

L-缬氨酸发酵供氧与补料过程控制的研究

屈明波 龚建华 黄和容

(中国科学院微生物研究所, 北京)

高产缬氨酸的北京棒杆菌(*Corynebacterium pectinense*)突变株125菌株, 在2.6L自控发酵罐上分批培养结果表明, 当发酵中后期DO为零时, 产酸量较多。也可用 k_{La} 值为指标来调节过程的供氧强度, $k_{La} = 90.75h^{-1}$ 时, 产酸量最高。同时比较了恒速连续补加葡萄糖液, 当 $F = 3.75g/h$ 时, 产酸较高。由此获得了该菌株L-缬氨酸发酵的低供氧与恒速补糖的控制模式。总糖量为16.85%的发酵, 可使产酸量达38.2g/L, 转化率为22.67%。本文对有关试验结果, 进行了发酵动力学的分析和讨论。

关键词 L-缬氨酸; 分批补料培养; 供氧与补料

L-缬氨酸系必需氨基酸之一, 用以配制复合氨基酸输液和其他治疗药物。目前世界年产量已达200余吨。在氨基酸发酵中, 溶氧对酸量积累有很大影响^[1], 为了获得高产, 必须控制溶氧在合适程度内。工业生产多采用分批发酵方式, 高浓度的初糖往往会抑制菌体的产酸能力, 使糖的转化率下降, 而补料分批培养方式则能较好地解决这一问题。这方面已有广泛的报道^[2-7]。因此本研究从这两方面着手, 以生化工程学的观点对北京棒杆菌125菌株L-缬氨酸发酵过程控制作了初步探讨, 得到了一个较优化的控制模式。

材料与方 法

(一) 菌种

北京棒杆菌(*Corynebacterium pectinense*)多重抗性突变株125(Ile⁻, α-AB^r, 2-TA^r, NL^r, NV^r)^[8]。

(二) 培养基

1. 种子培养基(g/dl): 葡萄糖2.0, 尿素0.05, (NH₄)₂SO₄ 0.2, K₂HPO₄ · 3 H₂O 0.1, MgSO₄ · 7 H₂O 0.04, 玉米浆1.5, pH7.0。

2. 分批发酵培养基(g/dl): 葡萄糖12.0, 尿素0.1, (NH₄)₂SO₄ 2.5, K₂HPO₄ · 3 H₂O 0.15, MgSO₄ · 7 H₂O 0.05, FeSO₄ · 7 H₂O 0.002, MnSO₄ · 4 H₂O 0.0021, Ile 1.0mg, VB₁ 10μg, 生物素5μg, pH6.8。

3. 补料分批培养基(g/dl): 葡萄糖6.0, (NH₄)₂SO₄ 0.8, 尿素0.15, K₂HPO₄ · 3 H₂O 0.225, MgSO₄ · 7 H₂O 0.075, FeSO₄ · 7 H₂O 0.003, MnSO₄ · 4 H₂O 0.003, Ile 1.5mg, VB₁ 15μg, 生物素7.5μg, pH 6.8。

4. 补料液: 168g葡萄糖配成350ml水溶液, 23.6g(NH₄)₂SO₄配成50ml水溶液, 分别灭菌后混合。

(三) 培养方法

摇瓶种子液30℃培养12h, 以10%重量接入发酵罐中, 温度控制在30±1℃,

本文于1990年12月11日收到。

本文在1989年“第二届全国生化过程模型化与控制学术讨论会”上报告, 属国家“七五”科技攻关部分研究内容。本工作系国家自然科学基金资助项目。

用 7 mol/L 氨水调节控制 pH 在 6.5。

(四) 发酵设备

日本丸菱公司(L.E. Marubishi)台式 2.6L 实验室用自控发酵罐(工作体积 1L)。发酵液溶解氧饱和度自动显示,温度自动控制。发酵过程用氨水流加控制所需 pH 值,补料液由蠕动泵控制不同流速补进罐内。

(五) 分析方法

1. 菌体浓度:用比色计测得吸光度 A 值后换算成干重浓度。

2. 还原糖测定:采用 3,5-二硝基水杨酸法^[9]。

3. L-缬氨酸测定:纸上层析分离,用茚三酮显色反应进行定量测定^[10]。

结 果

(一) 供氧对菌株 125 L-缬氨酸发酵的影响

1. 溶解氧浓度(DO)对缬氨酸生成的影响:为了对缬氨酸发酵的供氧过程实现最适控制,考察了 DO 对产酸的影响,结果见表 1。试验中使发酵开始后的 20h 中供氧充足(rpm 为 800),DO 保持高值,20h 后不断调整搅拌转速使 DO 保持恒定。结果表明,当发酵液中 DO 从 76% 下降到 60% 和 40% 时,产酸虽有提高但不明显,说明若发酵处于较充足供氧情况下,产酸较低。当 DO 从 40% 下降至零时(此时溶氧电极已无法测出),产酸量明显提高。很低的 DO 条件下,菌体呼吸可能受到抑制,却有利于缬氨酸的合成。

这种需氧特点,可能与缬氨酸生物合成过程中耗氧少有关。缬氨酸的合成不是经由三羧酸循环,而由丙酮酸为前体合成。当供氧不足时,葡萄糖酵解通过 TCA 环的氧化受到抑制,细胞内丙酮酸库水平

表 1 DO 对 L-缬氨酸生成的影响

Table 1 Effect of DO on L-valine formation

溶解氧浓度 Dissolved oxygen DO (%)	葡萄糖浓度 Glucose conc. (%)	L-缬氨酸生成 L-valine (g/L)	对糖的转化率 Conversion rate of glu- cose to val- ine $Y_{p/s}$ (%)
76	12.60	18.0	14.29
60	12.49	18.8	15.05
40	12.45	21.6	17.78
0	12.20	25.4	20.82

提高,即缬氨酸合成前体增加,因而有利于缬氨酸积累。同时缬氨酸合成过程中生成 2 个 ATP,不生成 NAD(P)H_2 ,无需大量的氧用于 NAD(P)H_2 的再氧化^[11]。

2. 体积氧传递系数 k_La 对缬氨酸生成的影响:在通常条件下,试图用不断调整转速来控制恒定的 DO 较难实现。但可控制某一恒定的 k_La 值使发酵过程尽可能维持在一个最适 DO 水平上。在我们实验室条件下,比较了不同的 k_La 值(由实验条件计算而得)^[12],结果见图 1。

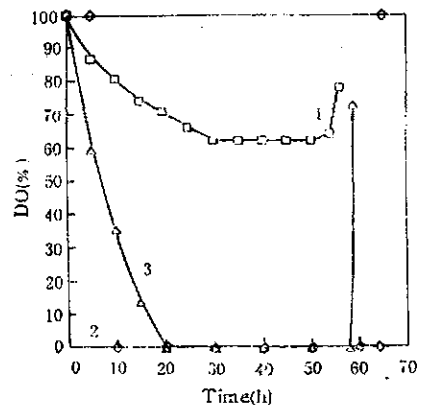


图 1 不同 k_La 值下 DO 的变化

Fig.1 Changes in DO under the different oxygen transfer coefficient k_La values

1. $k_La = 428.70\text{h}^{-1}$ 2. $k_La = 90.78\text{h}^{-1}$
3. $k_La = 42.60\text{h}^{-1}$

k_La 为 428.70h^{-1} 时,发酵 20h 后 DO 仍维持 60%,糖转化率很低,为 14.30%。 k_La 为 90.78h^{-1} 时,20h 后 DO 为零,糖转

化率提高到20.80%，而 k_La 继续下降到 $42.60h^{-1}$ 时，发酵5 h后 DO 就为零，糖转化率反而有所下降（18.79%）。这是由于在实验条件下，菌株 125 L-缬氨酸发酵属动力学Ⅱ型^[12]。只有保持前期菌体良好生长，才能使发酵中后期积累较多量的缬氨酸。当 k_La 值太小，在菌体生长期 DO 就为零，限制了菌体生长。此外，由于氧电极在溶氧浓度不论多低时，均显示为零，若二者的 k_La 值不同，实际氧浓度可能也不相同， k_La 值小，氧浓度会更低，导致糖转化率不同。因此，缬氨酸发酵只有在一定程度限氧条件下，产酸才能最高，过度缺氧也会导致产酸下降。

最适 k_La 值的获得，不仅可以优化供氧过程，也为我们提供了发酵规模放大的基础。由于氧的供给和传递对缬氨酸发酵是一个关键因子^[1,14,15]，可以选用 k_La 值相等的原则进行放大。

（二）恒速补料分批培养对产酸的影响

1. 分批培养中不同初糖浓度与缬氨酸积累的关系：实验结果见表2和图2—

4。结果表明，在低糖下，比生长速率 μ 大，菌体浓度 X 增长快，促进生长。合适的低糖浓度(如7.55%)，可使比产酸速率 q_p 值较大，糖转化率最高。过低的初糖也会抑制菌的产酸能力， q_p 很小，转化率很低。高浓度的初糖使 μ 和 q_p 下降，抑制菌体生长和产酸能力使转化率下降。因此单纯用提高初糖浓度的措施，不能有效地增加产酸量。

表 2 不同初糖浓度对产酸的影响
Table 2 Effect of initial glucose conc. in the medium on L-valine production

初糖浓度 Initial glucose conc. (%)	L-缬氨酸生成 L-valine (g/L)	对葡萄糖 的转化率 Conver- sion rate of glucose to vali- ne (%)	菌体浓度 Cell conc. (%)	发酵周期 Ferme- ntation period (h)
6.40	9.8	15.3	9.82	30
7.55	17.0	22.5	9.30	35
10.45	21.8	20.9	10.51	46
12.20	25.4	20.83	11.20	52
13.67	26.0	20.48	13.11	55
17.77	31.4	17.67	11.55	95

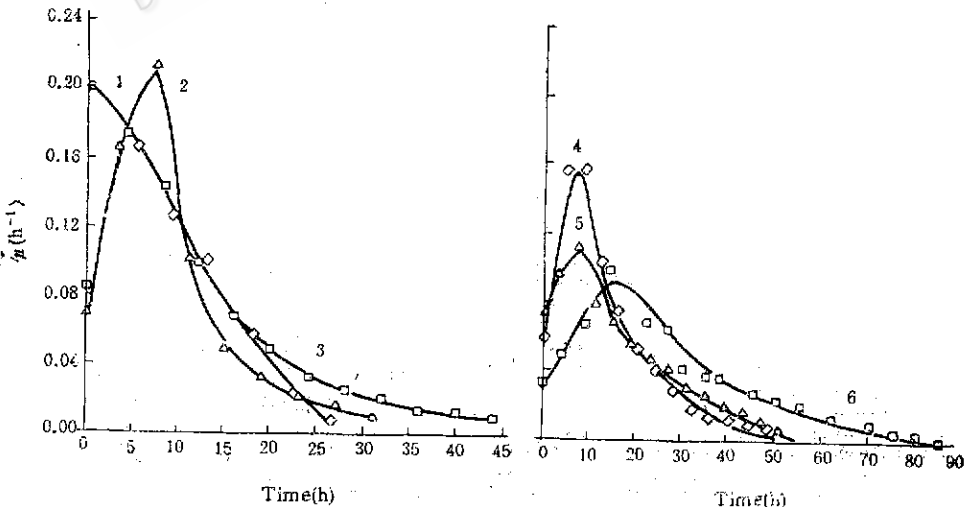


图 2 不同初糖浓度发酵比生长速率的比较
Fig.2 Effect of initial glucose conc. in the medium on the specific growth rate
初糖浓度 Initial "glucose conc. (%): 1. 6.40, 2. 7.55, 3. 10.45,
4. 12.20, 5. 13.67, 6. 17.77

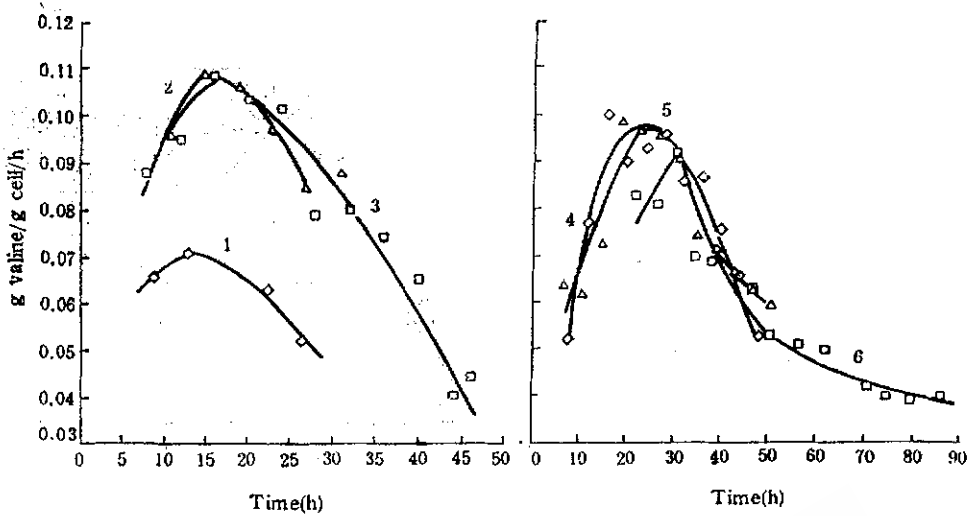


图 3 不同补糖浓度发酵比产酸速率的比较
Fig.3 Effect of the initial glucose conc. in the medium on the specific L-valine formation rate
补糖浓度同图 2 Initial glucose conc. (%) as in Fig. 2

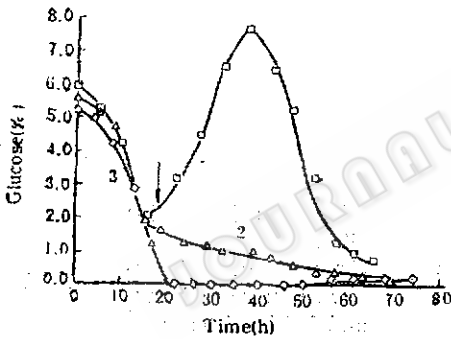


图 4 不同补糖速率下发酵过程中糖浓度的变化
Fig.4 Changes in the glucose conc. under the different speeds of the glucose feeding

补糖速率 Speed of the glucose feeding:
1. 7.82 g/h, 2. 3.75 g/h, 3. 2.81g/h

2. 不同恒速补糖分批培养的比较:

由于分批培养方式限制了产酸量的提高, 因此采用补料分批培养方式^[2-7]。由分批培养得知, 补料分批发酵的初糖浓度选为 6% 左右, 前期可得到足够的菌量, 当糖浓度下降至 1—2% 时, 将糖液补入, 实验结果见表 3 和图 5—6。

在高流速下 (7.82g/h), 补入糖和发酵液维持高糖浓度, μ 、 X 、 q 值小, 产

表 3 不同补糖速度对产酸的影响

Table 3 Effect of the different speeds of glucose feeding on L-valine production

补糖速率 Speed of gluc- ose fee- ding (g/h)	总补糖量 Total glucose feed- ing (g)	L-缬氨 酸量 L-vali- ne (g/L)	菌体 浓度 Cell conc. (g/L)	糖的转 化率 Conver- sion ra- te of glucose to L- valine (%)	发酵周期 Ferme- ntation period (h)
7.82	164.0	30.0	12.57	17.27	65
3.75	164.0	38.2	15.03	22.67	63
2.81	160.0	34.1	18.84	20.67	74

酸量和糖转化率最低。中速补糖下 (3.75 g/h), 补糖后发酵液糖浓度维持在 1% 左右, μ 、 X 值都提高了, q 为最大。产酸量和转化率最高。当补糖流速很低时 (2.82g/h), 维持糖浓度为零, 此时菌体代谢受到糖供量的限制, μ 、 X 值虽为最大, 但 q 值最小, 反而降低了产酸和转化率。在我们实验条件下, 补糖流速以 3.75 g/h 较为适宜。表 4、图 7—8 比较了分批和补料分批培养总糖量基本相同的条件下的产酸、比生长速率、比产酸速率和糖

的转化率情况。

表 4 不同发酵方式对产酸的影响

Table 4 Results of the batch and fed batch cultures

发酵方式 Culture	总糖量 Conc. of total gl- ucose (g)	L-缬氨 酸 量 L-vali- ne (g/L)	菌体 浓度 Cell conc. (g/L)	糖 的 转化 率 Conver- sion ra- te of glucose to L- valine (%)	发酵周期 Ferme- ntation period (h)
分批 Batch	213.24	31.4	11.65	17.67	95
补料分批 Fed batch	202.2	38.2	16.37	22.67	63

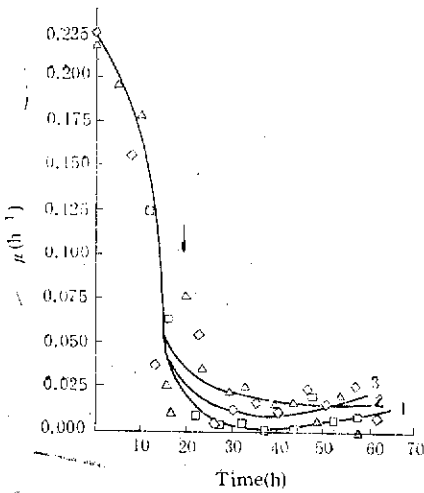


图 5 补糖速率对比生长速率(μ)的影响

Fig.5 Effect of the different speeds of the glucose feeding on the specific growth rate (μ)

补糖速率 Speed of the glucose feeding:
1. 7.82 g/h, 2. 3.75 g/h, 3. 2.81 g/h

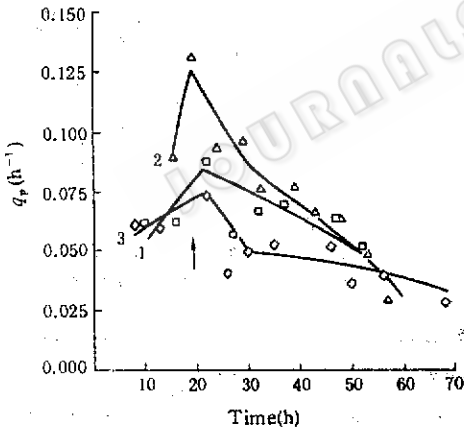


Fig.6 Effect of the different speeds of glucose feeding on the specific L-valine formation rate

补糖速率 Speed of the glucose feeding:
1. 7.82 g/h, 2. 3.75 g/h, 3. 2.81 g/h

实验证明,无论是产酸量和发酵周期,补料分批培养方式均明显优于分批培养,结果见表4所示。从图7可以看出,补料分批培养的平均 q_p 值大于分批培养,特别是在30h前大大高于分批培养。图8中补料分批培养在绝大部分耗糖量下的转

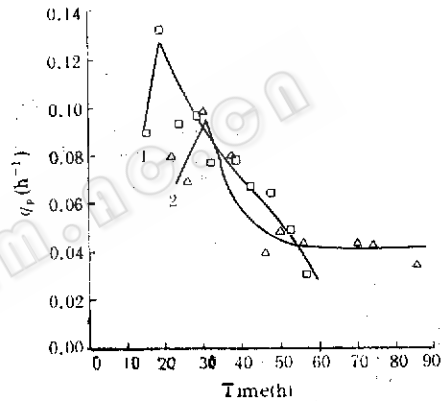


图 7 分批培养和补料分批培养过程比产酸速率的比较

Fig.7 Comparison of the specific L-valine formation rate between the batch and fed-batch cultures

1. 补料分批培养 Fed-batch culture
2. 分批培养 Batch culture

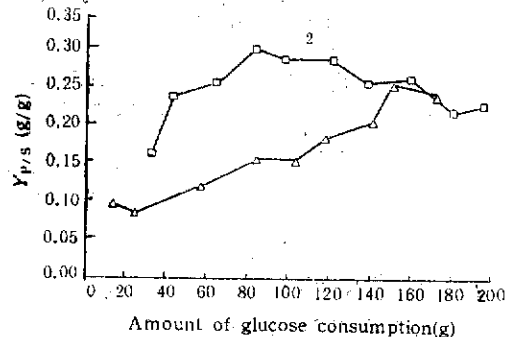


图 8 分批和补料分批培养过程糖转化率的比较

Fig.8 Comparison of the conversion rate of glucose to L-valine between batch and fed-batch cultures

1. 补料分批培养 Fed-batch culture
2. 分批培养 Batch culture

化率 $Y_{p/s}$, 都明显高于分批培养。这是由于分批培养时, 大部分糖都是在高浓度下

被消耗的; 而补料分批培养中所有的糖都是在低浓度下被消耗的。说明在高糖浓度

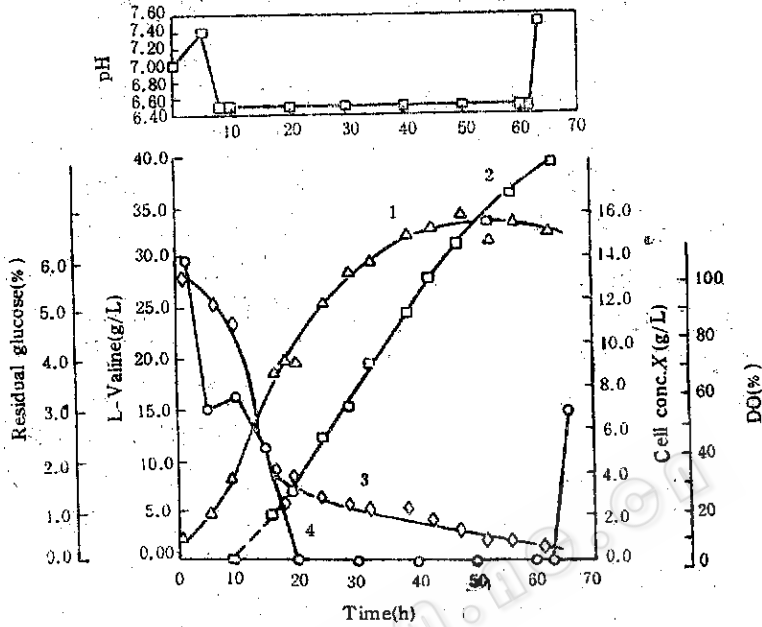


图 9 最佳控制模式下菌株125 L-缬氨酸补料分批培养过程
Fig.9 The fed-batch culture of L-valine fermentation under the control

1. 菌体浓度 Cell conc. 2. L-缬氨酸 L-valine
3. 残糖浓度 Residual glucose 4. 溶解氧浓度 DO

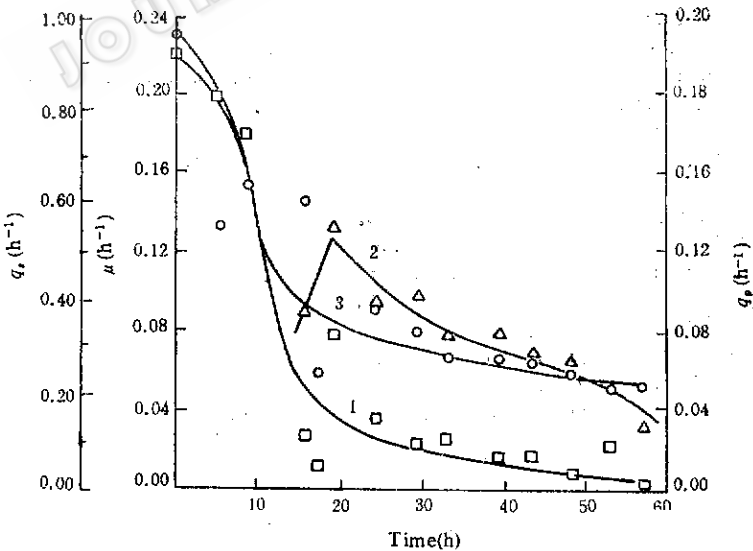


图10 最佳控制模式下菌株125L-缬氨酸补料分批培养过程中 μ 、 q_p 、 q_s 的变化
Fig.10 Changes in μ , q_p and q_s in fed-batch culture under the control

1, 比生长速率 μ (h^{-1}) 2, 比产酸速率 q_p (h^{-1}) 3, 比耗糖速率 q_s (h^{-1})

下会降低细菌利用葡萄糖转化成缬氨酸的能力。

(三) 菌株125 L-缬氨酸发酵供氧、补糖控制模式

综合以上研究,我们得到了菌株 125 L-缬氨酸发酵的一个较优化的控制模式即“低供氧和恒速补糖分批发酵”

$$\begin{cases} k_L a = 90.78 \text{ h}^{-1} (\text{DO} = 0) \\ F = k \quad (k = 3.75 \text{ g/h}) \end{cases}$$

用此模式对总糖 16.85% 的发酵,缬氨酸产量可达 38.2g/L,糖转化率为 22.67% (图 9, 10),超过国内文献报道的水平。

讨 论

通过本研究,我们了解到缬氨酸发酵在低溶氧下有利,并提出用 $k_L a$ 法控制供氧,但此法也有其局限性,因为只考虑了

设备的供氧能力,并不涉及到细胞的呼吸能力,如果发酵体系的耗氧强度受到其他因素的影响而发生变化时,就会引起供氧和耗氧的不平衡,偏离最适供氧。Akashi等^[11,16]引入了“氧满足度”参数作为在限氧发酵中氧供给控制的指标,它能反馈控制供氧。他们还用氧化还原电位较精确地测定低溶解氧浓度来反馈控制供氧。用上两种方法,他们取得了缬氨酸发酵满意的结果。国内目前尚缺乏这方面的设备,故在工业生产上难以应用。

我们得到的L-缬氨酸发酵的控制模式,简便实用,也便于放大。 $k_L a$ 可通过计算或用 Na_2CO_3 等方法测得,并可加以控制,恒定速度补料在工业上也较易实施。这些特点保证了该模式用于工业生产的可能性。

参 考 文 献

- [1] Hirose, Y. et al.: *Biotechnol. Bioeng.*, 22:Suppl. I, 111—125, 1980.
- [2] Yoshida, F. et al.: *Biotechnol. Bioeng.*, 1:257, 1973.
- [3] Pirt, S. J.: *Appl. Chem. Biotechnol.*, 24:415—424, 1974.
- [4] Yamene, T. et al.: *Advance in Biochemical Eng./Biotech.*, 30:147—194, 1984.
- [5] Hone, K. T. et al.: *J. Ferment. Technol.*, 62:49, 1984.
- [6] Kuzuki, T. et al.: *J. Ferment. Technol.*, 66:85—91, 1988.
- [7] Knrique, L. H. et al.: *J. Ferment. Technol.*, 62:205—210, 1984.
- [8] 王秀岭等:微生物通报, 17(5):276—279, 1990.
- [9] Sumner, T. B.: *J. Biol. Chem.*, 63:393, 1925.
- [10] 潘家秀等:蛋白质化学研究技术, pp. 27—28, 79—81, 1962.
- [11] Akashi, K. et al.: *J. Ferment. Technol.*, 55:364, 1977.
- [12] “微生物工程”编写组:微生物工程,上海人民出版社, p. 95, 1975.
- [13] 赵弘伟等:生物工程学报, 待发表.
- [14] 高俊德:工业微生物, 16(2):32, 1986.
- [15] 王选良:氨基酸杂志, (3):25—30, 1986.
- [16] Akashi, K. et al.: *J. Ferment. Technol.*, 57:321—327, 1979.

Study on the Oxygen Supply and Substrate Feeding in the L-valine Fermentation

Qu Mingbo Gong Jianhua Huang Herong

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

Study on L-valine fermentation were made in a 2.6 L jar fermentor using a valine producing mutant of *Corynebacterium pekinese* 125. The batch culture confirmed that the valine fermentation belonged to the kinetic type II of fermentation and the oxygen supply greatly affected the production of valine. The influence of the dissolved oxygen tension on the valine fermentation was investigated. The valine formation was maximum when the DO approached zero twenty hours later after the fermentation start. By means of the control of k_{La} , the oxygen supply was controlled. The maximum productivity occurred when $k_{La} = 90.78 \text{ h}^{-1}$. The batch culture also indicated that the higher glucose concentration in culture broth inhibited the ability of the mutant for valine formation and decreased the product yield. The possibility of improving valine production was then studied using fed-batch culture. Several constant feed rates were tested. Initial glucose concentration 60 g/L , was chosen in the batch period of the designed fed-batch culture. When the glucose conc. was reduced to $10 - 20 \text{ g/L}$, the additional glucose solution began to be added into the fermentor. The higher production was obtained at the feed rate of 3.75 g/h (glucose solution conc. of 420 g/L). Finally, a control strategy for the supply of oxygen and glucose in the fed batch culture valine fermentation was developed, i.e. the control method of low dissolved oxygen tension and the constant glucose feed. Using this strategy, the production of valine was improved to 38.2 g/L , and the product yield was 22.75% with total glucose concentration of 177.7 g/L . And this strategy provided a base of the valine fermentation scale-up.

Key words

L-valine; oxygen supply and substrate feeding; fed-batch culture