

L-精氨酸发酵动力学特性的分析研究

龚建华 丁久元 黄和容 陈琦

(中国科学院微生物研究所, 北京 100080)

在2.6L自控小罐上用突变株 971.1 进行了L-精氨酸分批发酵, 对涉及细胞群体代谢速率和代谢效率的发酵动力学行为进行了分析研究, 内容有: (1)分析了该发酵过程的动力学类型, 并提出了定量分类的“生长比速率双相比较法”; (2)在实验基础上组建了L-精氨酸发酵的数学模型; (3)通过对不同溶氧系数 $k_L a$ 条件下的菌体生长耗底物分数 α_x 、产物生成耗底物分数 α_p 的分析比较, 讨论了氧的供给对底物转化成L-精氨酸效率的影响。

关键词 生长比速率双相比较法; 数学模型; 底物转化效率

L-精氨酸的发酵法生产早就受到国外的重视^[1-3]。国内已发表了L-精氨酸菌株选育、发酵条件控制及其工艺放大的研究报告^[4,5]。本文则从发酵过程的动力学类型、数学模型以及底物利用率等三个方面对L-精氨酸发酵细胞群体的动力学行为进行了研究。

材料和方法

(一) 菌种

L-精氨酸产生株 *Corynebacterium crenatum* 971.1(SG⁺, His⁻)^[4]。

(二) 培养基

1. 种子培养基(g/L): 葡萄糖 30.0, 玉米浆5.0, 豆饼水解液10.0, 尿素2.5, 磷酸氢二钾1.5, 磷酸二氢钾0.5, 硫酸镁0.4, 硫酸锰0.02, 硫酸亚铁0.02, pH 6.5。

2. 发酵培养基(g/L): 工业葡萄糖 120.0, 玉米浆20.0, 豆饼水解液6.0, 硫酸铵 20.0, 磷酸二氢钾0.5, 磷酸氢二钾1.0, 硫酸镁0.4, 甘油聚醚0.2, pH6.5。

(三) 发酵设备

日本 MARUBISHI Co. Ltd. MD-250 2.6L 台式自控发酵罐。

(四) 培养方法

以接种量6%的摇瓶种液接入装有1L培养基的自控发酵罐, 培养温度30℃。试验中改变搅拌速度及通风量来控制溶氧系数 $k_L a$ 值^[6,7]。

(五) 分析方法

1. pH的测定: pH电极在线显示。
2. 菌体生长的测定: 稀释后的发酵液在721型分光光度计上测定光密度, 并由标准曲线求得干重浓度。
3. 还原糖的测定: 3,5-二硝基水杨酸法^[8]。
4. L-精氨酸含量的测定: 坂口改良法^[9]。

结果与讨论

(一) L-精氨酸发酵动力学类型

发酵动力学类型分析是研究细胞群体

本文于1992年3月5日收到。

本文在“1991年全国生化反应工艺及工程学术报告会”上报告。

本工作系国家自然科学基金资助项目。

发酵动力学行为的基本方法之一,具有工程学意义^[10,11]。文献报道较常用的是 Gaden与 Wang^[11]等人提出的分为三种发酵类型的发酵动力学分类法^[10]。本文在此基础上提出了定量分类的“生长比速率双相比较法”,并用于精氨酸发酵过程分析。

1. 生长比速率双相比较法:有菌体生长和产物生成的分批发酵过程,菌体生长比速率 μ 总是由0经过特定的变化过程达到最大值 μ_{max} (即对数生长期),又经过特定的变化过程下降到0。我们对变量特征进行相对比较,前部份无量纲量 $\frac{\mu}{\mu_{max}}$

(记为 $\hat{\mu}$)由0增大到1.0,称为“上升相”(对数生长期的 $\hat{\mu}$ 恒等于1.0);后部份的 $\hat{\mu}$ 由1.0下降到0,称为“下降相”。无量纲量 $\frac{q_p}{q_{p,max}}$ (记为 \hat{q}_p)也相应地变化在0—

1.0范围内。“双相比较法”的横坐标 $\hat{\mu}$ 为:0→1.0→0,纵坐标 \hat{q}_p 为:0→1.0。上述三种发酵类型在两个正方形区域内构成其“特性曲线”(或“分类曲线”),并有其特征量(图1)。II型曲线是I型至III型的过渡型曲线,形式较复杂。三个特征量是(见图1b):①:“启动同步率” R_1 。对于不同的发酵过程,a点可由 a_1 点沿横轴移至 a_2 点,定义 R_1 值(无量纲)相应地由1.0减至0,启动同步率下降。它宏观地表征了菌体内有关生长酶系与产物生成酶系可否同时被活化。②“反应同步率” R_2 。细胞内代谢酶系错综复杂相互关联,上述两类酶系中的酶促反应相互联系的密切程度可有变化。 R_2 是一特性函数,它宏观地表征了菌体代谢过程中产物生成酶系与菌体生长酶系反应活跃性的相对同步性,从而反映前者对后者的影响,后者对前者的依赖性。非同步的差异在双相图上表示为($f -$

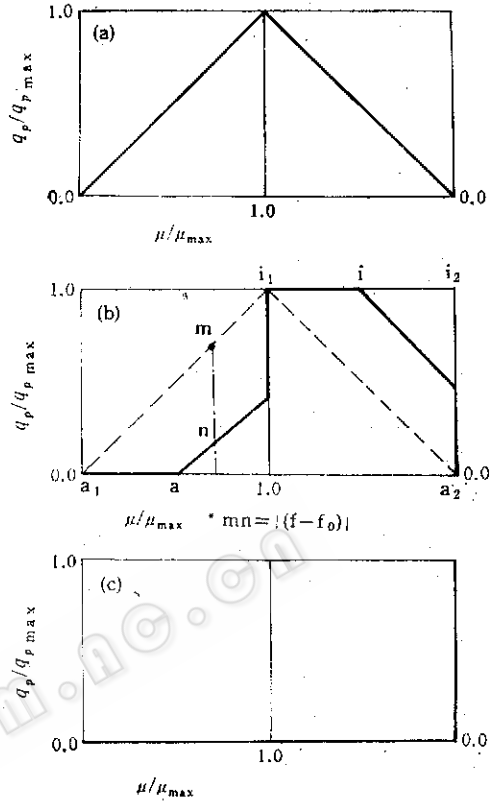


图1 “生长比速率双相比较法”的三种发酵动力学类型特性曲线

Fig.1 Kinetic classification of fermentations by means of the comparison of the two-phases of specific growth rate

(a) kind I (b) kind II (c) kind III

μ : specific growth rate (1/h)

μ_{max} : maximum of μ (1/h)

q_p : specific product formation rate (1/h)

$q_{p,max}$: maximum of q_p (1/h)

f_0), f 为分类曲线方程, f_0 为同步方程,即 $\hat{q}_p = \hat{\mu}$ (图1b中虚线)。定义 $R_2 = 1 - |(f - f_0)|$, $0 \leq R_2 \leq 1.0$ 。③“峰值同步率” R_3 。对于不同的发酵过程, i 点可由 i_1 点移至 i_2 点,定义 R_3 值(无量纲)相应地由1.0减至0,峰值同步率下降。它涉及细胞内有关菌体生长酶系与产物生成酶系,由于发酵体系中环境因子的影响可否同时显出被抑制效应(抑制程度可异)。这

样,三个特征量从工程学观点宏观地度量了发酵过程中细胞群体产物生成酶系与细胞生长酶系,在活化、依赖以及抑制三方面的基本特征。该法可用于有细胞繁殖过程的发酵体系。

2. L-精氨酸分批发酵动力学类型分析:本文用上法定量地分析了精氨酸发酵动力学类型,并比较了不同溶氧系数 k_La 值时分类曲线及其特征量的差异(图2、图3)。图2是Gaden Wang法所得分类曲线。图3的双相比较法分类曲线主要提供了第二相数根。它表明:(1)971.1菌株的L-精氨酸发酵属动力学分类II型,精氨酸积累过程与细胞自身生长过程间不存在线性依赖性。(2)精氨酸发酵工艺改造策略中可考虑上述的相对独立性。例如,由于在第二相期产物生成处于活跃状态,可采取发酵pH两阶段控制工艺,以激发不同相期时菌体酶系不同的活性,精氨酸积累量可从26.2mg/ml提高到31.7mg/ml。(3) k_La 值从 222 h^{-1} 增至 1920 h^{-1} 直至 2130 h^{-1} 时,峰值同步率 R_s 由0.091增至0.291直至1.0,异步变成同步。可以推测在该发酵过程中,可能发生并存在可以同时影响菌体生长与精氨酸合成的某种抑制性环境因子(抑制效应起因于这种环境因子的缺乏或过多),且这种环境因子与胞内氧化还原反应密切相关。

(二) L-精氨酸发酵的数学模型

组建发酵过程数学模型是研究菌株发酵动力学行为的又一重要内容^[12-14]。L-精氨酸发酵的建模研究在国内外有关文献上还未见报道,组建发酵过程数学模型的方法各异,本文作者则在实验数据的基础上建立了该发酵过程有关菌体代谢速率的数学模型,并比较了不同供氧条件下参数的差异。

溶氧系数 $k_La=222\text{ h}^{-1}$ 时,获得生长

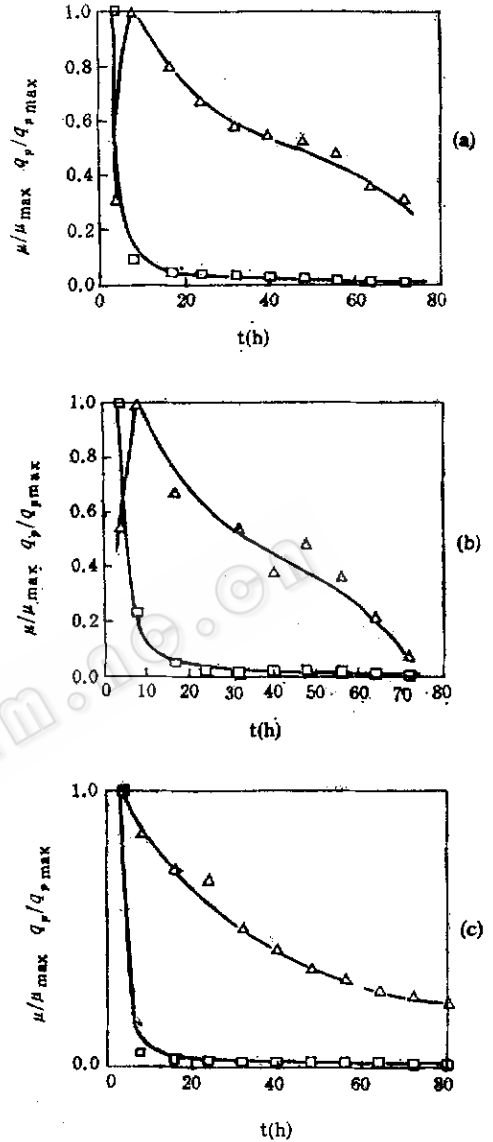


图2 不同溶氧系数 k_La 条件下菌体生长比速率与产物生成比速率的变化过程(Gaden-Wang比较法)

Fig.2 Time courses of specific growth rate and specific product formation rate under the different oxygen transfer coefficients

(a) $k_La=222$ (1/h) (b) $k_La=1920$ (1/h)
(c) $k_La=2130$ (1/h)

* μ : specific growth rate (1/h)

μ_{max} : maximum of μ (1/h)

q_p : specific product formation rate(1/h)

q_{pmax} : maximum of q_p (1/h)

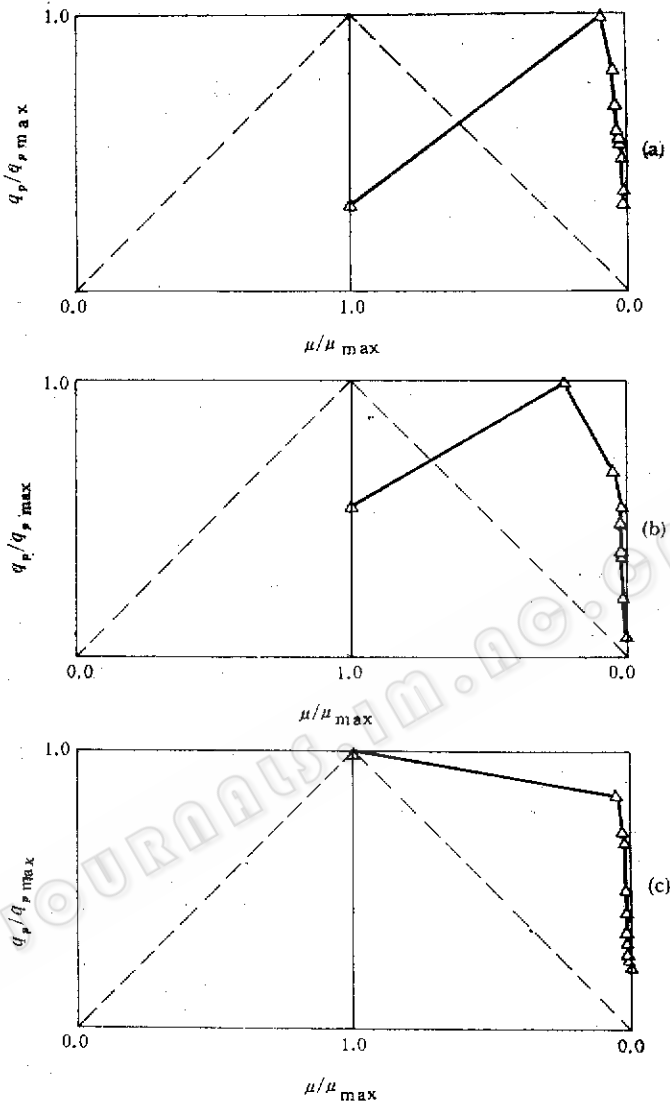


图 3 971.1 菌株 L-精氨酸发酵动力学类型以及溶氧系数 $k_L a$ 值对它的影响(生长比速率双相比较法)

Fig.3 Kinetic classification of L-arginine fermentations by the strain 971.1 under the different oxygen transfer coefficients

(a) $k_L a = 222 \text{ 1/h}$ (b) $k_L a = 1920 \text{ 1/h}$ (c) $k_L a = 2130 \text{ 1/h}$

比速率 μ 与精氨酸生成比速率 q_p 值(测定值不包括还未产酸的发酵初期 16 小时)。($\mu \sim q_p$) 值样本经曲线拟合求得式 (1):

$$q_p = k_1 + k_2 \cdot \mu + k_3 \cdot \mu^2 \quad (1)$$

曲线拟合 $|\gamma| = 0.8169 > \gamma_{0.05} = 0.7070$, 残差和 $\Sigma V = -0.008$, 残差平方和 $\Sigma V^2 = 0.000021$, 拟合效果较佳。用此模型进一

步在 $k_L a = 1920 \text{ h}^{-1}$ 和 $k_L a = 2130 \text{ h}^{-1}$ 两种实验条件下验证, 重合效果也较佳(前者 $|\gamma| = 0.7258 > \gamma_{0.05} = 0.7070$, $\Sigma V = -0.004$, $\Sigma V^2 = 0.000230$; 后者 $|\gamma| = 0.7080 > \gamma_{0.05} = 0.6660$, $\Sigma V = -0.019$, $\Sigma V^2 = 0.000191$)。拟合参数如下:

$$k_L a = 222 \text{ h}^{-1}; k_1 = 0.005 \text{ h}^{-1},$$

$k_2 = 1.51$, $k_3 = -15.56\text{h}$; $k_L a = 1920\text{h}^{-1}$; $k_1 = 0.007\text{h}^{-1}$, $k_2 = 1.43$, $k_3 = -9.47\text{h}$; $k_L a = 2130\text{h}^{-1}$; $k_1 = -0.005\text{h}^{-1}$, $k_2 = 2.95$, $k_3 = -45.34\text{h}$, 由式(1)推得产物生成模型:

$$\left(\frac{dp}{dt}\right) = k_1(x) + k_2\left(\frac{dx}{dt}\right) + k_3 \cdot \left(\frac{1}{x}\right)\left(\frac{dx}{dt}\right)^2 \quad (2)$$

其中, $\frac{dp}{dt}$: 产物精氨酸的生成速率 ($\text{mg/ml} \cdot \text{h}$); $\frac{dx}{dt}$: 菌体生长速率

($\text{mg干重}/\text{ml} \cdot \text{h}$); x : 菌体浓度($\text{mg干重}/\text{ml}$); t : 培养时间(h).

由 $k_L a = 222\text{h}^{-1}$ 的试验同时也获得耗糖比速率 q_s 值, ($\mu \sim q_s$) 值样本经曲线拟合可得方程(3):

$$q_s = k_4 + k_5 \cdot (\mu) \quad (3)$$

曲线拟合 $|r| = 0.9975 > r_{0.01} = 0.7650$, 残差和 $\Sigma V = 0$, 残差平方和 $\Sigma V^2 = 0.005$, 拟合效果较佳。用此模型进一步在 $k_L a = 1920\text{h}^{-1}$, $k_L a = 2130\text{h}^{-1}$ 两种实验条件下验证, 重合结果也较佳(前者 $|r| = 0.9886 > r_{0.01} = 0.7650$, $\Sigma V = 0.001$, $\Sigma V^2 = 0.045$; 后者, $|r| = 0.9899 > r_{0.01} = 0.7350$, $\Sigma V = 0.001$, $\Sigma V^2 = 0.007$)。拟合参数如下:

$$\begin{aligned} k_L a = 222\text{h}^{-1}; & \quad k_4 = 0.042\text{h}^{-1}, \\ & \quad k_5 = 3.17; \\ k_L a = 1920\text{h}^{-1}; & \quad k_4 = 0.042\text{h}^{-1}, \\ & \quad k_5 = 2.94; \\ k_L a = 2130\text{h}^{-1}; & \quad k_4 = 0.059\text{h}^{-1}, \\ & \quad k_5 = 1.24 \end{aligned}$$

由式(3)推得底物消耗模型:

$$\left(\frac{ds}{dt}\right) = k_4 \cdot (x) + k_5 \cdot \left(\frac{dx}{dt}\right) \quad (4)$$

其中, $\frac{ds}{dt}$: 底物消耗速率($\text{mg/ml} \cdot \text{h}$),

取正值); $\frac{dx}{dt}$: 菌体生长速率 ($\text{mg干重}/\text{ml} \cdot \text{h}$); x : 菌体浓度(mg/ml); t : 培养时间(h)。以上结果归纳如下:

$$\begin{cases} \left(\frac{dp}{dt}\right) = k_1 \cdot (x) + k_2 \cdot \left(\frac{dx}{dt}\right) \\ + k_3 \cdot \left(\frac{1}{x}\right) \cdot \left(\frac{dx}{dt}\right)^2 \\ \left(\frac{ds}{dt}\right) = k_4 \cdot (x) + k_5 \cdot \left(\frac{dx}{dt}\right) \end{cases} \quad (2) \quad (4)$$

由方程可见:

①精氨酸生成、糖底物的消耗不仅与细胞量, 而且与细胞生长速率有关。

② k_3 是负值, 可称作“精氨酸生成抑制因子”, 而形成抑制项 $I = k_3 \cdot \left(\frac{1}{x}\right)$.

$\left(\frac{dx}{dt}\right)^2$ 。在一定条件下, 细胞繁殖过快, 可以影响精氨酸的合成速率。

③精氨酸合成主要发生在发酵的“生长减慢期”(Growth-declining phase)和“静止期”(Stationary phase), 即第二相期。把式(2)写成:

$$q_s = k_1 + k_2 \cdot (\mu) + k_3 \cdot (\mu)^2 \quad (2')$$

对于生长减慢期, μ 很小时, $\mu^2 \approx 0$ 。又因 k_1 值很小, 式(2')近似为 $q_s = k_2 \cdot (\mu)$ 。在生长减慢期, 产酸活性主要与细胞的生长活性相关, 并受 k_2 因子的影响。在静止期, $\mu = 0$, 式(2')成为 $q_s = k_1$ 。它表示了静息细胞的产酸活性。该值很小, 且受 $k_L a$ 值的影响不大。

$$\text{④式(4)可写成, } q_s = k_4 + k_5 \cdot (\mu) \quad (4')$$

这表明细胞耗碳底物能力与细胞的生长过程有明显的线性关系, 线性斜率随 $k_L a$ 的改变有明确的变化规律性。

(三) 供氧强度对葡萄糖转化成 L-精氨酸效率的影响

以上分析涉及菌体代谢速率，下面对代谢效率，主要是碳底物利用率进行一些分析。溶氧系数 $k_L a$ 从 222h^{-1} 增加到 1920h^{-1} 直至 2130h^{-1} ，葡萄糖对 L-精氨酸的批转化率可由 17.80% 提高到 21.63% 以及 25.59% 。对上述结果分析如下：

1. “产物生成耗底物分数 α_p ” 与 “菌体生长耗底物分数 α_x ” 概念：我们在有关研究报告中^[15]，已提出了上述概念，这里简述如下：在有产物生成的发酵过程中，碳底物被细胞群体利用引起的浓度变化 (ds) 表示为： $ds = ds_1 + ds_2 + ds_3$ ，其中， ds_1 、 ds_2 、 ds_3 分别用于菌体生成的浓度增量 dx ，产物生成的浓度增量 dp ，以及单位体积菌体的维持能消耗 ($m \cdot x$)。

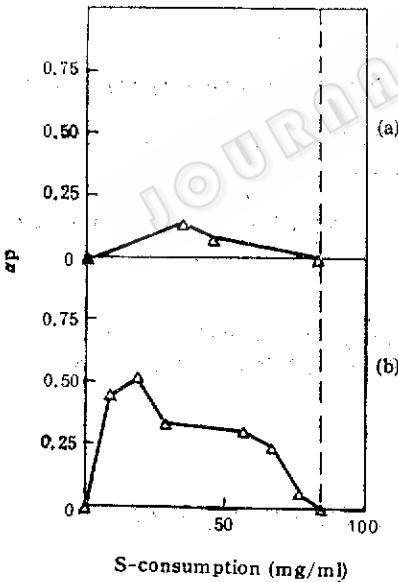


图 4 不同溶氧系数 $k_L a$ 条件下精氨酸生成耗底物分数 α_p 的比较
 Fig.4 Comparison between the fractions of substrate (glucose)-consumption for product formation, α_p , under the different oxygen transfer coefficients, $k_L a$
 (a) $k_L a = 222\text{ 1/h}$ (b) $k_L a = 2130\text{ 1/h}$

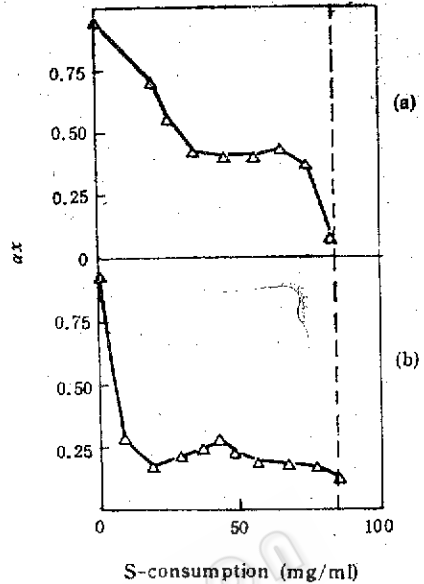


图 5 不同溶氧系数 $k_L a$ 条件下菌体生长耗底物分数 α_x 的比较
 Fig.5 Comparison between the fractions of substrate (glucose)-consumption for cell growth, α_x , under the different oxygen transfer coefficients, $k_L a$
 (a) $k_L a = 222\text{ 1/h}$ (b) $k_L a = 2130\text{ 1/h}$

则菌体生长耗底物分数， $\alpha_x = \frac{ds_1}{ds}$ ；

产物生成耗底物分数， $\alpha_p = \frac{ds_2}{ds}$ 。它们从工程学意义分别度量了该时间 t 时细胞内菌体生长酶系与产物生成酶系竞争底物能力的大小，因为 $\alpha_x + \alpha_p + \alpha_m = 1$ (α_m 是维持能耗底物分数， $\alpha_m = \frac{ds_3}{ds}$)，并有以下关系式： $Y_p = \alpha_p \cdot y_p$ ， $Y_x = \alpha_x \cdot y_x$ (详见有关研究报告^[15])。基于以上关系及有关的动力学基本概念可求得 L-精氨酸发酵过程的 α_x 、 α_p 值。

2. 不同溶氧系数 $k_L a$ 时菌体细胞利用碳源的竞争特性：溶氧系数 $k_L a$ 值分别为 222h^{-1} 、 2130h^{-1} 时发酵过程中“产物生成耗底物分数” α_p 值以及“菌体生长耗底物分数” α_x 值的变化情况由图 4 和图 5 表

示。供氧强度较小时 ($k_L a = 222\text{h}^{-1}$), α_r 值都很低, 最高才接近 0.2; 当供氧强度明显提高 ($k_L a = 2130\text{h}^{-1}$) 后, α_r 值普遍增大, 最高值可达 0.5 左右。即细胞群体每一瞬间所耗糖量较多地用于精氨酸合成, 最高时可达当时所耗糖量的 50%。另外, 图 4 中曲线与横坐标所构成的面积度量了细胞群体在整个发酵过程用于精氨酸合成的糖量的比例。 $k_L a$ 为 2130h^{-1} 时的曲线面积明显大于 $k_L a$ 为 222h^{-1} 时的曲线面积。而 α_r 值的变化情况完全与之相反 (图 5)。以上分析表明: ① 一般来说, 菌体合成自身和积累产物的生化途径与方式较难改变 (即 y_x 、 y_p 值受环境影响而变化的

可能性较小)。提高溶氧系数可以改善精氨酸发酵批转化率的重要原因在于菌体细胞对碳底物利用分配率的重新调整; α_r 值的增加, α_x 值的下降, 细胞内精氨酸合成酶系对碳底物竞争能力的提高。② 从生物学意义说, 试验表明供氧强度提高后, 菌体呼吸能力加强, 使细胞内有关氧化还原反应加剧。这可能导致细胞代谢池内氧浓度的变化而对不同酶系的活性或反应速率产生了影响, 也可能由于代谢池内氧/碳浓度间比例的调整影响了不同酶系有关反应对碳底物的利用量。而精氨酸积累过程较细胞生长过程对氧的要求更为迫切。

参 考 文 献

- [1] Kisumi, M. et al.: *Appl. Microbil.*, 22(6):987, 1971.
- [2] Nakayama, K. et al.: *Amino Acid and Nucleic Acid*, 25:141, 1972.
- [3] Kubato, K. et al.: *J. Gen. Appl. Microbil.* 19(5):339, 1973.
- [4] 路志强 等: 微生物学报, 28(2):131—135, 1988.
- [5] 龚建华 等: 微生物学报, 28(3):257—264, 1988.
- [6] Tsao, G. T. et al.: *Annual Reports on Fermentation Processes*, Academic Press, Inc., Vol. 5 Chapters 1, 2, 1982.
- [7] (微生物工程) 编写组: 微生物工程, pp.95—111, 上海人民出版社, 1975.
- [8] 张龙翔等: 生化实验方法和技术, pp.9—11, 人民教育出版社, 1981.
- [9] Rosenberg, H. et al.: *Biochem. J.*, 63:153, 1965.
- [10] Wang, D. I. C. et al.: *Fermentation and Enzyme Technology*, Chapter 9, John Wiley and Sons, Inc. 1979.
- [11] Gaden, E. L. Jr.: *Chem. and Ind.*, p.154, 1955.
- [12] Monod, J.: *Ann. Rev. Microbiol.* 3:371, 1949.
- [13] Moser, A.: In *Biotechnology*, Vol. 2, H. Brauer, Ed., Verlag Chemie, Weinheim, 1985.
- [14] 蒋慰孙 主编: 全国首届生化过程模型化与控制学术讨论会论文集, 华东化工学院出版社, 1989.
- [15] 龚建华 等: 生物工程学报, 3(4):281—289, 1987.

Kinetic Study and Modelling on L-arginine Fermentation

Gong Jianhua Ding Jiuyuan Huang Herong Chen Qi
(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing 100080)

The batch culture of the L-arginine fermentation by *Corynebacterium crenatum* L-arginine-producing mutant 971.1 was kinetically studied

in the 2.6 L fermentor for the purpose as follows: (1) Kinetic classification of L-arginine fermentation by means of the comparison of the two-phases of specific growth rate; (2) Modelling of the L-arginine fermentation; (3) The discussion about the effects of the oxygen supply on the conversion rate of glucose to L-arginine, by comparison between the fractions of glucose-consumption for L-arginine formation, α_1 , and the ones of glucose consumption for cell growth, α_2 , under the different oxygen transfer coefficients, $k_L a$. As a result, the kinetic fermentative behaviour of the strain 971.1, which relates to the velocity and the effectiveness of the metabolism of the cell, in L-arginine-formation cultivation were mathematically analysed.

Key words Means of the comparison of the two-phases of specific growth rate; modelling of fermentation; conversion effectiveness of the substrate