

文章编号 :1009 - 038X(2002)04 - 0340 - 04

L-色氨酸产生菌分批发酵动力学模型

宋文军¹, 陈宁¹, 王健¹, 谭青乔¹, 刘淑云¹, 张克旭¹,
朱延哲², 刘洪平², 冯胜华²

(1. 天津轻工业学院食品工程系, 天津 300222; 2. 天津市氨基酸公司, 天津 300051)

摘要:基于 30 L 的发酵罐分批发酵实验数据, 根据已建立的 L-色氨酸发酵数学模型, 应用 MATLAB 软件对模型进行最优参数估计和非线性曲线拟合, 得到的结果相对误差较小, 所建立的分批发酵动力学模型能较好地反映 L-色氨酸分批发酵的过程。

关键词:L-色氨酸; 发酵动力学模型; 拟合

中图分类号: Q 93-33; Q 939.93

文献标识码: A

The Kinetics of Batch Fermentation of L-Tryptophan-Producing Strain

SONG Wen-jun¹, CHEN Ning¹, WANG Jian¹, TANG Qing-qiao¹, LIU Shu-yun¹,
ZHANG Ke-xu¹, ZHU Yan-zhe², LIU Hong-ping², FENG Shen-hua²

(1. Tianjin Institute of Light Industry, Tianjin 300222, China; 2. Tianjin Amino Acid Company, Tianjin 300051, China)

Abstract: Base on the experimental data of batch fermentation in 30 L fermentation reactor, and the established mathematical model of L-tryptophan fermentation, the optimal parameters were evaluated, and the nlinfit was fitted to the model through software MATLAB. The fitted model could reflect the fed-batch fermentation process of L-tryptophan very well.

Key words: L-Tryptophan; the model of fermentation kinetics; fit

MATLAB 数值应用软件, 功能强大, 使用方便, 界面简洁, 对大批量数据有较强的管理、计算和可视化能力, 运算效率高。近年来, 国内掀起了 MATLAB 软件应用热。随着大量的工具箱的开发, MATLAB 软件的应用几乎覆盖各行各业, 被人们形象地喻为“数学验算纸”^[1,2], 但目前国内尚未见将 MATLAB 软件应用于发酵动力学模型分析的研究报道。基于所选育的 L-色氨酸产生菌 TQ2223 菌株 30 L 容积发酵罐分批发酵的实验数据, 应用 MATLAB 软件对发酵动力学模型进行参数优化估

值和曲线拟合, 并对其可靠性进行了分析。

1 材料与方法

1.1 供试菌种

谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamate*) TQ2223, 天津轻工业学院代谢控制发酵研究室保存菌种。

1.2 主要仪器

巡回式自动摇瓶柜, 上海新蕊公司产品; 30 L 容积自动控制发酵罐(B Braun B 型), 德国贝朗

收稿日期 2002-04-03; 修订日期 2002-04-15.

基金项目 天津市科委“九八”攻关项目(L-色氨酸中试 983113711)资助课题。

作者简介 宋文军(1967-), 男, 河北唐山人, 发酵工程博士研究生, 副研究员。

(Braun)公司产品。

1.3 培养基

1.3.1 种子培养基 葡萄糖 40 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 4.0 g/L, 酵母浸膏粉 6 g/L, KH_2PO_4 1.0 g/L, MgSO_4 0.4 g/L, MnSO_4 0.01 g/L, FeSO_4 0.01 g/L, 玉米浆 30 mL, VB_1 300 μg , VH 200 μg ; pH 7.0~7.2, 73.55 kPa, 15 min。

1.3.2 发酵培养基 葡萄糖 132 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 40 g/L, Phe 0.15 g/L, Tyr 0.15 g/L, KH_2PO_4 1.0 g/L, MgSO_4 0.4 g/L, MnSO_4 0.01 g/L, FeSO_4 0.01 g/L; 豆饼水解液 20 mL, 玉米浆 40 mL, VB_1 100 μg , VH 50 μg ; pH 7.0~7.2, 73.55 kPa, 15 min。

1.4 培养条件

1.4.1 斜面活化培养 32 $^\circ\text{C}$ 培养 20~24 h。

1.4.2 30 L 容积罐发酵的种子培养 500 mL 的三角瓶装量 50 mL, 九层纱布封口, 32 $^\circ\text{C}$ 于循环式摇瓶柜 220 r/min 振荡培养 16 h。

1.4.3 30 L 容积罐分批发酵 30 L 的发酵罐中装液 15 L, 接种量 1 L, 温度控制在 32 $^\circ\text{C}$, 通风比控制 1:1, 流加氨水控制 pH 在 7.0, 通过流加泡敌消泡, 搅拌转速 400 r/min。

1.5 分析方法

1.5.1 菌体干重测定 取 10 mL 发酵液于预先干燥好的离心管中, 3 000 r/min 离心 15 min, 弃上清液, 于恒温干燥箱 105 $^\circ\text{C}$ 干燥至恒重, 然后用分析天平称重。

1.5.2 葡萄糖测定 以 SBA-40A 型葡萄糖-谷氨酸分析仪测定。

1.5.3 L-色氨酸测定 采用对二甲氨基苯甲醛比色法测定。

1.5.4 模型确定 应用 MATLAB 工具软件进行非线性曲线拟合(nlinfit)。

2 结果与讨论

2.1 动力学模型的建立

发酵动力学模型一般由 3 部分组成: 微生物生长动力学模型; 底物消耗动力学模型; 产物形成动力学模型。Moser 等^[5]按建模方式将动力学模型分为 3 类: 机制模型; 数学拟合模型; 正规模型。微生物反应过程非常复杂, 特别是在分批发酵过程中建立机制模型几乎不可能。目前, 国内外生化工程学者所构建的模型大多属于二三类, 数学拟合模型应用最为广泛。其中, 数学拟合模型建模较为简便, 易于分析验证和实现计算自动化。建模的目的是为了更深刻地了解微生物复杂的代谢本质, 通过建模寻

求最适的操作条件, 实现发酵过程的最优化控制。

2.1.1 菌体生长动力学模型的建立 描述菌体生长最常用的模型为 Monod 方程, 该模型为典型的决定论均相非结构模型, 而且最简单。它是基于以下假设建立的: 菌体生长为均衡型非结构式生长, 细胞成分只需要用一个参数即菌体浓度表示即可; 培养基中只有一种底物是生长限制性底物, 其它营养成分不影响微生物生长; 将微生物生长视为简单反应, 并假设菌体得率为常数, 没有动态滞后。显然后两种假设不符合 L-色氨酸发酵的特征。由于 L-色氨酸发酵采用较高浓度的糖类物质进行发酵, 发酵液比较粘稠, 采用 Monod 方程有偏差, 为此采用 Logistic 方程来描述菌体的生长规律, 即

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

式中: μ_m ——最大比生长速率; X_{\max} ——菌体生长上限。

Logistic 模型是一个典型的 S 型曲线, 能较好地反映分批发酵过程中因菌体浓度的增加对自身生长存在的抑制作用, 并能较好地拟合分批发酵过程的菌体生长规律。分批发酵开始时, 菌体浓度很低即 X 比 X_{\max} 小得多, X/X_{\max} 项可忽略不计, 方程(1)表示菌体呈指数生长; 对数生长期结束后菌体生长处于稳定期, $X = X_{\max}$, 方程(1)表示菌体生长停止。

2.1.2 产物生成动力学模型的建立 产物主要指的是细胞培养过程中代谢生成的细胞量以外的产物。按照其生成特点, 可分为 3 类: 产物形成与菌体生长偶联型: 只是在菌体生长时才有产物生成; 产物形成与菌体生长部分偶联型: 在菌体生长阶段有部分产物形成, 而部分或大部分产物是在菌体处于生长稳定期形成的; 产物形成与菌体生长非偶联型: 只要细胞存在, 产物就会生成。对于 L-色氨酸发酵, 可分为两个阶段, 第一阶段为菌体生长阶段, 菌体生长与基质消耗成正比, 有产物生成但较少; 第二阶段为产物合成阶段, 产物的合成与基质消耗成正比, 菌体生长量趋于稳定。显然, L-色氨酸发酵属于部分生长偶联型。为简便起见, 选用由 Luedeking 和 Pirel^[3]提出的下列模型, 描述产物色氨酸的形成规律, 即

$$\frac{dP}{dt} = \alpha \frac{dX}{dt} + \beta X \quad (2)$$

式中: α, β ——动力学模型参数; $\alpha \frac{dX}{dt}$ ——与菌体生长率相关的产物形成率; βX ——非伴随菌体生长的产物形成率。

2.1.3 底物消耗动力学模型 底物包括细胞生长所需的各种营养成分,其消耗主要有 3 个方面:一是细胞生长的消耗,用以合成新的细胞;二是细胞维持基本生命活动的消耗;三是用于合成代谢产物的消耗.因此底物消耗可用如下动力学模型表示^[4]:

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{dX}{dt} \times \frac{1}{Y_{x/s}} - m_x X - \frac{1}{Y_{p/s}} \times \frac{dP}{dt} \quad (3)$$

式中: $Y_{x/s}$ ——碳源用于菌体生长的得率常数; $Y_{p/s}$ ——碳源用于产物积累的得率常数; m_x ——微生物碳源的维持常数.

为建模简化起见,将 L-色氨酸分批发酵过程的限制性基质消耗,大致分为长菌消耗和产酸消耗两大部分.虽然菌体呼吸也要消耗一些基质,但可以将其归结在长菌消耗之内,则基质(葡萄糖)消耗的模型方程可以简单地用式(4)描述

$$-\frac{dS}{dt} = k_1 \frac{dX}{dt} + k_2 \frac{dP}{dt} \quad (4)$$

式(1)(2)(4)构成了 L-色氨酸发酵过程中菌体生长、产物形成及底物消耗的动力学模型.该模型共 6 个参数,描述了发酵过程中菌体、底物及产物浓度的变化规律.

2.2 模型拟合分析

发酵过程模型常根据经验和微生物代谢本质建立,并经实践不断验证,不断修正参数,从而使模型能更好反映发酵本质.针对特定的微生物发酵过

表 1 分批发酵动力学模型参数估计值

Tab.1 Estimated values of kinetics model parameter of batch fermentation

参数	μ_m	X_{max}	α	β	k_1	k_2
估计值	0.147	22.6	0.0052	0.0888	0.0052	17.94
95%置信区间	(0.135, 0.158)	(22.22, 22.98)	(0.00489, 0.00546)	(0.0768, 0.1007)	(-0.263, 0.273)	(16.77, 19.1)

因此,非线性规划得到的 3 个发酵动力学数学模型为

$$\frac{dX}{dt} = 0.147 \left(1 - \frac{X}{22.6}\right) X \quad (5)$$

$$\frac{dP}{dt} = 0.0888 X + 0.0052 \frac{dX}{dt} \quad (6)$$

$$-\frac{dS}{dt} = 0.0052 \frac{dX}{dt} + 17.94 \frac{dP}{dt} \quad (7)$$

2.2.2 拟合曲线分析 为了进一步衡量所建数学模型的可靠性,应用 nlintool 函数得到 L-色氨酸分批发酵过程的拟合曲线,如图 1~3 所示.图中,横坐标轴表示发酵时间,纵坐标轴分别为菌体质量浓度(g/L)、L-色氨酸质量浓度(g/L)和葡萄糖质量浓度(g/L),中间的实线代表拟合的菌体生长、产物形成及葡萄糖消耗的预测曲线,两条虚线为置信度

程,需要应用计算机软件对发酵动力学模型参数进行拟合,求得待解参数,从而为这一微生物发酵过程的优化奠定基础.过去常采用 Runge-Kutta 法、Marquardt 法等对发酵动力学模型进行拟合分析,常以绝对误差平方和最小为目标.马红武等人^[5]曾以相对误差平方和最小为目标,改进 Runge-Kutta 法计算程序,获得了较好的结果.Holland^[6]提出著名的遗传算法,经过近 20 年的研究、应用,已成为非线性优化和系统辨识的有效工具,被广泛应用于机器人系统、神经网络学习过程,以解决非多项式(NP)完全性、规划控制等问题,取得了很好的效果^[7~9].本文采用的算法为经 Levenberg-Marquardt 修正的高斯-牛顿法,以全局性收敛为目标获得最优估计参数,并通过 nlintool, nlpredci 等函数获得拟合曲线、估计值及误差等模型衡量指标^[10].

2.2.1 模型参数求解

应用 MATLAB 软件编程,进行非线性规划,采用的算法为全局性收敛的 Levenberg-Marquardt 修正的高斯-牛顿法,以误差平方和最小为目标,获得待估参数.根据发酵实验数据和经验获得模型参数的初估值,经高斯-牛顿法逐步迭代,进行拟合处理,不断修正模型参数的初估值,直到获得全局性收敛的最优参数估计值.应用 nlpredci 函数还可得到参数的置信区间,结果见表 1.

95%时的全局性置信区间.可以看到,拟合的曲线较理想.

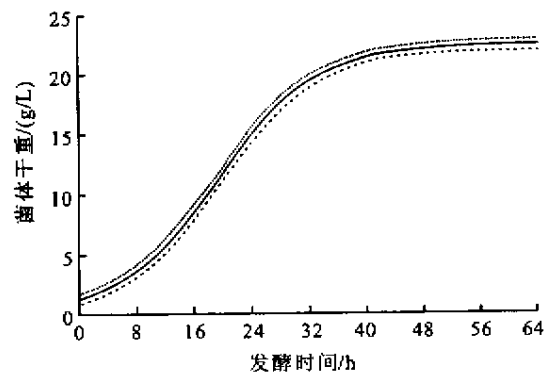


图 1 菌体生长拟合曲线

Fig.1 The fitting curve of the growth of bacteria cells

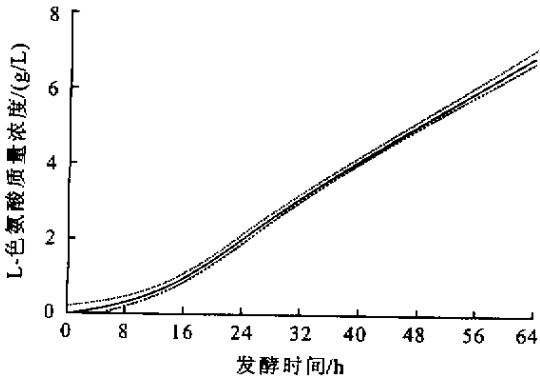


图 2 产物形成拟合曲线

Fig.2 The fitting curve of tryptophan formation

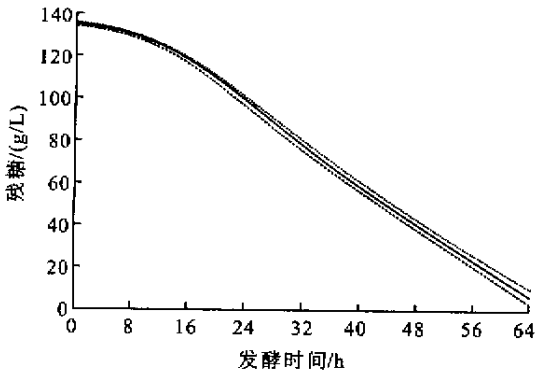


图 3 底物消耗拟合曲线

Fig.3 The fitting curve of substrate consumption

2.2.3 模型拟合值与实验值的比较 根据所建立的发酵动力学模型数学表达式及其模型参数值,应用 nlpredci 函数可得到分批发酵过程中菌体量、残糖量和 L-色氨酸产量随发酵时间变化的拟合值,进而可计算出实验值与拟合值之间的相对误差,结果列于表 2。

表 2 分批发酵动力学模型计算值与实验值的比较

Tab.2 The comparison of putative and experimental values of batch fermentation dynamic model

培养时间/h	残糖量(g/L)		菌体量(g/L)		L-色氨酸产量(g/L)	
	实验值	拟合值	实验值	拟合值	实验值	拟合值
0	132	134.8	1.38	1.306	0	0.015
4	130	132.7	2.36	2.272	0.11	0.136
8	128	129.3	3.14	3.827	0.28	0.334
12	122	124.1	5.67	6.126	0.57	0.637
16	114	116.8	8.72	9.142	0.94	1.060
20	108	107.6	12.03	12.525	1.52	1.588
24	98	97.3	14.25	15.718	2.14	2.175
28	87	86.9	17.34	18.274	2.68	2.766
32	80	76.7	19.84	20.065	3.22	3.331

万方数据

续表 2

培养时间/h	残糖量(g/L)		菌体量(g/L)		L-色氨酸产量(g/L)	
	实验值	拟合值	实验值	拟合值	实验值	拟合值
36	72	67.1	20.72	21.205	3.71	3.861
40	58	57.9	21.98	21.888	4.23	4.362
44	52	49	22.21	22.282	4.48	4.844
48	42	40.3	22.93	22.504	5.15	5.313
52	32	31.8	21.94	22.628	5.64	5.774
56	28	23.2	22.24	22.696	6.03	6.232
60	16	14.8	22.72	22.734	6.56	6.687
64	5	6.3	21.95	22.755	7.28	7.141

可以看出,拟合值与实验值非常接近,除少数点的相对误差较大外,大部分在 5% 以内,拟合情况较好,说明所建数学模型能较好地反映 L-色氨酸分批发酵的过程。

3 结论

1) 非线性规划得到的 3 个发酵动力学模型如下:

$$\frac{dX}{dt} = 0.147 \left(1 - \frac{X}{22.6} \right) X$$

$$\frac{dP}{dt} = 0.0888 X + 0.0052 \frac{dX}{dt}$$

$$-\frac{dS}{dt} = 0.0052 \frac{dX}{dt} + 17.94 \frac{dP}{dt}$$

符号说明: P ——产物质量浓度(g/L); S ——基质质量浓度(g/L); t ——时间/h; X ——菌体质量浓度(g/L); X_{max} ——菌体生长最大质量浓度(g/L); k_1, k_2 ——待定系数; $Y_{x/s}$ ——菌量对基质的得率系数; $Y_{p/s}$ ——产物对基质的得率系数; α ——与生长有关的比例系数; β ——与菌体有关的比例系数/h⁻¹; μ_m ——菌体最大比生长速率; m ——菌体维持系数/h⁻¹。

2) 采用 MATLAB 工具软件,编程较为简单,可读性强,实现拟合简要、快速。算法为全局收敛的 Levenberg-Marquardt 修正的高斯-牛顿法,以误差平方和最小为目标,获得待估参数。拟合得到的数学模型误差较小,能较好反映 TQ2223 菌株在 30 L 的发酵罐中的分批发酵过程。尽管采用的模型普遍较简单,但实验证明,它已能相当精确地反映 TQ2223 菌株 L-色氨酸分批发酵过程中主要状态变量的变化情况。

(下转第 356 页)

- [2] JOHNSOTONE R B , BLOCH K. Enzymatic synthesis of glutathione[J]. **J Biol Chem** , 1951 , 188 : 221 – 240.
- [3] MURATA K , KIMURA A. Cloning of a glutathione biosynthesis in *E. coli* [J]. **Appl Environ Microbiol** , 1982 , 44 : 1444 – 1449.
- [4] MURATA K , MIYA T , GUSHIMA H , *et al.* Cloning and amplification of a gene for glutathione synthetase in *E. coli* [J]. **Agric Biol Chem** , 1983 , 47 : 1381 – 1383.
- [5] GUSHIMA H , YIYA T , MURATA K , *et al.* Construction of glutathione – producing strains of *E. coli* B by recombinant DNA techniques[J]. **J Appl Biochem** , 1983 , 5 : 210 – 218.
- [6] ZABRISKI D W. Effects of fermentation feeding strategies prior to induction of expression of a expression of a recombinant malaria antigen in *E. coli*[J]. **J Industrial Microbiol** , 1987 , 2 : 87 – 92.
- [7] SUZUKI T , YAMANE T , SHIMIZU S. Mass production of thiostrepton by fed-batch culture of *Streptomyces laurentii* with pH-stat mode feeding of multi-substrat[J]. **Appli Microbiol Biotechnol** , 1987 , 25 : 526 – 531.
- [8] BROWN D E , MCAVORY A. A pH-controlled fed-batch process for dextransucrase production[J]. **J Chem Tech Biotechnol** , 1990 , 48 : 405 – 414.
- [9] NISHIO N , TSUCHIYA Y , HAYASHI M. A fed-batch culture of methanol-utilizing bacteria with pH-stat[J]. **J Ferment Technol** , 1977 , 55(2) : 151 – 155.
- [10] TULIN E E , UEDA S , YAMAGATA H , *et al.* Effective extracellular production *Bacillus stearothermophilus* esterase by pH-stat mode fed-batch culture of recombinant *Bacillus brevis*[J]. **Biotechnol Bioeng** , 1992 , 40 : 844 – 850.
- [11] 李华钟 林金萍 方芳等. 高谷胱甘肽合成活性的重组大肠杆菌的构建及反应条件[J]. 无锡轻工大学学报 , 1999 , 18(6) : 56 – 59.
- [12] 董群义 陈坚. 重组大肠杆菌生产谷胱甘肽合成酶系的摇瓶发酵条件[J]. 无锡轻工大学学报 , 2001 , 20(3) : 228 – 232.

(责任编辑 李春丽)

(上接第 343 页)

参考文献 :

- [1] 龚剑 朱亮. MATLAB 5X 入门与提高[M]. 北京 清华大学出版社 , 2000.
- [2] BAILEY J E , OLLIS D F. Biochemical engineering fundamental(2nd Edition) [M]. New York ;Mc-Graw-Hill Book Company , 1986.
- [3] 王沫然. MATLAB 5X 与科学计算[M]. 北京 清华大学出版社 , 2000.
- [4] 李友荣 马辉文. 发酵生理学[M]. 长沙 湖南科技出版社 , 1988.
- [5] 马红武 赵学明 赵晓芸. 应用 Excel 处理生化过程数据(II)——动力学参数估值[J]. 计算机与应用化学 , 1999 , 16(1) : 41 – 47.
- [6] HOLLAND J H. Adaptation in Natural ans Artificial System[R]. Ann Arbor :MI University of Michigan , 1975. 11 – 14.
- [7] GOLDBERG D. Genetic Algorithm in Search , Optimazation and Machine Learning[M]. MA , USA : Addison-Wesley Reading , 1989. 123 – 128.
- [8] DAVIDOR Y. Genetic Algorithm and Robotics , A Heuristic Strategy for Optimaziation[M]. New Jersey , USA : World Scientific Pub Co , 1991. 431 – 438.
- [9] 蔡煜东 陈常庆. 用遗传算法辨识发酵动力学参数[J]. 化工学报 , 1995 , 46(3) : 338 – 342.
- [10] 李涛 贺勇军 刘志俭. MATLAB 工具箱应用指南——应用数学篇[M]. 北京 : 电子工业出版社 , 2000.

(责任编辑 秦和平)