

# 固定化细胞分布对动力学影响的模型化研究

魏东芝 袁渭康 陈敏恒

(华东理工大学 上海 200237)

袁中一

(中国科学院上海生物化学研究所 上海 200231)

**摘要** 通过对固定化 *Gluconobacter oxydans* 和 *Bacillus cereus* 的活细胞系统的研究,提出了固定化细胞不均匀分布模型,将此类分布与均匀分布(最劣分布模型)进行比较,分析了它们对固定化细胞内部的基质浓度分布、有效速率因子和选择率的影响,指出不均匀分布和均匀分布对于该固定化活细胞系统的动力学行为无显著影响,这一模型分析结果在实验中得以验证。通过无因次化分析,建立了适用于固定化生物催化剂动力学研究的模型方法。

**关键词** 固定化细胞,分布模型,有效速率因子,选择率

自二十世纪 60 年代初,固定化酶技术作为酶学领域的新技术逐渐发展起来,随着固定化完整细胞新方法的相继建立,固定化生物催化剂技术得到全面发展。但多年来,固定化生物催化剂用于工业生产的实例甚少,除经济成本问题外,对固定化生物催化剂动力学行为的研究不够深入也是原因之一,其中,酶或细胞在载体中的分布是一个很重要的方面,以往的研究多限于固定化酶或死细胞系统,有关的讨论结果缺乏普遍性。

在固定化活细胞增殖过程中,由于空间效应、分隔效应和传质阻力 3 种因素的影响<sup>(5)</sup>,细胞在载体中往往形成不均匀分布<sup>(2~4)</sup>,对于生化反应,这种分布会因正负反应级数不同表现出不同的影响形式,反映在转化速率和选择率上则具体地表现为使过程改善或恶化,有些甚至得不到预期产品。因此,有必要对固定化活细胞的分布问题进行深入研究。本文选用以 K-卡拉胶为载体包埋 *Gluconobacter oxydans* 和 *Bacillus cereus* 的活细胞组成的共固定化系统<sup>(5,6)</sup>,反应过程的主要基质为 L-山梨糖,产物为维生素 C 前体 2-酮基-L-古龙酸。在细胞本征动力学模型的基础上<sup>(7,8)</sup>,研究了固定化细胞的分布模型及其对固定化细胞动力学行为的影响,对固定化生物催化剂的设计和动力学研究作出了新的尝试。

## 1 模型理论

### 1.1 固定化细胞的动力学模型

根据已建立的维生素 C 两步发酵过程本征动力学模型<sup>(7)</sup>和对固定化细胞性质的分析,认为细胞经固定化和增殖培养后,其本征动力学形式并未改变,所不同的只是细胞增殖与死亡处于动态平衡状态,这部分的细胞增殖是十分有限的,对反应过程不构成明显的影响,在固定化细胞动力学模型中,可以忽略细胞生长的影响,模型方程为:

$$\frac{dp}{dt} = \frac{v_m \cdot c}{K_m + c} \cdot x \quad (1)$$

$$\frac{dc}{dt} = -\frac{1}{v_{p,i}} \cdot \frac{dp}{dt} - mx \quad (2)$$

本文于 1995 年 9 月 2 日收到。

## 1.2 有效速率因子和选择率

扩散阻力造成基质浓度分布, 固定化细胞内 (除同一球面外) 局部各点的基质浓度各不相同, 速率也各不相同 (零级反应除外)。整个固定化细胞颗粒所催化的真实反应速率称为有效速率或表观速率。等量细胞全部暴露在主体溶液浓度下的反应速率称为本征速率。将有效速率与本征速率之比定义为有效速率因子。据此定义可推得:

$$\eta_i = \frac{\int_0^R \left( \frac{1}{Y_{p/s}} \cdot \frac{V_m \cdot c_r}{K_m + c_r} \cdot x_r + m \cdot x_r \right) r^2 dr}{R^3 \left( \frac{1}{Y_{p/s}} \cdot \frac{V_m \cdot c_1}{K_m + c_1} \cdot x_s + m \cdot x_s \right)} \quad (3)$$

为了便于数学处理并使讨论结果具有普遍性, 令:

$$r_1 = \frac{c_1}{K_m} \quad (4);$$

$$r_2 = \frac{m}{V_m/Y_{p/s}} \quad (5)$$

将式(3)化为无因次式:

$$\eta_i = \frac{\int_0^1 \left( \frac{s}{1 + r_1 s} + \frac{r_2}{r_1} \right) f(\zeta) x_m \cdot \zeta^2 \cdot d\zeta}{\left( \frac{1}{1 + r_1} + \frac{r_2}{r_1} \right) x_s} \quad (6)$$

反应选择率定义为用于产物合成的有效速率与总有效速率的比值, 即:

$$\beta = \frac{\int_0^R \frac{1}{Y_{p/s}} \cdot \frac{V_m \cdot c_r}{K_m + c_r} \cdot x_r \cdot r^2 dr}{\int_0^R \left( \frac{1}{Y_{p/s}} \cdot \frac{V_m \cdot c_r}{K_m + c_r} \cdot x_r + m \cdot x_r \right) r^2 dr} \quad (7)$$

其无因次化形式为:

$$\beta = \frac{\int_0^1 \frac{s}{1 + r_1 \cdot s} f(\zeta) \cdot \zeta^2 \cdot d\zeta}{\int_0^1 \left( \frac{s}{1 + r_1 \cdot s} + \frac{r_2}{r_1} \right) f(\zeta) \cdot \zeta^2 \cdot d\zeta} \quad (8)$$

## 1.3 固定化细胞内部扩散 - 反应微分方程

为了建立球状固定化细胞的扩散 - 反应微分方程, 做如下假定: (1) 基质浓度只存在径向梯度; (2) 在颗粒内部, 物质扩散服从 Fick 定律; (3) 扩散 - 反应系统处于稳态; (4) 整个系统保持恒温。通过物料衡算建立了微分方程<sup>(9)</sup>:

$$\frac{ds^2}{d\zeta^2} \cdot \frac{2}{\zeta} \cdot \frac{ds}{d\zeta} = \varphi^2 \left( \frac{s}{1 + r_1 \cdot s} + \frac{r_2}{r_1} \right) f(\zeta) \quad (9)$$

边界条件为:

$$\frac{ds}{d\zeta} = 0, \quad \zeta = 0 \quad (10); \quad s = 1, \quad \zeta = 1 \quad (11)$$

应用正交配置理论, 可以求解上述微分方程, 计算固定化生物催化剂内部的基质分布值, 进而运用 Rung-Kutta 积分法等数学手段求取有效速率因子和选择率<sup>(10)</sup>。

## 1.4 固定化生物催化剂内部细胞分布模型

基质扩散往往造成固定化细胞密度从外向内逐渐减小的分布, 亦即所谓的下凹型曲线分布, 在细胞量恒定的条件下, 这种分布与均匀分布相比, 对于正级数的反应反较优分布, 换言之, 在细胞量恒定的条件下, 均匀分布对于正级数反应属于最劣分布, 而细胞全部集中于载体表面的分布为最优分布。为了使比较结果具有普遍性, 需要寻求典

型的较优分布,为此,首先在均匀分布模型的基础上,计算固定化细胞内的基质分布,将其作为细胞分布进一步计算基质分布,如此重复直至模拟出固定化细胞颗粒中心的基质浓度恰为零时的基质浓度分布,并以此近似作为固定化细胞浓度分布,其数学模型为:

$$f(\xi) = 0.1185 + 0.60032\xi^2 + 0.24480\xi^4 \quad (12)$$

计算结果表明,将这种下凹曲线型分布模型作为固定化细胞分布模型。对于考察细胞分布对固定化细胞动力学的影响具有较好的代表性。该模型分布曲线见图 1。

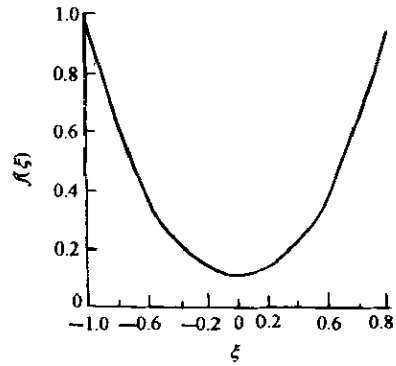


图 1 细胞不均匀分布曲线

Fig. 1 Curve of nonuniform cell distribution

## 2 结果与讨论

### 2.1 细胞分布对基质浓度分布的影响

在固定化细胞内部,基质扩散和反应同时进行,形成一定的浓度分布,考察这种分布有助于分析生物催化剂内部的反应状态,从而为固定化生物催化剂的设计提供理论依据。图 2 和图 3 分别表示细胞均匀与不均匀分布两种情况下,固定化细胞内部基质浓度的分布曲线。可以看出细胞不均匀分布可以使固定化细胞内部维持较高的基质浓度,这恰恰表明了细胞不均匀分布有利于正级数的反应。无因次数群  $r_1$  值对基质浓度分布的影响十分显著,  $r_1$  值越小(或主体溶液中基质浓度越低),基质浓度沿径向的变化越大,当  $r_1 = 0.0677$  时,在无因次半径约为 0.5 处,基质浓度已趋于零。此时靠近颗粒中心部分的细胞已不再起作用,这无疑大大降低了有效反应速率。在进行固定化生物催化剂设计时,应首先根据理论模型计算出临界半径,按照临界半径的尺寸制备固定化生物催化剂。

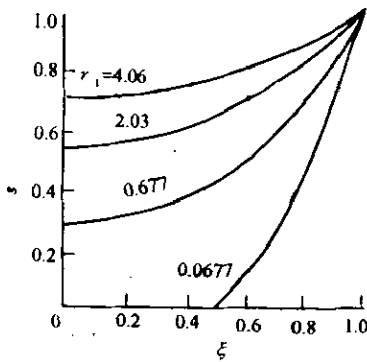


图 2 细胞均匀分布对基质分布的影响

Fig. 2 Substrate distribution in immobilized cell with uniform distribution  
( $\varphi^2 = 7.785, r_2 = 0.1219$ )

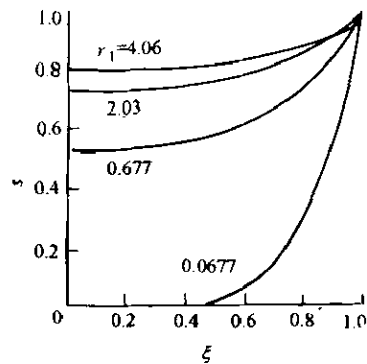


图 3 细胞不均匀分布对基质分布的影响

Fig. 3 Substrate distribution in immobilized cell with nonuniform distribution  
( $\varphi^2 = 7.785, r_2 = 0.1219$ )

在图3中,当 $r_1=4.06$ 时,在 $\zeta=1$ 处出现 $s<1$ ,说明外部传质阻力已对反应过程产生了明显的影响,因此,细胞不均匀分布更容易造成外部传质限制,在较高的基质浓度下操作时,改善外部传质条件是必要的。

## 2.2 细胞分布对有效速率因子和选择率的影响

图4和图5描绘了有效速率因子和选择率随无因次数群 $r_1$ 变化的结果。可以看出,不同类型的细胞分布对计算结果并未产生太大的影响,特别是在 $r_1$ 值较高的情况下,细胞分布的影响可以忽略。在固定化*G. oxydans*和*B. cereus*系统以及具有相近的无因次数群 $\varphi^2$ 和 $r_2$ 的其他系统,皆可近似作为细胞均匀分布来处理,这种简化将给理论计算和分析带来很大的方便。值得注意的是:当 $r_1$ 值较小时(如 $r_1<0.5$ ),选择率随 $r_1$ 值的减小而急剧下降。要获得较高的产物收率,应力图使生物转化过程在较高的基质浓度下进行。对批式发酵过程,当转化到基质浓度很低时(即 $r_1$ 很低时)继续延长发酵时间虽然对于降低溶液中的基质浓度是有效的,但此时的基质消耗已不再有效地用于合成产物。

从图4中理论计算值与实验值的比较结果可以看出:(1)实验值基本上介于两种细胞分布模型的计算值之间。一方面证实了所选取的两种分布模型具有很好的代表性,另一方面证实了所选取的两种分布模型用于实际过程分布的可靠性。(2)细胞均匀分布模型用于固定化*G. oxydans*和*B. cereus*系统及相近系统,即可简化计算分析又可有效的反映真实过程,因而可优先选用。

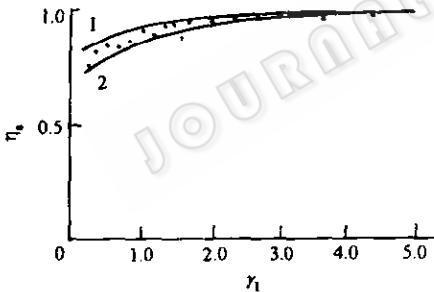


图4 细胞分布对有效速率因子的影响

Fig. 4 Effect of cell distribution on effective rate factor

- 1. Nonuniform distribution
  - 2. Uniform distribution
  - Experimental data
- ( $\varphi^2=7.785$ ,  $r_2=0.1219$ )

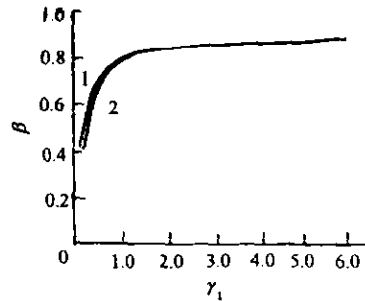


图5 细胞分布对选择率的影响

Fig. 5 Effect of cell distribution on selective yield

- 1. Nonuniform distribution
  - 2. Uniform distribution
- ( $\varphi^2=7.785$ ,  $r_2=0.1219$ )

## 符号说明

$c$ ——基质浓度/ $\text{kg} \cdot \text{m}^{-3}$

$c_1$ ——主体溶液中基质浓度/ $\text{kg} \cdot \text{m}^{-3}$

$c_r$ ——固定化生物催化剂内半径 $r$ 处基质浓度

$D_c$ ——固定化细胞内基质有效扩散系统  
/ $\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$

$K_m$ ——动力学参数/ $\text{kg} \cdot \text{kg}^{-1}$

- $\rho$ ——产物浓度 / $\text{kg} \cdot \text{m}^{-3}$
- $r$ ——固定化生物催化剂半径 / $\text{m}$
- $R$ ——固定化生物催化剂最大半径 / $\text{m}$
- $r_1$ ——无因次数群 / $c_1 \cdot k_m^{-1}$
- $r_2$ ——无因次数群  $\left( \frac{m}{V_m/Y_{p/s}} \right)$
- $s$ ——无因次基质浓度 / $c_s \cdot c_1^{-1}$
- $t$ ——时间 / $\text{s}$
- $V_m$ ——动力学参数(产物合成最大速率)/ $\text{kg} \cdot (\text{m} \cdot \text{s})^{-1}$
- $x$ ——细胞浓度 / $\text{kg} \cdot \text{m}^{-3}$
- $f(\xi)$ ——细胞分布密度函数
- $m$ ——细胞存活维持系数 / $\text{kg} \cdot (\text{kg} \cdot \text{s})^{-1}$
- $x_0$ ——固定化细胞内的平均细胞浓度 / $\text{kg} \cdot \text{m}^{-3}$
- $x_m$ ——固定化细胞表面球壳内的细胞浓度 / $\text{kg} \cdot \text{m}^{-3}$
- $x_r$ ——半径为  $r$  处固定化细胞球壳内的细胞浓度 / $\text{kg} \cdot \text{m}^{-3}$
- $Y_{p/s}$ ——基质的产物得率 / $\text{kg} \cdot \text{kg}^{-1}$
- $\xi$ ——固定化细胞无因次半径 / $r \cdot R^{-1}$
- $\phi^2$ ——Thiele 模数  $\phi^2 = \frac{(V_m/Y_{p/s})R^2 x_m}{D_s K_m}$
- $\eta$ ——有效速率因子
- $\beta$ ——选择率

## 参 考 文 献

- [1] Sonomoto K, Matsuno R, Tanaka A *et al.* J Ferment Technol, 1984, 2: 157~160.
- [2] osanna B, Rehm H J. Appl Microbial Biotechnol, 1986, 23: 163~166.
- [3] Wada M. Eur J Appl Microbial Biotechnol, 1980, 10: 257~259.
- [4] Nagashima M, Azuma M, Noguchi S *et al.* Biotechnol Bioeng, 1984, 26: 992~996.
- [5] 魏东芝, 袁清康, 陈敏恒等. 生物技术, 1992, 2 (3): 32~36.
- [6] 魏东芝, 袁清康, 袁中一等. 生物工程论文集, 北京: 化学工业出版社, 1994, 1: 90~94.
- [7] 魏东芝, 袁清康, 袁中一等. 生物工程学报, 1992, 8 (3): 277~292.
- [8] 魏东芝, 袁清康, 袁中一等. 生物工程学报, 1993, 9 (1): 31~35.
- [9] 魏东芝, 袁清康, 尹光琳等. 生物工程论文集. 北京: 化学工业出版社, 1994, 1: 32~39.
- [10] Villadsen J V. Chem Eng, 1967, 22: 1483~1488.

## Studies on Modelizing the Effects of Immobilized Cell Distribution on Kinetics

Wei Dongzhi Yuan Weikang Chen Minheng

(East China University of Science and Technology, Shanghai 200237)

Yuan Zhongyi

(Shanghai Institute of Biochemistry, Academia Sinica, Shanghai 200237)

**Abstract** A nonuniform distribution model of immobilized cells was established by the studies on immobilized *Gluconobacter oxydans* and *Bacillus cereus* living cells. It was compared with uniform distribution model. Effects of the two typical cell distribution on substrate distribution in immobilized biocatalyst, effective rate factor and selective yield were discussed. No obvious difference was observed between the effects of uniform cell distribution and that of nonuniform cell distribution on kinetics of immobilized *G. oxydans* and *B. cereus* living cells, which was then confirmed in experiments. The conclusion is also fit for the studies on kinetics of other immobilized biocatalyst system.

**Key words** Immobilized cell, distribution model, effective rate factor, selective yield