

文章编号 :1009 - 038X(2000)05 - 0433 - 04

透明质酸分批发酵的动力学模型

高海军¹, 陈坚¹, 堵国成¹, 郭育涛²

(1. 无锡轻工大学生物工程学院,江苏无锡 214036;2. 南阳理工学院生物与化学工程系,河南南阳 473004)

摘要:透明质酸是一种具有特殊生理功能的高分子多糖,在医药和化妆品工业中有着广泛的用途.以兽疫链球菌(*Streptococcus zooepidemicus*)为生产菌株,葡萄糖为碳源,在 2.5 L 小型发酵罐上对发酵过程的动力学进行了研究,利用功能单元理论建立了以碳源为限制性底物的动力学模型.采用计算机对实验数据进行的计算,拟合出模型参数,对模型的适用性进行考察,证明了该模型有较宽的适用范围.

关键词:透明质酸;动力学;模型

中图分类号:TQ929

文献标识码:A

Modeling of Hyaluronate Batch Fermentation by *Streptococcus Zooepidemicus*

GAO Hai-jun¹, CHEN Jian¹, DU Guo-cheng¹, GUO Yu-tao²

(1. School of Biotechnology, Wuxi University of Light Industry, Wuxi 214036; 2. Nanyang Institute of Science Technology, Nanyang 473004)

Abstract: Hyaluronic acid (HA) is a kind of polysaccharide with special physical functions, and has been used widely in cosmetic and medical areas. Kinetics of HA fermentation process with glucose as carbon source by *Streptococcus zooepidemicus* H23 were studied in a 2.5 L fermentor. Using function unit theory, kinetic model was constructed for fermentation with carbon source as limited substrate. Parameters of model were estimated by computation of the data of experiment. Applicability was also tested.

Key words: hyaluronic acid; kinetics; model

现有描述微生物生长过程的模型多属经验模型, Tan 等^[1]采用统计热力学手段,提出了描述微生物在单一底物限制条件下生长的功能单元理论.作为一种较为通用的方法,它可以为许多经验模型,如 Monod 模型、Moser 模型及其修正模型提供理论基础,并显示出广泛的适用性.

透明质酸(Hyaluronic acid,简称 HA),又名玻璃酸,是一种广泛存在于结缔组织及某些微生物荚膜中的具有特殊功能的胞外大分子酸性粘多糖,其水溶液有着良好的粘弹性和流变性. HA 在生物体内有着良好的生物相容性和其它许多重要的生理功能^[2,3],同时还具有特殊的保水作用,被称为理想

收稿日期:1999-12-23,修订日期:2000-06-12.

作者简介:高海军(1969-),男,江苏盐城人,工学博士.

万方数据

的天然保湿因子(natural moisturizing factor,简称NMF),因此HA在医学、化妆品工业有重要的应用价值.

对HA发酵过程进行单一控制难以达到最大生产的目的,而对其过程深入的研究,了解细胞培养中菌体生长、基质消耗、产物生成的动态平衡及内在规律,建立反映微生物生长代谢规律的数学模型,可以为控制HA发酵过程提供理论指导.作者以功能单元假设为前提,以统计热力学^[1,4]为理论基础,结合经典微生物动力学模型建立方法^[5],考虑产物对微生物生长的抑制,在理论推导的基础上提出了关于分批培养的菌体生长、各种产物合成及底物消耗动力学模型,为进一步研究做好理论准备.

1 理论与模型建立

1.1 理论及模型假设

每个微生物细胞都具有一定量的基本功能单元,如连接底物、释放胞内物质等,其中起着重要作用的是酶、酶复合物或其它底物受体,每一个功能单元都有着一整套催化分解和合成反应等细胞所要求的代谢功能,并且有多个底物的连接位点.

抑制物(包括底物和产物)对微生物生长的抑制,即为抑制物对功能单元的抑制,是通过阻碍物质的运输等行为而使得细胞胞内体系发生改变,从而使细胞的生长受到阻碍.如产物对细胞生长的抑制,是因为产物与那些负责运输或吸收细胞生长所需底物的功能单元相结合,使该单元对底物的吸收能力降低或消失,造成胞内底物的限制;一种产物对另一种产物的抑制是因为前者与负责传输后者的功能单元结合后,不能将后者正常释放出胞外,从而造成胞内该物质的积累,形成反应途径的反馈抑制效应,表现出细胞合成该产物能力的下降.

1.2 统计热力学理论在细胞培养动力学中的应用

根据统计热力学巨正则系综理论^[1,4],可以对功能基团所处状态进行定量描述,得到其与*i*(*i* = 0, 1, ..., *n*)个底物分子连接的概率,这种概率可用于推导描述微生物过程的数学表达式:

$$\mu = \frac{\sum_{i=1}^m \alpha_i [S]^i}{\sum_{i=1}^m \beta_i [S]^i} \quad (1)$$

这里 μ 为比速率,*S*为功能单元的作用底物, α 、 β 为底物与功能单元连接能或初始反应速度常数,*m*表示*S*与功能基团的连接位点,当*S*与功能单元的*m*个连接位点中有*x*个抑制位点时,方程(1)变为:

$$\mu = \frac{\alpha_1 [S]^1 + \alpha_2 [S]^2 + \dots + \alpha_{m-x} [S]^{m-x}}{\beta_1 [S]^1 + \beta_2 [S]^2 + \dots + \beta_{m-x} [S]^{m-x}} \quad (2)$$

若有其它抑制物存在,方程(1)方程(2)变为:

$$\mu = \frac{\sum_{i=1}^m \alpha_i [S]^i}{\sum_{i=1}^m \beta_i [S]^i + \sum_{i=0}^n \gamma_i [P]^i} \quad (3)$$

$$\mu = \{\alpha_1 [S]^1 + \alpha_2 [S]^2 + \dots + \alpha_{m-x} [S]^{m-x}\} / \{\beta_0 [S]^0 + \beta_1 [S]^1 + \dots + \beta_m [S]^m + \gamma_1 [P]^1 + \gamma_2 [P]^2 + \dots + \gamma_n [P]^n\} \quad (4)$$

*P*为功能单元的抑制物, γ 为抑制物与功能单元连接能或初始反应速度常数,*n*表示*P*与功能基团的连接位点数.

若底物与功能单元有2个连接位点,其中一个为抑制位点,即*m* = 2, *n* = 1,方程(4)为:

$$\mu = \alpha [S]^2 / \{\beta_0 [S]^0 + \beta_1 [S]^1 + \beta_2 [S]^2 + \gamma_1 [P]^1 + \gamma_2 [P]^2 + \dots + \gamma_n [P]^n\} \quad (5)$$

当仅有一个抑制位点,即*n* = 1时,方程(5)为:

$$\mu = \alpha [S]^2 / \{\beta_0 [S]^0 + \beta_1 [S]^1 + \beta_2 [S]^2 + \gamma_1 [P]^1 + \gamma_2 [P]^2\} \quad (6)$$

1.3 微生物反应动力学模型的推导

1.3.1 菌体生长模型 研究可知,streptococcus zooepidemicus H23在合成HA的过程中大部分碳源都转化成乳酸.乳酸发酵是一种典型的产物抑制型生物过程,发酵液中乳酸的积累对细胞生长和产物积累都会产生很强的抑制作用^[6].

对于抑制型的微生物生长,已有许多经验模型来描述.如Logistic模型及其修正模型^[7],由于其为典型的“S”型曲线,所以具有广泛的适用性,曾被用于描述微生物聚合物的过程细胞生长动力学.但不能很好的描述streptococcus zooepidemicus H23受底物及乳酸抑制的动力学行为.作者根据功能单元假设和统计热力学理论,提出如下方程:

$$\frac{dX}{dt} = \frac{\mu_{\max} X S}{K_s + S + S^2/K_i + P_{LA}/K_{LA}} = \frac{A X S}{1 + B_1 S + B_2 S^2 + C P_{LA}} \quad (7)$$

其中 μ_{\max} 为菌体最大比生长速率($g/(g \cdot h)$),*K_s*为基质半饱和常数(g/L),*K_{LA}*为乳酸抑制常数,*K_i*为底物抑制常数,*A*、*B₁*、*B₂*、*C*为常数.

1.3.2 产物合成模型 HA和乳酸是2种主要产物,在厌氧发酵过程中,它们是仅能检出的胞外产物.在通风发酵过程中会产生少量的乙酸^[8].由于乙酸的产生量较少,因此,对细胞合成的产物仅考虑HA和乳酸.研究可知,HA和乳酸的生成与菌体

的生长相偶联。但当乳酸积累到一定浓度时,HA合成速度明显变慢,说明乳酸对HA的合成表现出比菌体的生长更为强烈的抑制,同时乳酸对自身的合成也会产生抑制作用。

1959年,Gaden^[9]将产物生成与菌体生长及底物消耗相关联,定性地分为3种类型,I型为生长偶联型,比基质消耗速率 σ 、比产物合成速率 π 、比生长速率 μ 基本同步;II型为生长半偶联型,当 μ 、 σ 降低至一定值后, π 开始增加,以后 μ 、 π 、 σ 同步变化且同期达到最高;III型为生长非偶联型, μ 、 σ 降至最低后, π 开始增加,并逐步至最大。Luedeking和Piret^[5]对产物形成速率与细胞生长速率及细胞浓度的关系进一步研究后,提出了著名的Luedeking-Piret方程,即方程(8)。

$$\frac{dP}{dt} = \alpha \frac{dX}{dt} + \beta X \quad (8)$$

其中 α 、 β 为常数。

根据以上对HA发酵的分析和功能单元抑制反应动力学,结合Luedeking-Piret方程(8),作者提出了HA和乳酸形成动力学模型如下:

$$\frac{dP_{HA}}{dt} = \alpha_{HA} \frac{dX}{dt} \cdot \frac{1}{1 + P_{LA}/k_1} = \frac{dX}{dt} \cdot \frac{1}{\sigma'_0 + \sigma'_1 P_{LA}} \quad (9)$$

$$\frac{dP_{LA}}{dt} = \alpha_{LA} \frac{dX}{dt} \cdot \frac{1}{1 + P_{LA}/k_2} = \frac{dX}{dt} \cdot \frac{1}{\delta''_0 + \delta''_1 P_{LA}} \quad (10)$$

其中 P_{HA} 、 P_{LA} 为HA和乳酸产量(g/L), α_{HA} 、 α_{LA} 为偶联常数, k_1 、 k_2 为乳酸对HA和乳酸的抑制常数, σ'_0 、 σ'_1 、 δ''_0 、 δ''_1 为常数。

1.3.3 基质消耗模型 根据物料平衡,限制性基质通常可以分为3部分,即用于菌体生长的、用于产物合成的和用于细胞内源维持的消耗,综合HA发酵,可以用下式表示:

$$-\frac{dS}{dt} = \left(-\frac{dS}{dt}\right)_{P_{HA}} + \left(-\frac{dS}{dt}\right)_{P_{LA}} + \left(-\frac{dS}{dt}\right)_X + m_e X \quad (11)$$

考虑到HA只占底物消耗量的小部分,可以将HA项和菌体项合并,若基质对菌体和产物的转化率恒定,则方程(11)可以变为:

$$-\frac{dS}{dt} = \left(\frac{1}{Y_x} + \frac{1}{Y_{HA}}\right) \frac{dX}{dt} + \frac{1}{Y_{LA}} \frac{dP_{LA}}{dt} + m_e X = n_1 \frac{dX}{dt} + n_2 \frac{dP_{LA}}{dt} + m_e X \quad (12)$$

其中 Y_x 、 Y_{HA} 、 Y_{LA} 为基质对菌体、HA、乳酸的转化率(g/g), $n_1 = \frac{1}{Y_x} + \frac{1}{Y_{HA}}$, $n_2 = \frac{1}{Y_{LA}}$, m_e 为菌体的内源维持常数(g/(g·h))。

2 材料和方法

2.1 菌种

实验菌种 *Streptococcus zooepidemicus* H23,作者所在实验室保藏。

2.2 培养基

斜面培养基、种子培养基、发酵培养基见参考文献[10]。

2.3 培养方法

斜面与种子培养:取保藏在安酞管中菌种,斜面划线传代。斜面于37℃下培养10h,用接种环挑取2~3环接入装有50mL种子培养基的500mL三角瓶中,在200r/min的旋转摇床上培养14~16h,培养温度37℃。

小罐培养采用2.5L的发酵罐(韩国KFC公司产品),配有单只园盘透平桨, $D_{罐}:D_{桨}=2:1$ 。自动控制温度、pH值。加入1.2L发酵培养基,121℃下灭菌15min。接种量为10%(体积分数),发酵过程中自动控制pH值为 7.0 ± 0.1 。除特殊说明,初始葡萄糖浓度为50g/L,搅拌转速650r/min,通气量2.4L/min,发酵温度37℃。

2.4 测定方法

1)透明质酸质量分数测定:采用Bitter-Muir氏法^[10]。

2)葡萄糖质量分数测定:采用3,5-二硝基水杨酸法^[11]。

3)乳酸质量分数测定:对羟基联苯法^[12]。

4)菌体量的测定:采取干重法与比色法对照。干重法:将发酵液(适当稀释)离心后取沉淀,洗涤2次,80℃干燥24h后,称取质量计算细胞浓度;同时将沉淀物稀释一定倍数,520nm比色,与标准曲线对照,计算细胞浓度。

2.5 数据处理方法

方程数值解法:四阶龙格库特法;数值寻优方法:单纯形法。

3 结果

3.1 乳酸对发酵的影响

为进一步明确乳酸对发酵的影响,在摇瓶发酵中,采用在初始培养基加一定量乳酸的方法,考察乳酸量与菌体生长和产物形成的关系。结果如图1所示。从图可以看出,加入乳酸后细胞生长及HA形成都受到抑制^[13],而乳酸对自身的合成也有强烈的抑制,随着乳酸添加量的增加,其抑制作用越明显。

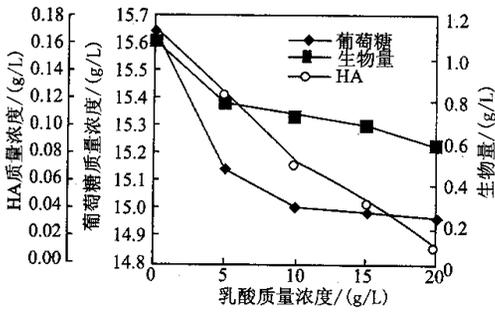


图 1 发酵液中乳酸的添加量对发酵的影响

Fig.1 Effect of the lactic acid volume on fermentation

3.2 动力学模型的求解

根据扩展的功能单元理论得到了微分形式的 *S. zooepidemicus* H23 生长代谢动力模型式 (7) (9) (10) (12), 采用龙格库特法求取方程的数值解, 单纯形法进行参数寻优, 目标函数如式 (13), 所求得参数列于表 1 所示.

表 1 HA 发酵动力学方程参数

Tab.1 The equation parameters of HA fermentation kinetic

参数	拟合值	参数	拟合值
A	10268.08	μ_{max}	1.10
B_1	9349.06	K_s	1×10^{-4}
B_2	563.76	K_i	16.85
C	9230.8	K_{LA}	1.01
σ'_0	0.34	α_{HA}	2.94
σ'_1	0.013	k_1	26.15
δ''_0	0.032463	α_{LA}	30.76
δ''_1	0.001297	k_2	24.67
n_1	0.93517	$\frac{1}{Y_x} + \frac{1}{Y_{HA}}$	0.935
n_2	0.91	Y_{LA}	1.10
m_e	0.483919	m_e	0.484

$$\min f = \min [\sum_i (X_i^{cal} - X_i^{exp})^2 + \sum_i (P_{HAi}^{cal} - P_{HAi}^{exp})^2 + \sum_i (P_{LAi}^{cal} - P_{LAi}^{exp})^2 + \sum_i (S_i^{cal} - P_i^{exp})^2] \quad (13)$$

$$\text{收敛精度为 } \left| \frac{f_{n+1} - f_n}{f_{n+1}} \right| < 10^{-2}$$

进行参数拟合所用数据, 与拟合得到的模型曲线如图 2 所示.

3.3 模型适用性

为了解模型准确反映过程状况的程度, 在不同初糖质量浓度下对模型的适用性进行了考察, 图 2 为不同初糖质量浓度的发酵结果与模型预测曲线图. 在初糖质量浓度为 40 ~ 60 g/L 范围内除个别实验点外, 误差均小于 10%. 只有初糖质量浓度为 80 g/L 时, 发酵后期的实验结果与预测值出现较大的

误差. 说明作者所建立的模型可以在较大的范围内准确地预测实验结果, 可以用于描述正常实验条件下 HA 分批发酵过程.

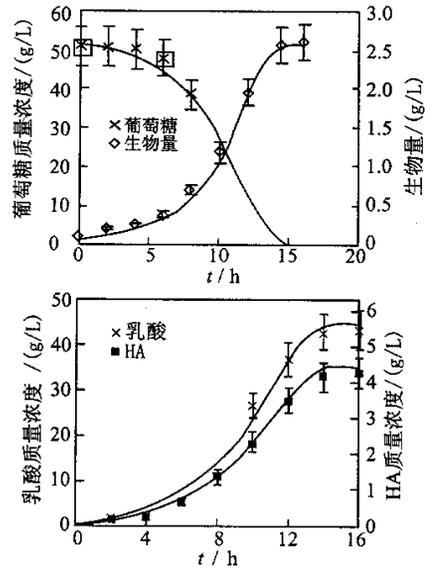


图 2 初糖质量浓度为 50 g/L 时动力学模型预测曲线及实验值

Fig.2 The forecast curves of kinetic model at initial sugar concentration 50 g/L

4 结 论

1) 功能单元理论具有较广泛的适用性, 除可以应用于描述具有底物抑制的细胞培养过程, 还可以推广到有产物抑制的过程中. 功能单元与酶在一定程度上具有类似的动力学行为, 但前者具有更为广泛的适用性.

2) *Streptococcus zooepidemicus* H23 利用葡萄糖发酵生产 HA 是同时具有底物和产物抑制的发酵过程, 以功能单元假设为前提, 以统计热力学为理论基础, 结合经典微生物动力学模型建立方法, 提出了描述整个发酵过程细胞生长、产物生成、底物消耗的动力学模型.

3) 利用得到的模型对实验数据进行了预测, 计算值与实验值较好地符合, 表明所得模型能较好地描述 *Streptococcus zooepidemicus* H23 在正常条件下利用葡萄糖发酵 HA 的过程. 但在高质量浓度底物存在时, 发酵后期 HA 质量浓度与预测值相差较大, 可能是由于发酵体系的传质特点使得细胞对部分营养的要求难以得到满足, 造成了 HA 产量难以进一步提高.

(下转第 450 页)

参考文献

- [1] TAN Y , WANG Z X , SCHNEIDER R P. Modeling microbial growth : Statistical thermodynamics approach[J]. **J Biotechnol** , 1994 , 32 : 97 ~ 106.
- [2] BALAZ E A , BAND P. Hyaluronic acid : Its structure and use[J]. **Cosmetic Toilets** , 1984 , 99 : 65 ~ 72.
- [3] SWANN D A , KUO J W. Biomaterials – novel materials from biological sources[M]. New York : Stockton Press , 1991.
- [4] HILL T L. Cooperativity theory in biochemistry : Steady – state and equilibrium systems[M]. New York : Spring – verlag , 1985.
- [5] LUEDEKING R , PIRET E L. A kinetic study of the lactic acid fermentation : Batch process at controlled pH[J]. **J Biochem Microbiol Tech Eng** , 1959 , 1 : 393 ~ 342.
- [6] KWON Y J , KAUL R , ATTIASSON B. Extractive lactic acid fermentation in poly(ethyleneimine) – based aqueous two – phase system[J]. **Biotechnol Bioeng** , 1996 , 50 : 280 ~ 290.
- [7] MULCHANDANI A. LUONG J H T. Batch kinetics of microbial Polysaccharide biosynthesis[J]. **Biotechnol Bioeng** , 1988 , 32 : 639 ~ 640.
- [8] JOHNS M R , GOH L T , OEGGERLI A. Effect of pH , agitation and aeration on hyaluronic acid produced by streptococcus zooepidemicus[J]. **Biotech Lett** , 1994 , 15 (5) : 507 ~ 512.
- [9] GADEN L E. Kinetics of fermentation process[J]. **J Biochem Microbiol Tech Eng** , 1960 , 1 : 413 ~ 429.
- [10] BITTER T , MURI H M. A modified uronic acid carbazol reactor[J]. **Anal Biochem** , 1962 , 4 : 330 ~ 334.
- [11] MILLER G L. Dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar[J]. **Anal chem** , 1960 , 31 : 426 ~ 428.
- [12] BAKER S B , SUMMERSON W H. The Colorimetric determination of lactic acid in biological material[J]. **J Biol Chem** , 1949 , 139 : 535 ~ 554.
- [13] HONDA H , TOYAMA Y , TAKAHASHI H , et al. Effective lactic acid production by two – phase system.[J]. **Biotechnol Bioeng** , 1960 , 50 : 280 ~ 290.