

## 基于过程参数相关分析的鸟苷发酵过程优化\*

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)

王焕章 刘咏梅

(广东肇庆星湖生物科技股份有限公司 肇庆 526070)

**摘 要** 本文分析鸟苷产生菌枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)在 50L 多参数自控发酵罐上的发酵过程特点,基于多种在线及离线参数的检测,通过相关分析将生理调控的工艺参数和生物合成过程中的代谢流分布相联系,发现了发酵过程中的代谢流向糖酵解和 TCA 循环的迁移,并初步分析了产生代谢流迁移的原因,在此基础上优化发酵过程使产苷水平稳定在 30g/L。

**关键词**: 鸟苷,相关分析,代谢流迁移

中图分类号:Q525 文献标识码:A 文章编号:0001-6209(2002)02-0232-04

发酵生产中为了提高发酵的生产水平人们往往考虑的是最佳工艺控制点的选择,采用人工经验为主的静态操作,在方法上基本上是以正交试验为基础,而忽略了在生物反应器中的发酵过程同时存在有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三方面的协同调节,但发酵过程优化的本质应该是代谢流分布的优化。生物反应器中的发酵过程是在分子水平的遗传特性、细胞水平的代谢调控和工程水平的传递特性三个水平同时发生并相互作用的,只要某一水平环节上产生瓶颈问题就会产生全局性影响。虽然这三个水平是不同研究领域的基础性研究内容,但对于反应器中的细胞个体(或群体)这三方面又是一个统一体,必然存在现象与本质上的联系,这些都会直接或间接地反应在直接参数、间接参数和实验室手工参数上。通过多参数的相关分析进行动态优化,最终形成对发酵过程代谢流动态调控的理论,用于指导发酵过程优化和放大,将具有重大的理论意义和实践指导意义。

鸟苷作为一个多用途的核苷,除用于三氮唑核苷、无环鸟苷等许多抗病毒药物的合成原料外,作为特效食品增鲜剂 I+G 的合成前体在食品工业中也有着相当重要的作用。鸟苷发酵的研究 80 年代前有就有大量的文献报道<sup>[1,2]</sup>,但主要是集中在对各种理化因子的抗性菌株的选育上,80 年代以来,研究的重点转移到利用基因工程<sup>[3,4]</sup>的方法构建菌株,提高产苷水平,而在发酵工艺方面则基本上仍是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,而忽略了作为发酵过程中细胞代谢流的时变性。

本文即以鸟苷发酵过程为例,获取发酵过程的多参数。利用的 50L 反应器除配备温

\* 上海市曙光计划资助项目(01SG28)

\*\* 通讯作者

作者简介 蔡显鹏(1974 - )男,陕西咸阳市,华东理工大学在读博士研究生,主要从事发酵过程优化及放大的理论与技术研究。

收稿日期 2001-05-25,修回日期 2001-08-20

度、转速、消泡、pH、DO 等常规的测量控制以外,还配备有高精度补料(基质、酸碱、消泡剂等)的测量与控制、热质量空气流量计和罐压电信号测量与控制,并与尾气  $\text{CO}_2$ 、 $\text{O}_2$  分析仪连接,整机具有 14 个过程参数检测或控制功能,相应的过程控制和数据处理软件包融合多种过程理论和控制理论,并能输入各种离线参数便于过程分析。研究通过在线直接参数、间接参数、以及实验室手工参数相合的相关分析,将发酵调控的工艺参数、细胞代谢的特征参数、反应器中的物料流变化和细胞的代谢流变化相耦合,通过对发酵过程的工艺参数及时调整对细胞代谢流动态优化,提高产率。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌种

枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)754 #( $A^- \beta\text{-Ag}^+$ )

### 1.2 培养基

含葡萄糖、酵母粉、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、KCl 等。

### 1.3 仪器设备

1.3.1 设备:FUS-50I(A)50L 发酵罐(国家生化工程技术研究中心,上海),配备有 BIO-RADAR 软件包,提供 14 个直接与间接参数的在线检测与控制(图略)。酶电极分析仪 SBA-40B(山东省科学院生物研究所)

1.3.2 控制参数(1)pH:Ingold pH 传感器在线检测,由 pH 数字控制器 C901-pH(国家生化工程技术研究中心,上海)显示并且通过流加氨水闭环控制。(2)DO:Ingold DO 传感器在线检测由 DO 数字控制器 C901-DO(国家生化工程技术研究中心,上海)显示,调节空气流量或搅拌转速来控制。(3)排气  $\text{O}_2$ :热磁氧分析仪(Magnos 4G)在线检测。(4)排气  $\text{CO}_2$ :不分光红外仪(Uras 3G)在线检测(德国 H&B 公司生产)。

### 1.4 手工参数测定方法

1.4.1 葡萄糖的测定:葡萄糖分析仪。

1.4.2  $\text{NH}_4^+-\text{N}$  测定:取 5mL 发酵液于凯氏定氮仪蒸馏瓶中,按文献<sup>5</sup>蒸馏并滴定。

1.4.3 氨基酸检测:纸层析法<sup>5</sup>,茚三酮显色。

1.4.4 鸟苷的测定:纸层析法<sup>6</sup>。

## 2 结果和讨论

### 2.1 产苷过程分析

鸟苷属生长部分相关型发酵产物,在典型的发酵过程中发酵前期的生长阶段发酵液中基本检测不到鸟苷积累,大约到 12h 后进入稳定期,开始伴随有鸟苷积累,进入高速产苷期,此过程持续到 40h 左右,然后产苷速率下降,糖耗速率增加,糖苷转化率明显下降。

### 2.2 代谢流分析

从 OUR(摄氧率)、CER( $\text{CO}_2$  释放速率)过程曲线(图 1)也可以看到同样是在 40h 左右 OUR 开始下降,这表征的是菌体的氧化能力正在下降,即对氧的消耗降低,与此对应 CER 同步下降,而其相关值 RQ(呼吸熵)基本维持不变左右,常规分析认为菌体活力下降所致。

即用于菌体维持所需的碳源或能量消耗下降(图 2)。

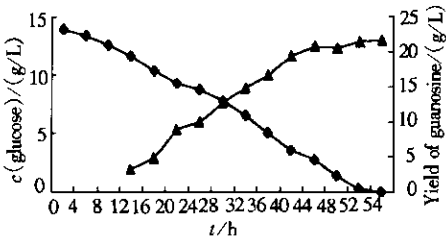


图 1 发酵过程产昔变化曲线

Fig.1 Curve of guanosine yield and glucose consumption

◆—Glucose; ▲—Guanosine.

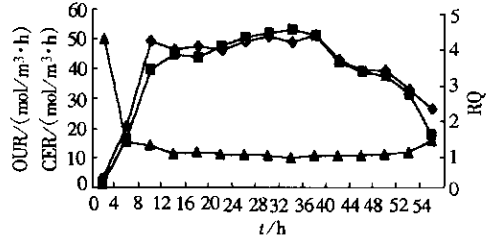


图 2 间接参数变化曲线

Fig.2 Curve of indirect parameters

■—OUR; ◆—CER; ▲—RQ.

但进一步分析过程特点,发现在产昔速率下降的同时,糖耗速率增加,首先从碳元素平衡分析就可确定有中间代谢产物积累,再考虑到与此同时氨水加入速率同步增长,这或者是有机酸积累时的酸碱平衡(物理过程)、或者是氨基酸等含氮有机混合物中间体的积累需要氮源(生物过程),如果有有机酸或氨基酸等中间化合物积累的话,则 OUR、CER 的降低则只表示代谢流的迁移。

采用纸层析法检测氨基酸,发现随着发酵过程的进行确实有丙氨酸等氨基酸的积累,从 40h 左右伴随产昔速率的降低开始出现明显的氨基酸斑点。从代谢途径知氨基酸的形成主要来源于糖酵解途径和 TCA 循环,而鸟昔的形成主要依赖于 HMP 途径的代谢通量,在代谢总通量不变的情况下随着糖酵解和 TCA 循环通量的增加,HMP 途径的通量势必减少,因此在氨基酸积累的过程中产昔速率降低是代谢流迁移所致。

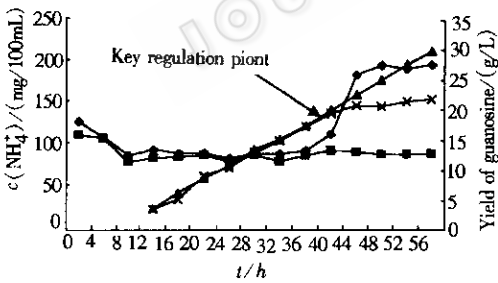


图 3 优化后的产昔曲线

Fig.3 Yield of guanosine after optimization

■—Optimized NH<sub>4</sub><sup>+</sup>; ◆—NH<sub>4</sub><sup>+</sup> - N; ▲—Optimized yield; ×—Yield.

氨水在鸟昔发酵过程中除用作维持发酵液的 pH 外,在很大程度上是用作氮源,以 NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (NH<sub>3</sub>)形式参与细胞的代谢过程。微生物利用 NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (NH<sub>3</sub>)是在同一氧化水平进行的过程,通过三条主要途径<sup>[7]</sup>被同化,分别生成谷氨酸、天冬酰胺和谷氨酰胺,这些同化作用的产物还可以成为其它含氮前体的氨基或酰胺基供体,从而也可能转化成其它的氨基酸。微生物同化 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>是消耗 ATP 的过程,因此势必增加能量的消耗,而能源的消耗又依赖于碳源的利用,因此该过程中糖耗速率的增加也就不难理解。由于氨基酸的积累与发酵液中 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>的积累基本上同步,初步分析

认为该过程中代谢流的迁移,即氨基酸积累,与发酵液中 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>的积累有关,但具体的定量关系还有待于进一步对氮元素的元素平衡分析才能确定。

### 2.3 发酵过程优化

通过过程参数的相关分析,我们发现了发酵过程的关键调控点,即在发酵的中后期,

常规发酵过程中产苷速率降低时大幅调整控制参数,优化发酵过程,进而抑制发酵液中  $\text{NH}_4^+$  的积累,最终成功的抑制了代谢流的迁移(图 3),最终产苷达  $30\text{g/L}$ ,比文献报道的国内最高产率  $17.7\text{g/L}$ <sup>[8]</sup>提高了近 70%。

### 3 结论

尽管基因水平和细胞水平的代谢流研究已有大量的报道<sup>[9,10]</sup>,但在发酵罐实际操作中由于发酵过程酶学研究的困难以及数据采集与处理的困难,过程优化中的细胞代谢流的变化很少有研究,因而发酵工艺优化的基本思路仍然是寻求培养基的最优配方和最佳的 T、pH、DO 等的静态调控,而本质上的过程优化往往需要以代谢流为控制点,通过动态优化以达到目的。通过多种在线的直接参数、间接参数以及离线的手工参数的检测,通过相关分析将生理调控的工艺参数和生物合成过程中的代谢流分布相联系,从而在代谢流的水平指导发酵过程,实现实时的动态优化才有可能在本质上提高发酵得率,从而大幅度提高发酵生产水平。

### 参 考 文 献

- [ 1 ] Matsui H ,Sato K ,Enei H ,et al . *Appl Environ Microbiol* ,1977 **34** ( 4 ) 337 ~ 41 .
- [ 2 ] Matsui H ,Sato K ,Enei H , et al . *Agr Biol Chem* ,1978 **42** ( 3 ) 637 ~ 641 .
- [ 3 ] Miyagawa K ,Kimura H ,Nakahama K ,et al . *Bio/Technology* ,1986 **4** : 225 ~ 228 .
- [ 4 ] Miyagawa K ,Doi M ,Akiyana S . US Patent 4 ,701 A13 ,1987 .
- [ 5 ] 北京大学生物系生物化学教研室 . 生物化学实验指导 . 北京 : 人民教育出版社 ,1987 .
- [ 6 ] Kamatsu K ,Haneda K ,Hirano A ,et al . , *J Gen Appl Microbiol* ,1972 ,18 :19 ~ 27 .
- [ 7 ] 沈 同 ,王镜岩 . 生物化学(下册)(第二版) . 北京 : 高等教育出版社 ,1994 . 259 ~ 276 .
- [ 8 ] 汤生荣 ,黄卫生 ,侯佐荣 . *工业微生物* ,1998 **28** ( 4 ) :11 ~ 15 .
- [ 9 ] Sauer U ,Hatzimanikatis V ,Hohmann H P ,et al . *Appl Environ Microbiol* ,1996 **62** ( 10 ) 3687 ~ 3696 .
- [ 10 ] Sauer U ,Camerou D C ,Bailey J E . *Biotechnol Bioeng* ,1998 **59** ( 2 ) 227 ~ 238 .

## The Optimization of Guanosine Fermentation Based on Process Parameter Correlation Analysis

Cai Xianpeng Chen Shuangxi Chu Ju Zhuang Yingping Zhang Siliang

( State Key Laboratory of Bioreactor Engineering , ECUST , Shanghai 2000237 , China )

Wang Huanzhang Liu Yongmei

( Star Lake Bioscience Co , Inc , Zhaoqing 526070 , China )

**Abstract** : The characteristic of *Bacillus subtilis* fermentation process of guanosine on 50L fermentor was analyzed. Based on determination of on-line and off-line parameter , using correlation analysis , the technology study of physiologic regulation was combined with the metabolic flux distribution of synthesis process. The metabolic flux shift from HMP to EMP and TCA cycle during fermentation was found. The reason of the flux shift was preliminary analyzed , based on which the procedure was optimized to increase the yield of guanosine to  $30\text{g/L}$ .

**Key words** : Guanosine , Correlation analysis , Metabolic flux shift