

不同补料控制方式发酵生产头孢菌素 C 的性能比较

桑美纳¹ 袁国强² 李红飞² 赵艳丽² 倪伟佳¹ 段生兵¹ 刘立明¹ 史仲平^{1*}

(1 江南大学 生物工程学院 工业生物技术教育部重点实验室 江苏 无锡 214122)

(2 石药集团河北中润制药有限公司 河北 石家庄 050041)

摘要: 在 7 L 发酵罐下, 对利用顶头孢霉菌(*Cephalosporins acremonium*)发酵生产头孢菌素 C (CPC)过程的最优底物流加工艺进行了研究。提出了一种新式硫酸-豆油耦联型的硫酸流加策略。该控制策略可将发酵液中的氨态氮浓度控制在 3-6 g/L 之间, 同时满足了发酵前期细胞生长与 CPC 合成对氮源和硫源的需求, 促进了顶头孢霉菌菌丝分化, 为发酵后期的 CPC 高效生产奠定了前期基础。比较了 CPC 合成期内间歇、匀速和 DO-Stat 自动流加 3 种不同豆油流加方式的发酵性能。研究发现, 耦联使用硫酸/后程通富氧空气 DO-Stat 法进行硫酸和豆油的同时补料和 CPC 发酵, 可将碳源浓度与溶解氧浓度 DO 同时控制于适中水平, 使 CPC 合成以高浓度和低副产物积累的方式进行, 最终 CPC 浓度和得率分别达到 35.77 g/L 和 13.3%。主代谢副产物脱乙酰氧头孢菌素 C (DAOC)的积累量和 DAOC/CPC 分别仅有 0.178 g/L 和 0.5%。

关键词: 顶头孢霉菌, 头孢菌素 C, DO-Stat, 发酵, 补料

Cephalosporin C fermentation performance under different ammonium sulfate and soybean oil feeding strategies

SANG Mei-Na¹ YUAN Guo-Qiang² LI Hong-Fei² ZHAO Yan-Li² NI Wei-Jia¹
DUAN Sheng-Bing¹ LIU Li-Ming¹ SHI Zhong-Ping^{1*}

(1. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

(2. CSPC Hebei Zhongrun Pharmaceutical Co. Ltd., Shijiazhuang, Hebei 050041, China)

Abstract: Various substrates feeding strategies for cephalosporin C (CPC) efficient production by *Cephalosporins acremonium* were studied and conducted in a 7 L fermentor. A novel ammonium sulfate feeding strategy in couple with soybean oil addition was proposed. With this strategy, NH_4^+ concentration in fermentation broth could be stably maintained in a range of 3-6 g/L throughout fermentation pe-

基金项目: 国家科技支撑计划项目(No. 2007BAI26B02); 国家 973 项目(No. 2007CB714303)

* 通讯作者: Tel: 86-510-85918292; 信箱: zpshi@jiangnan.edu.cn

收稿日期: 2011-01-24; 接受日期: 2011-04-02

riod, simultaneously satisfying the demands on nitrogen and sulfur sources for cells growth and CPC synthesis, promoting *Cephalosporins acremonium* hyphal split, and creating the prerequisite for the subsequent CPC efficient production. Based on the novel ammonium sulfate feeding strategy, performance of the subsequent CPC fermentations with different soybean oil feeding strategies, namely intermittent, constant rate and automatic DO-Stat feeding was compared. Feeding ammonium sulfate in couple with the soybean oil feeding in a manner of DO-Stat+oxygen-enriched air aeration at late fermentation phase could control carbon source concentration and DO at adequate levels, ensuring efficient CPC synthesis in a way of high CPC concentration and low by-product accumulation. With this combinational feeding strategy, final CPC concentration and CPC yield could reach 35.77 g/L and 13.3%, respectively, the major by-product, de-acetoxycephalosporin (DAOC) and DAOC/CPC were only 0.178 g/L and 0.5%.

Keywords: *Cephalosporins acremonium*, Cephalosporin C, DO-Stat, Fermentation, Feeding

头孢菌素 C (Cephalosporin C, CPC)是生产头孢类抗生素的主要原料,其终端产物——各类头孢类抗生素在临床上应用广泛^[1]。工业头孢菌素 C 生产所使用的主要生产菌株为顶头孢霉菌 (*Cephalosporins acremonium*)^[2]。

顶头孢霉菌细胞在发酵过程中会不断分化,所呈现的细胞形态主要有细长菌丝、中等膨大的断裂菌丝、高度膨大的断裂菌丝、单细胞节孢子和分生孢子^[3]。细胞的正常分化与 CPC 的合成关系密切,CPC 主合成期发生在细胞由高度膨大的断裂菌丝逐渐断裂成球形单细胞节孢子的时期,高度膨胀菌丝的形成是影响 CPC 合成的重要因素^[4]。CPC 发酵需要流加硫酸铵(硫铵)为细胞与 CPC 的合成提供氮源,同时为调节 pH 还要自动添入氨水,因此,发酵液中的氨态氮浓度始终处在动态变化状态。当氨态氮浓度超过一定水平,菌丝的正常分化就会受到抑制^[5],从而导致 CPC 合成速度的降低。优化 CPC 生产中的硫铵流加方式,控制氨态氮浓度于适当水平对提高 CPC 发酵性能非常重要。

另一方面,CPC 是顶头孢霉菌的次级代谢产物。在 CPC 合成过程中,淀粉和糊精等糖类物质会抑制 CPC 合成的关键酶,如 ACV 合成酶、扩环酶和羟化酶等,严重影响 CPC 的正常合成^[6]。Pan 等人在利用顶头孢霉菌 BC-2116 生产 CPC 的培养基中加入脂肪酸甲酯作为主要发酵碳源,发现了油脂物质对 CPC 合成的促进作用^[7]。有关植物油和脂肪酸对抗生素生产和霉菌/真菌代谢生产有用物质具有促进

作用的报道也很多^[8-9]。油脂代谢的中间产物有利于 CPC 前体氨基酸(α -氨基己二酸、缬氨酸、半胱氨酸、 α -酮戊二酸等)的合成^[10]。因此,在 CPC 合成期通常采用豆油作为 CPC 发酵生产的主要碳源。CPC 发酵是一个高耗氧过程,不仅能量代谢需要耗氧,而且 CPC 合成的某些特定反应也需要氧作为电子受体或反应底物,如 CPC 合成途径中的异青霉素 N 合成酶、扩环酶就需要氧作为电子受体和反应底物^[11]。另外,丝状霉菌发酵液粘度高的特征也造成了发酵过程供氧困难。CPC 发酵的高耗氧特征和供氧难题使得发酵过程的 DO 难以控制,DO 经常处于接近于饱和度 0 的低水平。因此,如何控制 DO 于适度水平已经成了高产 CPC 的瓶颈^[12]。理论上,CPC 合成底物的适度匮乏可以缓解 DO 控制难的问题,合理流加豆油,同时满足底物的适度充裕和 DO 的适中是提高 CPC 整体发酵性能的关键。然而,有关如何进行豆油流加,特别是同时满足底物适度充裕和 DO 适中的研究报道很少,有限的文献集中在使用匀速流加法补油生产 CPC 等方面^[13]。另外,CPC 发酵还伴随有代谢副产物去乙酰氧头孢菌素 C (DAOC)的积累,该物质是 CPC 发酵产品的主要杂质。DAOC 与 CPC 的分子结构相近,后续的产品精制提纯工艺很难将其与 CPC 分离,DAOC 的积累严重影响了 CPC 的产品质量^[14],工业生产中要求 DAOC/CPC (质量比)不超过 0.5%。有研究报道表明^[15],DO 控制水平影响 DAOC 的积累。

我国是世界上最大的 CPC 系列头孢类抗生素药

生产国, 其工业发酵水平基本代表了世界同类产品的最高水平。目前, 国内各主要生产厂家使用一线优良菌株的 CPC 发酵水平在 30–35 g/L 左右, 最高可达 40 g/L。但发酵工艺相对落后, 仅靠离心分离目测发酵液中的油含量, 经验性地流加油和硫铵。另外, 国内外文献报道中的 CPC 最高发酵效价为 32 g/L^[16]。

基于以上背景, 本研究以提高头孢菌素 C 的整体发酵性能为目标, 提出了各种硫铵和豆油的自动流加控制策略, 并对不同流加策略下的主要发酵性能指标进行了比较研究。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验菌种: 顶头孢霉菌 (*Cephalosporium acremonium* HC3), 是由石药集团中润制药公司提供的次优生产菌种(上一代生产菌种)。

1.1.2 培养基: 种子培养基(g/L): 葡萄糖 5, 蔗糖 35, 玉米浆 31, 豆油 5, D,L-蛋氨酸 0.5, (NH₄)₂SO₄ 8, CaCO₃ 5。pH 6.5。

(初始)发酵培养基(g/L): 淀粉 30, 糊精 60, α -淀粉酶(20 000 U/mL) 0.2, 玉米浆 50, 市贩豆油 50, D,L-蛋氨酸 6, 尿素 3, (NH₄)₂SO₄ 13, KH₂PO₄ 9, MgSO₄·7H₂O 3, FeSO₄·7H₂O 0.08, CaCO₃ 10, ZnSO₄·7H₂O 0.02, MnSO₄·H₂O 0.02, CuSO₄·5H₂O 0.02。pH 6.2。

流加培养基: 市贩豆油, 硫铵 200 g/L, 氨水(25%, W/W)。

1.2 实验方法

斜面活化培养: 恒温(28 °C)培养 7–8 d。

种子培养: 500 mL 三角瓶中装液量 50 mL, 8 层纱布封口。旋转式摇床上 240 r/min、28 °C 下振荡培养 72 h。

7 L 罐发酵: 装液量 4.25 L, 接种量 0.75 L。发酵前 50 h 控制温度于 28 °C, 之后降至 25 °C。自动流加硫酸(20%, W/W)和氨水(25%, W/W)控制发酵液 pH 于 5.5–5.6 的范围。按照需要(后述)流加硫铵和豆油, 发酵约 160–200 h 后放罐。使用空气时通气量为 2.5:1 vvm。发酵开始时搅拌转速为 300 r/min, 随

着发酵的进行, DO 不断下降, 当 DO 低于 20% 时手动提高搅拌转速(每次提高 50 r/min)。当搅拌转速达到最大值 980 r/min 仍无法维持 DO 的稳定基线(下限)于 20% 以上时, 则通入富氧空气(O₂ 含量约 50%)来控制 DO。

1.3 实验设备与分析方法

1.3.1 实验设备: 7L 发酵罐(7BG-1000), 上海保兴公司产, 配有 DO/pH 在线测量和控制系统, 可通过控制柜的 RS232 通信接口与工业控制计算机(工控机)进行数据通信。尾气分析仪(LKM2000A, 韩国 LOKAS 公司产)、电子天平(JA1102, 上海海康公司产)等测量仪器的信号输出借助 RS232 通信接口或多通道 A/D-D/A 数据采集卡(PCL-812PG, 台湾研华公司产)在线输入和记录到工控机中, 并根据自我编制的软件在线计量耗氧速度 OUR、CO₂ 释放速度 CER、任意时间间隔内的豆油和硫铵添加量、氨水耗量和 DO 等过程状态参数。工控机根据上述数据、相应的控制策略和执行软件(Visual Basic, Ver. 6.0), 借助 A/D-D/A 数据卡驱动程序可调式蠕动泵(BT00-100M, 保定兰格公司产)流加豆油和硫铵。

1.3.2 分析方法: 使用高效液相色谱(HPLC)测定头孢菌素 C (CPC)和脱乙酰氧头孢菌素(DAOC)的浓度。色谱柱: ODS C18 柱, 4.6 mm×250 mm; 流动相: 甲醇/重蒸水/磷酸(V/V/V)=15/85/0.05; 流速: 0.8 mL/min。使用紫外检测器检测, 波长 254 nm, 温度 30 °C, 进样量 30 μ L。菌体湿重测定: 取发酵液 20 mL, 在高速冷冻离心机 8 000 r/min 下离心 15 min, 收集保存上清液。称量沉淀重量, 计算菌体湿重。使用生物传感分析仪(SBA-40C, 山东省科学院产)测定发酵液的残糖浓度。氨态氮浓度测定方法见文献[17]。

1.4 营养物质流加策略

1.4.1 硫铵流加策略(氮源和硫源添加): 硫铵流加策略 1: CPC 发酵过程中, 随着发酵的进行, pH 先上升、后下降。pH 的这种变化趋势是由于细胞代谢不同的氮源物质所造成的。发酵前期细胞优先利用有机氮源, 释放 NH₄⁺ 导致 pH 上升; 有机氮源耗尽后, 细胞开始利用无机氮源, pH 下降。当 pH 开始下降后, 自动流加氨水控制发酵液 pH 于 5.5。自动流加

氨水控制 pH 虽然也可以为细胞生长提供氮源,但却无法为 CPC 合成提供硫源。为向细胞生长和 CPC 合成提供充足的无机氮源和硫源,当 pH 开始下降后以 0.25 g/(L·h)的速度匀速流加硫酸铵。硫酸流加策略 2: 根据 CPC 和硫酸铵中的 S 元素含量、以及 CPC 对豆油的经验得率,将流加硫酸铵与豆油添加相耦联。通过在线计量任意时间间隔内的豆油流加量,并利用自编的控制程序,每 4 h 自动间歇式地流加硫酸铵 1 次,流加量为该流加时刻以前 4 h 内的豆油添加总量乘以系数 0.17。pH 控制同硫酸流加策略 1。

1.4.2 碳源(豆油)流加策略: 以下各种不同的豆油流加策略均建立在硫酸流加策略 2 的基础之上。策略 1——间歇流加(发酵批次 a): 当发酵培养基中的豆油消耗殆尽后,DO 突然上升。当 DO 超过某一 DO 控制上限后(此条件下为饱和度 80%),蠕动泵被自动驱动,一次性添加豆油 50 g,这样 DO 可在短时间内重新降低到其稳定的基线水平。策略 2——匀速流加(发酵批次 b): DO 突然上升(豆油消耗殆尽)后,匀速流加豆油。流加速率: 豆油流加开始后前 34 h 为 2.25 g/(L·h),以后降低至 1.15 g/(L·h)。策略 3——DO-Stat 法自动流加(发酵批次 c 和 d): 当 DO 超过控制上限后自动流加豆油,DO 降到控制上限以下则豆油流加自动停止。

2 结果与讨论

2.1 硫酸流加策略对 CPC 合成的影响

发酵批次 1,按照 1.4.1 所述的硫酸流加策略 1 进行。CPC 发酵产杂酸少,发酵液 pH 的降低标志着发酵培养基中可利用的有机氮源已基本耗尽、细胞开始利用无机氮源。为保证有充足的无机氮源、特别是硫源可用于 CPC 合成和细胞生长,当 pH 开始下降后,硫酸铵和氨水的添加同时进行。然而,经验式地流加硫酸铵存在很大问题: 不合适的硫酸铵供给或导致氮源(以氨态氮 NH_4^+ 浓度为指标)过剩,或造成氮源浓度低下。另一方面,考虑到 CPC 的分子结构(分子式 $\text{C}_{16}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_8\text{S}$,分子量 415)、CPC 对豆油的经验得率(0.11 g-CPC/g-豆油)、硫酸铵分子量和硫酸铵中的 S 含量,并假定 *Cephalosporium acremonium* 的构成元

素仅为 C、N、O 和 H,则根据硫元素质量守恒原则: 每合成含 1 g S 元素的 CPC 所需豆油量为 126.6 g; 而 4.31 g 硫酸铵(含 1 g S)中的 S 全部经由硫酸根逆转硫途径进入到 CPC 分子中,纯硫酸铵与豆油的理论质量比应为 0.034。因此,在使用浓度 200 g/L 硫酸铵的前提下,满足 CPC 正常合成的豆油与硫酸铵消耗质量比应为 1:0.17。在实施发酵批次 2(硫酸流加策略 2)时,将硫酸铵与豆油的流加量以比例系数 0.17 相耦联进行硫酸流加,即硫酸流加量=0.17×豆油流加量。图 1 是两种不同硫酸流加策略下的硫酸铵、豆油和氨水流加量的时间变化曲线。

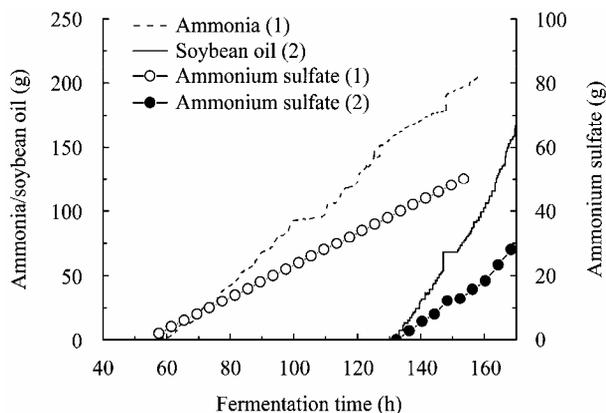


图 1 两种不同硫酸流加控制策略下的硫酸铵、豆油和氨水流加量的时间变化曲线

Fig. 1 Time courses of ammonium sulfate, soybean oil and ammonia addition amount under different ammonium sulfate feeding strategies

图 2 是使用两种不同的硫酸流加控制策略时,整个发酵过程的氨态氮和 CPC 浓度(0-180 h),以及发酵中间阶段的 OUR 和 DO (20-110 h)的时间变化曲线。图 1 和图 2 的结果显示,60 h 启动硫酸流加控制策略 1 后,氨态氮浓度逐渐升高,最终达到 17 g/L 左右。硫酸控制策略 2 的启动依赖于碳源完全耗尽、DO 的急剧上升,以及 DO-Stat 法流加豆油(使用后述的传统 DO-Stat 豆油流加策略-发酵批次 c)的实施,启动时间在发酵 130 h 左右,明显滞后于流加策略 1 的启动时间。在 pH 开始降低之后、豆油流加之前(60-130 h),发酵培养基中的初始氮源和为控制 pH 所添加的氨水可将氨态氮浓度大致控

制在 3–6 g/L 范围内。发酵 130 h、启动流加策略 2 后, 氨态氮浓度依旧可以维持在 3–6 g/L 的水平。

使用硫酸流加策略 1 时, 发酵中期(30–100 h) 相同发酵时刻的耗氧速度 OUR 明显低于使用硫酸流加策略 2 时的 OUR。但是在发酵 80–95 h 间, 即便将搅拌转速调到最大(980 r/min), 依旧无法对 DO 进行控制, DO 在接近于 0 的极低水平徘徊了近 15 h。与此相对应, 使用硫酸流加策略 2 (硫酸-豆油耦联流加) 时, 尽管 OUR 水平高、耗氧需求大, 但是发酵中期的 DO 却始终能控制在 20%–40% 左右的范围内。很显然, 使用硫酸流加策略 1 时, DO 在接近于 0 的低水平徘徊而无法得到控制不是由于细胞代谢旺盛、耗氧巨大所造成的。两种不同硫酸流加策

略下(发酵 70 h) 的菌丝形态照片(图 3) 表明, 使用控制策略 2 时, 发酵 70 h 细胞已经分化成高度膨胀的断裂菌丝; 而使用控制策略 1 时, 发酵 70 h 细胞依旧未分化、细胞形态是细长的菌丝。由于菌丝没有正常分化, 细长菌丝不断生长势必造成发酵液粘度增大、氧气传递系数降低, 进而造成供氧困难, 最终导致供氧和耗氧平衡的破坏、DO 无法控制。DO 长期徘徊于极低水平反过来又会进一步抑制菌体的分化, 同时引起细胞代谢活性的下降。即使在 72 h 后通入富氧空气, 改善了发酵系统的供氧状况, 但 CPC 最终浓度依旧很低(图 2)。使用硫酸流加策略 1 时, CPC 产量低是因为发酵液中硫酸浓度过高、顶头孢霉菌始终无法正常分裂, 即使高剪切力也无法

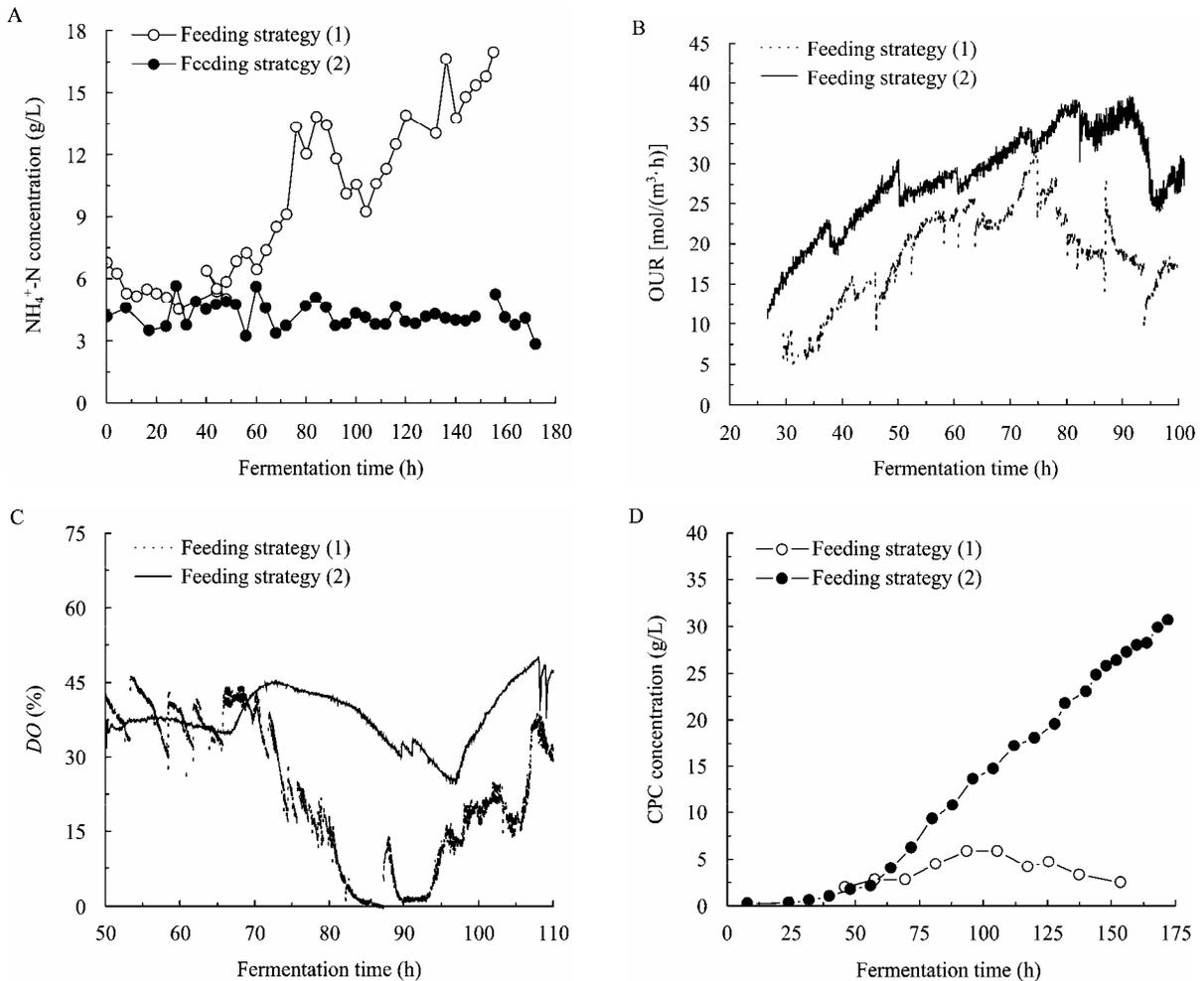


图 2 两种不同的硫酸流加控制策略下的发酵性能
 Fig. 2 Fermentation performance under different ammonium sulfate feeding strategies

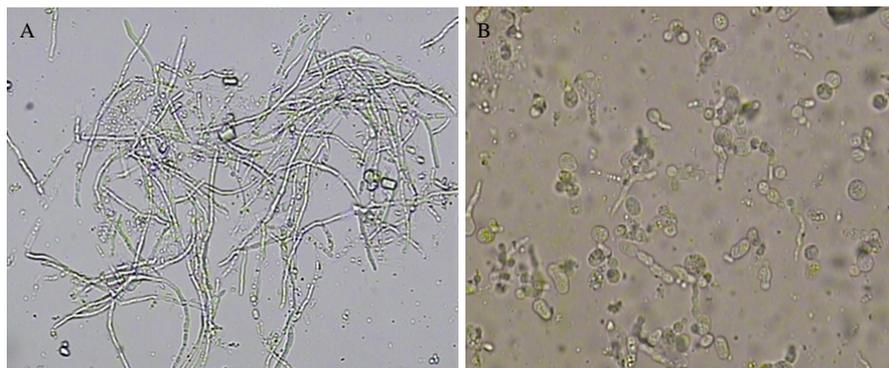


图3 两种不同硫酸铵流加控制策略下的菌丝分化形态(40×10)

Fig. 3 Morphological shapes of *Cephalosporium acremonium* under different ammonium sulfate feeding strategies (40×10)

注: A: 策略 1, 发酵 70 h; B: 策略 2, 发酵 70 h.

Note: A: Strategy 1, 70 h; B: Strategy 2, 70 h.

强行剪断和分化丝状菌体, 最终导致系统传氧能力下降、DO 低下且无法控制。另一方面, 使用硫酸铵流加策略 2 (硫酸-豆油耦联流加控制) 时, 整个发酵期间的氨态氮浓度可基本稳定在 3-6 g/L 的范围内, 发酵中期细胞可正常分化为高度膨胀的断裂菌丝, 发酵过程的 OUR 高、菌体代谢旺盛, 且 DO 水平可控, 有利于细胞的生长和 CPC 的合成, CPC 最终浓度达到 30.7 g/L。因此, 硫酸-豆油耦联流加策略是一种较优的硫酸铵流加控制方式, 它确保了发酵中前期细胞的正常分化, 为发酵后期利用豆油进行 CPC 的高效合成生产奠定了前期基础。

2.2 不同豆油流加控制方式对 CPC 合成的影响及其发酵性能比较

CPC 主合成期(发酵后期), 豆油流加控制方式的好坏既影响到 CPC 的最终浓度和产品质量, 也能制约 CPC 发酵的操作成本。图 4 是不同豆油流加控制方式下的 CPC 发酵曲线和发酵性能比较。发酵批次 a 采用自动间歇补料控制方式添加豆油, 当搅拌转速达到最高限(980 r/min)、DO 控制基线(下限)仍低于 20% 时则通入富氧空气。发酵批次 b 采用匀速流加法补加豆油。发酵批次 c 采用 DO-Stat 法自动流加豆油、发酵全程一直使用空气。发酵批次 d 同样采用 DO-Stat 方法自动进行豆油流加, 但仅在 DO-Stat 无法正常实施时才通入富氧空气。顶头孢霉菌是高度好氧微生物。图 5 显示 CPC 合成代谢途径

中的异青霉素合成酶, 生成脱乙酰氧头孢菌素 C (DAOC) 和脱乙酰头孢菌素(DAC)的扩环酶/羟化酶都需要氧气作为反应底物, 但 CPC 合成途径中的最后一步反应(DAC→CPC)并不需要氧气。因此, DO 水平过低, 碳源过量, 发酵中间代谢产物特别是异青霉素 N 和 DAOC 难以继续向 DAC 和 CPC 转化, 导致 CPC 合成能力下降和 DAOC 积累。而如果 DO 水平过高且碳源不匮乏, 好氧性代谢中间产物异青霉素、DAOC 和 DAC 的生成积累迅速, 但由于非耗氧反应 DAC→CPC 有限的代谢能力和瓶颈作用, 也会导致异青霉素、DAOC 和 DAC 无法向 CPC 高效转化而过度积累, 最终造成 CPC 产品质量下降。因此, 只有将 DO 维持在某一合适的平均浓度水平(比如平均浓度 40%)上, CPC 才有可能比较顺利地合成, 且没有主代谢副产物 DAOC 的积累。豆油添加量过小(传统 DO-Stat 法, 发酵批次 c), 虽然 DO 水平适中、操作成本低(低豆油消耗+无富氧通气操作), 但底物浓度过低, CPC 合成受限, 导致 CPC 产量(最终浓度)低, 总体发酵性能不好。过量添加豆油则碳源过剩(匀速流加), 将使得细胞代谢过于旺盛、氧耗大, DO 水平过低, 为此不得不使用富氧空气来调控 DO。但是, 使用富氧空气又将增加发酵操作成本, 而且一旦 DO 长时间处于过高水平, 好氧代谢副产物 DAOC 的积累也将不可避免, 这将极大影响发酵产品 CPC 的质量。

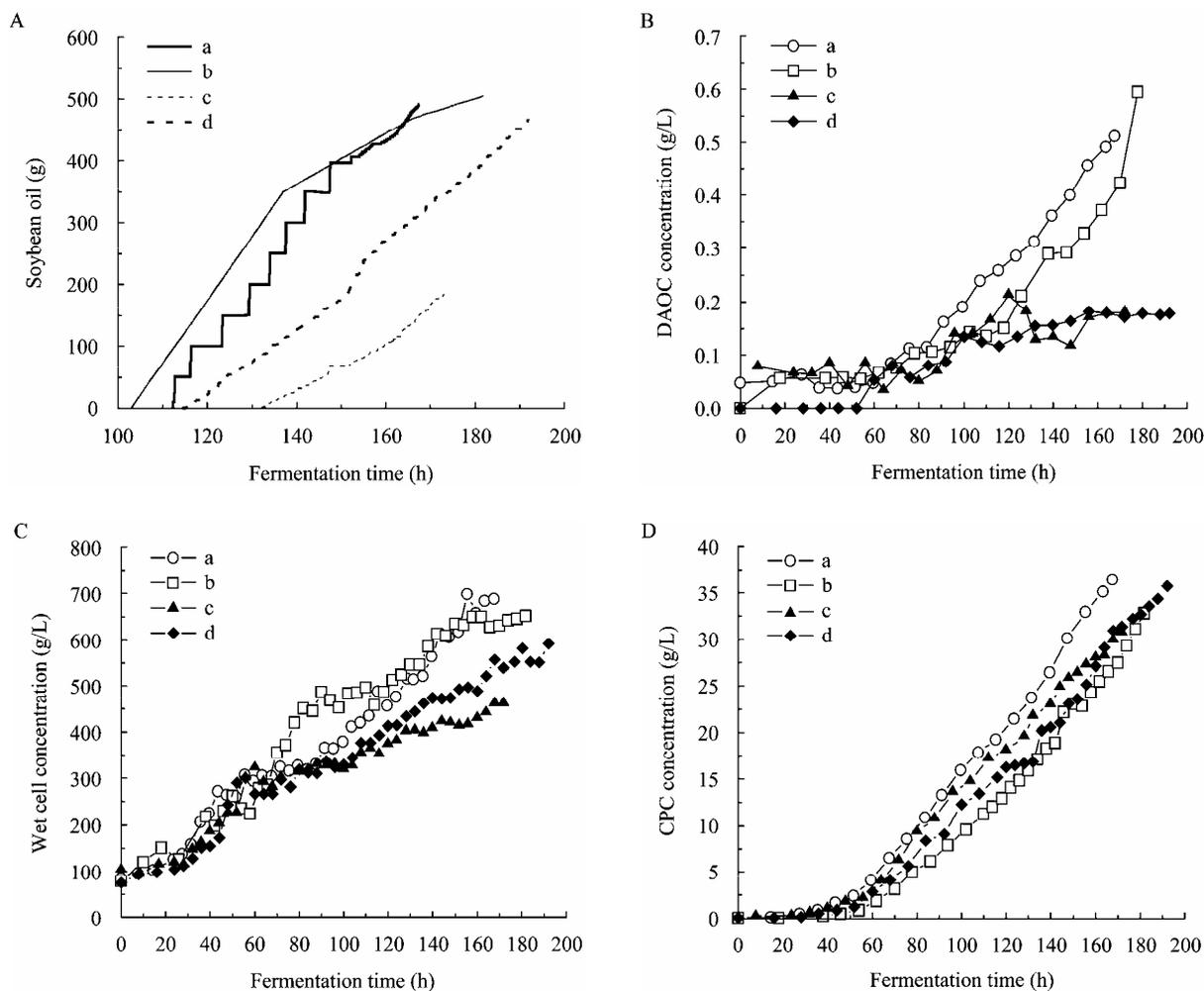


图 4 不同豆油流加控制方式下的 CPC 发酵曲线和性能

Fig. 4 Fermentation time courses and performance when using different soybean oil feeding strategy

注: a: 间歇流加; b: 匀速流加; c: DO-Stat 法(全程通空气); d: DO-Stat 法(后期通富氧空气)。硫酸铵添加使用硫酸铵控制策略 2。

Note: a: Intermittent feeding; b: Constant rate feeding; c: DO-Stat feeding; d: DO-Stat feeding (Using O₂-enriched air in late feeding stage). Ammonium sulfate feeding strategy 2 was adopted for ammonium sulfate feeding.

图 6 是不同豆油流加控制模式下的 DO 变化曲线。间歇流加的 DO 控制性能不好, DO 时高时低、且经常处于高位(60%–80%), 最终导致发酵性能的恶化。使用匀速流加策略(发酵批次 b)时, 由于流加速度设定过高[2.25 g/(L·h)], 导致豆油过剩、细胞代谢过于旺盛, 即便通入富氧空气 DO 也只能在较低的水平上徘徊波动, 有时甚至降到 20% 以下。为此, 豆油流加开始 34 h 后, 将流加速度调低到 1.15 g/(h·L), 以缓解供氧压力。该批次发酵的总豆油流加量为 505 g, 但 CPC 最终浓度只有 32.8 g/L, DAOC 积累量

高达 0.6 g/L, 且氧耗巨大。发酵批次 c 采用 DO-Stat 方式自动流加豆油, 全过程一直使用空气。此条件下 DO 长期在控制上限附近徘徊而迟迟无法超过该上限, 导致 DO-Stat 法的启动频率越来越慢, 自动补料速度也越变越小。其结果是不得不在发酵过程中手动调低 DO 的控制上限, 以此来缓解补油速度不断下降的问题。但当 DO 控制上限调低至 30% 后, 控制上限已经充分接近 DO 稳定基线(下限)的 20%, DO-Stat 法的实施自身都产生了问题(DO 控制上下限范围过窄), 最后不得不在 172 h 提前终止发酵。

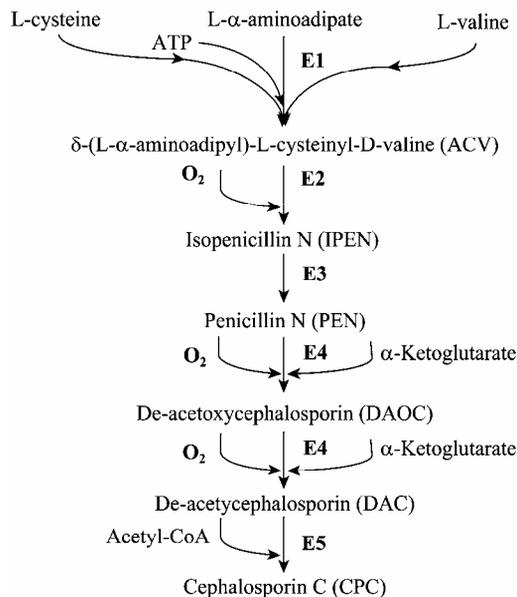


图5 CPC合成代谢图

Fig. 5 Metabolic map of CPC synthesis

注: E1: ACV合成酶; E2: 环化酶; E3: 差相异构酶; E4: 扩环酶/羟化酶; E5: 乙酰转移酶。

Note: E1: ACV synthetase; E2: Cyclase; E3: Epimerase; E4: Expandase/hydroxylase; E5: Acetyltransferase.

采用 DO-Stat+发酵后期通富氧空气的控制策略(发酵批次 d), 可由 DO 控制上限稳定地控制豆油流加, 平均 DO 水平稳定在 40%–50% 左右, 且瞬时 DO 水平也从未降低到 20% 以下。此时, 碳源适度匮乏, 图 5 所示的 CPC 合成途径的碳代谢速度适中, 碳代谢速度与耗氧速度基本匹配, 好氧性中间代谢副产物异青霉素、DAOC 和 DAC 生成后即被消耗、基本没有积累。此时, CPC 最终浓度和其对豆油的得率分别达到 35.77 g/L 和 13.3%, 纯氧消耗量不大, 主代谢副产物 DAOC 积累量仅为 0.178 g/L。

使用不同的豆油流加方式, 发酵性能有所不同。间歇流加和 DO-Stat+后期通富氧空气的 CPC 最终浓度高, 分别达到 36.48 g/L 和 35.77 g/L。DO-Stat 豆油流加法耗氧少、操作成本低, CPC 得率较高、豆油利用充分, 更为重要的是主代谢副产物 DAOC 的最终浓度低, CPC 产品质量可以得到保障。综合 CPC 最终浓度、DAOC 积累和发酵成本来看, DO-Stat 豆油流加法, 特别是 DO-Stat+后期通富氧空气流加控

制方法的性能最为优越。不同豆油流加控制策略下的发酵性能总结概括于表 1。

DO-Stat+后期通富氧空气补油耦联硫铵流加控制法虽然可以提高 CPC 产量、降低 DAOC 积累、有利于缓解发酵产品后提取的压力和降低精制成本, 但后期通富氧空气会造成发酵生产成本的增加。7 L 玻璃发酵罐下通富氧空气, 由于罐压无法上调, 后期传统 DO-Stat 法流加豆油耦联硫铵添加难以进行。工业 CPC 发酵一般是上百吨规模, 发酵均在耐压不锈钢发酵罐内进行。这时, 通过提高罐压可以增加 DO 对碳源匮乏的敏感度, 即使发酵全程使用空气, 使用传统 DO-Stat 法进行补料控制依旧有望取得相同的 DO 控制效果, 提高发酵性能。另外, 本文提出的控制策略核心就是使用 DO-Stat 法自动(耦联)补加豆油和硫铵, 因此, 正确地在线跟踪测量 DO 是控制策略取得成功的关键。我们正在利用计算流体力学 CFD 软件模拟大罐 CPC 发酵下的 DO(气/液)和豆油(液/液)分布规律, 寻找罐内 DO/豆油分布相对均匀的主体区域, 并据此将 DO 探头设置在该区域内以正确追踪 DO 的真实变化, 尽量避免因 DO/底物分布不均所引起的 DO 波动, 实现最优流加控制策略的工业化实施。

3 结论

(1) CPC 发酵过程中硫铵的流加控制非常重要, 硫铵流加控制不当, 会抑制顶头孢霉菌的分化, 造成发酵系统黏度上升、供氧困难, 对 CPC 合成产生极大的负面影响。硫铵-豆油耦联型硫铵补料策略可将发酵液中的氨态氮浓度控制 3–6 g/L 左右的水平, 确保菌丝的正常分化, 同时满足 CPC 合成对氮源和硫源的需求, 为 CPC 高效合成奠定了前期基础。

(2) 溶解氧浓度 DO 是左右 CPC 整体发酵性能的关键因素。同时控制豆油浓度和 DO 于适度水平对于提高 CPC 最终浓度、抑制主代谢副产物 DAOC 的积累至关重要。DO-Stat+后期通富氧空气的豆油流加策略可以提高 CPC 的最终浓度和得率, 减少主代谢副产物 DAOC 的积累, 降低操作成本, 提高了 CPC 发酵的综合性能指标。

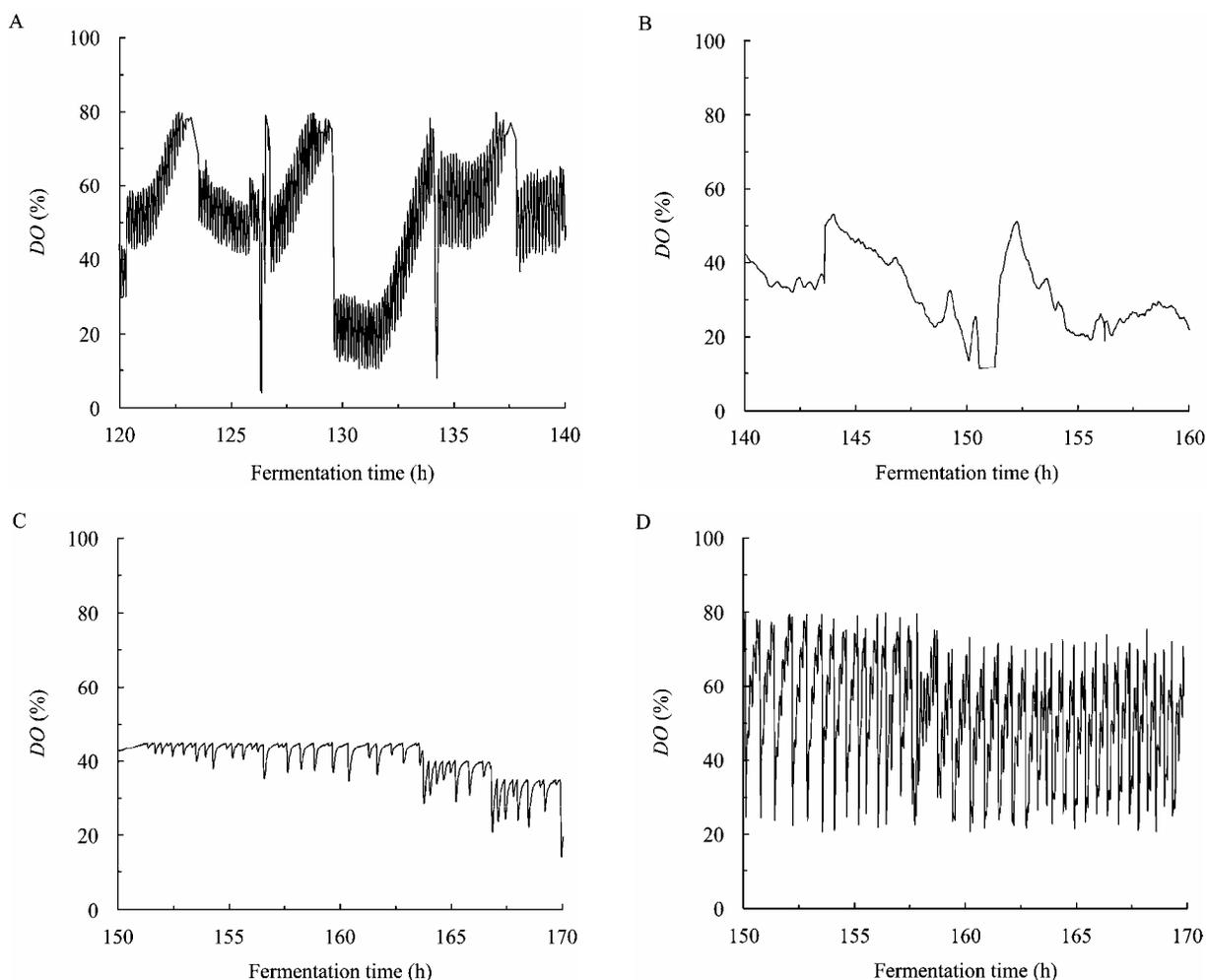


图 6 不同豆油流加控制模式下的 DO 变化曲线

Fig. 6 DO Profile under different soybean oil feeding strategies

注: A: 间歇流加; B: 匀速流加; C: DO-State 法(全程通空气); D: DO-State 法(后期通富氧空气). 硫酸添加使用硫酸控制策略 2.

Note: A: Intermittent feeding; B: Constant rate feeding; C: DO-State feeding; D: DO-State feeding (Using O₂-enriched air in late feeding stage). Ammonium sulfate feeding strategy 2 was adopted for ammonium sulfate feeding.

表 1 不同豆油流加方式发酵生产 CPC 的性能比较

Table 1 CPC fermentation performance when using different soybean oil feeding strategies

发酵批次 Fermentation run	流加策略 Soybean oil feeding strategies	最终 CPC 浓度 Final CPC conc. (g/L)	CPC 得率 CPC yield (%)	最终 DAOC 浓度 Final DAOC conc. (g/L)	总耗油量 Total oil usage (g)	发酵时间 Fermentation time (h)	通 O ₂ 时间 O ₂ -enriched air aerated time (h)
a	Intermittent adding	36.48	11.3	0.512	490	167	66
b	Constant rate	32.80	13.4	0.600	505	182	111
c	DO-Stat	30.71	14.4	0.180	185	172	0
d	DO-Stat	35.77	13.3	0.178	468	192	42

注: CPC 得率=(豆油开始流加以后) CPC 的增加量/豆油流加量.

Note: CPC yield= Increased CPC amount (After starting soybean oil feeding)/Soybean oil feeding amount.

(3) 使用 DO-Stat+后程通富氧空气控制策略流加豆油、硫酸-豆油耦联流加策略进行硫酸补料, 开展头孢菌素 C 发酵, 最终 CPC 浓度和得率分别达到 35.77 g/L 和 13.3%。主代谢副产物 DAOC 的积累量仅为 0.178 g/L, DAOC/CPC 比为 0.5%, CPC 产品质量达到工业标准。

参考文献

- [1] 方向群, 刘又宁. 第四代头孢菌素及其临床应用前景[J]. 中华结核和呼吸杂志, 1998, 21(5): 263-264.
- [2] Adinarayana K, Prabhakar T, Srinivasulu V, et al. Optimization of process parameters for cephalosporin C production under solid state fermentation from *Acremonium chrysogenum*[J]. Process Biochem, 2003, 39(2): 171-177.
- [3] 万平, 冀志霞, 储炬, 等. 菌丝形态分化与头孢菌素 C 合成的关系[J]. 微生物学通报, 2005, 32(1): 15-21.
- [4] Nash CH, Huber FM. Antibiotic synthesis and morphological differentiation of *Cephalosporium acremonium*[J]. Appl Microbiol, 1971, 22(1): 6-10.
- [5] Shen YQ, Heim J, Solomon NA, et al. Repression of beta-lactam production in *Cephalosporium acremonium* by nitrogen sources[J]. J Antibiot, 1984, 37(5): 503-511.
- [6] Jekosch K, Kück U. Loss of glucose repression in an *Acremonium chrysogenum* β -lactam producer strain and its restoration by multiple copies of the *creI* gene[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2000, 54(4): 556-563.
- [7] Pan CH, Spetch SV, McKillip E, et al. Methyl oleate-based fermentation medium for cephalosporin C production[J]. Dev Ind Microbiol, 1982, 23: 315-323.
- [8] Ortiz SCA, Hokka CO, Badino AC. Utilization of soybean derivatives on clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus*[J]. Enzyme Microb Tech, 2007, 40(5): 1071-1077.
- [9] Hsieh CY, Liu CJ, Tseng MH, et al. Effect of olive oil on the production of mycelial biomass and polysaccharides of *Grifola frondosa* under high oxygen concentration aeration[J]. Enzyme Microb Tech, 2006, 39(3): 434-439.
- [10] Revin W, Kasatkin SA, Cherkasova GN, et al. Effect of the quality of fat substrate on the dynamics of fatty acid utilization during biosynthesis of cephalosporin C[J]. Antibiot Khimioter, 1991, 36(1): 5-8.
- [11] Kozma J, Karaffa L. Effect of oxygen on the respiratory system and cephalosporin-C production in *Acremonium chrysogenum*[J]. J Biotechnol, 1996, 48(1/2): 59-66.
- [12] Mishra P, Srivastava P, Kundu S. A comparative evaluation of oxygen mass transfer and broth viscosity using Cephalosporin-C production as a case strategy[J]. World J Microbiol Biotechnol, 2005, 21(4): 525-530.
- [13] Kim NR, Lim JS, Hong SI, et al. Optimization of feed conditions in a 2.5-l fed-batch culture using rice oil to improve cephalosporin C production by *Cephalosporium acremonium* M25[J]. World J Microbiol Biotechnol, 2005, 21(5): 787-789.
- [14] Chiang SJ. Strain improvement for fermentation and biocatalysis processes by genetic engineering technology[J]. J Ind Microbiol Biotechnol, 2004, 31(3): 99-108.
- [15] Hilgendorf P, Heiser V, Diekmann H, et al. Constant dissolved oxygen concentrations in cephalosporin C fermentation: applicability of different controllers and effect on fermentation parameters[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 1987, 27(3): 247-251.
- [16] Li JH, Yang YM, Chu J, et al. Quantitative metabolic flux analysis revealed uneconomical utilization of ATP and NADPH in *Acremonium chrysogenum* fed with soybean oil[J]. Bioprocess Biosyst Eng, 2010, 33(9): 1119-1129.
- [17] 谢志鹏, 徐志南, 郑建明, 等. 靛酚蓝反应测定发酵液中的氨态氮[J]. 浙江大学学报: 工业版, 2005, 39(3): 437-440.