

文章编号:1674-2869(2008)03-0008-03

空气流量控制在阿维菌素发酵过程中的应用

湛 颀

(武汉工程大学化工与制药学院, 新型反应器与绿色化学工艺重点实验室, 湖北 武汉 430074)

摘 要:在 *S. avermitilis* 发酵过程中引入质谱仪进行尾气的在线测定, 发现正常过程产素期临界通气量为 $1\ 600\text{m}^3/\text{h}$; 前期的 OUR 数值可以用于预测发酵正常与否; 在非正常批次, 产素期在尾气数据指导下利用空气流量限制发酵的初级代谢水平, 起到部分恢复产素速率的效果。

关键词:质谱仪; 阿维链霉菌; 发酵过程; 通气

中图分类号: TQ 920.6 **文献标识码:** A

0 引 言

微生物的发酵调控一直是工业发酵过程研究的关注焦点之一, 在此方面前人有许多尝试, 也取得不错效果。但大多数人都是根据离线数据进行调控而缺乏实时手段。在引入质谱仪检测尾气数据后, 能够对发酵过程进行实时监控。

为了更为有效地利用现有手段, 尝试将其用于阿维菌素发酵过程空气流量控制。常规的空气流量控制一般是经验型地调节, 而有了溶氧电极后, 也开始根据临界氧来调控。例如朱元元等人^[1]在林可霉素发酵中就是通过实验得到培养各个时期的临界氧, 再加上 10% 的富余, 最后确定生产中的通气量。由于尾气数据能够提供更为进一步的信息, 所以我们尝试根据尾气数据进行在线调控。实验过程中发现正常过程产素期的临界通气量为 $1\ 600\text{m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$, 而前期的 OUR (氧消耗速率) 数值可以用于预测发酵正常与否。在非正常批次, 产素期在尾气数据指导下利用空气流量限制发酵的初级代谢水平, 起到部分恢复产素速率的效果。

1 实验部分

1.1 菌种与培养基

研究中用到的 *Streptomyces avermitilis* 突变株为工业生产菌株; 培养基包含多种有机碳源、有机氮源和无机盐。

1.2 设备和过程控制

发酵罐的监控和一些后面要用到的在线参数采集是借助 Honeywell 工业控制系统及相关软件完成的。

尾气分析使用的是 VG Prima δ B 型质谱仪。

它支持多达 64 路样品及 8 路标准气体。除了测定各发酵罐出口气体成分外, 还引入一路入口气体作为参比。自动进样系统将会保证在计算机控制下质谱仪循环测定各路样品浓度。如果仅测定常规的 N_2 、 Ar 、 O_2 、 CO_2 四种气体含量百分比, 每组数据测定时间为 5 s; 如果不忽略其他气体如乙醇等, 则需额外的 3 s 进行测定。

1.3 在线数据处理

最后的数据处理汇总和相关分析是通过华东理工大学生化工程中心自行开发的上位机软件包《发酵过程检测系统 BIORADAR 2.0》完成, 其数据来源及流向如图 1 所示。

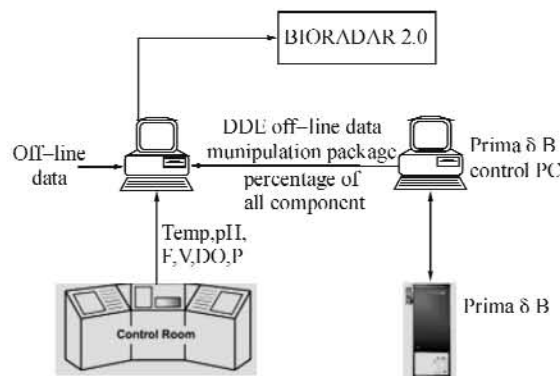


图 1 试验数据传输示意图

Fig. 1 Scheme of data transference

由图 1 可以看出, 计算摄氧率 OUR、二氧化碳析出率 CER 和呼吸商 RQ 所需的数据分别由不同渠道汇集于上位机软件中, 并由软件自动计算出来^[2]。其中

$$\text{OUR} = \frac{Q_{\text{in}}}{V} \left[E_{\text{O}_2(\text{in})} - \frac{E_{\text{O}_2(\text{out})} \times E_{\text{N}_2(\text{in})}}{E_{\text{N}_2(\text{out})}} \right],$$
$$\text{CER} = \frac{Q_{\text{in}}}{V} \left[\frac{E_{\text{CO}_2(\text{out})} \times E_{\text{N}_2(\text{in})}}{E_{\text{N}_2(\text{out})}} - E_{\text{CO}_2(\text{in})} \right]$$

收稿日期: 2007-05-08

作者简介: 湛 颀 (1976-), 男, 湖北武汉人, 博士, 研究方向: 发酵过程优化。

假设满足 $Q_{in} \times E_{N_2(in)} = Q_{out} \times E_{N_2(out)}$, 上式中 Q 为干燥气体物质通量, E 为某气体物质分量, 下标注明气体种类和采样位置。

1.4 其它

PMV 测定: 离心 30 min 后量测取固含物百分比。

效价测定: 取发酵液 3 mL, 加入无水乙醇 7 mL, 充分振荡 5 min, 静置 4 h, 过滤后取滤液采用 HPLC 法测定阿维菌素 B_{1a} 的效价。色谱条件: HP1100 型高效液相色谱仪; C18 反相柱 (250 mm \times 4.0 mm); 流动相为甲醇水溶液 (甲醇: 水 = 90: 10); 流速为 1.0 mL/min; 检测波长为 246 nm; 柱温 25 $^{\circ}\text{C}$; 进样量 20 μL ; B_{1a} 标准品由浙江海正药业提供。

2 结果与讨论

2.1 OUR 数值与发酵过程的关系

根据 OUR 的定义^[8], 它代表单位时间单位体积发酵液中 CO_2 析出的摩尔数。作为碳源代谢的终产物之一, OUR 的数值不仅与某一时间发酵体系内的菌量有关, 还受到此时体系内的菌体生长环境及此环境下菌体的生物活性的影响。

作者为了研究通气对产素的影响^[2], 曾在产素期逐步降低空气流量并观察相关变化。当空气流量由 $1\ 600\ \text{m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$ 降到 $1\ 400\ \text{m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$ 左右时, CER、OUR 立即开始下降, RQ 则是先升后降。此后虽提高补料速率, 阻止了 CER、OUR 及 RQ 数值的下滑, 但也仅仅在短期内有所提高, 而最终稳定水平 CER 和 OUR 要低于改变流量以前, RQ 则有些上升。这种情况在先前的各次调整中从未出现, 在先前的调整中, CER、OUR 和 RQ 稳定值都不会因流量改变发生太大的变化。这说明氧供应对代谢的限制已经显现出来, 后来测定的产素速率也就是在这个阶段开始发生较大的下降。通过这个实验初步确定产素期空气流量临界值为 $1\ 600\ \text{m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$ 。

2.2 非正常批次的 OUR 特征

从两个批次的比较可以看出非正常批次的几个特点。首先菌体快速生长阶段出现的 OUR 首个峰值就达到 $25\ \text{mol} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{h}^{-1}$ 以上, 超过对照批次约 25%。其次, 虽然两批的 PMV 数值和变化趋势近似, 但是 OUR 却也有着巨大差异, 非正常批次明显偏高, 而且在 100 h 前数值基本都高于 $20\ \text{mol} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{h}^{-1}$ 。最后, 非正常批次的产素速率仅有对照批次的 50% 左右。

以上这些特点并非仅该批次独有, 而是在总结了大量数据后的结果, 也确实成为实际工作中

对发酵过程进行预估的经验性标准之一。

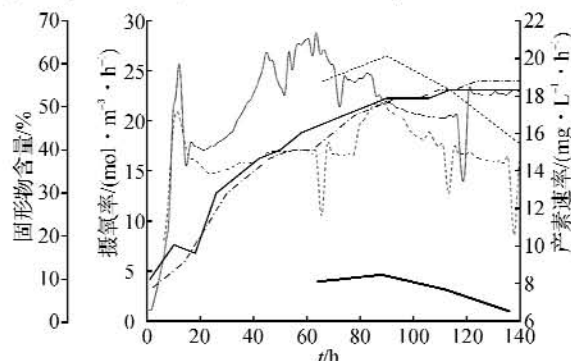


图2 正常批次与非正常批次的比较

Fig. 2 Comparison of normal and abnormal batch

注: 不正常批次: 摄氧率 —— 产素速率 —— 固形物含量;
正常批次: 摄氧率 产素速率 固形物含量。

2.3 空气流量控制的作用

在实际过程如果已经预计会出现低产批次, 往往希望通过调控手段, 进行补救。在一批已经出现前期尾气数据异常的批次里, 采用空气流量控制抑制产素期的菌体生物活性。如图 3 所示, 通过后期降低空气流量, 使得产素速率回升到 $0.9\ \text{kg} \cdot \text{m}^{-3}$ 左右。

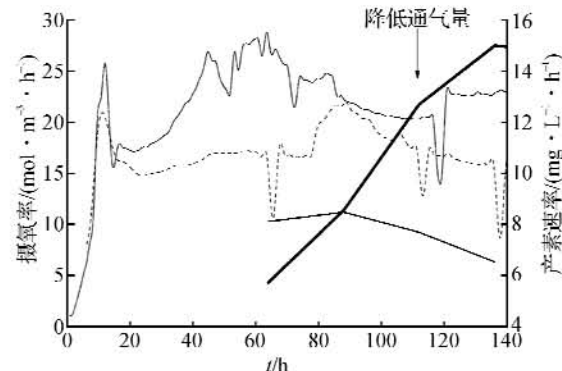


图3 空气流量控制的效果

Fig. 3 Effect of reduce airflow rate

注: —— 对照批次摄氧率; 通气量调整后摄氧率;
—— 对照批次的产素速率; —— 调整通气策略对产素的影响。

2.4 讨论

CER、OUR 对于阿维菌素发酵是相当重要的参数, 例如 K Gbewonyo 等人^[4]在 800 L 反应器上, 曾经研究利用在线的 CER 数据估计前期的菌体生长量, 并且取得良好的对应关系。本研究主要发现就是 OUR 用于评估发酵过程, 并以此为标准, 进行优化。

从前期的情况来看, 过高的初期 OUR 对应批次较差, 由于菌量基本类似, 较高的 OUR 说明单位菌体氧耗较高, 菌体生物活性较强。Schulman 等人^[5]的同位素标记实验结果发现直接添加的乙酸盐和丙酸盐并非好的前体, 原因不是无法输送到胞内, 而是无法进入次级代谢途径或胞内已经有

大量该类物质积累.在阿维链霉菌中早已发现存在将这些物质转入能量代谢途径的酶系,加之其 CoA 酯既是阿维菌素合成的原料,也是参与能量代谢的原料,Schulman 等人由此推断可能是因为胞内氧化过程反应速率远远高于阿维菌素合成速率,这点可以通过产素期高氧耗的特点加以证明.

产素期存在一个空气流量临界值,低于这个流量,代谢就会开始受到氧供应的限制.所以虽然实测的 PMV 没有太大变化,但由于生物活性下降造成 OUR 突变.由于合成前体都来自碳源代谢与氨基酸代谢,所以正常情况下阿维菌素合成速率与代谢快慢直接相关.菌体具有一定强度的初级代谢才能保证较高的产素速率.在非正常批次中间出现的情况又说明,呼吸强度过高,只是代表菌体初级代谢过于旺盛,虽然产生可用于合成的原料增加,但出于竞争关系,最后进入合成途径的反而减少,甚至因为初级代谢物的阻遏作用而完全抑制合成途径.之所以能通过前期 OUR 发现问题,主要是因为它体现出菌体生长状况的异常,这类批次后面的共同特点就是呼吸强度大,糖耗高,产素速率低下,明显体现出初级代谢占据统治地位.

从先前的实验已经可以得出控制空气流量是限制初级代谢的有效手段.基于这一点进行的补偿性控制也说明,限制初级代谢后,OUR 下降,原料更多流向次级代谢,产素速率恢复(图 4).以此为借鉴,在实际生产中可以及时采取措施,减少低产批次带来的损失.

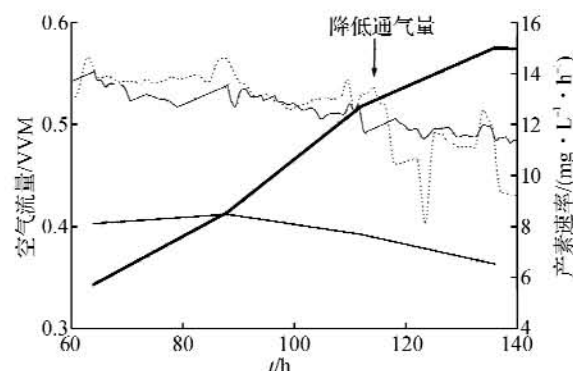


图 4 OUR 下降与产素速率的回升

Fig. 4 With the reduce of OUR, yield rate restore to a normal level

注:——对照批次;通气量调整;
——对照批次的产素速率; ——调速通气策略对产素的影响.

参考文献:

- [1] 朱立元, 林可霉素发酵生产过程中空气流量控制的研究[J]. 中国抗生素杂志, 2001, 26(5): 393-394.
- [2] 湛 颖, 储 炬, 庄英萍, 等. 质谱仪在 avermectin 发酵过程中的应用[J]. 中国抗生素杂志, 2004, 29(1): 4-7.
- [3] 储 炬, 李有荣. 现代工业发酵调控学[M]. 北京: 化学工业出版社, 2002.
- [4] Gbewonyo K, Jain D, Hunt G, et al. On-line analysis of avermectin fermentation cell growth kinetics in an industrial Pilot plant [J]. Biotechnol Bioeng, 1989, 34(2): 234-241.
- [5] Schulman M, Valentino D, Hensens O. Biosynthesis of the avermectins by Streptomyces avermitilis; incorporation of labeled precursors [J]. J Antibiotics, 1986, 39(4): 541-549.

Application of aeration control in the avermectin fermentation

CHEN Jie

(School of Chemical Engineering and Pharmacy, Wuhan Institute of Technology,
Hubei Key Lab of Novel Reactor and Green Chemical Technology, Wuhan 430074, China)

Abstract: Method of using mass spectrometer to the exhaust gas on-line analysis was successfully applied into fermentation processes of avermectin in China for the first time. The critical inlet air flux was found to be 1 600 m³/h, and OUR value in prophase could be used to indicate future trend of the batch. For an abnormal batch, with the restriction of primary metabolism under guidance of the exhaust gas data, yielding rate of avermectin was restored to a normal level.

Key words: mass spectrometer; *S. avermitilis*; fermentation process; aeration

本文编辑:张 瑞