

维生素C 第二步发酵过程动力学模型的研究

魏东芝¹ 袁渭康¹ 尹光琳² 袁中一³ 陈敏恒¹

(华东化工学院, 上海)¹

(上海生物工程研究中心, 上海)²

(上海生物化学研究所, 上海)³

本文系统地分析了L-山梨糖到2-酮基-L-古龙酸的生物转化过程, 提出了生长因子的假定, 对发酵机理进行了新的探讨, 对发酵过程做了必要与合理的简化。首次建立了维生素C第二步发酵过程的动力学模型。运用多面体最优化法和Runge-Kutta积分法等数学方法处理模型, 获得最佳模型参数。结果表明, 模型计算值与实验值得到良好的吻合, 从而证明动力学模型是正确的和有效的。

关键词 L-山梨糖; 2-酮基-L-古龙酸; 生长因子; 动力学模型

维生素C(简称Vc)又名L-抗坏血酸, 是人体营养必需的维生素, 在医药和食品方面均有重要用途^[1,2]。2-酮基-L-古龙酸(简称2-KLG)是第二步发酵的产物, 也是合成维生素C的前体。

七十年代初, 我国首创第二步发酵法生产维生素C的工艺, 开始了生物氧化法代替化学氧化法生产Vc的历史^[3]。多年来, 随着对Vc作用机理及新用途的研究不断深入, 对Vc的需求量日益增加, 而工业生产却一直停留在传统工艺上, 特别是对第二步发酵(即由L-山梨糖到2-酮基-L-古龙酸的生物转化过程)的认识还很肤浅, 严重阻碍了科研与生产的发展, 无法适应连续化、自动化以及大规模、高效率的工业生产趋势。

L-山梨糖到2-KLG的转化涉及两个菌株 *Gluconobacter oxydans* 和 *Bacillus cereus*。两菌之间的关系及多级酶促反应机理一直是人们没有解决的难题, 虽然许多专家在多方面进行过研究^[4-7], 也曾提出各种理论推测, 但始终没有得到圆满结论。在动力学方面至今仍无有关

报道, 使得该领域的研究变得困难而又迫切。

本文试图通过对发酵过程的深入分析, 有效地把握过程的特征, 建立适宜的动力学模型, 在揭示系统的本质方面做出新的尝试, 为工业生产的改进和新技术的开发提供可靠的依据。

材料与方 法

(一) 菌种与发酵

实验菌种为混合菌株氧化葡萄糖杆菌 *Gluconobacter oxydans* 和蜡状芽孢杆菌 *Bacillus cereus*, 由江西赣江制药厂提供。

*G. oxydans*和混合菌种子培养基和培养条件: L-山梨糖 1.5%(w/v, 下同), 酵母膏0.5%, 玉米浆0.3%, 尿素0.1%, KH_2PO_4 0.2%, CaCO_3 0.2%, pH 6.5—6.7, 温度30℃, 摇床转速180rpm。

*B. cereus*种子培养基和培养条件: 蛋

本文于1991年10月4日收到。

白朊 1%，牛肉膏 0.3%，NaCl 0.5%，pH 7.2—7.4，温度 30℃，摇床转速 180 rpm。

发酵培养基及条件：L-山梨糖 8%，尿素 1.2%，玉米浆 0.3%，MgSO₄·7H₂O 0.01%，CaCO₃ 0.2%，泡敌 0.04%，pH 6.4—6.8，温度 30±0.5℃，灌压 0.5kg/cm²，接种量 10%，溶氧(DO) 40%—50%。

(二) 实验设备

选用西德 B. Braun 公司生产的 Biostat-E 型发酵罐及全部配套检测和控制系系统。发酵罐容积为 10 L，装料系数为 80%。在间歇发酵过程中，可以自动记录 pH 值、温度、溶氧和搅拌转速并根据设定值进行自动控制和调节。

(三) 分析方法

菌体浓度的测定：用 721-型分光光度计在波长 650nm 下测定菌体悬浮液的光密度，然后根据菌体浓度与光密度的标准关联式 $x = 6.586(D - D_0)$ ，计算菌体浓度。

L-山梨糖浓度的测定^[8]：(1) 甘油铜法：用过量的甘油铜与 L-山梨糖进行氧化-还原反应，然后用标准浓度的 L-山梨糖滴定过剩的甘油铜。由于 2-KLG 具有与 L-山梨糖相似的还原性游离基，在甘油铜存在时也发生反应，因此，在 Vc 第二步发酵中应用该方法时，需要进行校正。(2) 二苯胺法：利用二苯胺可以与 L-山梨糖生成兰色化合物的性质，在波长 640nm 下测定反应液的光密度值，根据标准曲线计算 L-山梨糖的浓度。此法不受 2-KLG 等结构类似物的干扰，但由于稀释倍数较大，往往会造成显著的误差。鉴于以上两种方法的特点，在本实验的测定中，发酵前期和中期采用方法 (1)，发酵末期采用方法 (2)。

2-KLG 浓度的测定^[9]：先用 14N 的

H₂SO₄ 溶液与样品反应，将 2-KLG 转化为维生素 C，然后再用标准碘量法测定。

细胞酶活力的测定：在 NaH₂PO₄—NaOH 缓冲溶液中加入 L-山梨糖 (2%) 配成 pH 6.8 的反应液，将一定量的游离细胞加入后，恒温振荡培养 1h，立即终止反应并测定 2-KLG 的生成量，计算反应速率。细胞酶活力以单位重量 (湿重) 的细胞在单位时间内转化 L-山梨糖生成 2-KLG 的量表示。

生物转化过程的分析和动力学模型的建立

(一) 混合菌株转化酶系的研究

将 *G. oxydans* 和 *B. cereus* 的静息细胞以各种比例混合，测定转化 L-山梨糖生成 2-KLG 的酶活力，实验结果见表 1。

表 1 *G. oxydans* 和 *B. cereus* 混合细胞转化 L-山梨糖到 2-KLG 的酶活力

Table 1. Enzymic activity of *G. oxydans* and *B. cereus* cells converting L-Sorbose to 2-KLG

| <i>G. oxydans</i> (mg wt.) | <i>B. cereus</i> (mg wt.) | Enzymic activity (mg 2-KLG/mg cells·h) |
|-------------------------------|------------------------------|--|
| 5 | 0 | 0.414 |
| 4 | 1 | 0.332 |
| 3 | 2 | 0.248 |
| 2 | 3 | 0.168 |
| 1 | 4 | 0.085 |
| 0 | 5 | 0.000 |

G. oxydans 细胞单独存在时可以转化 L-山梨糖生成 2-KLG，表明 *G. oxydans* 细胞内含有合成 2-KLG 的全部酶系；*B. cereus* 细胞单独存在时不能产生 2-KLG，说明 *B. cereus* 细胞不具备转化 L-山梨糖合成 2-KLG 的能力。另外，还可以看出，混合细胞的酶活力基本上与 *G. oxydans* 的细胞量成正比，而与 *B. cereus* 的细

胞量多少无关, 说明两菌株的混合对 2-KLG 的合成并无影响。从上述结论可以得到启发, 即将两菌株之间相互关系的研究重点放在细胞生长繁殖阶段。

(二) 发酵过程分析

在发酵过程中, 定时取样测定菌体浓度, 产物 2-KLG 浓度和 L-山梨糖浓度, 将实验数据绘于图 1。

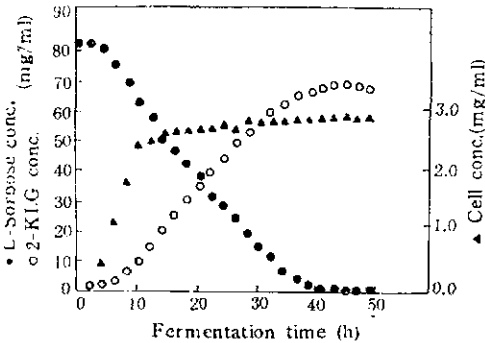


图 1 2-KLG 发酵实验数据

Fig.1 Experimental data of 2-KLG fermentation

在整个发酵过程中, *B. cereus* 细胞只在发酵过程的前 8 个小时内得到一定程度的繁殖, 呈现营养体形态, 此后, *B. cereus* 细胞逐渐形成芽孢, 进而有部分芽孢破碎和溶解。在 8 个小时以前, 2-KLG 的产量甚微, 基质消耗基本用于菌体生长和繁殖, 随后, 产物 2-KLG 大量产生直到 L-山梨糖趋于耗尽。表明产物的合成主要是在 *B. cereus* 细胞形成芽孢和 *G. oxydans* 细胞具备一定浓度之后。由于芽孢处于休眠状态, 不再进行正常的生理代谢活动, 因此, 在产 2-KLG 的高峰期处于芽孢状态的 *B. cereus* 细胞不参与 L-山梨糖到 2-KLG 的转化, 可能只是在发酵初期分泌生长因子促进 *G. oxydans* 细胞的生长, 一旦 *G. oxydans* 菌株得到良好的繁殖, 就可以进行正常的生物转化反应, 合成 2-KLG。

(三) 动力学模型的建立

对于 2-KLG 发酵系统而言, 细胞生长和代谢除了受到基质浓度、pH 和温度等各种环境因素的影响外, 还必须考虑到混合菌株之间的相互作用。众所周知, 要对一个复杂的反应系统进行数学描述, 很难做到把所有的因素都归纳在一个模型中。为了使模型更具有实用性, 本文在优化的工艺条件下进行研究。首先规定了 pH 和温度等工程参数的范围。另外, 氧气和 L-山梨糖是 2-KLG 发酵的主要基质, 但从发酵结果分析, 溶氧饱和度在 40%—50% 的范围内变化基本上不会影响各发酵参数, 本文在 DO 为 40%—50% 的范围内建立模型, 从而剔除了氧浓度变量。因为工业生产中均在适宜的底物浓度下操作, 因而也不考虑底物抑制对模型的影响。

根据以上对发酵过程的分析, 在数学描述中, 只需将 *B. cereus* 的作用归结于生长因子的影响变量, 使复杂过程大大简化。关于以生长因子为限制因素的细胞生长, 曾用以下模型加以描述^[10,11]。

$$\frac{dx}{dt} = \mu_m \frac{S}{K_i + S} \cdot \frac{B}{K_B + B} \quad (1)$$

$$\frac{dx}{dt} = \mu_m \frac{B_0 - Z_m \cdot x}{B_0 + (E - Z_m)x} \cdot x \quad (2)$$

由于生长因子浓度 B 一般无法实测, 在应用模型式 (1) 时往往需要假定 B 为常数, 因而不能确切地反映出生长因子的影响。模型式 (2) 虽然在许多发酵过程的描述中得到应用, 但由于参数多, 模型复杂, 因而实用性也较差。本文将菌体生长视为自催化反应, 设反应速率与生长因子及菌体浓度均呈一级动力学形式。

$$\frac{dx}{dt} = kBx \quad (3)$$

$$\text{令: } Y_{x/B} = \frac{x - x_0}{B_0 - B} \quad (4)$$

$$\text{则: } B = B_0 - \frac{1}{Y_{x/B}}(x - x_0) \quad (5)$$

将式(5)代入式(3)并整理为:

$$\frac{dx}{dt} = \mu_m \left(1 - \frac{x}{x_m}\right)x \quad (6)$$

$$\text{其中: } \mu_m = k \left(B_0 - \frac{x_0}{Y_{x/B}}\right) \quad (7)$$

$$x_m = B_0 Y_{x/B} + x_0 \quad (8)$$

从式(7)和式(8)可以看出 μ_m 和 x_m 具有明确的物理含义, μ_m 表示菌体的最大比生长速率, x_m 为菌体所能达到的最大细胞浓度。在以上模型中,生长因子浓度的影响全部归结于两个模型参数中,或者说,该动力学模型的参数反映了以生长因子为限制因素的特征。

2-KLG 发酵为混合型发酵,关于此类发酵的次级代谢产物合成,通常有以下动力学模型^[10-12]。

$$\frac{dp}{dt} = V_m \frac{S}{K_m + S} x - k_d \frac{dx}{dt} \quad (9)$$

$$\frac{dp}{dt} = k_1 x - k_2 \frac{dx}{dt} \quad (10)$$

$$\frac{dp}{dt} = V_m \frac{S}{K_m + S} x \quad (11)$$

模型式(9)属于Gaden第二型动力学形式,是一种较为普遍适用的动力学模型,式(10)和式(11)实际上是式(9)的简化形式。根据实验结果分析(见图1)和对发酵过程的假定,产物合成曲线基本符合Monod模型,即式(11)。

基质消耗模型按照物料平衡原则导出:

$$-\frac{ds}{dt} = \frac{1}{Y_{p/s}} \cdot \frac{dp}{dt} + \frac{1}{Y_{x/s}} \cdot \frac{dx}{dt} + mx \quad (12)$$

即基质用于产物合成、菌体生长和维持细胞存活上。

动力学模型的分析

(一) 模型参数的估计

本文运用多面体最优化法和 Runge-Kutta 积分法对动力学模型和实验数据进行拟合处理,估计动力学模型参数。在数学处理中,将模型参数视为可调变量,给定初值后引用Runge-Kutta积分法积分式(6)、式(9)和式(11),计算出 t 时刻的菌体浓度 $X_{c,t}$ 、产物浓度 $P_{c,t}$ 及基质浓度 $S_{c,t}$ 后,求取目标函数:

$$f(x_i) = (x_{c,t} - x_{c,t})^2 + (p_{c,t} - p_{c,t})^2 + (s_{c,t} - s_{c,t})^2 \quad (13)$$

然后,根据多面体最优化法在多维空间对目标函数进行最优搜索,求取最佳模型参数,见表2。

表2 动力学模型参数估计值

Table 2 Estimated value of kinetic model parameter

| μ_m | x_m | V_m | K_m | $Y_{m/s}$ | $Y_{p/s}$ | m |
|---------|-------|-------|--------|-----------|-----------|-------|
| 0.401 | 2.888 | 1.153 | 14.772 | 0.1617 | 1.316 | 0.131 |

(二) 动力学模型的分析

在取得最佳模型参数后,用数学模型对实验数据进行回归分析,见图2。模型计算值与实验值得到良好的吻合。

生长动力学模型较好地描述了发酵过程中菌体的迟缓期、对数生长期和稳定期,从一个侧面验证了有关生长因子理论

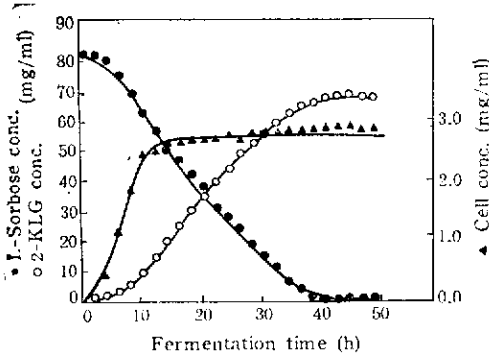


图 2 2-KLG 发酵动力学模型与实验数据的拟合
Fig.2 Simulation of experimental data by kinetic model
(— Value of computer simulation)

的正确性, 不仅为 Vc 第二步发酵混合菌的生长提供了数学描述的手段, 而且在揭示混合菌株伴生关系方面开辟了新的思路。从产物合成速率模型可以看出, 基质浓度 (L-山梨糖浓度) 较高时, 产酸速率与基质浓度成拟零级动力学形式, 亦即与基质浓度无关, 此时的产酸速率与菌体浓度成正比。在发酵末期, 由于基质浓度的降低, 产酸速率急剧减小, 继续延长时间已无益于 2-KLG 的积累, 此时基质主要

消耗在维持细胞存活上。

动力学模型从一定程度上揭示了 2-KLG 发酵系统的本质特征, 可以直接用于分析发酵过程并指导实际生产。同时, 动力学模型的建立也为 Vc 二步发酵生产实现连续化及自动化奠定了理论基础。

符号说明

- B : 生长因子浓度(mg/ml)
 B_0 : 生长因子初浓度(mg/ml)
 E : 动力学平衡常数
 $k, k_b, k_s, K_B, K_m, K_s$: 动力学模型参数
 m : 菌体存活维持系数(h^{-1})
 p : 产物 2-KLG 浓度(mg/ml)
 s : 基质 L-山梨糖浓度(mg/ml)
 t : 时间(h)
 x : *G. oxydans* 菌体浓度(mg/ml)
 x_m : 细胞生长最大密度(mg/ml)
 V_m : 产物合成的最大速率(mg/ml·min)
 $Y_{x/s}$: 生长因子的细胞得率(mg/mg)
 $Y_{p/s}$: 基质的细胞得率(mg/mg)
 $Y_{p/x}$: 基质的产物得率(mg/mg)
 Z_m : 单个细胞的最低生长因子含量
 μ_m : 最大比生长速率(min^{-1})

参 考 文 献

- [1] Price, C.E., *Nature*, 212, 1481, 1966.
 [2] Reichstein, G., *Helv. Chim. Acta*, 16, 1019, 1933.
 [3] 尹光琳, *微生物学报*, 20, 246, 1980.
 [4] Tsukada, Y. et al., *Biotech. Bioeng.*, 14, 799, 1972.
 [5] Martin, C.K.A. et al., *Biotech. Bioeng.*, 17, 1474, 1975.
 [6] Makover, S. et al., *Biotech. Bioeng.*, 17, 1485, 1975.
 [7] Tengerdy, R.P., *J. Biochem. Microb. Technol. Eng.*, 3, 241, 1961.
 [8] 程茉莉等, *医药工业*, 6, 19, 1981.
 [9] 程茉莉等, *医药工业*, 6, 15, 1981.
 [10] 合叶修一等, *生物化学化工——反应速度论*, p. 226, 1975.
 [11] 李春辰, *辽宁食品与发酵*, 1, 4, 1980.
 [12] 张克旭等, *氨基酸工艺学*, p. 65, 1983.

Studies on Kinetic Model of Vitamin C Two-step Fermentation Process

Wei Dongzhi¹ Yuan Weikang¹ Yin Guanglin²

Yuan Zhongyi³ Chen Minheng¹

(East China University of Chemical Technology, Shanghai)¹

(Shanghai Biotechnology Research Center, Academia Sinica, Shanghai)²

(Shanghai Institute of Biochemistry, Academia Sinica, Shanghai)³

This paper aims at analyzing the bioconversion process from L-sorbose to 2-Keto-L-gulonic acid with the aid of the growth factor assumption. Fermentation mechanism is discussed after making necessary simplifications. A model is established for this two-step fermentation process. Nonlinear optimization together with Runge-Kutta method, are used to obtain model parameters. Results of computer simulation agree with experimental data to show the reliability of the kinetic model.

Key words

L-sorbose; 2-Keto-L-gulonic acid; growth factor; kinetic model