

酿酒酵母工程菌 分批发酵产 UMP 动力学模型

张凯丽¹, 郑晗青¹, 牛启启¹, 邓晓敏¹, 杨雪莲^{1,2,*}

(1.北京工商大学食品学院, 北京 100048;

2.北京工商大学北京市食品添加剂工程技术研究中心, 北京 100048)

摘要:对酿酒酵母工程菌产 UMP 的分批发酵动力学进行了研究。通过对 Logistic 方程、Leudeking-Piret 方程和类 Luedeking-Piret 方程进行参数估计和非线性数据拟合, 分别得到发酵过程中菌体干重、UMP 产量、残糖含量动力学模型及模型参数。对拟合曲线进行分析, 结果表明模型值与实验值拟合性良好, 线性拟合度大于 98%, 所建立模型能较好的反映 UMP 的分批发酵过程。

关键词:尿嘧啶核苷酸, 线性拟合, 动力学

Kinetic models for uridine 5'-monophosphate batch fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*

ZHANG Kai-li¹, ZHENG Han-qing¹, NIU Qi-qi¹, DENG Xiao-min¹, YANG Xue-lian^{1,2,*}

(1.School of Food Science and Technology, Beijing Technology & Business University, Beijing 100048, China;

2.Beijing Engineering and Technology Research Center of Food Additives,
Beijing Technology & Business University, Beijing 100048, China)

Abstract: The dynamic models for uridine 5'-monophosphate batch fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* recombinant strain was studied. The kinetic models for dry cell weight, the content of uridine 5'-monophosphate and residual sugar were proposed with the Logistic equation, Leudeking-Piret equation and class Luedeking-Piret equation though the parameters estimation and nonlinear least-squares fitting method. The results showed that the experimental values and the fitted values fit well by analyze fitted curve, the fit of the linear over 98%. The models can reflect the batch fermentation of uridine 5'-monophosphate well.

Key words: uridine 5'-monophosphate; linear fit; kinetics

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2015)09-0158-04

doi:10.13386/j.issn1002-0306.2015.09.026

尿嘧啶核苷酸(Uridine 5'-monophosphate, UMP)是一种重要的食品添加剂和药物中间体,是嘧啶核苷酸生物合成中处于节点位置的核苷酸^[1],广泛应用于寡聚糖合成和抗癌药物生产中,市场需求很大,蕴含有良好的商业潜力^[2-3]。目前,利用微生物转化乳清酸生成 UMP 逐渐成为研究的热点,因其目的产物明确、反应体系简单,成为未来工业化生产核苷酸的理想途径。已有报道的用于生物转化的菌株主要为产氨短杆菌^[4-8]。钱秀萍^[6]等用离子束诱变产氨短杆菌 R248 后尿苷酸产量约为 900mg/L。Wang Xing^[7]等对产氨短杆菌 ATCC 6872 催化合成 UMP 进行响应面优化,UMP 产量达 38.5mmol/L。Tatsuro Fujio^[8]

等人将产氨短杆菌 KY13505 的细胞经表面活性剂处理后 UMP 可达 28.6g/L。部分学者对酿酒酵母产 UMP 也进行了研究,雷高新^[9]等利用全细胞催化法发酵酿酒酵母,其 UMP 产量为 7mmol/L。考虑到酿酒酵母具备良好的基因操作背景、生物兼容性及安全性,采用实验室前期构建的能够过量表达 UMP 从头合成途径中的两个关键酶——乳清酸磷酸核糖转移酶(OPRTase)和乳清苷酸脱羧酶(ODCase)的酿酒酵母工程菌 BJX12-URA5,进行 UMP 分批发酵动力学研究,确定微生物生长速率、发酵产物合成速率、底物消耗速率之间的动态定量关系,建立相应发酵动力学数学模型,为菌种高产 UMP 提供参考和

收稿日期:2014-07-14

作者简介:张凯丽(1990-),女,硕士研究生,主要从事食品与微生物发酵工程。

*通讯作者:杨雪莲(1980-),女,博士,讲师,主要从事食品生物技术研究。

基金项目:国家自然科学基金项目(31301410);科研基地建设—科技创新平台—国家自科基金配套(北京市级,19005418040);北京市级大学生科学研究与创业行动计划(SJ201402065)。

帮助。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

酿酒酵母工程菌 BJX12-URA5 由实验室保藏; UMP 为色谱纯 上海科瑞生物公司; 种子培养基 酵母粉 10g/L、蛋白胨 20g/L、葡萄糖 20g/L; 发酵培养基 葡萄糖 40g/L、酵母粉 2g/L、蛋白胨 4g/L、乳清酸 1g/L、 NaH_2PO_4 4g/L、 MgSO_4 1g/L、甲苯 0.2%, 葡萄糖单独灭菌, 121℃ 灭菌 20min。

Waters2695 型四元高效液相色谱仪、SunFire™ C_{18} (5 μm , 4.6 × 150mm) 色谱柱 美国 Waters 公司; CR-22G 离心机 日本日立公司; GBJT 三联体发酵罐 镇江东方生物工程设备技术有限责任公司。

1.2 实验方法

1.2.1 种子培养 将-80℃ 冰箱中冻存的含 30% 甘油的 BJX12-URA5 活化后, 转入种子培养基中, 30℃、200r/min 培养 24h。

1.2.2 分批发酵培养 在 2.5L 发酵罐中加入 1L 新鲜发酵培养基, 接种量 10%、发酵温度 30℃、通气量 $1\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$ 、搅拌转速 300r/min, 流加 NaOH 以控制 pH 维持在 5.0。发酵培养一定时间后下罐。发酵液 10000r/min 离心 20min, 分别收集菌体及发酵上清液, 菌体用于干重检测, 上清液于-20℃ 冻存备用。

1.2.3 菌体干重检测 将 2mL 发酵液离心所得菌体于 60℃ 烘箱中烘干 12h, 称量其干重。

1.2.4 发酵液中残糖含量的测定 按照 DNS 法测定残糖含量^[10]。

1.2.5 HPLC 法测定 UMP 含量 色谱柱为 SepaxHP - C_{18} (4.6 × 250 mm), 流动相为磷酸:水 = 3:500 (三乙胺调 pH 为 6.6), 流速为 0.8mL/min, 用紫外检测器在 261nm 波长下检测。按照外标法计算发酵液中 UMP 含量。

2 结果与讨论

2.1 BJX12-URA5 分批发酵产 UMP 的发酵过程

分批发酵进行三次平行实验, 其菌体干重、残糖含量、UMP 产量随时间的变化曲线如图 1 所示。由图可知, 0~40h, 菌体干重逐渐增大, 葡萄糖大量消耗, UMP 产量逐渐升高。继而进入稳定期, 菌体干重基本恒定, 残糖含量消耗速率减慢, UMP 产量得到快速积累。由于 UMP 是组成酵母 RNA 的一种核苷酸, 关系到遗传信息的传递和蛋白质合成等生理功能, 对数期酵母大量生长繁殖时, UMP 大部分被利用; 稳定期代谢产物开始积累, 由于过表达 OPRtase 和 ODCase, 使 UMP 得以积累。因此, UMP 产量的积累和菌体生长的关系为部分生长相关型^[9]。

2.2 发酵动力学模型

2.2.1 菌体生长动力学模型 如图 1 所示, BJX12-URA5 的生长曲线接近于 S 型曲线, Logistic 模型也是一个典型的 S 型曲线, 采用 Logistic 方程能较好的描述菌体的生长规律, 同时反映分批发酵过程中菌体浓度的增大对菌体自身的抑制作用^[11-13]。

Logistic 生长模型方程为:

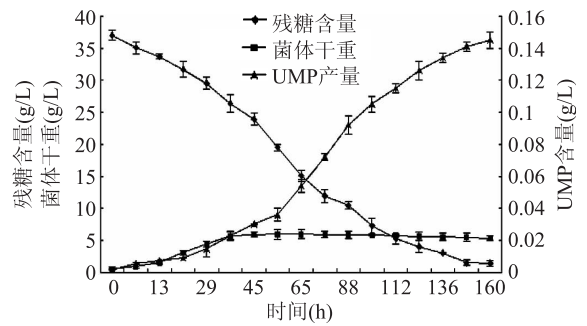


图1 酿酒酵母分批发酵曲线

Fig.1 Batch fermentation process of *Saccharomyces cerevisiae*

$$\frac{dx}{dt} = \mu_m \left(1 - \frac{x}{x_m}\right) x \quad \text{式(1)}$$

式中: x 为菌体浓度 (g/L); x_m 为最大菌体浓度 (g/L); μ_m 为最大比生长速率 (h^{-1}); t 为发酵时间。

当 $t=0$ 时, $x=x_0$, x_0 为初始菌体浓度, 对式(1)积分得:

$$x = \frac{x_0 x_m \exp(\mu_m t)}{x_m - x_0 + x_0 \exp(\mu_m t)} \quad \text{式(2)}$$

2.2.2 UMP 生成动力学模型 Leudekin-Piret 方程^[14]既能反映伴随菌体细胞生长的产物生成速率, 又能反映出独立于菌体细胞生长之外, 细胞催化底物形成产物的速率^[15-16]。Luedekin-Piret 方程如下:

$$\frac{dp}{dt} = \alpha \frac{dx}{dt} + \beta x \quad \text{式(3)}$$

式中: α, β 为模型参数。

根据代谢产物生成和菌体生长的关系, 产物生成分为偶联型、非偶联型和部分偶联型三类。当 $\alpha \neq 0, \beta = 0$ 时, 产物生成与细胞生长为生长偶联型; $\alpha = 0, \beta \neq 0$, 为非生长偶联型; $\alpha \neq 0, \beta \neq 0$ 为部分生长偶联型^[13, 15, 17-18]。通过对图 1 分析可知, 菌体生长阶段有少量 UMP 生成, 大部分则是在菌体生长稳定期生成, 所以, UMP 的生成与菌体生长为部分生长偶联型^[11]。所以 $\alpha \neq 0, \beta \neq 0$, 将式(1)代入式(3)可得

$$\frac{dp}{dt} = \alpha \mu_m \left(1 - \frac{x}{x_m}\right) x + \beta x \quad \text{式(4)}$$

对式(4)积分得

$$P = \frac{\alpha x_0 x_m \exp(\mu_m t)}{x_m - x_0 + x_0 \exp(\mu_m t)} + \frac{\beta x_m \ln\left(\frac{x_m - x_0 + x_0 \exp(\mu_m t)}{x_m}\right)}{\mu_m} \quad \text{式(5)}$$

2.2.3 葡萄糖消耗动力学模型 根据物料平衡原理, UMP 分批发酵过程中, 葡萄糖作为碳源和能源物质用于菌体细胞生长, 维持菌体新陈代谢以及合成代谢产物^[12-13]。底物消耗动力学可采用类 Luedekin-Piret 方程:

$$-\frac{ds}{dt} = \frac{dx}{Y_{x/s} dt} + mx + \frac{dp}{Y_{p/s} dt} \quad \text{式(6)}$$

式中: s 为基质浓度 (g/L); p 为产物浓度 (g/L); m 为细胞的维持系数 (s^{-1}); $Y_{x/s}$ 为菌体对底物的得率常数; $Y_{p/s}$ 为产物积累得率常数。

微生物发酵过程中, 维持细胞正常生理活动需

表1 发酵动力学模型参数

Table 1 Parameter values in kinetic models of fermentation

参数	x_0 (g/L)	x_m (g/L)	μ_m (1/h)	s_0 (g/L)	k_1	k_2	α	β
拟合值	0.3610	5.793	0.1387	35.29	0.2359	1.403	0.0148	0.0001

要消耗的底物所占的比例相对较少,大部分底物用于代谢产物的积累,因而可以被忽略^[18-19],即 $m = 0$ 。

令 $k_1 = \frac{1}{Y_{x/s}}$; $k_2 = \frac{1}{Y_{p/s}}$, 将式(1)和式(4)带入式

(6)后得:

$$-\frac{ds}{dt} = \left[k_1 \mu_m \left(1 - \frac{x}{x_m} \right) \right] + k_2 \alpha \mu_m \left(1 - \frac{x}{x_m} \right) x \quad \text{式(7)}$$

将式(7)积分得:

$$s = s_0 - (k_1 + \alpha k_2) \left\{ \frac{\exp(\mu_m t) - 1}{1 - \frac{x_0}{x_m} [1 - \exp(\mu_m t)]} \right\} \quad \text{式(8)}$$

2.3 发酵动力学模型求解

上述发酵动力学模型中包含了8个动力学参数,运用 Origin 8 软件进行自定义函数非线性拟合,根据发酵数据和相关文献获得参数的初估值,最终拟合得到误差平方和最小的参数值^[12],见表1所示。

据表1的发酵动力学模型参数得 BJX12-URA5 发酵产 UMP 动力学模型:

$$\text{菌体生长动力学模型: } \frac{dx}{dt} = 0.1387 \left(1 - \frac{x}{5.793} \right) x$$

$$\text{UMP 生成动力学模型: } \frac{dp}{dt} = 0.0148 \frac{dx}{dt} + 0.0001 x$$

$$\text{葡萄糖消耗动力学模型: } -\frac{ds}{dt} = 0.2359 \frac{dx}{dt} +$$

$$1.403 \frac{dp}{dt}$$

2.4 拟合曲线分析

根据动力学模型,应用 Origin 8 软件得到 UMP 分批发酵动力学模型拟合曲线,并绘制 95% 置信区间和 95% 预测区间,结果如图 2~图 4 所示。菌体干重、UMP 产量以及残糖含量的实测值和预测值比较如表 2 所示。

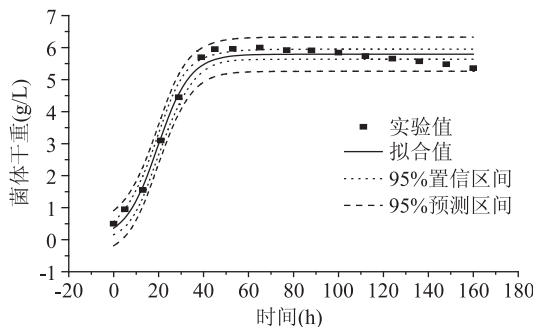


图2 菌体生长动力学模型拟合曲线(X-t)

Fig.2 Cell growth kinetics model fitting curve

菌体生长、残糖含量和 UMP 产量 3 条曲线拟合度 R^2 分别为 0.9844、0.9923、0.9942。结合拟合曲线可知方程拟合程度较好,并且图中所有的实验测定值均在 95% 预测区间内,大部分值处于 95% 置信区间内,说明实验结果可信度高,该动力学模型基本可

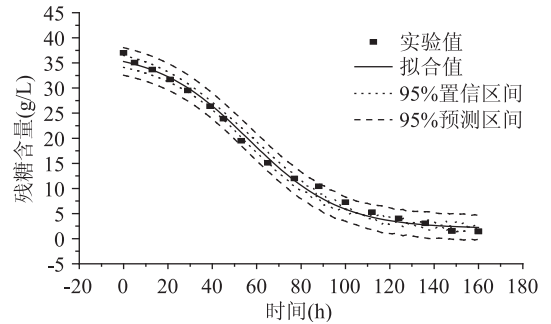


图3 残糖消耗动力学模型拟合曲线(S-t)

Fig.3 Glucose consumption kinetic model fitting curve

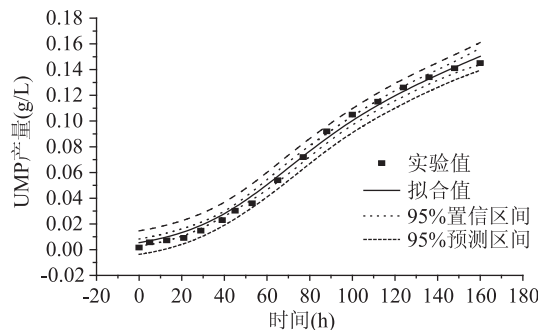


图4 UMP 生成动力学模型拟合曲线(P-t)

Fig.4 UMP generate kinetic model fitting curve

以反映 UMP 分批发酵的过程。由表 2 可知,菌体干重在 5h 前相对误差 δ 较大,大于 20%,13h 后的实验数据拟合较好。原因可能是菌体接种到发酵培养基后进入迟滞期,迟滞期生物量较小,容易产生测量误差^[20-22]。发酵前期,残糖含量 δ 较小,88h 后由于次级代谢产物积累,残糖含量降低,测量误差增大, δ 值较大。UMP 产量在发酵 29h 内 δ 均高于 20%,这与 UMP 初期合成量过少,容易产生测量误差有关。30h 后 δ 较小,拟合良好。总体来看,分批发酵过程中三条曲线均拟合良好,可以较好地反映酵母的生长规律、葡萄糖的消耗规律以及 UMP 的生成规律。

3 结论

综上,应用 Origin 8 软件对酿酒酵母工程菌 BJX12-URA5 发酵过程中菌体干重、UMP 产量、残糖含量动力学进行自定义函数非线性拟合,得到相应的发酵动力学模型及参数;通过对拟合曲线进行分析表明模型预测值和实验值拟合度良好,实验结果可信度高,说明该动力学模型基本能合理的反映 BJX12-URA5 产 UMP 的发酵过程,为 UMP 的发酵生产控制提供了理论依据。由于酿酒酵母发酵原料、菌株及发酵过程的复杂性,还有很多的工作需要深入地探讨,UMP 发酵的模型也需要不断地建立与完善。

表2 菌体干重、残糖含量、UMP产量的实测值与预测值的比较

Table 2 Comparison between experimental and predicted values of dry cell weight, residual sugar content, UMP content

时间(h)	菌体干重(g/L)			残糖含量(g/L)			UMP产量(g/L)		
	实测值	预测值	δ (%)	实测值	预测值	δ (%)	实测值	预测值	δ (%)
0	0.500	0.360	27.81	37.01	35.29	4.637	0.0016	0.0054	-242.5
5	0.950	0.679	28.45	35.07	34.73	0.941	0.0056	0.0069	-22.18
13	1.550	1.664	-7.395	33.65	33.58	0.215	0.0072	0.0099	-37.06
21	3.100	3.187	-2.811	31.69	32.03	-1.073	0.0091	0.0138	-52.53
29	4.450	4.563	-2.541	29.52	30.01	-1.645	0.0147	0.0189	-28.51
39	5.700	5.427	4.778	26.37	26.77	-1.515	0.0229	0.0271	-17.97
45	5.950	5.628	5.408	23.90	24.50	-2.501	0.0302	0.0330	-9.304
53	5.960	5.737	3.729	19.49	21.20	-8.755	0.0360	0.0419	-16.50
65	6.000	5.782	3.624	15.09	16.13	-6.860	0.0540	0.0569	-5.518
77	5.920	5.791	2.177	11.98	11.61	3.158	0.0720	0.0727	-0.985
88	5.910	5.792	1.985	10.42	8.370	19.73	0.0920	0.0865	5.923
100	5.840	5.793	0.804	7.262	5.882	18.98	0.1050	0.1000	4.514
112	5.732	5.793	-1.065	5.257	4.291	18.36	0.1150	0.1120	2.313
124	5.655	5.793	-2.442	4.052	3.326	17.90	0.1260	0.1230	2.341
136	5.573	5.793	-3.949	3.056	2.759	9.694	0.1340	0.1320	0.947
148	5.481	5.793	-5.694	1.547	2.433	-57.29	0.1410	0.1410	-0.519
160	5.356	5.793	-8.161	1.456	2.247	-54.36	0.1450	0.1500	-3.648

参考文献

[1] 武田药品工业株式会社. 5'-核苷酸的生产方法[P]. CN1086219A, 1994-05-04.

[2] 邬小兵, 乐国伟, 施用晖. 外源核苷酸对婴幼儿的营养作用及其在代乳品中的应用[J]. 食品科技, 2000(5): 17-19.

[3] Carver J D. Dietary nucleotides: cellular immune, intestinal and hepatic system effects[J]. The Journal of nutrition, 1994, 124(1): S144-S148.

[4] Kiyoshi Nakayama, Haruo Tanaka. Production of Uridine 5'-Monophosphate and Orotidine 5'-Monophosphate by *Brevibacterium ammoniagenes* [J]. Agr Biol Chem, 1971, 35(4): 516-525.

[5] A A Nudler, A G Garibyan, Bourd. The derepression of enzymes of de novo pyrimidine biosynthesis pathway in *Brevibacterium ammoniagenes* producing uridine - 5 - monophosphate and uracil[J]. Microbiology Letters, 1991, 82(3): 263-266.

[6] Qian X P, Li H. Breeding of A *Corynebacterium ammoniagenes* KU-F14-14 Strain for Microbial Transformation of Uridine Monophosphate[J]. Chinese Journal of Pharmaceuticals, 2006, 37(12): 12-14.

[7] Wang X, Wang X W, Yin M X, et al. Production of uridine 5'-monophosphate by *Corynebacterium ammoniagenes* ATCC 6872 using a statistically improved biocatalytic process[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2007, 76: 321-328.

[8] Tatsuro Fujio, Akihiko Maruyama. Construction of a Plasmid Carrying both CTP Synthetase and a Fused Gene Formed from Cholinephosphate Cytidylyltransferase and Choline Kinase Genes and Its Application to Industrial CDP-Choline Production: Enzymatic Production of CDP-Choline from Orotic acid (Part II) [J]. Biosci Biotech Biochem, 1997, 61(6): 960-964.

[9] 雷高新, 陈勇, 许琳, 等. 酿酒酵母中过表达 URA5 及 URA3 基因催化合成 UMP 的初步研究[J]. 中国生物工程杂志, 2008, 28(12): 77-81.

[10] 赵凯, 许鹏举, 谷广辉. 3,5-二硝基水杨酸比色法测定还原糖含量的研究[J]. 食品科学, 2008, 29(8): 534-536.

[11] 刘永乐, 李忠海, 俞健, 等. 耐酸性 α -淀粉酶发酵动力学的研究[J]. 食品工业科技, 2008(1): 60-62.

[12] 梁金钟, 王凤青, 张露露. 产 γ -PGA 批次发酵动力学模型的建立[J]. 食品工业科技, 2013, 34(16): 174-177.

[13] 张小昊, 童群义. 黑曲霉生产葡萄糖酸钠的分批发酵动力学模型[J]. 食品工业科技, 2010(12): 221-223.

[14] Berger C, Martin N, Collin S, et al. Combinatorial approach to flavor analysis. 2. olfactory investigation of a library of s-methyl thioesters and sensory evaluation of selected compounds [J]. J Agric Food Chem, 1999, 47: 3274-32791.

[15] 吴悦, 李强, 林燕, 等. 酵母乙醇发酵动力学模型研究[J]. 可再生能源, 2014, 32(2): 229-233.

[16] 廖明义, 陈雯莉. 桔青霉发酵制备核酸酶 P1 的发酵动力学研究[J]. 食品工业科技, 2012, 33(3): 180-182.

[17] 代志凯, 印遇龙, 阮征. 微生物发酵动力学模型及其参数拟合的软件实现[J]. 计算机与应用化学, 2011, 28(4): 437-441.

[18] 蔡允佳, 刘晓兰, 郑喜群, 等. 嗜酸放线菌 701 深层发酵产纤维溶酶动力学研究[J]. 齐齐哈尔大学学报: 自然科学版, 2012, 28(6): 59-63.

[19] 叶勤. 发酵过程原理[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005.

[20] 张建国, 陈晓明, 贺新生. 灵芝孢外多糖分批发酵动力学模型[J]. 生物工程学报, 2007, 23(6): 1065-1070.

[21] 张中义, 张勇, 孙君社. 植物乳杆菌合成 CLA 发酵动力学研究[J]. 食品与机械, 2007, 23(5): 7-10.

[22] 郑雨雪, 王立梅, 梅艳珍, 等. 酿酒酵母生产谷胱甘肽分批发酵动力学研究[J]. 食品科学, 2011, 32(1): 158-161.