

谷胱甘肽分批补料发酵动力学模型的建立

贾建萍¹, 裘娟萍², 周彦钢¹

(1. 浙江省医学科学院, 浙江杭州 310013) (2. 浙江工业大学生物与环境工程学院, 浙江杭州 310014)

摘要: 研究了酿酒酵母分批补料发酵生产谷胱甘肽的动力学特性, 利用 Logistic 方程和 Luedeking-Piret 方程建立了菌体生长、产物生成、基质消耗动力学模型。对得到的模型和实验数据进行了验证, 模型计算值和实验数据拟合较好, 模型能够较好地反映谷胱甘肽分批发酵动力学特性。

关键词: 谷胱甘肽; 酿酒酵母; 发酵; 动力学模型

文章编号: 1673-9078(2012)4-391-395

Modeling Of Batch Fermentation Kinetics for Glutathione Production

JIA Jian-ping¹, QIU Juan-ping², ZHOU Yan-gang¹

(1.Zhejiang Academy of medical Science, Hangzhou 310013, China)

(2.Collage of Biology and Environment Engineering, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, China)

Abstract: The fermentation kinetics of glutathione production by *Saccharomyces cerevisiae* were studied in a batch system. Logistic equation and Luedeking-Piret equation were used to describe the kinetics of the biomass growth, glutathione production and substrate utilization, respectively. A good agreement was found between experimental data and predicted data, which indicated that the models obtained could describe the glutathione production in the batch fermentation process.

Key words: glutathione; *Saccharomyces cerevisiae*; fermentation; kinetics model

谷胱甘肽 (Glutathione, 简称 GSH) 是一种由谷氨酸、半胱氨酸和甘氨酸缩合而成的活性三肽, 广泛存在与动物植物和微生物细胞中, 是一种主要的非蛋白巯基化合物, 具有抗氧化、解毒等生理功能, 在临床上用于治疗肝病、肿瘤、白内障等疾病。近年来, 谷胱甘肽作为一种抗氧化功能因子积极应用于食品工业。

目前谷胱甘肽主要采用微生物发酵法进行生产制备, 该法具有反应条件温和、成本低、步骤简单的优点, 利用发酵法制备谷胱甘肽的研究主要集中于生产菌株的选育和发酵工艺或提取工艺的优化^[1-5]方面, 而有关其发酵动力学方面的文献较少, 最近郑丽雪等^[6]研究了酿酒酵母在麦芽汁培养基中生产谷胱甘肽的动力学特性, 贺小贤等^[7]建立了谷胱甘肽分批发酵动力学模型, 两者在发酵培养过程中均未采用补料策略, 在实际发酵过程中合理的补料是菌体生长、产物积累的有效保证。

我们在前期研究中选育了谷胱甘肽高产菌株^[1], 同时对生产菌株的培养条件进行了合理的优化^[8]。在前期工作的基础上, 本研究的目的旨在通过研究谷胱

甘肽分批补料发酵动力学特性, 建立菌体生长、产物生成、基质消耗动力学模型, 为谷胱甘肽实际发酵生产、过程控制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 菌种

酿酒酵母 (*S. cerevisiae*), 4 °C 完全培养基斜面保藏, 每个月进行传代试验。

1.2 主要仪器

LS-B50L 立式压力蒸汽灭菌器, 上海医用核子仪器厂; 751-GW 分光光度计, 上海分析仪器厂; Labofuge 400R 台式高速冷冻离心机, 德国产; BIostat B 型发酵罐, 德国产。

1.3 培养基

1.3.1 斜面培养基

酵母膏 3 g, 麦芽汁 3 g, 蛋白胨 5 g, 葡萄糖 10 g, 琼脂 20 g, 定容至 1 L 水中, pH 自然。

1.3.2 种子培养基

葡萄糖 18 g, 蔗糖 12 g, 蛋白胨 30 g, 酵母膏 1 g, NH₄H₂PO₄ 0.55 g, (NH₄)₂SO₄ 12 g, MgSO₄·6H₂O 2 g, FeSO₄·7H₂O 0.1 g, 肌醇 75 mg, 生物素 24 μg, 维生素 B₁ 0.8 mg, 麦芽汁 10 g, 定容至 1 L 水中, pH 5.0。

1.3.3 发酵培养基

收稿日期: 2011-12-15

作者简介: 贾建萍, 女, 助理研究员, 研究方向为微生物遗传及生物活性肽的开发

葡萄糖 19.5 g, 糖蜜 19.5 g, 蛋白胨 30.0 g, Cys·HCl 0.976 g, MgSO₄·7H₂O 5.0 g, 甲硫氨酸 0.48 g, 生物素 0.024 mg, 肌醇 0.075 g, 酵母膏 0.5 g, 麦芽汁 30.0 mL, NH₄H₂PO₄ 0.55 g, VB₁ 1.6 mg, (NH₄)₂SO₄ 12.4 g, K₂HPO₄ 3.0 g, FeSO₄ 1 mg, ZnSO₄ 1 mg, CuSO₄ 0.167 mg, 定容至 1 L 水中, pH 5.0。

1.3.4 补料培养基

葡萄糖 300 g, 糖蜜 300 g, 蛋白胨 150 g, Cys·HCl 4.8799 g, MgSO₄·7H₂O 25.0 g, 生物素 120.0 μg, 肌醇 0.375 g, NH₄H₂PO₄ 2.75 g, VB₁ 8 mg, (NH₄)₂SO₄ 31.0 g, K₂HPO₄ 15.0 g, FeSO₄ 3 mg, ZnSO₄ 3 mg, CuSO₄ 0.5 mg, 麦芽汁 300 mL, 定容至 1 L。

1.4 培养方法

种子培养: 从斜面培养基上挑取生长良好、新鲜培养的菌苔到种子培养液, 250 mL 三角瓶种子培养基装量为 30 mL, 在 30 °C 及 200 r/min 下培养 48 h; 发酵培养: 以 7.5% 的接种量将种子培养基接入 5 L 发酵罐中, 控制温度 28 °C, 通气量 3 mL/min, 搅拌转速 500 r/min, pH 5.0, 发酵时间 40 h。

1.5 分析方法

1.5.1 菌体干重的测定

取适量发酵液, 于 4500 r/min 离心 4 min, 收集菌体, 经蒸馏水洗涤菌体两次, 弃去上清液, 湿菌体经 105 °C 烘干至恒重后称重。

1.5.2 胞内谷胱甘肽含量测定

ALLOXAN 试剂衍生法, 见文献^[9]。

1.5.3 还原糖的测定

斐林试剂滴定法。

2 结果与分析

2.1 谷胱甘肽分批发酵过程

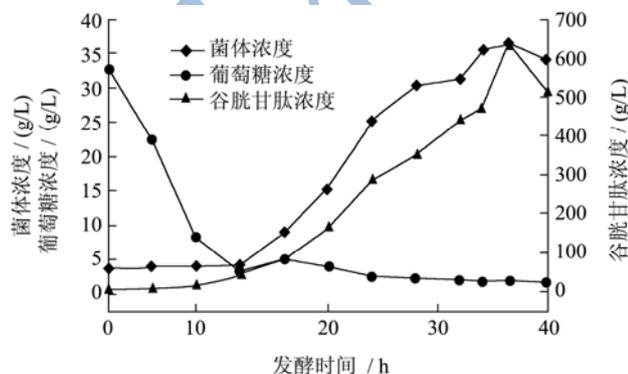


图1 谷胱甘肽分批发酵进程曲线

Fig.1 The evolution of glutathione production in batch fermentation system

图 1 描述了菌体浓度 (X), 谷胱甘肽浓度 (P), 葡萄糖浓度 (S) 随发酵时间 (t) 的变化过程。在图

1 中可根据菌体生长状况分为三个阶段, 第一阶段: 延滞期 (0~12 h), 菌体生长速率和谷胱甘肽生成速率缓慢。第二阶段: 对数生长期 (12~34 h), 菌体快速增长, 呼吸强度明显增加, 发酵液中溶氧浓度下降, 需通过增加搅拌速率和通气量来增加溶氧浓度, 同时随着菌体浓度的增加, 谷胱甘肽浓度相应增加。第三阶段: 稳定期 (34~38 h), 菌体浓度达到最高值, 而且基本不变, 谷胱甘肽浓度继续增加, 36 h 谷胱甘肽浓度达最高值 (638.9 mg/L), 由此可见, 菌体生长与谷胱甘肽产量呈部分相关的关系, 体现了菌体生长与次级代谢产物生成时间上不一致的特征。

2.2 谷胱甘肽发酵动力学模型的建立

从模型的简化考虑采用均衡生长的非结构模型, 基于以下假设, 即在细胞的生长过程中, 细胞内各种成分均以相同的比例增加, 视菌体为单组份, 不考虑环境对菌体组成的影响。

2.2.1 菌体生长动力学模型

Logistic 方程是一个典型的 S 型曲线, 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, 对于拟合菌体生长过程具有广泛的适用性。因此, 采用 Logistic 方程描述谷胱甘肽发酵过程中菌体生长动力学特性, Logistic 方程为:

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

以 t=0 时, X=X₀ 为初始条件, 上式积分整理后, 可得:

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

$$\text{或} \ln \frac{X}{X_m - X} = \mu_m t - \ln \left(\frac{X_m}{X_0} - 1\right) \tag{3}$$

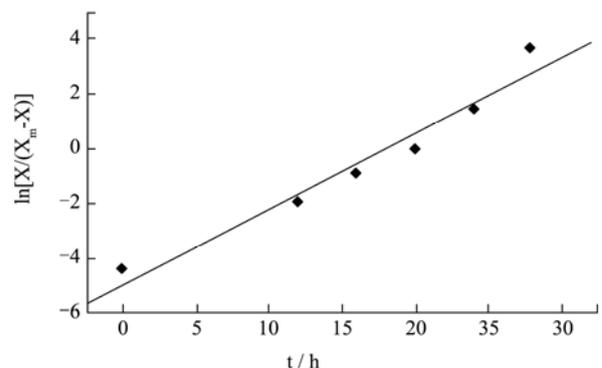


图2 ln [X / (X_m - X)] 与 t 的对应关系

Fig.2 The relationship between $\ln \frac{C_x}{C_{xm} - C_x}$ and t

以 $\ln \frac{X}{X_m - X}$ 对 t 作图(图 2), 可得: $\mu_m = 0.273 (\text{h}^{-1})$,

$X_0=0.227$ (g/L)。将参数 μ_m , X_0 , X_m 代入式 (2) 得菌体生长的动力学模型:

$$X(t) = \frac{0.227 e^{0.273 t}}{0.993 + 0.00733 e^{0.273 t}} \quad (4)$$

2.2.2 谷胱甘肽生成动力学模型

由图 1 可见在谷胱甘肽的发酵过程中, 谷胱甘肽的生成与细胞生长是部分相关的过程, Gaden 的部分相关模型即 Luedeking-Piret 方程可用来描述谷胱甘肽生成的动力学特征, 其数学表达式为:

$$\frac{dP}{dt} = \alpha \frac{dX}{dt} + \beta X \quad (5)$$

稳态时, $dX/dt=0$, $X=X_m$, 由式 (5) 可得 $\beta=(dP/dt)_{st}/X_m$, 以细胞生长稳态时谷胱甘肽浓度 (P) 对 t 作图 (图 3), 得 $(dP/dt)_{st}=20.4$ (mg/L·h), 由此可得 $\beta=0.659$ (mg/h·g)。

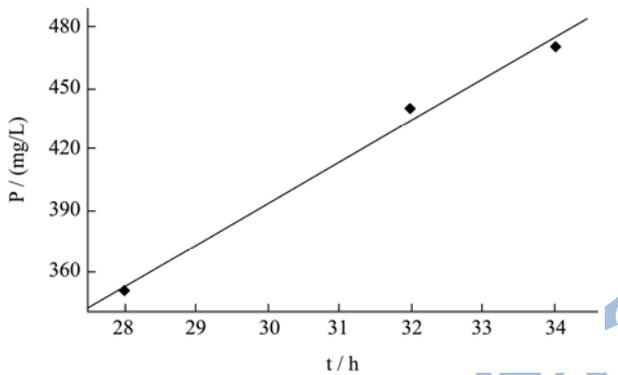


图 3 谷胱甘肽浓度与时间的关系

Fig.3 The relationship between Cp and t

将式 (2) 代入式 (5), 积分后得:

$$P(t) = \alpha X_0 \left[\frac{e^{\mu_m t}}{1 - \frac{X_0}{X_m} (1 - e^{\mu_m t})} - 1 \right] + \beta \frac{X_m}{\mu_m} \ln \left\{ 1 - \frac{X_0}{X_m} (1 - e^{\mu_m t}) \right\} \quad (6)$$

将式 (6) 简化为

$$P(t) = \alpha A(t) + \beta B(t) \quad (7)$$

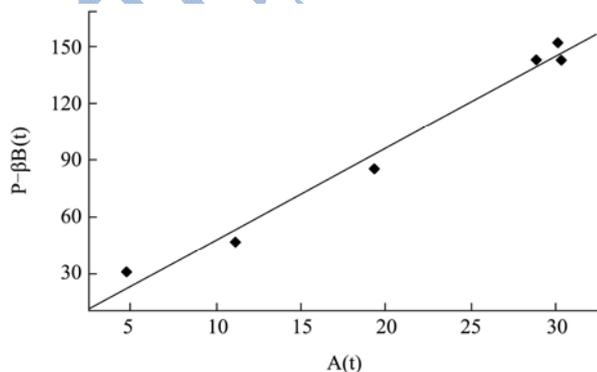


图 4 [P - beta*B(t)] 与 A(t) 的关系图

Fig.4 The relationship between [P - beta*B(t)] and A(t)

式 (7) 中:

$$A(t) = X_0 \left[\frac{e^{\mu_m t}}{1 - \frac{X_0}{X_m} (1 - e^{\mu_m t})} - 1 \right]$$

$$B(t) = \frac{X_m}{\mu_m} \ln \left\{ 1 - \frac{X_0}{X_m} (1 - e^{\mu_m t}) \right\}$$

以 $[P - \beta B(t)]$ 对 $A(t)$ 作图 (图 4), 得斜率 $\alpha=4.898$ 。将参数 α , β , X_0 , μ_m , X_m 代入式 (6) 可得谷胱甘肽生成动力学模型:

$$P(t) = \frac{1.11e^{0.273t}}{0.993 + 0.00733e^{0.273t}} + 75 \ln(0.993 + 0.00733e^{0.273t}) - 1.11 \quad (8)$$

2.2.3 基质消耗动力学

在谷胱甘肽发酵过程中, 基质 (葡萄糖) 的消耗主要用于: (1) 构成菌体成分; (2) 维持菌体生长和代谢需要; (3) 合成产物谷胱甘肽。基质消耗动力学特性可用下式表示:

$$-\frac{dS}{dt} = \frac{1}{Y_{X/S}} \cdot \frac{dX}{dt} + mX + \frac{1}{Y_{P/S}} \cdot \frac{dP}{dt} \quad (9)$$

2.2.3.1 菌体延滞阶段基质消耗动力学模型

由图 1 可知, 谷胱甘肽产量与菌体生长呈部分相关的关系, 在菌体生长进入对数期 (12 h) 后谷胱甘肽才开始大量生成, 在菌体延滞期谷胱甘肽几乎不生成, 所以, 在菌体延滞阶段, 基质消耗只用于构成菌体成分及维持菌体生长和代谢需要。(9) 式可转化为:

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{1}{Y_{X/S}} \frac{dX}{dt} - mX \quad (10)$$

稳态时 $dX/dt=0$, $X=X_m$, 由式 (10) 得: $m=-(dS/dt)_{st}/X_m$, 以细胞生长稳态时葡萄糖浓度 (S) 对 t 作图 (图 5), 得 $(dS/dt)_{st}=-0.049$, 可得 $m=0.00158$ (g/g·h)。

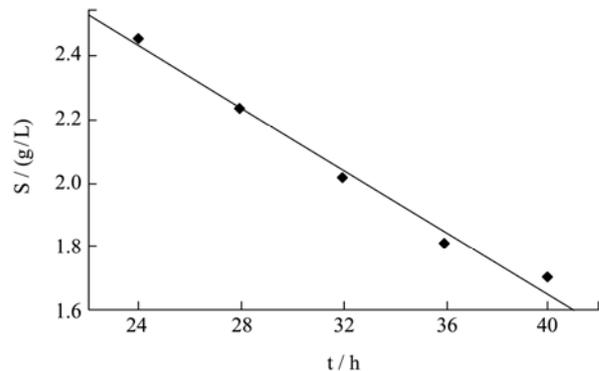


图 5 葡萄糖浓度与时间关系

Fig.5 The relationship between glucose and time

将式 (10) 积分得:

$$S(t) = S_0 - \frac{X_0}{Y_{X/S}} \left[\frac{e^{\mu_m t}}{1 - \frac{X_0}{X_m} (1 - e^{\mu_m t})} - 1 \right] - m \frac{X_m}{\mu_m} \ln \left\{ 1 - \frac{X_0}{X_m} (1 - e^{\mu_m t}) \right\} \quad (11)$$

将式 (11) 简化为:

$$S = S_0 - \frac{1}{Y_{X/S}} \cdot C(t) - mD(t) \quad (12)$$

式 (12) 中 $C(t) = X_0 \left[\frac{e^{\mu_m t}}{1 - \frac{X_0}{X_m}(1 - e^{\mu_m t})} - 1 \right]$,

$$D(t) = \frac{X_m}{\mu_m} \ln \left\{ 1 - \frac{X_0}{X_m}(1 - e^{\mu_m t}) \right\}$$

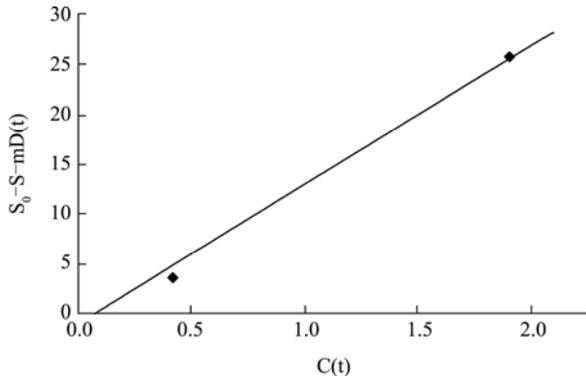


图6 [S₀-S-mD(t)]与C(t)关系

Fig. 6 The relationship between [S₀-S-mD(t)] and C(t)

在发酵时间 12 h 以内, 以[S₀-S-mD(t)]对C(t)作图 (图 6), 得 $\frac{1}{Y_{X/S}} = 13.88$ 。将参数 m、X₀、μ_m、X_m

代入式 (11) 得基质消耗动力学方程为:

$$S(t) = 34 - \frac{3.15e^{0.273t}}{0.993 + 0.00733e^{0.273t}} - 0.18 \ln(0.993 + 0.00733e^{0.273t}) \quad (13)$$

2.2.3.2 谷胱甘肽生成阶段基质消耗动力学模型

在菌体生长进入对数期 (12 h) 后, 基质消耗主要用于构成菌体成分、维持菌体生长和代谢需要及合成产物谷胱甘肽。将式 (5) 代入式 (9) 并简化为:

$$\frac{dS}{dt} = -\gamma \frac{dX}{dt} - \delta X \quad (14)$$

式中 $\gamma = \frac{1}{Y_{X/S}} + \frac{\alpha}{Y_{P/S}}$, $\delta = m + \frac{\beta}{Y_{P/S}}$, 稳态时 dX/dt=0,

X=X_m, 由式 (14) 得: $\delta = -(dS/dt)_{st}/X_m$, 以细胞生长稳态时葡萄糖浓度 (S) 对 t 作图 (图 5), 得 (dS/dt)_{st}=-0.049 (g/L·h), 由此可得 $\delta=0.00158$ (g/g·h)。

将式 (13) 积分得:

$$S(t) = S_0 - \gamma X_0 \left[\frac{e^{\mu_m t}}{1 - \frac{X_0}{X_m}(1 - e^{\mu_m t})} - 1 \right] - \delta \frac{X_0}{\mu_m} \ln \left\{ 1 - \frac{X_0}{X_m}(1 - e^{\mu_m t}) \right\} \quad (15)$$

将式 (15) 简化为:

$$S = S_0 - \gamma C(t) - \delta D(t) \quad (16)$$

式 (16) 中 $C(t) = X_0 \left[\frac{e^{\mu_m t}}{1 - \frac{X_0}{X_m}(1 - e^{\mu_m t})} - 1 \right]$,

$$D(t) = \frac{X_m}{\mu_m} \ln \left\{ 1 - \frac{X_0}{X_m}(1 - e^{\mu_m t}) \right\}$$

以[S₀-S-δD(t)]对C(t)作图 (图 7), 得 γ=0.104。将参数 γ、δ、X₀、μ_m、X_m 代入式 (15) 得基质消耗动力学方程为:

$$S(t) = 5.437 - \frac{0.0236e^{0.273t}}{0.993 + 0.00733e^{0.273t}} - 0.18 \ln(0.993 + 0.00733e^{0.273t}) \quad (17)$$

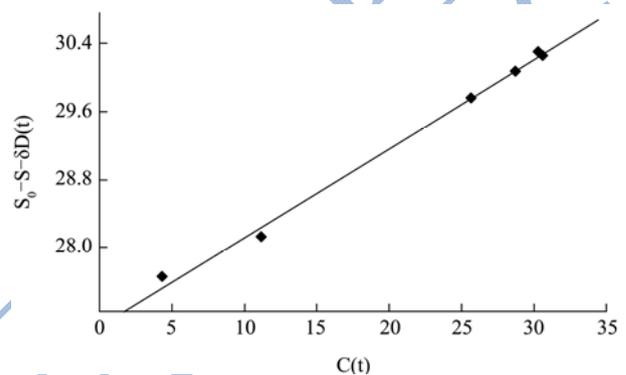


图7 [S₀-S-δD(t)]与C(t)关系

Fig. 7 The relationship between [S₀-S-δD(t)] and C(t)

2.2.4 模型的验证

根据所得到的菌体生长、产物生成及基质消耗动力学模型, 利用 Origin 6.0 软件进行了非线性拟合, 并与实验数据进行了比较, 结果见图 8。

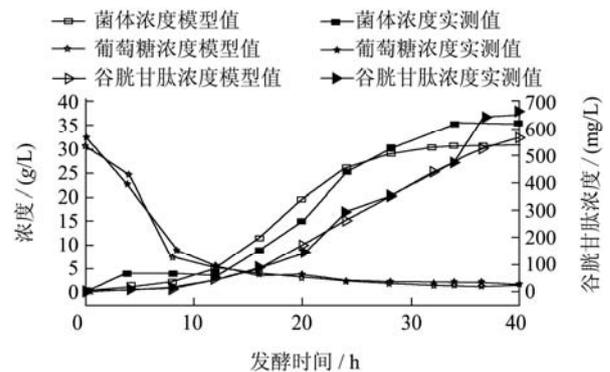


图8 谷胱甘肽分批发酵过程模型值与实测值的比较

Fig.8 Comparison of experimental data and kinetics mode values during glutathione batch fermentation

由图 8 可见, 实验数据与模型能较好拟合, 所得到的模型能较好描述谷胱甘肽分批发酵过程。

3 结论

3.1 本实验菌体发酵过程中经历了较长时间的延滞期 (0~12 h), 延滞期的出现与细胞一时缺乏分解或催化有关底物的酶, 或缺乏充足的中间代谢物有关, 菌

种、接种龄、接种量和培养基的营养等因素影响延滞期的长短,在后续的研究中通过进一步优化培养基成分和适当增加接种量来缩短延滞期,相应地缩短发酵周期,提高生产效率。

3.2 在发酵过程 12 h 之内,体系内葡萄糖浓度和溶氧浓度快速下降,此时进行及时、合理的补料显得尤为必要。Li^[4]等通过指数流加酵母膏(氮源)、前体氨基酸和 ATP 的方式实现细胞高密度培养及谷胱甘肽的高产;Lin^[10]分两个阶段补料实现谷胱甘肽的高产,在菌体生长阶段采用指数流加补料培养基的方式避免乙醇过量产生,同时实现细胞高密度培养,在产物生成阶段采取恒速流加培养基的方式实现谷胱甘肽的高产;Xiong^[11]通过在线监测发酵体系内细胞浓度及葡萄糖(基质)浓度(控制在 10~20 g/L)的方式分批流加补料培养基实现谷胱甘肽的高产,作者也采取该法补料实现发酵体系内谷胱甘肽的高产,得到比较好的效果。

3.3 通过对谷胱甘肽分批发酵动力学研究,建立的菌体生长动力学模型、产物生成模型和基质(葡萄糖)消耗动力学模型和实验值较好拟合,说明建立的模型能较好地反映谷胱甘肽的分批发酵过程,能为优化谷胱甘肽生产提供理论依据。

符号说明

X-细胞浓度(g/L); X_m -最大细胞浓度(g/L);
 X_0 -细胞初始浓度(g/L); μ_m -最大比生长速率(h^{-1});
P-谷胱甘肽浓度(mg/L); S-葡萄糖浓度(基质)(g/L);
t-发酵时间(h); $\alpha, \beta, \delta, \gamma$ -动力学模型参数; $Y_{X/S}$ -菌体相对于葡萄糖的得率系数(g 细胞/g 基质)。

参考文献

- [1] 贾建萍,裘娟萍.谷胱甘肽高产菌株的选育[J].微生物学通报,2003,30(4):24-29
- [2] 吕鸿雁,陈叶福,周大伟,等.产谷胱甘肽面包酵母的选育及发酵条件优化研究[J].现代食品科技,2011,27(5):559-563
- [3] Wen SH, Zhang T, Tan TW. Maximizing production of glutathione by amino acid modulation and high-cell-density fed-batch culture of *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Process Biochem, 2006, 41: 2424-2428
- [4] Li Y, Chen J, Mao YY, et al. Effect of additives and fed-batch culture strategies on the production of glutathione by recombinant *Escherichia coli* [J]. Process Biochem, 1998, 33(7): 709-714
- [5] 袁宏丽,蔡俊,丘雁临.谷胱甘肽(GSH)高产酵母菌株的初筛及营养条件优化[J].现代食品科技,2007,23(9):12-14
- [6] 郑丽雪,王立梅,梅艳珍,等.酿酒酵母生产谷胱甘肽分批发酵动力学研究[J].食品科学,2011,32(1):158-161
- [7] 贺小贤,潘亚磊,江磊.酿酒酵母 YF 谷胱甘肽分批发酵动力学模型[J].食品科技,2010,35(11):32-35
- [8] 贾建萍,周彦钢.酵母生产谷胱甘肽的培养条件研究[J].微生物学杂志,2007,27(4):40-45
- [9] 沈蓓英,江志炜.具有生物活性新型功能食品添加剂-谷胱甘肽[J].粮食与油脂,1993,2:27-32
- [10] Lin JP, Tian J, You JF, et al. An effective strategy for the co-production of S-adenosyl-L-methionine and glutathione by fed-batch fermentation [J]. Biochemical Engineering Journal, 2004, 21: 19-25
- [11] Xiong ZQ, Guo MJ, Guo YX, et al. Real-time viable-cell mass monitoring in high-cell-density fed batch glutathione fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* T65 in industrial complex medium [J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2008, 105(4): 409-413