

双碳源单细胞蛋白间歇培养 及流加培养的动力学模型

刘 刚 郑重鸣 宋 达 岑沛霖*

(浙江大学二次资源化工实验室 杭州 310027)

摘 要 应用非结构的逻辑增殖模型研究了两种酵母的单碳源和双碳源单细胞蛋白间歇培养的动力学,用改进的逻辑增殖模型研究了双碳源流加培养过程的动力学,从实验数据拟合了动力学模型参数,模型计算值与实验数据吻合良好。

关键词 双碳源, 间歇培养, 流加培养, 动力学模型

以单一的碳源为原料生产单细胞蛋白(SCP)的工艺已非常成熟,在反应动力学及反应器设计方面也已经开展了大量的研究工作^[1~4]。多种碳源的混合物往往是从可再生资源加工获得的,如乳清、亚硫酸纸浆废液、淀粉加工工业废液及木质纤维素水解液等,这些原料用于SCP生产属于三废治理或可再生生物资源的综合利用,具有十分重要的社会和经济意义,其中的一些过程也已用于工业生产。但是对于多碳源的微生物增长动力学的研究工作还进行得不多。

双碳源SCP培养动力学研究的难点是二次增长现象^[5]的描述,即微生物将优先代谢一种容易代谢的碳源(如葡萄糖),当该碳源耗尽后微生物才能受诱导建立起代谢另一碳源(如木糖)的酶系,因此,会出现第二个迟滞期后才能继续生长(二次生长)。Kompala等曾从关键酶合成机理出发,根据资源匹配定律建立了一个动力学模型描述产气克雷伯氏菌(*Klebsiella oxytoca*)在阿拉伯糖-乳糖双碳源介质中的二次增长现象^[6]。在该模型基础上,Geoge Tsao^[7]等人提出了一个多底物的结构模型,能比较直观地描述二次增长现象,但结构模型的参数比较多。Imanaka等人^[8]、Moser^[9]和Yoon^[10]提出了多碳源的非结构生长模型,这些模型的特点是形式简单、参数少、应用比较容易。非结构模型一般都采用两种碳源比生长速率的迭加,然后对不易被微生物利用的碳源的比生长速率乘以一个抑制因子。多碳源SCP的流加培养研究得较少,对这种过程的动力学研究尚属空白。

本工作在双碳源(葡萄糖+木糖)SCP间歇培养及流加培养的实验研究基础上,建立起单碳源和双碳源的间歇培养及双碳源流加培养的动力学模型。

1 材料与amp;方法

菌种为热带假丝酵母(*Candida tropicalis*)和树状假丝酵母(*Candida arborea*),所

国家自然科学基金资助。

*通信联系人。

本文于1994年5月4日收到。

有的发酵均在国产发酵罐上进行, 发酵培养基: 每升 A 液含 $MgCl_2$ 2g, $CaCl_2$ 0.3g, NaCl 0.5g, 一定量的单糖或混合糖; 每升 B 液含 $(NH_4)_2SO_4$ 2g, 酵母膏 3g, 维生素溶液 15ml, KH_2PO_4 7g, 一定量的尿素。流加培养基: 每升 A 液含混合糖 200g, 每升 B 液含尿素 45g, 以及相应量的无机盐和维生素溶液, A 液与 B 液分别灭菌后以 2:1 的比例混合。每升维生素溶液含生物素 0.04g, 维生素 B_1 0.08g, 维生素 B_2 2g, 泛酸钙 1g, 肌醇 20g。

总还原糖浓度采用斐林滴定法测定, 葡萄糖浓度用葡萄糖氧化酶法测定, 木糖浓度从总还原糖与葡萄糖浓度的差值计算得到。细胞浓度采用比色法测定。

2 单碳源 SCP 间歇培养动力学模型

单碳源 SCP 间歇培养采用逻辑增殖模型^[1]

$$X = \frac{X_0 \cdot e^{a't}}{1 - b \cdot X_0 \cdot (1 - e^{a't})} \quad (1)$$

$$\frac{dS}{dt} = -k \cdot S \cdot X \quad (2)$$

由 $(S_0 - S) \cdot Y_{X/S} = (X - X_0)$, 和式(2)结合

并积分得:

式(1)及(3)中的参数 a 、 b 、 a' 、 b' 可以从单碳源间歇培养的实验数据回归得到。

3 双碳源 SCP 间歇培养动力学模型

根据 Tyree 等人^[2]的研究结果, 葡萄糖对木糖利用酶系的诱导的阻遏作用依赖于浓度对比关系, 根据我们的实验观察, 对于树状假丝酵母和热带假丝酵母, 只有当葡萄糖浓度分别下降到约 1.0 和 4.0g/L 以下时, 木糖才开始被利用, 若设双碳源 SCP 培养时葡萄糖浓度降到上述数值所需的时间为 t_0 , 则可将双碳源 SCP 间歇培养分为两个阶段:

$0 < t < t_0$ 时, 只代谢葡萄糖

$t_0 < t < t_c$ 时, 只代谢木糖

对这两个阶段都可以用逻辑增殖模型来描述, 则

第一阶段:

$$X = \frac{X_{10} \cdot e^{a_g t}}{1 - b_g \cdot X_{10} \cdot (1 - e^{a_g t})} \quad (6)$$

$$S_g = \frac{S_{g0} \cdot e^{a_g t} - a'_g \cdot t}{1 - b'_g \cdot S_{g0} \cdot (1 - e^{-a'_g t})} \quad (7)$$

$$S_x = S_{x0} \quad (8)$$

第二阶段:

$$X = \frac{X_{20} \cdot e^{a_x (t-t_0)}}{1 - b_x \cdot X_{20} \cdot (1 - e^{a_x (t-t_0)})} \quad (9)$$

$$S_x = \frac{S_{x0} \cdot e^{-a'_x (t-t_0)}}{1 - b'_x \cdot S_{x0} \cdot (1 - e^{-a'_x (t-t_0)})} \quad (10)$$

$$S_g = 0 \quad (11)$$

式中, X_{20} 及 S_{x0} 分别表示当 $t=t_0$ 时的微生物及木糖的浓度。

4 双碳源 SCP 流加培养的动力学模型

双碳源 SCP 流加培养的开始阶段仍属于间歇培养, 因此, 仍可采用上述逻辑增殖模型描述。当流加操作开始后, 在操作中应尽可能地使培养液中两种碳源的浓度保持恒定, 即 $S_g, S_x = \text{常数}$ 。葡萄糖和木糖同时被消耗^[10], 流加阶段是一个变体积过程, 考虑到流加液中的细胞密度为零, 因此对于细胞密度, 可写出:

$$\frac{dX}{dt} = r_x - \frac{F}{V} \cdot X \quad (12)$$

细胞增长速率 r_x 应是由葡萄糖代谢和木糖代谢的共同贡献,若设由葡萄糖和木糖代谢的贡献分数分别为 β_g 和 β_x , 则根据逻辑增殖模型可得:

$$r_x = a_g \cdot \beta_g \cdot X \cdot (1 - b_g \cdot \beta_g \cdot X) + a_x \cdot \beta_x \cdot X \cdot (1 - b_x \cdot \beta_x \cdot X) = a' \cdot (1 - b' \cdot X) \cdot X \quad (13)$$

式中, $a' = a_g \cdot \beta_g + a_x \cdot \beta_x \quad (14)$

$$b' = \frac{a_g \cdot b_g \cdot \beta_g^2 + a_x \cdot b_x \cdot \beta_x^2}{a_g \cdot \beta_g + a_x \cdot \beta_x} \quad (15)$$

根据假设,在流加操作阶段培养液中的两种碳源浓度基本保持不变,即流加的碳源全部被消耗,即:

$$F \cdot (S_g + S_x) = F \cdot S_0 = V \cdot (r_{xg} + r_{xx}) = V \cdot (r_{xg}/Y_{X/Sg} + r_{xx}/Y_{X/Sx}) = V \cdot a' \cdot (1 - b' \cdot X) \cdot X \quad (16)$$

式中: $a_1' = \frac{a_g \cdot \beta_g}{Y_{X/Sg}} + \frac{a_x \cdot \beta_x}{Y_{X/Sx}} \quad (17)$

$$b_1' = \frac{a_g \cdot b_g \cdot \beta_g^2 / Y_{X/Sg} + a_x \cdot b_x \cdot \beta_x^2 / Y_{X/Sx}}{a_g \cdot \beta_g / Y_{X/Sg} + a_x \cdot \beta_x / Y_{X/Sx}} \quad (18)$$

将式 (13)、(16) 代入式 (12), 即得:

$$\frac{dX}{dt} = a' \cdot (1 - b' \cdot X) \cdot X - a_1' \cdot (1 - b_1' \cdot X) \cdot X^2 / S_0 \quad (19)$$

式 (19) 可写为如下的形式:

$$\frac{dX}{dt} = a_1 \cdot (1 - b_1 \cdot X) \cdot (1 - c_1 \cdot X) \cdot X \quad (20)$$

式中: $a_1 = a', b_1 + c_1 = \frac{a' \cdot b' \cdot S_0 + a_1'}{S_0 \cdot a'}, b_1 \cdot c_1 = \frac{a_1' \cdot b_1'}{S_0 \cdot a'}$

式 (20) 积分可得:

$$A \cdot \ln \frac{X}{X_0} + B \cdot \ln \frac{D - X}{D - X_0} + C \cdot \ln \frac{E - X}{E - X_0} = t \quad (21)$$

式中: $A = \frac{1}{a_1}, B = \frac{b}{a_1(c_1 - b_1)}, C = \frac{c_1}{a_1(b_1 - c_1)}, D = \frac{1}{b_1}, E = \frac{1}{c_1}$

参数 A、B、C、D、E 可以直接从实验数据回归得到。

5 结果与讨论

5.1 单碳源 SCP 间歇培养动力学模型

用式 (1) 及 (3) 对两种酵母单碳源 SCP 间歇培养实验数据进行了拟合,拟合得到的模型参数列于表 1。用表 1 中的参数计算得到的底物消耗及菌体增长曲线与实验数据的比较见图 1~4。可以看到逻辑增长模型可以较好地拟合实验数据。从表中列出的参数可知,热带假丝酵母的 a 及 a' 值均大于树状假丝酵母的相应值,说明热带假丝酵母的底物消耗及菌体生长均比较快,另外,两种酵母在葡萄糖培养基中得到的 a 值都比在木糖培养基中生长时要大,说明葡萄糖是一种更易被代谢的碳源。表 1 中的模型参数适用于 *C. arborea* 和 *C. tropicalis* 以葡萄糖或木糖为底物在不同糖浓度下的培养。

表 1 单碳源培养时的动力学模型参数

Table 1 Parameters of kinetic model for culture of SCP with single substrate

Paramete	a (1/h)		b (L/g)		a' (1/h)		b' (L/g)	
	(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)
Glucose	0.3268	0.4376	0.0334	0.0339	0.5065	1.0874	0.0248	0.0219
Xylose	0.2270	0.5452	0.0662	0.0904	0.3448	1.6992	0.0451	0.0452

(1) *C. arborea* (2) *C. tropicalis*

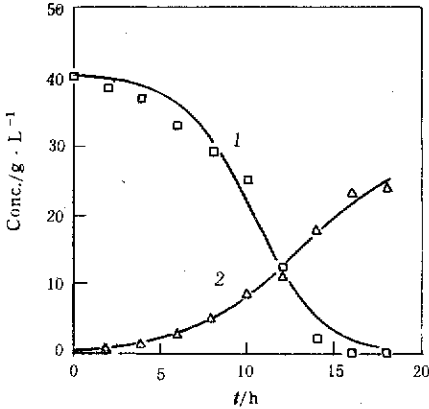


图 1 *C. arborea* 以葡萄糖为底物间歇培养的实验数据与模型计算曲线

Fig. 1 Experimental data and model simulation for *C. arborea* batch culture with glucose as carbon source
1. Glucose, 2. Cell
Simulation is shown with solid lines

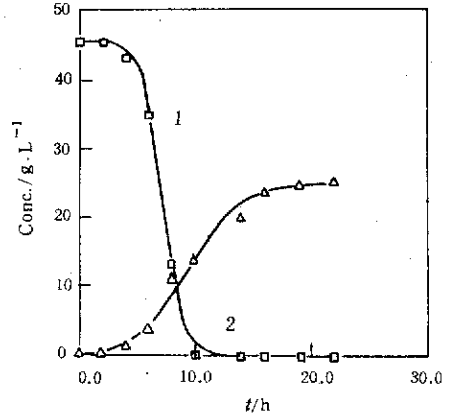


图 2 *C. tropicalis* 以葡萄糖为底物间歇培养的实验数据与模型计算曲线

Fig. 2 Experimental data and model simulation for *C. tropicalis* batch culture with glucose as carbon source
Legend is the same as Fig. 1

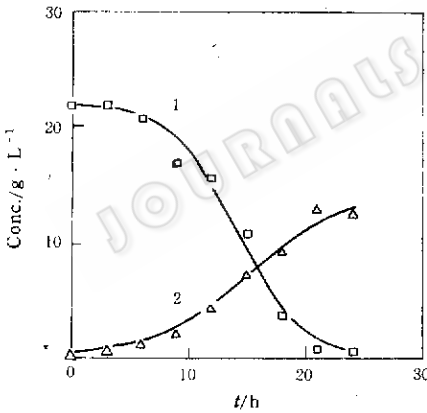


图 3 *C. arborea* 以木糖为底物间歇培养的实验数据与模型计算曲线

Fig. 3 Experimental data and model simulation for *C. arborea* batch culture with xylose as carbon source
Legend is the same Fig. 1

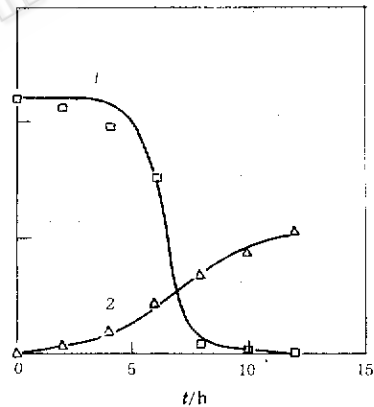


图 4 *C. tropicalis* 以木糖为底物间歇培养的实验数据与模型计算曲线

Fig. 4 Experimental data and model simulation for *C. tropicalis* batch culture with xylose as carbon source
Legend is the same as Fig. 1

5. 2 双碳源 SCP 间歇培养的动力学模型

用式 (6) 至 (11) 对两种酵母的双碳源 SCP 间歇培养实验数据的拟合结果示于图 5 及图 6, 拟合得到的模型参数列于表 2。从图中可以看到, 该模型可以正确地描述双碳源 SCP 间歇培养中的二次增长现象, 模型计算曲线与实验数据符合良好。表 2 中的模型参数适用于 *C. arborea* 和 *C. tropicalis* 以双碳源 (葡萄糖和木糖) 为底物的间歇培养。

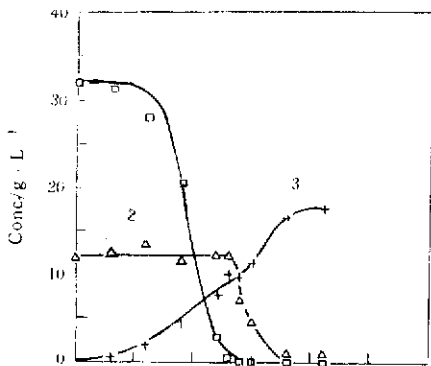


图5 *C. arborea* 以双碳源为底物间歇培养的实验数据与模型计算曲线

Fig. 5 Experimental data and model simulation for *C. arborea* batch culture with double substrates: 1. Glucose, 2. Xylose, 3. Cell
Simulation is shown with solid lines

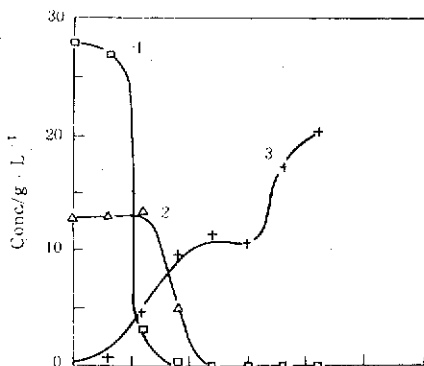


图6 *C. tropicalis* 以双碳源为底物间歇培养的实验数据与模型计算曲线

Fig. 6 Experimental data and model simulation for *C. tropicalis* batch culture with double substrates
Legend is the same as Fig. 5

表2 双碳源间歇培养时的动力学模型参数

Table 2 Parameters of kinetic model for culture of SCP with double substrates

Parameter	a_x (1/h)		b_x (L/g)		a_x' (1/h)		b_x' (L/g)	
	(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)
Strain	(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)
Value	0.3651	0.5302	0.0813	0.0892	0.8841	1.7772	0.0311	0.0357
Parameter	a_x (1/h)		b_x (L/g)		a_x' (1/h)		b_x' (L/g)	
Value	0.5084	0.5290	0.0551	0.0480	1.9015	2.0061	0.0797	0.0769

(1) *C. arborea* (2) *C. tropicalis*

5.3 双碳源 SCP 流加培养的动力学模型

根据流加模型表达式 (21) 及流加培养实验值, 对模型参数进行拟合, 得到的模型参数为: $A=24.7694$, $B=223.4719$, $C=84.1982$, $D=69.8154$, $E=49.2287$ 数据拟合结果见图 7, 从图中可以看到, 拟合值和实验值吻合良好。模型参数适用于底物浓度波动不大的双碳源 (葡萄糖和木糖) 流加培养实验。

符号说明

- a, b 菌体生长模型参数 (1/h, L/g)
- a', b' 底物消耗的模型参数 (1/h, L/g)
- a_x, b_x 菌体利用葡萄糖生长时的模型参数 (1/h, L/g)
- a_x', b_x' 葡萄糖 (底物) 消耗的模型参数 (1/h, L/g)
- a_y, b_y 菌体利用木糖生长时的模型参数 (1/h, L/g)
- a_y', b_y' 木糖 (底物) 消耗的模型参数 (1/h, L/g)

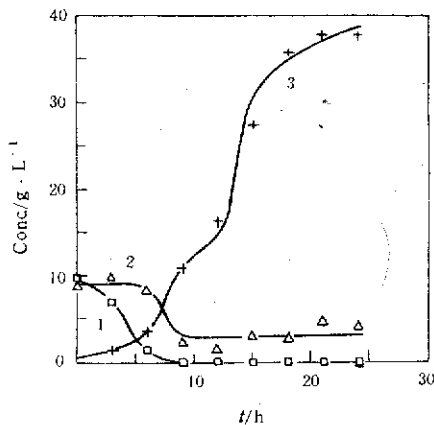


图7 *C. tropicalis* 以双碳源为底物流加培养的实验数据与模型计算曲线
Fig. 7 Experimental data and model simulation for *C. tropicalis* fed-batch culture with mixed substrates
Legend is the same as Fig. 5

β_g, β_x	流加培养时由葡萄糖和木糖生成的菌体分率		
F	流加速率 (L/h)	S_{g0}	葡萄糖的初始浓度 (g/L)
k	反应速率常数 (L/g · h ⁻¹)	S_{x0}	木糖的初始浓度 (g/L)
r_x	菌体生长速率 (g/L · h ⁻¹)	t_0	菌体开始利用木糖的时间 (h)
r_{xg}	菌体利用葡萄糖的生长速率 (g/L · h ⁻¹)	V	培养液体积 (L)
r_{xx}	菌体利用木糖的生长速率 (g/L · h ⁻¹)	X	菌体浓度 (g/L)
r_s	底物消耗速率 (g/L · h ⁻¹)	X_0	初始菌体浓度 (g/L)
r_{sg}	葡萄糖消耗速率 (g/L · h ⁻¹)	X_{10}	混合糖培养时最初的菌体浓度 (g/L)
r_{sx}	木糖消耗速率 (g/L · h ⁻¹)	X_{20}	混合糖培养时, 葡萄糖耗完时的菌体浓度 (g/L)
S	底物浓度 (g/L)	$Y_{x/s}$	菌体得率因子
S_g	葡萄糖浓度 (g/L)	Y_{x/s_g}	菌体利用葡萄糖生长的得率因子
S_x	木糖浓度 (g/L)	Y_{x/s_x}	菌体利用木糖生长的得率因子
S_0	初始底物浓度 (g/L)		

参 考 文 献

- [1] Fududa H, Shiotani T, Okada W *et al.* J Ferment Technol, 1978, 56 (4): 354~361.
- [2] Lee C H, Tsang S K, Urakabe R *et al.* Biotechnol Bioeng, 1979, 21: 1~17.
- [3] Mackhek F, Fencel Z, Behalova J *et al.* J Biotechnol Bioeng, 1974, 4: 977~991.
- [4] Callihan C D, Clemer J E. Economic Microbiol 1979, 4: 351~357.
- [5] Yoon H, Klinzing G, Blanch H W. Biotechnol Bioeng, 1977, 19: 1193~1210.
- [6] Kompala D S. Ph. D thesis. Purdue University, Lafayette, 1983, 68~79.
- [7] Kompala D S, Ramkrishna D, George T Tsao. Biotechnol Bioeng, 1984, 26: 1272~1281.
- [8] Imanaka T, Hboka K O, Yoshida T *et al.* J Ferment Technol, 1972, 50: 633~637.
- [9] Moser A, Preprints. "1st Eur Congress on Biotechnol, Parl 1", 1978: 88~94.
- [10] Yoon H, Klinzing G, Blanch H W. Biotechnol Bioeng, 1977, 19: 1375~1386.
- [11] James E, Bailey, Ollis D F. Biochemical Engineering Fundamental, 1985: 404~406.
- [12] Tyree R W *et al.* Biotechnol Letter, 1990, 12 (1): 51~56.

The Dynamic Models of Batch and Fed-batch Cultivation of SCP with Double Carbon Sources

Liu Gang Zheng Zhongming Song Da Cen Peilin

(Laboratory of Secondary Resources Chemical Engineering Zhejiang University, Hangzhou 310027)

Abstract The unstructured logistic models were applied to simulate the kinetic process of the SCP batch culture with two species of yeast, in which glucose, xylose or a mixture of glucose and xylose were used as carbon sources. A modified logistic growth model was used to describe the fed-batch process by using of mixed carbon sources. The model parameters were simulated with the experimental data. The simulated curves by the models were in good agreement with the experimental data.

Key words Double substrates, batch cultivation, fed-batch cultivation, kinetic model