木醋杆菌在转盘式反应器中的发酵动力学研究

黄丹, 张玉军, 窦烨

(山东万杰医学院生物化学教研室,山东 淄博 255213)

摘要:对细菌纤维素生产菌株 QAX993 的发酵动力学特性进行了研究,基于 Logistic 方程,提出了菌体生长动力学、基质消耗 动力学、纤维素合成动力学模型,得到了使用转盘式反应器分批发酵合成细菌纤维素的动力学模型参数,同时对实验数据与模型进行 了比较,模型与实验数据能够较好地拟合,模型基本上反映了该菌株在转盘式反应器中分批发酵过程的动力学特征。

关键词: 细菌纤维素; 动力学模型; 转盘式反应器

中图分类号: Q92; 文献标识码: A; 文章篇号:1673-9078(2008)03-0210-04

Fermentation Kinetics of Acetobacter xylinum in Rotating

Biodisc Reactors

HYANG Dan, ZHANG Yu-jun, DOU Ye

(Teaching and Research Section of Biochemistry, Shandong Wanjie Medical College, Zibo 255213, China) **Abstract:** The fermentation kinetics of a bacterial cellulose-producing strain QAX993 was studied and the kinetic models of microorganism growth, product formation and substrate consumption were developed based on the Logistic equation and then the kinetics parameters of the batch fermentation in rotating biodisc reactor for bacterial cellulose production were obtained. Results showed that the model predicted very well the kinetics characteristics of the stain QAX993 mediated batch fermentation in rotating biodisc reactor.

Key words: bacterial cellulose; kinetics model; rotating biodisc reactors

细菌纤维素由 D-葡萄糖聚合而成,具有高纯度、高结晶度、高聚合度、高扬氏模量及生物可降解性等 优越性能,作为一种新型生物材料,在食品、医药、 造纸、生物医学中具有广泛应用前景^[1-3]。目前对细菌 纤维素的研究主要集中于菌种选育和静态培养条件的 优化方面,在动态生产设备中的发酵动力学目前未见 报道。本文在对使用转盘式反应器进行细菌纤维素生 产菌株发酵培养的研究基础上,通过 Logistic 方程构 建了实验菌株在转盘式反应器中合成细菌纤维素的动 力学模型。

1 材料与方法

1.1 菌种

木醋杆菌 QAX993,由实验室分离纯化筛选而得。 1.2 培养基

斜面培养基:蔗糖 5%,牛肉膏 1.5%, Na₂HPO₄ 0.44%,柠檬酸 0.08%,琼脂 1.8%,乙醇 1.0%, pH 6.0。 121 ℃灭菌 20 min。

种子培养基: 同斜面培养基, 但不加琼脂。 收稿日期: 2007-11-20

作者简介:黄丹(1979-),男,助教,硕士研究生,研究方向为生物化学

发酵培养基: 蔗糖 3%, 酵母膏 1.5%, Na₂HPO₄ 0.44%, 柠檬酸 0.08%, 乙醇 1.0%, pH 6.0。121 ℃灭 菌 20 min。

1.3 转盘式反应器

实验室自制(已申报专利),有效容积1L,转盘 直径12cm,厚度1.5mm,盘间距3cm。转盘由电机 带动。

1.4 培养方法

从木醋杆菌斜面菌种挑取一环活化好的菌膜接入装有液体种子培养基的三角瓶中,于 30 ℃、150 r/min 条件下摇床培养 24 h。然后以 10%的接种量接种 到装有发酵培养基的转盘式反应器中,30 ℃水浴恒温 培养。每 24 h 取样进行发酵参数的测定。其中反应器 转盘转速为 20 r/min。

1.5 分析方法

1.5.1 菌体细胞浓度

采用在 600 nm 波长下的吸光值来测定发酵液中 菌体浓度^[4];

1.5.2 残糖的测定

采用 3,5-二硝基水杨酸(DNS)比色法测定^[5]。

1.5.3 纤维素膜干重

取出菌膜,用蒸馏水冲洗后,用 1%的 NaOH 溶 液,80℃浸泡 30 min,以除去菌体蛋白和残余的培养 基,再用蒸馏水反复冲洗,直至膜为中性。105℃干 燥至恒重,进行称量。纤维素的产量表示为:g 纤维 素/L 培养基。

2 结果与讨论

2.1 菌体在发酵过程中的代谢变化

由图1可以看出,木醋杆菌细胞浓度曲线与蔗糖 消耗曲线为相反变化,即:单位体积的培养基中在单 位时间内菌体细胞的生长量与蔗糖的消耗量成反向关 系,而从菌浓曲线和纤维素膜干重曲线的关系可以看 出产物的合成与细菌的生长成正向关系。由于在培养 基中蔗糖既是碳源又是能源,蔗糖的消耗主要用于细 胞生长和纤维素的合成两个方面。因此,可以推测碳 源是菌体生长的限制性底物。据此推测细菌纤维素的 合成属于生长偶联型。



Fig.1 Kinetic Curve of Fermentation

2.2 细胞生长动力学模型^[6]

Logistic 方程的表达式是一个标准的 S 型曲线, 能反映出分批发酵过程中因菌体生长浓度增加而对自 身生长存在的抑制作用,并能较好地拟合分批发酵过 程的菌体生长规律,其微分表达式为:

式(1)中 μ_{max} 为菌体细胞的最大比生长速率; 初始条件为 t=0时,菌体浓度 C_x (以 OD600 值表示) 等于接种后的菌体浓度 C_{x0} , $C_{x0}=0.008$; C_{xmax} 为最大 菌体浓度, $C_{xmax}=0.381$; t为时间。

对(1)式进行积分可得

$$C_{x}(t) = \frac{C_{x0} \exp(\mu_{\max} t)}{1 - (C_{x0} / C_{x\max})[1 - \exp(\mu_{\max} t)]} \dots (2)$$

以 $\ln[C_x/(C_{x \max} - C_x)]$ 对 t 作图得到的直线斜

率即为μ_{max},结果见图 2,并可求得μ_{max}=1.27 d⁻¹。 因此该菌体细胞生长动力学模型为:

$$C_x(t) = \frac{0.008 \exp(1.27t)}{0.979 + 0.021 \exp(1.27t)} \dots (3)$$

由式(3)求得的菌体生长拟合曲线,与实验测 得值相比较,结果如图 3。该模型的拟合值与实验值 基本都能很好的拟合,平均拟合误差为3.7%。



图 3 菌体生长动力学模型拟合值与实验值的比较

Fig.3 Simulative Value and Experimental Value of Kinetic

Model on Microorganism Growth

2.3 纤维素合成动力学模型

木醋杆菌发酵生产细菌纤维素属于生长偶联型,因此可以采用 Luedeking-Piret 方程^[7]描述细菌纤维素的比生成速率与菌体细胞比生长速率之间的关系。

由于该方程在生长偶联型条件下使用,因此方程 中的*β=*0。则有

Modern Food Science and Technology

式中, C_p 为细菌纤维素干重,g/L; α 为细菌纤维 素生成系数; β 为细菌纤维素积累速率(1/d)。对(5) 式进行积分,可得

式中, C_{p0}为细菌纤维素的初始干重, C_{p0}=0g/L。

以
$$C_{p}(t) - C_{p0}$$
对 $C_{x}(t) - C_{x0}$ 作图,直线斜率即

为α值,由图4求得 α=15.669。



Model on Bacterial Cellulose Synthesization

因此细菌纤维素合成动力学模型为:

由式(7)求得的纤维素合成拟合曲线,与实验测 得值相比较,结果如图 5。该模型的拟合值与实验值 能够较好的拟合,平均拟合误差为 5.86%。 2.4 基质消耗动力学模型 发酵过程中的基质消耗主要与菌体生长和产物生 成及其代谢有关,因此,基质消耗速率可用下式表示。

$$\frac{dC_{s}}{dt} = \frac{1}{Y_{x/s}} \left(\frac{dC_{x}}{dt} \right) + \frac{1}{Y_{p/s}} \left(\frac{dC_{p}}{dt} \right) + K_{e}C_{x}$$

(8) 式中: *Y_{x/s}*为菌体对基质的得率, g/g; *Y_{p/s}*为产物 对基质的得率, g/g; *C_s*为蔗糖浓度, g/100mL; *K_e*为 细胞维持系数。

将(5)式代人上式,可得

$$-\frac{dC_s}{dt} = \left[\frac{1}{Y_{x/s}} + \frac{\alpha}{Y_{p/s}}\right]\frac{dC_x}{dt} + K_e C_x$$

令
$$b = \frac{1}{Y_{x/s}} + \frac{\alpha}{Y_{p/s}}$$
,则有

$$-\frac{dC_s}{dt} = b\frac{dC_x}{dt} + K_e C_x \dots \dots \dots (9)$$

因为在稳定期
$$\frac{dC_x}{dt} = 0$$
,此时 $\frac{dC_s}{dt} = -0.009$,

 $C_x = 0.381$

$$K_e = -\frac{\left(\frac{dC_s}{dt}\right)_{stat}}{\left(C_s\right)_{stat}} = \frac{0.009}{0.381} = 0.0236$$

设式中 $C_{r}(t) - C_{r0} = A(t)$,

 $(C_{x \max} / \mu_{\max}) \ln \{1 - (C_{x0} / C_{x \max})[1 - \exp(\mu_{\max} t)]\} = B(t)$

。以 $[C_{s0} - C_s(t) - K_e B(t)]$ 对 A(t) 作图,所得直线

斜率即为 b。由图 6 可求得 b=5.9147。将 C_{s0}=2.97g/100ml 及其它模型参数代入(10)式可得基质 消耗动力学模型为:

 $C_s(t) = 2.97 - 5.9147 [C_x(t) - 0.008] - 0.007 \ln[0.979 + 0.021 \exp(1.27t)]$ (11)

由式(11)求得的基质消耗拟合曲线,与实验测得值相比较,结果如图 7。该模型的拟合值与实验值能够较好的拟合,平均拟合误差为 8.6%。



Model on Substrate Consumption

3 结论

通过对木醋杆菌(QAX993)发酵生产细菌纤维

(上接第 236 页)

- [2] Kono Y, Shibata H , Kodama Y, Ueda A , Sawa Y. Chlorogenic acid as a natural scavenger for hypochlorous acid Biochemical and Biophysical Research ommunications, 1995, 217 (3): 97
- [3] Peluso G. Studies on the inhibitory effects of Caffeoylquinic acid on monocyte migration acid superoxide in production
 [J] Ja. nat. prod., 1995, 58 (5): 639-646.
- [4] FedericaPellati, StefaniaBenvenuti.Analysis of phenolic compounds and radical scavenging activity of Echinaceaspp.
 [J]. Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2004, (35): 289-301.
- [5] Tso T C. Physiology and chemistry of tobacco plant

素的特征进行分析以及结合数学推导,建立了本实验 菌株使用转盘式反应器进行分批发酵过程中菌体生 长、纤维素合成及基质消耗的动力学模型及参数。该 模型的计算值与实验所测得的数据能够较好地拟合, 因此可以用来描述本实验菌株在转盘式反应器中生产 细菌纤维素的发酵过程,从而便于控制与优化操作参 数,为今后进一步放大实验及取代传统静态发酵的生 产方式提供了重要依据。

参考文献

- [1] 马霞,王瑞明,关凤梅.发酵条件对木醋杆菌合成细菌纤维 素影响的研究进展[J].酿酒科技,2005,127(1):31-33
- [2] 范丽霞,王锡彬,杨先会.细菌纤维素生物理化特性及其应 用[J].海南医学院学报,2004,10(4):279-281
- [3] 胡晓燕,曲波音.细菌纤维素的研究进展[J].纤维素科学与 技术,1998,6(4):55-64
- [4] 马霞,察可文,王瑞明,等,木醋杆菌 M12 静态发酵生产细菌
 纤维素的动力学模型的建立[J].氨基酸和生物资源,
 2004,26(4):27-29
- [5] 大连轻工业学院等组编.食品分析[M].北京:中国轻工业出版社,1994.173-177
- [6] 戚以政,汪叔雄.生化反应动力学与反应器[M].北京:化学工 业出版社,1996.72-105
- [7] Murat Elibol,Ferda Mavituna. A kinetic model for actinorhodin production by Streptomyces coelicolor A3(2)[J].
 Process Biochemistry 1999,34: 625-631

[M] .Hutchison and Ross , 1972 ,259-271.

- [6] Penn P T, Stephens R L , weybew J A. Some factors affecting the content of principal polyphenols in tobacco leaves[J]. Tob Sci, 1958,2:68-72.
- [7] Williamson R E. Variation of Polyphenols in cured tobacco cultivars attributed to location, stalk position and year [J]. Crop Sci., 1982,22:144-146.
- [8] Bauer, A. W., Kirby, W. M. M., Sheriss, J. C., & Turck, M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by standardised single method. American Journal of Clinical Pathology, 45, 493–496