

赖氨酸分批发酵动力学的研究

官 衡

(华东理工大学生化工程系 上海 200237)

伦世仪

(无锡轻工大学生物工程系 无锡 214036)

摘 要 在着重考虑基质浓度对发酵过程影响的基础上,结合黄色短杆菌 FB42 发酵的具体特点,建立了一组描述赖氨酸分批发酵过程的动力学模型。结果该组模型能很好的拟合发酵过程,并在初糖浓度变化较大的范围内表现出适用性。用该组模型对赖氨酸发酵过程进行分析得到了和实际发酵相一致的结果。

关键词 赖氨酸,分批发酵,动力学,模型

分批发酵动力学模型的建立,对发酵过程工艺条件的研究、反应过程操作的优化和控制具有重要意义和实用的价值。Moser^[1]对分批发酵动力学进行了较为详细的论述,按建模方式将动力学模型分为三类:①机制模型、②数学拟合模型、③正规模型(Formal Kinetics)。微生物的反应过程非常复杂,特别是在分批发酵过程中,建立机制模型几乎是不可能。目前各国生化工程学者所提出的模型大都属于 2,3 类,这些模型从本质上来讲都是对分批发酵过程总体现象和行为的描述,是一种现象模型。从工程角度出发,建立模型是为了更深刻地了解微生物复杂的反应本质,更确切地说是在于使用模型,发现最适的操作条件,并为反应器的优化和控制服务。要实现这一目的,一个好的现象模型必须具备两个特征①模型能够定量地描述发酵过程的变化,②主要影响因子的作用能够在模型中反映出来。以此为出发点,我们结合 FB42 菌株的特点,在着重考虑了基质浓度对菌体生长和产物形成影响的基础上,建立了 FB42 菌株分批发酵的动力学模型。

1 材料与方 法

1.1 菌种

L-赖氨酸产生株黄色短杆菌(*Brevibacterium flavum*)FB42(Leu^r, Thr^r, AEC^r, str^r, AHV^r, LysHx^r) 无锡轻工大学提供。

1.2 培养基

1.2.1 斜面培养基(g/L):葡萄糖 10,牛肉膏 5,酵母膏 5,NaCl 15,琼脂 20,pH7.0。

1.2.2 种子培养基(g/L):葡萄糖 20,(NH₄)₂SO₄ 4,K₂HPO₄ 1 玉米浆 25,MgSO₄·7H₂O 0.5,豆饼水解液 5,CaCO₃ 1,pH 7.0。

本文于 1995 年 5 月 10 日收到。

1.2.3 发酵培养基(g/L): 葡萄糖 150, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 30, K_2HPO_4 1, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 玉米浆 30, 豆饼水解溶 20, 泡敌 0.3, pH7.2

1.3 发酵设备

瑞士 INFORS, 30L 实验用自控发酵罐, 发酵液溶氧指示, 温度自动控制, pH 自动控制。

1.4 培养条件

斜面活化 24h。种子在 30~32℃ 下振荡培养 17~19h。30L 的发酵罐中装液量 16L, 接种量 10%, 温度为 32℃, 通风比 16L/min, 罐压 0.05MPa(表压), 流加氨水控制所需的 pH 值, 搅拌转速根据需要设定。

1.5 分析方法

1.5.1 菌体量的测定: 样品菌液摇匀后, 吸出 0.2ml, 加入 4ml 0.25mol/L 的盐酸溶液, 于 620nm 处读 OD 值。所得 OD 值与 OD 值——菌体干重标准曲线对照, 计算出菌体浓度。

1.5.2 葡萄糖浓度: 3,5-二硝基水杨酸法^[2]。

1.5.3 赖氨酸浓度: 酸性茚三酮法^[3]。

1.6 数据处理方法

1.6.1 微分方程组的求解: 四阶龙格库特法^[4]。

1.6.2 模型参数的求解: 单纯形法^[5]。

2 结果与讨论

2.1 赖氨酸分批发酵动力学模型的建立

2.1.1 菌体生长模型

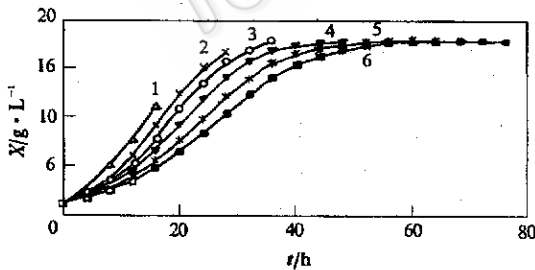


图 1 不同初糖浓度对菌体生长的影响

Fig.1 The influence of various initial concentration of glucose on cell growth

(1)^[6]、(2)^[7]、(3)^[8]式都曾用于描述过赖氨酸的分批发酵过程。

$$\frac{dX}{dt} = \mu X, \mu = 0.125S, S \leq 28\text{g/L} \quad (1)$$

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{\max} \left(1 - \frac{X}{X_{\max}}\right) X \quad (2)$$

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{\max} \left(\frac{S}{K_s + S}\right) X \quad (3)$$

(1)式为经验模型, 使用范围很窄。(2)式为 Logistic 模型, 能很好地反映分批发酵过程中因菌体浓度的增加对自身生长的抑制作用, 这在分批发酵中是普遍存在的, Logistic 模型是一个典型的 S 型曲线, 用于拟

合分批发酵的菌体生长过程有广泛的适用性。(3)式为 Monod 方程。

作者曾在连续培养中, 对 FB42 的动力学特性进行了考察, 其生长比速和限制性基质(葡萄糖)浓度的对应关系如图 2 所示。表明在基质限制的条件下, 菌体的生长符合 Monod 方程, 并计算出 $K_s = 0.8\text{g/L}$, 在分批发酵过程中基质的浓度均维持在较高的水

平,当残糖 < 10g/L 时意味着发酵终点的到来,可见在分批发酵中葡萄糖对菌体生长的制约作用不宜用 Monod 方程来描述。

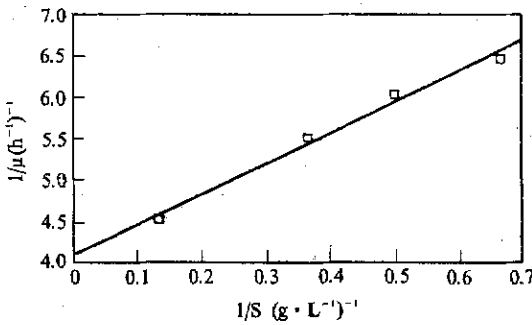


图2 连续培养中 1/S—1/μ 关系图

Fig. 2 The Relationship between 1/S and 1/μ in continuous culture of FB42

从图 1 可以看在赖氨酸分批发酵过程中:首先菌体的生长有一最大饱和浓度,其次提高初糖浓度菌体的生长速度下降,基质浓度对菌体生长有抑制作用。Logistic 模型可以很好地解释第一个现象,但对基质的作用在 Logistic 模型中没有反映。考虑到基质的抑制作用,本文提出一个描述分批发酵菌体生长的动力学模型:

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{max} \cdot X \cdot \left(1 - \frac{X}{X_{max}}\right) \cdot \left(\frac{1}{1 + S/K_i}\right) \quad (4)$$

2.1.2 产物形成模型:微生物的产物形成的过程非常复杂,为了便于研究,一些定性的

描述被提出^[9-11],其中 Gaden^[11]的观点最为广泛接受,从产物形成与能量代谢的内在联系出发,Gaden 将产物形成的类型分三类:①产物的形成与能量代谢相偶联,②产物的形成和能量代谢部分偶联,③产物的形成和能量代谢没有联系。

$$\frac{dP}{dt} = \alpha \frac{dX}{dt} + \beta X \quad (5)$$

(5)式为 Luedeking - Piret^[12]方程,式中 $\alpha \neq 0, \beta = 0$ 可表示一类发酵, $\alpha \neq 0, \beta \neq 0$ 可表示二类发酵, $\alpha = 0, \beta \neq 0$ 可表示三类发酵。由于 Piret 方程既能反映出伴随着菌体生长产物的形成速度,也能反映出独立于菌体生长之外,细胞催化底物形成产物的速度,对一般的发酵过程 Piret 方程原则上都能适用。曾用该模型描述过赖氨酸发酵,能较好地拟合发酵过程,结果表明赖氨酸发酵为二类发酵^[8]。

但 Piret 方程仅仅是一个总体描述,从 Piret 方程中反映不出基质浓度的变化对产物形成的影响。Bajpai^[13]曾提出了一个基质非竞争抑制模型(6)式用来描述青霉素发酵产物形成过程,很好地解释了高浓度碳源对青霉素形成的抑制作用,模型计算值与实验值吻合极好。

$$\frac{dP}{dt} = K \cdot \left(\frac{S}{S + K_{sp}}\right) \cdot \left(\frac{1}{1 + S/K_{ip}}\right) X \quad (6)$$

赖氨酸发酵不同于青霉素发酵,前者属于二类发酵,后者是一个典型的三类发酵。但高浓度基质对产物形成的抑制作用在赖氨酸发酵中是存在的,研究表明^[14],维持较低的糖浓度有利于赖氨酸的形成。因此为了能反映出这种现象,本文结合 Bajpai 和 Piret 方程,建立出如下的产物形成动力学模型:

$$\frac{dP}{dt} = K_x \cdot \frac{dX}{dt} + K_2 \cdot \left(\frac{S}{S + K_{sp}}\right) \cdot \left(\frac{1}{1 + S/K_{ip}}\right) X \quad (7)$$

2.1.3 基质消耗模型

$$\left(-\frac{dS}{dt}\right) = \left(-\frac{dS}{dt}\right)_x + \left(-\frac{dS}{dt}\right)_p + \left(-\frac{dS}{dt}\right)_m$$

即:

$$\left(-\frac{dS}{dt}\right) = \frac{1}{Y_x} \cdot \frac{dX}{dt} + \frac{1}{Y_p} \cdot \frac{dP}{dt} + mX \tag{8}$$

以(8)式作为描述赖氨酸发酵的基质消耗模型, Y_x 、 Y_p 为基质转化为菌体和产物的真实转化率。

2.2 模型的验证

表 1 模型参数取值汇总

Table 1 The value of parameters of the model

Parameter	μ_{max}	X_{max}	K_i	K_1	K_2	K_{sp}	K_{ip}	Y_x	Y_p	m
Value	0.28	17.75	102.1	0.46	0.18	12.2	41.5	0.51	0.61	0.04

表 2 模型计算值与实验值的比较

Table 2 The comparison between calculated value and experimental data

t/h	X/g·L ⁻¹		P/g·L ⁻¹		S/g·L ⁻¹	
	I	II	I	II	I	II
0	1.18	1.20	0	0	150.1	150.0
8	2.80	2.70	1.09	1.21	148.0	144.5
16	5.73	5.56	3.63	3.70	139.0	133.5
24	9.90	9.81	7.80	8.08	120.1	115.6
32	14.2	13.9	14.2	14.3	95.5	93.3
40	16.3	16.5	22.1	21.9	70.3	71.4
48	17.3	17.4	31.2	30.8	47.2	49.2
56	17.5	17.7	42.1	41.2	25.0	26.0
62	17.6	17.7	50.1	49.4	6.0	8.1

注: I Experimental data II Calculated value

综上所述, 得出了一组用于描述赖氨酸分批发酵过程的动力学模型(4)、(7)、(8)式。用该组模型对赖氨酸分批发酵的实验数据进行拟合, 微分方程组的求解采用四阶龙格库

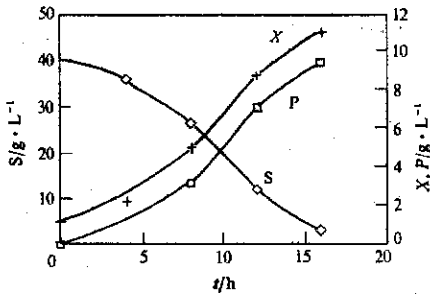


图 3 初糖 40g/L

Fig.3 The initial concentration of glucose is 40g/L

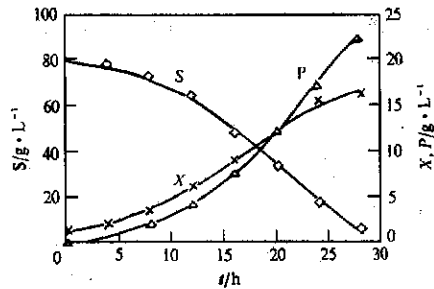


图 4 初糖 80g/L

Fig.4 The initial concentration of glucose is 80g/L

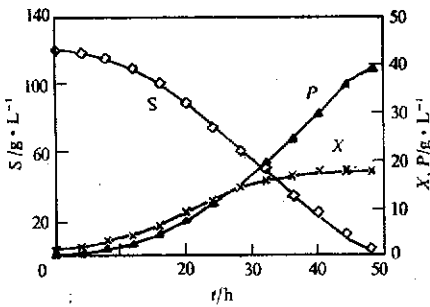


图 5 初糖 120g/L
Fig.5 The initial concentration of glucose is 120g/L

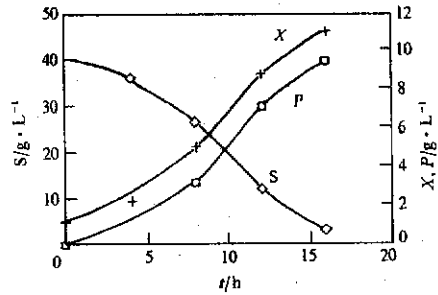


图 6 初糖 180g/L
Fig.6 The initial concentration of glucose is 180g/L

特法,模型参数的优化采用单纯形法,经计算机优化后,计算出模型参数见表 1。

表 2 为模型计算值与实验值的比较,从表 2 中可以看出用该组模型拟合赖氨酸分批发酵过程,除极个别点外,误差均小于 10%。

在建立分批发酵动力学模型的过程中,模型参数的求解和模型的验证是基于初糖为 150g/L 条件下的发酵数据,进一步在更广的初糖范围内对模型的适用性进行了考察。

图 3~6,分别为初糖 40、80、120、180g/L 的发酵实验值与模型计算值比较(图中线表示模型计算值,点表示实验值),从图中可以看出该组模型对初糖 40、80、120g/L 的发酵拟合很好,只在初糖浓度为 180g/L 时基质浓度的模型计算值与实验值有较大的偏差。因此用该组模型描述赖氨酸的分批发酵过程,在较广的初糖浓度范围内均表现出适用性。

2.3 分批发酵的模型分析

模型建立的目的是为了选择合适的操作条件和操作方式,下面用上述模型对初糖浓度对发酵过程的影响进行了分析。

2.3.1 初糖浓度对产物形成速度的影响:

结合(4),(7)式产物的形成速度为:

$$\frac{dP}{dt} = [K_1 \mu_{max} (1 - \frac{X}{X_{max}}) (\frac{1}{1 + S/K_s} + K_2 (\frac{S}{S + K_{sp}} (\frac{1}{1 + S/K_{ip}}))] \cdot X = A \cdot X \quad (9)$$

从(9)式中可以看出,维持高的菌体浓度对产物的形成是有利的。菌体的合成需要消耗碳源(以 $X_{max} = 17.75\text{g/L}$, $Y_x = 0.51$ 计,大约需要 34g/L 的碳源,实际发酵中,由于产物的合成和细胞的维持消耗,获得高浓度菌体的初糖浓度要大于这个值),初糖浓度过低,会造成 X 的下降,使得产物的形成速度下降;但是初糖浓度过高又会造成 A 的下降,使得产物的生成比速下降。所以要获得高的产物形成速度,初糖浓度有一最佳值。

2.3.2 初糖浓度对产物表观转化率(Y)的影响:

将(8)式积分可得:

$$(S_0 - S_t) = (X_t - X_0)/Y_x + (P_t - P_0)/Y_p + m \int_0^t X dt \quad (10)$$

由于在分批发酵后期 $S_0 \gg S_t$, $X_t \gg X_0$, $P_0 = 0$, 并令 $\int_0^t X dt = \bar{X}t$ 则由(10)式得:

$$P_t = (S_0 - X_t/Y_x - m\bar{X}t) \cdot Y_p \quad (11)$$

$$Y = \frac{S_0 - X_t / Y_x - mX_t}{S_0} \cdot Y_p \quad (12)$$

通过前面的分析可知,赖氨酸的合成速度和菌体的浓度是紧密相关的,所以保持高浓度菌体是获得高转化率的首要条件,将 $X_t \approx X_{\max}$ 代入(12)式,并进一步化简得:

$$Y = \left(1 - \frac{X_{\max}}{S_0 \cdot Y_x} - \frac{m\bar{X}_t}{S_0}\right) \cdot Y_p \quad (13)$$

从(13)式可以看出, Y 与 S_0 和 $m\bar{X}_t$ 有关: S_0 增大, Y 增大; $m\bar{X}_t$ 增大, Y 减小。事实上 $m\bar{X}_t$ 是随 S_0 变化的: $S_0 \uparrow$, 使 $dX/dt \downarrow$ 、 $dp/dt \downarrow$, 综合表现出 $dS/dt \downarrow$, 造成 $t \uparrow \uparrow$, 因而 $m\bar{X}_t$ 大大增大。因此 S_0 的增加对 Y 的影响可能表现出两种情况:①因 S_0 的增加, Y 增加, 这种正效应大。这时提高 S_0 对提高转化率有利。②因 S_0 的增加, $m\bar{X}_t$ 随之增大, Y 减小, 这种负效应大。这时提高 S_0 对提高转化率不利。所以要使全批发酵过程获得最高的转化率, 有一最适的初糖浓度。通过的分批发酵操作的模型分析可以得到如下结论:①分批发酵要获得最高的生产强度, 有一量适的初糖浓度。②分批发酵要获得最高的转化率, 也有一最适的初糖浓度。

从表3的结果可以看出, 和上面模型分析的结论极为吻合: 当初糖浓度为 100g/L 时, 发酵的生产强度达到最大; 当初糖浓度为 150g/L 时形成产物的转化率最大。可见在分批发酵中不可能同时获得最高的生产强度和转化率。

表 3 初糖浓度对发酵的影响

Table 3 The influence of initial concentration of glucose on fermentation process

$S_0/g \cdot L^{-1}$	$S_0/g \cdot L^{-1}$	t/h	$p/g \cdot L^{-1}$	$Y/\%$	$l/g \cdot L^{-1}$
38.2	3.0	16	9.36	24.5	0.585
80.3	4.2	28	22.6	28.1	0.807
99.1	5.1	36	30.7	30.9	0.850
117.8	5.4	48	38.9	33.0	0.810
150.1	8.0	62	50.1	33.3	0.808
178.2	10.2	78	56.9	31.3	0.729

利用该模型对分批发酵进行分析可以进一步看出, 当试图用提高总糖的方法以期获得更高的产物浓度时, 由于葡萄糖抑制作用的存在, 必然意味着转化率和生产强度下降。因此在分批发酵中不可能同时获得高的产物浓度、高的转化率和高的生产强度。但是我们从(9)式中不难看出, 若在一定的初糖浓度下发酵, 通过流加方式提高总糖浓度, 并维持发酵过程的糖浓度处于合适的水平, 就有可能同时获得高的转化率、高的生产强度和高的产物浓度。因此要实现高水平的赖氨酸发酵, 必须通过流加的方式。

参 考 文 献

- [1] Moser A. In: Brauer H ed, Biotechnology, 1985, Vol. 2 pp. 243~246.
 [2] 蔡武城. 生物物质常用化学分析方法, 北京: 科学出版社, 1982, pp. 56~58.

- [3]石渡昭男. 特许公报, 1975, 20: pp. 874~879.
 [4]梁正熙等编. 化学化工中的数值法, 北京: 科学出版社, 1989, pp. 98~120.
 [5]王子若, 陈永昌编. 优化计算方法, 北京: 机械工业出版社, 1989, pp. 113~140.
 [6]Ohno H, Nakanishi, M. *Biotechnol Bioeng*, 1976, 18(6): 847~864.
 [7]王国政, 胡章助, 俞俊棠. *抗生素*, 1983, 8(4): 207~213.
 [8]方柏山, 林金清. *生物工程学报*, 1992, 8(3): 283~287.
 [9]Gale E F. *Chemical Activities of Bacteria*, New York: Academic Press, 1947, pp. 210~230.
 [10]Stodala F H. *Chemical Transformations by Microorganismes*, New York: Willey, 1958, pp. 54~66.
 [11]Gaden Jr E L. *J Biochem Microbio Tech Eng*, 1959, 1(4): 413~429.
 [12]Luedeking R, Piret E L. *J Biochem Microbiol Technol. Eng*, 1959, 1(4): 393~413.
 [13]Bajpai R K, Reub M. *J Chem Tech Biotechnol*, 1980, 30(6): 332~344.
 [14]龚建华, 陈 琦. *生物工程学报*, 1987, 3(4): 281~289.

符 号 说 明

$\alpha, \beta, K, K_1, K_2$ ——模型常数	μ_{\max} ——菌体的最大生长比速/ h^{-1}
S ——基质浓度/ $g \cdot L^{-1}$	Y_x ——基质形成菌体的真实转化率/ $g \cdot g^{-1}$
S_0 ——基质初始浓度/ $g \cdot L^{-1}$	Y_p ——基质形成产物的真实转化率/ $g \cdot g^{-1}$
S_r ——基质残留浓度/ $g \cdot L^{-1}$	Y ——产物的表观转化率/ $g \cdot g^{-1}$
X ——菌体浓度/ $g \cdot L^{-1}$	m ——细胞的维持消耗/ $g \cdot g^{-1} \cdot h^{-1}$
X_{\max} ——菌体的最大浓度/ $g \cdot L^{-1}$	K_m ——基质对菌体生长的饱和常数/ $g \cdot L^{-1}$
P ——产物浓度/ $g \cdot L^{-1}$	K_i ——基质对菌体生长的抑制/ $g \cdot L^{-1}$
I ——生产强度/ $g \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$	K_{mp} ——基质对产物形成的饱和常数/ $g \cdot L^{-1}$
t ——发酵时间	K_{ip} ——基质对产物形成的抑制常数/ $g \cdot L^{-1}$
μ ——菌体的生长比速/ h^{-1}	

The Kinetics of Lysine Batch Fermentation

Gong Heng

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

Lun Shiyi

(Department of Fermentation Engineering, Wuxi Light Industry University, Wuxi 214036)

Abstract On considering the influence of the concentration of glucose on lysine fermentation, a set of models including cell growth, product formation, substance consumption was established for FB42, the lysine producer. The results obtained from the models well agree with the experimental data in spite of the initial concentration of glucose varies in a very wild range. Using model analyzing some conclusions were made, which can be informed in practical fermentation process successfully.

Kew words Lysine, batch fermentation, kinetics model