

# 菌株 SFZ-37 产鼠李糖脂分批式发酵动力学的初步研究

赵晨, 赵祥瑞<sup>2</sup>, 董学前<sup>2</sup>, 乔君<sup>2</sup>, 刘建军<sup>1,2</sup>

(1. 山东轻工学院食品与生物工程学院, 山东济南 250353)

(2. 山东省食品发酵工程重点实验室, 山东济南 250013)

**摘要:** 在5 L磁力搅拌发酵罐上, 对铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 菌株SFZ-37生产鼠李糖脂进行分批发酵, 并对发酵过程进行监测, pH值在发酵过程中基本维持稳定, 发酵结束时, 菌体生物量可达4.41 g/L, 鼠李糖脂产量达到11.61 g/L, 底物甘油残量达到11.69 g/L。根据实验数据构建了菌体生长、产物生成及底物消耗的动力学模型, 并采用OriginPro 8.0软件对其进行了非线性拟合。结果表明, 建立的动力学模型可以较好的反映菌株分批发酵过程中菌体生长、产物生成和底物消耗三者之间的关系。

**关键词:** 鼠李糖脂; 铜绿假单胞菌; 动力学模型; 非线性拟合

文章编号: 1673-9078(2013)5-989-992

## Kinetics Study of Batch Fermentation of Rhamnolipid by *Pseudomonas aeruginosa* SFZ-37

ZHAO Chen<sup>1</sup>, ZHAO Xiang-ying<sup>2</sup>, DONG Xue-qian<sup>2</sup>, QIAO Jun<sup>2</sup>, LIU Jian-jun<sup>1,2</sup>

(1. College of Food and Biological engineering, Shandong Polytechnic University, Jinan 250353, China)

(2. Food & Fermentation Engineering Key Lab of Shandong Province, Jinan 250013, China)

**Abstract:** To explore rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* SFZ-37, batch fermentation was conducted in a 5-L fermentor and the fermentation process was monitored. During the batch fermentation, the pH was almost constant. At the end of batch fermentation, the dry cell weight, rhamnolipid production and residual glycerol could reach 4.41 g/L, 11.61 and 11.69 g/L, respectively. Based on the experimental data of batch fermentation, the kinetic models of cell growth, product formation and substrate consumption were established. The non-line fitting was employed to model the kinetics of fermentation by software OriginPro 8.0. The kinetic model could be used to describe the relationship of cell growth, product formation and substrate consumption during the process of batch fermentation.

**Key words:** rhamnolipid; *Pseudomonas aeruginosa*; kinetic model; non-linear fitting

鼠李糖脂分子结构庞大而复杂, 主要由亲水基鼠李糖及憎水基 $\beta$ -羟基癸酸两部分组成<sup>[1]</sup>, 从而使其具有较强的表面活性和乳化能力, 易被生物降解, 可作为一种新型乳化剂、乳化稳定剂、保湿剂、防腐剂、消泡剂、制糖助剂等广泛应用于食品工业中, 随着社会的发展, 人们对清洁、安全、高效的生物表面活性剂需求越来越高。

采用微生物发酵法生产鼠李糖脂, 生产过程易于控制, 设备要求较低, 发展潜力巨大<sup>[2]</sup>。目前, 有关鼠李糖脂的研究多集中在菌种选育及培养条件优化方面, 对于菌株产鼠李糖脂动力学的研究报告较少。通过建立动力学模型与求解模型方程参数, 可以更深入

科学地阐述菌体产鼠李糖脂的代谢过程, 寻求更加适合的发酵控制条件, 指导微生物反应器设计, 优化发酵过程参数, 是鼠李糖脂工业化生产的基础研究。2007年, 沈薇等人对一株假单胞菌产鼠李糖脂过程中菌株生长、产物生成、及氮源尿素消耗的动力学特性进行了研究, 证明了以甘油为底物时, 鼠李糖脂生成与菌体生长部分相关<sup>[3]</sup>。本文采用5L发酵罐, 通过考察铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 菌株SFZ-37在分批发酵过程中菌体生长、产物生成、底物甘油消耗、溶氧、pH随时间的变化规律, 构建菌株SFZ-37产鼠李糖脂分批发酵过程中菌体生长、产物生成及底物甘油消耗的动力学模型, 并采用OriginPro 8.0软件对模型进行非线性拟合, 进一步考察不同鼠李糖脂产生株在不同培养基中, 菌体生长与产物生成之间的关系。

收稿日期: 2012-12-26

作者简介: 赵晨(1987-), 男, 硕士研究方向: 微生物资源开发

通讯作者: 刘建军(1962-), 男, 博士, 研究员, 研究方向: 微生物资源开发

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株

铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 菌株 SFZ-37 分离自东营胜利油田长期受石油污染的土壤中, 由山东省食品发酵工业研究设计院山东省食品发酵工程重点实验室保藏。

### 1.2 发酵培养基 (g/L)

甘油30, 玉米浆6, 磷酸氢二钠2.5, 磷酸二氢钾6.0, 硫酸镁0.5。

### 1.3 发酵装置

采用BIOTECH-5BG型玻璃发酵罐, 全容量5 L, 工作体积3.5 L, 设置强磁力底部无顶针罐底磁力搅拌装置, 装备有溶氧电极, pH电极、温控系统。发酵过程中各种参数控制和变化都通过BBIOTECH-2002控制器进行控制和实时记录。

### 1.4 测定方法

#### 1.4.1 生物量的测定<sup>[3]</sup>

比浊法和细胞干重法结合来测定菌体浓度。根据培养液640 nm处测定吸光值, 建立吸光值与菌体干重的线性关系, 将其转化为菌体干重。

#### 1.4.2 鼠李糖脂的测定<sup>[4]</sup>

发酵液8000 r/min离心去菌体, 取1 mL上清液, 加入1 mL 6 mol/L盐酸, 在沸水浴中酸水解30 min, 用6 mol/L NaOH将水解液pH调为7.0, 定容到10 mL。取其中1 mL溶液, 加入2 mL DNS试剂, 沸水浴5 min, 定容到10 mL, 在550 nm处测定吸光值, 根据鼠李糖的标准曲线, 计算水解液中鼠李糖的含量。鼠李糖含量乘以系数3既得鼠李糖脂的产量<sup>[5]</sup>。

#### 1.4.3 甘油的测定

参照文献<sup>[6]</sup>进行。

### 1.5 培养方法

5 L发酵罐装液3 L, 接种量5%, 发酵温度30 ℃, 溶氧维持在20%以上。定时取样, 测定发酵液中的菌体量, 鼠李糖脂含量以及甘油含量。

## 2 结果与讨论

### 2.1 SFZ-37 发酵动态曲线

菌株SFZ-37在5 L发酵罐中进行分批发酵, 发酵周期104 h, 菌体量、鼠李糖脂产量、甘油浓度、溶氧浓度及pH随时间的变化情况如图1所示。结果表明, 菌体干重在前8 h内变化不明显, 8~32 h, 菌体量迅速增长, 32 h之后趋于稳定; 鼠李糖脂生成略滞后于菌体生长, 菌株生长进入稳定期后, 产物浓度继续增长, 在96 h后趋于平稳; 底物甘油在菌体生长对数期消耗

迅速, 进入稳定期后, 消耗速率降低; 溶氧在发酵初期下降较快, 说明菌体生长对于氧气需求量较大, 进入对数后期, 菌体生长减缓, 耗氧减弱, 溶氧开始缓慢回升; pH在整个发酵过程中基本恒定。

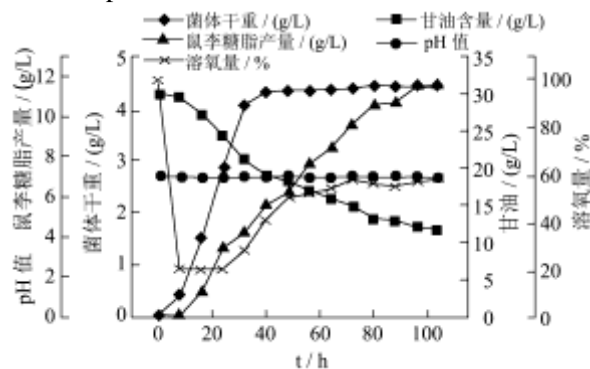


图1 SFZ-37分批发酵过程曲线

Fig.1 Time course of batch fermentation by SFZ-37

### 2.2 动力学模型的构建

微生物发酵动力学模型一般由微生物生长模型、产物生成模型、底物消耗模型三部分组成。主要分为两大类: 结构类模型和非结构类模型<sup>[7]</sup>。结构模型主要考虑细胞内部组分如蛋白质、脂肪、维生素随环境的变化规律, 从细胞机理方面描述细胞生长及代谢行为, 但在具体操作过程中, 因为细胞生长代谢的复杂性, 致使数据采集较为困难, 所以结构模型构建通常受阻。而非结构动力学模型则不考虑细胞内部组分及个体差异, 只是将细胞群体作为一种溶质, 根据宏观菌体量、底物及产物浓度的变化描述细胞生长及代谢行为。根据本实验的具体情况, 可将菌株SFZ-37产鼠李糖脂的分批发酵视为非结构类模型类型。本文利用5L罐发酵数据(图1), 构建并拟合细胞生长动力学模型、产物生成动力学模型及底物消耗动力学模型, 求解各动力学参数。

#### 2.2.1 菌体生长动力学模型的建立

研究者为充分描述微生物在复杂环境下所呈现的生长规律, 通常会使用大量限制条件和模型参数, 致使构建的模型也比较复杂, 求解困难。目前, 有关微生物生长动力学研究较多采用模型参数较少的Monod和Logistic方程。Monod方程设置的限制性因素为限制性营养物质浓度, 不适合描述菌体生长的停滞期与稳定期。Logistic<sup>[8]</sup>方程的限制因素为一定条件下所能达到的最大群体密度, 是典型的S型曲线, 能更好地反映菌体生长过程中所经历各个时期, 体现发酵过程中菌体浓度的增加对于菌体生长的抑制作用。因此, 本文选择Logistic方程来拟合菌株SFZ-37分批发酵过程中的菌体生长规律, 如方程式(1), 经过积分得到方程式(2)。

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

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

使用方程式(2)拟合的菌株SFZ-37在分批发酵过程中菌体干重随时间的变化规律如图2所示,经OriginPro 8.0软件进行的数据拟合结果显示,模型方程对实验数据点拟合的相关系数可达到 $R^2=0.99164$ ,实验数据与方程曲线拟合情况良好,证明该模型方程可以很好地描述菌株SFZ-37的生长趋势。通过模型拟合求得的最大比生长速率为 $\mu_m=0.23993h^{-1}$ ,相对于文献[3,9,10]中报道的最大比生长速率略高,说明培养基比较适合对数生长期菌株SFZ-37的生长。将所求参数带入方程式(2),得到菌株SFZ-37生长动力学模型,如式(3):

$$X = \frac{0.1421e^{0.24t}}{4.408 + 0.032e^{0.24t}} \quad (3)$$

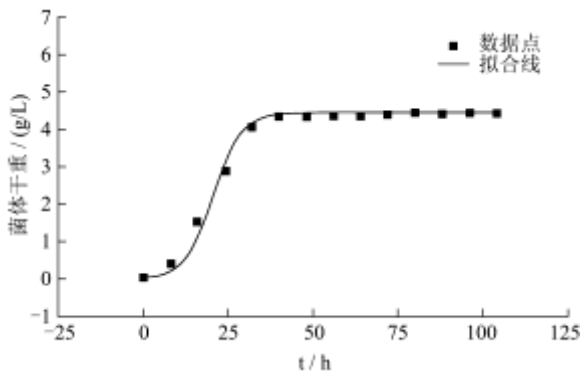


图2 菌体生长曲线

Fig.2 Growth course of the strain

### 2.2.2 产物生成动力学模型建立

Gaden将产物生成与菌体生长之间的关系分成三种类型:相关模型、部分相关模型、非相关模型<sup>[7]</sup>。为此,研究者建立了Luedeking-Piret<sup>[7]</sup>方程(如方程式(4))来判断这三种类型:当 $\alpha>0, \beta=0$ 时,为相关模型,产物生成为生长偶联型;当 $\alpha>0, \beta>0$ 时,为部分相关模型,产物生成为部分生长偶联型;当 $\alpha=0, \beta>0$ 时,为非相关模型,产物生成与细胞生长无关。Luedeking-Piret方程积分得方程式(5)。

$$\frac{dp}{dt} = \alpha \frac{dx}{dt} + \beta X \quad (4)$$

$$C_p = \alpha X_0 \left[ \frac{e^{\mu_m t}}{X_m - X_0 + X_0 e^{\mu_m t}} - 1 \right] + \beta \frac{X_m}{\mu_m} \ln \left[ 1 - \frac{X_0}{X_m} (1 - e^{\mu_m t}) \right] \quad (5)$$

采用Luedeking-Piret方程拟合的菌株SFZ-37在分批发酵过程中鼠李糖脂产量随时间的变化规律如图3所示。经Origin Pro 8.0软件进行的数据拟合结果显示,该模型方程对实验数据点拟合的相关系数可达到 $R^2=0.99044$ ,实验数据与方程曲线拟合情况良好,证明该

模型方程可以很好地描述菌株SFZ-37产鼠李糖脂的变化趋势。通过模型拟合求得产物生成动力学方程中 $\alpha=0.85807, \beta=0.02312$ ,均大于零,说明菌株SFZ-37产鼠李糖脂为部分生长偶联型。将所求参数带入方程式(5),得到菌株SFZ-37产物生成动力学模型,如式(6)。

$$C_p = 0.85X_0 \left[ \frac{e^{0.24t}}{4.408 + 0.032e^{0.24t}} - 1 \right] + 0.023 \frac{4.44}{0.23993} \ln \left[ 1 - \frac{0.032}{4.44} (1 - e^{0.24t}) \right] \quad (6)$$

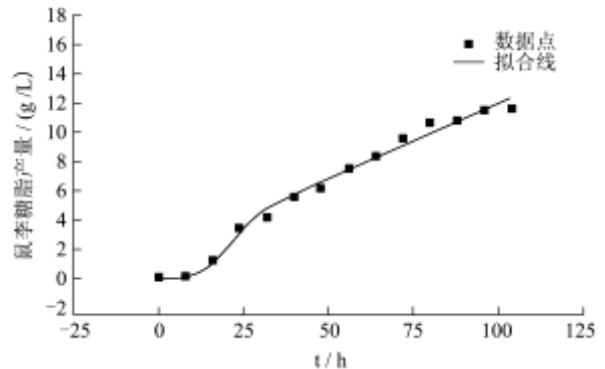


图3 鼠李糖脂生成曲线

Fig.3 Course of production of rhamnolipids

### 2.2.3 底物(甘油)消耗动力学模型建立

根据物料守恒,可以推导出底物消耗动力学模型方程<sup>[11]</sup>(如式7)。式中 $1/Y_{x/s} \cdot dx/dt$ 部分为用于菌体生长的底物消耗速率, $mX$ 部分为维持菌体细胞生存的底物消耗速率, $1/Y_{p/s} \cdot dp/dt$ 部分为用于产物生成的底物消耗速率。发酵培养基中的氮源、维生素、无机盐类一般只用于菌体生长和部分代谢产物合成,而碳源既用于新菌体细胞合成及代谢产物生成,还需维持菌体细胞的生存<sup>[12]</sup>。由于本文主要探讨菌株SFZ-37发酵过程中碳源甘油的消耗情况,因此,方程中3部分消耗速率都应包含在内。

$$-\frac{ds}{dt} = \frac{1}{Y_{x/s}} \frac{dx}{dt} + \frac{1}{Y_{p/s}} \frac{dp}{dt} + mX \quad (7)$$

对方程式(7)积分,为方便计算,设:

$$\frac{1}{Y_{x/s}} + \frac{\alpha}{Y_{p/s}} = k_1 \quad (8)$$

$$m + \frac{\beta}{Y_{p/s}} = k_2 \quad (9)$$

经计算得到方程式(7)的积分式为:

$$S = S_0 - k_1 \left( \frac{X_0 X_m e^{\mu_m t}}{X_m - X_0 + X_0 e^{\mu_m t}} - X_0 \right) - k_2 \frac{X_m}{\mu_m} \ln \left[ 1 - \frac{X_0}{X_m} (1 - e^{\mu_m t}) \right] \quad (10)$$

采用方程式(10)拟合的菌株SFZ-37在分批发酵过程中底物甘油的消耗量随时间的变化规律如图4所示。经Origin Pro 8.0软件进行的数据拟合结果显示,该模型方程对实验数据点拟合的相关系数可达



$R^2=0.99546$ , 实验数据与方程曲线拟合情况良好, 证明该模型方程可以很好地描述菌株SFZ-37产鼠李糖脂时底物甘油的消耗情况。将所求参数带入方程式(10), 得到菌株SFZ-37底物消耗动力学模型, 如式(11):

$$S = 30.03 - 1.89 \left( \frac{0.1421e^{0.24t}}{4.408 + 0.032e^{0.24t}} - 0.032 \right) - 0.029 \frac{4.44}{0.24} \ln \left[ 1 - \frac{0.032}{4.44} (1 - e^{0.24t}) \right] \quad (11)$$

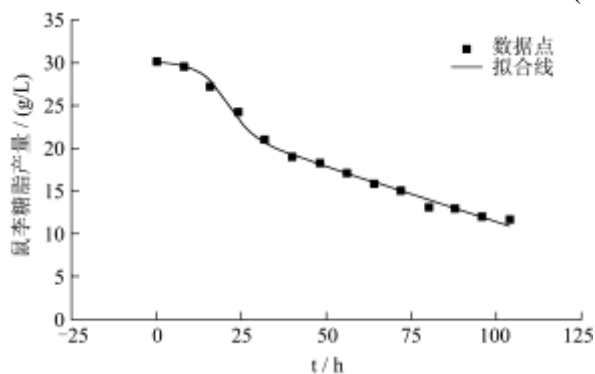


图4 甘油消耗曲线

Fig. 4 Course of glycerin consumption

### 3 结论

根据菌株SFZ-37在5L发酵罐中发酵生成鼠李糖脂的过程数据, 建立了此菌株的发酵动力学模型, 经过OriginPro8.0拟合后得到菌株SFZ-37生长动力学模型、产物生成动力学模型、底物消耗动力学模型, 如方程(3)、(6)、(11)所示, 各模型拟合的相关系数分别为0.99164, 0.99044, 0.99546, 均接近1, 拟合结果良好, 证明本文所建模型可以很好地反映出菌株SFZ-37鼠李糖脂发酵过程中菌体生长、产物生成、底物消耗的变化规律。

#### 符号说明:

X-菌体浓度(g/L);  $X_m$ -菌体最大干重(g/L); S-底物(甘油)浓度(g/L); P-鼠李糖脂含量(g/L);  $\mu$ -菌体比生长速率;  $\mu_m$ -菌体

的(最大)比生长速率( $h^{-1}$ );  $m$ -菌体维持系数( $h^{-1}$ );  $Y_{x/s}$ -菌体生长得率系数;  $Y_{p/s}$ -产物形成得率系数;  $\alpha$ -与菌体生长率关联的合成常数(g/L);  $\beta$ -与菌体生长量关联的合成常数[g(L·h)]; t-时间(h)。

#### 参考文献

- [1] 刘雪红,刘慧,高洁,等.鼠李糖脂在石油工业中的应用研究进展[J].*化学工业与工程技术*,2012,33(2):5-8
- [2] 张天胜.生物表面活性剂及其应用[M].北京:化学工业出版社,2005
- [3] 沈薇,唐仕荣,杨树林.鼠李糖脂分批式发酵动力学模型[J].*食品与生物技术*,2007,5:44-47
- [4] 胡孝丛.产生物表面活性剂菌株的筛选及发酵条件的优化[D].山东轻工业学院,2010
- [5] A Abalos, F Maximo, M A Manresa. Utilization of response surface methodology to optimize the culture media for the production of rhamnolipid by *Pseudomonas aeruginosa* AT10 [J]. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 2002, 77: 777-784
- [6] 阎杰,丘泰球.甘油铜比色法测定甘油含量的研究[J].*中国油脂*,2004,29(1):40-43
- [7] 贾士儒.生物反应工程原理[M].北京:科学出版社,2002
- [8] 贾建萍,裘娟萍,周彦钢.谷胱甘肽分批补料发酵动力学模型的建立[J].*现代食品科技*,2012,28(4):391-395
- [9] 宋文军,陈宁,王健,等.L-色氨酸产生菌分批发酵动力学模型[J].*无锡轻工业大学学报*,2002,4:340-343
- [10] 马挺,李京浩,李国强,等.红球菌DS-3脱硫发酵动力学模型的建立[J].*化工学报*,2006,57:1418-1421
- [11] 刘康乐,谢希贤,刘淑云.尿苷产生菌枯草芽孢杆菌Tc124分批发酵动力学研究[J].*现代食品科技*,2008,24(6):532-508
- [12] 韩文清,任志龙,张锐,等.发酵动力学教学释疑解难尝试[J].*微生物学通报*,2010,37(5):752-756