

尿苷产生菌枯草芽孢杆菌 Tc142 分批发酵动力学研究

刘康乐, 谢希贤, 刘淑云

(天津科技大学生物工程学院, 天津 300457)

摘要: 通过建立菌体生长、产物形成和基质消耗的动力学模型, 并应用 MATLAB 软件进行模型拟合分析, 对枯草芽孢杆菌 Tc142(6-Au^r+2-Tu^r+Upase⁻)5 L 罐尿苷分批发酵实验数据进行分析, 建立尿苷分批发酵动力学模型。结果是拟合模型能较好地反映尿苷产生菌 Tc142 的分批发酵过程。结论是以发酵动力学为指导, 应用 Matlab 分析方法对尿苷发酵动力学模型进行拟合, 其结果与实验结果相符。

关键词: 尿苷; 分批发酵动力学; 数学模型; MATLAB

中图分类号: TQ920.1; **文献标识码:** A; **文章编号:** 1673-9078(2008)06-0532-04

Study on Batch Fermentation Kinetics of a Uridine Producing Strain

Bacillus subtilis Tc142

LIU Kang-le, XIE Xi-xian, LIU Shu-yun

(College of Bioengineering, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: The kinetic model of uridine batch fermentation by *Bacillus subtilis* Tc142 (6-Au^r+2-Tu^r+Upase⁻) in 5 L auto-control fermentation reactor was established by investigating the cell growth, uridine production and substrate consumption with Matlab software. The results showed that the model successfully simulated the batch kinetics of Tc142 for uridine production.

Key words: uridine; batch fermentation kinetic; mathematic model; MATLAB

尿嘧啶核苷 (Uracil riboside) 又称 1-β-D-呋喃核糖基尿嘧啶 (1-β-D-Ribofuranosyl-uracil), 是一种多功能生物药物, 具有抗巨型红血球贫血、治疗肝、脑血管、心血管等疾病的功效, 也是制造氟尿嘧啶 (5-FU)、5-脱氧氟尿苷、碘苷 (IDUR)、溴苷 (BUDR) 等特效生物药物的主要原料。尿苷生产方法包括化学法和发酵法两种, 国内有少数利用化学法生产尿苷的厂家, 但成本较高, 关于发酵法生产尿苷还未见报道。建立尿苷分批发酵动力学模型, 对发酵过程工艺条件研究、反应过程操作优化和控制具有重要意义和实用价值, 可以为小罐试验数据放大、从分批发酵过渡到补料分批发酵提供理论依据^[1]。近年来发酵动力学模型分析在乙醇, 乳酸, 甘油发酵以及生物能源领域得到了广泛应用^[4-7], 但目前关于尿苷发酵动力学的研究尚属空白。本研究以尿苷 5 L 罐发酵数据为依据, 建立了尿苷发酵过程中菌体生长、基质消耗和产物形成的动力学模型, 并应用 MATLAB 软件进行模型拟合及拟合分析。

1 材料与方 法

收稿日期: 2008-01-23

作者简介: 刘康乐 (1982-), 男, 在读硕士。研究方向: 代谢控制发酵

1.1 供试菌株

枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) Tc142, 遗传标记 6-Au^r+2-Tu^r+Upase⁻, 天津科技大学代谢控制研究室保存菌株^[2]。

1.2 培养基 (g/L)

基本培养基^[3]: 葡萄糖 5, 柠檬酸钠 1, (NH₄)₂SO₄ 2, MgSO₄·7H₂O 0.2, K₂HPO₄ 14, KH₂PO₄ 6, 琼脂粉 20, pH 7.0, 灭菌条件: 0.1 MPa, 15 min。

完全培养基^[3]: 葡萄糖 5, 牛肉膏 3, 蛋白胨 10, MgSO₄·7H₂O 2, pH 7.0, 灭菌条件: 0.1 MPa 20 min。

种子培养基: 葡萄糖 40, 蛋白胨 20, 酵母膏 5, MgSO₄·7H₂O 0.5, K₂HPO₄ 0.5, KH₂PO₄ 1.5, pH 7.0~7.2, 0.1 MPa 灭菌 15 min。

发酵培养基: 葡萄糖 120, 玉米浆 10, 豆浓 30, 玉米蛋白粉 7, 尿素 20, MgSO₄·7H₂O 5, K₂HPO₄ 5, 碳酸钙 5, CaCl₂ 5, pH 7.0~7.2, 0.1 MPa 灭菌 15 min。

1.3 分析方法

菌体生长量测定: 每隔 4 h 吸取 10 mL 发酵液, 离心, 弃上清, 用蒸馏水洗涤两次, 所得菌体用 2 mL 蒸馏水悬浮后移至干燥皿, 105 °C 下烘干至恒重, 所得净重即为细胞干重 (g/L)。

pH 值测定: 采用 PHSJ-4A 精密 pH 计进行测定。

还原糖测定: 采用 SBA-40C 多功能生物传感分析仪测定。

尿苷测定: 采用 Agilent 高效液相色谱系统 (HPLC) 测定^[8]。

1.4 分批发酵动力学模型研究方法

应用 MATLAB 软件, 结合 csape、fnder、ppval、nlinfit, 根据实验数据, 对菌体生长、底物消耗及产物形成的动力学方程进行非线性回归, 求解出模型的参数。使用 Ode45, 对拟合出的微分方程求解, 并进行 F 检验。

2 结果与讨论

2.1 尿苷产生菌 Tc142 菌株 5 L 罐分批发酵过程

根据发酵过程中碳源的消耗、菌体量的变化和产物的合成, 绘制了 5 L 罐分批发酵的过程曲线, 结果如图 1。

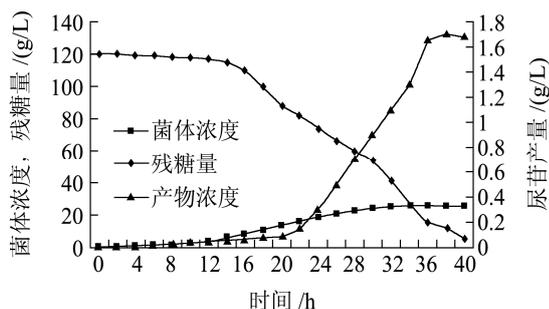


图1 5 L罐分批发酵过程曲线

Fig.1 Batch fermentation curve in 5 L auto-control fermentation reactor

由图 1 可以看出, 延滞期为 0~10 h, 10~32 h 为对数生长期, 稳定期在 32 h 之后。16 h 之前葡萄糖的消耗速度非常缓慢, 16 h 后耗糖速度加快且比较稳定, 到 36 h 后葡萄糖质量浓度降低至 10 g/L 以下。在延滞期和对数生长中前期, 产物生成很少, 22 h 之后尿苷才开始大量合成, 产苷速度迅速上升, 当葡萄糖质量浓度降至 10 g/L 以下时, 产物合成几乎停止。由此说明菌株 Tc142 的尿苷发酵属于产物形成与菌体生长部分偶联的二类发酵。

2.2 尿苷分批发酵动力学模型的建立

2.2.1 菌体生长动力学模型

在尿苷分批发酵过程中, 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。考虑到基质的抑制作用, 建立如下菌体生长动力学模型:

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

式中: μ_{\max} -菌体最大比生长速率(h^{-1}); X_{\max} -菌体最大质量浓度(g/L)。

2.2.2 产物形成动力学模型

尿苷分批发酵过程属于产物形成与能量代谢部分偶联的二类发酵过程, 高浓度基质对产物的形成存在抑制作用。本文结合 Bajpai 和 Piret 方程^[4], 建立出如下的产物形成动力学模型:

$$\frac{dP}{dt} = K_1 \frac{dX}{dt} + K_2 * (\frac{S}{S + K_{sp}}) * (\frac{1}{1 + S / K_{ip}}) X \quad (2)$$

式中: K_{sp} -基质对产物形成的饱和常数(g/L); K_{ip} -基质对产物形成的抑制常数(g/L)。

2.2.3 基质消耗动力学模型

底物包括细胞生长所需各种营养成分, 其消耗主要有三个方面: 一是用于细胞生长以及合成新细胞; 二是细胞维持基本生命活动消耗; 三是用于合成代谢产物。为反映关键底物葡萄糖的消耗与菌体生长、产物形成的关系, 底物消耗可用如下动力学模型表示:

$$(-\frac{dS}{dt}) = \frac{1}{Y_x} * \frac{dX}{dt} + \frac{1}{Y_p} * \frac{dP}{dt} + mX \quad (3)$$

以(3)式作为描述核苷发酵的底物消耗模型, 式中: m -细胞的维持消耗常数; Y_x -碳源用于菌体生长的得率常数; Y_p -碳源用于产物积累的得率常数。

2.3 模型参数求解及实验值与拟合值的比较

根据 5 L 罐发酵过程中菌体生长量、底物质量浓度、产物质量浓度随时间变化数据, 应用 MATLAB 软件, 利用 Csape 函数计算不同时间菌体、底物、产物质量浓度的变化速率, 利用 fnder、ppval 对三项数据进行非线性拟合。根据拟合值和实验值, 利用 Excel 软件计算残差比例。结果如表 1 所示。

表1 模型计算值和实验值的比较 单位:g/L

Table 1 Comparison of the experimental and computed value (unit:g/L)

菌体质量浓度		底物质量浓度		产物质量浓度	
实验值	拟合值	实验值	拟合值	实验值	拟合值
0.4028	0.4028	120.0000	120.0000	0	0
0.6451	0.6626	120.0000	118.5682	0.0080	0.0083
1.0076	1.0583	119.0000	118.0772	0.0100	0.0102
1.5126	1.4828	119.0000	117.7753	0.0200	0.0206
2.2231	2.1808	118.0000	116.4754	0.0300	0.0288
3.1427	3.0973	118.0000	115.8582	0.0400	0.0385
3.9061	3.6457	117.0000	113.8958	0.0500	0.0495

转下页

接上页

菌体质量浓度		底物质量浓度		产物质量浓度	
实验值	拟合值	实验值	拟合值	实验值	拟合值
4.9517	4.8392	115.0000	111.3694	0.0600	0.0582
8.1541	8.3131	110.0000	108.3632	0.0700	0.0676
10.7733	10.8983	100.0000	100.6423	0.0800	0.0782
13.4261	13.5581	88.0000	91.3642	0.0900	0.0892
16.0489	16.1874	82.0000	84.7118	0.1500	0.1503
19.0306	19.3855	74.0000	77.4201	0.3000	0.3163
21.6510	22.0515	66.0000	68.9201	0.5000	0.5097
22.7456	23.3144	60.0000	62.7485	0.7000	0.6953
24.6209	25.5092	54.0000	52.2982	0.9000	0.8754
25.8190	26.2022	41.0000	40.3088	1.1000	1.0626
26.2357	26.2391	26.0000	25.2663	1.3000	1.3768
25.9752	25.8128	15.0000	14.7256	1.6600	1.7315
25.7669	25.7098	12.0000	11.7311	1.7000	1.7752
25.7148	25.7148	6.0000	6.0000	1.6800	1.6800

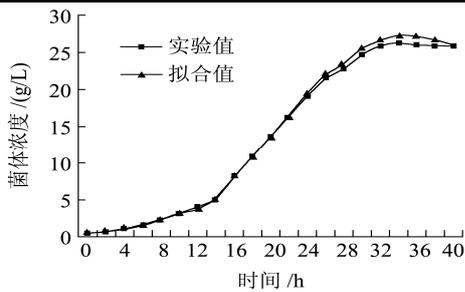


图2 菌体量 X-发酵时间 t 图

Fig.2 The cell growth curve with fermentation time

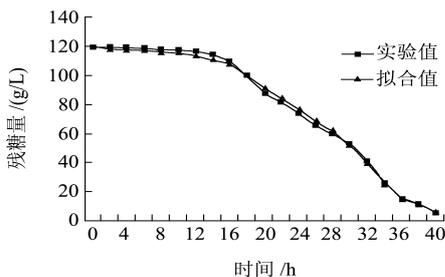


图3 残糖量 S-发酵时间 t 图

Fig.3 The residual glucose curve with fermentation time

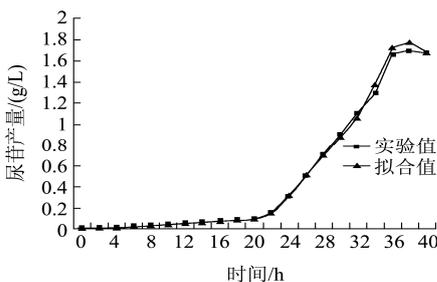


图4 尿苷产量 P-发酵时间 t 图

Fig.4 The uridine production curve with fermentation time

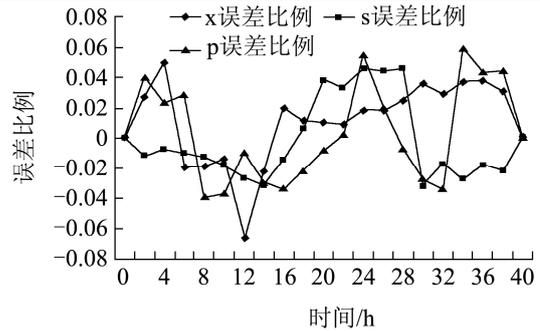


图5 残差比例-发酵时间 t 图

Fig.5 The residual proportion curve with fermentation time

从以上各结果可以看出,除 4 h 的菌体浓度,24 h 与 28 h 的产物浓度等个别点外,拟合数据和实验值的差值比例都在 5% 以内。

根据以上所得拟合数据,利用 nlinfit 函数对所建立的动力学方程进行非线性最小方差回归分析,分别对 3 个动力学模型中的参数进行求解,结果如表 2 所示。

表2 模型参数值汇总

Table 2 The kinetic model parameters

μ_{max}	X_{max}	K_i	K_1	K_2
0.11902	18.564	4.5688e+009	-0.044269	0.033531
K_{sp}	K_{ip}	Y_x	m	Y_p
54.684	54.684	0.43039	-4.4851e+011	0.21529

将计算出的各参数代入(1)、(2)、(3)式,得出3个动力学模型:

菌体生长模型:

$$\frac{dX}{dt} = 0.11902 * X * (1 - \frac{X}{18.564}) * (\frac{1}{1 + S / 4.5688e + 009})$$

基质消耗模型:

$$\frac{dP}{dt} = -0.044269 \frac{dX}{dt} + 0.033531 * (\frac{S}{S + 54.684}) * (\frac{1}{1 + S / 54.684}) X$$

产物形成模型:

$$(-\frac{dS}{dt}) = \frac{1}{0.43039} * \frac{dX}{dt} + \frac{1}{0.21529} * \frac{dP}{dt} - (4.4851e + 11) * X$$

根据所得到的动力学模型,对微分方程进行求解并进行 F 检验。通过 F 检验,对菌体量 $F=303.81$,对残糖量 $F=125.77$,对尿苷产量 $F=303.81$,均远远大于临界值 $F_{\alpha}=4.6$ ($\alpha=0.05$)。这说明此模型和参数可以较好地反映菌株 Tc142 的菌体生长、产物生成和底物(葡萄糖)消耗的变化规律,可以模拟发酵过程操作,对尿苷发酵过程的优化控制具有一定的指导意义。

3 结论

(下转第 508 页)