

十三碳二元酸发酵过程产酸期拟均相动力学模型及其应用

李元广* 曹竹安 袁乃驹 侯治中

(清华大学化学工程系, 北京 100084)

摘要 分析了十三碳二元酸发酵过程中产酸期的代谢特点,对产酸期四相体系发酵动力学进行了研究。提出了菌体生长、产物形成及底物消耗的动力学模型,对模型参数进行了回归估值,并对产酸期进行了拟合,结果表明,模型的计算值和实测值较为吻合,平均相对偏差为 3.6%。利用所建模型对产酸期进行了多种操作条件下的模拟计算,结果表明,提高进入产酸期的菌体浓度、缩短菌体生长期时间及降低发酵液中产物浓度具有提高产物形成速率的有效途径。

关键词 石油发酵, 十三碳烷烃, 十三碳二元酸, 发酵动力学, 四相体系

前文^[1]对十三碳二元酸(DCA₁₃)过程中菌体生长期的代谢特点进行了分析,建立了菌体生长及底物消耗的动力学模型,并利用所建模型对菌体生长期进行多种操作条件的模拟计算。本文则研究DCA₁₃发酵过程中产酸期的代谢特点及产酸期的发酵动力学,并利用所建的动力学模型对产酸期在多种操作条件下的发酵过程进行模拟,以便优化产酸期工艺条件。

对于需氧发酵而言,若按照体系中所含相的数目来分类,则可分为三相发酵体系和四相发酵体系两大类。以糖类水溶性物质为基质的发酵即属于三相发酵体系,而以烃类为基质的石油发酵则属于四相发酵。从工程角度看,四相发酵体系的动力学要比三相发酵体系复杂得多。十三碳烷烃生物发酵生产DCA₁₃过程属于石油发酵,但它和一般的石油发酵体系又存在着差异。在一般的石油发酵过程中,菌体所用基质只有烷烃一种,而在DCA₁₃发酵过程中,菌体所利用的基质有两种:在菌体生长期利用蔗糖,在产酸期则利用nC₁₃^[2]。这样在菌体生长期,尽管体系中也含有四个相,但是因为油相(烷烃)只起诱导作用而不为菌体所消耗,因而菌体生长期的动力学模型和常规的三相发酵体系相类似^[3]。在产酸期,由于菌体所消耗的基质为烷烃,因而DCA₁₃发酵过程中的产酸期和常规的四相石油发酵体系相类似。

对于常规的四相石油发酵体系,前人只是对以生产SCP为目的的石油发酵体系中的菌体生长动力学进行了一些研究^[2-7]。这些研究都假设烷烃为限制性底物。这样在建立菌体生长动力学模型时,首先遇到的问题就是菌体对烷烃的摄取机理,关于菌体对烷烃的摄取机理,文献中共有五种观点,目前尚无定论,因而文献中关于SCP生产中菌体生长动力学模型各持己见,难以统一^[8]。对于以代谢产物为目的的四相石油发酵体系中的菌体

*现在工作单位:华南理工大学食品工程系,广州510641。
中国石化总公司及国家自然科学基金资助课题。
本文于1993年4月6日收到。

生长、底物消耗及产物形成动力学，未见文献报道。

在 DCA_{13} 发酵过程中，菌体对 nC_{13} 的摄取机理更为复杂。针对这种情况，本文采用了拟均相动力学研究方法，从而避开了菌体摄取烷烃机理这一复杂的理论问题。

1 材料和方法

见前文^[1]。

2 结果与讨论

2.1 产酸期代谢过程分析

产酸期代谢过程曲线见图 1。由图 1 可见，在产酸期内蔗糖浓度基本不变，而 nC_{13} 浓度不断下降。由此可见，在产酸期内，菌体主要消耗 nC_{13} 而不消耗蔗糖。在产酸期初期，菌体缓慢增长；50 小时以后基本停止生长。在产酸期内二元酸浓度不断增加，即菌体不断产生二元酸。由图 1 可见， DCA_{13} 的形成是在菌体生长十分缓慢的情况下进行的，甚至当菌体生长已基本停止时仍能维持较高的产酸速率。

图 2 给出了 DCA_{13} 的比生成速率 q_p 随时间的变化曲线。由图 2 或见 DCA_{13} 的形成过程可大致分为三个阶段，即加速产酸期 (I)、减速产酸期 (II) 及稳定产酸期 (III)。在稳定产酸期 q_p 约为 $0.06h^{-1}$ 。由于在菌体生长期所加入的 nC_{13} 的诱导作用，使得菌体在进入产酸期时已产生了与 DCA_{13} 形成有关的各种酶，因而进入产酸期时没有出现明显的诱导期，而是直接进入加速产酸期，过一段时间后再进入减速产酸期。由此可以推测发酵过程中可能存在着产物的抑制作用。为检验这种推测，进行了摇瓶实验。其结果列于表 1。

表 1 DCA_{13} 产物抑制的摇瓶实验结果*

Table 1 The results of shaking flask on the product inhibition

	1	2	3
The concentration of DCA_{13} added (g/L)	0.00	20.42	40.84
The final concentration of DCA_{13} (g/L)	52.81	62.36	65.08
The net increase of DCA_{13} (g/L)	52.81	41.94	24.24

* The volume of the shaking flask is 300ml, the loading is 30ml and the total fermentation time is 135 hours.

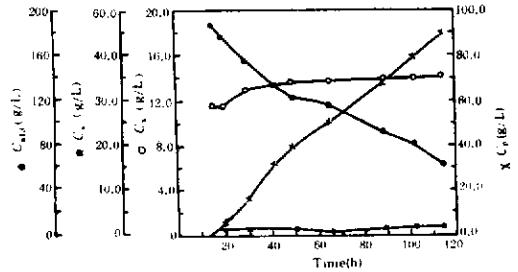


图 1 产酸期代谢过程曲线

Fig. 1 The metabolic curves of production phase

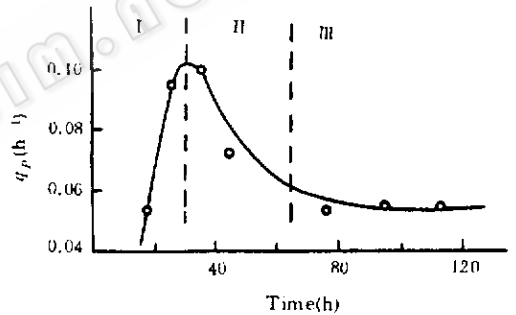


图 2 比产酸速率随时间的变化

Fig. 2 The curve of specific product formation rate

从表 1 可见, 补加的 DCA_{13} 浓度越高, DCA_{13} 形成速率就越慢, 这表明 DCA_{13} 发酵过程中确实存在着产物抑制作用。

如前所述, 在产酸期菌体所消耗基质为 nC_{13} , 一部分用于菌体生长, 另一部分则用于形成 DCA_{13} 。文献〔9〕表明, DCA_{13} 是胞内形成的, 由此可见, 在产酸期, 烷烃必须要传至胞内方可被菌体消耗。但是由于 nC_{13} 在水中的溶解度极小, 它是如何被传至菌体内部的呢? 这就涉及到四相石油发酵体系中所特有的一个理论问题, 即菌体对烷烃的摄取机理。关于菌体对烷烃的摄取机理, 目前尚不完全清楚, 文献中共有五种观点^{〔9〕}。要想建立石油发酵体系的动力学模型, 就必须搞清菌体对烷烃的摄取机理, 但目前要做到这一点很难。笔者在此对这一问题不作详细讨论, 而只拟结合 DCA_{13} 发酵中的一些实验现象, 对该体系中菌体摄取烷烃的机理作一粗略的分析, 然后采用拟均相动力研究方法建立产酸期的发酵动力学模型。

实验观察到, 在产酸期烷烃和水之间的乳化现象非常严重, 以致有时在离心时发酵液中的油和水也难以分相。这表明在发酵过程中产生了大量的生物乳化剂。由于烷烃在水中溶解度极小, 因而菌体对烷烃的摄取和油水的界面积有关。文献中的五种观点对此也予以肯定。在发酵液中能为菌体直接利用的烷烃浓度显然不能用发酵液中烷烃的总浓度 (C_{n13}) 表示, 为叙述方便, 将能为菌体直接利用的烷烃浓度称为烷烃的有效浓度 (C_e)。这样 C_e 就和油水界面积 (A) 密切相关, 而 A 又和 C_{n13} 搅拌转速、菌体产生的表面活性剂、菌体浓度等有关^{〔10〕}。在产酸期, 菌体浓度虽有所增加但变化不大; 由于在菌体生长期, 体系中已含有一定的烷烃, 生物表面活性剂在菌体生长期就已形成, 并假定这种表面活性物质的浓度已达到其临界胶束浓度, 因而在产酸期, 生物表面活性物质对油滴和水之间的界面积的影响基本不变; 根据工艺要求, 产酸期的转速又不变。这样产酸期的 A 只和 C_{n13} 的变化有关。文献〔11〕表明, 在以十六碳烷烃为基质的石油发酵体系中油水界面积 A 和发酵液中的烷烃含量成正比, 即 C_e 和烷烃含量成正比。

在 DCA_{13} 发酵过程中的产酸期内, 氧是一种重要的基质, 但实验过程中产酸期内的溶氧值 (DO) 均在 40% 以上变化。据此可以认为, 在产酸期内, 氧的供给充足, 是非限制性因素。

2.2 动力学模型的建立及参数回归

2.2.1 模型假设: 根据前面的分析, 对产酸期作如下几点假定: (a) 氧及其它营养成分充足, nC_{13} 是唯一的限制性底物。(b) 能为菌体直接利用的烷烃浓度和发酵液中烷烃总浓度成正比。(c) 由于菌体生长和产物形成均是利用同一种基质, 因而菌体的生长和产物形成之间存在着竞争性抑制, 即产物的形成抑制菌体生长。(d) 产物形成过程中存在着产物抑制作用。

2.2.2 动力学模型: 产酸期的动力学模型包括菌体生长模型、产物形成模型以及基质消耗模型。(a) 菌体生长模型: 产酸期菌体生长缓慢, 菌体浓度变化不大, 和菌体生长期不同, 产酸期的比生长速率受菌体浓度影响很小, 菌体的生长受到产物形成的抑制, 在产酸期菌体多为椭圆形, 发酵液粘度变化不大, 因而菌体自身对底物扩散的影响不明显。

根据上面的分析, 对产酸期内的菌体生长提出如 (1) 式所表示的动力学模型, 它的形式和 Abia 模型^{〔12〕}类似:

$$\frac{dC_x}{dt} = \mu_{m2} \frac{C_x}{K_s + C_x} \exp(-K_A C_P \cdot C_x) \quad (1)$$

(b) 产物形成的动力学模型：由前面的分析可知，产物的形成速率是和菌体浓度、烷烃的有效浓度及产物浓度有关。前两个因素对产物形成速率的影响可借用 Michaelis 方程的形式来表示，而后一因素的影响可用线性关系来表示。鉴于这种分析，提出如下的产物形成动力学模型：

$$\frac{dC_P}{dt} = q_m \frac{C_x}{K_s + C_x} C_x - K_p C_P \quad (2)$$

(c) 底物消耗动力学模型： nC_{13} 的消耗可分为三部分：一部分用于菌体的生长，一部分用于菌体的内源代谢，其余则用于形成产物。据此可得如(3)式所示的底物消耗动力学模型：

$$\frac{dC_{n13}}{dt} = -\frac{1}{Y_{x/s}} \frac{dC_x}{dt} - \frac{1}{Y_{p/s}} \frac{dC_P}{dt} - m_2 C_x \quad (3)$$

根据模型的第二条假设有

$$C_x = KC_{n13} \quad (4)$$

上述四个方程即为产酸期的动力学模型。该模型共含有 10 个待定参数。

2.2.3 模型参数回归及模型检验：上述动力学模型为一个非线性微分方程组，采用四阶 Runge-Kutta 法求解微分方程组，用单纯形法优化模型参数。通过对实验数据的回归得到 10 个模型参数之值，结果见表 2。将表 2 中的 q_m 值与图 2 进行对比，可以发现模型回归出的最大比产物形成速率和实测的最大比产物形成速率吻合得相当好。

表 2 模型参数回归结果

Table 2 The parameters in the kinetic models of the production phase

Parameter	μ_{m2}	K_s	K_A	q_m	K_b	K_p	$Y_{x/s}$	$Y_{p/s}$	m_2	K
Unit	h^{-1}	g/L	L/G	h^{-1}	g/L	—	—	—	h^{-1}	—
Value	0.0158	0.0050	0.0822	0.0960	0.0150	0.0082	0.0840	0.9142	0.0015	0.0529

为了进一步检验模型的可靠性，将模型的拟合结果和实验值进行了比较，其结果见图 3。由图 3 可见，模型的拟合效果较好，实验值和拟合值之间的最大相对偏差为 9.4%，平均相对偏差为 3.6%，由此可见，所提出的动力学模型能够较好地描述产酸期菌体生长、底物消耗及产物形成的规律。

2.3 动力学模型在发酵工艺条件优化中的应用

由前面的分析可知，进入产酸期的时间 t_0 、进入产酸期后的初始烷烃浓度 $C_{n13,0}$ 、初始 DCA₁₃ 浓度 $C_{p,0}$ 、初始菌体浓度 $C_{x,0}$ 以及发酵过程中二元酸浓度对产物形成的抑制作用等

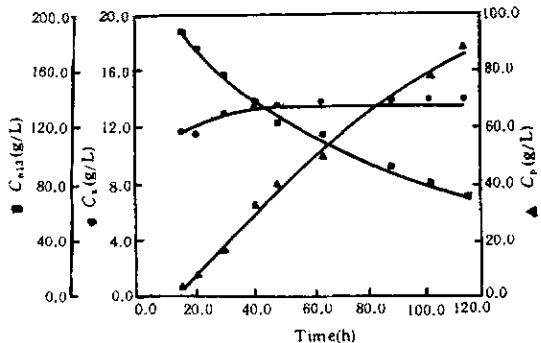


图 3 产酸期模型计算值与实测值对比
Fig. 3 Comparison between the calculated values and the experimental values in production phase

均影响产物的形成速率。利用本文所建立的动力学模型(1) — (4)式及回归所得模型参数,可对多种操作条件下的产酸期进行模拟计算,以优化工艺条件。

2.3.1 进入产酸期时间对产物浓度的影响: 在实际发酵过程中,由于种种原因,菌体生长期的长短会有变化,即进入产酸期的时间 t_0 存在波动。表3给出了总发酵时间不变时, t_0 的变化对产酸期结束时的产物浓度 C_p 的影响。

表3 进入产酸期时间对发酵终止时产物浓度的影响

Table 3 Effect of time switching into production phase on the end product concentration

t_0/t_{0i}^*	1.5	1.4	1.3	1.2	1.1	1.0	0.9	0.8	0.7	0.6
$C_{pe}/C_{pei} \times 100\%$	94.54	95.73	96.77	97.86	98.93	100.00	101.05	102.08	103.10	104.14

* $t_{0i} = 15.92$ hours, $C_{pei} = 85.98$ g/L

由表3可见, t_0 越小则 C_{pe} 越大,这表明在总发酵时间不变的情况下,减小菌体生长期所需时间,能够使发酵产物浓度明显增大,即发酵过程中总的产酸速率增大。

2.3.2 初始二元酸浓度对产物浓度的影响: 由图1可见,进入产酸期时菌体已形成少量的产物 DCA_{13} ,即进入产酸期时的二元酸浓度 C_{p0} 不为零(约为2.5g/L)。在实际发酵过程中 C_{p0} 可能会出现波动。通过模拟计算,表4给出了进入产酸期时的 DCA_{13} 浓度 C_{p0} 对发酵终止时的产物浓度 C_p 的影响。

表4 进入产酸期时产物浓度对发酵结束时产物浓度的影响

Table 4 Effect of Product concentration switching into production phase on the end product concentration

C_{p0}/C_{p0i}^*	3	2	1.5	1	0.5	0.25	0.1	0.01
C_{pe} (g/L)	84.90	85.28	85.59	85.98	86.46	86.74	86.92	87.03

* $C_{p0i} = 2.47$ g/L

由表4可见, C_{p0} 越大则 C_{pe} 越小,但其变化量较小。这表明进入产酸期的 DCA_{13} 浓度对产物形成过程的影响很小。

2.3.3 初始十三碳烷烃浓度对产物浓度的影响: 表5给出了进入产酸期时 nC_{13} 浓度 C_{n130} 对发酵终止时的产物浓度 C_p 的影响。由该表可见, C_{n130}/C_{n130i} 在0.65—1.50范围内变化时, C_{n130} 对 C_{pe} 基本无影响;但当 C_{n130}/C_{n130i} 小于0.65时, C_{n130} 对 C_{pe} 有较大影响。这是由于 C_{n130} 较小时,在产酸期后期发酵液中 C_{n13} 较小,从而使产酸速率降低;而 C_{n130} 较高时,在产酸期后期残留的 C_{n13} 仍较高,因而 C_{pe} 基本不受影响。由此可见,在发酵后期,如若残留的 nC_{13} 较少,则应补加一定量的 nC_{13} 。

表5 初始十三碳烷烃浓度对产物浓度的影响

Table 5 Effect of initial tridecane concentration on the product concentration

C_{n130}/C_{n130i}^*	1.50	1.30	1.20	1.10	1.00	0.90	0.80	0.70	0.65	0.62	0.61	0.60
$C_{pe}/C_{pei} \times 100\%$	100.13	100.09	100.07	100.03	100.00	99.93	99.81	99.53	99.13	98.23	97.16	95.36

* $C_{n130i} = 186.92$ g/L

2.3.4 进入产酸期时的初始菌体浓度对产酸过程的影响: 由产物形成动力学模型(2)式可知 C_i 对 C_p 有较大影响。图4给出了进入产酸期时的菌体浓度 C_{x0} 分别提高(相

对实际操作状况 $C_{x0}=11.50\text{g/L}$ 0%、10%、20%、40%、50%时的产物浓度 C_p 随时间的变化曲线。由该图可见，增大 C_{x0} 能显著地提高产物浓度 C_{p0} 。

2.3.5 发酵液中产物浓度对产酸速率的影响： 由产物形成动力学模型可知产物浓度 C_p 抑制产物形成过程，因而设法降低发酵液中产物浓度 C_p ，必然加大产物形成速率 dC_p/dt 。图5给出了当发酵分别进行到45、60、75、90小时时，恒定产物浓度 C_p 进行发酵以及实际发酵过程中产物形成速率 dC_p/dt 随时间的变化曲线。由该图可见，进入半连续发酵操作的时间越早则产物形成速率就越快。恒定 C_p 的发酵只有通过反应分离相结合的半连续发酵工艺方能实现。图6给出了发酵时间达60小时，通过分离手段使此时的 C_p

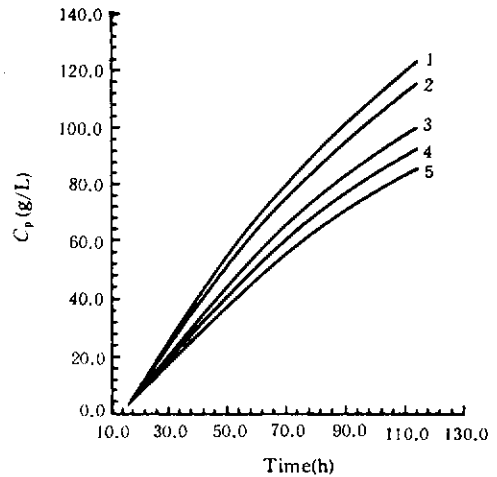


图4 初始细胞浓度对产酸过程的影响
Fig. 4 Effect of initial cell concentration on the product formation
Initial cell concentration increased by (%): 1.50, 2.40, 3.20, 4.10, 5.0

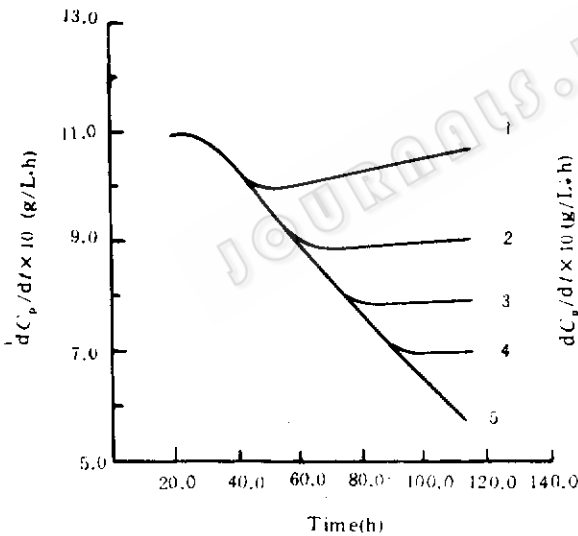


图5 半连续发酵对产物形成速率的影响
Fig. 5 Effect of semi-continuous fermentation of the product formation rate
Fermentation time switching into semi-continuous fermentation (h):
1.45, 2.60, 3.75, 4.90, 5.115

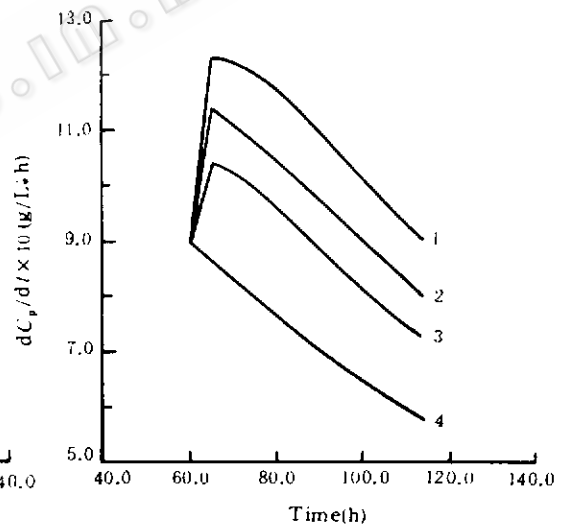


图6 降低产物浓度对产物形成速率之影响
Fig. 6 Effect of decreasing product concentration on the product formation rate
Product concentration decreased by (%) (Switching time is 60h):
1.90, 2.70, 3.50, 4.0

分别降低50%、70%、90%后继续发酵以及实际发酵过程中 dC_p/dt 随时间的变化曲线。由该图可见，分离出去的产物越多，则产物形成速率就越大。综合图5及图6可以得出这样的推断，即无论采用何种操作方式，只要能降低发酵液中产物浓度 C_p 就可以显著地

提高产物形成速率。

3 结 论

四相石油发酵体系动力学极为复杂,可采用拟均相动力学研究方法使之简化,在产酸期选用 Aiba 模型描述菌体生长特征;产物浓度对产物形成具有明显的抑制作用,可用线性关系表示产物浓度对产物形成的影响,菌体浓度及烷烃有效浓度对产物形成速率的影响可用 Michaelis 方程描述;根据物料衡算建立了底物消耗的动力学模型;利用实验数据回归出了所有的模型参数值,并对产酸期进行了拟合,结果表明所提出的动力学模型能较好地描述发酵过程,计算值和实测值之间的平均相对偏差为 3.6%,最大相对偏差为 9.4%;模拟计算结果表明,缩短菌体生长期时间,提高进入产酸期的菌体浓度及降低发酵液中产物浓度是提高产物形成速率的有效途径;进入产酸期 nC_{13} 浓度较高时, nC_{13} 对产物形成速率影响较小,但当 nC_{13} 较小时,则应在发酵后期补加一定量的 nC_{13} ,否则会对产物形成速率产生较大影响;进入产酸期的产物浓度对产物形成过程影响甚小。

符 号 说 明

C_{a_i} ——蔗糖浓度 (g/L)	C_p ——十三碳二元酸浓度 (g/L)
C_e ——十三碳烷烃的有效浓度 (g/L)	C_x ——菌体浓度 (g/L)
K ——比例系数	K_A ——产物形成对菌体生长的抑制系数 (g/L)
K_b ——产物形成动力学常数 (g/L)	K_p ——十三碳二元酸浓度对产物形成的抑制系数
K_s ——菌体生长动力学常数 (g/L)	m_2 ——菌体的维持系数 (h^{-1})
q_m ——最大比产酸速率 (h^{-1})	q_p ——比产物形成速率 (h^{-1})
t ——时间 (h)	$y_{P/s}$ ——产物形成得率系数
$Y_{x/s}$ ——菌体生长得率系数	μ_{m2} ——菌体最大比生长速率 (h^{-1})

下标 0、e 分别表示产酸期开始和结束状态;下标 i 表示实际发酵状态。

参 考 文 献

- [1] 李元广、曹竹安、袁乃驹等,生物工程学报,1994,10(3):250—257.
- [2] Dunn I J. Biotechnol Bioeng, 1968, 10: 891—894.
- [3] Aiba S *et al.* J Ferment Technol, 1969, 47(3): 211—219.
- [4] Erickson L E *et al.* Biotechnol Bioeng, 1969, 11: 467—487.
- [5] Moo-Young M *et al.* Biotechnol Bioeng, 1971, 13: 761—767.
- [6] Chakravarty M *et al.* Biotechnol Bioeng, 1975, 17: 399—412.
- [7] Chakravarty M *et al.* Bioeng, 1977, 19: 715—726.
- [8] 李元广、曹竹安、袁乃驹等,清华大学学报(自然科学版),1994,34(3): 63—73.
- [9] 沈永强等,植物生理学报,1980,6(1): 29—35.
- [10] 李元广等,全国第五届生物化工学术报告会议论文集,北京:化学工业出版社,1993,69—76.
- [11] Wang D I C *et al.* Biotechnol Bioeng, 1972, 14: 345—362.
- [12] 俞俊棠等,生物化学工程,北京:化学工业出版社,1991,54—55.

The Pseudohomogeneous Kinetic Models of Production Phase in the Fermentation Process for Producing Undecane Dicarboxylic Acid and Their Application

Li Yuanguang Cao Zhu'an Yuan Naiju Hou Zhizhong

(*Department of Chemical Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084*)

Abstract The metabolic characters of production phase in the fermentation of undecane dicarboxylic acid were analyzed. The kinetic models of cell growth, product formation and substrate consumption in production phase were established respectively. The parameters of the models have been estimated by regression. The calculated curves fit the experimental data quite well and the average deviation between those over production phase is 3.6%. Based on the kinetic models, computer simulations of production phase were fulfilled. From the computer simulations, it can be seen that the product formation rate could be increased markedly by the following ways: increasing cell concentration before switching into production phase, decreasing the period of cell growth phase and lowering the product concentration of production phase.

Key words Petroleum fermentation, tridecane, undecane dicarboxylic acid, fermentation kinetics, four phase system