

知识介绍

微生物培养的振荡现象及其应用

秦华明, 尹 华

(暨南大学环境工程系, 广东 广州 510632)

摘要: 振荡现象广泛存在于生命系统中。简述了微生物培养过程中的振荡现象, 描述了其特征, 介绍了振荡行为在发酵培养、废水处理、提高工程菌的稳定性等方面的应用, 并指出了其今后的研究方向。

关键词: 振荡; 连续培养; 周期操作

中图分类号: Q939.9

文献标识码: A

文章编号: 0253-4320(2006)08-0068-03

Oscillations behavior in continuous culture of microorganisms and its application

QIN Hua-ming, YIN Hua

(Department of Environmental Engineering, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract: The oscillation behavior widely exists in life systems. This paper briefly described the oscillations behavior in continuous culture of microorganisms, and its features. Its application in fermenting culture, wastewater treatment, and improvement of engineering bacteria's stability is introduced. The direction of future research is also pointed out.

Key words: oscillations; continuous culture; periodic operation

振荡现象广泛存在于生命系统中, 越来越多的证据表明周期性的振荡行为不仅仅局限于少数的细胞, 而是大多数生物系统的共同性质, 其周期从动物中枢神经系统的几分之一秒到植物节律的几年。Rapp^[1]的综述列举了大量实验过程中发现的周期性的生命系统的振荡现象, 包括酶催化反应、蛋白质合成、细胞膜电位及细胞运动、生长和代谢中的振荡。在微生物连续培养或流加培养过程中振荡现象也普遍存在。

1 微生物培养的振荡现象

在微生物培养过程中出现的振荡现象不仅是指生物量、底物和产物浓度、溶氧(DO)、二氧化碳浓度以及pH等细胞外宏观参数的周期性变化, 而且包括胞内酶、辅酶(NADH)、生物能(ATP)、中间代谢产物、DNA、蛋白质以及细胞大小和形态等微观生理学特性方面的变化情况, 涉及到细菌、真菌、藻类等微生物。其表现出的振荡现象大致可以分为3种类型: 自发性振荡、强制性振荡和混合菌培养振荡^[2]。

自发性振荡是指体系受到外环境干扰后自身表现出的一种周期性变化行为, 如操作参数(如稀释速率、溶氧或搅拌速度、pH、底物浓度等)发生一次性较大幅度变化时, 体系中生物量、底物、产物, 甚至胞内中间代谢物的浓度都会随之产生周期性的起伏或

涨落; 强制性振荡是指外界培养条件周期性变动引发体系参量随之振荡的现象, 如底物、反应物或产物以周期性或某一特定方式输入, 将诱导体系产生持续或衰减振荡; 混合菌培养振荡是指2种或2种以上的菌混合培养时, 由于微生物间存在捕食、竞争、互惠等种间关系而引发的振荡现象。

2 微生物培养的振荡特征

振荡的2个重要特征是振荡周期和振幅, 也是判断振荡现象是否存在的标志。振荡周期在不同的微生物之间存在显著差异, 短则几分钟, 长则数小时甚至数天。即使同一菌种其振荡周期也不尽相同。振荡周期和振幅均与操作条件和菌株来源等有密切关系。王洪礼^[3]在研究乙醇连续发酵过程中存在的振荡现象时发现, 在低糖浓度条件下振荡的周期和幅值以及振荡出现的入口浓度阈值都将随着稀释率和入口糖浓度的变化而变化。袁其朋^[4]考察了全混釜内酵母连续发酵系统中振荡区域内振荡频率随操作条件的变化, 表明稀释率 $D \leq 0.1$ L/h时, 入口糖浓度增加, 振荡频率变小周期变长; 稀释率 $D \geq 0.1$ L/h时, 入口糖浓度增加, 频率变大周期变短。Parulekar等^[5]发现在某个搅拌转速时, 振荡自动产生; 当转速增加到一定值时, 振荡就会消失。在中度稀释率附近的一个范围内, 所有研究都发现振

荡周期随稀释率的变化而显著变化:较低稀释率时,周期较长;稀释率增加时,周期变短。

3 振荡的应用

人们对振荡的印象长期以来多停留在其不利的一面,如导致系统操作不稳定、难以预测和控制等而导致生化反应的失败等,因此普遍认为反应器的操作过程应该处于稳定条件下的定态操作状态,反应器的最佳控制是防止操作参数偏离此定态值。

但生物反应系统因其自身的复杂性而存在着丰富的非线性现象,传统的定态操作并不能保证过程总处于最佳状态。反应过程中某些参数如温度、pH、溶氧、底物或产物浓度等在定态操作下也会随反应时间而不断地发生变化。随着时间的推移,人们在充分认识振荡特性的基础上也开始利用其有利的一面。对有些特殊的反应,则可以在有限振幅的振荡范围内操作以达到较高的产率。Douglas 和 Rippin 等^[6]通过研究开创了人为动态操作反应器以提高其性能的先河,他们认为在某些情况下,定态操作只是动态操作的一个特例,人为动态操作可能更有利于反应和传递过程的强化。目前利用反应器培养微生物的振荡现象而采取的人为动态操作主要涉及用强制手段使反应过程的某些操作参数如温度、进料浓度、流量等随时间发生变化以提高反应器的生产能力。

3.1 发酵培养

Kirkby 等^[7]用模型证明,通过使生物反应器的进料振荡而产生共谐,从而不仅使进料中营养物质能被充分利用,而且简化了下游的产品回收和纯化过程,使反应器更加有效,事实上他们利用细胞生长和分裂的信息开发出更加有效的反应操作方式,使反应器生产率提高 50%。

Yang 等^[8]用自发振荡方式操作生物反应器,将 2 个全混釜反应器串联使用,第 1 个反应器内产生自发振荡,在第 2 个反应器中继续维持这种振荡(相对而言可以称为强制振荡),最终使生物反应器的生产能力提高 6 倍以上。

李佐虎^[9]对固态发酵系统中的变温、变压控制做过一些有意义的探索。刘德华等^[10]用气升环流生物反应器发酵好氧耐渗酵母生产甘油时发现,采取周期性改变通气方向和热冲击的策略可以明显提高甘油的产量。他们还指出,一定情况下振荡能有效改善反应器的特性,但是不适当的振荡周期非但不能改善传质,反而降低传质系数,因此最佳振荡周

期的确定是实现这一操作的关键^[11]。杨玉敏^[12]采用 pH 振荡的方式培养植物细胞,发现可以增加生物碱的分泌量;袁其朋等^[13]研究变温操作对黑曲霉产酶过程的影响,对黑曲霉 An115,在前 24 h、33℃而后 27℃条件下培养,摇瓶与 20 L 发酵罐中酶活性达到峰值的时间均比常温 28℃操作提前了约 16 h,结果表明采用合适的变温操作方式可在不降低酶活性的情况下缩短发酵周期。

3.2 废水处理

Hornvedt^[14]证明采用强制振荡型生物过程处理,可以显著提高脱氮效率。首先,为了提高目标微生物的共生潜力,建立了一个数学模型,着重考察在一个 CSTR 反应器中硝化、反硝化、好氧异养菌的竞争。模拟结果显示,相比较恒 DO 来说,振荡操作对于硝化菌和好氧菌,比生长速率降低 16%;而反硝化细菌生长率平均上升 59%,改善了其生长状况。其结果就是提高了体系氮的去除能力。在引入振荡操作之前,总氮的去除率为 30%左右,引入振荡操作 3 个月后,氮的去除率稳定在 60%~63%,而且并不降低化学需氧量(COD)和磷的去除率。另外由于减少了氧的需求,更为节省能量。同时在中试水平上也证明了振荡对菌体细胞比生长速率的影响,得到相同的结论。因此他认为相比较在稳态条件下,由于在振荡条件下引起比生长速率的变化,从而对菌群彼此之间的竞争关系产生了影响,改变了混合培养体系中各种群的相对含量和活力,从而提高体系的处理能力。其全尺寸实验验证了计算机的模拟。

3.3 提高工程菌的稳定性

基因工程中质粒稳定性问题是影响基因工程菌实现规模生产的一个重要因素。Weber 等^[15]尝试在基因工程大肠杆菌的培养中采用周期振荡操作方式,在一定程度上提高了质粒的稳定性。

Lin 等^[16]研究了分批流加培养重组大肠杆菌生产葡萄糖苷酶时不同浓度的葡萄糖振荡流加对细胞生长和产物形成的影响。结果显示,如果没有持续的选择压力,这种葡萄糖的振荡流加操作会影响产物的稳定性和引起非重组细胞的过量生长。在诱导产物表达后,快速振荡虽然引起葡萄糖的摄入率下降,但同时也强烈抑制非重组细胞在产物表达阶段的生长。而在恒速流加或慢速振荡流加时,非重组细胞则生长良好。结果还显示,许多因素影响二氧化碳形成的比速率,在快速振荡时,具有高的二氧化碳产生速率。虽然产物的形成不受影响,但在慢速振荡时产物的稳定性明显降低。

Allison^[17]研究了稀释率的强制性振荡对含有 pBR322 质粒的工程大肠杆菌 K12 在非选择性培养基中培养的影响。结果表明,在恒定稀释率的操作方式下,经过一段时间的培养,含有质粒的细胞的比例逐渐减少,直至体系中全部为不含有质粒的菌体细胞;而稀释率周期变化的操作方式使含有质粒的菌体细胞与不含有质粒的菌体细胞同时共存较长一段时间。另外还发现每个细胞的平均质粒拷贝数和产物 β -内酰胺酶的活力在振荡条件下都有上升的趋势,并由此提出稳定性提高的 2 个可能的原因:一个原因是含质粒的细胞能更快对振荡条件下随时变化的外部环境做出反应,从而抵消了非重组细胞生长较快的优势;另一个原因可能是在变化的条件下,细胞被诱导产生较高的拷贝数,而拷贝数的提高降低了随机分配导致的质粒丢失的可能性。此外还发现,不同的振荡方式也影响培养物的稳定性,不规则的振荡操作更能提高质粒的稳定性。菌体对振荡所引起的即时变化的外部条件的适应会降低它的有利作用。并建立了一个非结构化的模型描述了上述现象,且模型预测与实验数据非常吻合。

袁其朋等^[18]研究对比了定态与周期操作对基因工程酒精酵母质粒稳定性的影响,发现周期操作有利于增强质粒的稳定性。此外有实验^[19]表明,自发式振荡则提高了丙酮丁酸梭状芽孢杆菌中产溶剂基因和嗜热脂肪芽孢杆菌基因工程菌中耐高温 α -淀粉酶质粒的稳定性。

4 存在的问题与展望

微生物过程中存在明显的振荡等非线性现象,目前对其研究得还比较少,仅有的一些结果大多集中于数学模型的理论分析,而且研究主要集中在自发振荡上。因此如何对这些复杂的非线性现象加以研究,以便在实际生产中选择合理的操作条件,对于微生物过程的机理研究和工业应用,以及更深层次阐明微生物生长代谢过程中的非线性本质以及生命现象的多样性,都有重要的意义。

参考文献

[1] Rapp P E. An atlas of cellular oscillators[J]. J Exp Biol, 1979, 81:

281 - 306.

- [2] 修志龙,曾安平.微生物细胞连续培养过程中振荡和混沌行为的研究进展[J].生物工程进展,1999,19(6):58-63.
- [3] 王洪礼,高卫楼,袁其朋,等.CSTR 中生化反应振荡行为研究[J].化学反应工程与工艺,1997,13(3):270-275.
- [4] 袁其朋,胡宗定.全混釜内酵母培养系统稳定性的数学分析[J].北京化工大学学报,2000,27(2):5-9.
- [5] Parulekar S J, Semones G B, Rolf M J, et al. Induction and elimination of oscillations in continuous culture of *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Biotech Bioeng, 1986, 28: 700 - 710.
- [6] Douglas J M, Rippin D W T. Unsteady state process operation [J]. Chem Engin Sci, 1966, 21: 305 - 315.
- [7] Kirkby D F, Faraday D. Engineering for efficiency [J]. The Chemical Engineer, 1992, 30: 11.
- [8] Yang R Y K, Su J. Improvement of chemostat performance via nonlinear oscillations: Part 1. Operation strategy [J]. Bioprocess Engineering, 1993, 9: 97 - 102.
- [9] Sun Tao, Liu Beihui, Li Zuohu. Effect of elevated temperature on *Trichoderma viride* SL-1 in solid state fermentations [J]. Biotech Lett, 1997, 19(2): 171 - 174.
- [10] 谢东明,刘德华,张岩,等.应用热冲击处理技术提高发酵甘油的产率[J].生物工程学报,2000,16(3):383-386.
- [11] 徐圆圆,刘德华,谢东明.气升式环流反应器强制振荡周期对传质影响的研究[J].高校化学工程学报,2002,16(1):13-16.
- [12] 杨玉敏.植物细胞胞内产物释放行为实验与理论研究[D].天津:天津大学,1996.
- [13] 袁其朋,马润宇.黑曲霉产酶过程中变温操作的研究[J].北京化工大学学报,1999,26(2):11-14.
- [14] Horntvedt B R, Rambekk M, et al. Oscillating conditions for influencing the composition of mixed biological cultures [J]. Water Sci Technol, 1998, 37: 259 - 262.
- [15] Weber A E, San K Y. Enhanced plasmid maintenance in a CSRT upon square-wave oscillations in the dilution rate [J]. Biotechnology Letters, 1988, 10(8): 531 - 536.
- [16] Lin H Y, Neubauer P. Influence of controlled glucose oscillations on a fed-batch process of recombinant *Escherichia coli* [J]. Biotechnology, 2000, 79: 27 - 37.
- [17] Weber A E, San K Y. Dynamics of plasmid maintenance in a CSTR upon square-wave perturbations in the dilution rate [J]. Biotechnol Bioeng, 1989, 34: 1104 - 1113.
- [18] 袁其朋,孙长慧.周期操作对基因工程菌质粒稳定性的影响[J].北京化工大学学报,2002,29(2):20-23.
- [19] Clarke K G, Hansford G S, Jones D T. Nature and significance of oscillatory behavior during solvent production by *Clostridium acetobutylicum* in continuous culture [J]. Biotechnol Bioeng, 1988, 32: 538 - 544. ■

德固赛集团宣布在亚太区市场调升热塑性丙烯酸树脂成膜基料价格

德固赛(Degussa)集团成膜基料和助剂(BD)产品部门(属德固赛公司-Degussa AG 的特种丙烯酸酯部门)2006年7月在上海宣布自2006年9月1日起调高其基于甲基丙烯酸酯类的树脂价格,价格涨幅为5%(已签合同不受此调价影响)。

Degalan[®]系列和特种丙烯酸树脂产品均在调价之列。目前这些产品广泛应用于如工业涂料、油墨、塑胶漆、建

筑涂料和热密封胶漆等。

近几个月以来 BD 部门致力于优化其供应链及降低成本,但原材料成本、运输费用和能源价格的不断上升已使 BD 部门不堪重荷。BD 部门亚太区市场总监贾法兰先生(Siamak Djafarian)强调“BD 部门长期服务于亚太区客户,极力避免提高价格以更好服务客户。但目前状况迫使我们不得不少量加价以维系我们的服务和品质”。(孙 壹)