

费氏链霉菌 HTP6 分批发酵动力学

张新刚^{1,2} 史冠莹^{1,2} 陶科^{1,2} 滕云^{1,2} 崔文华^{1,2} 刘运^{1,2} 全鑫^{1,2} 侯太平^{1,2*}

(1. 四川大学生命科学学院 四川 成都 610064)

(2. 四川大学生物资源与生态环境教育部重点实验室 四川 成都 610064)

摘要: 对费氏链霉菌 HTP6 产新霉素的分批发酵动力学进行了研究, 并建立了动力学模型。对数生长期最大比生长速率 μ_m 为 0.0866 h^{-1} , 产物合成期最大合成速率 q_p 为 $1.1867 \times 10^{-4} \text{ g}/(\text{mL}\cdot\text{h})$ 。对实验数据与模型模拟值进行拟合检验, 表现出很好的适用性, 实验平均相对偏差小于 5%。表明该动力学模型对费氏链霉菌产新霉素的发酵生产具有实际意义。

关键词: 费氏链霉菌, 新霉素, 发酵, 动力学模型

Kinetics of *Streptomyces fradiae* HTP6 in the Batch Fermentation Process

ZHANG Xin-Gang^{1,2} SHI Guan-Ying^{1,2} TAO Ke^{1,2} TENG Yun^{1,2} CUI Wen-Hua^{1,2}
LIU Yun^{1,2} QUAN Xin^{1,2} HOU Tai-Ping^{1,2*}

(1. College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610064, China)

(2. Key Laboratory of Bio-resources and Eco-environment, Ministry of Education, Chengdu, Sichuan 610064, China)

Abstract: The kinetics of neomycin productions by batch fermentation with *Streptomyces fradiae* HTP6 were studied. The mathematical kinetic models describing the course of *Streptomyces fradiae* HTP6 fermentation were established. The maximal specific growth rate μ_m was 0.0866 h^{-1} in exponential phase. The maximal specific production rate q_p could reach $1.1867 \times 10^{-4} \text{ g}/(\text{mL}\cdot\text{h})$ in antibiotic production phase. The calculated results of models were compared satisfactorily with experimental data, the average relative deviation was no more than 5%. This kinetic model had practically guiding producing neomycin in fermentation of *Streptomyces fradiae*.

Keywords: *Streptomyces fradiae*, Neomycin, Fermentation, Kinetics model

农用抗生素是微生物产生的次级代谢产物, 在低浓度时可抑制或杀灭作物的病、虫、草害及调节作物生长发育, 因其具有低毒、高效、选择性强、残留时间短等特点, 正日益受到各国重视, 我国自“七·五”计划以来一直将其列为攻关项目^[1]。新霉素是由费氏链霉菌^[2]产生的氨基糖苷类抗生素^[3]。

它作为一种理想的干扰蛋白质合成^[4]的杀菌剂, 在临床和兽医学上有着广泛的应用。本课题组首次运用新霉素防治我国农业细菌病害发现: 新霉素对植物病原细菌具有良好的抑制作用, 同时其急性毒理实验表现为低毒级^[5]。因此, 新霉素完全符合农用抗生素开发中广谱、高效、低毒的基本要求, 具有很大

基金项目: 国家 863 计划项目(No. 2006AA10A209); 国家自然科学基金(No. 30800034)

* 通讯作者: Tel: 86-28-85410992; ✉: houtp@tom.com

收稿日期: 2008-07-31; 接受日期: 2008-10-29

的农业应用前景。

本实验对费氏链霉菌的发酵动力学包括菌体生长动力学、还原糖消耗动力学和代谢产物动力学进行了研究,并建立了模型^[6-8],通过动力学模型的建立,能更好的认识发酵过程中费氏链霉菌生长和新霉素形成的机制,以及影响这些机制的环境因素,对费氏链霉菌大规模发酵过程的优化控制提供指导,以期为新霉素在农业上的大规模应用奠定一定的理论基础。

1 实验材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种: 供试菌株:费氏链霉菌(*Streptomyces fradiae* HTP6),由实验室保藏;指示菌:金黄色葡萄球菌,由四川抗生素研究所提供。

1.1.2 培养基: 种子培养基(g/100 mL):花生粉 4.0,蛋白胨 1.3,米粉 9.0,玉米浆 0.3,酵母粉 0.6,玉米粉 2.0,葡萄糖 2.0, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.9, CaCO_3 0.6, pH 7.0; 发酵培养基(g/100 mL):米粉 6.50,葡萄糖 3.00,蛋白胨 0.80,酵母粉 0.88,花生粉 1.10,玉米浆 0.40,硫酸铵 0.53, Na_2HPO_4 0.44, CaCO_3 0.40, NaCl 0.40, α -淀粉酶 0.03, K_2HPO_4 0.02, pH 6.5~7.0。

1.2 培养方法

种子培养: 从斜面培养基上挑取生长良好的孢子到种子培养液中,250 mL 三角瓶种子培养基装液量为 30 mL,在 30°C 及 150 r/min 条件下摇床培养 48 h; **发酵罐培养:** 以 10% 的接种量将种子液接入 3 L 发酵罐中,控制温度在 35°C,通气量为 4 L/min,搅拌转速 400 r/min, pH 6.5~7.0,发酵时间为 168 h。

1.3 分析方法

菌体浓度: 细胞堆积容积测定法^[9]; **新霉素效价:** 生物测定法^[10]; **还原糖浓度:** 将发酵液过滤,吸取过滤液 0.5 mL 置于 250 mL 三角瓶中,精确加入 20 mL 斐林试剂,摇匀后置电热板上加热沸腾 3 min,待冷却后加入 2 mol/L 的 H_2SO_4 15 mL 摇匀,加入 1% 淀粉指示剂 2 mL,立即用 0.1 mol/L 的 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 标准溶液滴定,滴至蓝色刚好消失,记录读数,查表计算即可求得还原糖浓度。

2 结果与分析

2.1 费氏链霉菌发酵过程的代谢特征

根据过程参数曲线的变化趋势(见图 1、图 2),

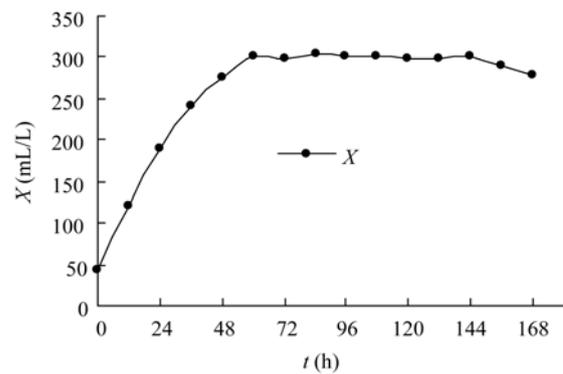


图 1 费氏链霉菌生长(X)曲线

Fig. 1 Profile of cell concentration

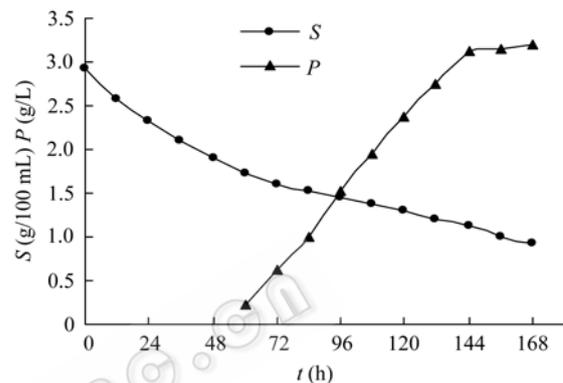


图 2 还原糖(S)消耗及产物合成(P)曲线

Fig. 2 Profile of reducing sugar concentration and production concentration

费氏链霉菌发酵过程可分为 4 个阶段来认识:

第一阶段: 延迟期。对本次实验来讲,这一时期很短,可以忽略。**第二阶段: 对数生长期。**接种后到 60 h,呼吸强度明显增加,为整个发酵过程最强阶段。即使在现有设备满负载运行条件下(通气速率达 4 L/min,搅拌转速 400 r/min),溶氧浓度仍很低。此阶段内还原糖消耗较显著。发酵开始后 60 h,菌浓达到最高值。**第三阶段: 产物合成期(接种后 60 h~144 h)。**产物在 60 h 左右开始合成,产物浓度随时间几乎呈线性增加,菌浓基本不变。**第四阶段: 菌体活性衰退期(接种后 144 h~168 h)。**接种后约第 144 h,发酵液中还原糖浓度下降至 1.1199 g/100 mL 以下。新霉素效价增长速率明显趋缓。此阶段微生物呼吸强度较小。从以上 4 个阶段可以看出,费氏链霉菌发酵过程中的产物合成与菌体生长的过程动力学基本符合微生物次级代谢产物的合成规律。

2.2 费氏链霉菌菌体生长动力学模型

图 1 为费氏链霉菌的生长曲线。经历了 对数生

长期的快速生长和繁殖. 在进入产物合成期后菌体浓度逐渐稳定并维持在 300 mL/L 左右. 在对过程数据进行分析的基础上, 认为菌体的生长较符合 Logistic 模型:

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

当 $t=t_0$ 时 $x=x_0$, 对方程积分得:

$$x = \frac{x_0 \times e^{\mu_m t}}{1 - \frac{x_0}{x_m} (1 - e^{\mu_m t})} \quad (2)$$

式中 x_0 和 x_m 可由实验得到. 以 $\ln[x/(x_m-x)]$ 对 t 作图, 线性回归, 可求出 $\mu_m = 0.0866 \text{ h}^{-1}$.

2.3 新霉素生成动力学模型

微生物产物生成动力学模型可用 Luedeking-Piret 方程来描述:

$$\frac{dp}{dt} = q_p \cdot x + \gamma \frac{dx}{dt} \quad (3)$$

式中 $q_p=0, \gamma \neq 0$ 时可表示生长偶联型发酵; $q_p \neq 0, \gamma \neq 0$ 时可表示部分相关型发酵; $q_p \neq 0, \gamma = 0$ 时可表示非生长偶联型发酵. 本实验所用费氏链霉菌在菌体生长进入稳定期时才开始产新霉素, 其发酵类型属于非生长偶联型, 因此方程(3)转化为:

$$\frac{dp}{dt} = q_p \times x \quad (4)$$

进入稳定期($t=t_1=60 \text{ h}$)后, $x=x_m$ 即菌体浓度保持在相对稳定的状态, 方程积分得:

$$p = q_p \cdot x_m \cdot (t - t_1) + p_i \quad (5)$$

解方程(4)得: $q_p = 1.1867 \times 10^{-4} \text{ g/(mL}\cdot\text{h)}$.

2.4 还原糖消耗动力学模型

在费氏链霉菌整个发酵过程中, 还原糖消耗主要用于菌体生长、细胞维持及产物生成上, 根据物料平衡的原理, 其消耗动力学可用类似 Luedeking-Piret 的方程描述:

$$\frac{ds}{dt} = -\frac{\mu \cdot x}{Y_G} - m \cdot x - \frac{dp}{dt} \cdot \frac{1}{Y_p} \quad (6)$$

新霉素生成与菌体生长无直接关系, 在菌体生长进入稳定期(60 h)后才开始大量生成新霉素, 所以还原糖消耗可分为两个阶段, 即菌体生长阶段还原糖的消耗和新霉素合成阶段还原糖的消耗.

2.4.1 菌体生长阶段还原糖消耗动力学模型: 在菌体生长期阶段, 还原糖的消耗主要用于菌体生长和细胞维持上, 因此方程(6)可转化为:

$$\frac{ds}{dt} = -\frac{\mu \cdot x}{Y_G} - m \cdot x \quad (7)$$

$$\text{式(7)即为: } \frac{ds}{dt} = -\frac{dx}{dt} \cdot \frac{1}{Y_G} - m \cdot x \quad (8)$$

当 $t=t_0$ 时, $x=x_0, s=s_0$, 将(2)式带入(8)积分得:

$$s = s_0 - \frac{x_0}{Y_G} \cdot \left[\frac{e^{\mu_m t}}{1 - \frac{x_0}{x_m} (1 - e^{\mu_m t})} - 1 \right] - \frac{m \cdot x_m \cdot \ln \left[1 - \frac{x_0}{x_m} (1 - e^{\mu_m t}) \right]}{\mu_m} \quad (9)$$

根据前 60 h 的 x 和 s 的数据, 求出不同时刻的 $Y_{x/s}$ 和 μ , 将 $Y_{x/s}$ 对 μ 的倒数作图, 由线性回归解出方程, 得 $Y_G = 232.56 \text{ g/mL}$, $m = 3.0 \times 10^{-6} \text{ g/(mL}\cdot\text{h)}$.

2.4.2 新霉素合成阶段还原糖消耗动力学模型: 发酵开始到 60 h 后, 进入产物合成阶段, 此时还原糖的消耗主要用于菌体生长, 细胞维持和新霉素生成上, 因此根据物料平衡可用方程(6)表示. 产物合成阶段, 菌体浓度处于稳定期, 即 $t \geq 60 \text{ h}$ 时 $\mu=0, x=x_m$, 把(4)式代入(6)式简化得:

$$\frac{ds}{dt} = -\left(m + \frac{q_p}{Y_p}\right) \cdot x_m \quad (10)$$

其中 m, q_p, Y_p, x_m 为常数, 所以此阶段还原糖的消耗速率为一定值, 通过实验数据计算得:

$$ds/dt = 0.0071 \text{ g/(100 mL}\cdot\text{h)}$$

2.5 模型的准确性及适用性验证

为检验模型的准确性, 在相同条件下进行发酵重复实验, 跟踪测定菌体浓度、还原糖浓度及新霉素合成浓度, 并对发酵的实验值与建立的动力学模型模拟值进行比较分析(见图 3B). 为了提高模型的适用性, 在不同初始还原糖浓度下对模型进行考察, 并对发酵的实验值与建立的动力学模型的模拟值进行比较分析(见图 3).

对所建模型的模拟值和实验值进行相对偏差分析, 在初始还原糖浓度分别为 2.5 g/100 mL、3 g/100 mL、3.5 g/100 mL、4 g/100 mL 的条件下, 实验平均偏差分别为 3.125%、2.579%、4.936%、10.267%. 由实验数据可以看出, 当初始还原糖浓度在 2.5 g/100 mL~3.5 g/100 mL 时, 菌体浓度、还原糖浓度和产物浓度的实验值与模拟值能较好的吻合, 当初始还原糖浓度超过 4 g/100 mL 时实验值与模拟值有较大偏差, 不能很好的描述发酵过程.

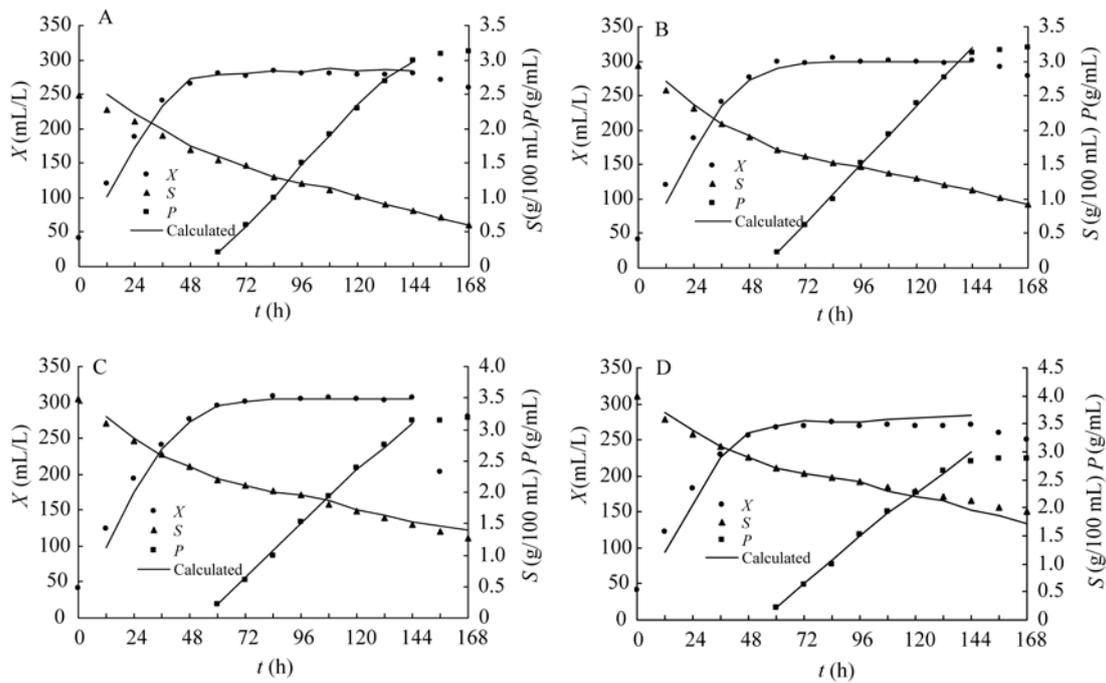


图3 费氏链霉菌浓度(X)、还原糖(S)消耗及产物合成(P)实验值与模拟值曲线

Fig. 3 Comparison between the experimental date and the model prediction

Note: A: Reducing sugar 2.5 g/100 mL; B: Reducing sugar 3 g/100 mL; C: Reducing sugar 3.5 g/100 mL; D: Reducing sugar 4 g/100 mL.

3 讨论

当菌体细胞从原来的培养基转接到新的培养基时,如果接种的微生物已停止生长或有些菌体已死亡,总菌数与活菌数将不符。从接种开始到微生物达到最高生长速率为止,是微生物对外界环境的适应时期。为了适应新的环境,细胞内发生了一系列的变化,如产生新的营养物输送系统,向细胞外扩散基本的辅助因子,调整参与代谢的酶和细胞组分等,这一时期通常被称为延迟期。延迟期的长短与微生物的种类、菌龄、营养物的种类和浓度、培养温度等有关^[11]。本实验中延迟期很短,其原因与菌龄和培养基的成分及搭配有关。此外,若加入某些微生物的生长促进剂,可能也会收到较好的效果。在实际发酵生产过程中,设法缩短延迟期,对缩短发酵周期,提高生产效率具有很大的意义。

在微生物发酵过程中,营养物是极其重要的影响因素,它不仅表现在对菌体生长的影响,更表现在对产物生成的影响。合理浓度的营养物有利于菌体生长及产物合成,但浓度过高则会起抑制作用。当营养物浓度过高时,培养基中电解质的渗透压高于细胞内液的渗透压,细胞因生理干燥而出现

质壁分离,生长减慢,生命活动受到影响,甚至死亡,同时,会出现培养基的粘度过大,导致溶解氧浓度下降至临界值或环境酸碱变化过大而直接影响发酵。本实验中,当初始还原糖浓度大于4 g/100 mL时,实验值与模型的模拟值之间有较大的偏差,其原因正基于以上几点。

通过本实验对费氏链霉菌发酵过程的系统研究结果表明,其菌体的生长、还原糖消耗和产物的合成过程基本符合微生物次级代谢产物的合成规律。对 μ_m 、 q_p 、 Y_G 、 m 等模型参数进行估算,状态变量模型模拟值与测量值能较好的吻合,表现出较好的适用性,相对偏差均小于5%,说明所建立的模型能较好地描述实际发酵过程,为该发酵过程的分析和优化提供了相关数据。

符号说明

μ_m	最大比生长速率(h^{-1})
X_m	最大菌体浓度(mL/L)
S	还原糖浓度(g/100 mL)
P	效价浓度(g/L)
q_p	产物比生成速率[g/(mL·h)]

Y_G	菌体生长得率系数(g/mL)
Y_p	产物对基质的得率系数(mL/L)
m	菌体对基质的维持系数[g/(mL·h)]
μ	菌体比生长速率(h^{-1})
X	菌体浓度(mL/L)
X_0	初始菌体浓度(mL/L)
S_0	初始还原糖浓度(g/100 mL)
$Y_{x/s}$	菌体对于底物的表观得率系数(mL/10 g)
t	发酵时刻(h)
γ	菌体生长相关系数(g/mL)

- losis organisms. *Science*, 1949, **109**(3): 305–307.
- [4] Mehta R, Champney WS. Neomycin and paromomycin inhibit 30S ribosomal subunit assembly in *Staphylococcus aureus*. *Current Microbiology*, 2003, **47**(3): 237–243.
- [5] 贺燕, 陶科, 黄晓, 等. 新霉素对植物病原细菌的防效及其急性毒性. *农药*, 2008, **47**(4): 297–299.
- [6] 张建国, 陈晓明, 贺新生. 灵芝胞外多糖分批发酵动力学模型. *生物工程学报*, 2007, **23**(6): 1065–1070.
- [7] David AM, Meien OF, Krieger N, *et al.* A review of recent development in modeling of microbial growth kinetics and intraparticle phenomena in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 2004, **17**(1): 15–16.
- [8] Bapat PM, Bhartiya S, Venkatesh KV, *et al.* Structured kinetic model to represent the utilization of multiple substrates in complex media during rifamycin B fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*, 2006, **93**(4): 779–790.
- [9] 钱铭镛. 发酵工程最优化设计. 南京: 江苏科学技术出版社, 1998, p.16.
- [10] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(二部). 北京: 化学工业出版社, 2005, pp.124–125.
- [11] 钱铭镛. 发酵工程最优化设计. 南京: 江苏科学技术出版社, 1998, pp.18–19.

参 考 文 献

- [1] 朱昌雄, 宋渊. 我国农用抗生素的现状与发展趋势. *中国农业科技导报*, 2006, **8**(6): 17–19.
- [2] Rinehart KL Jr, Stroshane RM. Biosynthesis of aminocyclitol antibiotics. *Journal of Antibiotics*, 1976, **29**(4): 319–353.
- [3] Waksman SA, Lechevalier HA. Neomin, a new antibiotic active streptomycin-resistant bacteria, including tubercu-

征 订 启 事

2009 年中科院微生物所期刊联合编辑部联合征订全面启动!

	《微生物学报》月刊(每月 4 日出版), 单价 55.00 元, 全年定价 660 元。刊号: ISSN 0001-6209; CODEN WSHPA8。国内邮发代号: 2-504; 国外邮发代号: BM67。
	《生物工程学报》月刊(每月 25 日出版), 单价 65.00 元, 全年定价 780 元。刊号: ISSN 1000-3061; CODEN SGXUED。国内邮发代号: 82-13; 国外邮发代号: BM5608。
	《微生物学通报》月刊(每月 20 日出版), 单价 48.00 元, 年价 576 元。刊号: ISSN 0253-2654; CODEN WSWPDI。国内邮发代号: 2-817; 国外邮发代号: BM413。
	《菌物学报》双月刊(单月 15 日出版), 单价 80 元, 全年定价 480 元。刊号: ISSN 1672-6472; CODEN JXUUAЕ。国内邮发代号: 2-499; 国外邮发代号: Q723。
订阅	欢迎广大读者直接与本刊发行部联系订购, 我们将按期免费为您邮寄。
	汇款地址: (100101)北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号中科院微生物所 B401
	收信人: 《 》编辑部; 电话: (010)64807521; E-mail: bjb@im.ac.cn
	请在附言处注明“订刊费”及所订期刊名称、年代、卷、期和数量

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>