

应用规模缩小方法的鸟苷发酵过程放大*

蔡显鹏 陈双喜 储 炬 庄英萍 张嗣良**

(华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室 上海 200237)

刘咏梅 王仲石

(广东肇庆星湖生物科技股份有限公司 肇庆 526070)

摘要: 利用鸟苷生产菌株枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*) 754 #, 在 50L 发酵罐成功优化的基础上, 分别在 12M³ 的中试规模和 100M³ 的生产规模进行了放大, 产苷分别达到 29.4g/L 和 21.4g/L; 进而通过过程缩小 (scale down) 方法, 从代谢流动态变化的角度研究了放大过程中存在的问题, 发现 DO 是限制过程放大的另一重要因素, 据此将 50L 规模克服代谢流迁移的优化工艺成功放大到生产规模, 使产苷水平进一步提高了 18%, 达 25.2g/L。

关键词: 鸟苷, 发酵, 规模缩小, 放大

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2003) 02-0061-04

SCALE UP OF GUANOSINE FERMENTATION BASED ON SCALE-DOWN TECHNOLOGY

CAI Xian-Peng CHEN Shuang-Xi CHU Ju ZHUANG Ying-Ping ZHANG Si-Liang

(State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, ECUST, Shanghai 200237)

LIU Yong-Mei WANG Zhong-Shi

(Star Lake Bioscience Co., Inc., Zhaoqing, Guangdong province, Zhaoqing 526060)

Abstract: Based on the optimized technology on 50L scale, *B. subtilis* 754 # was used to manufacture guanosine on pilot-scale (12M³) and plant-scale (100M³) to give the production of 29.4g/L and 21.4g/L successively. Through scale-down the process of plant-scale to pilot-scale, based on the theory of dynamic metabolic flux, DO was found to be another key factor that limited the scale-up process. After conquering the DO limitation, the optimized technology was successfully scaled up to plant scale and the production was further increased by 18% to 25.2 g/L.

Key words: Guanosine, Fermentation, Scale down, Scale up

一个生物反应过程的开发, 通常是在实验室规模、中试规模优化研究的基础上最后才在大型生产设备中投入生产的, 但是在不同大小的反应器中进行相同的生物反应时, 在生物反应器质量、热量和动量传递上的差别, 有可能导致在大小不同的生物反应器中生物反应速率的差别, 有时候这种差异极其悬殊。尽管对反应器的放大已经确

* 上海市曙光计划资助项目 (01SG28)

** 联系人

收稿日期: 2002-03-28, 修回日期: 2002-05-25

立了许多放大准则^[1],但是由于微生物反应过程是分子水平的遗传特性、细胞水平的代谢调节和工程水平的传递特性3个水平上发生,使反应过程呈现高度的复杂性、多容量性和非线性,因而使上述放大准则的应用产生了很大的局限性。此外,在研究微生物发酵过程时,往往采用以动力学为基础的最佳工艺控制点为依据的静态操作方法,这实质上只是化学工程宏观动力学概念在发酵工程上的延伸,没有充分注意过程中发生的细胞代谢流变化及对反应器物料流的反馈影响。实质上,发酵过程放大的仍然是以代谢流研究为核心的优化过程,不仅在发酵的过程中代谢流会因受到抑制而发生迁移,而且在不同反应器规模,限制代谢流的因素也可能会发生变化。为此,张嗣良提出了在生物反应器中以细胞代谢流为核心的发酵工程学观点^[2]。

常规认为发酵过程的优化与放大是生化工程领域研究的两部分重要内容,而实质上,这是生化工程中同一个问题的二个侧面,只是人们进行研究的角度不同,并且就实验室成果向实际生产力的转化而言,发酵过程的放大更是成为过程优化、乃至生化工程研究的关键内容,从代谢流动态分析的角度研究过程放大无论从理论上还是从工程角度均有重要意义。

以鸟苷生产的发酵过程为对象,通过在50L发酵罐上的优化,作者成功地抑制了发酵过程代谢流的迁移,使鸟苷发酵产率大幅提高,达30 g/L水平^[3],但是该工艺在放大到生产罐规模后表现出显著差异,针对这一现象我们在中试罐上进行生产罐的规模缩小,通过发酵过程参数变化的相关性分析,确定了放大过程中限制鸟苷生成代谢流的另一的“瓶颈”所在,以此为依据实现了鸟苷发酵过程的成功放大,最终实现了生产规模产率的大幅度提高。

1 材料与方法

1.1 菌种

B. subtilis 754 # (A^- , 8- Ag^r), 由广东星湖生物科技股份有限公司提供。

1.2 培养基

1.2.1 种子培养基: 葡萄糖 10g, 蛋白胨 0.5g, 酵母膏 1.5g, 氯化钠 4g, 定容至 1L。

1.2.2 发酵培养基: 葡萄糖 150g, 谷氨酸钠 15g, 硫酸铵 20g, 硫酸镁 2g, 磷酸二氢钾 2g, 玉米浆 10g, 酵母粉 30g, 定容至 1L。

1.3 分析方法

1.3.1 鸟苷测定: 纸层析法^[4]。

1.3.2 葡萄糖测定: 葡萄糖分析仪 SBA-40B 型 (山东省科学院生物研究所)。

1.3.3 OD 测定: 样品稀释 20 倍, 于 721 型分光光度计测定 波长 650nm。

1.3.4 排气 O_2 浓度测定: CY-101 顺磁氧气体分析仪。

1.3.5 排气 CO_2 浓度测定: GXH-101 红外 CO_2 气体分析仪。

1.3.6 溶解测定: Mettler Toledo 在线溶氧检测系统。

1.3.7 pH 测定: Mettler Toledo 在线 pH 检测系统, 并离线校正。

1.4 发酵罐

通用型发酵罐: 容积 12M³ (二组六弯叶搅拌器), 容积 100 M³ (三组六弯叶搅拌器)。

2 结果与讨论

2.1 12M³ 中试罐和生产罐上的过程曲线

在 50L 规模反应器上进行的优化研究发现, 在发酵中后期 (40h 左右) 产苷速率通常会出现下降过程, 同时伴随有糖耗加快, 氨氮升高等一系列现象。经过分析我们认为这是由于代谢流迁移所致, 并通过加入代谢调节剂 (作用机理为抑制糖酵解途径通量, 从而减少相应的氨基酸、有机酸的积累, 维持产物持续形成) 的新工艺成功地抑制了发酵过程代谢流的迁移, 大幅度提高了产率^[3]。以此为依据, 我们在 12M³ 中试规模采用了经过改进的工艺。可以明显的看到, 经过工艺的改进, 在 12M³ 中试规模的表现与在 50L 规模的表现, 明显的抑制了代谢流的迁移 (图 1), 表明我们的方法是行之有效的。

从生产规模的发酵过程曲线 (图 2) 可以看出采用新工艺条件后, 尽管 NH₂-N 升高现象有所改善, 但产苷下降的趋势并没有明显地抑制, 从代谢流动态变化的角度分析, 这可能是有其他因素制约正常代谢过程鸟苷生成的代谢流。

过程参数比较可以发现, 在生产规模和中试规模过程 DO 差异显著, 中试规模控制 DO 水平基本维持平稳, 能够满足发酵过程的要求, 在发酵过程好氧最为剧烈的时期, 特别是 8~12 h, 中试罐可以将 DO 控制在 15%

20% 左右, 以满足菌体对于氧的需求。但是, 生产罐在生长期 DO 持续较低, 可能不足以满足正常代谢过程所需要的 NADH₂, FADH₂ 的再氧化以及 ATP 的生成, 造成能量供应不足, 严重影响了菌体的新陈代谢, 使细胞合成鸟苷的代谢流发生了变化; 而细胞为满足自身对能量的需求, 自然会通过其它途径产生能量, 如加强糖酵解途径和 TCA 循环的通量, 同时则会相应减少产生鸟苷的 HMP 途径的通量, 表现在前期糖耗速率较大和整个过程产苷速率较低 (图 3), 并且在后期产苷速率仍然下降, 表现出同 50L 罐相同的 OUR 下降, 并对工艺调整的反应不明显, 这很明显是前期的 DO 限制造成正常合成鸟苷的代谢流发生了变化的结果。

2.2 中试规模对生产罐发酵过程的规模缩小 (scale down)

为确证是否 DO 就是发酵过程中的限制性因素, 我们在 12M³ 中试规模控制其它参数与 100M³ 生产罐相同的情况下, 同样采用新工艺, 但是 DO 是拟合 100M³ 生产罐上的

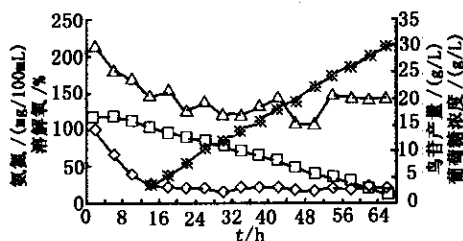


图 1 12M³ 中试规模新工艺过程曲线

—◇— 溶解氧, —△— 氨氮,
—□— 葡萄糖, —*— 产苷

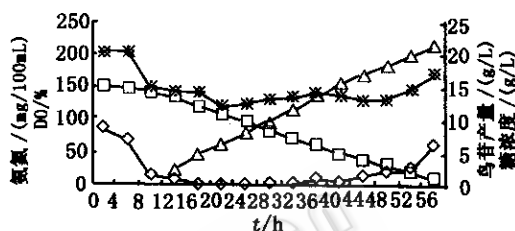


图 2 100M³ 生产规模新工艺过程曲线

—◇— 溶解氧, —*— 氨氮含量,
—□— 葡萄糖浓度, —△— 氨氮

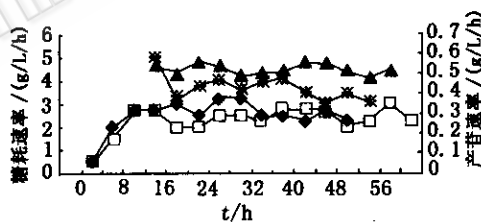


图 3 中试和生产规模糖耗速率
和产苷速率的比较

—□— 中试规模糖耗速率, —◆— 生产规模糖耗速率,
—▲— 中试规模产苷速率, —*— 生产规模糖耗速率

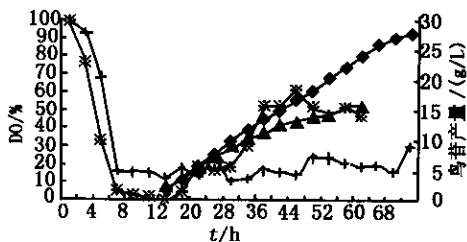


图4 模拟的生产罐发酵过程曲线

—○— 优化工艺的溶解氧, —*— 缩小工艺的溶解氧
—◆— 优化工艺的产量, —▲— 缩小工艺的产量

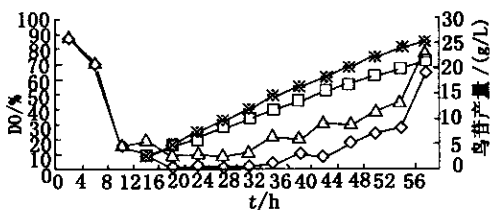


图5 生产罐优化前后产甘曲线

—◇— 初始的溶解氧, —△— 优化后的溶解氧,
—□— 初始的产量, —*— 优化后的产量

变化过程,以考察 DO 对过程的影响,结果发现在 12M^3 中试规模控制前期持续低 DO 的过程在后期同样表现出产甘速率明显降低(图4),完全与 100M^3 生产罐上相同。

至此我们可以得出结论:在鸟苷发酵的过程放大中,DO 已成为影响产甘的另一个重要因素,尤其是在菌体好氧最为剧烈的发酵前期,如果不能满足菌体对氧的需求,首先会打破正常代谢过程的能量平衡,由此会引起物质流,信息流的紊乱,这会对菌体的正常代谢产生重要的影响,导致后期 DO 大幅回升,即使采用改进的工艺仍不能改善发酵后期产甘速率下降的趋势。据此我们对生产罐进行了改造,使供氧状况改善之后成功地使优化工艺得到了放大。

3 结论

尽管早在 20 世纪 80 年代前就有大量关于鸟苷发酵的研究^[5,6];但主要只是集中在对各种理化因子的抗性菌株的选育和利用基因工程的手段构建高产菌株以提高产甘水平;而在发酵工艺方面则少有研究,大多是局限于培养基的优化和 pH,温度等摇瓶的实验,考虑过程控制优化和放大时基本上只是采用动力学为基础的最佳工艺控制点为依据的静态操作方法,而忽略了作为发酵过程中细胞代谢流的时变性;鸟苷本身是一个典型的代谢控制发酵产物^[7],在优良菌株的前提下,菌种性能的发挥在很大程度上依赖于工艺控制和过程优化,只有在充分考虑发酵过程中细胞代谢流动态变化的基础上研究发酵过程的优化与放大才能从本质上提高其产率。

对于已有的发酵工厂而言,发酵设备基本都已固定,为方便小试和中试的研究成果在生产规模的实现,或者针对性的解决生产规模出现的问题,就很有必要将现行的生产设备已有的环境条件缩小(scale down)到中、小试设备中,从而为生产规模的工艺改进或者生产设备的改造提供依据。我们通过在模拟生产罐发酵过程的中试罐上通过缩小方法进行发酵过程的曲线拟合,通过发酵过程参数趋势曲线变化的相关性分析,发现在放大过程中抑制鸟苷生成代谢流的主要因素已经变成了溶解氧,经过对参数调整成功地实现了放大,这进一步说明了基于细胞代谢流分析的过程动态优化理论的正确性。

参考文献

- [1] 张元兴,许学书.生物反应器工程.上海:华东理工大学出版社,2001.199~214.
- [2] 张嗣良.中国工程科学,2001,3(8):37~44.
- [3] 蔡显鹏,陈双喜,储炬,等.微生物学报,2002,2:232~235.
- [4] 汤生荣,黄卫红,侯左荣,等.工业微生物,1998,4:11~15.
- [5] Matsui H, Sato K, Enei H, et al. Appl Environ Microbiol, 1977, 34(4):337~341.
- [6] Miyagawa K, Kimura H, Nakahama K, et al. Bio / Technology, 1986, 4:225~228.
- [7] 张克旭,陈宁,张蓓,等.代谢控制发酵,北京:中国轻工业出版社,1998.382~387.