

由连续培养数据估算微生物生长动力学和能学参数的研究

方 柏 山

(化工与生化工程系)

摘 要

本文基于 Monod 方程和 Pirt 的线性化关系式导出了含有维持系数的、用于描述微生物连续培养时菌体浓度随稀释度变化的数学表达式,并用最小二乘法和改正单纯形法较好地估算了单罐连续培养中大肠杆菌的生长动力学和能学参数。

一、前 言

在大规模生产中,最有效地利用生物及其组分,需要有个最优化的过程,而过程最优化的实现要求人们对生物转化的动力学和能学有一个定量的和基本的了解(Thijssen, 1982)^[1]。数十年来,许多生化工程学者为了了解微生物生长动力学和能学,进行了不懈的探索,建立了各种各样的数学模型^[1,2]。在这些模型中,最重要和最常用的模型是 Monod 方程(1942)

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{K_s + S} \quad (1)$$

和 Pirt (1965年)的线性化关系式

$$\frac{1}{Y_{x/s}} = \frac{1}{Y_o} + \frac{m}{\mu} \quad (2)$$

在这两个方程式中, μ 和 S 分别为微生物的比生长速度和限制性底物浓度, $Y_{x/s}$ 系微生物关于底物的宏观得率。其定义式为

$$Y_{x/s} = - \frac{dX}{dS} \quad (3)$$

μ_{\max} 和 K_s 为微生物生长动力学参数, Y_o 和 m 为微生物能学参数,这四个参数分别表示微生物最大比生长速度、Monod 饱和常数、最大宏观得率和用于维持细胞生存的底物比消耗速度(简称维持系数)。对于这些参数的估算,人们也进行了许多研究。但就其手段而言,多见于文献的或是由单一培养(如分批培养或连续培养等)的数据估算其中几个参数^[4,6];或

本文1986年12月31日收到。

是把分批培养和连续培养的数据结合起来估算四个参数^[2]。作者曾就由分批培养数据一举估算这四个参数的方法进行了研究^[3]。至于由连续培养数据估算这四个参数的研究, 俞叶修^[4]等人曾报导了根据不同稀释度 D 测定的 S 及间接求得的 Y_{G0} 值进行参数估算的方法^[8]。本文则是研究由不同的 D 下测定的原始数据 X (菌体浓度) 和 S 一举估算 μ_{\max} 、 K_s 、 Y_G 及 m 的方法。并以实例比较这两种方法的估算结果。

二、数学模型及其解析解

由于在单罐连续培养过程中, 菌体的生长速度往往比其死亡速度快得多, 而且进料液通常是不含有菌体的, 因而由单罐连续培养的菌体物料衡算可知: 当单罐连续培养达到稳定态时

$$\mu = D \quad (4)$$

式中, D 为稀释度, 等于进料液的体积流量与反应器中培养液体积之比。

将方程式(4)代入式(1)可得稀释度与限制性底物浓度的关系式

$$D = \mu_{\max} \frac{S}{K_s + S} \quad (5)$$

或

$$S = \frac{DK_s}{\mu_{\max} - D} \quad (6)$$

另外, 根据式(1)、(2)和(3)得

$$- \frac{dS}{dX} = \frac{1}{Y_G} + \frac{m(K_s + S)}{\mu_{\max} S} \quad (7)$$

以边界条件: $X|_{S=S_0} = 0$ 和 $X|_{S=0} = X$ 积分式(7)可得

$$X = A \left[(S_0 - S) - B \ln \left(\frac{S_0 + B}{S + B} \right) \right] \quad (8)$$

式中

$$A = Y_G \mu_{\max} / (m Y_G + \mu_{\max}) \quad (9)$$

$$B = K_s m Y_G / (m Y_G + \mu_{\max}) \quad (10)$$

S_0 为进料液中限制性底物浓度。

由此可见 A 和 B 均为常数, 其物理意义参见文献^[7]。

由于 $B < S_0$ ^[7], 而 $S = \frac{DK_s}{\mu_{\max} - D}$, 则方程式(8)可改写成

$$X = A \left[S_0 - \frac{DK_s}{\mu_{\max} - D} - B \ln \frac{S_0(\mu_{\max} - D)}{DK_s + B(\mu_{\max} - D)} \right] \quad (11)$$

三、微生物生长动力学和能学参数的估算

为了便于估算微生物生长动力学参数, 方程式(5)可以写成如下的双倒数形式

$$\frac{1}{D} = \frac{K_s}{\mu_{\max}} \cdot \frac{1}{S} + \frac{1}{\mu_{\max}} \quad (12)$$

就 $1/D$ 关于 $1/S$ 而言, 这是个线性方程。一旦测得不同稀释度 D 下的限制性底物浓度 S , 应

用最小二乘法或 Lineweaver-Burk 图解法, 就能够很方便地求出 K_s 和 μ_{\max} 。

求出的 K_s 和 μ_{\max} 值代入方程式(11)便可得到一个 X 关于 D 的双参数 (A 和 B) 非线性方程。测定不同 D 下的菌体浓度 X , 通过试差便可求得 A 和 B 值^[7]。把 A 、 B 、 K_s 和 μ_{\max} 值代入方程式(9)、(10), 联立求解便可得到 Y_o 和 m 。

为了避免作图所带来的人为的误差及试差的盲目性, 本文采用了最小二乘法和改正单纯形法。并且以大肠杆菌单罐连续培养的数据(表1)^[9]为例, 估算出大肠杆菌的生长动力学和能学参数。整个计算过程在 Apple-II 微型电子计算机上进行。计算结果: $\mu_{\max} = 1.05(h^{-1})$, $K_s = 0.0997(g \text{ 葡萄糖}/l)$ 、相关系数 $r = 0.9996$; $Y_o = 0.573(g \text{ 菌体}/g \text{ 葡萄糖})$ 、 $m = 0.241(g \text{ 葡萄糖}/g \text{ 菌体} \cdot h)$, 目标函数 $f = 8.0 \times 10^{-3}$ 。把这些参数代入方程式(6)和(11), 所得到的限制底物浓度及菌体浓度的计算值(见表2)随稀释度变化的规律如图1中(a)组曲线所示。(b)组曲线引自文献^[9], 其数学模型为

$$S = \frac{K_s(m Y_o + D)}{\mu_{\max} - D} \quad (13)$$

$$X = \frac{Y_o D}{m Y_o + D} \left[S_o - \frac{K_s(m Y_o + D)}{\mu_{\max} - D} \right] \quad (14)$$

由数据分析(见表3)可知^[10], 不管是描述 S 还是 X 的实验数据, 用本模型所得到的结果均优于文献^[9]所提出的模型(即方程式(13)、(14))。

表 1 大肠杆菌单罐连续培养

$D(h^{-1})$	0.06	0.12	0.24	0.31	0.43	0.53	0.60	0.66	0.69	0.71	0.73
$S(g \text{ 葡萄糖}/l)$	0.006	0.013	0.033	0.040	0.064	0.102	0.122	0.153	0.170	0.221	0.210
$X(g \text{ 菌体}/l)$	0.427	0.434	0.417	0.438	0.422	0.427	0.434	0.422	0.430	0.390	0.352

注: 以葡萄糖为生长限制底物, 需氧培养, $S_o = 0.988(g \text{ 葡萄糖}/l)$ 。

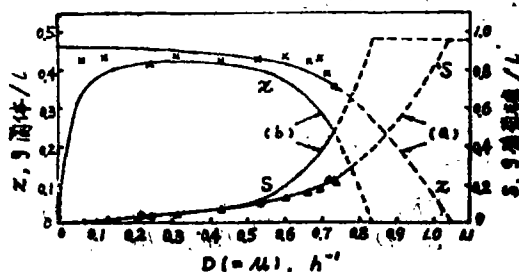


图1 S 及 X 的计算值与实测值

(a) 组曲线: $\mu_{\max} = 1.05(h^{-1})$, $K_s = 0.0997(g \text{ 葡萄糖}/l)$, $Y_o = 0.573(g \text{ 菌体}/g \text{ 葡萄糖})$, $m = 0.241(g \text{ 葡萄糖}/g \text{ 菌体} \cdot h)$;

(b) 组曲线: $\mu_{\max} = 0.84(h^{-1})$, $K_s = 0.074(g \text{ 葡萄糖}/l)$, $Y_o = 0.5(g \text{ 菌体}/g \text{ 葡萄糖})$, $m = 0.05(g \text{ 葡萄糖}/g \text{ 菌体} \cdot h)$ ^[9]。

表 2 葡萄糖、大肠杆菌浓度的计算值

$S_{\text{计}}$	0.006	0.013	0.030	0.042	0.069	0.102	0.133	0.169	0.191	0.208	0.227	本文*
(g葡萄糖/l)	0.008	0.015	0.033	0.047	0.082	0.132	0.193	0.282	0.353	0.418	0.508	文献〔9〕**
$X_{\text{计}}$	0.463	0.462	0.457	0.452	0.440	0.426	0.411	0.395	0.384	0.376	0.367	本文*
(g菌体/l)	0.339	0.394	0.423	0.426	0.419	0.399	0.372	0.330	0.297	0.266	0.222	文献〔9〕**

* $\mu_{\max} = 1.05 \text{ (h}^{-1}\text{)}$, $K_s = 0.0997 \text{ (g葡萄糖/l)}$, 相关系数 $r = 0.9996$, $Y_o = 0.573 \text{ (g菌体/g葡萄糖)}$, $m = 0.241 \text{ (g葡萄糖/g菌体} \cdot \text{h)}$, 目标函数 $f = 8.0 \times 10^{-3}$.
** $\mu_{\max} = 0.84 \text{ (h}^{-1}\text{)}$, $K_s = 0.074 \text{ (g葡萄糖/l)}$, $Y_o = 0.5 \text{ (g菌体/g葡萄糖)}$; $m = 0.05 \text{ (g葡萄糖/g菌体} \cdot \text{h)}$.

表 3 不同数学模型的数据分析

计 算 结 果	数 学 模 型			
	$S_1 = f_1(D)$ 〔详见式(13)〕	$S_2 = f_2(D)$ 〔详见式(6)〕	$X_1 = g_1(D)$ 〔详见式(14)〕	$X_2 = g_2(D)$ 〔详见式(11)〕
剩余平方和Q	0.1841	0.001314	0.07284	0.008025
剩余标准离差s	0.1430	0.01208	0.08996	0.02986
文 献	9	本 文	9	本 文

注: $Q = \sum (S_{\text{实}} \text{ (或 } X_{\text{实}}) - S_{\text{计}} \text{ (或 } X_{\text{计}}))^2$;

$$s = \sqrt{Q/(N - M - 1)}$$
;

式中, M 为自变量个数; N 为实验数据组数. Q 、 s 愈小, 计算值与实测值吻合得愈好^{〔10〕}.

四、讨 论

(1) 估算表明, 本文所导出的 X 与 D 的关系式 (式(11)) 及所提出的估算方法, 能够用于由一套连续培养数据估算微生物生长动力学和能学的四个参数: μ_{\max} 、 K_s 、 Y_o 和 m .

(2) 以大肠杆菌单罐连续培养为例, 用本方法进行估算所得到的结果较文献^{〔9〕} 所报导的结果好 (如图 1 及表 3 所示).

(3) 本文在推导 X 与 D 的关系时, 始终考虑到 $Y_{x/o}$ 通常并非常数, 而是 S (或 D) 的函数这一实际情况, 因而由此所推导的关系式具有较普遍的意义. 而且本法进行估算时, 所用的数据均为原始数据, 这样有利于避免因采用间接数据所可能产生的额外误差.

(4) 由方程式(11)可知, 当 $D \rightarrow 0$ 时, $X \rightarrow A \cdot [S_0 - B \ln \frac{S_0}{B}]$. 它不象文献^{〔9〕} 所阐述的那样, 或是趋近于 $Y_{x/o} S_0$ (此时 $Y_{x/o} = Y_o$), 或是趋近于 0 (此时 $Y_{x/o} \rightarrow 0$), 从而排除了该

文献中所述的那种预测 $D \rightarrow 0$ 时的 X 值所存在的困难。

参 考 文 献

- [1] Roels, J.A., *Energetics and Kinetics in Biotechnology*, Elsevier Biomedical Press, (1983).
- [2] Esener, A.A., Roels, J.A. and Kossen, N.W.F., *Biotechnol. Bioeng.*, 25, 12(1983), 2803.
- [3] Takamatsu, T., shioya, S. and okuda, K., *J. Ferment. Technol.*, 59, 2(1981), 131.
- [4] Webster, I.A., *Biotechnol. Bioeng.*, 25, 12(1983), 2981.
- [5] Heijnen, J.J., Roels, J.A., *Biotechnol. Bioeng.*, 23, 4(1981), 739.
- [6] Atkinson, B., Mavituna, F., *Biotechnol Engineering and Biotechnology Handbook*, The Nature Press, (1983).
- [7] 方柏山, 由分批培养数据估算微生物生长动力学和能学参数, *生物工程学报*, 2, 4 (1986), 54—60.
- [8] 合叶修一等合著, 涂长晟译, *生物化学工程*, 轻工业出版社, (1981).
- [9] 合叶修一、永井史郎著, 胡章助等译, *生物化学工程——反应动力学*, 化学工业出版社, (1984).
- [10] 白新桂, *数据分析与优化设计*, 清华大学出版社, (1986).

Using Continuous Culture Data to Estimate Kinetics and Energetics Parameters of Microbial Growth

Fang Baishan

Abstract

In this paper, a mathematical expression with maintenance coefficient, based on Monod equation and Pirt linear relation, is deduced for describing the concentration change of microbes with the change of dilution rate in continuous cultivation; and then, the kinetics and energetics parameters of *E. Coli* growth in single tank continuous culture are well estimated by means of least square method and Spendley-Neider-Mead simplex method.