

研究论文

基于动力学模型的丙酮酸分批发酵温度控制策略

许庆龙, 刘立明, 史仲平, 堵国成, 陈 坚
(江南大学工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122)

摘要: 在对不同温度下 *Torulopsis glabrata* 分批发酵生产丙酮酸过程进行详尽分析的基础上, 建立丙酮酸分批发酵动力学模型, 并分析了温度与动力学参数之间的函数关系, 提出 *T. glabrata* 高产量、高产率和高强度发酵生产丙酮酸的温度控制轨迹: 在发酵初始阶段 (0~8 h) 控制发酵温度为 34℃ 以维持较高的菌体生长速率和丙酮酸合成速率; 发酵中期 (8~42 h), 逐步将发酵温度降到 27℃ 以获取代谢流强化和细胞衰亡之间的最佳平衡; 然后维持 27℃ 至发酵结束以提高细胞后续产酸能力。采用这一最佳温度控制轨迹, 丙酮酸产量 (89.4 g · L⁻¹)、对葡萄糖产率 (0.76 g · g⁻¹) 和生产强度 (1.32 g · L⁻¹ · h⁻¹) 比 30℃ 恒温发酵分别提高了 25.7%、16.9% 和 48.3%。

关键词: 光滑球拟酵母; 动力学模型; 温度; 控制策略

中图分类号: TQ 921

文献标识码: A

文章编号: 0438-1157 (2008) 08-2065-06

Maximized pyruvate production through temperature shifting strategy based on kinetics model

XU Qinglong, LIU Liming, SHI Zhongping, DU Guocheng, CHEN Jian

(Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China)

Abstract: In the batch fermentation of pyruvate, temperature is one of the most important environmental factors that affect pyruvate productivity. The effect of temperature, varying from 26℃ to 34℃, on production of pyruvate in a 7 L stirred fermenter by *T. glabrata* CCTCC M202019 was investigated. A modified Logistic equation and Luedeking-Piret equation were used to estimate kinetics of cell growth and pyruvate production. The effect of temperature on the estimated kinetic parameters was further studied by regression analysis. Based on kinetic parameters analysis, a temperature-shifting strategy was proposed, in which, at 0—8 h, culturing was performed at 34℃ to obtain a high specific cell growth rate, and at 8—42 h, the temperature was decreased step by step from 34℃ to 27℃ to keep a high pyruvate production rate. After 42 h, the temperature was maintained at 27℃ to weaken inhibition of pyruvate and offer constant production capacity of pyruvate in the anaphase of fermentation. A high concentration (89.4 g · L⁻¹), yield (0.76 g · g⁻¹) and productivity (1.32 g · L⁻¹ · h⁻¹) of pyruvate were achieved by applying this strategy, which were 25.7%, 16.9% and 48.3% higher than batch fermentation at a constant temperature 30℃, respectively.

Key words: *Torulopsis glabrata*; kinetics model; temperature; shifting strategy

2007-12-02 收稿初稿, 2008-01-07 收到修改稿。

联系人: 陈坚, 刘立明。第一作者: 许庆龙 (1983—), 男, 硕士研究生。

基金项目: 国家杰出青年基金项目 (20625619); 国家重点基础研究发展计划项目 (2007CB71403); 国家自然科学基金项目 (30670066, 20706025); 国家高技术研究发展计划项目 (2006AA02Z201)。

Received date: 2007-12-02.

Corresponding author: Prof. CHEN Jian, LIU Liming.
E-mail: jchen@jiangnan.edu.cn, mingll@jiangnan.edu.cn

Foundation item: supported by the National Outstanding Youth Foundation of China (20625619), the National Basic Research Program of China (2007CB71403), the National Natural Science Foundation of China (30670066, 20706025) and the High-tech Research and Development Program of China (2006AA02Z201).

引 言

丙酮酸作为一种重要的有机酸，广泛应用于化工、制药和农用化学品等领域^[1-3]。在前期研究中，以获得丙酮酸高产率、高产量和高生产强度的相对统一为目标，对影响多重维生素营养缺陷型菌株 *Torulopsis glabrata* 过量合成丙酮酸的关键因素进行了系统研究^[4-8]。发酵温度作为一个重要的环境因素^[9-10]，通过影响 *T. glabrata* 的能量代谢从而影响丙酮酸积累的效率。尽管王翠华等^[11]系统研究了温度对丙酮酸发酵的影响，但并未提出相应的控温策略。实际上，为进一步提高 *T. glabrata* 积累丙酮酸的效率，需在对丙酮酸发酵过程中动力学模型及温度与这些模型参数的关系进行详尽分析的基础上，提出最优的温度控制模式，以实现丙酮酸的过量高效积累。

本研究在建立不同发酵温度下 *T. glabrata* 分批发酵丙酮酸动力学模型的基础上，对温度与模型参数的内在联系进行模拟、计算、分析，得出丙酮酸分批发酵最佳温度控制轨迹，从而实现丙酮酸高效生产。

1 材料和方法

1.1 菌株

光滑球拟酵母 *T. glabrata* CCTCC M202019, NA、Bio、B₁、B₆ 4 种维生素营养缺陷型，且丙酮酸脱羧酶活性组成型降低，为本研究室选育。

1.2 培养基

斜面 and 种子培养基 (g · L⁻¹)：葡萄糖 30，蛋白胨 10，KH₂PO₄ 1，MgSO₄ · 7H₂O 1，琼脂 20 (斜面添加)；pH 5.0。

发酵培养基：参见文献 [3]。

1.3 培养方法和分析方法

参见文献 [3]。

1.4 数据处理

微分方程组的求解采用四阶龙格库塔法，模型参数求解采用单纯形法。

2 结果与讨论

2.1 丙酮酸发酵过程动力学模型的构建

高浓度丙酮酸 (在实际发酵过程为丙酮酸钠) 对 *T. glabrata* 生长具有抑制作用^[12]。30 °C 时丙酮酸 (钠盐形式) 对细胞生长的影响如图 1 所示。

随着发酵培养基中丙酮酸浓度的增加，最终细胞浓度逐渐降低，当丙酮酸达到 100 g · L⁻¹ 时，菌体生长完全受到抑制。结合 Logistic 方程得到式 (1) 描述 *T. glabrata* CCTCC M202019 生长过程^[13]

$$\frac{dX}{dt} = \mu_m X \left(1 - \frac{X}{X_m}\right) \left(1 - \frac{P}{P_m}\right) \quad (1)$$

式中 μ_m 为最大比生长速率，h⁻¹； X_m 为最大细胞干重，g · L⁻¹； P_m 为产物抑制常数，g · L⁻¹。

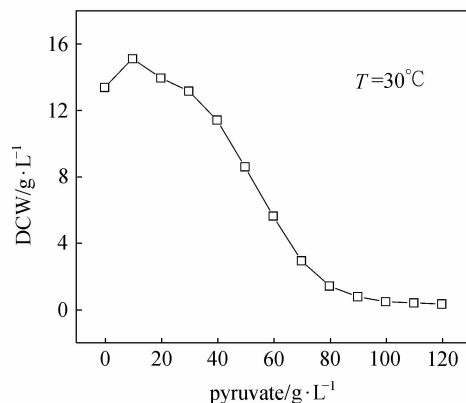


图 1 丙酮酸 (钠) 对细胞生长的影响

Fig. 1 Effect of pyruvate on cell growth at 30 °C

丙酮酸的合成与菌体生长为部分偶联型，用式 (2) 描述^[14]

$$\frac{dP}{dt} = Y_{PX} \frac{dX}{dt} + m_P X \quad (2)$$

式中 Y_{PX} 为与细胞生长相关的产物合成系数，g · g⁻¹； m_P 为与菌体浓度相关的产物合成系数，h⁻¹。

基质葡萄糖的消耗用式 (3) 描述^[14]

$$-\frac{dS}{dt} = Y_X \frac{dX}{dt} + m_X X \quad (3)$$

式中 Y_X 为与细胞生长相关的基质消耗系数，g · g⁻¹； m_X 为与菌体浓度相关的基质消耗系数，h⁻¹。

基于上述描述，共有 7 个参数待估。 X_m 、 P_m 、 Y_{PX} 、 Y_X 、 m_X 和 m_P 与温度之间关系采用多项式描述^[15]； μ_m 与温度之间关系用多项式 (4) 描述^[16]

$$\mu_m = [B(T - T_{min})]^2 \quad (4)$$

式中 B 为经验常数，h^{0.5} · K⁻¹； T_{min} 为细胞生长的最低理论温度，°C。

2.2 不同温度下细胞生长、葡萄糖消耗及丙酮酸合成动力学模型的求解及验证

采用不同温度下 (26、28、30、32 和 34 °C) 丙酮酸分批发酵结果结合模型拟合计算，得到各温度下分批发酵动力学模型参数 (μ_m 、 X_m 、 P_m 、 Y_{PX} 、

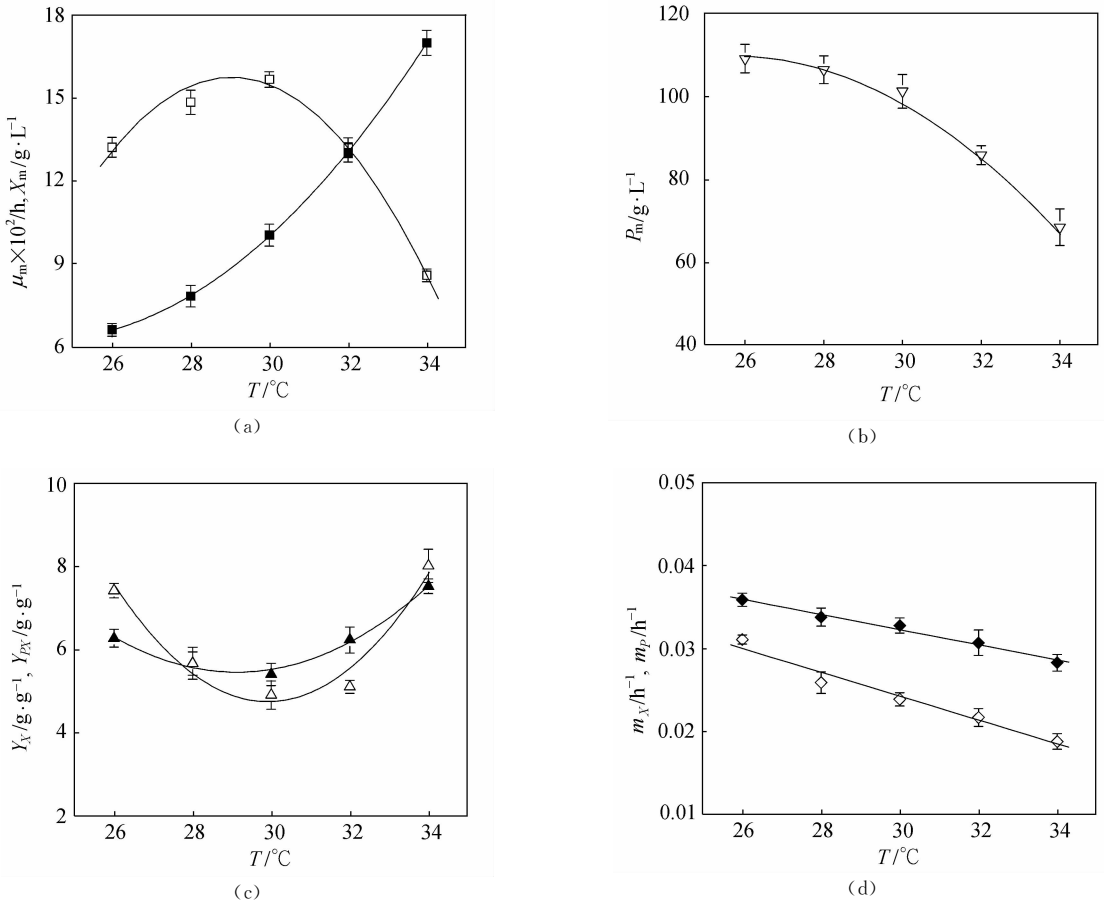


图 2 模型参数与温度之间的关系

Fig. 2 Relationship between model parameters and temperature

■ μ_m; □ X_m; ▽ P_m; ▲ Y_{PX}; △ Y_X; ◆ m_X; ◇ m_P; — parameters simulated from equations in Table 1

表 1 温度与动力学参数关系及模型表示

Table 1 Results of parameters estimated from models

Parameter	Equation	R ²
μ _m	μ _m = [0.02(T - 14.09)] ²	0.992
X _m	X _m = -0.35T ² + 20.87T - 292.29	0.998
P _m	P _m = -0.71T ² + 37.33T - 383.49	0.997
Y _{PX}	Y _{PX} = 0.18T ² - 11.02T + 169.64	0.957
Y _X	Y _X = 0.09T ² - 5.09T + 79.51	0.989
m _X	m _X = -0.0009T + 0.060	0.984
m _P	m _P = -0.0014T + 0.068	0.965

Y_X、m_X和 m_P)，其与温度的关系如图 2 和表 1 所示。其中温度与最大比生长速率 μ_m之间的关系由 Ratkowsky 模型 [式 (4)] 描述，其他模型参数与温度之间的关系采用多项式描述。

将表 1 中关系式代入式 (1) ~ 式 (3)，得到依赖于温度的 *T. glabrata* CCTCC M202019 分批

发酵生产丙酮酸的动力学模型，如式 (5) ~ 式 (7) 所示

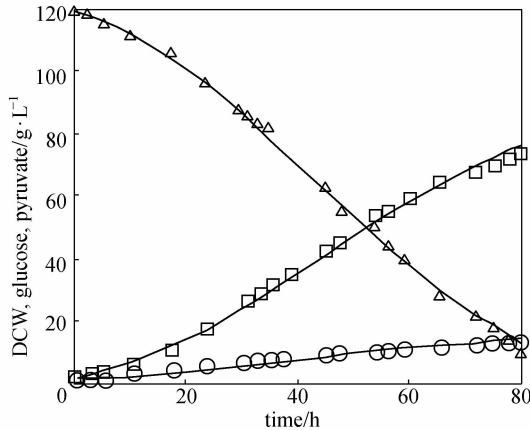
$$\frac{dX}{dt} = [0.02(T - 14.09)]^2 \times X \left(1 - \frac{X}{-0.35T^2 + 20.87T - 292.29}\right) \times \left(1 - \frac{P}{-0.71T^2 + 37.33T - 383.49}\right) \quad (5)$$

$$\frac{dP}{dt} = (0.18T^2 - 11.02T + 169.64) \frac{dX}{dt} + (-0.0014T + 0.068)X \quad (6)$$

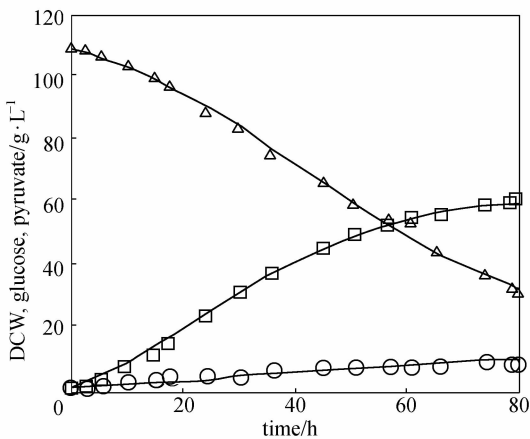
$$-\frac{dS}{dt} = (0.09T^2 - 5.09T + 79.51) \frac{dX}{dt} + (-0.0009T + 0.060)X \quad (7)$$

为了验证式 (5) ~ 式 (7) 在 26 ~ 34°C 范围内的适用性，分别取 T = 29°C 及 33°C，将式 (5) ~ 式 (7) 积分得到 29°C 及 33°C 下丙酮酸发酵

过程曲线，然后与实际实验结果进行比较（图 3）。发现模型计算结果与实际丙酮酸分批发酵过程具有一致性（29℃下最大相对误差为 7.8%，平均相对误差为 4.3%；33℃下最大相对误差为 8.6%，平均相对误差为 3.2%），表明所拟合的模型较好地描述了 26~34℃ 范围内丙酮酸分批发酵过程。



(a) 29℃



(b) 33℃

图 3 *T. glabrata* CCTCC M202019 分批发酵生产丙酮酸动力学模型的验证

Fig. 3 Comparison of results predicted by kinetic model with experimental results

△ glucose; □ pyruvate; ○ DCW; — model value

2.3 温度对丙酮酸发酵动力学参数影响分析

对所拟合的动力学模型及相关参数分析发现：

(1) 在所研究的温度范围内， μ_m 随温度升高而增大 [图 2 (a)]，由式 (1) 可得：发酵起始， $X \ll X_m$ ， $P \ll P_m$ ，因而

$$1 - \frac{X}{X_m} \approx 1, 1 - \frac{P}{P_m} \approx 1,$$

$$\begin{cases} \frac{dX}{dt} = \mu_m X \left(1 - \frac{X}{X_m}\right) \left(1 - \frac{P}{P_m}\right) \approx \mu_m X = \\ \quad [0.02(T - 14.09)]^2 X \\ \frac{dP}{dt} = Y_{PX} \frac{dX}{dt} + m_P X \approx Y_{PX} \mu_m X + m_P X = \\ \quad (Y_{PX} \mu_m + m_P) X = \pi_m X \end{cases}$$

所考察温度条件下 (26~34℃) 初始菌体量 X 相同，因而细胞生长速率正比于 μ_m ，即细胞生长延滞期随着温度的升高而不断缩短。同理，可以通过表 1 计算得到 π_m 随温度升高而增大，即产酸延滞期随着温度的升高而不断缩短。(2) 当温度低于 30℃， X_m 随温度的增加而增加；当温度超过 30℃， X_m 随温度的增加而降低。发酵温度为 30℃ 时的 X_m 较 26℃ 和 34℃ 时高 36.9% 和 48.2% [图 2 (a)]；计算得到 *T. glabrata* CCTCC M202019 的理论最低生长温度为 14.09℃。(3) P_m 随温度的增加而逐步降低 [图 2 (b)]，表明较高的温度下丙酮酸对菌体生长的抑制作用较强，当丙酮酸积累至较高浓度时，应降低发酵温度以减轻其抑制作用。(4) Y_X 和 Y_{PX} 随温度的增加先降低后升高 [图 2 (c)]，表明合适的温度有利于丙酮酸的合成。(5) m_X 和 m_P 随温度升高呈线性递减 [图 2 (d)]，表明较高的温度导致发酵后期单位细胞消耗葡萄糖和生产丙酮酸的能力逐渐下降。

2.4 丙酮酸分批发酵过程中温度控制策略

基于以上分析并结合式 (5) ~ 式 (7) 和表 1，取最优控制的目标函数为丙酮酸浓度 P 最大。其他数值条件为：初始菌体浓度 $X_0 = 1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ，初始丙酮酸浓度 $P_0 = 0$ ，初始葡萄糖浓度 $S_0 = 120 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ，残余葡萄糖浓度 $S_{\text{end}} \leq 5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ，发酵时间 $t \leq 80 \text{ h}$ ，发酵温度 $26^\circ\text{C} \leq T \leq 34^\circ\text{C}$ (且取整)，积分时间步长为 1 h。计算得到丙酮酸分批发酵温度控制轨迹如图 4 所示。发现：(1) 在发酵前期 (0~8 h) 适当提高发酵温度，可缩短细胞生长延滞期，提高细胞生长速度和丙酮酸积累速度；(2) 发酵中期 (8~42 h) 逐步降低发酵温度，可继续维持较高的细胞生长速率和丙酮酸合成速率；(3) 发酵后期 (42 h 以后) 将温度维持在 27℃，可以提高 P_m 、 m_X 和 m_P ，进而减轻高浓度丙酮酸对细胞生长的抑制作用并提高细胞催化产酸能力。

采用图 4 所示的温度控制策略对丙酮酸分批发酵过程进行控制，与 30℃ 恒定温度分批发酵结果进行比较 (图 5)，发现：在发酵初始时维持较高

的发酵温度，细胞不经过延滞期而进入快速生长期，调控温度后丙酮酸一直维持较高的增长速度至发酵结束，整个过程葡萄糖和氯化铵的消耗速率明

显加快，具体结果列于表 2。最终发酵周期缩短 12 h，丙酮酸产量 ($89.4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)、对葡萄糖产率 ($0.76 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$) 和生产强度 ($1.32 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) 则分别提高了 25.7%、16.9% 和 48.3%。

3 结 论

T. glabrata CCTCC M202019 分批发酵生产丙酮酸过程中，较高的发酵温度加速 *T. glabrata* 积累丙酮酸；而较低的温度则可减轻高浓度丙酮酸对细胞生长和产酸的抑制，提高细胞后续产酸能力。运用考虑产物抑制的 Logistic 方程等对发酵过程进行模拟，得到不同温度下发酵动力学参数，然后运用不同的方程对动力学参数进行拟合，进而得到丙酮酸分批发酵的最佳温度控制策略。采用这一策略，实现了丙酮酸发酵生产的高产量、高产率和高生产强度的统一。

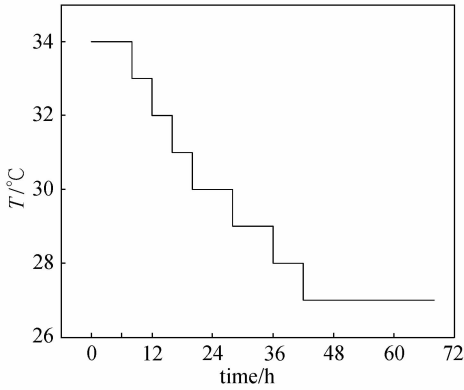


图 4 基于模型的丙酮酸发酵温度控制轨迹
Fig. 4 A proposed temperature control profile to enhance pyruvate production

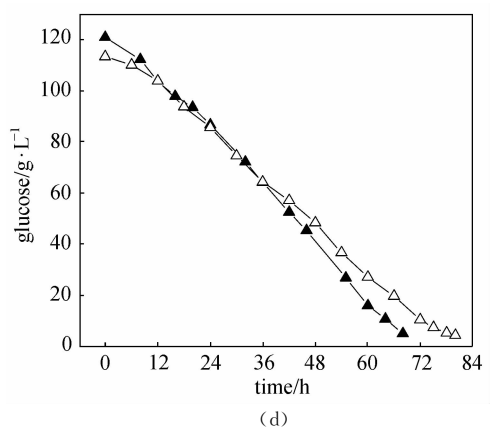
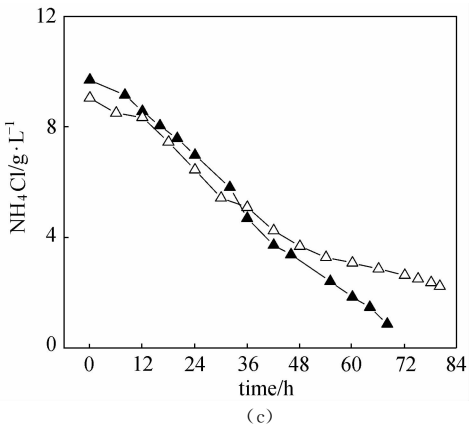
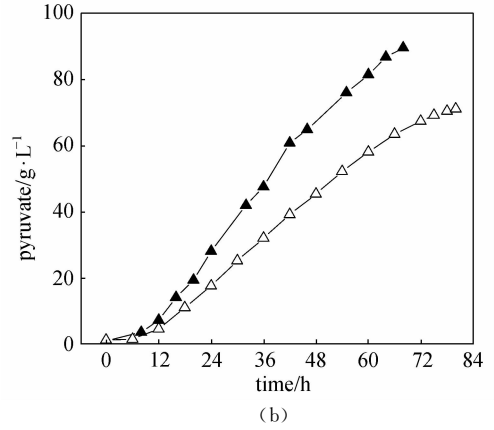
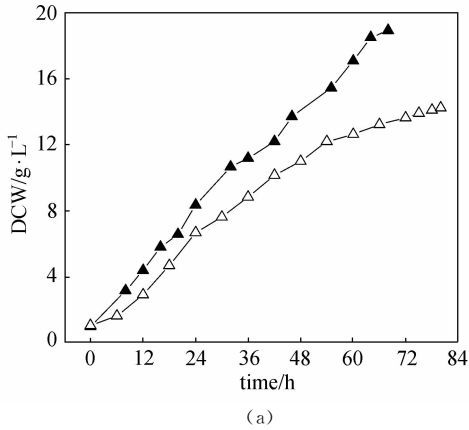


图 5 最优温度控制条件 (如图 4) 下和恒定 30°C 下的丙酮酸发酵过程比较

Fig. 5 Comparison of batch fermentation with optimal temperature control strategy (as shown in Fig. 4) and with constant temperature 30°C

▲ optimal temperature control strategy; △ 30°C

表 2 不同温度下丙酮酸分批发酵过程参数比较

Table 2 Comparison of parameters in batch pyruvate fermentation under different temperatures

Parameter	Temperature/°C					
	34	32	30	28	26	T shift
initial glucose concentration/g · L ⁻¹	109.1	116.3	113.3	114.9	111.3	120.9
residual glucose concentration/g · L ⁻¹	30.4	26.5	4.4	12.1	22.5	1.6
culture time/h	80	80	80	80	80	68
maximum dry cell weight/g · L ⁻¹	8.8	12.0	14.3	13.5	10.2	18.9
maximum pyruvate concentration/g · L ⁻¹	61.9	64.9	71.2	72.8	67.8	89.4
average glucose consumption rate/g · L ⁻¹ · h ⁻¹	0.98	1.12	1.36	1.29	1.11	1.6
average specific glucose consumption rate/h ⁻¹	0.11	0.093	0.095	0.096	0.11	0.085
average specific growth rate/h ⁻¹	0.026	0.036	0.030	0.033	0.029	0.052
average specific pyruvate production rate/h ⁻¹	0.092	0.068	0.062	0.070	0.083	0.070
cell yield on glucose/g · g ⁻¹	0.099	0.13	0.13	0.13	0.11	0.15
pyruvate yield on glucose/g · g ⁻¹	0.78	0.72	0.65	0.74	0.75	0.76
cell productivity/g · L ⁻¹ · h ⁻¹	0.098	0.14	0.18	0.17	0.13	0.28
pyruvate productivity/g · L ⁻¹ · h ⁻¹	0.77	0.81	0.89	0.95	0.85	1.32

References

- [1] Causey T B, Shanmugam K T, Yomano L P, *et al.* Engineering *Escherichia coli* for efficient conversion of glucose to pyruvate. *PNAS.*, 2004, **101**: 2235-2240
- [2] Wang Q H, He P, Lu D J, *et al.* Metabolic engineering of *Torulopsis glabrata* for improved pyruvate production. *Enzyme. Microb. Technol.*, 2005, **36**: 832-839
- [3] Liu L M, Li Y, Li H Z, *et al.* Manipulating the pyruvate dehydrogenase bypass of a multi-vitamin auxotrophic yeast *Torulopsis glabrata* enhanced pyruvate production. *Lett. Appl. Microbiol.*, 2004, **39**: 199-206
- [4] Li Y, Chen J, Lun S Y, *et al.* Efficient pyruvate production by a multi-vitamin auxotroph of *Torulopsis glabrata*; key role and optimization of vitamin levels. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2001, **55**: 680-685
- [5] Li Y, Hugenholtz J, Chen J, *et al.* Enhancement of pyruvate production by *Torulopsis glabrata* using a two-stage oxygen supply control strategy. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2002, **60**: 101-106
- [6] Li Y, Chen J, Liang D F, *et al.* Effect of nitrogen source and nitrogen concentration on the production of pyruvate by *Torulopsis glabrata*. *J. Biotechnol.*, 2000, **81**: 27-34
- [7] Liu L M, Li Y, Chen J, *et al.* Increasing glycolytic flux in *Torulopsis glabrata* by redirecting ATP production from oxidative phosphorylation to substrate-level phosphorylation. *J. Appl. Microbiol.*, 2006, **100** (5): 1043-1053
- [8] Liu L M, Li Y, Chen J, *et al.* Redistribution of carbon flux in *Torulopsis glabrata* by altering vitamin and calcium level. *Metab. Eng.*, 2006, **9** (1): 21-29
- [9] Wei G Y, Li Y, Chen J, *et al.* Application of a two-stage temperature control strategy for enhanced glutathione production in the batch fermentation by *Candida utilis*. *Biotechnol. Lett.*, 2003, **25** (11): 887-890
- [10] Fonchy E, Morin A, Rodrigue N, *et al.* Effect of growth temperature on hydrolytic and esterifying activities from *Pseudomonas fragi* CRDA 037 grown on whey. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1999, **65**: 3114-3120
- [11] Wang Cuihua (王翠华), Li Youyuan (李友元), Chen Changhua (陈长华), *et al.* Effects of temperature on the kinetics and level of energy charge and oxidation reduction state in pyruvate biosynthesis. *Chinese Journal of Biotechnology (生物工程学报)*, 2006, **22** (2): 316-321
- [12] Liu L M, Xu Q L, Chen J, *et al.* Enhancement of pyruvate production by osmotic-tolerant mutant of *Torulopsis glabrata*. *Biotechnol. Bioeng.*, 2007, **97** (4): 825-832
- [13] Zeng A P. A kinetic model for product formation of microbial and mammalian cells. *Biotechnol. Bioeng.*, 1995, **46**: 314-324
- [14] Gaden E L. Fermentation kinetics and productivity. *J. Biochem. Microbiol. Technol.*, 1959, **1** (4): 413-429
- [15] Zwietering M H, Koos J T, Hasenack B E, *et al.* Modeling of bacterial growth as a function of temperature. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1991, **57** (4): 1094-1101
- [16] Ratkowsky D A, Olley J, McMeekin T A. Relationship between temperature and growth rate of bacterial culture. *J. Bacteriol.*, 1982, **149**: 1-5