

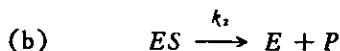
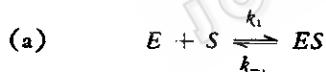
吴佩琮

(无锡轻工业学院, 江苏)

在抗生素、酵母和谷氨酸的生产中, 已有应用电子计算机成功地控制发酵过程, 以求不断地提高发酵控制水平进而提高产量的报道^[1-3]。要达到上述目标有二个途径: 一是在积累大量操作数据的基础上, 总结出操作模型, 由电子计算机模拟此模型进行控制, 这样有时可能得到理想的结果, 但这并不一定是最佳情况。另一种是在研究发酵过程中微生物代谢机制的基础上, 用数学模型进行描述, 并找出模型中的关键可控参数, 应用电子计算机实现最佳控制, 这才是更有希望的途径^[2]。

米氏方程和莫诺方程

发酵过程与酶反应是紧密相关的, 酶反应最基本的数学模型是研究简单的单一底物反应后得到的。所谓简单的单一底物反应是指在酶反应过程中不伴有可逆反应和激活剂、抑制剂影响的许多单底物体系的反应机制^[4], 可以简单地表示为:



首先, 底物 S 与自由酶 E 形成一个复合物 ES , 第二步复合物分解成反应产物 P , 同时酶被重新游离。在反应过程中, ES 的浓度几乎是不变的, 我们将此情况称为准稳态(quasi stationary states)^[7], 因而可用恒态法处理^[8]。即:

$$\frac{d[ES]}{dt} = 0 \quad (1)$$

由反应式(a), (b)得到:

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1[E][S] - k_{-1}[ES]$$

$$- k_2[ES] = 0 \quad (2)$$

则有:

$$[ES] = \frac{k_1[E][S]}{k_{-1} + k_2} \quad (3)$$

酶的总浓度 $[E]_0$ 应等于自由酶浓度 $[E]$ 和复合物浓度 $[ES]$ 之和

$$[E]_0 = [E] + [ES]$$

则:

$$[E] = [E]_0 - [ES] \quad (4)$$

将(4)代入(3)并整理化简得到:

$$[ES] = \frac{[E]_0[S]}{k_{-1} + k_2 + [S]} = \frac{[E]_0[S]}{K_m + [S]} \quad (5)$$

根据反应式(b), 产物的生成速度为:

$$\frac{dP}{dt} = k_2[ES] = \frac{k_2[E]_0[S]}{K_m + [S]} \quad (6)$$

(6)式便是经 Briggs-Haldane 修正的 Michaelis-Menten 方程, 简称为米氏方程, K_m 称为米氏常数。当 $[S]$ 足够大, K_m 比之于 $[S]$ 可以忽略时, 反应速度达到最大值:

$$\left(\frac{dP}{dt}\right)_{\max} = k_2[E]_0 \quad (7)$$

故(6)式又可写成:

$$\frac{dP}{dt} = \left(\frac{dP}{dt}\right)_{\max} \frac{[S]}{K_m + [S]} \quad (8)$$

1942 年 Monod 根据菌体的生长速度与限制性基质浓度有关的事实, 提出了与米氏方程相似的莫诺方程^[6,7]:

$$\mu = \mu_{\max} \frac{[S]}{K_s + [S]} \quad (9)$$

其中 $[S]$ 为限制性基质浓度, μ 是比生长速度 (Specific growth rate), 用 $\frac{dX}{dt}$ 表示菌体生长速度时:

$$\mu = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} \quad (10)$$

当 X 表示菌体个数时, 其含意是每个菌体的生

长速度;当 x 表示菌体浓度时,其含意是单位重量菌体的生长速度。同样当 $[S]$ 足够大到 K_s 允许忽略时,比生长速度将达到最大值 μ_{max} , 当 $[S]$ 等于常数 K_s 时,则 $\mu = \frac{1}{2} \mu_{max}$, 即为比生长速度最大值的一半,所以 K_s 又叫做半饱和和常数。图 1 是在不同的限制性基质浓度下测得的

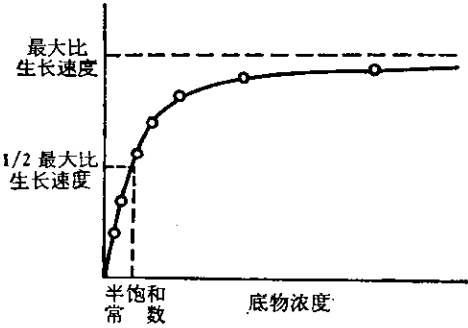


图 1 比生长速度与底物浓度的关系

比生长速度。当 $[S]$ 为低浓度时, μ 随 $[S]$ 增加成直线增加,但 $[S]$ 为高浓度时, $[S]$ 增加, μ 则趋近于纵坐标为 μ_{max} 的一水平线,纵坐标 $\frac{1}{2} \mu_{max}$ 处曲线对应的横坐标即为 K_s 。这样 μ_{max} 只能近似估计而不可能准确地求出,采用 Eadie 倡议的方法^[8],可将(9)式整理得:

$$\mu_{max}[S] = \mu[S] + \mu K_s \tag{11}$$

再改变为:

$$\frac{\mu}{[S]} = \frac{\mu_{max}}{K_s} - \frac{\mu}{K_s} \tag{12}$$

根据不同的 $[S]$ 所得的 μ 换算成 μ 对 $\frac{\mu}{[S]}$ 作图,可得到斜率为 $-\frac{1}{K_s}$,纵坐标上截距为 $\frac{\mu_{max}}{K_s}$,横

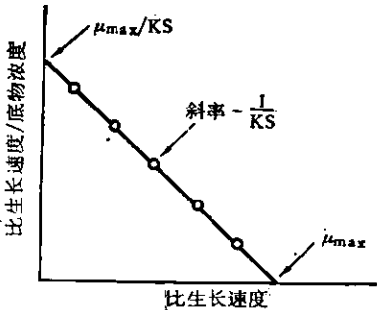


图 2 以比生长速度/底物浓度对比生长速度作图

坐标上截距为 μ_{max} 的一直线,如图 2 所示。

由葡萄糖发酵产生谷氨酸的机制

以葡萄糖和尿素为主要原料,在通气条件下经产谷氨酸菌株发酵产生谷氨酸的机制目前已经比较清楚,其代谢途径如图 3 所示^[6,10]。

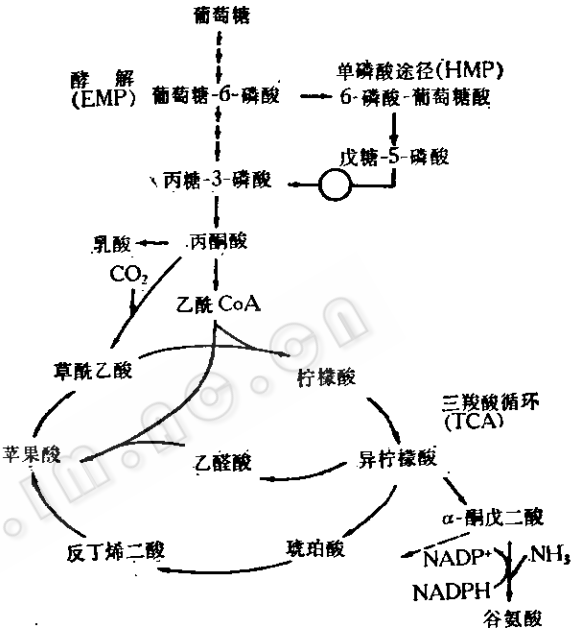


图 3 谷氨酸的合成途径

产谷氨酸菌株的共同特点是:菌体生长和谷氨酸合成均需要生物素,生物素浓度过低,菌体生长和谷氨酸合成都将受到影响,特别是菌体生长^[6,10]。但生物素含量过多会导致细胞膜渗透性下降^[9,10],必然影响液体中谷氨酸的积累。因此对生物素含量必须严加控制,实际上在谷氨酸发酵过程中是用生物素作为限制基质。

谷氨酸发酵菌体增殖的数学模型

对谷氨酸发酵机制的研究成果为获得其数学模型创造了条件。从菌体增殖过程开始,按照 Gaden 对发酵的分类,谷氨酸发酵属于 2 型^[6,10],即菌体的增殖和产物生成分两个阶段并相当完整地分开(见图 4)。可以认为菌体增殖

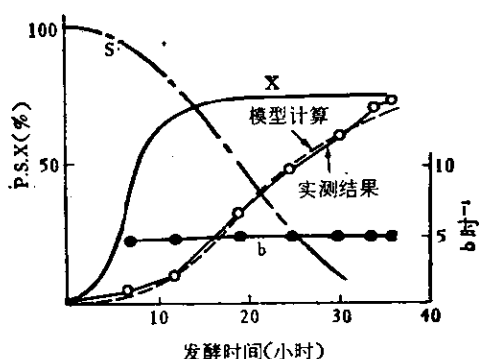
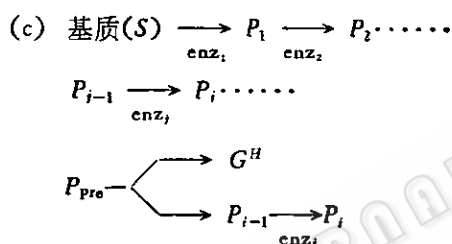


图 4 产物生成曲线

图中 X 示菌体浓度, 由光密度指示; S 示底物浓度, 在发酵开始为 100%; $\circ-\circ$ 示产物, 以发酵结束培养液内含量为 100%。其中常数, $\alpha = 0.23$, $K = 1.4\%$

和产物生成的限制因素必定分别存在, 根据前述, 谷氨酸发酵过程可以用一系列酶反应按如下形式表达:



其中 P_{pro} 代表 G^H 或 P_{i-1} 的前体, G^H 指发酵最终产物谷氨酸。 enz_n 表示各阶段的酶, P_i 为菌体增殖所必需的前体物质。

菌体增殖应用莫诺方程来描述:

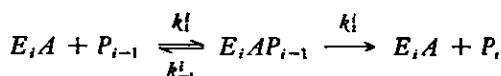
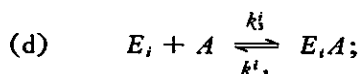
$$\frac{dX}{dt} = \mu X = \mu_{\max} \frac{S}{K_s + S} X \quad (13)$$

现假定:

1. 生物素具有必要的门限浓度 (threshold concentration), 当低于此浓度时菌体不可能生长。

2. 培养液内生物素在一个短期内被菌体吸收, 但不被溶解, 而上述部分即与相应酶结合, 作用类似辅酶(参看反应式 d)。

根据限制性基质的作用机制, 在每一个正在增殖的菌体内部, 都同时进行着如下反应:



其中 A 为菌体内自由生物素浓度, E_i 为第 i 阶段的酶(即 enz_i), k' 是第 i 阶段各过程的反应速度常数。发酵过程进行时 i 阶段应存在准稳态, 应用恒态法:

$$\frac{d[E_i A]}{dt} \cong 0; \quad \frac{d[E_i A P_{i-1}]}{dt} \cong 0;$$

在反应式(d)中设:

$$[E_i] = c_1; [E_i A] = c_2; [E_i A P_{i-1}] = c_3;$$

则任何时刻酶总浓度

$$[E_i]_0 = c_0 = c_1 + c_2 + c_3 \quad (14)$$

据(d)式可得:

$$\begin{aligned}
 \frac{dc_2}{dt} &= k_1 c_1 A - k_{-1} c_2 - k_2 [P_{i-1}] c_2 \\
 &+ k'_{-1} c_3 + k'_2 c_3 = 0 \quad (15)
 \end{aligned}$$

P_{i-1} 是代谢过程中间产物, 对限制性基质 $[A]$ 而言是大量存在, 反应过程中可以把它看作常数, 设 $k'_1 = k_1 [P_{i-1}]$ 。由式(14)得 $c_1 = c_0 - c_2 - c_3$, 把这些关系代入(15)可得:

$$\begin{aligned}
 & k_1 c_0 A - c_2 (k_{-1} A + k'_1 + k'_2) \\
 & + c_3 (k'_{-1} + k'_2 - k_2 A) = 0
 \end{aligned}$$

则有

$$c_2 = \frac{k_1 c_0 A + c_3 (k'_{-1} + k'_2 - k_2 A)}{k_{-1} A + k'_1 + k'_2} \quad (16)$$

从(d)式又可得:

$$\begin{aligned}
 \frac{dc_3}{dt} &= k'_1 c_2 - k'_{-1} c_3 - k'_2 c_3 = 0 \\
 \therefore c_3 &= \frac{k'_1 c_2}{k'_{-1} + k'_2} \quad (17)
 \end{aligned}$$

将式(16)代入式(17)并化简可得:

$$c_3 = \frac{k'_1}{k'_{-1} + k'_2 + k'_1} \frac{c_0 A}{k_{-1} (k'_{-1} + k'_2) + A} \quad (18)$$

而

$$\frac{d[P_i]}{dt} = k'_2 c_3 \quad (19)$$

设:

$$\begin{aligned}
 K^* &= \frac{k'_1 k'_2}{k'_{-1} + k'_2 + k'_1} \\
 K^i &= \frac{k'_{-1} (k'_{-1} + k'_2)}{k'_2 (k'_{-1} + k'_2 + k'_1)}
 \end{aligned}$$

则菌体增殖所必须的前体物质 P_i 生成速度为:

$$\frac{d[P_i]}{dt} = \frac{k_i^*[E_i]_0[A]}{K^i + [A]} \quad (20)$$

从式(20)中可以看出当 $[A]$ 增大到常数 K^i 与 $[A]$ 相比允许忽略时, P_i 的增加达到最大值 $\left(\frac{d[P_i]}{dt}\right)_{\max} = k_i^*[E_i]_0$, 故式(20)又可写成:

$$\frac{d[P_i]}{dt} = \left(\frac{d[P_i]}{dt}\right)_{\max} \frac{[A]}{K^i + [A]} \quad (21)$$

μ 可以理解为一个菌体的增殖速度, 应与 $\frac{d[P_i]}{dt}$ 成正比, 由式(21)相应可得:

$$\mu = \mu_{\max} \frac{[A]}{K^i + [A]} \quad (22)$$

将式(10)代入式(22)得到:

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{\max} \frac{[A]}{K^i + [A]} X \quad (23)$$

这里 $[A]$ 是指菌体内自由生物素浓度, 若 $[A]_0$ 表示菌体内生物素总浓度, 用 A_m 表示菌体内生物素的门限浓度, 则有: $[A] = [A]_0 - A_m$, 于是式(23)应写成:

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{\max} \frac{[A]_0 - A_m}{K^i + [A]_0 - A_m} X \quad (24)$$

根据假定 2, 发酵液生物素初浓度 $[B]_0$ 被菌体吸收, 但不被溶解, 则每个菌体内生物素的总浓度为: $[A]_0 = \frac{[B]_0}{X}$, 代入式(24)即得以生物素作为限制基质时谷氨酸发酵菌体增殖的数学模型:

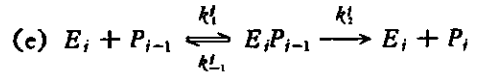
$$\begin{aligned} \frac{dX}{dt} &= \mu_{\max} \frac{\frac{B_0}{X} - A_m}{K^i + \frac{B_0}{X} - A_m} X \\ &= \mu_{\max} \frac{B_0 - A_m X}{B_0 + (K^i - A_m)X} X \end{aligned} \quad (25)$$

将式(25)分离变量进行积分, 就可以找到任何培养时间 t 相对应菌体浓度 X 之间的关系式:

$$\mu_{\max} t = \ln \frac{X}{X_0} + \frac{K^i}{A_m} \ln \frac{B_0 - A_m X_0}{B_0 - A_m X} \quad (26)$$

谷氨酸发酵产物生成的数学模型

参照反应式(c)再假定在菌体内获得产物 G^H 的前体物质 P_i 的酶反应式为:



同理应用恒态法 $\frac{d[E_i P_{i-1}]}{dt} = 0$, 由(c)式可得:

$$\begin{aligned} \frac{d[E_i P_{i-1}]}{dt} &= k_1[E_i][P_{i-1}] \\ &\quad - k_{-1}[E_i P_{i-1}] - k_2[E_i P_{i-1}] = 0 \\ \therefore [E_i P_{i-1}] &= \frac{k_1}{k_{-1} + k_2} [E_i][P_{i-1}] \end{aligned} \quad (27)$$

设在 i 阶段酶总浓度为 $[E_i]_0$ 则有 $[E_i] = [E_i]_0 - [E_i P_{i-1}]$ 代入式(27)得:

$$[E_i P_{i-1}] = \frac{[E_i]_0 [P_{i-1}]}{\frac{k_{-1} + k_2}{k_1} + [P_{i-1}]}$$

设

$$K_i = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$$

则

$$[E_i P_{i-1}] = \frac{[E_i]_0 [P_{i-1}]}{K_i + [P_{i-1}]} \quad (28)$$

由反应式(c)得到 P_i 的生成速度:

$$\frac{d[P_i]}{dt} = k_2 [E_i P_{i-1}] = \frac{k_2 [E_i]_0 [P_{i-1}]}{K_i + [P_{i-1}]} \quad (29)$$

P_i 有两个用途, 一部分继续反应变成所需的终产物 G^H , 另一部分供给菌体增殖。则有:

$$\frac{d[G^H]}{dt} = a_0 \frac{d[P_i]}{dt} - a_1 \frac{d[P_i]}{dt} \quad (30)$$

而每个菌体的增殖速度 μ 应与菌体内前体物质生成速度 $\frac{d[P_i]}{dt}$ 成正比, 即

$$a_1 \frac{d[P_i]}{dt} = a\mu = a \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} \quad (31)$$

同时 $[P_{i-1}]$ 作为 i 阶段的反应基质, 实际上应与产物生成阶段的限制基质浓度 S 相当, 将此关系代入式(29)并化简得到:

$$\frac{d[P_i]}{dt} = b_0 \frac{S}{K + S} \quad (32)$$

将式(31),(32)代入(30)得:

$$\frac{d[G^H]}{dt} = b \frac{S}{K+S} - a \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} \quad (33)$$

此式是对一个菌体而言, 发酵液中菌体浓度为 X 时产物生成速度应为:

$$\frac{dP}{dt} = X \frac{d[G^H]}{dt} = b \frac{S}{K+S} X - a \frac{dX}{dt} \quad (34)$$

式(34)即为谷氨酸生成的数学模型。上述 a_0 , a_1 , a , b_0 , b 均为常数, K 相当于 K_i , P 为发酵液内产物 G^H 的浓度。

发酵主要基质——糖 消耗的数学模型

以糖为基质的发酵过程中, 糖主要消耗于:

(1)满足菌体增殖需要, 构成菌体成分, 用 $(\Delta S)_G$ 表示; (2)维持菌体生存和代谢的消耗, 即菌体进行呼吸耗能和发酵积累代谢产物的消耗, 用 $(\Delta S)_M$ 表示。

因此发酵过程中糖消耗:

$$\Delta S = (\Delta S)_G + (\Delta S)_M \quad (35)$$

按莫诺公式, 菌体增殖与相应消耗基质的关系为:

$$-\left(\frac{dS}{dt}\right)_G = \frac{1}{Y_G} \frac{dX}{dt} \quad (36)$$

其中 $-\left(\frac{dS}{dt}\right)_G$ 为 $(\Delta S)_G$ 的消耗速率, Y_G 为当糖消耗 $(\Delta S)_G$ 后, 菌体增加 ΔX 的比例常数, 即

$$Y_G = \frac{\Delta X}{(\Delta S)_G}$$

对于呼吸和发酵的消耗 $(\Delta S)_M$ 可表示为:

$$-\left(\frac{dS}{dt}\right)_M = \frac{1}{Y_M} \frac{dP}{dt} + mX \quad (37)$$

其中 $-\left(\frac{dS}{dt}\right)_M$ 为 $(\Delta S)_M$ 的消耗速率, Y_M 为当发酵得到产品 ΔP 时相应所消耗的糖 $(\Delta S)_M'$ 之间的比例常数, 即 $Y_M = \frac{\Delta P}{(\Delta S)_M'}$ 。而 X 为发酵

液内菌体总量, m 为菌体呼吸耗糖的比例常数。综合式(34)(35)和(36)可得到发酵过程糖消耗的数学模型:

$$\begin{aligned} -\frac{dS}{dt} &= -\left[\left(\frac{dS}{dt}\right)_G + \left(\frac{dS}{dt}\right)_M\right] \\ &= \frac{1}{Y_G} \frac{dX}{dt} + \frac{1}{Y_M} \frac{dP}{dt} + mX \end{aligned} \quad (38)$$

以上所推导的数学模型与实测情况进行了对比, 如图 4, 5, 6 所示。

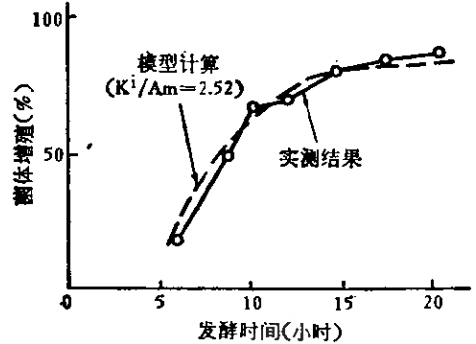


图 5 菌体增殖曲线 (K^i/A_m 的值是发酵 10 小时估算得到)

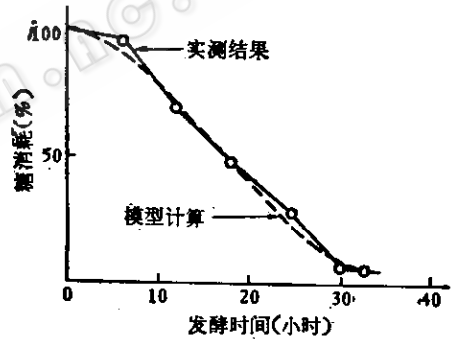


图 6 糖消耗曲线

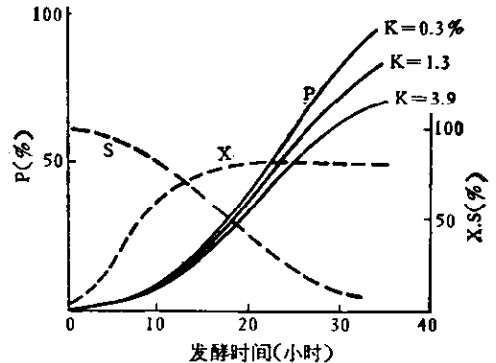


图 7 可控参数 K 对产物生成的影响 (P 示产率, 最大为 100%, S 代表糖消耗, X 代表菌体浓度, 其中常数 $a = 0.23$, $b = 5.7 \times 10^{-2} \text{时}^{-1}$)

上述结果证实, 以上模型基本上正确地描述了发酵过程。因此可以用来预先估计发酵液内产物的浓度, 判断早期的异常发酵, 预测适当的放罐时间。此外根据所得的数学模型, 还可以了解为使产物获得理想结果对有关参数的要求, 以便加以控制。这些参数往往是由操作条件, 如罐温、罐压、溶氧以及 pH 等所决定。例如在产物生成的数学模型中可以看出: 产物生成速度与参数 K 密切相关。在发酵过程中, 控制各发酵条件使 K 维持在较低水平则有利于产物的生成, 如图 7 所示。

K 对产物生成速度的影响, 在发酵后期表现得更为强烈, 当由电子计算机控制发酵过程时, 能及时反应和控制 K 的大小, 使发酵过程向最佳目标接近。

参 考 文 献

- [1] Yamashita, S. and C. Murao: *J. Soc. Instrument and Control Engineers*, 6(10): 735, 1967.
- [2] Yamashita, S., H. Hisashi and T. Inagaki: *Automatic Control and Optimization of Fermentation Processes: Glutamic Acid Fermentation Advances* (ed. by Perlman, D.), Academic Press, New York and London, 1969, pp. 441—

- 463.
- [3] Young, T. B. and H. M. Koplove: *A Systems Approach to design and Control of Antibiotic Fermentation, Fermentation Technology Today* (ed. by Terui, G.) Society of Fermentation Technology, Japan, 1972, p. 163.
- [4] Nyiri, L. K.: *Strategies and Problems Related to Computer Coupled Fermentation Systems, Proceedings of the 1st International Congress of IAMS*, Vol. 5 (ed. by Hasegawa, T.), Science Council of Japan, Tokyo, 1974, pp. 120—136.
- [5] Wang, H. Y.: *Computer-aided Bakers Yeast Production*, PhD Thesis, Dept. Nutrition and Food Science, MIT, Cambridge, Mass, August, 1976.
- [6] Aiba, S., A. E. Humphrey and N. F. Millis: *Biochemical Engineering*, Academic Press, N. Y. and London, 1973, pp. 61—63, 93—125.
- [7] James, E. B. and D. F. Ollis: *Biochemical Engineering Fundamentals*, McGraw-Hill Book Company, New York, London and Tokyo, 1977, pp. 94—95, 343—346.
- [8] Laidler, K. J.: *The Chemical Kinetics of Enzyme Action*, Oxford University Press, 1958, 朱德煦译: 《酶作用的化学动力学》, 科学出版社, 北京, 1965, 第 43, 68—71 页。
- [9] アミノ酸, 核酸集談会編: アミノ酸醱酵, 上, 総論, 共立出版株式会社, 東京, 1972, pp. 224—231.
- [10] 木下祝郎: 醱酵工業(新版), 大日本図書, 東京, 1975, pp. 96—98, pp. 128—131.