

刺糖多孢菌分批发酵动力学研究

张竞立¹, 钱曙光², 廖美德¹, 侯学文³, 徐汉虹¹

(1 农药与化学生物学教育部重点实验室, 华南农业大学 昆虫毒理研究室, 广东 广州 510642

2 华南农业大学 理学院, 广东 广州 510642

3 华南农业大学 生命科学学院, 广东 广州 510642)

摘要: 利用摇瓶培养试验研究了刺糖多孢菌 *Saccharopolyspora spinosa* 的分批培养过程中生物量、培养液 pH、葡萄糖消长、多杀菌素含量等因素的变化规律。利用 MATLAB 软件对试验数据进行非线性回归, 拟合出了细胞生长动力学模型、基质消耗动力学模型和产物生成动力学模型, 得到了细胞生长量、残糖量、多杀菌素产量在发酵过程中随时间变化的规律, 相关系数分别为 0.989 34、0.992 66 和 0.986 35。拟合曲线 95% 置信度区间分析的结果表明, 该模型能够很好的反映出刺糖多孢菌分批发酵的过程。

关键词: 刺糖多孢菌; 多杀菌素; 发酵动力学模型; 拟合

中图分类号: TQ920.6

文献标识码: A

文章编号: 1004-411X(2006)03-0051-04

Study on the Fermentation Kinetic Models of *Saccharopolyspora spinosa*

ZHANG Jing li¹, QIAN Shu guang², LIAO Mei de¹, HOU Xue wen³, XU Han hong¹

(1 Key Lab of Pesticide and Chemical Biology Ministry of Education Lab of Insect Toxicology

South China Agric Univ, Guangzhou 510642 China

2 College of Science South China Agric Univ, Guangzhou 510642 China

3 College of Life Science South China Agric Univ, Guangzhou 510642 China)

Abstract An experiment was conducted for *Saccharopolyspora spinosa* in the changes of biomass, residual carbohydrate content, spinosad content, the pH value in the cultural medium by the shaking flask. The kinetic models of batch fermentation by *S. spinosa* for biomass, substrate consumption and spinosad production were studied. The models were fitted and provided a useful equation for biomass, substrate consumption and spinosad production. And the parameters of the models were obtained by using non-linear regression techniques simulated by MATLAB software. The temporal regulations of biomass, residual carbohydrate, spinosad content were gotten in the batch fermentation. The correlation coefficients of the models were 0.989 34, 0.992 66, 0.986 35 respectively. The fitted models could reflect the batch fermentation process of *S. spinosa*.

Key words *Saccharopolyspora spinosa*; spinosad; the model of fermentation kinetics; fit

刺糖菌素, 又名多杀菌素 (spinosad), 由放线菌刺糖多孢菌 *Saccharopolyspora spinosa* 发酵生产。经活性鉴定, 发现多杀菌素对鳞翅目、双翅目、缨翅目、鞘翅目及膜翅目害虫具有较好的生物活性, 且对蓟马和小菜蛾高效。因其低毒、低残留、对天

敌安全、对哺乳动物和环境无毒害、分解快等优点而获得美国“总统绿色化学品挑战奖”^[1]。多杀菌素是天然生成的代谢物, 类似良性生物制品, 是一种主要由 2 种非常活跃的天然存在代谢物所组成的混合物, 这 2 种物质分别是多杀菌素 A 和多杀

收稿日期: 2005 11-07

作者简介: 张竞立 (1980), 男, 硕士研究生; 通讯作者: 徐汉虹 (1961), 男, 教授, 博士, E-mail: hhxu@scau.edu.cn

©1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

菌素 D. 经结构鉴定, 属于大环内酯类抗生素^[2]. 由美国陶氏公司开发的 $w=2.5\%$ 的悬浮剂 (商品名: 莱喜) 和 $w=48\%$ 的悬浮剂 (商品名: 催杀), 已获得我国农药的临时登记, 分别用于防治甘蓝的小菜蛾和棉花的棉铃虫, 而在国内现无生产厂家^[3]. 目前国外关于刺糖多孢菌的研究大多集中在多杀菌素的杀虫作用机理、构效关系和编码基因等方面, 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^[4-6], 而有关刺糖多孢菌代谢变化的报道较少. 本文利用摇瓶培养试验, 对刺糖多孢菌的生长特性和发酵动力学进行了研究.

1 材料与方法

1.1 菌种

放线菌刺糖多孢菌 *Saccharopolyspora spinosa* (菌株号: NRRL 18395 华南农业大学昆虫毒理研究室保存菌种).

1.2 培养基

固体培养基: 牛肉膏 1.0 g 葡萄糖 10.0 g 胰蛋白胨 2.0 g 酵母粉 1.0 g 琼脂 15.0 g 水 1 000 mL, pH 7.0 种子培养基与发酵培养基: 酵母粉 1.0 g 葡萄糖 1.0 g 水 100 mL, pH 7.0

1.3 培养方法

将斜面培养基上的孢子置于种子培养基中, 震荡过夜使孢子均匀分散. 将分散后孢子悬浮液接入装有 50 mL 发酵培养基的 500 mL 三角瓶中, 于 28 °C 摇床振荡 (150 r/min) 培养 11 d 每 24 h 取样测定生物量、培养液 pH、葡萄糖消长、多杀菌素含量^[4-7].

1.4 多杀菌素 A 和多杀菌素 D 的提取

将培养液离心, 分别收集培养液和菌体, 并分别用 50 和 40 mL 的乙酸乙酯萃取上清液 2 次, 减压蒸馏萃取液, 蒸干后用丙酮溶解并定容至 5 mL, 即为多杀菌素 A 和多杀菌素 D 的粗提物, 于 4 °C 保存备用^[5-6].

1.5 多杀菌素 A 和多杀菌素 D 的检测

使用高效液相色谱监测多杀菌素 A 和多杀菌素 D 的产量变化^[8]. 高效液相色谱的分析条件为: 20RBAX Eclipse XDB-C18 4.6×250.0 mm 色谱柱, 流动相 $V_{\text{甲醇}}:V_{\text{乙腈}}:V_{\text{水}}=45:50:5$ (含 $\rho=0.05\text{ g/L}$ 的乙酸钠), 检测波长 250 nm, 进样量 20 μL , 流速 1.0 mL/min

1.6 培养液中可溶性总糖的测定

采用葱酮试剂法测定^[9].

1.7 生物量的测定

采用干菌丝质量法测定.

1.8 模型确定

运用 MATLAB 软件工具进行非线性拟合^[10].

2 结果与分析

2.1 多杀菌素发酵过程代谢变化

培养过程中生物量、培养液 pH、葡萄糖消长, 多杀菌素含量测定结果统计如图 1 所示. 从图 1 可以看出菌体生长的 4 个时期: 1~3 d 为停滞期, 孢子逐渐适应新的生长环境; 4~7 d 菌体大量合成相关的消化酶, 将培养液中的养分吸收, 菌体进入对数生长期, 培养液中菌体大量生长, 生物量和多杀菌素几乎同步增长, 多杀菌素增长稍滞后 1 d 7~10 d 是菌体的平衡期, 这一时期是菌体次生代谢产物的主要形成期; 第 10 d 后, 培养液中的营养消耗殆尽, 菌丝开始自溶, 生物量明显降低, 菌体进入衰亡期. 随着生物量的增长, 总糖浓度迅速减小, 在 8 d 后浓度稳定在 4.2 mg/mL. 从图 1 b 的 pH 变化趋势来看, 前 3 d 的 pH 逐渐下降, 在停滞期末期达最小值 5.25 恰好是菌体将要大量消耗培养液中的碳源和氮源, 并可能产生某些酸性物质使 pH 下降, 之后呈上升趋势, 可见, 在弱酸性环境下, 有利于激活有关酶系, 促进碳源和氮源的利用, 因此在菌体生长期可将培养液的 pH 控制在弱酸条件中, 利于菌体的生长.

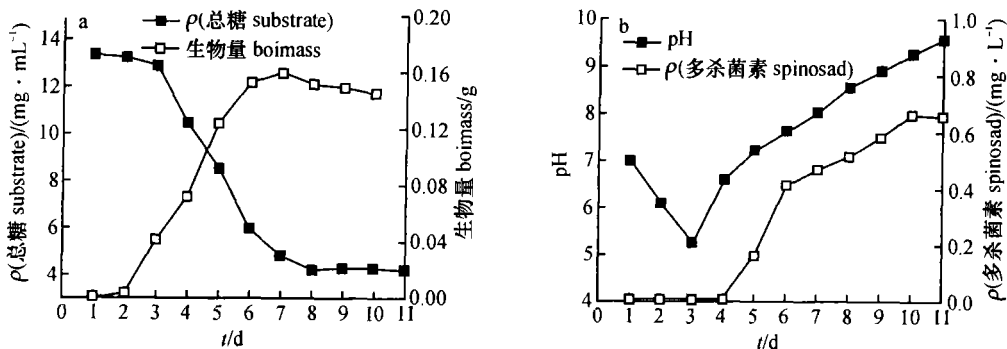


图 1 刺糖多孢菌的发酵曲线

Fig. 1 The curve of fermentation process of *S. spinosa*

2 2 刺糖多孢菌的发酵动力学模型的构建

由于菌体的存活期等诸多因素的影响, 发酵过程通常采取分批的操作方式. 分批发酵动力学模型的建立, 对发酵过程工艺条件的研究、反应过程操作的优化和控制具有重要意义和实用价值. 分批发酵动力学模型通常包括菌体生长动力学模型、产物生成动力学模型和底物消耗动力学模型. 目前, 国内外生化工程学者所构建的模型大多应用数学拟合模型, 数学拟合模型建模较为简便, 易于分析验证和实现计算自动化^[11].

2 2 1 细胞生长动力学模型^[12]的构建 Logistic模型是一个典型的 S 型曲线, 能较好地反映分批发酵过程中菌体生长规律, 因此本文采用该模型来描述菌体细胞的生长, 即

$$\mu = dx/dt = \mu_{max} (1 - x/x_{max}), \tag{1}$$

式中, 变量 x 表示菌体生长量, μ 表示菌体的生长速率. 初始条件 $t=0$ 时, $x=x_0$. μ_{max} 可根据试验数据用最小二乘法拟合而得, x_{max} 由试验测得, 两者均为常数. 方程 (1) 的积分式为

$$x(t) = x_0 \exp(\mu_{max} t) / \{1 - (x_0/x_{max}) [1 - \exp(\mu_{max} t)]\}, \tag{2}$$

根据试验数据 $x_{max}=0.153\ 0$ 和方程 (2), 结合试验数据进行非线性回归后得到分批发酵过程中菌体生长的动力学模型

$$x(t) = 9.979\ 8 \times 10^{-5} \exp(8.592\ 5 \times 10^{-3} t) / \{1 - 6.521\ 9 \times 10^{-4} [1 - \exp(8.592\ 5 \times 10^{-3} t)]\}, \tag{3}$$

模型方程的相关系数为 0.989 34 在图 2 中, 中间的实线代表拟合的菌体生长曲线, 两条虚线代表置信度为 95% 时全局性置信区间. 可以看出实线所表示的预测曲线的拟合效果良好, 所选择的模型完全反应了刺糖多孢菌的生长情况.

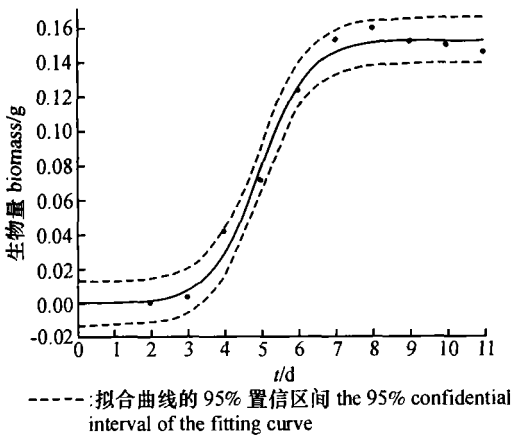


图 2 菌体生产模型拟合曲线

Fig 2 The fitting curve of the grow th of *S. spinosa*

2 2 2 多杀菌素生成动力学模型 从图 1 刺糖多孢菌的发酵曲线中可以观察到多杀菌素的合成与菌体的生长具有同步性, 并且在菌体生长结束后, 能继续合成多杀菌素, 显然多杀菌素的发酵属于部分生长偶联型. 因此可以选用经典的产物生成动力学模型, 即 Leudeking-piret模型

$$dp/dt = \alpha \ dx/dt + \beta x \tag{4}$$

方程 (4) 中变量 p 表示多杀菌素的产量, $\alpha \ dx/dt$ 表示与菌体生长率相关的产物形成率, βx 表示非伴随菌体生长的产物形成率, α 、 β 均为常数, 可根据试验数据拟合求得. 将方程 (1) 代入 (4), 积分得到

$$p(t) = p_0 + \alpha [x(t) - x_0] + (\beta x_{max} / \mu_{max}) \ln \{1 - (x_0/x_{max}) [1 - \exp(\mu_{max} t)]\}, \tag{5}$$

当 $x=x_{max}$ 时, 可以得到 β 值, $\beta=0.329\ 1$; 其中 μ_{max} 、 x_{max} 、 x_0 值均已知, $p_0=0$ 以 $p(t)$ 对 $x(t) - x_0$ 作图, 直线斜率即为 α 值, $\alpha=2.659\ 3$ 结合试验数据进行非线性回归后得到分批发酵过程中产物多杀菌素合成的动力学模型

$$p(t) = 2.659\ 3 [x(t) - 9.979\ 8 \times 10^{-5}] + 5.86 \ln \{1 - 6.521\ 9 \times 10^{-4} [1 - \exp(8.592\ 5 \times 10^{-3} t)]\}, \tag{6}$$

模型方程 (6) 的相关系数为 0.986 35 由图 3 可以看出实线所表示的预测曲线的拟合效果良好, 较好的反应了多杀菌素的合成情况, 方程 (6) 中的 β 值较大, 恰好证明了多杀菌素的发酵属于部分生长偶联型的初始假设.

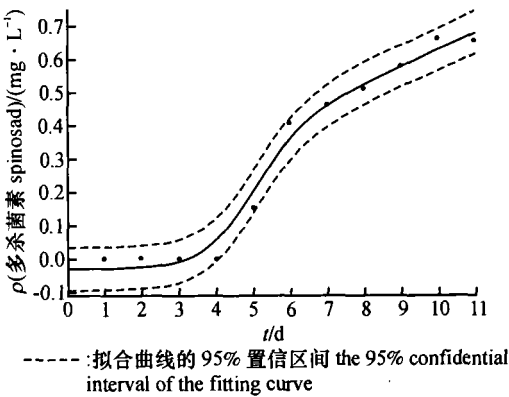


图 3 多杀菌素合成模型拟合曲线

Fig 3 The fitting curve of spinosad formation

2 2 3 基质消耗动力学模型的构建 通过分析多杀菌素的生物合成路线, 可以看出多杀菌素的糖苷配体部分属于聚酮结构, 是由丙酸按 A-A-P-A-A-A-A-A-A (A: 乙酰; P: 丙酰) 的顺序添加 10 个酰基缩合而成的, 而丙酸是通过糖代谢得到的. 多杀菌素 A 和多杀菌素 D 的糖基为 NDP-二甲基-福乐糖胺和 6 胶氧-L-鼠李糖, 也是由葡萄糖在相关酶的作用下

得到^[13]。因此在以葡萄糖作为碳源的多杀菌素发酵中,建立起总糖的消耗动力学模型是非常必要的。常用的基质消耗动力学模型为

$$-ds/dt=k_1(dx/dt)+k_2(dp/dt)+k_3x \quad (7)$$

式中:变量 s 表示总糖含量; k_1 表示碳源用于菌体生长的得率常数; k_2 表示碳源用于产物积累的得率常数; k_3 表示微生物碳源的维持常数,由于菌体呼吸所需的基质量较小,因此可归至菌体生长消耗中。故方程(7)可以简化后积分为

$$s(t)=s_0-k_1x(t)-k_2p(t), \quad (8)$$

将菌体生长动力学模型方程(3)和产物合成动力学模型方程(6)代入方程(8),经非线性回归后得到分批发酵过程中基质消耗动力学模型:

$$s(t)=0.0131-0.05754x(t)-9.5796 \times 10^{-5}p(t), \quad (9)$$

模型方程的相关系数为 0.992 66 从图 4 可以看出实线所表示的预测曲线的拟合效果良好,很好的反映了培养液中总糖消耗的变化趋势。

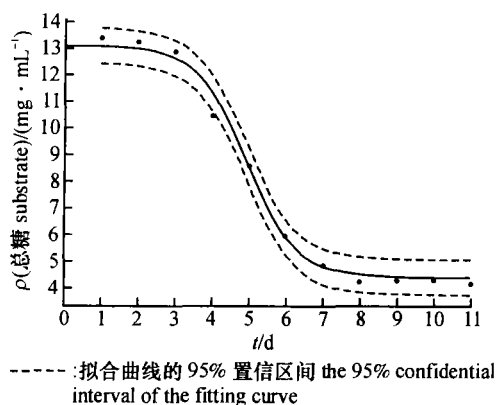


图 4 基质消耗模型拟合曲线

Fig 4 The fitting curve of substrate consumption

3 结论

通过对刺糖多孢菌培养中菌体生物量的变化,培养液 pH 的变化、碳源消耗情况、多杀菌素产量变化的测定,得到了菌体生长中 4 个周期的具体时间,并且得出弱酸条件有利于菌体生长的结论,从多杀菌素产量的变化曲线可以看出,多杀菌素的合成属于部分生长偶联型。

利用 MATLAB 软件,根据 Logistic 模型和

Leudeking piret 模型对菌丝量、残糖量、多杀菌素产量进行了非线性回归,得到了细胞生长动力学模型、多杀菌素生成动力学模型、基质消耗动力学模型,相关系数分别为 0.989 34、0.986 35、0.992 66 结合 95% 置信度区间分析,3 个动力学方程基本反映了刺糖多孢菌的发酵过程,可以为工业生产提供参考。

参考文献:

- [1] 杜顺堂,朱明军,梁世中. 生物农药多杀菌素的研究进展[J]. 农药, 2005 44(10): 441-444
- [2] 李如,汪清民,黄润秋. 多杀菌素的研究进展[J]. 农药学报, 2003 5(2): 1-12
- [3] VINCENT L, SAIGADO L, JOEL J et al. Studies on the mode of action of spinosad. The internal effective concentration and the concentration dependence of neural excitation[J]. Pesticide Biochemistry and Physiology 1998 60: 103-110
- [4] 陈晓霞,郭聆聆,张宇谔,等. 新型杀虫剂 Spinosad 发酵工艺的研究[J]. 微生物学通报, 2002 29(5): 21-25
- [5] 李福. 刺糖菌素产生菌的菌种选育及发酵条件优化研究[D]. 杭州: 浙江工业大学药学院, 2004
- [6] 张苑. 多杀菌素高产菌种的推理选育和发酵工艺的优化[D]. 杭州: 浙江大学材料与化工学院, 2004
- [7] GREASHAM R, NAM NE E. Nutritional improvement of processes[M] // ARNOLD D, JULIAN E D. Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology. Washington: American ASM Press, 1999: 59-63
- [8] 聂果,王广成,张忠明,等. 多杀菌素高效液相色谱分析[J]. 农药科学与管理, 2003 24(8): 6-8
- [9] 侯学文. 悬浮玫瑰茄细胞的生长及泛醌合成的代谢调控[D]. 广州: 华南理工大学食品与生物工程学院, 1998
- [10] 马雷. 应用 MATLAB 软件构建谷氨酸温度敏感突变株补料分批发酵动力学模型[J]. 天津科技大学学报, 2004 19(1): 36-38
- [11] 王岁楼,李志. 微生物动力学模式及在工业发酵中的应用[J]. 工业微生物, 1995 25(1): 30-40
- [12] 熊晓辉,张李李,韦策. 固体发酵生产 Monacolin K 的动力学模型[J]. 工业微生物, 2003 33(4): 27-31
- [13] 苏建亚,沈晋良. 多杀菌素的生物合成[J]. 中国生物工程杂志, 2003 23(5): 55-73

【责任编辑 李晓丹】