

文章编号 :1009 - 038X(2000)05 - 0451 - 04

混沌控制在聚 β -羟基丁酸混合 培养过程中的应用

钱梓文¹, 远山正幸², 清水和幸²

(1. 中国科学院化工冶金研究所 ,北京 100080 ;2. 九州工业大学情报工学部 ,日本福岡 820-8502)

摘 要 :在研究混沌建模的基础上开发了 PHB(聚 β -羟基丁酸)混合培养过程供氧的节律控制方法 .在 PHB 混合培养体系中 ,二种菌共存于同一发酵罐 ,其中乳酸杆菌首先消耗葡萄糖产生乳酸 ,与此同时真养产碱杆菌消耗乳酸最终产生 PHB.这是两个相互耦合的过程 ,前者为需氧过程 ,后者为厌氧过程 .实验证明供氧的节律控制能够协调互相矛盾的两种代谢过程 ,是多菌共存生态系统优化控制的新尝试 .

关键词 :混沌控制 ; PHB 生产 ; 混合培养过程

中图分类号 :O623.61

文献标识码 :A

Application of Chaotic Control in PHB Mixed Cultivation Process

QIAN Zi-wen¹, TOHYAMA Masayuki², SHIMIZU Kazuyuki²

(1. Institute of Chemical Metallurgy , Chinese Academy of Sciences , Beijing 100080 ;2. Department of Biochemical Engineering , Kyushu Institute of Techonlogy , Fukuoka 820-8602 , Japen)

Abstract :Based on chaos control method , the method of optimal control on oxygen supply in the PHB mixed cultivation process was studied . Two kinds of microorganisms coexist in the same fermentor for mixed cultivation , in which *L. delbrueckii* converted glucose into lactate acid first , while *R. eutropha* consumed lactate acid to produce PHB. The two processes were coupled , and the former was aerobic while the latter was anaerobic. It was proved by experiments that the rhythmical control of oxygen supply could compromise the two-conflict metabolism processes and provide a novel method on optimal control in symbiotic ecosystem.

Key words : chaotic control ; PHB production ; mixed cultivation process

混沌是非线性系统所特有的一种运动形态 ,它是确定性系统里由于内禀随机性而产生的貌似无序的复杂运动 .20 世纪 70 年代国际公认的三种混沌实例 ,包括 Lorenz 气象模型 ,Vanderpol 隧道二极管电流方程和 Logist 种群增殖函数 ,现在已经广泛

地被开发成为各种控制方法^[1].在 Logist 函数中当参数发生变化到某一确定值时种群增殖数将会由线性经周期、倍周期、分岔直至混沌 .这个规律也存在于需氧微生物培养过程^[2] ,1990 年由 Ott , Grebogi & Yorke 开发了一种通用控制方法 ,称为 OGY

收稿日期 :1999 - 11 - 23 ;修订日期 :2000 - 06 - 29 .

作者简介 :钱梓文(1943 -) ,女 ,上海人 ,研究员 .

万方数据

方法^[3],指出混沌不仅能够被控制,而且能够被利用,例如按照预定的目标,构建相空间轨迹.现在这种方法已被应用到几种需氧微生物培养过程中,对激发细菌增殖和提高产率有显著的作用^[4].作者介绍的混沌控制方法在 PHB 混合发酵中的应用就是根据 OGY 控制方法设计的供氧策略. PHB(poly β -hydroxybutyric acid)的混合培养是由 2 种微生物菌共存的培养过程^[5,6],研究其过程的目的是为了开发廉价碳源生产可降解生物塑料 PHB. 由于废食品中同时存在葡萄糖和乳酸,采用 2 种细菌,其中乳酸杆菌消耗葡萄糖产生乳酸,而真养产碱杆菌消耗乳酸转化成为 PHB, 2 种发酵过程耦合在一起,前者为需氧过程,后者为厌氧过程,作者通过实验证明混沌节律控制方法能够协调这个矛盾,提高 PHB 产率.

1 微生物培养过程非线性动力学模型的开发

已知微生物菌代谢增殖的 Logist 函数为：

$$X_{n+1} = AX_n(1 - X_n) \tag{1}$$

当细菌的代际增殖为世代交叠而非代际迭代时,式(1)演变成为 Verhulst 方程(2)：

$$\frac{dx}{dt} = \mu_{max}x(1 - \frac{x}{x_{max}}) - k_d x \tag{2}$$

该式是一个线性方程,方程的解是有确定稳定点的指数增长,它不会发生混沌,但是当微生物生存环境及内在代谢活动发生改变时,其影响并不一定反映在当代而是会延迟一段时间才反映在菌体数量和增长速率上.因此,引入时延的非线性机制后将改变细菌生长的动力学行为.当引入一阶 Taylor 级数展开项时,系统的初始平衡点向更高增殖速率的指数平衡点移动并且稳定在该点^[5].而引入二阶 Taylor 级数展开项时,系统的初始平衡点向振荡增殖的多个平衡点滑动并且围绕其最终平衡点保持周期性动态平衡如图 1 所示：

其动力学模型如下：

$$\dot{X} = \frac{k_1 X - k_2 X^2 + (k_3 X - 1) X}{k_4 X} \tag{3}$$

$$k_1 = \mu_{max} - k_d, k_2 = \frac{\mu_{max}}{x_{max}}, k_3 = \frac{T\mu_{max}}{x_{max}} = Tk_2, k_4 = \frac{T^2}{2} k_2$$

对式(3)的二阶状态方程改写的相空间模型表达如下：
万方数据

$$y = \frac{k_x - k_2 x^2 + (k_3 x - 1)y}{k_4 x} \tag{4}$$

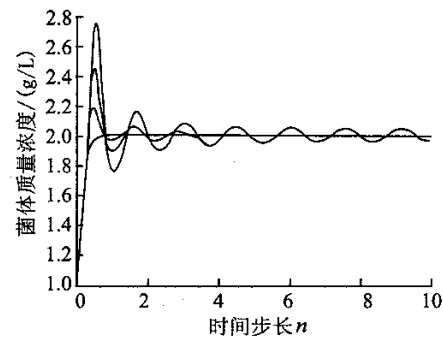


图 1 二阶泰勒级数修正后模型菌体浓度变化曲线
Fig.1 variant cure of cell concentration by two-order Taylor progression revision

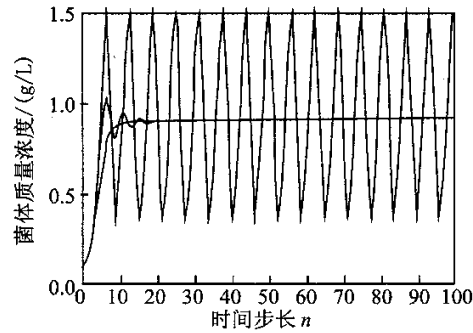


图 2 有二阶时延的菌体浓度变化曲线
Fig.2 Variant cure of concentration by two-order delay

由于二阶状态方程的特征变量为一对共轭复数时,表明状态方程有自发振荡趋势,其振荡频率和振幅与初值相关,用修正的 Runge-kutta 法进行模拟时,可以看到式(3)的时空表达.在时域里的振荡模式如图 2 所示,在相空间里是一个极限环,如图 3 所示.

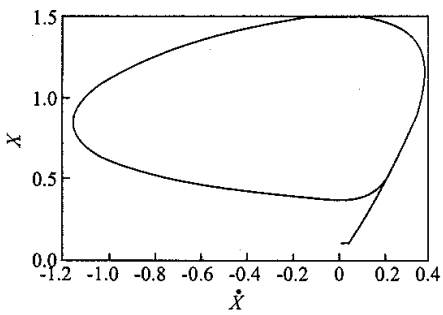


图 3 菌体浓度由修正后龙格库塔法获得的变化的二维相空间图
Fig.3 Variation of concentration by revision Runge-Kutta method in two phase space

在微生物培养体系里,动力学状态方程的非线

性程度越大,混沌趋势越明显.当培养条件发生变化,将会导致增殖的混沌,它的趋势是先从一个平衡点到达一个新的不稳定平衡点,然后产生自发振荡和分岔,直至混沌.

2 混沌控制方法的应用

1990 年,Ott Grebogi & Yorke 提出一种稳定奇怪吸引子中的某个不稳定的周期轨道(UPO)的方法,即 OGY 方法^[9],并在实验中得以证实.从而第一次指出人们可以通过控制混沌来利用它的种种特性.

已知系统模型为:

$$\frac{dx}{dt} = F(x, p)$$

(5)

其中 x 为相空间中的 N 维坐标向量, p 为可以施加控制的控制参数.

假定系统的模型为未知,但可从系统中得到某个可观测量 $z(t)$,从而可以得到一组时间序列 $Y(t) = \{z(t), z(t - \tau), \dots, z(t - (N - 1)\tau)\}$. 固定 $z(t - (N - 1)\tau)$,可以得到 $N - 1$ 维的离散序列 $\xi_n(t) = \{z(t_n), z(t_n - \tau), \dots, z(t_n - (N - 2)\tau)\}$. 使用这样的固定序列,我们就可以得出有实用价值的不稳定的周期轨道.如选择相平面上一个固定点 $\xi_f(p_0)$,欲使系统稳定在 $\xi_f(p_0)$ 上,只需当系统轨道接近该固定点时,改变参数 p ,则

$$\delta p_n = \lambda_u (\lambda_u - 1)^{-1} \frac{[\zeta_n - \xi_f(p_0)] \cdot f_v}{g \cdot f_u}$$

就能够控制系统的混沌,并将系统稳定在固定点 $\zeta_f(p_0)$ 上.其中参数 λ_u, f_v, f_u, g 可由实验得出.

OGY 方法在需氧微生物培养体系中的用法是施加扰动去同步输出变量^[5].建模时式(5)中参数 p 代表这种变量,输入或输出变量虽然在动力学模型里没有表达,但实际上却直接影响动力学行为.

$$p(t) = p_0 + \epsilon \cos(\omega t)$$

(6)

式(6)假设表示一种节律,是根据系统的非线性输出而设计的同步方法, p_0, ϵ 和 ω 分别表示初相、幅值与频率.

3 PHB 混合培养系统的溶氧节律控制

3.1 材料与方法

3.1.1 菌种和培养基 乳酸生产菌株为 *Lactobacillus delbrueckii* IAM 1928,其培养基组分如表 1 所示. 万方数据

表 1 *Lactobacillus delbrueckii* IAM 1928 菌株培养基组分
Tab.1 Composition of culture medium for strain *L. delbrueckii* LAM1928

成分	质量浓度/(g/L)
Polypepton(Nippon Seiyaku co. , Tokyo)	10
Yeast extract(Nippon Seiyaku co. , Tokyo)	5
Meat extract(Nippon Seiyaku co. , Tokyo)	5
K ₂ HPO ₄	2
Ammonium citrate	1
L-Cystein	0.1
MnCl ₂ · 4H ₂ O	0.033
FeSO ₄ · 4H ₂ O	0.013

PHB 生产菌株为 *Ralstonia eutropha* H₁₆ (ATCC17699).菌株首先在含 Yeast extract 10 g/L, Polypepton 5 g/L, Meat extract 5 g/L 和 (NH₄)₂SO₄ 5 g/L 的富氮培养基中进行预培养,然后菌体经离心洗涤后接入合成培养基中进行培养.

混合培养所用的培养基组成与上述乳酸杆菌所用的相同.

3.1.2 分析方法 细胞质量浓度的测定采用分光光度计(Ubest-3, Jasco Co. , Tokyo)在 660 nm 测定光密度获得.葡萄糖质量浓度的测定采用葡萄糖分析仪(Glucose B-test 271-31401, Wako Pure Chemical Co. , Osaka).乳酸质量浓度的测定采用乳酸分析仪(F-kit L-lactic acid 139084, Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany).硫酸铵的质量浓度通过酶法(Wake Co. , Tokyo)测定铵离子质量浓度获得.PHB 的质量浓度采用 Law & Slepecky 改善法.其余有机酸的浓度用 HPLC(LC-10A, Shimadzu Co. , Osaka)进行测定(色谱柱 Shim-PAK SCR-102H, Shimadzu Co. , Osaka).

3.1.3 培养过程 0.2 mL *L. delbrueckii* 从 -80 ℃ 的甘油冷冻管中转移到装有 20 mL 培养基试管中进行接种物的制备.培养基在 37 ℃ 培养 12 h 之后转移到 200 mL 的 T 形瓶中进行预培养.在静态培养 4.5 h 之后,培养基在 4 ℃ 5 000 g 条件下离心 10 min.细胞沉淀物悬浮于新鲜培养基内,然后接种到一个 5 L 的发酵罐(M-100, Tokyo Rikakikai Co. , Tokyo)中,工作体积为 3 L,温度恒温控制在 37 ℃,pH 通过在线 pH 传感器(FC-1, Tokyo Rikakikai Co. , Tokyo)进行检测,采用 8 mol/L NaOH 或 4 mol/L HCl 维护在设定值.溶氧浓度通过在线 DO 传感器(FC-1, Tokyo Rikakikai Co. , Tokyo)进行检测,通过改变搅拌速率和通气量保持

在设定值. *R. eutropha* 的培养过程与 *L. Delbrueckii* 的培养过程相类似.

葡萄糖和乳酸的质量浓度分别通过在线的葡萄糖和乳酸传感器(BF-400 , Biot Co. , Tokyo)进行测定 ,采用开关模式使其维持在设定值. 由于这些传感器非常昂贵 ,因此 ,作者通过 NaOH 溶液添加的体积估算乳酸的浓度.

所有的信号经放大后传送到计算机中 ,所有的阀门均通过 D/A 转换器或继电器由计算机进行控制. 所有的设备在使用之前于 121 ℃ 灭菌 20 min.

3.2 节律控制设计

PHB 混合培养是多菌株共存体系. 事实上 2 种菌的代谢交织在一起不仅难以建模来描述它们之间的共生关系 ,而且也给过程的优化和控制带来困难. 应用混沌控制方法首先需要大致分辨多菌株各自的时空界限 ,探明不同代谢过程之间的协同途径. 根据在线检测记录的葡萄糖质量浓度、乳酸质量浓度、菌体光密度、pH、DO、CO₂ 等参数表明的大致规律. 在发酵初期葡萄糖被乳酸杆菌消耗产生乳酸. 随着乳酸质量浓度增长 ,真养产碱杆菌消耗乳酸而繁殖速率增大 ,当氮源耗尽之后 ,真养产碱杆菌才开始积累 PHB 形成产物. 有 2 种矛盾存在于混合培养体系中 (1) 氮源供应的矛盾. 葡萄糖被乳酸杆菌消耗产生乳酸的速率与氮源的供应有关. 在一定的碳氮比时乳酸对葡萄糖消耗的抑制最小同时又能使真养产碱杆菌的增殖速率最高 ,但是真养产碱杆菌只有在氮源饥饿时才能积累 PHB (2) 供氧的矛盾. 乳酸杆菌的培养是厌氧过程 ,限制氧能够加速乳酸的生成. 而真养产碱杆菌的培养是好氧过程 ,供氧丰富能够加速 PHB 的积累.

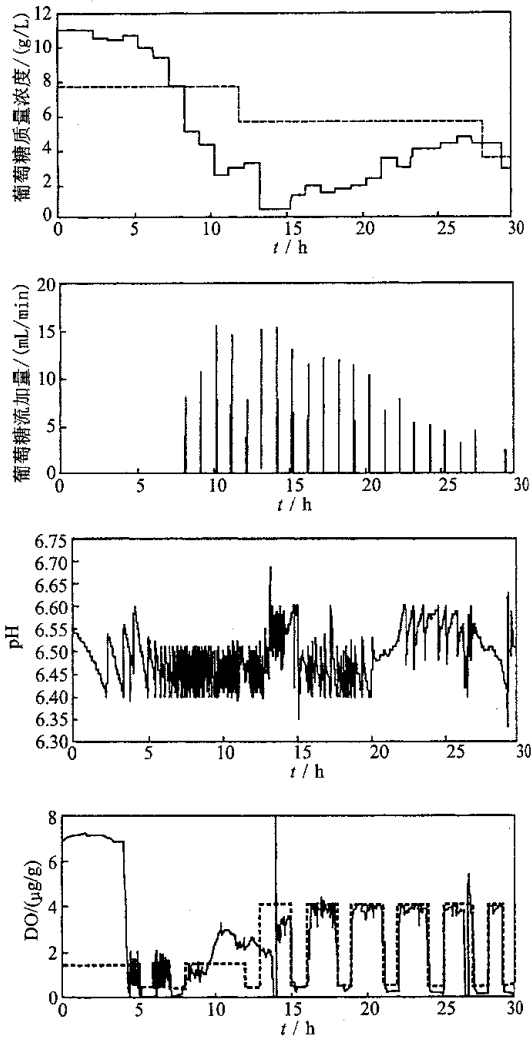


图 5 PHB 混合培养过程应用混沌控制方法的在线记录

Fig.5 On - line record of using chaotic control various variables in mixed cultivation process

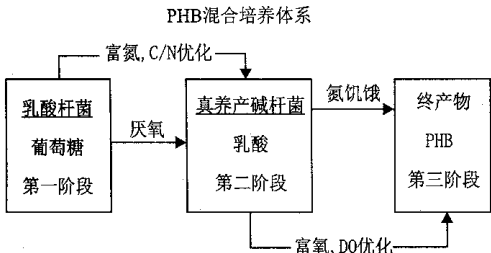


图 4 PHB 混合发酵过程控制的时空分析

Fig.4 Process decomposition for PHB mixed fermentation

图 4 为混合发酵过程控制的时空分机 ,图 5 为该培养体系应用混沌控制的在线记录 ,图 6 为混沌控制的 PHB 混合培养实验结果.

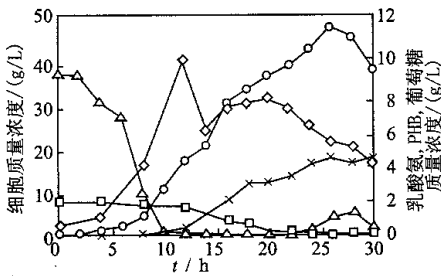


图 6 混沌控制下的 PHB 混合培养实验结果

Fig.6 Results of PHB mixed culture under rhythmic control condition

4 结果与讨论

发酵法生产生物可降解塑料的原料 PHB 是当前国际、国内研究的重要课题之一, PHB 发酵的关键是降低成本. 利用废弃食品中的葡萄糖和乳酸生产 PHB 是一种新的尝试. 事实上在自然界中广泛存在着多菌共存的环境生态体系, 由于动力学关系复杂并且生化反应的耦合不易分辨, 迄今为止仍只有非常有限的混合培养过程被研究和报道. 作者应用

混沌控制方法分析了乳酸杆菌和真养产碱杆菌混合培养过程中共存和制约的关系, 认为在 PHB 混合培养中氧的供应是关键, 因此针对 2 种菌的不同生理要求设计了溶氧节律控制, 虽然最终 PHB 的产物质量浓度还不高, 但是比溶氧常规控制方法提高了一个百分点^[4], 同时也说明节律是振荡的优化结果, 不同的生物体有其代谢的最佳节律. 在一定的节律范围内能够激发潜在生物能, 大大有利于最终产物的积累.

参考文献

- [1] HU G, QU Z H, HE K. Feedback Control of Control of Chaos in Sptiotemporal System[J]. **J of Bifur and Chaos**, 1995, 5: 901 ~ 936.
- [2] ANASTASIOS. Chaos From Theory to Application[M]. New York and London: Plenum Press, 1994.
- [3] OTT E, GREBOGI C, JAMES A. Controlling Chaos[J]. **Physical Review Letters**, 1990(4): 1195 ~ 1199.
- [4] 钱梓文, 李华, 黄永曦等. 需氧微生物发酵过程控制菌体代谢节律的培养方法[P]. 中国专利: CN1198257, 1996-09-19.
- [5] MASAYUKI, KAZUYUKI. Control of a Mixed Culture of *Lactobacillus delbrueckii* and *Ralstonia eutropha* for the Production of PHB from Glucose via Lactate[J]. **Biochemical Engineering Journal**, 1999(4) 45 ~ 53.
- [6] TOMOJI K, DAISUKE Y, KAZUYUKI S. Dynamics and Modeling on Fermentation Production of Poly(β -hydroxybutyric acid) from Sugars via Lactate by a Mixed Culture of *Lactobacillus delbrueckii* and *Aliccaligenes eutrophus*[J]. **J Biotech**, 1999,