

基于生物参数在线检测的谷氨酸发酵动力学研究

Research on fermentation dynamics of glutamic acid by biological parameters on-line detection

周万里 张金玲 朱思荣

ZHOU Wan-li ZHANG Jin-ling ZHU Si-rong

史建国 赵晓华 毕春元

SHI Jian-guo ZHAO Xiao-hua BI Chun-yuan

(1. 山东省科学院生物研究所, 山东 济南 250014; 2. 山东省生物传感器重点实验室, 山东 济南 250014)

(1. Biology Institute of Shandong Academy of Sciences, Jinan, Shandong 250014, China;

2. Key Laboratory for Biosensors of Shandong Province, Jinan, Shandong 250014, China)

摘要: 利用生物量在线检测系统和在线控制系统技术, 通过探讨谷氨酸发酵过程中棒状杆菌 S9114 菌体浓度、底物浓度和产物浓度随时间的变化规律, 对谷氨酸发酵动力学进行研究, 分别建立谷氨酸发酵过程中菌体生长、底物消耗和产物生成的动力学模型。利用 MATLAB 软件对试验数据进行拟合, 获得能够描述谷氨酸棒状杆菌 S9114 发酵过程的动力学模型, 对发酵过程的调控及发酵规模的放大有着重要的指导意义。

关键词: 谷氨酸; 发酵; 在线检测; 动力学模型

Abstract: Established bacteria growth dynamics model, substrate consumption dynamic model and product generate dynamic model in the process of glutamic acid fermentation, by discussing the concentration of corynebacterium S9114 bacteria, substrate concentration and product concentration changing with the time. It uses biomass on-line detection system and online control system technology. Use the MATLAB software for fitting experimental data to describe S9114 corynebacteria glutamate fermentation kinetics model. It has the important guiding significance for fermentation process control and fermentation scale enlargement.

Keywords: glutamic acid; fermentation; online detection; dynamic model

发酵过程的计算机控制是现代生物过程工程技术发展的必然趋势, 相关研究已取得很大进展, 但目前的各种动力学模型和控制方法普遍存在的难点之一是缺乏可靠的生物传感器, 使得一些重要的生物状态变量无法在线测量, 不能

精确表征发酵过程状态的主要生化指标, 导致很多发酵控制模型在实际生产中达不到预期的应用效果^[1-6]。

本研究拟基于生物量在线检测系统, 开展谷氨酸发酵过程的动力学研究, 主要依据葡萄糖、乳酸、谷氨酸等生物参数, 结合常规 pH、温度、溶氧等在线发酵指标, 研究不同发酵条件下菌体生长、底物消耗和产物生成的变化规律, 构建以生物参数为直接变量的发酵动力学模型, 为谷氨酸发酵过程优化和自动控制提供新的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种

谷氨酸棒状杆菌(*Corynebacterium glutamateum* S9114): 菱花集团有限公司。

1.1.2 试剂

甜菜糖蜜、玉米浆: 菱花集团有限公司;

其余试剂: 均为市售分析纯。

1.1.3 培养基

试管活化培养基: 葡萄糖 1 g/L, 牛肉膏 10 g/L, 蛋白胨 10 g/L, 酵母膏 5 g/L, NaCl 5 g/L, 琼脂 20 g/L, pH 7.0 ~ 7.2;

摇瓶种子培养基: 葡萄糖 30 g/L, 玉米浆 20 g/L, 甜菜糖蜜 12 g/L, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 3 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.4 g/L, 尿素 5 g/L (单独灭菌), $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.005 g/L, $MnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.005 g/L, pH 7.0 ~ 7.2;

发酵罐种子培养基: 葡萄糖 50 g/L, 甜菜糖蜜 15 g/L, 玉米浆 50 g/L, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 3 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.4 g/L, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.005 g/L, $MnSO_4 \cdot H_2O$ 0.005 g/L, pH 7.0 ~

基金项目: 国家“863”计划项目(编号: 2012AA021201); 山东省自然科学基金项目(编号: ZR2011CL008)

作者简介: 周万里(1956—), 男, 山东省科学院生物研究所高级工程师。E-mail: swzl@sdas.org

通讯作者: 毕春元

收稿日期: 2014-09-08

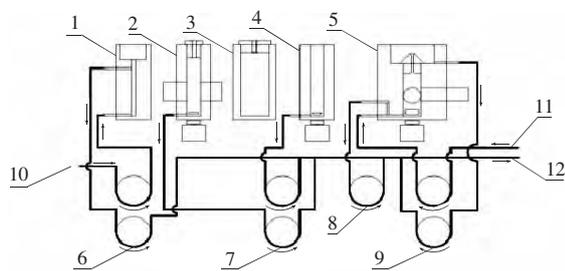
7.2;

发酵罐发酵培养基: 葡萄糖 160 g/L, 甜菜糖蜜 1.5 g/L, 玉米浆 6 g/L, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 1 g/L, KCl 2.2 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 g/L, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.002 g/L, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.002 g/L, pH 7.0 ~ 7.2^[7]。

1.2 方法

1.2.1 谷氨酸发酵过程 在无菌操作台酒精灯火焰上挑取一环保藏斜面菌种, 接到试管活化培养基斜面上, 32 °C 恒温培养过夜。如此重复操作, 活化菌种 2 ~ 3 次完成保藏菌种的活化。在无菌操作台酒精灯火焰上挑取一环新鲜种子斜面, 接入装有 20 mL 摇瓶种子培养液的 500 mL 三角瓶中, 32 °C, 200 r/min 培养 12 h 进行摇瓶种子培养。在火焰圈上将摇瓶种子接入装有 2 L 发酵罐种子培养基的 10 L 发酵罐中, 自动流加氨水控制 pH 7.0, 33 °C。根据溶氧要求调节搅拌转速, 培养 12 h 进行发酵罐种子培养。待发酵罐种子培养结束时, 将灭完菌的发酵罐发酵培养基在火焰圈上接入到此发酵罐中, 最终 10 L 发酵罐的装液量为 6 L, 33 °C。根据溶氧要求调节搅拌转速, 通过流加氨水控制 pH 7.0, 温度由 33 °C 逐渐上升至 39 °C 完成发酵罐发酵培养。

1.2.2 生物量在线检测 图 1 是发酵在线控制系统和生物量在线检测系统装置示意图。经由电磁阀和取样泵共同组成的采样装置, 通过 C8051F120(SOC) 单片机程序设计控制发酵液的采样和排放, 单次测定所需发酵液体积为 0.5 mL。生物量在线检测系统的检测范围为 0 ~ 100 mg/mL, 当发酵液生物量浓度超过该量程时由比色稀释池和二级稀释池对发酵液进行稀释, 其中比色稀释池稀释倍数固定为 10 倍; 同时检测出在 570nm 处的 OD 值。最后由机械手从取样池内吸取待测发酵液注入反应池进行生物量的测定。最终测定



1. 取样池 2. 比色稀释池 3. 标样池 4. 二级稀释池 5. 生物传感反应池 6. 采样泵 7. 稀释池排空泵 8. 反应池排空泵 9. 反应池清洗泵 10. 样品入口 11. 缓冲液入口 12. 废液出口

图 1 发酵在线控制系统和生物量在线检测系统装置示意图

Figure 1 The equipment diagram of biomass online detection system schematic

结果输入 PC 机进行分析处理, 以数据表格和曲线的形式展示, 测定周期可以设置为 6 ~ 200 min^[8-10]。

1.2.3 在线控制 温度、DO、pH 等参数分别由与在线控制系统连接的相应电极检测, 在线控制系统根据检测结果进行反馈调节, 保持菌株处于相对最适环境下生长, 其中温度通过控制加热底座和循环水调节, DO 通过控制转速和通气量调节, pH 是通过添加氨水调节。

2 结果与分析

2.1 生长代谢规律分析

对菌株在发酵过程中的生长代谢规律进行分析有利于选择适宜的动力学公式来描述发酵过程, 从而使动力学分析更加准确。分批发酵的原始数据见表 1, 菌体生长曲线、底物消耗曲线、产物生成曲线以及 pH 和溶氧对发酵的影响曲线见图 2。

由图 2 可知, 谷氨酸棒状杆菌的菌体生长曲线比较典型, 各个生长阶段比较分明。伴随着菌体生长葡萄糖不断被消耗, 菌体生长曲线和葡萄糖的消耗曲线基本成镜像关系, 可以认为碳源是其菌体生长的限制性基质。另外, 在产物谷氨酸产率较高时葡萄糖的消耗并不明显, 因此在选择动力学模型时可忽略代谢产物对底物的消耗。

通过分析比较菌体生长曲线和谷氨酸生成曲线可以发现, 谷氨酸的生成基本和菌体生长同步, 在菌体进入平衡期后, 谷氨酸还可以继续合成一段时间。因此, 可以断定谷氨

表 1 分批发酵的原始数据表

Table 1 Batch fermentation of the original data table

时间/ h	葡萄糖/ %	乳酸/ %	谷氨酸/ %	DO	pH	OD
0	6.0	0.0	0.5	78.3	7.11	0.188
2	5.7	0.0	0.6	56.8	7.02	0.237
4	5.1	0.0	1.1	58.9	7.04	0.329
6	4.1	0.1	1.8	37.7	7.01	0.458
8	2.9	0.1	2.6	19.3	7.02	0.682
10	1.3	0.1	3.9	10.2	6.98	0.976
12	1.2	0.1	5.5	15.8	7.00	1.234
14	1.1	0.1	7.6	10.2	7.01	1.437
16	0.9	0.1	9.7	7.9	6.98	1.483
18	1.0	0.1	11.6	9.8	7.03	1.527
20	1.1	0.1	13.3	4.2	6.97	1.562
22	1.0	0.1	15.1	14.2	7.00	1.559
24	0.9	0.1	16.4	11.2	7.02	1.568
26	0.9	0.1	17.5	15.6	6.96	1.562
28	0.7	0	18.4	28.5	6.87	1.547
30	0.3	0	18.9	46.4	6.76	1.539
32	0.0	0	19.1	95.9	6.67	1.532

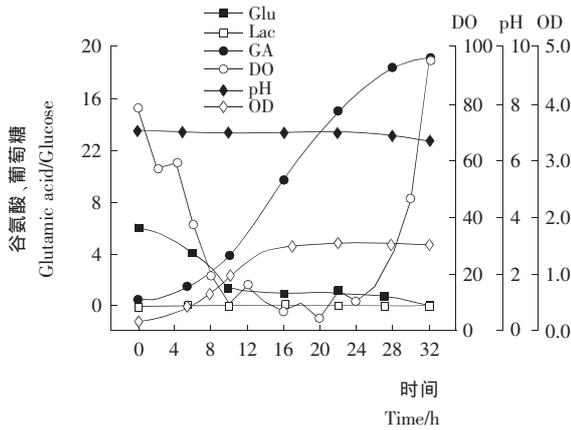


图 2 谷氨酸发酵的动力学曲线以及 pH 和溶氧对发酵的影响曲线图^[10]

Figure 2 Glutamic acid fermentation kinetics curve and the influence of pH and dissolved oxygen on fermentation curve

酸棒状杆菌 S9114 合成谷氨酸的模式为延续合成型, 产物生成属于生长部分相关型。

2.2 菌体生长动力学

根据对谷氨酸发酵的动力学曲线图中生长代谢规律的分析, 假设葡萄糖是谷氨酸棒状杆菌 S9114 生长的唯一限制性基质, 采用 Monod 方程来对菌体生长规律进行描述, 见式 (1)。

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

式中:

t ——时间 h ;

X ——菌体浓度 $\mu g/g$;

X_{\max} ——得到的最大菌体浓度 $\mu g/g$;

μ_{\max} ——最大比生长速率 h^{-1} 。

利用表 1 中的原始数据采用 MATLAB 软件, 进行菌体生长动力学模型非线性回归解法 nonlinear Regression Thallus (T, X, bt) 然后开始菌体生长动力模型参数计算 Parameter Calculation Thallus (bt, T), 再绘制菌体、动力、原始点与非线性回归拟合的对比效果 Draw Nonlinear Regression Thallus (CX, T, Miu_m, C_x_0)。参数计算结果为 $X_0 = 515.0083$ $\mu_{\max} = 0.3906$ 拟合效果见图 3。

由图 3 可知, 前期菌体生长动力学模型原始数据点和拟合曲线贴得非常好。当 $t > 14$ 时, 原始数据慢慢低于拟合点并呈现下降趋势, 主要原因为分批发酵不能保证菌体一直处于最佳生长环境, 发酵后期菌体自身产生有毒物质以及葡萄糖供给不足导致菌体死亡。

2.3 产物生成动力学

通过生长代谢规律分析确定谷氨酸的生成属于产物生成与生长部分偶联型根据对谷氨酸发酵的动力学曲线图中生长代谢规律的分析, 假设菌体生长部分偶联型。采用由

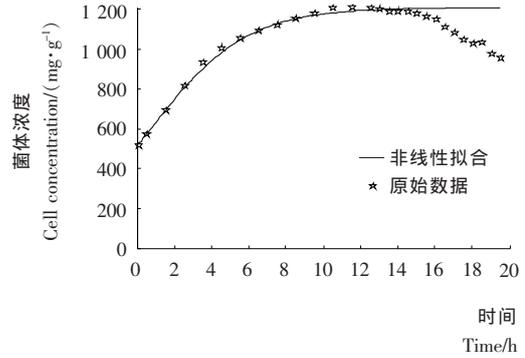


图 3 菌体生长拟合效果图

Figure 3 Bacteria growth fitting effect

Luedeking R 和 Piret EL^[11-13] 于 1959 年所提出的数学模型 (式 (2)) 来描述。

$$\frac{dP}{dt} = a \times \frac{dX}{dt} + bX \quad (2)$$

式中:

P ——生成谷氨酸浓度 $\mu g/g$;

t ——时间 h ;

X ——菌体浓度 $\mu g/g$;

a, b ——常数。

利用表 1 中的原始数据采用 MATLAB 软件, 进行产物生成动力学模型非线性回归解法 Nonlinear Regression Product (T, X, bt) 然后开始产物生成动力模型参数计算 Parameter Calculation Product (bt, T), 最后绘制原始点与非线性回归拟合效果 Draw Nonlinear Regression Product ($CCX, CX, T, Miu_m, C_x_0, a, b$)。代入 2.2 已经求得的数据计算出: $a = 29.8724$ $b = 0.1942$ 拟合效果见图 4。

2.4 底物消耗动力学

常见的底物消耗动力学模型如下:

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

式 (3) 是根据物料恒算得到的, 发酵过程中底物消耗主要用于菌体生长以及用于维持菌体基本生命活动和代谢产

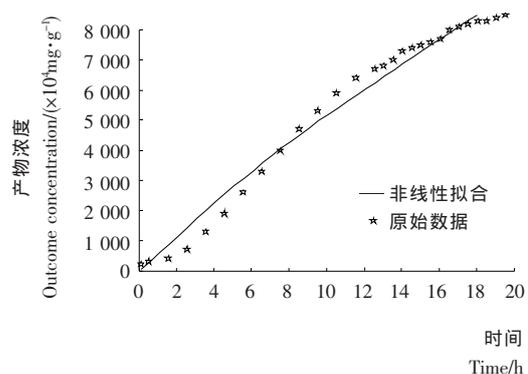


图 4 产物生成拟合效果图

Figure 4 Product fitting effect

物生成。因此常有如下几种近似:

$$-\frac{dS}{dt} = \frac{1}{Y_s} \times \frac{dX}{dt} + \frac{1}{Y_p} \times \frac{dp}{dt} \quad (4)$$

$$-\frac{dS}{dt} = \frac{1}{Y_s} \times \frac{dX}{dt} + mX \quad (5)$$

$$-\frac{dS}{dt} = \frac{1}{Y_s} \times \frac{dX}{dt} \quad (6)^{[14]}$$

式(4)是忽略自生代谢消耗,底物主要用于菌体生长和代谢产物的合成;式(5)是忽略代谢产物消耗,底物主要用于菌体的生长和自生代谢;式(6)是忽略自生代谢和代谢产物消耗,底物主要用于菌体生长^[15-17]。在前面的分析中,该发酵可忽略代谢产物的消耗,因此选择式(5)来描述底物消耗模型。首先利用最小二乘法进行底物消耗动力学模型线性回归,Linear Regression Least Squation(X, S, X0),然后列主元高斯消去法求解方程 Gaussliexuanzhuyuan(A, b)最后绘制底物消耗动力学模型原始点与线性回归拟合的对比效果。将 2.2 和 2.3 已经求得的数据代入该模型进行回归,求得参数 $Y_s = 0.2810$, $Y_p = 0.8266$, $S_0 = 12.995 \times 10^3$,拟合效果见图 5。

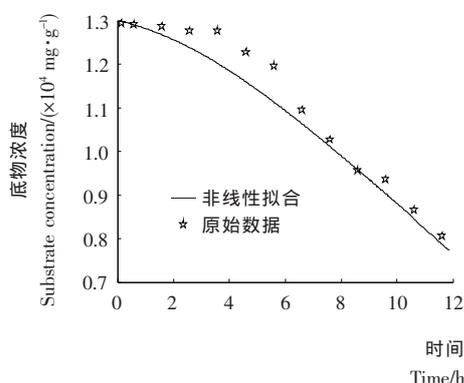


图 5 底物消耗拟合效果图

Figure 5 The substrate consumption fitting effect

3 结论

(1) 在谷氨酸棒状杆菌 S9114 的发酵过程中,动力学公式(1)、(2)、(5)对于描述菌体生长、产物生成、底物消耗具有很好的合理性。

(2) 由图 3 可以发现,葡萄糖的消耗与菌体的生长呈现很好的负相关性,可以认为葡萄糖为谷氨酸棒状杆菌 S9114 发酵的唯一限制性基质。

(3) 综合图 3 和式(5)可以发现,谷氨酸的产量与菌体

量有关系,菌体浓度越大,谷氨酸产率越高,因此,提高细胞浓度有助于加快产谷氨酸的速率。

参考文献

- 1 高学金,刘广生,程丽,等. 发酵过程葡萄糖在线检测系统的研制[J]. 分析化学 2012, 40(12): 1945~1949.
- 2 王瑶,张银冰,邓毛程. 流加混合碳源的谷氨酸发酵工艺研究[J]. 食品与机械 2007, 23(4): 30~33.
- 3 陈宏文,金福江,方柏山,等. 发酵过程中细胞浓度在线检测系统[J]. 微生物学通报 2003, 4(30): 39~43.
- 4 邓毛程,吴亚丽,梁世中,等. 高生物素谷氨酸发酵中溶氧水平与生物素用量的研究[J]. 食品与机械 2008, 24(3): 10~13.
- 5 朱思荣,周万里,毕春元,等. C8051F120 单片机串口扩展与通讯设计[J]. 山东科学 2013, 26(1): 69~73.
- 6 刘金玉,史建国,马耀宏,等. 酶电极法测定肌苷发酵液中肌苷含量[J]. 实用医药杂志 2013, 30(9): 822~824.
- 7 白长胜,贺玉明,孙传钦,等. 谷氨酸发酵培养基中磷酸盐替代可行性研究[J]. 中国调味品 2014, 39(1): 60~61.
- 8 史建国,马耀宏,张利群,等. 淀粉糖化过程中还原糖在线检测的研究[J]. 山东科学 2002, 15(4): 28~31.
- 9 毕春元,朱思荣,周万里,等. 一种谷氨酸发酵在线检测系统及采用该系统在线检测的方法,中国: 201310705288.8 [P]. 2013—12—20.
- 10 杨海麟,吕霞付,王龙刚,等. 发酵过程在线检测系统在谷氨酸发酵中的应用研究[J]. 中国调味品 2003(10): 16~20.
- 11 张中义,张勇,孙君社. 植物乳杆菌合成 GLA 发酵动力学研究[J]. 食品与机械 2007, 23(5): 7~10.
- 12 彭金龙,毛健,姬中伟,等. 黄酒发酵动力学研究[J]. 食品与机械 2013, 29(3): 12~15.
- 13 王天娇,唐传红,张劲松,等. 灵芝杂交菌株选育及其菌丝体液态深层发酵动力学[J]. 食品与发酵工业 2014, 40(3): 107~112.
- 14 马雷. 应用 MATLAB 软件构建谷氨酸温度敏感突变株补料分批发酵动力学模型[J]. 天津科技大学学报 2004, 19(1): 36~38.
- 15 代志凯. 基于 SAS 软件拟合微生物发酵动力学模型[J]. 中国科技论文在线 2003(10): 19~20.
- 16 王大慧,王玉磊,卫功元,等. 基于代谢通量分析的 SAM 和 GSH 联产溶氧控制策略[J]. 高校化学工程学报 2013, 27(1): 102~107.
- 17 朱晓媛,胡铁,黎继烈,等. 基于遗传算法的纤维素酶分批发酵动力学研究[J]. 中国食品学报 2014, 14(1): 47~51.