

由基质对优化链霉素发酵过程的分析

花 强 王树青

(浙江大学工业控制技术国家重点实验室 杭州 310027)

褚庆国 杨西炜

(山东鲁抗医药集团)

摘 要 通过对链霉素发酵过程中历史最优水平及当前生产的基质补入与消耗数据的详细比较和分析,推出实际生产上补料操作中可能存在的问题,找到了基于实际情况的较优补料时间和补料量,并以此改进补料控制,使平均放罐效价比原先提高 3000u/ml 左右,获得较大的生产效益。

关键词 链霉素发酵过程,基质,优化,补料

链霉素发酵工业延续至今已有相当长的历史,和其它抗生素生产过程一样,它的菌体生长,产物形成等所涉及的一系列时刻变化着的生物化学和质量、能量传递过程^[1,2]使链霉素发酵表现出相当程度的不确定性。同时又由于反应机理复杂,无合适的模型用以描述过程,使人们在其发酵操作上依赖经验甚于理论。这给链霉素生产水平的提高带来了一定的困难,但同时又给基于理论分析提高生产提供了可能。

对于链霉素补料分批(Fed-Batch)发酵过程,合理的补料能保证产物最大可能地形成,又可避免物料的无谓浪费^[3,4]。本文着重就实际链霉素工业发酵过程中的基质利用情况作详细分析,提出较合适的补料时间及补料量用于链霉素发酵过程之优化,并通过实际生产证明取得了较好的效益。

1 试验及数据来源

在山东鲁抗医药集团链霉素车间的大力协助下,我们参与了数批发酵过程试验,并把 18m³ # 805 罐和 36m³ # 902 罐作为试验罐,重点监控。车间原来只进行发酵过程中总氮含量的测试,我们增加了对底物中无机氮浓度的测量,以提供更多的过程信息。

从多批试验数据中补料状况的比较和统计,不难发现当前补料的特点,即在基本上相等的时间间隔内补入一定量的碳源和氮源,在补料量上随经验有所增减。就总体而言,各批的放罐效价均不甚高,在相同的菌种和培养基主要成分不变的情况下,要比我们所掌握历史资料中的最高效价普遍低 20% 左右。

国家自然科学基金资助项目。

本文于 1995 年 4 月 3 日收到。

2 结果与讨论

2.1 基质浓度的处理和曲线行为分析

在发酵过程中,碳源是作为链霉菌菌体成分和链霉素中碳元素来源的重要培养基成分,氮源是构成氨基酸、核酸、蛋白质等菌体胞内物和链霉素的重要营养来源^[5~7],因此发酵罐中这些量的浓度和消耗率变化趋势能直观地反应出该过程的菌体生长及产物生成的情况。在此,我们着重考虑了无机氮浓度的变化,是基于流加方便和较易监测,实际生产也多以无机氮源,如硫酸铵的形式进行氮的补加;在发酵的生产阶段,链霉素和菌体的氮有相当部分是从无机氮源中获取。

通过对历史资料中高产物效价的理想批次的数据分析,得出基质中碳源浓度、表面总氮浓度和无机氮浓度的时间特性曲线如图 1,碳源与无机氮源浓度比值的时间特性曲线如图 2,图中实线为数据经过滤波等处理后的曲线。

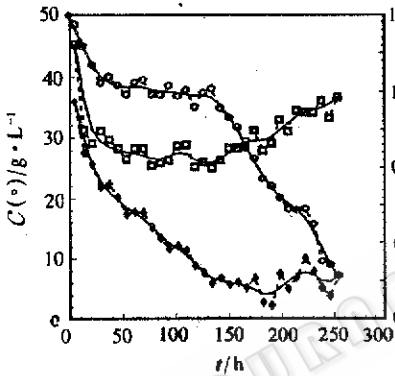


图 1 碳源与氮源浓度曲线(资料)

Fig.1 Concentration of carbon & nitrogen source vs time(Data)

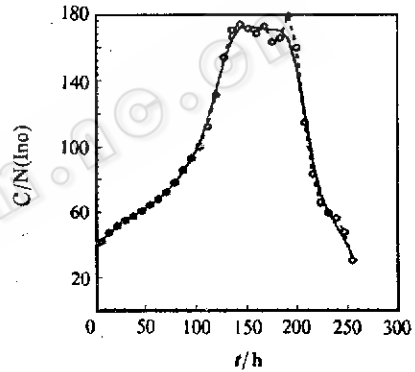


图 2 碳源与无机氮源相对浓度曲线(资料)

Fig.2 Relative concentration of carbon to nitrogen source vs time(Data)

对次级代谢产物的链霉素而言,发酵过程可分为菌体快速生长,没有或很少有产物生成的生长阶段和菌体低速生长,链霉素大量合成的生产阶段。上图清楚地反应出了这两个阶段。从发酵开始到 50h 左右的生长期内,基质中碳源和氮源被急速消耗,繁殖大量高活性的菌体,并积蓄合成链霉素的原料及中间体。50h 到 180h 这一段时间,主要是链霉素的生产期。由于合适地控制了补料,维持了与链霉素合成酶系半衰期相适应的初级代谢速率对失活的酶进行更新,从而保证了此时壮年菌体细胞占有优势,大大延长了平衡生长期,即链霉素的生产期;由于维持一定生长速率的碳源和氮源的加入,以及构成菌体和链霉素氮的无机氮的消耗,使碳源与无机氮源浓度比值逐渐上升并稳定在某个峰值,也较好地体现了这一段特点。发酵后期,综合考虑了罐中碳源浓度尚较高,而高浓度菌体仍有相当的生产能力,着重进行了无机氮的补加,故图 1 后期曲线表明了菌体利用碳源和无机氮源仍有相当的后劲。

而经分析处理当前现场操作所得的试验数据,给出了如下带有普遍性的碳源和氮源

的行为曲线(图 3, 图 4):

从试验结果来看,在链霉素生成期,基质中无机氮浓度表现为无规则地上下波动,其原因为试验中近似均匀的补料过程引起有时候基质浓度远大于需求,导致基质在高浓度

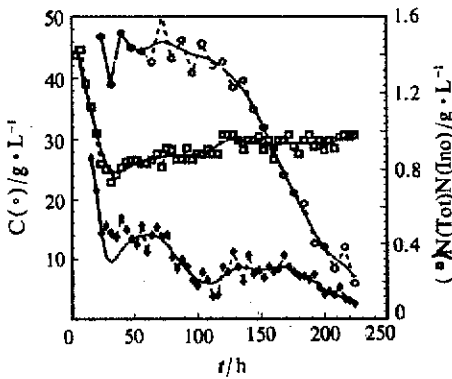


图 3 碳源与氮源浓度曲线(试验)

Fig.3 Concentration of carbon & nitrogen source vs time(Trials)

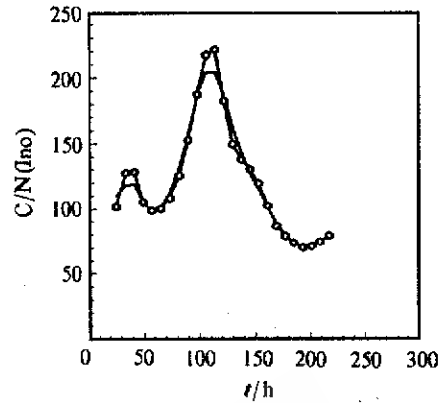


图 4 碳源与无机氮源相对浓度曲线(试验)

Fig.4 Relative concentration of carbon to nitrogen source vs time(Trials)

下对链霉素合成的分解代谢物阻遏或抑制作用;有时候基质不能保证消耗,使菌体处于过饥状态,二者都会使体系的链霉素合成活力下降。同时从碳源和无机氮源浓度比值曲线中,我们发现曲线很快地下降,停留在峰值的时间较短。又由试验数据发现该阶段的补糖量较多,这意味着此时罐中耗碳率有所增大。原因在于发酵前期罐中碳源不够充分,使一些菌体生长停滞,在有了足够碳源的情况下,又继续生长。因此前期的补糖量应比较大,保证绝大多数菌体尽快地成熟,使后期链霉素尽可能多地生成。

2.2 基质消耗速率的处理和曲线行为分析

由于链霉素发酵生产过程中,菌体生长阶段表现出较大的耗碳和耗氮速率,在进入生产期后,碳源和氮源一部分作为抵消死亡细胞的新细胞的物质及能量来源,另一部分加入链霉素的合成,其耗碳和耗氮速率相对会有所下降。因此基质中碳源消耗速率(CCR)、氮源消耗速率(NCR)以及二者比值(CCR/NCR)能一定程度地反映过程的不同阶段。经过对多批试验数据的处理,给出典型的上述时间曲线如图 5。

从上述曲线,特别是 CCR/NCR 曲线,可以推出该发酵过程中存在有类似菌体二次生长^[8,9]的现象;菌体经第一次生长稳定后在 50h 前后达到了链霉素分泌的一个高峰,从试验结果也可以看出这段时期链霉素的效价增长率 R_p 都在 $130\text{u/ml}\cdot\text{h}$ 以上(见图 6);然而 80~100h 碳源消耗率显著增加,同时菌浓也有所增加(由发酵液粘度可以看出),出现了部分原处于幼年期的菌体的生长,而该阶段仍有较大的效价增长率是由于原来大部分成熟细胞仍有很强的链霉素合成活力的缘故。

同时,在并非绝大多数菌体都达到成熟的生产前期(120h 以前),图 6 显示了远大于平均值的链霉菌效价增长速率,体现了所用菌种的生产起步效价较高,在这一阶段很有潜力可挖。然而生产后期的效价增长减慢,一方面是补料中无机氮不足,另一方面是由于菌

体的再次生长,生长周期被拉长,原来成熟的细胞逐渐步入衰亡期,分泌产物的能力迅速下降所致。

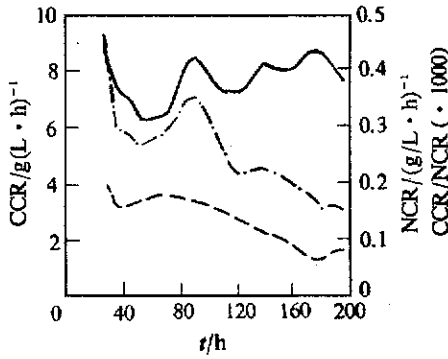


图 5 基质消耗速率曲线

Fig. 5 Rate of substrate consumption vs time

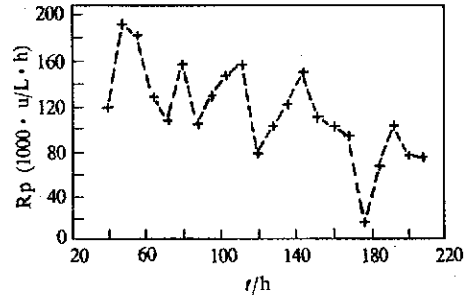


图 6 链霉素效价增长率曲线

Fig. 6 Rate of streptomycin concentration increasing vs time

3 结 论

通过工业现场的试验和对基质等情况的分析,并结合实际生产状况,我们给出了一些关键时间段的补料策略,如前期 20~30h 菌体生长期较多地加入碳源保证充分生长,生产期以缓慢流加糖源为佳;生长期尽量利用基础料中已有的大量有机氮源,少加无机氮,进入生产期则应适时适量注意无机氮的补充,如 50h 左右相对大量地补加氮源,120h 以后也适当增加补氮量等。同时考虑其动力学方程和菌体浓度等因素及约束,以发酵结束时链霉素效价最高为优化目标^[10],确定优化补料轨线,用于指导实际生产,使放罐时平均效价达 28000u/ml 以上,比原先 25000u/ml 提高了 10% 强,取得了良好的效益。

符 号 说 明

C——基质中碳源(葡萄糖)浓度/ $g \cdot L^{-1}$,	CCR——碳源消耗速率/ $g \cdot (L \cdot h)^{-1}$
N(Tot)——基质中表观总氮浓度/ $g \cdot L^{-1}$,	NCR——氮源消耗速率/ $g \cdot (L \cdot h)^{-1}$
N(Tno)——基质中无机氮浓度/ $g \cdot L^{-1}$,	CCR/NCR——碳源与氮源消耗速率之比/ $g \cdot (L \cdot h)^{-1}$
C/N(Ino)——基质中碳源与无机氮源浓度之比,	R_p ——链霉素效价增长率/ $u \cdot (L \cdot h)^{-1}$

参 考 文 献

- [1]徐 浩. 工业微生物学基础及其应用,北京:科学出版社,1991, p. 345.
- [2]Bailey J E. Ollis D F. Biochemical Engineering Fundamentals. 2nd ed. New York: McGraw-Hill Inc., 1986, p. 459.
- [3]Whitaker A. Process Biochem., 1980, 15(4): 10~15.
- [4]Rehm H J, Reed G. Biotechnology, Vol. 2. Weinheim: VCH, 1985, p. 316.
- [5]俞俊棠,唐孝宣. 生物工艺学,上海:华东化工学院出版社,1992, p. 245.

- [6]徐亲民主编. 抗生素工艺学, 北京: 中国建材工业出版社, 1994, p. 79.
- [7]山根恒夫著, 周 斌译. 生化反应工程, 西安: 西北大学出版社, 1992, p. 163.
- [8]Roels J A. *Energetics and Kinetics in Biotechnology*, Amsterdam: Elsevier Biomedical Press, 1983, p. 283.
- [9]Crueger W, Crueger A. In: *Biotechnology: A Textbook of Industrial Microbiology*, Sunderland: Sinauer Associate, Inc., 1984, p. 156.
- [10]Modak J M, Lim H C. *Biotech Bioeng*, 1987, **30**:528~540.

Analysis of Optimizing Streptomycin Fermentation Process from Substrates

Hua Qiang Wang Shuqing

(*National Laboratory of Industrial Control Technology,
Zhejiang University, Hangzhou 310027*)

Chu Qingguo Yang Xiwei

(*Lukang Pharmaceutical Group CO., Ltd., Shandong Province*)

Abstract Historical and current data of substrates in streptomycin fermentation process have been compared and analyzed in detail in this paper. Possibly existing problems in actual feeding process are developed from some phenomena observed. Optimal time and quantity of feeding based on actual situation are presented, control of feeding is improved, the average final concentration of streptomycin is about 3000u/ml higher than before, and more economic profit is obtained.

Key words Streptomycin fermentation, substrates, optimization, feeding