

文章编号:1673-1689(2005)04-0031-07

利用代谢网络模型和线性规划法在线 预测谷氨酸发酵中产物浓度

张成燕¹, 邵培¹, 段作营¹, 毛忠贵¹, 史仲平^{1,2}

(1. 江南大学生物工程学院, 江苏无锡 214036; 2. 江南大学工业生物技术教育部重点实验室, 江苏无锡 214036)

摘要: 在好氧型的谷氨酸发酵实验中发现, 溶解氧(DO)对发酵性能有很大的影响, 谷氨酸的生成方式也因此有很大不同: 较低的 DO 水平能够延长产酸期、提高谷氨酸的最终浓度, 但是代谢副产物——乳酸也有较大程度的积蓄; 而 DO 水平过高, 虽然代谢副产物不会生成积蓄, 但菌体消亡过快导致产酸期缩短、谷氨酸的最终浓度降低。同时, 谷氨酸的生成方式与发酵过程中摄氧率(OUR)和 CO₂ 的释放率(CER)有着非常紧密的关联。作者利用代谢网络模型并结合使用线性规划优化法, 通过在线测定 OUR 和 CER, 比较准确地在线推定出发酵过程中谷氨酸的质量浓度变化。与传统的非构造式动力学模型相比, 上述预测方法具有建模简单、模型物理意义明确、通用性能好等优点, 为后续过程的在线控制和优化提供一种全新和有效的途径。

关键词: 代谢网络; 谷氨酸发酵; 数学模型; 线性规划; 在线预测

中图分类号: TQ 922.1

文献标识码: A

On-Line Prediction of Product Concentrations in Glutamate Fermentation Using Metabolic Network Model and Linear Programming

ZHANG Cheng-yan¹, GAO Pei¹, DUAN Zuo-ying¹, MAO Zhong-gui¹, SHI Zhong-ping^{1,2}

(1. School of Biotechnology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China; 2. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: The experimental data showed that, in aerobic glutamate fermentation with strain *C. glutamicum* S9114, glutamate produced in different ways with different patterns of O₂ uptake rate (OUR), CO₂ evolution rate (CER) and by-products accumulation at different dissolved oxygen (DO) levels; glutamate production could be prolonged but with higher lactate accumulation at a lower DO level; while glutamate production stopped at low concentration level with a quick decline of both OUR and CER when controlling DO at a higher level. In this study, a metabolic network model combined with the linear programming optimization was used to on-line predict the glutamate production under different DO levels, with only OUR and CER be on-line measured. The results indicated the power and advantages of the metabolic network model over the traditional unstructured dynamic models, in terms of easy parameter identification, clear biochemical interpreting of data, as well as prediction performance. The proposed method

收稿日期: 2004-11-15; 修回日期: 2005-02-01.

基金项目: 江苏省自然科学基金资助项目(BK-2003021)资助课题.

作者简介: 张成燕(1976-), 女, 江苏金湖人, 助理工程师, 生物化工专业硕士研究生.

supplies a novel and alternative way for on-line control and optimization of fermentation processes.

Key words: metabolic network; glutamate fermentation; mathematical model; linear programming; on-line prediction

要实现发酵过程的控制和优化,就必须建立准确有效的数学模型。一般来说,发酵过程的数学模型有3类。一类是非构造式的动力学模型(Unstructured Model)。它是描述发酵过程特征和本质的、最常见的、使用最广泛的数学模型。在非构造式的动力学模型中,状态变量通常是一些反映生物量和化学量的浓度,如菌体浓度、底物浓度、代谢产物浓度等等,可以用以发酵时间为独立变量的常微分方程(组)的形式来表示。许多常见的细胞增殖和代谢产物生成模型,如 Monod 增殖模型、Luedeking-Piret 产物生成模型就属于此类。非构造式模型的缺点有两个:1)模型参数的数量多,而且其物理意义也不十分明确,求解模型参数是一个非常复杂和困难的过程;2)模型及其参数是根据离线测量数据求解和计算得到的,它不能实时适应和把握环境因子、发酵条件、发酵批次等出现的变化和漂移,即由于发酵过程的时变特性,模型的通用能力有限。另一类是基于时间序列数据的黑箱性质的模型,这种模型考虑的仅仅是发酵过程的表现动力学特性,而根本不考虑过程的本质和各类反应的机理和机制。有两种黑箱性质的模型最常见、也应用得最为广泛:一种是基于过程状态变量和操作变量时间序列数据的线性自回归平均移动模型;另一种则是所谓的人工神经网络模型。其中,人工神经网络模型在发酵过程的建模中应用得比较广泛。人工神经网络模型的最大缺点就是它需要大量的实验数据来对神经网络进行学习和训练,否则模型将很难具有通用能力。另外,模型本身不具有任何明确的物理和化学意义。最后一类模型就是建立在人类经验和知识基础上的所谓模糊逻辑定性模型。这类模型的预测精度和通用能力完全取决于人们对于发酵过程特性的知识积累,需要建立大量、有效的模糊规则和模糊成员函数,而上述规则和函数的建立是一个非常费时费力的过程。

20 世纪 90 年代初,代谢(流)网络模型和技术开始出现。代谢(流)网络模型克服了传统建模方法中参数意义不明,输入输出关系难以解释等缺点,充分利用了现存的生物化学的知识和理论,具有通用性强、模型物理意义明确、建模相对容易等特点。

万方数据

代谢网络模型广泛应用于分析代谢网络的流量分配信息、确定代谢网络的流量分配关系、寻找目的产物流向中的瓶颈所在、和计算最大理论产量等方面。但是,由于代谢网络模型一般是由几十、上百个的代谢流的线性方程式组成的,直接用来计算求解发酵过程状态变量的经时变化,乃至用于过程的控制和优化有很大的困难,因此迄今为止,代谢网络模型的研究和应用几乎全部停留在分析发酵过程在不同阶段的代谢流分布,为过程的离线优化和调控提供依据和数据等方面^[1~3],主要是用来在线判断发酵过程所处的阶段和状态^[4],为是否采取在线控制措施,如是否添加基质、是否中断发酵等提供依据。

代谢(流)网络模型虽然含有大量的代谢流的物质平衡方程式,但每一步反应都有明确的物理化学意义,且都被既存生物化学理论所证实并被人们所公认。因此,建模过程本身并不复杂,而且模型的通用能力应该很强。建立代谢网络模型的目的之一就是利用可测状态变量的(生成或消耗)速度来求解不可测的、着眼物质的反应(生成或消耗)速度,从而为在线推定目的物质的浓度曲线以及过程的控制和优化提供可靠的情报和依据。通常,要根据特定的系统和对象和某些假定,对发酵过程所涉及到的所有反应和代谢途径进行合理的简化和合并,对代谢网络模型实施简化处理以利于计算。作者以谷氨酸发酵过程为对象,通过在线测定两个最常见、最易测量的状态变量速度参数——摄氧率(OUR)和 CO₂ 的释放率(CER),利用所建立的代谢网络模型在线推定不同操作条件下的谷氨酸的浓度—时间曲线,尝试发酵过程建模的一种新模式。

1 材料与方法

1.1 菌种

谷氨酸棒杆菌 *C. glutamicum* S9114,作者所在实验室保存菌株。

1.2 培养基

种子培养基(组分 g/L): C₆H₁₂O₆ · H₂O 25, K₂HPO₄ 1.5, MgSO₄ 0.6, MnSO₄ 0.005, FeSO₄

0.005,玉米浆 25,尿素 2.5(单独灭菌加入). pH 7.0~7.2.

发酵培养基(组分 g/L): $C_6H_{12}O_6 \cdot H_2O$ 140, K_2HPO_4 1.0, $MgSO_4$ 0.6, $MnSO_4$ 0.002, $FeSO_4$ 0.002, 硫胺素 5.0×10^{-5} , 玉米浆 15, 尿素 3.0(单独灭菌加入). pH 7.0~7.2.

1.3 发酵和培养条件

1.3.1 种子培养条件 从活化斜面接两环于种子培养基中,在 32 °C、200 r/min 条件下培养 8~10 h,镜检细胞正常无杂菌.

1.3.2 发酵及其发酵罐控制条件 发酵在 5 L 发酵罐(BIOTECH-5BG,上海保兴生物设备公司生产)中于 32 °C 下进行,实际发酵液量控制在 3.2~3.4 L 左右.根据需要通过自动调节搅拌转速将溶解氧浓度(DO)控制在 10%~50% 的水平,罐压保持在 0.07 MPa.自动添加质量分数 25% 的氨水将 pH 值控制在 7.1 ± 0.1 的水平,同时为谷氨酸合成提供氮源,保证整个发酵过程氮源过量和充足.根据需要通过间歇式地添加质量分数 50% 的葡萄糖,将发酵液中的葡萄糖质量浓度控制在 15 g/L 以上.

1.4 发酵过程状态参数的分析测定方法

使用尾气分析仪(LKM2000A,韩国 Lokas 公司生产)在线测定发酵尾气中 CO_2 和 O_2 的分压.将测得的数据进行移动平均滤波处理后,按照文献[3,5]的公式计算

$$OUR = \frac{F_{in}}{0.022 \ 4V} \left(p_{CO_2, in} - \frac{p_{O_2, out} \times p_{N_2, in}}{(1 - p_{O_2, out} - p_{CO_2, out})} \right) \quad (1)$$

$$CER = \frac{F_{in}}{0.022 \ 4V} \left(\frac{p_{CO_2, out} \times p_{N_2, in}}{(1 - p_{O_2, out} - p_{CO_2, out})} - p_{CO_2, in} \right) \quad (2)$$

计算摄氧率(OUR)和 CO_2 的释放率(CER).其中 F_{in} , V 为进罐气体体积和发酵液体积, $p_{O_2, in}$, $p_{O_2, out}$ 为 O_2 的进罐和出罐的气体分压, $p_{CO_2, in}$, $p_{CO_2, out}$ 为 CO_2 的进罐和出罐的气体分压.其余状态变量全部为离线分析和测定.其中葡萄糖、谷氨酸和乳酸的浓度由 SBA-40B 生物传感器(山东省科学院生物研究所生产)测定,菌体浓度(OD_{620})用分光光度计(UV-2100,尤尼柯上海仪器有限公司生产)测定.以灭菌后的初始发酵液为参比液,在 620 nm 波长下测定,少量产生的乙酸(<1 g/L)由气相色谱仪(GC112A,上海精密科学仪器厂生产)测定.经使用液相色谱和气相色谱验证,谷氨酸、乳酸和乙酸是存在于发酵液中的主要代谢产物.

万方数据

2 代谢网络模型及其求解方法

2.1 代谢网络模型

对谷氨酸发酵过程所涉及到的基本代谢反应和途径进行简化和合并,见图 1.

所示的谷氨酸发酵代谢网络图和 20 个代谢反应方程式($r_1, r_2, \dots, r_{20}$),即谷氨酸代谢网络模型.该代谢网络模型包含了发生在 EMP 糖酵解途径、PP 磷酸戊糖途径、TCA 循环、乙醛酸回补途径、呼吸链和氧化磷酸化以及代谢产物(谷氨酸和乳酸)生成过程中发生的所有基本反应.发酵过程实际上就是在摄取消耗营养源(如葡萄糖等碳源、 NH_3 等氮源、和 O_2)的同时,合成代谢产物并释放 CO_2 的过程.因此,葡萄糖、 NH_3 、 O_2 等反应物质是过程的输入,其在代谢网络图上的位置称为起始节点;而代谢产物、 CO_2 等则看成是过程的输出,其在代谢网络图上的位置称为终端节点.代谢网络图上的中间位置的节点代表中间产物(包括 ATP 和 ADP 等能量构成物质、以及 NADH 和 NADPH 等辅酶),中间节点既有物质流的流入也有物质流的流出.一般假定在反应过程中,中间产物生成后立即被后续的反应所消耗,其瞬间积累为 0 而处于稳态(拟稳态)^[4,6].在谷氨酸发酵中,所着眼的物质一共有 5 个,即谷氨酸、葡萄糖、乳酸、 CO_2 和 O_2 .

由于谷氨酸发酵是一个典型的增殖非偶联的过程,菌体(对数)增殖期非常短促,进入静止期之前,基本上没有谷氨酸生成,谷氨酸浓度也较低.而谷氨酸生产期(产酸期)较长,从过程和优化的角度上看也更为重要.因此,本代谢网络模型考虑的仅仅是产酸期的代谢反应过程,而难以确定的菌体合成同化反应则被忽略掉.一般来说,PP 磷酸戊糖途径的主要作用是大量生成 NADPH,用来合成菌体的构成前体.而在产酸期,菌体的合成停止,不再消耗 NADPH. NADPH 的消耗仅发生在由 α -酮戊二酸向谷氨酸合成的一步反应(r_{12}),因此,为平衡 NADPH 的物质收支,同时考虑文献所介绍的转氢酶反应^[7,8]和 NADPH 直接氧化^[8]的两个 NADPH 消耗反应,并将其合并为反应 r_{20} .另外,虽然产酸期菌体不再合成生长,但是维持代谢依然存在,ADP 再生反应 r_{19} 实际就代表了细胞维持代谢的过程^[8].

2.2 利用线性规划优化法求解代谢网络模型

代谢网络模型的求解过程就是利用可测状态变量的(生成或消耗)速度和代谢网络模型中的反应方程式来求解不可测的、着眼物质的反应速度的过程.

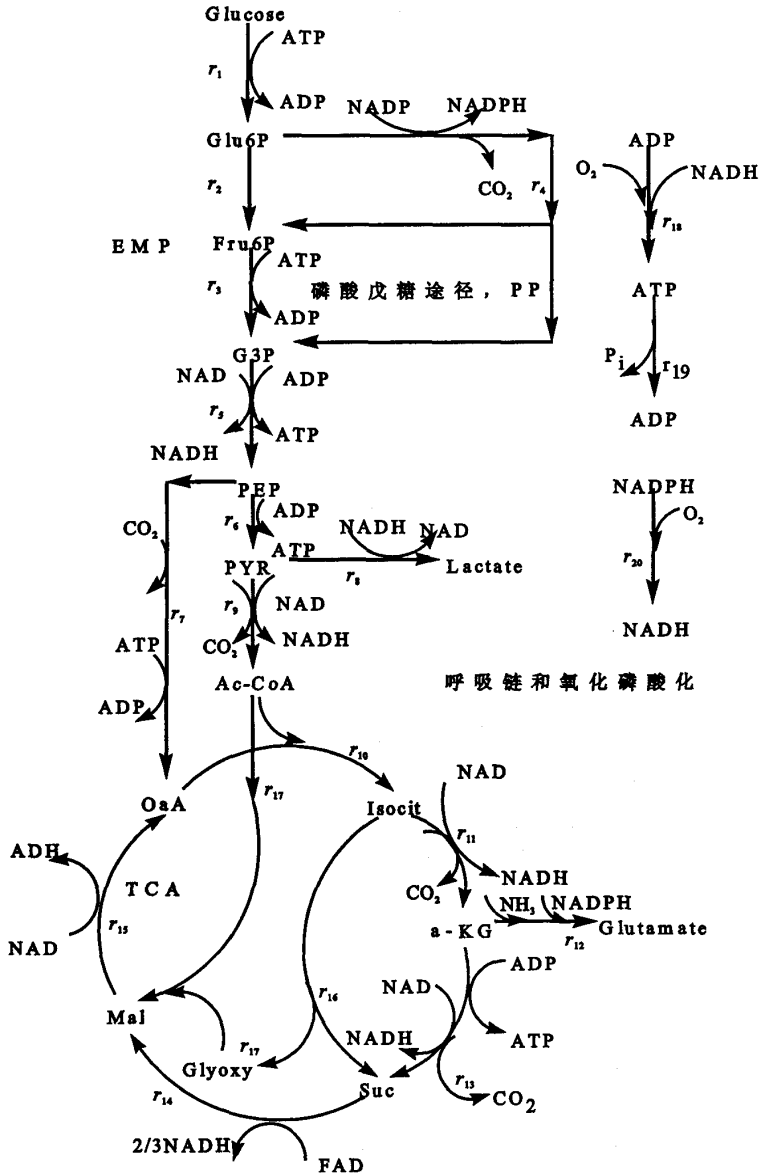


图1 谷氨酸发酵代谢网络图

Fig.1 Metabolic network of glutamate fermentation

根据谷氨酸发酵代谢网络图、20个反应方程式以及中间产物拟稳态的假设,可以用下列矩阵的方式来描述整个代谢网络模型:

$$A = A_m r_m + A_c r_c = 0 \quad (3)$$

这里, A 是 $n \times k$ 阶的代谢反应总行列矩阵, r 是 $k \times 1$ 阶的反应速度的向量. 其中, n 表示代谢网络的总的节点个数(20, 参见式2); 而 k 则表示反应速度的总个数(25), 它是代谢网络模型的反应式个数(20)与着眼物质速度式的个数(5)之和. 如果 k 个总反应速度中有 m 个是在线可测的, 对应的可测速度向量为 r_m , 其余不可测速度向量为 r_c , 那么 A_c 和 A_m 就分别是 $n \times (k-m)$ 阶和 $n \times m$ 阶的, 对应于不可测速

度向量 r_c 和可测速度向量 r_m 的, 对代谢反应总行列矩阵 A 进行分割以后形成的小矩阵. 在这里, A 、 A_c 、 A_m 、 r 、 r_c 和 r_m 可以具体表示为式(2)的形式. 矩阵 A 右侧的符号代表代谢网络所考虑的所有节点(物质), 即 n 个着眼物质和中间产物. 下侧的符号则代表所有的反应速度. 符号“ T ”表示矩阵的转置. r_g 、 r_s 、 r_L 、 r_c 和 r_m 分别表示葡萄糖、谷氨酸、乳酸、 CO_2 和 O_2 的生成或消耗速度. 如果 $n = k-m$, 则 A_c 为一方阵, $r_c = -A_c^{-1} A_m r_m$, 不可测速度向量 r_c 可以惟一求解. 如果 $n > k-m$, 则代谢网络是一个超定系统, 物质平衡的代数方程组的个数大于未知变量(不可测反应速度)的个数, 可以用最小二乘法来对

未知变量(不可测反应速度)进行最优推定: $r_c = -(A_c^T A_c)^{-1} A_c^T A_m r_m$ 。而如果 $n < k - m$, 则代谢网络是一个不定系统, 物质平衡的代数方程组的个数小于未知变量的个数, 理论上未知变量存在着无数个解。在这种情况下, 未知变量的求解方法是, 以所有的物质平衡方程式(n 个)为约束条件, 通过规定一个有关未知变量的线性目标函数, 然后利用线性规划法来进行求解计算。本研究中可在线测量的状态参数只有两个: 摄氧率(OUR)和 CO_2 的释放率(CER), 即 $m = 2$ 。这时, $(n = 20) < ((k - m) = (25 - 2))$, 代谢网络为一个不定系统, 必须通过规定线性目标函数, 利用线性规划法来求解计算不可测速度向量 r_c 。

$$r = (r_m^T, r_c^T)^T$$

$$r_c^T = (r_1, r_2, r_3, r_4, r_5, r_6, r_7, r_8, r_9, r_{10}, r_{11}, r_{12}, r_{13}, r_{14}, r_{15}, r_{16}, r_{17}, r_{18}, r_{19}, r_{20}, r_s, r_g, r_L) \quad (4)$$

$$r_m^T = (r_{O_2}, r_{\text{CO}_2})$$

线性目标函数的选取方式多种多样, 有目的物质生产速度最大的方法、有让整个代谢网络所产生的 ATP 或 NADH 最小的方法、还有让营养物质摄取速度最小的方法等等^[9]。作者采用的是 NADH 生成速度最小的方法, 其物理意义就是所谓的细胞经济学的原理和假说, 换句话说, 细胞要以高效率、最少的 NADH 量来循环再生 ATP 以维持代谢, 过量的氧化反应的存在对细胞自身不利^[9]。这样, 代谢网络模型的求解就可以用式(3)来进行定式化, 然后再使用 Matlab (Ver. 6.5, 美国 The Math Works 公司产品)软件中的线性规划最优计算程序包“Linprog”来实施计算。

$$\text{Min}(\text{NADH 生成速度}) = \text{Min}\{r_5 + r_9 + r_{11} + r_{13} + 0.67r_{14} + r_{15} + 2r_{20}\}$$

$$\text{限制条件: } A_m r_m + A_c r_c = 0$$

$$r_c(i) \geq 0 \quad (i = 1, \dots, k - m) \quad (5)$$

2.3 谷氨酸浓度经时曲线的求解

利用可测速度向量 r_m 和上述线性规划法求解出各个不同时刻的不可测速度向量 r_c , 包括谷氨酸生成速度 r_{12} 和葡萄糖消耗速度 r_1 后, 就可以利用 Euler 法^[10]积分求解出各种不同操作条件下的谷氨酸浓度变化曲线以及葡萄糖的消耗量, 并与谷氨酸浓度的离线实测值等相比较, 以验证代谢网络模型的预测性能和通用能力。

$$P(k) = P(k-1) + M_{wp} \times r_{12}(k) \times \Delta T \quad (6)$$

$$P(0) = P_0$$

$$S(k) = S(k-1) + M_{ws} \times r_1(k) \times \Delta T \quad (7)$$

$$S(0) = S_0$$

这里, $P, P_0, S, S_0, k, \Delta T, M_{wp}, M_{ws}$ 分别表示谷氨酸的浓度、谷氨酸的初始浓度(已知或给定)、单位发酵液体积内葡萄糖的消耗量、单位发酵液体积内初始葡萄糖的消耗量(已知或给定)、尾气分析的采样时刻和采样间隔、以及谷氨酸和葡萄糖的相对分子质量。

3 结果与讨论

3.1 谷氨酸发酵中菌体生长和产物代谢的基本特征

图2是谷氨酸发酵的典型模式和特征曲线(DO被控制在30%)。发酵的前8h为菌体增殖期, 细胞快速生长, OUR和CER迅速上升, 并在发酵10h左右形成一个高峰。进入到产酸期后, 菌体不再增殖生长, 并逐步死灭, OUR和CER也不断下降。在这期间, 谷氨酸开始大量生成和积累, 到20h左右产酸基本停止。溶解氧(DO)的浓度对于谷氨酸的发酵水平影响很大。

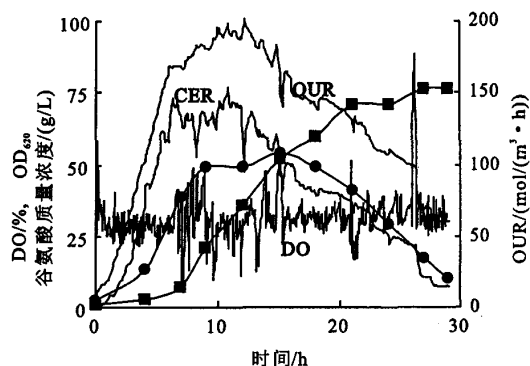


图2 谷氨酸发酵的典型模式和特征曲线

Fig. 1 Typical time course of glutamate fermentation

图3是DO被分别控制在10%和50%时, 谷氨酸质量浓度和OUR的经时变化曲线。从图3可以看出, 在菌体增殖期, 高溶氧和低溶氧的OUR变化趋势不大; 而到了产酸期, DO控制在10%和50%时的OUR变化和相应谷氨酸生成模式差异巨大。低溶氧(10%)时, OUR下降速度缓慢, 产酸期明显延长, 发酵32h谷氨酸质量浓度达到80g/L。而高溶氧(50%)条件下, OUR迅速下降, 谷氨酸的生产积累很快停止, 发酵30h谷氨酸质量浓度仅为56g/L。菌体浓度(OD_{620})和CER也显示出同样的下降趋势。同时在低溶氧条件下, 代谢副产物乳酸有比较严重的积累, 最终质量浓度达18g/L左右。这说明谷氨酸发酵在高溶氧和低溶氧条件下的代谢途径明显不同: 溶氧过量条件下, 虽然少有代谢副产物的生成和积累, 但是可能是由于细胞长期处在

高溶氧条件下,剧烈的通气和搅拌加剧了菌体的死灭速度和发酵活性的衰减,最终导致产酸能力下降,谷氨酸最终质量浓度停留在很低的水平上。而在较低的 DO(如 10%)下,产酸期的细胞发酵活性可以维持在相对较高的水平上,这点可以从 OUR 和 CER 相对缓慢下降的趋势上明显地体现出来。这时,虽然伴随着代谢副产物乳酸的生成,谷氨酸发酵产率在一定程度上下降,但是产酸期明显延长,最终质量浓度明显提高。上述谷氨酸发酵的基本特征和模式为我们提出了两个方面的任务:一是要通过调控 DO,把 DO 实时在线控制在既不产生乳酸等代谢副产物,又能最大程度地维持细胞发酵活性的水平,保证谷氨酸发酵的高产。二是要建立有效的反映谷氨酸质量浓度变化的实时在线模型,以满足发酵过程控制和优化的要求。作者尝试建立以 DO 为控制变量的非构造式动力学模型来拟合离线测定的菌体和谷氨酸质量浓度数据,但发现拟合效果很差。其原因可能有两个:一是非构造式动力学模型根本无法体现和反映各发酵批次间动力学特性出现的波动,即所谓发酵过程的时变性特征;二是实际上也确实无法用几个状态变量和控制变量所构成的常微分方程组来准确地描述谷氨酸发酵的复杂过程。这也是作者试图使用代谢网络模型并结合 OUR 和 CER 的在线数据来预测计算谷氨酸浓度变化曲线和其生产模式的原因所在。

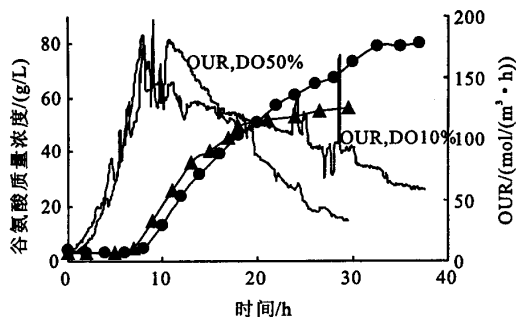


图3 同 DO 条件下的谷氨酸质量浓度和 OUR 的经时变化曲线

Fig. 3 Time courses of glutamate concentration and OUR at different DO levels

3.2 利用代谢网络模型在线推定谷氨酸质量浓度的经时变化

根据式(2)所示的代谢网络的(矩阵)模型以及式(3)和式(4)的计算方法,在不同的 DO 条件下(10%和 30%)对谷氨酸质量浓度进行在线推定的结果见图 4(a)。实线表示谷氨酸质量浓度的在线推定值,●和▲表示离线的实际测定结果。当菌体对数增殖期基本结束,即认为发酵已经进入产酸期,万方数据

取此时的谷氨酸实测质量浓度作为式(4)的积分初始值开始求解计算。代谢网络模型在两种不同的 DO 控制条件下的预测值与实测值吻合得非常好。为验证代谢网络模型的通用能力,在另一次发酵实验中对 DO 的控制水平进行了切换。即首先将 DO 控制在 10%,当发酵进入产酸期后的第 12 小时,将 DO 调高到 30%。代谢网络模型依旧能够比较准确地预测谷氨酸质量浓度,特别是它能够比较准确地反映出谷氨酸质量浓度的变化趋势(见图 4(b))。

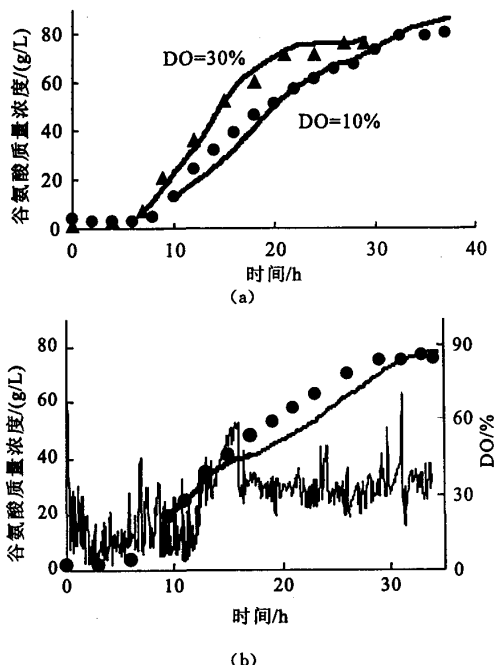


图4 不同条件下代谢网络模型对谷氨酸质量浓度的预测性能

Fig. 4 Prediction performance of the metabolic network model

3.3 代谢网络模型在识别和判断非正常发酵过程中的应用

为继续验证代谢网络模型的通用能力,作者在另一次实验中刻意制造出一次非正常发酵的过程(Failure Run),见图 5。首先将 DO 控制在 30%,当发酵进入产酸期后的第 13 小时,人工调低搅拌转速使 DO 脱离自动控制状态。DO 迅速降低到 0%的极端缺氧水平。由于氧气的极度匮乏,谷氨酸生产根本无法进行。从理论上讲,在此条件下谷氨酸生成速度基本为 0,谷氨酸质量浓度不会变化。当发酵进行到 19 h 后,重新启动 DO 的自动控制并将其控制水平恢复到 30%。这时,尽管细胞经受了 6 h 的极端缺氧状态,发酵活性受到很大的伤害,但是,当提高溶氧水平后,细胞的发酵活性得到了一定程度的恢复,谷氨酸生产依旧应该继续进行。代谢网络

模型较好地模拟预测了这一非正常发酵的过程,特别是在 DO 控制水平切换处,模型较好地预测了谷氨酸质量浓度的变化模式。这些结果表明代谢网络模型具有在线判断非正常发酵和识别诊断故障的潜在能力。

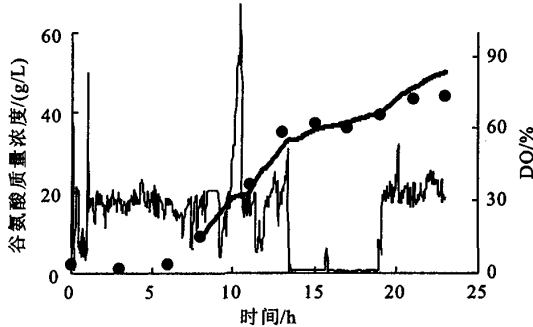


图5 利用代谢网络模型判断识别非正常发酵

Fig. 5 Recognition of failure fermentation using the metabolic network model

3.4 利用代谢网络模型在线推定葡萄糖的消耗量

利用式(5)计算发酵过程中(单位发酵液体积的)葡萄糖消耗量的变化并与实际值进行比较,可以进一步验证代谢网络模型的可靠性和通用能力。图6中实线代表在线预测值,●和▲表示离线的实际测定结果。从图6可以看出,两次发酵实验(一次是DO控制在10%的正常发酵,另一次是图5所示的非正常发酵)的葡萄糖消耗量的推定值均与实测值基本一致。DO为10%的发酵后期,葡萄糖消耗量的推定值与实测值产生了一定的偏差,恰恰反映了该发酵过程有比较严重的代谢副产物——乳酸积蓄这一事实。

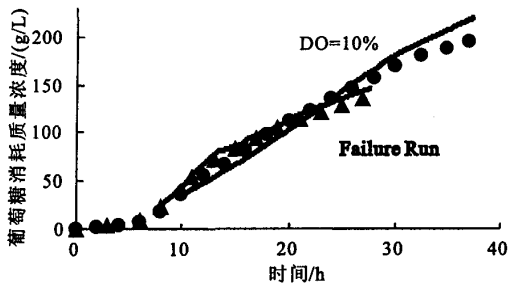


图6 利用代谢网络模型推定葡萄糖添加量

Fig. 6 Prediction of GCA (glucose consumption amount per unit broth volume) using the metabolic network model

代谢网络模型能够较好地在线预测谷氨酸发酵过程中谷氨酸质量浓度及其生成模式,但也存在着以下一些问题有待今后解决:1)在使用 Matlab 程序包“Linprog”进行线性规划优化计算时,虽然收敛率一般都在95%以上,但在个别 OUR 和 CER 采

样点处却不能收敛,这必然要影响到代谢网络模型的预测精度;2)OUR 和 CER 是仅有的两个独立测量变量,它们的值直接影响到代谢网络模型的预测性能。在 DO 为 50% 的发酵实验中,进入到产酸期后,呼吸商 $RQ(=CER/OUR)$ 一直保持在 1.0 左右,而其余发酵实验的 RQ 值一般在 0.6~0.8 左右。 $RQ=1$ 说明葡萄糖的代谢流几乎全部进入到 TCA 循环中,理论上葡萄糖几乎全部转化成 CO_2 和 H_2O ,而不产生其他代谢产物。但实际上此时确实有谷氨酸的生成和积累,尽管产量较低。通过计算 TCA 循环中 α 酮戊二酸以下的几步主要反应速度 r_{13} 、 r_{14} 、 r_{15} 发现, RQ 在 0.6~0.8 左右时, r_{13} 、 r_{14} 、 r_{15} 的值很小, CO_2 回补途径 r_7 活跃,进入到 TCA 回路的代谢流几乎全部通过反应 r_{12} 向外溢出,生成谷氨酸,TCA 回路自 α 酮戊二酸以下几乎全部关闭。而当 RQ 在 1.0 左右时, r_{13} 、 r_{14} 、 r_{15} 的值很大, r_{12} 的值很小,TCA 回路全部开通。这在理论上是解释得通的,但却造成谷氨酸的预测值远远小于实际测量值。以上事实说明该代谢网络模型在预测 $RQ=1$ 左右的代谢发酵时存在着缺陷。3)该代谢网络模型还不能预测代谢副产物乳酸的生成和积累。从代谢网络上讲,葡萄糖代谢流可以有两条路径进入到 TCA 循环中:即 $PEP \rightarrow PYR \rightarrow Ac-CoA$ 的途径和 CO_2 回补途径 r_7 。乳酸是从 PYR 出发,通过消耗 NADH 产生的,它并不参与 NADH 的生成。因此,只要 $r_5 = r_6 + r_7$ 和 $r_6 = r_8 + r_9$ 的关系得到满足, r_{20} 可以平衡 NADH 的收支,乳酸生成速度 r_8 就可以有很大的随意性。为了得到可同时预测谷氨酸和乳酸生成的模型,还必须增加至少一个在线可测量变量作为限制条件,比如说 NH_3 的消耗速度。 NH_3 既是作为合成谷氨酸的原料,又是中和谷氨酸和乳酸,保持 pH 值恒定的碱液,它与谷氨酸和乳酸的生成直接相关。

4 结论

通过在线测定 OUR 和 CER,建立代谢网络模型并用线性规划法进行优化计算,比较准确地在线推定出各种不同发酵条件下的谷氨酸质量浓度及其变化模式。与传统的非构造式动力学模型相比,该方法具有建模简单、模型物理意义明确、通用性能更好等优点,有望为发酵过程的在线控制和优化提供一种全新和有效的途径。

表6 $L_9(3^4)$ 正交试验结果分析Tab. 6 The analysis of result with the orthogonal test of $L_9(3^4)$

培养基 编号	葡萄糖 A	酵母膏 B	磷酸二 氢钾 C	硫酸镁 D	菌丝生物量 $\Sigma(n=6)$
1	1	1	1	1	18.239 4
2	1	2	2	2	16.222 6
3	1	3	3	3	16.598 2
4	2	1	2	3	21.317 7
5	2	2	3	1	22.854 6
6	2	3	1	2	18.831 9
7	3	1	3	2	26.763 5
8	3	2	1	3	17.984 2
9	3	3	2	1	29.008 3
K1	51.060 2	66.320 6	55.055 5	70.102 3	
K2	63.004 2	57.061 4	66.548 6	61.818 0	
K3	73.756 0	64.438 4	66.216 3	55.900 1	
k1	8.510 0	11.053 4	9.175 9	11.683 7	187.820 4
k2	10.500 7	9.510 2	11.091 4	10.303 0	
k3	12.292 7	10.739 7	11.036 1	9.316 7	
R	3.782 7	1.543 2	1.915 5	2.367 0	

3 结 论

以裂褶菌为材料进行液体培养基的筛选^[5,6], 结论如下:裂褶菌对供试碳源都有不同程度的利用,葡萄糖利用率最高,蔗糖和玉米粉利用较差;对供试氮源也有不同程度的利用,酵母膏和黄豆粉的利用率较高,蛋白胨和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 利用较差。通过 $L_9(3^4)$ 正交设计试验筛选裂褶菌液体培养基的最适配方是:马铃薯 200 g,麸皮 100 g,葡萄糖 30 g,酵母膏 1 g, KH_2PO_4 5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2.5 g, VB_1 0.1 g, CaCO_3 3 g, H_2O 1 L,如果考虑到经济价值等因素,可用黄豆粉代替酵母膏作为氮源,其菌丝生物量不会有较大的下降。

参考文献:

- [1] 黄年来,杨庆尧,张甫安,等. 中国食用菌百科[M]. 北京:中国农业出版社,1997. 119.
- [2] 陈文强,邓百万. 两种食用菌液体发酵培养基筛选的初步研究[J]. 氨基酸和生物资源,2000,22(3):22-25.
- [3] 林亲雄,陈京元. 碳源和氮源对松乳菇菌丝生长的影响[J]. 食用菌学报,2002,9(1):9-12.
- [4] 俞渭江. 生物统计附实验设计[M]. 北京:中国农业出版社,1980. 14-228.
- [5] 赖萍,黄彦珍,林跃鑫. 巴西革耳 *Lentinus striguellus* 深层发酵的研究[J]. 食品与发酵工业,2002,10(28):35-39.
- [6] 李阜棣,何绍江. 农业微生物学实验技术[M]. 北京:中国农业出版社,1996. 37-55.

(责任编辑:李春丽)

(上接第37页)

参考文献:

- [1] 张嗣良. 发酵过程多水平问题及其生物反应器装置技术研究[J]. 中国工程科学, 2001,3:37-45.
- [2] 唐军,蔡水洪,叶勤. 克鲁斯假丝酵母分批发酵生产甘油的代谢流分布[J]. 高校化学工程学报,2002,16:58-63.
- [3] Jin S, Ye K, Shimizu K. Metabolic pathway analysis of recombinant *saccharomyces cerevisiae* with a galactose-inducible promotor based on a signal flow model approach[J]. *J Biosci & Bioeng*, 1995, 80:541-551.
- [4] Takiguchi N, Shimizu H, Shioya S. An on-line physiological state recognition system for the lysine fermentation process based on a metabolic reaction model[J]. *Biotechnol Bioeng*, 1997, 55:170-181.
- [5] 王树青,元英进. 生化过程自动化技术[M]. 北京:化学工业出版社,1999. 110-113.
- [6] Shimizu H, Takiguchi N, Tanaka H. A maximum production strategy of lysine based on a simplified model derived from a metabolic reaction network[J]. *Metabolic Engineering*, 1999, 1:299-308.
- [7] 杨艳,陈奎发,李春. 谷氨酰胺产生菌 NS611 的代谢流分析[J]. 无锡轻工大学学报,2003,22(2):38-43.
- [8] Park S M, Sinskey A J, Stephanopoulos G. Metabolic and physiological studies of *Corynebacterium glutamicum* mutants [J]. *Biotechnol Bioeng*, 1997, 55:864-879.
- [9] Savinell J M, Palsson B O. Network analysis of intermediary metabolism using linear optimization-I. Development of mathematical formalism [J]. *J Theor Biol*, 1992, 154:421-454.
- [10] Atkinson K. Elementary numerical analysis [M]. New York: Wiley & Johnsons, 1985.

(责任编辑:李春丽)