmacy*, 2002, 14(2): 61-62. (in Chinese)

(责任编辑:朱明)

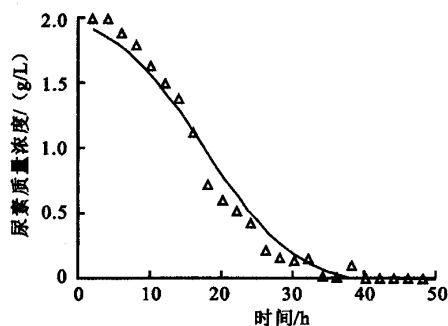


图4 尿素基质消耗过程

Fig. 4 Time course of urea consumption

3 结语

甘油发酵动力学研究结果表明: Logistic 方程能很好地反映批批发酵过程中菌体的生长情况。L-P 模型能较好的描述产物形成与细胞生长的关系, 得到糖脂的合成与发酵体系中的细胞积累量相关, 即属于半生长耦联型动力学关系, 但该模型并不能真正反映出发酵到后阶段糖脂产出的变化情况。尿素作为限制性氮源, 在消耗完后仍可大量合成糖脂表面活性剂。

符号说明: X : 菌体量 ($g \cdot L^{-1}$), X_M : 最大菌体量 ($g \cdot L^{-1}$), X_0 : 起始菌体量 ($g \cdot L^{-1}$), μ_m : 最大比生长速率 (h^{-1}), P : 糖脂的产量 ($g \cdot L^{-1}$), P_0 : 糖脂的起始量 ($g \cdot L^{-1}$), α : 生长耦联系数 ($g \cdot L^{-1}$), β : 非生长耦联系数 ($g \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$), S : 尿素的含量 ($g \cdot L^{-1}$), S_0 : 尿素的起始量 ($g \cdot L^{-1}$), $Y_{x/s}$: 用于菌体生长的得率常数, $Y_{p/s}$: 用于产物积累的得率常数, m_x : 微生物生命活动的维持常数。