

真菌 *Simplicillium lanosoniveum* 胞外多糖合成条件的 优化及其动力学分析

邢向英, 陈敬宇, 董庆霖*, 管瑞静, 闫双印
(河北工业大学化工学院, 天津 300130)

摘要: *Simplicillium lanosoniveum* (DT06) 是一种能够合成特殊胞外多糖的半知菌类真菌。本文以真菌 DT06 为研究材料, 采用 BBD 设计原则的响应面法优化其胞外多糖的合成工艺条件, 并对其发酵动力学参数进行分析。在单因素实验的基础上, 以胞外多糖得率为响应值, 确定多糖合成的最优条件: 初始 pH4.87, 葡萄糖 40.65 g/L, 蛋白胨 10.38 g/L, 温度 30 °C, 转速 140 r/min。优化后真菌 DT06 胞外多糖得率可达 0.139 g/g, 比优化前提高了 32%。在此优化条件下, 对 DT06 的发酵过程进行动力学分析, 结果表明: DT06 最大比生长速率 $\mu_{\max} = 0.156 \text{ h}^{-1}$, 其多糖合成与菌体生长部分偶联。与其它产多糖的真菌相比, DT06 合成多糖的最大比合成速率较高达到 0.066 h^{-1} , 但总的多糖得率却较低。碳平衡计算发现 DT06 还产生一种未知的中性含碳产物, 其碳得率为 0.129 g/g。上述实验为 DT06 多糖发酵过程的调控及其胞内代谢网络的优化提供了依据。

关键词: 胞外多糖, 真菌, 响应面法, 发酵动力学, 碳平衡

Optimization and kinetics analyses of exopolysaccharide production by *Simplicillium lanosoniveum*

XING Xiang-ying, CHEN Jing-yu, DONG Qing-lin*, GUAN Rui-jing, YAN Shuang-yin

(School of Chemical Engineering and Technology, Hebei University of Technology, Tianjin 300130, China)

Abstract: The optimum synthesis conditions and fermentation kinetic parameters of *Simplicillium lanosoniveum* DT06 which was a Deuteromycetes fungus being capable of producing unique exopolysaccharide (EPS) was researched. Based on single factor experiment, the optimum culture conditions for EPS yield coefficient were determined applying Box-Behnken design (BBD). Under the optimized conditions (40.65 g/L glucose, 10.38 g/L peptone, pH4.87, temperature 30 °C and rotation speed 140 r/min), the highest EPS yield coefficient 0.139 g/g was obtained, which increased 32% compared with that before optimization. Kinetics analyses indicate that the maximum specific growth rate (μ_{\max}) of DT06 was 0.156 h^{-1} , while its EPS synthesis was semi-growth-associated with a maximum specific production rate 0.066 h^{-1} , which was relative higher than those of other EPS-producing Fungi. Nevertheless its average EPS yield coefficient was relative low. Carbon-balance analysis revealed that apart from EPS DT06 also produced a unknown products with a carbon yield coefficient of 0.129 g/g. These results provided essential parameters for controlling DT06's fermentation process and improving its metabolic network.

Key words: exopolysaccharide; fungus; RSM; fermentation Kinetic; carbon-balance

中图分类号: TS201.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2016)18-0185-07

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2016.18.027

真菌胞外多糖是由一种或多种单糖连接而成的直链或支链型高分子聚合物。其多糖具有特殊的性能, 如乳化性, 絮凝性^[1], 抗氧化性和抗热/机械稳定性等, 因而在食品添加剂——增稠剂、抗氧化剂、药物载体, 石油助剂方面得到广泛的应用。

近 20 年来已发现的产胞外多糖的真菌主要来自半知菌纲, 小核菌属、短梗霉属、*Aspergillus* 属和 *Acremonium* 属, 如 *Sclerotium rolfsii*^[2]、*Aureobasidium pullulans*^[3]、*Penicillium citrinum*、*Aspergillus terreus*^[4]、*Aspergillus* sp. Y16^[5]、*Acremonium diospyri*^[6] 等。然而,

收稿日期: 2016-03-04

作者简介: 邢向英 (1965-), 女, 硕士, 副教授, 研究方向: 天然产物与合成, E-mail: xyxing@hebut.edu.cn。

* 通讯作者: 董庆霖 (1964-), 男, 教授, 研究方向: 天然代谢产物与代谢工程, E-mail: qldong@hebut.edu.cn。

半知菌纲 *Simplicillium* 属的真菌尚未发现能够产生胞外多糖,关于该属报道的主要是生物防治^[7]及次级产物如苦参碱的合成^[8]。目前,真菌胞外多糖的研究内容主要集中在影响多糖合成条件的研究与优化,如 NH_4^+ 限制是普兰多糖开始合成的信号^[3]、pH 可能影响了细胞的形态,而并不影响多糖的加工合成、合成后期高转速及溶氧会降低多糖的产量、添加有机物薏米可以提高多糖的产量^[9],及多糖分子结构表征^[2,4]研究方面,而关于真菌多糖动力学和计量学方面的研究相对较少。在前期的研究中,我们从蓝藻培养液中分离出了一株 *Simplicillium* 属的共生真菌 DT06 (*Simplicillium lanosoniveum* var. *tianjiniensis* Q.L. Dong)^[10]。进一步的实验发现 DT06 在合成抑菌性物质的过程中同时产生大量的胞外多糖,并且这种多糖结构特殊且有较强的抗氧化性^[11],因而在食品添加剂、食品保健方面具有潜在的应用价值。因此,本实验主要是对该多糖的合成条件进行优化并进一步研究其合成的动力学特性。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

菌种 共生真菌 DT06,中国科学院微生物研究所菌物标本馆保藏,保藏编号为:HMAS 242045;实验所用试剂 均为分析纯;沙氏培养基 葡萄糖 40 g、蛋白胨 10 g、蒸馏水 1000 mL;查氏培养基 葡萄糖 40 g、硝酸钠 1.5 g、磷酸氢二钾 1.0 g、氯化钾 0.5 g、硫酸镁 0.5 g、硫酸亚铁 0.01 g、蒸馏水 1000 mL;PDA 培养基 土豆 200 g、葡萄糖 20 g、蒸馏水 1000 mL。

HZQ-QG 卧式空气恒温振荡器 北京东联哈尔滨仪器制造有限公司;LG16-B 高速冷冻离心机 北京雷勃尔离心机有限公司;Model 868 pH 计 上海 Thermo;722N 可见分光光度计 上海菁华科技仪器有限公司;FD-1 冷冻干燥机 北京博医康技术有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 培养方法 从斜面上刮取孢子,转入 20 mL 无菌水中,振荡分散孢子,接种 0.1% 的孢子悬液于装有 50 mL 沙氏培养基的 250 mL 摇瓶中,在 25 °C, 120 r/min 的摇床中培养 36 h 得到种子液。接种 0.5% 的种子液到 100 mL 发酵培养基摇瓶(250 mL)中,于 25 °C, 120 r/min 的摇床中培养。

1.2.2 测定方法

1.2.2.1 生物量的测定 将发酵液于 7000 r/min,离心 10 min,得到沉淀的细胞,后用无菌水洗涤两次,置于电热恒温鼓风干燥箱中 105 °C 烘干 12 h 称重。

1.2.2.2 多糖和残糖测定 多糖按文献^[11]方法测定,还原糖用 DNS 法测定^[12]。

1.2.3 培养基筛选方法 分别研究 DT06 在 3 种培养基,沙氏培养基、查氏培养基、土豆培养基中的产糖情况,综合分析确定出最适产糖基本培养基。

1.2.4 单因素实验设计 在最佳产糖培养基的条件下,分别改变碳氮浓度、pH、温度和转速,来研究其对多糖得率的影响。

1.2.4.1 不同转速对多糖得率的影响 转速分别为:80、100、120、140、160 r/min。其它条件为:温度 25 °C, pH6.0,最佳培养基碳氮源浓度。

1.2.4.2 不同初始 pH 对多糖得率的影响 初始 pH 分别为:4.0、5.0、6.0、7.0、8.0。其它条件为:温度 25 °C,转速 120 r/min,最佳培养基碳氮源浓度。

1.2.4.3 不同发酵温度对多糖得率的影响 发酵温度分别为:20、25、30、35、40 °C。其它条件为:pH6.0、转速 120 r/min,最佳培养基碳氮源浓度。

1.2.4.4 不同碳氮源浓度对多糖得率的影响 将筛选的最佳产糖培养基碳氮源以其原始浓度为基点,分别设置 5 个等梯度浓度。其它条件为:温度 25 °C, pH6.0,转速 120 r/min。

1.2.5 BBD 实验设计 以产糖量最高的培养基为基础培养基进行单因素实验,初步确定主要因素对多糖得率的影响值范围,在单因素的实验结果基础上,根据 BBD 设计方法来设计表面响应方案,通过响应面分析得到多糖合成条件的最佳组合。每个因素分别以 -1, 0, 1 代表三水平进行编码,因数水平见表 1。该模型通过最小二乘法拟合二次多项式方程表达为:

$$Y_{\text{eps}}(\text{g/g}) = A_0 + \sum A_i X_i + \sum A_{ii} X_i^2 + \sum A_{ij} X_i X_j$$

式中, Y_{eps} 代表响应结果多糖得率, A_0 率为常数项, A_i 为线性系数, A_{ii} 为二次线性系数, A_{ij} 为交互项系数, X_i 、 X_j 为各自变量编码值。

表 1 实验因子及编码水平

Table 1 Factors and levels of experiment

变量	因素	编码水平		
		-1	0	1
A	pH	4.5	5.0	5.5
B	葡萄糖(g/L)	30	40	50
C	蛋白胨(g/L)	8	10	12

1.2.6 动力学模型建立 以非结构模型中的 Monod 方程式(1)为基础方程建立生长动力学模型,产物合成类型主要分为三种,需先通过数据分析来确定产物的合成类型,而后建立合成动力学模型。

$$\mu = \frac{\mu_{\text{max}} C_s}{K_s + C_s} \quad \text{式(1)}$$

其中, μ_{max} 为最大比生长速率, C_s 为细胞浓度, K_s 为底物饱和和常数。

1.2.7 动力学数据采集与处理 分别采集不同时间点的菌体量、多糖量、残液体积、残糖浓度及 pH。后根据公式(2~4)计算得到 μ 、 q_p 、 q_s 。每个点三组重复。所有数据均采用最小二乘法(Origin 8.0 软件)进行处理。

$$\mu = \frac{1}{X} \gamma_x = \frac{1}{c_x} \frac{dc_x}{dt} \quad \text{式(2)}$$

$$q_p = \frac{1}{X} \gamma_p = \frac{1}{c_x} \frac{dc_p}{dt} \quad \text{式(3)}$$

$$q_s = \frac{1}{X} \gamma_s = \frac{1}{c_x} \frac{dc_s}{dt} \quad \text{式(4)}$$

其中, μ 、 q_p 、 q_s 分别为比生长、产物比合成、底物比消耗速率(h^{-1}), r_x 、 r_p 、 r_s 分别为细胞生长、产物合

成速率(g/L·h)、产物消耗。

2 结果与讨论

2.1 培养基的筛选

实验数据表明(图1)DT06在沙氏培养基上多糖的浓度随着时间的变化迅速上升,发酵结束(148 h)时,多糖得率为0.106 g/g,而相同条件下DT06在查氏培养、土豆培养基上的得率较低,分别为0.022、0.047 g/g。因此,沙氏培养基为DT06合成胞外多糖的最佳培养基。

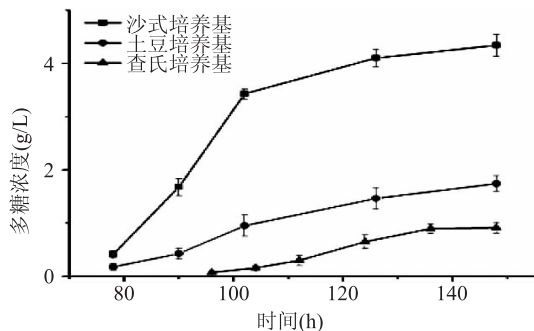


图1 多糖在不同培养基中的浓度曲线

Fig.1 EPS synthesis curve in different medium

2.2 单因素实验

2.2.1 不同转速对多糖得率的影响 由图2可以看出:随着转速的增加多糖得率呈平缓的上升后下降的趋势,当140 r/min时,多糖得率最大为0.116 g/g。出现该趋势的原因可能是:a.适当的增加转速刺激了细胞分泌多糖,当转速过大,导致细胞形态受损,多糖得率降低。b.该多糖合成为耗氧活动,适当的增加转速提高了溶氧量,多糖得率提高。因此选多糖合成的最佳培养转速为140 r/min。

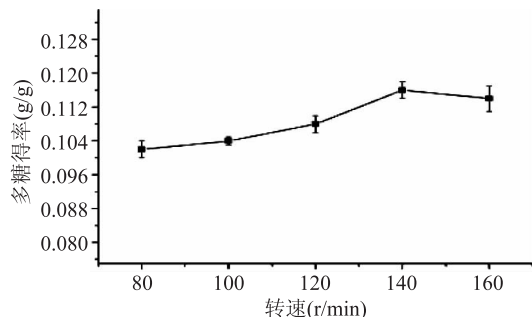


图2 转速对多糖得率的影响

Fig.2 Effect of rotational speed on EPS yield

2.2.2 不同初始 pH 对多糖得率的影响 由图3可知,pH从4.0~5.0多糖得率呈急剧上升趋势,5.0到8.0急剧下降。真菌DT06合成多糖的适宜pH偏弱酸性,在4.5~5.5之间且pH为5.0时多糖得率最大为0.124 g/g。而已报道的真菌合成多糖的适宜pH多数在2.5~4.5之间^[13-14],因此,真菌DT06的最适产糖pH比大部分真菌高。因此,选多糖合成的最佳pH是5.0。

2.2.3 不同发酵温度对多糖得率的影响 由图4可知,发酵多糖得率随着温度呈现先增加后降低的趋势,但总体变化趋势不明显。该多糖的最佳合成温度并非菌体最适生长温度25℃,而是30℃,说明参

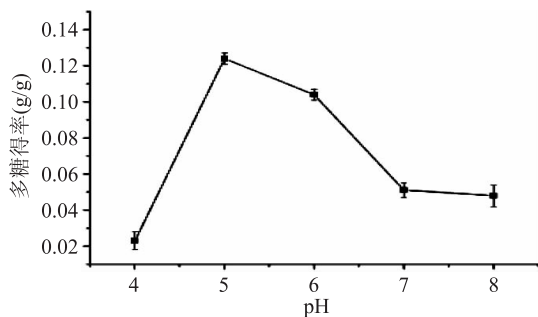


图3 pH对多糖得率的影响

Fig.3 Effect of initial pH on EPS yield

与合成多糖的各种酶的最适温度较菌体生长温度要高。而当外界温度超过30℃,该类酶的活性降低,从而导致代谢受阻,多糖得率降低。因此,选多糖合成的最佳温度为30℃。

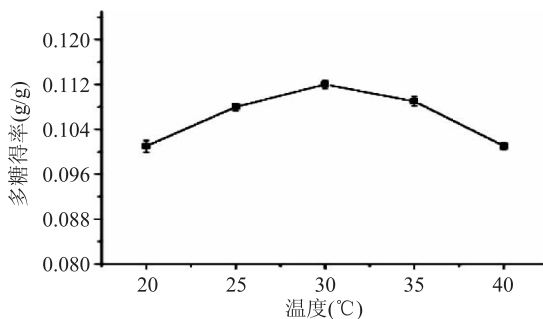


图4 温度对多糖得率的影响

Fig.4 Effect of temperature on EPS yield

2.2.4 不同葡萄糖浓度对多糖得率的影响 由图5可知,葡萄糖在低浓度范围内时对多糖得率影响很大,多糖得率呈直线上升趋势,在40 g/L时达到最大0.104 g/g。因此,选多糖合成的最佳葡萄糖浓度为40 g/L。

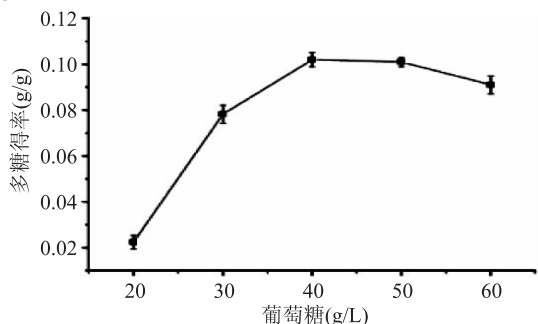


图5 葡萄糖浓度对多糖得率的影响

Fig.5 Effect of glucose concentration on EPS yield

2.2.5 不同蛋白胨浓度对多糖得率的影响 由图6可知,多糖得率随着蛋白胨浓度的增加呈现明显的变化趋势,10 g/L时多糖得率达到最大0.105 g/g。而当氮源浓度超过10 g/L时,多糖得率呈缓慢降低的趋势。因此该多糖合成的最佳蛋白胨浓度为10 g/L。

综合可知:由图2~图6可以看出:不同发酵温度和转速对多糖得率影响不明显,而初始pH和碳源、氮源浓度对多糖得率较为显著。因此,对初始pH和碳源、氮源浓度进行响应面优化实验。

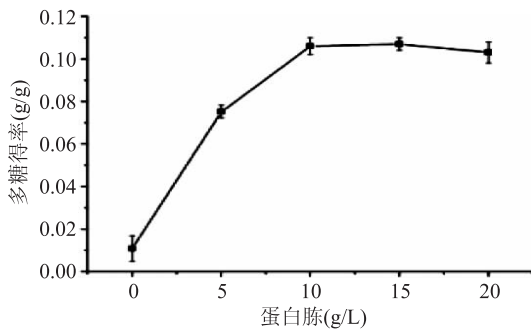


图6 蛋白胨浓度对多糖得率的影响

Fig.6 Effect of peptone concentration on EPS yield

2.3 响应面法优化分析

在单因素实验的基础上,以 pH、葡萄糖、蛋白胨为优化三因素(A, B, C), -1、0、1 为三水平,多糖得率($Y_{\text{eps/s}}$)为响应值设置实验,每组 3 个重复。根据 BBD 设计原则设计响应实验方案,实验因子编码及水平见表 1。表 2 为不同实验条件下的真菌 DT06 多糖得率,通过对表 2 实验结果进行响应面分析,得到多糖得率的二次回归模型为:

$$Y = -6.0404 + 1.8114A + 0.0237B + 0.2476C - 0.00895AC - 0.0001BC - 0.1763A^2 - 0.0003B^2 - 0.0096C^2$$

表2 BBD 实验设计的单因素实验结果

Table 2 Box-Behnken design matrix with EPS yield

实验号	A	B	C	响应值 $Y_{\text{eps/s}}$ (g/g)
1	-1	0	-1	0.049
2	1	0	-1	0.034
3	-1	0	0	0.091
4	1	1	1	0.039
5	-1	-1	1	0.086
6	1	-1	1	0.038
7	-1	1	0	0.091
8	1	1	0	0.042
9	0	-1	-1	0.049
10	0	-1	1	0.079
11	0	1	-1	0.064
12	0	1	1	0.087
13	0	0	0	0.135
14	0	0	0	0.137
15	0	0	0	0.139
16	0	0	0	0.137
17	0	0	0	0.133

回归方程的方差分析结果见表 3。方差分析表明:模型 p 值 < 0.01 , 表现为显著,且失拟项 p 不显著,说明模型有效。其中 A、B、C、AC、 A^2 、 B^2 、 C^2 均为显著影响因素,AB、BC 交互作用不显著,AC 交互显著。结果显示各自变量的最优组合是:初始 pH4.87,葡萄糖 40.65 g/L,蛋白胨 10.38 g/L,预测得率为 0.141 g/g。图 7 为交互因素的响应曲面图。经优化验证,实测平均得率为 0.139 g/g,平均相对误差为 1.

4% 在允许误差范围内,表明该模型模拟程度较好,实验方案合理。总体比较,优化后比优化前多糖得率提高了 32%。

表3 BBD 实验方差分析

Table 3 The analysis of ANOVA of BBD

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	p 值
模型	0.025	8	0.0031	142.73	< 0.0001
A	0.0034	1	0.0034	155.21	< 0.0001
B	0.0012	1	0.0013	5.86	0.0481
C	0.0001	1	0.0001	57.91	< 0.0001
AC	0.0003	1	0.0003	14.75	0.0049
AB	0.000001	1	0.000001	0.49	0.8309
BC	0.00001	1	0.000001	0.68	0.4326
A^2	0.0082	1	0.0082	376.72	< 0.0001
B^2	0.0063	1	0.0063	288.19	< 0.0001
C^2	0.0033	1	0.0032	150.92	< 0.0001
残差	0.0002	8	0.00002		
净误差	0.00003	4	0.00003		
失拟项	0.0001	4	0.000001	4.24	0.0955
相关系数				0.9930	
调整系数				0.9861	
预测系数				0.9406	
噪音比				31.483	

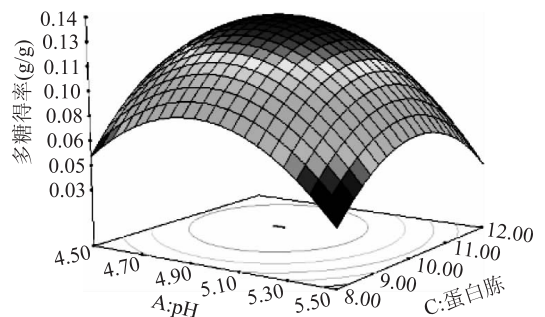


图7 蛋白胨浓度和 pH 对多糖得率影响的响应面图

Fig.7 Response surface of peptone concentration and pH on EPS yield

2.4 动力学分析

在最优发酵条件下(初始 pH4.87,葡萄糖 40.65 g/L,蛋白胨 10.38 g/L,转速 140 r/min,30 °C)对 DT06 的发酵过程进行动力学分析。在 146 h 发酵结束时,发酵液 pH 呈现逐渐上升的趋势,最后稳定在 6.1 左右。生物量浓度、底物浓度见表 4。

2.4.1 细胞生长动力学 据表 4 数据,对式(1)进行非线性模拟,得到 $\mu_{\text{max}} = 0.156 \text{ h}^{-1}$, $K_s = 5.18 \text{ g/L}$,拟合度 R^2 为 0.914。

$$\mu = \frac{0.156C_s}{5.18 + C_s} \quad \text{式(5)}$$

如图 8 所示,实验验证值与模拟值平均相对误差为 8.98%,趋势吻合较好,式(2)可以用来模拟求解真菌 DT06 的动力学参数。真菌 DT06 的最大比生长速率较已报道(表 5)的偏高,其主要原因可能是:第一,DT06 本身代谢的特殊性;第二,发酵条件的不同。

表4 底物、生物量浓度及比速率随时间变化的数据表

Table 4 Experiment data of substrate, biomass concentration and specific growth rate

序号	时间间隔 (h)	残糖平均浓度 (g/L)	菌体浓度 (g/L)	菌体浓度变化量 (g/L) × 10	菌体平均浓度 (g/L) × 103	菌体生长速率 (g/L·h)	菌体比生长速率 (h ⁻¹)
1	8	39.83	0.038~0.041	0.03	0.04	0.41	0.010 ± 0.005
2	8	39.57	0.038~0.052	0.11	0.046	1.33	0.025 ± 0.002
3	8	38.91	0.052~0.079	0.27	0.065	3.37	0.048 ± 0.003
4	6	37.21	0.079~0.159	0.81	0.1192	13.42	0.086 ± 0.004
5	6	31.87	0.159~0.395	2.36	0.2771	39.33	0.142 ± 0.005
6	6	23.22	0.395~0.946	5.51	0.6703	91.83	0.137 ± 0.004
7	6	13.87	0.946~2.066	11.20	1.5061	186.77	0.124 ± 0.005
8	8	5.53	2.066~4.351	22.85	3.2087	285.63	0.089 ± 0.002
9	8	3.22	4.351~7.602	32.51	5.9765	406.37	0.068 ± 0.006
10	8	1.21	7.602~8.600	9.98	8.101	124.75	0.015 ± 0.006
11	8	1.01	8.600~8.810	2.11	8.704	26.25	0.003 ± 0.001

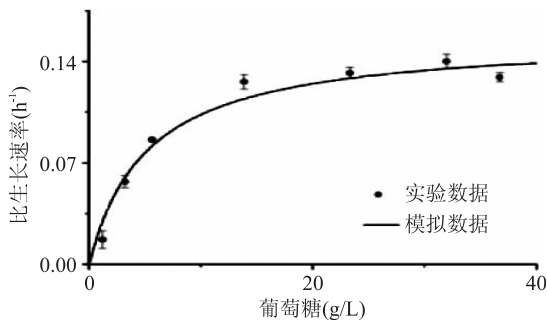


图8 实验验证数据与方程模拟值

Fig.8 Experimental value of specific growth rate versus substrate and model fit

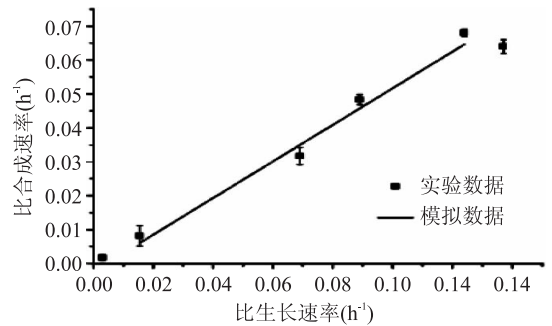


图10 实验值与方程模拟值

Fig.10 Experimental value of specific growth rate versus specific production rate and model fit

2.4.2 多糖合成动力学 发酵过程的比速率变化曲线(图9)表明:细胞生长的比速率(图10)与多糖合成的比速率(葡萄糖)的变化不同步。当比生长速率上升并达到 0.142 h⁻¹时,多糖比合成速率为 0,而当比生长速率下降至 0.12 h⁻¹左右时,多糖合成才开始,并在 83 h 达到最大值 0.066 h⁻¹。因此 DT06 的多糖合成与细胞生长为半偶联(部分偶联),可采用 Luedeking-piret 方程(6)来模拟多糖合成与细胞生长的关系:

$$r_p = \alpha \gamma_x + \beta c_x \quad \text{式(6)}$$

其中, α 和 β 分别表示多糖合成与细胞生长偶联的产物系数,和与细胞浓度相关的产物生成系数。

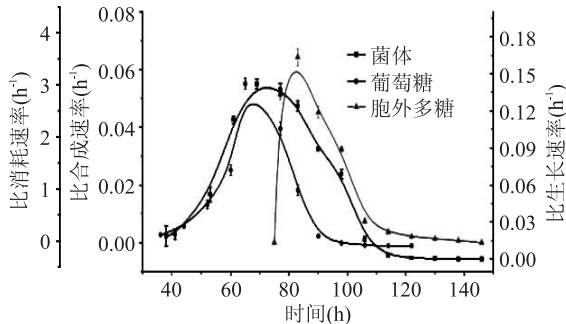


图9 发酵过程中比速率的时间变化曲线

Fig.9 The course of specific rates in the batch fermentation

由(1)式与(6)式结合,得到一定范围内,比合成速率与底物浓度的关系方程(7)如下:

$$q_p = \alpha \frac{\mu_{max} c_s}{K_s + c_s} + \beta \quad \text{式(7)}$$

据此对多糖合成速率与菌体生长速率进行拟合,得到 $\alpha = 0.539, \beta = 0.002, R^2 = 0.990$ (图10),且实验验证值与模拟值(图11)平均相对误差为 6.57%。则式(7)变为:

$$q_p = 0.539 \frac{0.156c_s}{5.18 + c_s} + 0.002 \quad \text{式(8)}$$

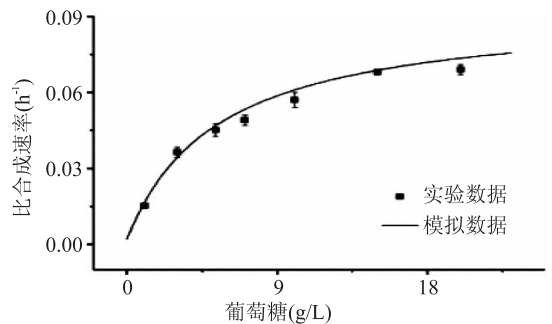


图11 实验值与方程模拟值

Fig.11 Experimental value of specific production rate versus substrate and model fit

DT06 合成胞外多糖的途径目前尚不清楚,但其动力学特性与合成途径较为复杂的柠檬酸、赖氨酸

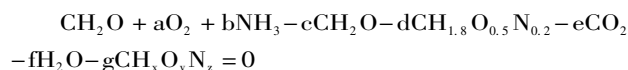
表5 部分产糖真菌动力学参数
Table 5 Kinetic parameters of fungus

菌种名称	比生长速率(h^{-1})	多糖得率($g \cdot g^{-1}$)	比合成速率(h^{-1})	作者
<i>Aureo.pullulans</i> 2552	0.046	0.590	0.076	Klimek ^[16]
<i>Morchella Esculenta</i>	0.069	0.467	0.018	吴秋立 ^[17]
<i>Aureo.pullulans</i> (ATTC9348)	0.110	0.343	0.023	Gibbs ^[18]
<i>Aureo.basidium</i>	0.042	0.600	0.057	Mohammad ^[19]
<i>Aureo.pullulans</i> N3.3837	0.042	0.467	0.021	康建雄 ^[20]
<i>Aureobasidium</i> spp 16	-	0.56	0.0465	Ma Z C ^[21]
<i>Ganoderma lucidum</i>	0.074	0.121	0.004	张建国 ^[22]

注:部分数据经文献原始数据推算得到。

酸^[15]相似。这可能由于与一般的葡聚糖如普兰多糖不同,DT06合成的胞外多糖为杂多糖主要由半乳糖和葡萄糖连接而成^[10-11],因此,合成途径相对复杂。

2.4.3 反应计量学平衡计算 由于真菌 DT06 的最大比生长速率($0.156 h^{-1}$)和最大比合成速率($0.066 h^{-1}$)都高于其它产多糖真菌(表5),但其多糖得率($0.14 g/g$)却明显低于其他真菌。推测其原因可能是 DT06 发酵过程中还产生了其它的胞外产物。为此又进行了碳平衡验证,其次级产物微量可忽略, CO_2 的得率参考酵母^[23]的最大值 $0.409 C-mole/C-mole$,维持消耗 m_c 与比消耗速率 q_s 参考 Van Aalst-van Leeuwen 报道的数据^[24]。



底物葡萄糖 P 简式 CH_2O ; 细胞 X 组成式 $CH_{1.8}O_{0.5}N_{0.2}$; 产物多糖 P 分子简式 CH_2O ; 未知含碳产物 y 分子简式 $CH_xO_yN_z$ 。

整个反应过程中的碳平衡方程如下:

$$m_{sc} - m_{pc} - m_{xc} - y_{co_2/s} \cdot m_{sc} - m_{yc} = 0 \quad \text{式(9)}$$

$$Y_{yc/sc} (\text{未知产物中碳得率}) = \frac{m_{yc}}{m_{sc}} \quad \text{式(10)}$$

$$Y_{c/s} (\text{维持消耗中碳分率}) = \frac{m_c}{q_s} \quad \text{式(11)}$$

其中, m_{sc} 表示物质 x 中含碳总量。由上式(9)、(10)计算得出未知含碳产物碳得率 $Y_{yc/sc}$ 为 $0.174 g/g$, 该值要比胞外多糖碳得率 $0.14 g/g$ 稍高。若考虑 DT06 的维持消耗,扣除最大维持消耗碳分率 $Y_{c/s}$ $0.045 g/g$,知产物的碳得率仍可达 $0.129 g/g$ 。因此,可推断虽胞外多糖最大比合成速率较高,但由于其他含碳产物的分流,流向胞外多糖的碳流量下降,最终导致了胞外多糖得率较低。这分析结果为代谢网络的优化研究提供了的依据。

3 结论

3.1 *Simplicillium lanosoniveum* DT06 最佳发酵条件为:发酵液初始 pH4.87,葡萄糖 $40.65 g/L$,蛋白胨 $10.38 g/L$ 。模型预测值为 $0.141 g/g$ 经实验验证,最大平均得率为 $0.139 g/g$,比优化前胞外多糖提高了 32%,该模型能够准确模拟多糖的合成量。

3.2 DT06 的多糖合成与细胞生长部分偶联,最大比生长速率和最大产物比合成速率分别为 $0.156, 0.066 h^{-1}$ 及 $K_s = 5.18 g/L$ 。

3.3 在发酵过程中产生一种未知的含碳产物,碳得率为 $0.129 g/g$,因而导致碳代谢通量的分流和多糖得率的下降。

参考文献

- [1]何建玲,杨双双,黄金田,等.响应面分析优化假单胞菌产絮凝剂的培养条件[J].食品工业科技,2015,36(16):183-192.
- [2]Farina J I, Vinarta S C, Cattaneo M, et al. Structural stability of *Sclerotium rolfsii* ATCC 201126 beta-glucan with fermentation time: a chemical, infrared spectroscopic and enzymatic approach [J]. Journal of Applied Microbiology, 2009, 106(1): 221-232.
- [3]Bulmer M A, Catley B J, Kelly P J. The effect of ammonium ions and pH on the elaboration of the fungal extracellular polysaccharide, pullulan, by *Aureobasidium pullulans* [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1987, 25(4): 362-365.
- [4]Wang C Y, Mao W J, Chen Z Q, et al. Purification, structural characterization and antioxidant property of an extracellular polysaccharide from *Aspergillus terreus* [J]. Process Biochemistry, 2013, 48(9): 1395-1401.
- [5]Chen Y, Mao W J, Tao H W, et al. Structural characterization and antioxidant properties of an exopolysaccharide produced by the mangrove endophytic fungus *Aspergillus* sp Y16 [J]. Bioresource Technology, 2011, 102(17): 8179-8184.
- [6]Stasinopoulos S J, Seviour R J. Exopolysaccharide production by *Acremonium persicinum* in stirred-tank and air-lift fermentors [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1992, 36(4): 465-468.
- [7]Ward N A, Robertaon C L, Chanda A K. Effects of *Simplicillium lanosoniveum* on *Phakopsora pachyrhizi*, the Soybean Rust Pathogen, and Its Use as a Biological Control Agent [J]. Phytopathology, 2012, 120(8): 749-760.
- [8]余永涛,何生虎,赵清梅.宁夏苦豆子中产苦参碱内生真菌的分离与鉴定[J].中国农业科学,2013,46(13):2643-2654.
- [9]Zhou H B, Bi P Y, Wu X G. Improved Polysaccharide Production in Submerged Culture of *Ganoderma lucidum* by the Addition of Coixenolide [J]. Applied Biochemical and Biotechnology, 2014, 172: 1497-1505.
- [10]董庆霖,陈博,邢向英,等.一株蓝藻内生真菌的鉴定及其产物抑菌活性[J].化工学报,2011,62(6):1655-1661.
- [11]Dong Q L, Lin T Y, Xing X Y. Identification of a symbiotic

fungus from blue-green alga and its extracellular polysaccharide [J]. Letters in Applied Microbiology, 2014, 58(4): 303-310.

[12] Miller G L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar [J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 1959, 31(3): 426-428.

[13] Desmond P F A, Robert J S. Influence of varying nitrogen sources on polysaccharide production by *Aureobasidium pullulans* in batch culture [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1990, 32(6): 637-644.

[14] Dzasimis S, Dana H, Jaromir K, et al. *Cryptococcus laurentii* Extracellular Biopolymer Production for Application in Wound Management [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2014, 174(4): 1344-1353.

[15] Lee H W, Pan J G, Lebeault J M. Characterisation of kinetic parameters and metabolic transition of *Corynebacterium glutamicum* on l-lysine production in continuous culture [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1995, 43(6): 1019-1027.

[16] Klimek J, Ollis D F. Extracellular microbial polysaccharides: Kinetics of *Pseudomonas* sp., *Azotobacter vinelandii*, and *Aureobasidium pullulans* batch fermentations [J]. Biotechnology and Bioengineering, 1980, 22(11): 2321-2342.

[17] 武秋立, 安家彦. 羊肚菌胞外多糖发酵动力学模型 [J]. 南开大学学报, 2005, 38(1): 43-48.

(上接第 164 页)

10: 213-217.

[4] Alessio A, Andrea M, Clara M, et al. Identification of Xenoestrogens in Food Additives by an Integrated *in Silico* and *in Vitro* Approach [J]. Chem Res Toxicol, 2009, 22: 52-63.

[5] Reddan JR, Giblin FJ, Sevilla M, et al. Propyl gallate is a superoxide dismutase mimic and protects cultured lens epithelial cells from H₂O₂ insult [J]. Exp Eye Res, 2003, 76(1): 49-59.

[6] McDonald-Gibson WJ, Saeed SA, Schneider C. The Local Antinociceptive and Topical Anti-inflammatory Effects of Propyl Gallate in Rodents [J]. Br J Pharmacol, 1976, 58(4): 573-581.

[7] Han YH, Park WH. Propyl gallate inhibits the growth of HeLa cells via regulating intracellular GSH level [J]. Food Chem Toxicol, 2009, 47(10): 2531-2538.

[8] Han YH, Moon HJ, You BR, et al. Propyl gallate inhibits the growth of HeLa cells via caspase-dependent apoptosis as well as a G1 phase arrest of the cell cycle [J]. Oncol Rep, 2010, 23(4): 1153-1158.

[9] Chen CH, Lin WC, Kuo CN, et al. Role of redox signaling regulation in propyl gallate-induced apoptosis of human leukemia cells [J]. Food Chem Toxicol, 2011, 49(2): 494-501.

[10] Zhu GF, Wang Y, Xi L, et al. Spectroscopy and molecular docking studies on the binding of propyl gallate to human serum albumin [J]. Journal of Luminescence, 2015, 159: 188-196.

[11] Dolatabadi JEN. Spectroscopic and molecular modeling studies of human serum albumin interaction with propyl gallate [J]. Rsc Advances, 2014, 4(110): 64559-64564.

[12] Kumar RS, Bergh HVD, Wagnières G. Probing the interaction

[18] Gibbs P A, Seviour R J. Does the agitation rate and/or oxygen saturation influence exopolysaccharide production by *Aureobasidium pullulans* in batch culture? [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1996, 46: 503-510.

[19] Mohammad F H A, Badr E M, Tayeb M E. Polysaccharide production by *Aureobasidium Pullulans* III. The influence of initial sucrose concentration on batch kinetics [J]. Biomass and Bioenergy, 1995, 8(2): 121-129.

[20] 康健雄, 孟少魁, 吴磊. 生物絮凝剂普鲁兰的发酵动力学模型研究 [J]. 哈尔滨工业大学学报, 2005, 37(10): 1370-1372.

[21] Ma Z C, Fu W J, Liu G L, et al. High-level pullulan production by *Aureobasidium pullulans* var. *melanogenium* P16 isolated from mangrove system [J]. Applied Microbiology and Biotechnolog, 2014, 98: 4865-4873.

[22] 张建国, 陈晓明, 贺新生. 灵芝胞外多糖分批发酵动力学模型 [J]. 生物工程学报, 2007, 23(6): 1065-1070.

[23] Nielsen J, Villadsen J, Liden G. Bioreaction Engineering Principles, second edition [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2004.

[24] Van Aalstt-Van Leeuwen M A, Pot M A, Van Loosdrecht M, et al. Kinetic Modeling of Poly(β -hydroxybutyrate) Production and Consumption by *Paracoccus pantotrophus* under Dynamic Substrate Supply [J]. Biotechnology and Bioengineering, 1997, (5): 773-782.

between a surfactant-cobalt (III) complex and bovine serum albumin [J]. Solution Chem, 2012, 41(2): 294-306.

[13] Ross PD, Subramanian S. Thermodynamics of steroid binding to the human glucocorticoid receptor [J]. Biochemistry, 1981, 20: 3096-3102.

[14] Förster T, Sinanoglu O.: Modern Quantum Chemistry [M]. New York: Academic Press, 1996: 93-138.

[15] Cyril L, Earl JK, Sperry WM. Biochemists' Handbook [M]. London: E & FN Epon Press Ltd, 1961: 84-88.

[16] Sudlow G, Birkett DJ, Wade DN. The characterization of two specific drug binding sites on human serum albumin [J]. Mol Pharmacol, 1975, 12(6): 1052-1061.

[17] Wang Q, Yan J, He J, et al. Characterization of the interaction between 3-Oxotabersonine and two serum albumins by using spectroscopic techniques [J]. Journal of Luminescence, 2013, 138(6): 1-7.

[18] Yue Y, Liu J, Fan J, et al. Binding studies of phloridzin with human serum albumin and its effect on the conformation of protein [J]. Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis, 2011, 56(2): 336-342.

[19] Kratochwil NA, Huber W, Müller F, et al. Predicting plasma protein binding of drugs: a new approach [J]. Biochemical Pharmacology, 2002, 64(9): 1355-1374.

[20] Fehske KJ, Zube I, Borbe HO, et al. β -Carboline binding indicates the presence of benzodiazepine receptor subclasses in the bovine central nervous system [J]. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, 1982, 319(2): 172-177.