

十三碳二元酸发酵过程菌体生长期 动力学模型及其应用

李元广¹ 曹竹安 袁乃驹 侯治中²

(清华大学化学工程系, 北京 100084)

摘要 介绍了由十三碳烷烃生产十三碳二元酸的发酵过程, 对其中的菌体生长期的代谢过程进行了分析。提出了以 CO_2 释放率判断菌体生长状况的方法, 据此可确定进入产酸期的最佳时间, 建立了菌体生长期底物消耗及菌体生长的动力学模型, 对模型参数进行了回归估值, 并对菌体生长期进行了拟合。结果表明, 模型的计算值和实测值吻合得较好, 平均相对偏差为 2.4%。利用所建模型对菌体生长期进行多种操作条件下的模拟计算, 结果表明, 提高蔗糖浓度及初始菌体浓度均能显著地提高菌体生长期结束时的菌体浓度。

关键词 石油发酵, 十三碳烷烃, 十三碳二元酸, 发酵动力学

十三碳二元酸 (DCA_{13}), 又名巴西基酸, 是重要的化工原料, 不仅可以合成高级香料麝香 T, 而且可以合成高级润滑油添加剂、工程塑料、食品防腐剂、树脂、涂料、粘合剂、高分子液晶等, 用途相当广泛^[1-3]。

以往都是通过从菜籽油中提取出甘油芥酸、再经臭氧氧化的方法生产 DCA_{13} , 其工艺路线复杂、成本高、产品纯度低^[4] (约为百分之七十)。微生物石油发酵法为生产 DCA_{13} 开辟了新的途径。这种方法是利用微生物特异氧化正十三碳烷烃 ($n\text{C}_{13}$) 的能力, 在常温常压下进行生产, 它的突出优点是产品纯度高、工艺简单, 因此深受重视, 国内外研究者颇多^[1-10]。日本已率先实现了工业化, 1982 年开始以 100 吨/年的规模进行生产, 1985 年年产量达 200 吨。中国从 70 年代初开始进行 DCA_{13} 发酵的研究工作, 并于 80 年代初有小批量生产, 但后来均因产量低、生产不稳定等原因而停产。目前抚顺石油化工研究院正在进行 DCA_{13} 发酵的中试研究。国内 DCA_{13} 发酵研究工作中存在的主要问题之一是生产规模小、产酸速率低。要解决这两个问题, 就必须进行发酵动力学的研究, 以便进行工艺条件优化和工程放大。

迄今为止, 关于 DCA_{13} 发酵过程的研究, 国内外研究者的主要工作集中在菌种诱变与筛选、培养基组成的优化、发酵工艺条件的考察等方面, 而对该过程的动力学未作任何研究。 DCA_{13} 的发酵过程可分为两个阶段, 前一阶段是菌体生长期, 另一阶段为产酸期。菌体生长期为双基质发酵, 不同的研究者所用基质不同。文献 [6] 采用了重蜡和 $n\text{C}_{13}$, 而文献 [9] 则采用蔗糖和 $n\text{C}_{13}$, 本文采用文献 [9] 中的发酵工艺。主要是研究了 DCA_{13} 发酵过程中菌体生长期的动力学规律, 建立了菌体生长和底物消耗的动力学模型。并利

1 现在工作单位: 华南理工大学食品工程系, 广州 510641。

2 现在工作单位为浙江大学化学工程系。

中国石化总公司及国家自然科学基金资助课题。

本文于 1993 年 4 月 6 日收到。

用所建动力学模型对菌体生长期进行多种工艺条件下的模拟计算，以便进行工艺条件的优化。

1 材料和方法

1.1 菌种

热带假丝酵母 (*Candida tropicalis*) 诱变多倍体菌株，由抚顺石油化工研究院生物工程室提供。

1.2 试剂

所用烷烃由蚌埠前进化工厂生产，其中含 nC_{13} 96.7%、 nC_{12} 2.4%、 nC_{14} 0.9%。玉米浆取自华北制药厂，其它药品为试剂级。

1.3 培养基及发酵工艺

种子培养基、发酵培养基、种子培养条件及发酵工艺，详见文献 [9]。

1.4 实验装置

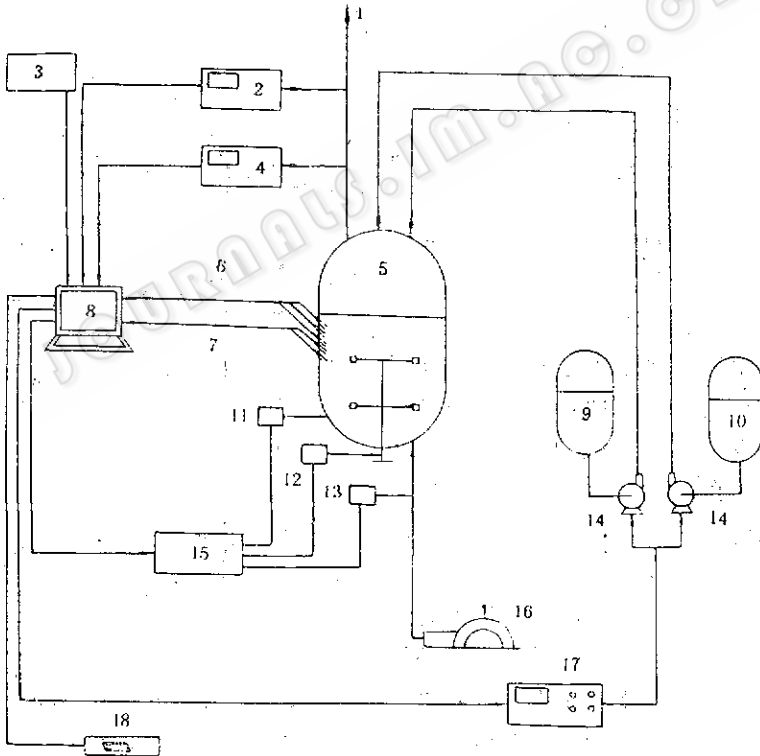


图1 十三碳二元酸发酵系统示意图

Fig. 1 Fermentation system of DCA_{13}

1. Exhaust gas, 2. O_2 analyzer, 3. Off-line measurements, 4. CO_2 analyzer, 5. 5L fermentor, 6. DO, pH, temperature, 7. Aeration rate, agitation speed, 8. PC computer, 9. Alkali tank, 10. Tridecane tank, 11. Temperature regulator, 12. Agitation regulator, 13. Aeration regulator, 14. Peristaltic pump, 15. Fermentation controller, 16. Air pump, 17. Feed controller, 18. Printer

种子在摇床上培养。发酵实验是在日本丸菱公司生产的 5L 全自动发酵罐中进行, 发酵用设备还包括计算机控制发酵系统、计算机反馈流加系统以及尾气分析系统等, 如图 1 所示。其中微机是由笔者开发出的一套十三碳二元酸发酵控制及数据处理软件所驱动。

1.5 分析方法

- 1.5.1 菌量的测定: 用重量法测定^[11]。
 1.5.2 烷烃的测定: 采用色谱法测定^[11]。
 1.5.3 糖的测定: 采用费林试剂法^[12]。
 1.5.4 DCA₁₃的测定: 采用抽滤—滴定法^[11]。
 1.5.5 总氮含量的测定: 采用凯氏定氮法^[13]。

2 结果与讨论

2.1 菌体生长期代谢过程分析

按照工艺要求的条件进行十三碳二元酸发酵实验。整个发酵过程可分为两个阶段, 前一阶段为菌体生长期, 后一阶段为产酸期。前一阶段的目的是为了获得大量菌体, 后一阶段的目的是为了获得生物氧化产物 DCA₁₃, 在前一阶段几乎无 DCA₁₃ 产生。菌体生长期的代谢过程曲线如图 2 所示。图中给出了菌

体浓度 C_x 、蔗糖浓度 C_s 、十三碳烷烃浓度 C_{n13} 、发酵清液中总氮含量 C_N 及 CO_2 释放率 CPR 等五个参数的变化情况。从该图可见, 在菌体生长期尽管有 nC_{13} 和蔗糖两种基质存在, 但菌体只利用蔗糖, 几乎未利用烷烃。这表明蔗糖是菌体生长的主要基质。加入烷烃的主要目的是对菌体产生诱导作用, 使其产生与 DCA₁₃ 形成有关的各种酶系, 以便在产酸期使烷烃转化为二元酸。 CPR 和菌体生产之间存在着密切的关系, 随着菌体生长的进行, CPR 不断增大, 当菌体生长基本停止时, CPR 达最大值, 然后便开始下降。据此可以通过在线测得的 CPR 来实时判断菌体的生长情况。根据发酵工艺要求, 进入产酸期的最佳时间为菌体生长基本停止之时, 但由于离线测定 C_s 较费时, 因而很难及时地确定进入产酸期的最佳时间。根据 CPR 和 C_x 之间的关系, 就可通过在线测得的 CPR 及时地确定进入产酸期的最佳时间 (即 CPR 达最大值时)。

2.2 动力学模型的建立和参数回归

由图 2 可见, 菌体生长所耗基质为蔗糖。前人已提出了多种模型, 用以描述以糖为基质时的菌体生长过程。但是对一个具体的体系而言, 究竟可用哪种模型来描述其菌体生长规律, 这要取决于体系自身的特点。现对十三碳二元酸发酵中菌体生长期内的菌体

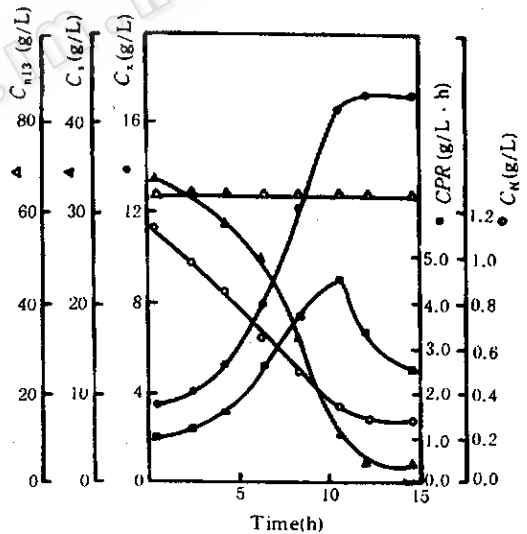


图 2 菌体生长期代谢过程曲线
 Fig. 2 The metabolic curves of cell growth phase

生长特性作一分析。

由图 2 可大致看出，菌体的生长大体经历了由慢→快→慢→基本停止生长的过程。为了更清楚地说明上述过程，图 3 给出了比生长速率随时间的变化情况。通常人们是根据 C_x 随时间变化情况，将菌体生长过程大致分为 4 个阶段，即延滞期、指数期、稳定期、衰亡期。为讨论方便起见，笔者根据 μ 随时间的变化情况，将 DAC₁₃ 发酵过程中菌体生长期内的菌体生长过程划分为 5 个阶段（见图 3）：延滞期（I）、加速生长期（II）、稳定生长期（III）、减速生长期（IV）和静止期（V）。由图 3 可见，减速期最长，这说明菌体生长到一定阶段时就会受到某些因素的影响，使比生长速率下降。导致 μ 下降的可能原因有糖、氮、氧浓度过低以及菌体自身阻碍基质扩散而产生的抑制作用等。从图 2 可见菌体生长基本停止时，发酵液中氮含量仍有 0.3g/L，且在整个菌体生长期内 DO 均在 30% 以上变化。据此可以认为氮、氧供应充足，对 μ 的影响很小。通过显微镜观察发现，在菌体生长初期，菌体的形态为椭圆形，随着菌体生长过程的进行，菌体形态变为细长形的假丝状；取样时发现，随着菌体生长过程的进行，发酵液变得越来越粘稠，这是由于菌体变长及菌体浓度增大这两个因素所致。由此可以推测菌体自身会阻碍基质的扩散，从而影响菌体比生长速率。此外， C_x 降低也会导致 μ 下降。基于这种分析，在建模时借用了 Contois 模型的表达形式。图 4 给出了 $\ln(C_x/C_{x0})$ 随时间的变化情况。由图 4 可见菌体生长时确实存在着一个约为 2 小时的延滞期，延滞期时间对菌体生长动力学的影响，可用指数形式来描述。

根据前面的分析，可对菌体生长期作出以下几点假定：

- a. 蔗糖是菌体生长的碳源和能源。
- b. 蔗糖为菌体生长中唯一限制性基质，

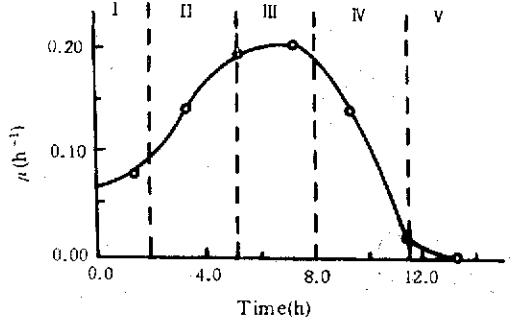


图 3 比生长速率 μ 的时变曲线
 Fig. 3 The curve of specific growth rate in cell growth phase

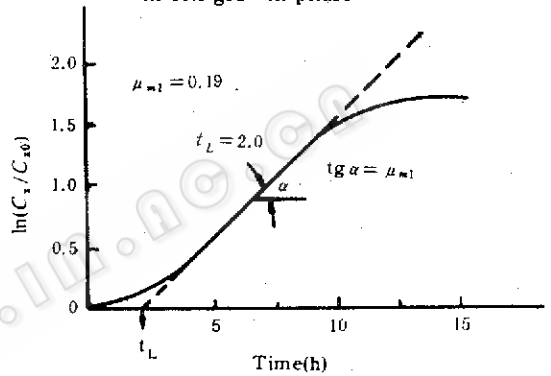


图 4 近似估算 μ_{m1} 和 t_L

Fig. 4 The estimation of μ_{m1} and t_L

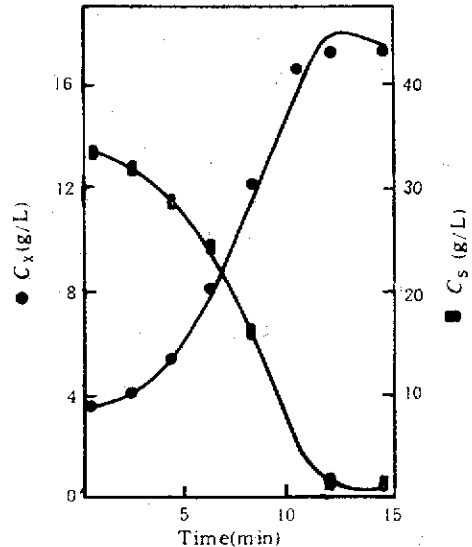


图 5 菌体生长期模型计算值与实测值比较
 Fig. 5 Comparison between the calculated values and the experimental values in cell growth phase

其它基质（如氧及氮源）供应充足。

c. 细长的假丝状菌体本身会阻碍基质向胞内的扩散，从而抑制菌体生长。

d. 在菌体生长的开始阶段存在一个延滞期。

基于上述 4 点假定，提出如下的菌体生长动力学模型：

$$\frac{dC_x}{dt} = \mu_{m1} \frac{C_s}{K_x C_x + C_s} (1 - e^{-t/t_L}) \cdot C_x \quad (1)$$

糖的消耗用于两个方面，一部分用于菌体生长，另一部分则用于菌体的内源代谢。据此有如下的蔗糖消耗动力学模型：

$$-\frac{dC_s}{dt} = \frac{dC_x}{dt} \cdot \frac{1}{Y_{x/s}} + m_1 C_x \quad (2)$$

(1)、(2) 两式即为 DCA₁₃ 发酵过程中菌体生长期的动力学模型。该模型共有 5 个待定参数，为一个非线性微分方程组。本文采用四阶 Runge-Kutta 法求解微分方程组，用单纯形法优化模型参数。通过对实验数据的回归，得到 5 个模型参数值。结果见表 1，模型拟合情况见图 5。

表 1 模型参数回归结果

Table 1 The parameters in the kinetic models of cell growth phase

Parameter	μ_{m1}	K_x	t_L	$Y_{x/s}$	m_1
Unit	h^{-1}	/	h	/	h^{-1}
Value	0.1942	0.1227	2.1002	0.4975	0.0302

由表 1 可见回归出的模型参数 μ_{m1} 及 t_L 之值和利用 $\ln C_x / C_{x0}$ 对 t 作图所求得的 μ_{m1} 及 t_L 值基本相同（见图 4）。由图 5 可以看出模型的拟合效果较好，模型计算值和实测值之间的平均相对偏差为 2.4%。由此可见，所提出的动力学模型能够较好地描述 DCA₁₃ 发酵过程中菌体生长期内基质消耗及菌体生长的规律。

2.3 动力学模型在菌体生长期工艺条件优化中的应用

应用所建立的动力学模型 (1) — (2) 式和回归所得的模型参数值，可模拟不同工艺条件下的菌体生长期过程，以便优化工艺条件。由于菌体生长期的目的是要获得菌体，因而优化的目标是如何提高菌体生长期终止时的菌体浓度 C_x 。由图 2 可见，在菌体生长期的后期，糖浓度较低，这可能是菌体生长缓慢的主要原因之一。有鉴于此，对不同糖浓度条件下的菌体生长期进行了模拟；此外还对初始菌体浓度的影响进行了模拟。

2.3.1 初始糖浓度 (C_{s0}) 对菌体生长过程的影响： 图 6 给出了在 C_{s0} 分别提高 10%、20%、30%、40%、50%（相对实际操作的 C_{s0} ）及实际操作的 C_{s0} 下进行发酵时，菌体浓度随时间的变化曲线。由该图可见 C_{s0} 的增加，对菌体生长期的前期基本无影响，但使菌体生长后期的菌体生长速率加快。这是由于在前期，残糖浓度仍较高，而在后期，残糖浓度较低（见图 2）。由此可见，增大初始糖浓度 C_{s0} 能显著地提高菌体生长期终止时的菌体浓度 C_x ，由图 6 还可看出，当 C_{s0} 较低时，其菌体生长期后期的菌浓会有所下降，这是由于此时糖浓度基本被耗尽之故。

2.3.2 恒定糖浓度对菌体生长过程的影响： 当发酵过程中糖浓度 C_s 分别被恒定在 0.5、1、2、3、4、6g/L 时的菌体生长过程曲线示于图 7。由该图可见， C_s 越大，菌体生

长越快；但随着 C_1 的增大， C_1 对菌体生长速率的影响作用越来越小。

2.3.3 补糖量对菌体生长过程的影响： 根据图 6 和图 7 的结果，可知菌体生长期后期糖浓度较低，且糖浓度 C_1 对菌体生长影响较大。有鉴于此，进行了中间补加糖这种操作的模拟计算。在菌体生长达 10 小时，即 C_1 约为 8g/L (见图 2) 时，开始补加糖，使发酵液中糖浓度分别提高 5、10、15、20g/L。其模拟结果示于图 8。由该图可见，在菌体生长后期补加一定量糖是提高 C_m 的有效措施。

2.3.4 初始菌体浓度对菌体生长过程的影响： 在初始糖浓度 C_{s0} 为 50.43g/L (相对实际 C_{s0} 提高 50%) 及糖浓度恒定在 4g/L 这两种情况下，进行了初始菌浓度对菌体生长影响的模拟实验，其结果分别示于图 9 和图 10。由这两个图可见，在糖量充足的情况下，提高初始菌浓可以使菌体生长期菌体浓度增大。

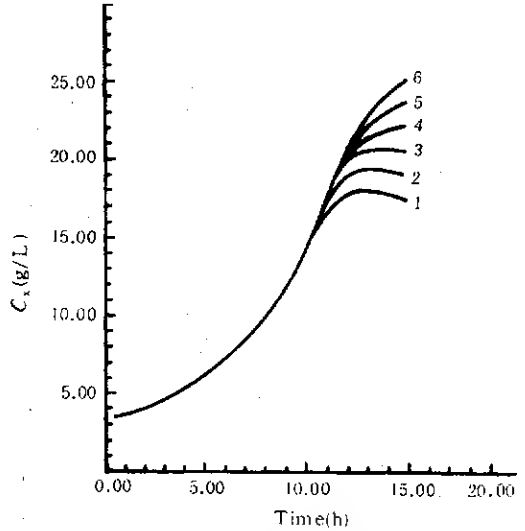


图 6 初始糖浓度对菌体生长过程的影响
Fig. 6 Effect of initial sucrose concentration on cell growth
Initial sucrose concentration increased by (%):
1. 0, 2. 10, 3. 20, 4. 30, 5. 40, 6. 50

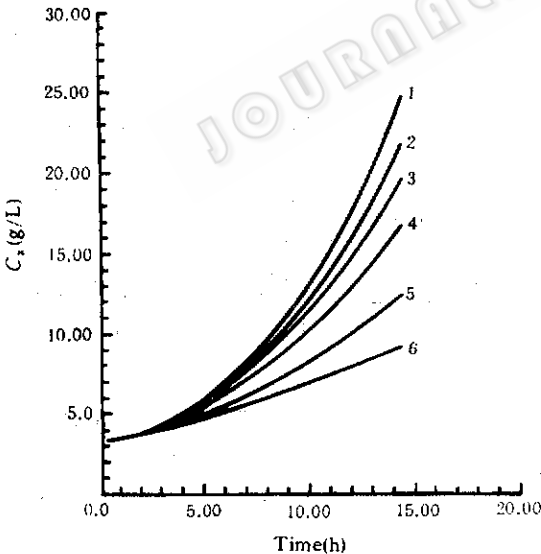


图 7 恒定糖浓度对菌体生长过程的影响
Fig. 7 Effect of different sucrose concentration on cell growth
Sucrose concentration (g/L): 1. 6.0, 2. 4.0, 3. 3.0, 4. 2.0, 5. 1.0, 6. 0.5

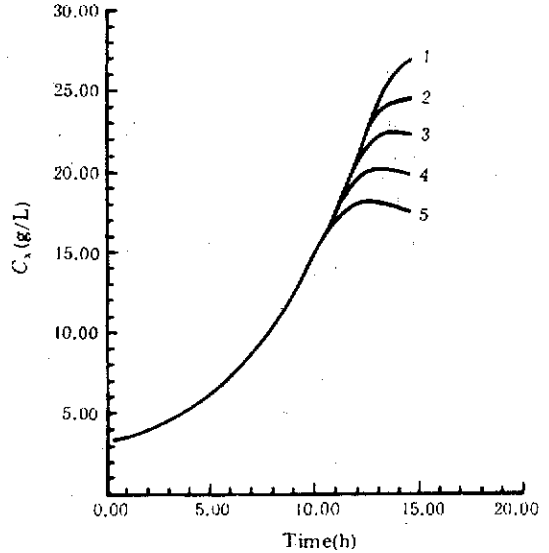


图 8 补糖量对菌体生长过程的影响
Fig. 8 Effect of fed sucrose concentration on cell growth
Fed sucrose concentration (g/L): 1. 20, 2. 15, 3. 10, 4. 5, 5. 0

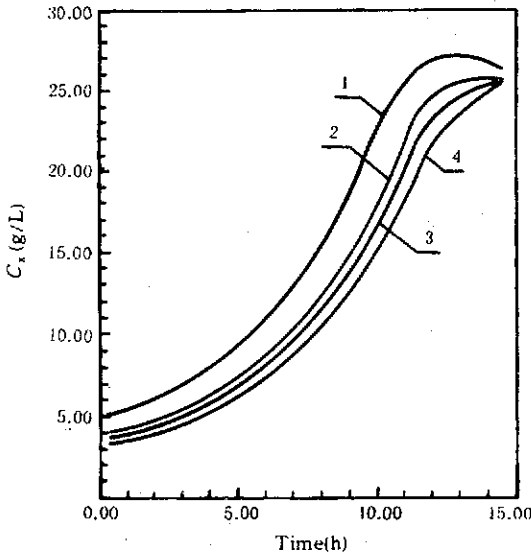


图 9 初始菌体浓度对菌体生长过程的影响
Fig. 9 Effect of initial cell concentration on cell growth ($C_{s0} = 50.43 \text{ g/L}$)
Initial cell concentration increased by (%):
1. 50, 2. 20, 3. 10, 4. 0

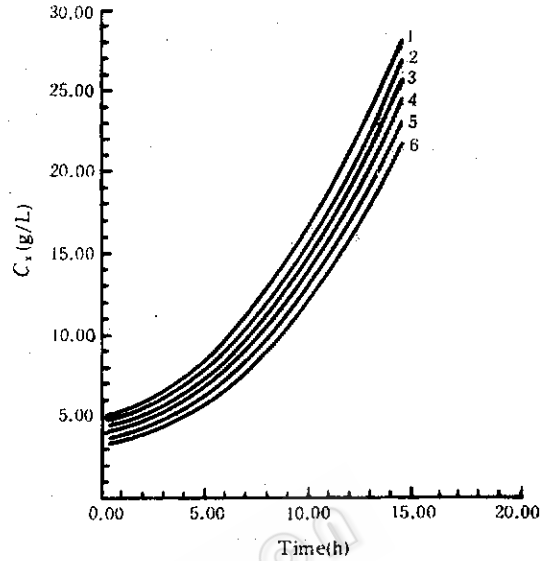


图 10 初始菌体浓度对菌体生长过程的影响
Fig. 10 Effect of initial cell concentration on cell growth ($C_s = 4 \text{ g/L}$)
Initial cell concentration increased by (%):
1. 50, 2. 40, 3. 30, 4. 20, 5. 10, 6. 0

3 结 论

在菌体生长进入静止期之前, CO_2 释放率 CPR 和菌体浓度曲线之间具有相似的特征, 因而可利用 CPR 在线判断菌体生长状况, 确定进入产酸期的最佳时间, 从而为过程的在线控制及工艺条件优化提供依据。

在菌体生长期, 选用 Contois 模型描述菌体生长特征, 同时还应考虑延滞期时间对菌体生长过程的影响; 根据物料衡算建立了底物消耗的动力学模型。

利用实验数据回归出了所有的模型参数, 并对菌体生长期进行了拟合, 结果表明所提出的动力学模型能较好地描述菌体生长期的代谢特征, 模型计算值和实测值之间的平均相对偏差为 2.4%。

模拟计算结果表明, 提高初始糖浓度及中间补加一定量蔗糖能显著地提高菌体生长期终止时的菌体浓度; 在糖量充足情况下, 提高初始菌浓, 也能够增大菌体生长期终止时的菌体浓度。

符 号 说 明

- | | |
|--|--------------------------------|
| C_x ——菌体浓度 (g/L) | C_{x0} ——菌体生长期终止时的菌体浓度 (g/L) |
| C_s ——蔗糖浓度 (g/L) | C_{s0} ——初始蔗糖浓度 (g/L) |
| C_{n13} ——十三碳烷烃浓度 (g/L) | C_N ——发酵清液中氮含量 (g/L) |
| μ_{m1} ——菌体生长期最大比生长速率 (h^{-1}) | K_x ——动力学常数 (g/L) |
| t_L ——延滞期时间 (h) | $y_{x/s}$ ——菌体对蔗糖的得率系数 |
| m_1 ——菌体的维持系数 (h^{-1}) | t ——时间 (h) |
| CPR ——单位体积发酵液中菌体的 CO_2 释放速率 (g/L·h) | |

致谢 在实验过程中得到抚顺石油化工研究院及北京微生物所的大力支持，潘玉金同学参加了部分研究工作，抚顺石油化研究院杨东同志参加了本文的部分整理工作。

参 考 文 献

- [1] 中国科学院微生物研究所经代谢组及发酵车间. 微生物学报, 1980, 20 (1) : 88—93.
- [2] 沈永强等. 植物生理学报, 1979, 5 (4) : 385—393.
- [3] 陈远童. 生物工程学报, 1988, 3 (4) : 307—308.
- [4] Namio Uemura, *et al.* Proc—World Conf Biotechnol Fats Oils Ind. 1988, 148—152.
- [5] 沈永强等. 植物生理学报, 1980, 6 (1) : 29—35.
- [6] 陈远童, 郝秀珍. 生物工程学报, 1989, 5 (3) : 241—245.
- [7] 刘祖同, 高忠翔. 石油学报, 1989, 5 (3) : 241—245.
- [8] 植材, 南海男. 石油与微生物, 1985, 33 : 436—441.
- [9] 抚顺石油化工研究院, 《生物发酵法制取十三碳二元酸的实验室研究》, 1992.
- [10] Picataggio S *et al.* Bio/Technology, 1992, 10 : 894—898.
- [11] 李元广. 十三碳二元酸双液相发酵体系研究, 清华大学工学博士学位论文, pp. 148—152, 1993.
- [12] 张龙翔等. 生化实验方法和技术, 北京: 高等教育出版社, 1981, 6—9.
- [13] 北京大学生物系生物化学教研室编. 生物化学实验指导, 北京: 高等教育出版社, 1979, 87—92.

The Kinetic Models of Cell Growth Phase in the Fermentation Process for Producing Undecane Dicarboxylic Acid and Their Applications

Li Yuanguang Cao Zhu'an Yuan Naiju Hou Zhizhong

(Department of Chemical Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084)

Abstract The fermentation process for producing undecane dicarboxylic acid from tridecane is introduced. The metabolic characters of cell growth phase in the process were analyzed. It was proposed that cell growth can be indentified by the carbon dioxide production rate (*CPR*). The best time for switching into production phase can be decided on-line with *CPR*. The kinetic models of cell growth phase were established and parameters of the models have been estimated by regression. The calculated curves fit the experimental date quite well. The average deviation between those over cell growth phase is 2.4%. Based on the kinetic models, computer simulations for several technological conditions of cell growth phase were fulfilled. From the results of the computer simulations, it can be seen that cell concentration at the end of cell growth phase could be increased markedly by increasing both sucrose concentration and initial cell concentration.

Key words Petroleum fermentation, tridecane, undecane dicarboxylic acid fermentation kinetics