

唾液链球菌嗜热亚种 LCX2001 胞外多糖 分批发酵动力学*

顾瑞霞¹ 刘爱萍² 骆承庠²

(扬州大学农学院食品科学系 扬州 225009)¹ (东北农业大学畜产品加工研究所 哈尔滨 150030)²

摘要: 对唾液链球菌嗜热亚种 LCX2001 生物合成胞外多糖 (EPS) 的动力学进行了研究, 基于 Logistic-equation 方程和 Luedeking-piret 方程, 得到了描述发酵过程的动力学模型和模型参数。该模型反映了细胞生长、乳酸生成、EPS 生物合成和基质消耗之间的关系, 模型的拟合结果与实验值吻合较好, 误差小于 10%。

关键词: 胞外多糖, 数学模型, 发酵动力学, 乳酸菌

中图分类号: Q93-936 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2001) 04-0035-05

* 江苏省教委自然科学基金资助项目

收稿日期: 2000-06-02, 修回日期: 2000-10-26

KINETICS OF EXOPOLYSACCHARIDE BY *STREPTOCOCCUS SALIVARIUS* SUBSP. *THERMOPHILUS* LCX2001 FERMENTATION FOR PRODUCTION OF EXOPOLYSACCHARIDE

GU Rui-Xia¹ LIU Ai-Ping² LUO Cheng-Xiang²

(Department Of Food Sci., School Of Agriculture, Yangzhou University, Yangzhou 225009)¹

(Institute of Animal Food Processing, Northeast Agricultural University, Harbin 150030)²

Abstract: The exopolysaccharide (EPS) production by batch fermentation process with *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* LCX2001 was studied. The dynamic models describing the production of EPS & lactic acid & the cell growth & consumption of substrate were obtained in the paper, based on Logistic-equation and Luedeking-piret, EPS synthesis and the consumption of substrate was put forward. The relative deviations between the experimental data and calculated values are no more than 10%.

Keyword: Exopolysaccharide, Mathematical model, Fermentation dynamics, Lactic acid bacteria

国外对乳酸菌发酵生物合成胞外多糖 (exopolysaccharide, EPS) 的研究相当活跃^[1,2], 近年来我们对乳酸菌 EPS 进行了一定的探讨和研究^[3], 本文以唾液链球菌嗜热亚种 LCX2001 为对象, 对其 EPS 的发酵过程及其动力学进行了研究探讨。为进一步放大实验和工业化生产提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 菌株

唾液链球菌嗜热亚种 LCX2001 为东北农业大学畜产品加工研究所分离、保藏菌株。

1.2 培养基

发酵培养基用 LCX 培养基^[4]为便于对底物消耗测定, 添加 20g/L 的葡萄糖作为碳源, 培养基初始 pH 为 6.8。

1.3 培养方法和发酵条件

经灭菌的培养基, 接种 3% 的发酵剂, 于 35℃ 培养。发酵周期为 20h, 每 2.5h 取样测定菌体生长量、多糖产量、乳酸含量、糖的消耗。重复 3 次。

1.4 分析检测项目及测定方法

1.4.1 菌体生物量的测定: 采用干重法, 乳酸菌培养液, 经 12, 000g 离心 10min 后 (Beckman, USA), 分离的菌体用水洗再离心 1 次, 菌体在 105℃ 条件下干燥称重。

1.4.2 胞外多糖的测定: 发酵液经除去菌体后的上清液, 加 3 倍的 95% 的冷酒精于 4℃ 沉淀过夜, 12, 000g 离心 20min, 取沉淀热水溶解, 离心 10 min 除去不溶物, 再用酒精沉淀过夜、离心、透析过夜, 用硫酸-苯酚法测定, 以葡萄糖作标准。

1.4.3 乳酸含量测定: 除去菌体后的上清液, 用 0.1mol/L NaOH 测定滴定酸度, 然后换算成乳酸度。

1.4.4 糖的消耗量测定, 采用 HPLC 方法测定除菌上清液中葡萄糖含量。

2 实验结果

2.1 菌体生长动力学

本文选用 logistic equation 作为细胞生长动力学模型^[5]:

$$dC_x/dt = k \cdot C_x (1 - C_x/C_M) \quad (1)$$

对式 1 积分可得生物量 (C_x) 与时间 (t) 函数:

$$C_x(t) = C_0 \cdot e^{kt} / \{1 - (C_0/C_M)(1 - e^{kt})\} \quad (2)$$

方程 (2) 转化处理为线性方程为:

$$kt = \ln(C_M/C_0 - 1) + \ln[C_x / (C_M - C_x)] \quad (3)$$

由实验数据以 $\ln[C_x / (C_M - C_x)]$ 对时间 t 作图, 得到斜率为 k , 截距为 $-\ln(C_M/C_0 - 1)$

根据发酵过程实验数据 $C_M = 2.8$ (g/L), $C_0 = 0.27$ (g/L), 得到 $k = 0.35$ (1/h)

将模型参数代入方程 (2) 中, 求得发酵过程中菌体生长动力学模型如下:

$$C_x(t) = 0.27e^{(0.35t)} / \{1 - (0.27/2.8)[1 - e^{(0.35t)}]\} \quad (4)$$

(式中 t 以 h 表示) 然后将模型计算值与实验数据点进行比较 (图 1), 最大相对误差为 5.1%, 平均相对误差为 2.1%。表明实验结果与动力学模型值基本吻合。

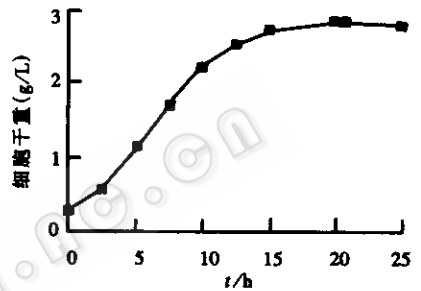


图 1 唾液链球菌嗜热亚种 LCX2001 胞外多糖发酵菌体生长动力学模型曲线

2.2 胞外多糖生成动力学

产物 (EPS) 的形成采用 Luedeking - piret 方程:

$$dp/dt = m_1 C_x + m_2 (dC_x/dt) \quad (5)$$

将方程 (1) 和方程 (2) 代入方程 (5), 并积分得方程:

$$P(t) = P_0 + m_2 [C_x - C_0] + m_1 (C_M/k) \ln \{1 - (C_0/C_M)[1 - e^{(kt)}]\} \quad (6)$$

稳态时, $dC_x/dt = 0$, $C_x = C_M$ 由方程 (5) 可得:

$$m_1 = (dp/dt)_s / C_M \quad (7)$$

通过实验数据得到 $(dp/dt)_s$, 为简便起见, 本文直接通过 (7) 式计算可得 (下同): $m_1 = 1.24 \times 10^{-3}$ 方程 (6) 可写成:

$$P(t) - P_0 - m_1 B(t) = m_2 A(t) \quad (8)$$

式中: $A(t) = C_x - C_0$, $B(t) = (C_M/k) \ln [1 - (C_0/C_M)(1 - e^{kt})]$

其中 $k = 0.35 \text{ h}^{-1}$, $C_M = 2.8$ (g/L), $C_0 = 0.27$ (g/L), $m_1 = 1.24 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$ 均为已知, 因此以 $P(t) - P_0 - m_1 B(t)$ 对 $A(t)$ 作图, 直线斜率为 $m_2 = 0.074$

依据动力学模型参数, 实验数据 $C_M = 2.8$ (g/L), $P_0 = 0$ (g/L), 将模型参数代入方程 (6), 即可求得产物生成动力学模型:

$$P(t) = 0.074 [C_x - 0.27] + 1.24 \times 10^{-3} \times (2.8/0.35) \cdot \ln \{1 - (0.27/2.8)[1 - \exp(0.35t)]\} \quad (9)$$

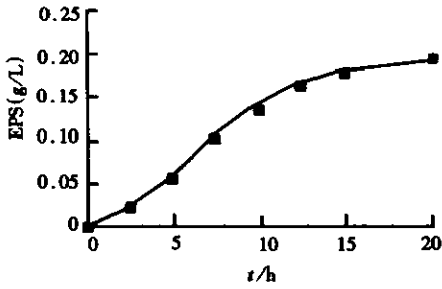


图2 唾液链球菌嗜热亚种 LCX2001 胞外多糖生物合成动力学模型与实验数据的拟合曲线

$$dL/dt = Y_{L/x} \cdot dC_x/dt \quad (10)$$

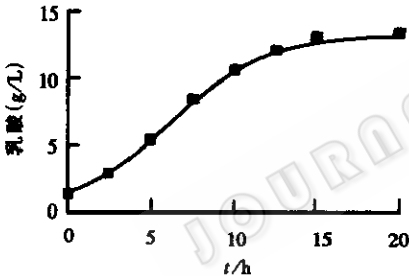
且 $Y_{L/x} = 4.72$ 对式 (10) 积分, 并将式 (2) 代入可知乳酸生成动力学模型如下:

$$L(t) = L_0 + Y_{L/x} \cdot C_0 \{ e^{(kt)} / [1 - (C_x/C_M) \cdot (1 - e^{(kt)})] - 1 \}$$

已知 $L_0 = 0$, 即乳酸生成动力学方程为:

$$L(t) = 4.72 \times 0.27 \{ e^{(0.35t)} / [1 - (0.27/2.8) (1 - e^{(0.35t)})] - 1 \} \quad (11)$$

图3为唾液链球菌嗜热亚种 LCX2001 胞外多糖生物合成过程中, 乳酸生成动力学模型与实验数据拟合曲线。从图中可以看出, 动力学模型计算值与实验数据最大相对误差为5.0%, 平均相对误差为2.1%。



2.4 基质消耗动力学

发酵过程中的底物消耗主要与菌体生长、乳酸形成、产物合成及代谢有关, 因此底物消耗速度可由下式表示:

$$dS/dt = - [1/(Y_{X/S})] (dC_x/dt) - [1/(Y_{L/S})] (dC_L/dt) - [1/(Y_{P/S})] (dC_P/dt) - K_e C_x \quad (12)$$

将式 (1), (5) 和 (10) 代入式 (12) 中可得:

$$dS/dt = - [1/Y_{X/S}] (dC_x/dt) - [1/Y_{L/S}]$$

$$Y_{L/S} dC_x/dt - [1/Y_{P/S}] [m_1 C_x + m_2 dC_x/dt] - K_e C_x$$

$$= - [m_1/Y_{P/S} + K_e] C_x - [1/Y_{X/S} + Y_{L/X}/Y_{L/S} + m_2/Y_{P/S}] dC_x/dt \quad (13)$$

设: $b_1 = m_1/Y_{P/S} + K_e$, $b_2 = 1/Y_{X/S} + Y_{L/X}/Y_{L/S} + m_2/Y_{P/S}$ 因此可将 (13) 改写成:

$$dS/dt = - b_1 C_x - b_2 (dC_x/dt) \quad (14)$$

发酵开始时即 $t=0$, 则 $S(t) = S_0$, 依上述同一原理当菌体生长处于稳定态时, 即 $dC_x/dt=0$, 可利用 (16) 求得: $b_1 = - [(dS/dt)/C_x]_{ST}$, 即 $b_1 = -0.085h^{-1}$

进而对式 (14) 积分, 并可改写成:

$$S(t) - S_0 + b_1 B(t) = - b_2 A(t) \quad (15)$$

以 $[S_0 - S_t - b_1 B(t)]$ 对 $A(t)$ 作图所得直线斜率为 $b_2 = 6.0$, 即动力学方程为:

$$S(t) = 20 - 6.0 \times (C_x - 0.27) - 0.085 \times \{ (2.8/0.35) \ln [1 - (0.27/2.8) (1 - \exp(0.35t))] \} \quad (16)$$

从图4中可以看出, 基质消耗动力学模型计算值与实验数据点比较, 最大相对误

差为 8.4%，平均相对误差为 3.5%。

3 讨论

在分批发酵中，许多学者提出了多种动力学方程^[5]，经比较发现 Logistic - equation 方程较适合于该菌株的生长特点。分批发酵中的生长和产物生成的三种关系，即生长偶联产物生成型、生长部分偶联产物生成型和非生长偶联产物生成^[7]。在我们的研究中发现，乳酸的生成与细胞的生长属偶联产物生成型，而 EPS 的生物合成在发酵初期与细胞生长偶联，但在发酵后期，由于乳酸菌可能也产生了分解酶，使得 EPS 的含量反而下降。

乳酸菌 EPS 生物合成与一般真菌 EPS 发酵特性类似^[6]，发酵过程具有典型的假塑性非牛顿流体特性。由于乳酸的生成会抑制乳酸菌的生长，我们采用 Logistic - equation 方程和 Luedeking - pirt 方程对唾液链球菌嗜热亚种 LCX2001 胞外多糖生物合成过程得到很好的理论描述，并取得相关的动力学模型参数，阐述了该菌发酵的动力学特征。

符号说明：

b1 动力学参数 g/ (g.h)

b2 动力学参数 g/ (g.h)

m1 动力学模型参数 (g/g)

m2 动力学模型参数 (g/g)

C_x 菌体浓度 (g/L)

P 胞外多糖浓度 (g/L)

L 乳酸浓度 (g/L)

S 糖浓度 (g/L)

C_M 最大菌体浓度 (g/L)

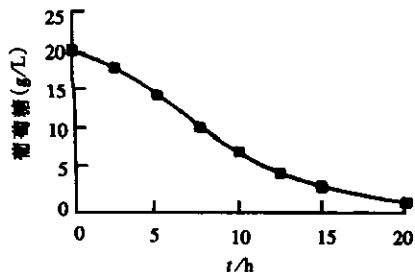


图4 唾液链球菌嗜热亚种 LCX2001 发酵过程中糖消耗动力学模型与实验数据的拟合曲线

图4 唾液链球菌嗜热亚种 LCX2001 发酵过程中糖消耗动力学模型与实验数据的拟合曲线

C₀ 初始菌体浓度 (g/L)

S₀ 初始糖浓度 (g/L)

P₀ 初始胞外多糖浓度 (g/L)

k 动力学模型参数 (1/h)

K_e 细胞维持系数

Y_{x/s} 细胞对基质的得率系数

Y_{L/s} 乳酸对基质的得率系数

Y_{p/s} 胞外多糖对基质的得率系数

参 考 文 献

[1] Gamar-Nouramil L, Blondeau K, Simonet S M. J of applied micro, 1998, 85: 664 ~ 672.

[2] Muzzi F, Giori G S, Oliver G, et al. Milchwissenschaft, 1994, 49 (12): 667 ~ 669.

[3] 顾瑞霞, 骆承岸. 中国乳品工业, 1999, 27 (2): 45.

[4] 顾瑞霞, 刘爱萍, 骆承岸. 中国乳品工业, 2000, 28 (4): 3 ~ 6.

[5] Daniel I. C. wang. Fermentation and Enzyme Technology, London and New York: John wiley & sons. Inc., 1979.

[6] 李平作, 章克昌. 生物技术, 1999, 9 (3): 24 ~ 26.

[7] 钱铭镭. 发酵工程最优化控制. 南京: 江苏科学技术出版社, 1998. © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn