文章编号:1673-1689(2009)03-0361-05

短梗霉多糖分批发酵动力学模型

崔玉海[1,2]， 童群义*[2]， 吴胜军[1,2]

(1. 食品科学与技术国家重点实验室,江南大学，江苏 无锡 214122；2. 江南大学 食品学院,江苏 无锡 214122)

摘 要：对短梗霉多糖分批发酵动力学进行了研究。基于 Logistic 方程和 Luedeking－Piret 方程分别建立了短梗霉多糖发酵过程菌体生长、产物合成及底物消耗随时间变化的数学模型，同时对实验值与模型进行了验证比较。结果表明，模型模拟计算结果与实验值能较好地吻合，该模型能较好地反映短梗霉多糖分批发酵的过程。

关键词：短梗霉多糖；出芽短梗霉；发酵动力学；模型

中图分类号：TQ 920.1；TQ 929.2 **文献标识码**：A

Kinetic Model of Pullulan Batch Fermentation

CUI Yu-hai[1,2]， TONG Qun-yi*[2]， WU Sheng-jun[1,2]

(1. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: In this study, the dynamic model to describe the pullulan batch fermentation by *Aureobasidium pullulans* was builted. According to the Logistic equation and the Luedeking－Piret equation, different mathematic models to describe cell growth, aim metabolites production and substrate consumption in pullulan fermentation were proposed. The results indicated that a good coincidence between models calculated values and experimental data was observed, therefore, the model equations can really reflect process of the pullulan batch fermentation.

Key words: pullulan, *Aureobasidium pullulans*, fermentation kinetic, model

短梗霉多糖(pullulan)是出芽短梗霉(*Aureobasidium pullulans*)合成的一种细胞外水溶性大分子中性多糖[1]。其分子是由麦芽三糖以 α-1,6 糖苷键连接而成的高分子直链多糖[2-3]，该多糖具有无毒性、安全性、耐热性、耐盐性、耐酸碱性、可塑性、薄膜性质、酶解性等物化及生物化学性质，产品可广泛应用于食品、医药、日用化工、建材、造纸、印刷、电子等产业，是一种新型的大分子材料。

目前国外关于短梗霉多糖的研究大多集中在短梗霉多糖的化学改性及后提取工艺方面[4-6]，国内的相关研究起步较晚，主要集中在高产菌株的筛选和培养条件的优化方面[7-9]，而有关反应动力学的报道较少。作者利用分批发酵试验，对一株出芽短梗霉变异菌株 G-58[10] 进行了动力学模型研究，旨在实

收稿日期：2008-05-23

基金项目：国家 863 计划项目(2007AA102362)。

* **通讯作者**：童群义(1963-)，男，湖南桃源人，工学博士，教授，主要从事碳水化合物及生物技术的研究。

Email：qytong@263.net

万方数据

现短梗霉多糖的发酵过程优化控制，降低生产成本，为放大试验和进行连续发酵提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 菌种

出芽短梗霉(*Aureobasidium pullulans*)G-58菌株，作者所在实验室筛选并保存。

1.2 培养基

1.2.1 种子培养基(g/L) 蔗糖50，硫铵0.8，磷酸氢二钾4，硫酸镁0.2，氯化钠2，酵母膏1.5；pH 6。

1.2.2 发酵培养基(g/L) 蔗糖50，硫铵0.6，磷酸氢二钾6，硫酸镁0.5，氯化钠4，酵母膏0.4；pH 6。

1.2.3 固体培养基 种子培养基添加20 g/L琼脂即可。

1.3 培养方法

1.3.1 种子培养 取28 ℃培养4 d的斜面菌种一环，接种于装有50 mL种子培养基的250 mL的三角瓶中，置于旋转式摇床上(200 r/min)，28 ℃振荡培养36 h即为种子液。

1.3.2 发酵罐培养 将种子液按3 %接种量(体积分数)接入装有3 L发酵培养基的5 L容积发酵罐(KFT-5L，韩国产)，搅拌速率为300 r/min，通气量3 L/min，发酵温度28 ℃，恒定pH 6.0，pH由2 mol/L NaOH或HCl自动调节。

1.4 分析方法

1.4.1 生物量测定 定量量取发酵液，在4 000 r/min下离心30 min，倾出上清液用于糖测定。沉淀的菌体用2倍体积蒸馏水洗涤、离心(3 000 r/min)2次，于70 ℃下干燥至恒重，用称重法测定生物量[11]。

1.4.2 短梗霉多糖 离心上清液，加入2倍无水乙醇，搅拌，4 ℃放置过夜，然后于4 000 r/min离心30 min，沉淀物用体积分数95%酒精洗涤3次，再依次用无水丙酮、无水乙醚洗涤，60 ℃干燥至恒重，即得短梗霉多糖粗品[12]。

1.4.3 残糖测定 蒽酮法[13]。

1) 试剂

蒽酮试剂：称取0.2 g蒽酮和1 g硫脲(阻氧化剂)置于烧杯中，缓慢加入100 mL浓硫酸，边加边搅拌，溶解后呈黄色透明溶液。将其贮存于棕色瓶中，最好现配现用。

蔗糖标准溶液：先配成1 mg/mL的蔗糖溶液，再分别吸取1、2、4、6、8、10 mL分别置于100 mL容量瓶中，用蒸馏水定容至刻度。可得10、20、40、60、80、100 mg/L的蔗糖系列溶液。

样液：从粗糖醇析后的上清液中准确吸取0.4 mL，移入100 mL容量瓶中，用蒸馏水定容至刻度，作为待测样液。

2) 标准曲线的制备

取上面不同梯度的蔗糖标准溶液各1 mL，加入4.0 mL新鲜配制的蒽酮试剂(质量浓度为2.0 g/L)，混匀后盖上试管塞，迅速浸入冰水中放置，然后同时置沸水浴10 min，取出后在流水中冷却15 min，以蔗糖溶液质量浓度为横坐标，制备标准曲线。

3) 残糖测定方法

取待测样液1 mL，按上述方法于620 nm测定A值。

1.5 试验数据的获得

每隔一定时间，测定该时间下的生物量、多糖量、残糖量。每次做3次平行试验，取其平均值。

2 结果与讨论

2.1 出芽短梗霉发酵过程的代谢变化

此前的实验已经对培养基和培养条件进行了优化，出芽短梗霉利用蔗糖分批发酵生成短梗霉多糖，发酵周期为156 h，其发酵过程曲线见图1。

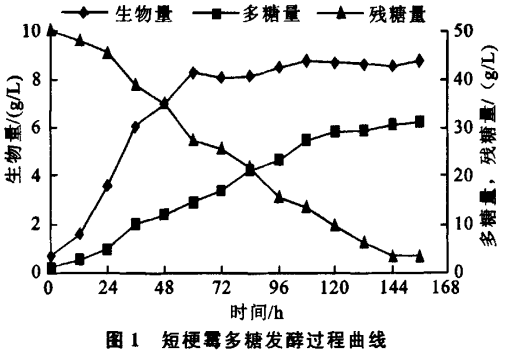


图1 短梗霉多糖发酵过程曲线

Fig. 1 Time-course of the pullulan fermentation by *A. pullulans*

从图1可看出，在0～12 h发酵处于延迟期，菌体逐渐适应新的生长环境，菌丝球在剪切力作用下由球状逐渐变为半球状，菌体浓度增长比较缓慢；12～60 h处于对数期，菌体开始迅速生长，蔗糖消耗伴随着菌体的增加，发酵液由初始的牛顿流体逐渐转变为高粘度的非牛顿流体，这种变化直接影响发酵体系的能量和物质(氧气和基质)传递。60 h至发酵终点处于稳定期，菌体最大量为8.775 g/L。从产物生成曲线可以明显看出，是次级代谢产物合

万方数据

成过程,多糖合成和菌体生长呈现部分相关,由此可以判断短梗霉多糖属于次级代谢产物。在 0～24 h时,由于只有少量的菌体,多糖生长比较缓慢,在 24～120 h 时,伴随着菌体大量增加,多糖开始迅速合成,在 60 h 以后仍然保持很高的产物合成速率,而同时底物蔗糖迅猛消耗。120 h 以后,蔗糖量减小至 10 g/L 以下,导致多糖合成明显缓慢。

2.2　发酵动力学模型的建立

2.2.1　菌体生长模型　在某一特定环境条件下,菌体的生长有一最大饱和浓度,它相当于生物学中的负载能力,该值与基质浓度有关,Logistic 方程就是在这个基础上被提出来的[14]。

$$\frac{dX}{dt} = u_{max}(1-\frac{X}{X_{max}})X \tag{1}$$

式(1)为 Logistic 方程,能很好地反映分批发酵过程中因菌体浓度的增加对自身生长存在的抑制作用,这在分批发酵中是普遍存在的。当菌体浓度很低即发酵刚开始时,X 比 X_{max} 小得多,X/X_{max} 项可忽略不计,表示菌体呈指数生长;当 $X = X_{max}$ 时,表示菌体停止生长。从图 1 可以看出,菌体的生长有一最大饱和浓度,而且随着菌体的增加自身生长也逐渐缓慢。因此选用 Logistic 方程来描述细胞生长动力学模型。

2.2.2　产物生成模型　由图 1 产物合成曲线研究结果,短梗霉多糖的合成与菌体生长属于部分相关模型,因此选用由 Luedeking 和 Piret 提出的 Luedeking-Piret 方程来描述产物短梗霉多糖形成规律[14],即:

$$\frac{dP}{dt} = \alpha\frac{dX}{dt} + \beta X \tag{2}$$

式(2)中,$\alpha(dX/dt)$ 表示与菌体生长率相关的产物形成率;βX 是与非伴随菌体生长的产物形成率。

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

$$-\frac{dS}{dt} = \frac{1}{Y_{x/s}}\frac{dX}{dt} + \frac{1}{Y_{p/s}}\frac{dP}{dt} + mX \tag{3}$$

由上述方程(1)、(2)和(3)式可以得到,初始条件为 $t = 0$ 时,分别有 $X = X_0$,$P = P_0$,$S = S_0$,通过数学求解得到方程的积分式分别为(4)、(5)和(6)式:

$$X(t) = \frac{X_0 X_{max}\exp(u_{max}t)}{X_{max} - X_0 + X_0\exp(u_{max}t)} \tag{4}$$

$$P(t) = P_0 - \alpha(X(t) - X_0) + \frac{\beta X_{max}}{u_{max}}\ln\frac{X_{max} - X_0 + X_0\exp(u_{max}t)}{X_{max}} \tag{5}$$

$$S(t) = S_0 - (\frac{1}{Y_{x/s}} + \frac{\alpha}{Y_{p/s}})(X(t) - X_0) - \frac{X_{max}}{u_{max}}(\frac{\beta}{Y_{p/s}} + m)\ln\frac{X_{max} - X_0 + X_0\exp(u_{max}t)}{X_{max}} \tag{6}$$

2.2.4　(1)－(6)式符号说明

m 为维持系数,g/(g·h);

X_0,X_{ma} 为起始菌体浓度和最大菌体浓度,g/L;

P 为短梗霉多糖质量浓度,g/L;

$Y_{p/s}$ 为短梗霉多糖得率系数,g/g;

P_0 为起始短梗霉多糖质量浓度,g/L;

$Y_{x/s}$ 为菌体得率系数,g/g;

S 为蔗糖溶液质量浓度,g/L;

α 为短梗霉多糖合成系数;

S_0 为起始蔗糖溶液质量浓度,g/L;

β 为非生长耦联系数;

X 为菌体浓度,g/L;

u_{max} 为最大比生长速率,h^{-1}。

2.3　发酵动力学模型参数和发酵动力学模型

以(4),(5)和(6)式分别对图 1 中分批发酵菌体生长曲线、产物生成曲线和底物消耗曲线进行拟合。根据实际测得的数据,采用国产 1stopt 软件,进行非线性曲线拟合,采用修正高斯牛顿法和通用全局优化算法,无需设置参数初始值,而由 1stopt 软件随机给出,通过其独特的全局优化算法,最终找出参数最优估计值,结果见表 1。

表 1　发酵动力学模型参数取值

Tab. 1　Parameter values in kinetic models of fermentation

参数	估计值
u_{max}	0.088
X_{max}	8.537
X_0	0.695
α	1.245
β	0.021
P_0	0.86
$Y_{x/s}$	2.616
$Y_{p/s}$	0.919
m	0.011
S_0	50.741

将其代入(4),(5)和(6)式,得短梗霉多糖分批发酵动力学模型(量符号含义同 2.2.4):

万方数据

$$X(t)=\frac{5.933\exp(0.088t)}{7.842+0.695\exp(0.088t)} \quad (7)$$

$$P(t)=1.725-1.245X(t)+2.037\ln\left(\frac{7.842+0.695\exp(0.088t)}{8.537}\right) \quad (8)$$

$$S(t)=51.95-1.737X(t)-3.284\ln\left(\frac{7.842+0.695\exp(0.088t)}{8.537}\right) \quad (9)$$

2.4 模型的验证

为了检验模型的误差，在已知实验条件下，进行分批发酵的重复实验，对分批发酵的实验值与模型预测值进行了比较，结果见表2。

表2 发酵动力学模型误差检验

Tab.2 Error proof of kinetic models of fermentation

t/h	X/(g/L)			P/(g/L)			S/(g/L)		
	实验值	计算值	偏差/%	实验值	计算值	偏差/%	实验值	计算值	偏差/%
0	0.75	0.695	7.3	0.94	0.86	8.5	50	50.741	1.5
12	1.82	1.737	4.6	2.67	2.447	8.4	46.765	48.481	3.7
24	3.53	3.619	2.5	5.91	5.45	7.8	45.021	44.178	1.9
36	6.274	5.801	7.5	9.013	9.36	3.8	39.432	38.499	2.4
48	7.648	7.336	4.1	13.115	12.948	1.3	34.754	33.16	4.6
60	8.724	8.078	7.4	14.258	15.83	11	27.879	28.733	3.1
72	8.36	8.372	0.1	17.843	18.279	2.4	24.012	24.879	3.6
84	8.594	8.479	1.3	20.954	20.541	2	21.065	21.272	1
96	8.549	8.516	0.4	24.295	22.735	6.4	15.876	17.756	11.8
108	8.663	8.53	1.5	26.376	24.904	5.6	12.998	14.274	9.8
120	8.87	8.534	3.8	28.343	27.065	4.5	9.654	10.802	11.9
132	8.7	8.536	1.9	29.544	29.222	1.1	6.689	7.335	9.7
144	8.713	8.536	2	30.765	31.378	2	4.011	3.87	3.5
156	8.865	8.536	3.7	31.234	33.534	7.4	2.232	0.404	81.9

从表2可看出，用动力学模型拟合短梗霉多糖分批发酵过程除极个别点外，大部分数据点的误差均小于10%；终点的残糖量误差较大，可能是测定中带来的误差，而且残糖量基本接近于零，可舍去该点。菌体生长、产物合成和底物消耗的平均相对偏差分别为3.4%、5.2%和5.3%，较好地反映了实际的发酵过程。

3 结 语

1)通过对菌体生长曲线分析可得出，菌体生长有一最大饱和浓度，且菌体浓度的增加对自身生长会产生抑制作用。

2)通过对产物合成曲线分析，短梗霉多糖属于次级代谢产物，多糖的合成与细胞生长呈现部分相关。

3)采用Logistic方程和Luedeking-Piret方程建立的短梗霉多糖发酵模型，能够较好地描述出短梗霉多糖分批发酵过程中菌体生长、产物形成和底物消耗随时间的变化情况。

参考文献(References)：

[1] Bender H, Lehman J, Wallenfels K. Pullulan, an extracellular glucan from *Pullularia pullulans*[J]. **Biochimicaet Biophysica Acta**, 1959, 36(2): 309－316.

万方数据

[2] Bender H, Wallenfels K. Investigations on pullulan. II. Specific degradation by means of a bacterial enzyme[J]. **Biochemische Zeitschrift**, 1961, 334:79－95.

[3] Madi N S, Harvey L M, Mehlert A,et al. Synthesis of two distinct exopolysaccharide fractions by cultures of the polymorphic fungus[J]. **Carbohydrate Polymers**, 1997, 32:307－314.

[4] Shingel K I. Current knowledge on biosynthesis,biological activity,and chemical modification of the exopolysaccharide, pullulan[J]. **Carbohydrate Research**, 2004, 339(3):447－460.

[5] Sivakumar P A, Rao K P. The use of cholesteryl pullulan for the preparation of stable vincristine liposomes[J]. **Carbohydrate Polymers**, 2003, 51(3):327－332.

[6] Kachhawa D K, Bhattacharjee P, Singhal R S. Studies on downstream processing of pullulan[J]. **Carbohydrate Polymers**, 2003, 52(1):25－28.

[7] 赵红, 李春芳, 薛玉强, 等. 高产普鲁兰菌的诱变与筛选[J]. 吉林大学自然科学学报, 1998 (3): 75－781.
ZHAO Hong, LI Chun-fang, XUE Yu-qiang,et al. Mutation and screening of high production strain of pullulan[J]. **Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Jilinensis**, 1998(3):75－78. (in Chinese)

[8] Chi Zhen-ming, Zhao Shuang-zhi. Optimization of medium and cultivation conditions for pullulan production by a new pullulan-producing yeast strain[J]. **Enzyme and Microbial Technology**, 2003, 33 (2－3):206－211.

[9] 马金龙, 王长海. 短梗霉多糖发酵条件优化研究[J]. 烟台大学学报:自然科学与工程版, 2005,18(3): 199－205.
MA Jin-long, WANG Chang-hai. Optimal culture conditions of aureobasidium pullulans[J]. **Journal of Yantai University: Natural Science and Engineering Edition**, 2005, 18(3):199－205. (in Chinese)

[10] 付湘晋, 童群义, 于航. 低色素出芽短梗霉菌株的诱变筛选[J]. 工业微生物, 2006, 36(3): 24－31.
FU Xiang-jin, TONG Qun-yi, YU Hang. Mutation and screening of *Aureobasidium pullulans* with reduced pigmentation [J]. **Industrial Microbiology**, 2006, 36(3): 24－31.

[11] 任永娥, 江宁, 谢浩旭,等. 几株出芽短梗霉在不同发酵条件下产生多糖的比较[J]. 微生物学通报, 1995, 22(3):146－149.
REN Yong-e, JIANG Ning, XIE Hao-xu,et al. The comparison of various strains of aureobasidium pullulans producing pullulan at different conditions[J]. **Microbiology**, 1995, 22(3):146－149. (in Chinese)

[12] 曹海石, 孙宏,梁放,等. 普鲁兰多糖的分离纯化及结构鉴定[J]. 高等学校化学学报, 1999, 20(11): 1729－1732.
CAO Hai-shi, SUN Hong, LIANG Fang,et al. Purification and determination of the structure of pullulan polysaccharide [J]. **Chemical Journal of Chinese Universities**, 1999, 20(11):1729－1732. (in Chinese)

[13] 邓长江, 李长清, 朱希强,等. 蒽酮-硫酸法测定出芽短梗霉发酵液残糖和总糖含量的研究[J]. 食品与药品, 2006, 8 (11):54－56.
DENG Chang-jiang, LI Chang-qing, ZHU Xi-qiang,et al. Determination of total sugars and residual sugars from *Aureobiasidium pullulans* broth by anthrone-sulfuric acid colorimetry method[J]. **Food and Drug**, 2006, 8(11):54－56. (in Chinese)

[14] 戚以政, 汪叔雄. 生化反应动力学与反应器[M]//第 2 版. 北京: 化学工业出版社,1999:127－167.

(责任编辑:秦和平)

万方数据