

# 元素衡算和代谢衡算在金色链霉菌培养过程的应用研究

扶教龙 庄英萍 黄明志 储 炬 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)

**摘 要** 应用元素衡算和代谢衡算方法,建立了金色链霉菌培养过程的数学模型。利用非线性优化方法对模型中的未知参数进行了估算,第一次得到了金霉素(CTC)生物合成的能量系数为  $1.8 \sim 2.8$  ( $\text{molATP} \cdot \text{C} \cdot \text{mol}^{-1}$ )。应用该模型对 CTC 发酵过程中的几个宏观反应进行了预测,并与实验值进行了比较。结果表明,该模型较好地描述了各个宏观反应速率之间的关系,为 CTC 发酵过程优化提供了理论指导。

**关键词** 元素衡算和代谢衡算,金色链霉菌,金霉素,发酵

中图分类号 Q939 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2003)04-0471-05

定量研究是微生物反应过程的一个重要研究方向。元素衡算和代谢衡算(Element-metabolism balancing, EMB)就是应用元素质量衡算原理和(微观的)代谢反应之间的关系,描述微生物反应过程的一种定量研究方法<sup>[1,2]</sup>。

元素衡算又称质量衡算,是基于一种特别的元素单位——氧化还原度即物质的还原程度,来研究微生物反应过程的产物合成、菌体生长、呼吸作用和底物消耗过程的宏观反应速率与各个元素如碳、氮、氧和氧化还原度以及硫、磷等之间相互关系的一种计算方法。元素衡算方法对代谢反应作为一个整体作了综合考虑,但是它没有考虑反应过程中的一些具体情况,如中间代谢物、能量反应等对代谢的影响<sup>[3,4]</sup>。

代谢反应衡算方法则弥补了元素衡算方法的不足。这种方法的出发点是细胞的代谢反应,它考虑微生物反应过程的几个主要代谢反应和几个主要的代谢物质,如菌体生长、产物合成、底物分解和呼吸作用等,并结合代谢过程中的重要物质如 NADH、FADH<sub>2</sub> 和 ATP 等,对这些物质应用拟稳态假设,以物质的氧化还原度和能量系数作为化学计量系数来表达各个反应速率之间的关系,进而研究各个化学计量系数及 ATP 得率系数,并得到宏观代谢反应速率如菌体生长和产物形成速率的具体表达式<sup>[2]</sup>。将

上述两种方法结合起来就形成元素衡算和代谢衡算方法,可建立描述各个宏观反应速率之间关系的衡算方程,继而可对微生物反应过程进行更深入的研究。

本文利用元素衡算和代谢衡算方法对在 50L 罐中进行金色链霉菌培养发酵生产金霉素(Chlorotetracycline, CTC)的代谢过程进行了研究,得到了相应代谢方程,并对发酵过程进行了预测。结果表明,该方程基本反映了发酵过程规律,可为 CTC 发酵提供有益的指导。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌种

菌种:金色链霉菌(*Streptomyces aureofaciens*)

### 1.2 培养方法及实验装置

按文献[5]

### 1.3 参数检测与分析方法

按文献[5],菌体浓度为干重。元素分析采用 VarioEL III Elementar Analysensysteme 测定。

## 2 元素衡算和代谢衡算方程的建立

### 2.1 金色链霉菌培养过程代谢途径的简化

根据代谢衡算的原理,对金色链霉菌培养过程代谢反应进行简化。主要考虑以下几个宏观代谢反

应 菌体生长、CTC 合成和糖(底物)的分解、能量产生等反应;涉及到的物质主要是底物糖 S、氮(或氨水)氧,以及菌体 X、产物 P(CTC)和 CO<sub>2</sub>。代谢过程中考虑的物质主要是代表还原力和能量的 NADH 和 ATP,如图 1 所示。

反应中消耗的糖以葡萄糖计,且忽略酶解反应步骤,假设 NADH 和 ATP 的浓度稳定,即它们的反应速率为零,忽略产物合成反应中的氯元素。

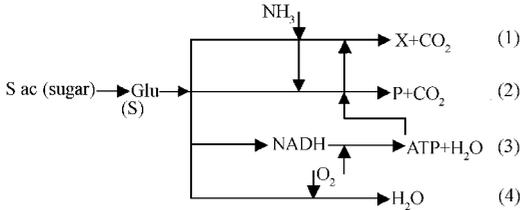


图 1 CTC 生物合成途径简化图

Fig. 1 The scheme of metabolic pathways for CTC biosynthesis

### 2.2 元素衡算方程的建立

根据 EMB 原理<sup>[1]</sup>,在金色链霉菌培养过程中,主要考虑 3 种元素的衡算:碳、氮、氧和氢的综合即氧化还原度  $\gamma$ 。因此,元素衡算方程有 3 个,  $m = 3$ 。在产物 CTC 合成过程中,主要考虑 6 个宏观代谢反应:底物糖 S 的消耗速率  $r_s$ 、菌体生长速率  $r_x$ 、产物生成速率  $r_p$ 、氮消耗速率  $r_n$ 、氧消耗速率  $r_o$  和二氧化碳的产生速率  $r_c$ 。以矩阵表示元素衡算方程,得:

$$BR_e = 0 \tag{5}$$

其中  $B = \begin{bmatrix} 1 & 1 & 1 & 0 & 0 & 1 \\ 0 & C_{xn} & C_{pn} & 1 & 0 & 0 \\ \gamma_s & \gamma_x & \gamma_p & \gamma_n & \gamma_o & \gamma_c \end{bmatrix}$

$$R_e = [r_s \quad r_x \quad r_p \quad r_n \quad r_o \quad r_c]^T$$

将  $R_e$  分为主要代谢物流  $R_{e1}$ (即  $r_s$ 、 $r_x$  和  $r_p$ )和次要代谢物流  $R_{e2}$ (即  $r_n$ 、 $r_o$  和  $r_c$ ),对(5)式进行矩阵运算,可以得到下式:

$$[B_1 \quad B_2] \begin{bmatrix} R_{e1} \\ R_{e2} \end{bmatrix} = 0$$

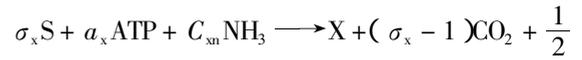
$$\text{用 } R_{e1} \text{ 来表示 } R_{e2}, R_{e2} = -B_2^{-1}B_1R_{e1} = -B'R_{e1} \tag{6}$$

在上式中,有 6 个反应( $n = 6$ ),3 个方程,元素衡算方程的自由度  $f = n - m = 6 - 3 = 3$ 。在实际操作中,只有补料速率(即通过  $r_s$ )是人为控制的,必须进一步把自由度降低。

### 2.3 代谢反应衡算方程及预测模型的建立

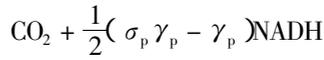
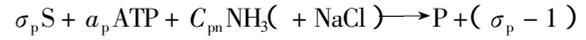
根据 CTC 合成简化的代谢途径,有如下几个主要代谢反应:

(1) 菌体生长反应

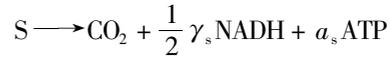


$(\sigma_x \gamma_s - \gamma_x) NADH$

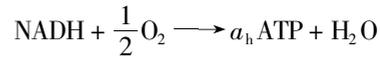
(2) 产物 CTC 的合成反应(忽略氯元素)



(3) 碳源(以葡萄糖计)的分解反应



(4) 呼吸反应(氧化还原反应)



根据 EMB 方法,上述反应中的各物质都以 C-mol 数(含碳物质)或 mol 数计。

对上述代谢反应,只考虑底物糖、菌体和产物几个主要外部代谢物质的反应速率,以及 NADH 和 ATP 两个代表还原力和能量物质的“内部”反应速率。用矩阵来表示上述代谢反应<sup>[1]</sup>:

$$ZE = 0 \tag{7}$$

其中

$$E = [X \quad P \quad S \quad NADH \quad ATP]^T$$

$$Z = \begin{bmatrix} 1 & 0 & -\sigma_x & (\sigma_x \gamma_s - \gamma_x)/2 & -a_x \\ 0 & 1 & -\sigma_p & (\sigma_p \gamma_s - \gamma_p)/2 & -a_p \\ 0 & 0 & -1 & \gamma_s/2 & a_s \\ 0 & 0 & 0 & -1 & a_h \end{bmatrix}$$

$E$  为所考虑的生物化学物质组成的向量; $Z$  为由各个反应中物质的系数所形成的矩阵,反应物的系数为负号,生成物的系数为正号。

按照文献[2]介绍的方法对(7)式进行运算得:

$$Z_3 R_{e1} = 0 \tag{8}$$

其中  $Z_3 = [a_x + \sigma_x a_s + \gamma_x a_h/2 \quad a_p + \sigma_p a_s + \gamma_p a_h/2 \quad a_s + \gamma_s a_h/2]$

$$R_{e1} = [r_x \quad r_p \quad r_s]^T$$

上式即是反映主要物质反应速率之间关系的代谢衡算方程。这样,元素衡算方程的自由度为  $f = 3 - 1 = 2$ ,还必须继续降低自由度。

假设产物 CTC 的合成速率与菌体的生长速率存在如下关系:

$$r_p = \beta r_x + k \tag{9}$$

一般情况下,  $\beta$  并不是一个常数,而是比生长速率  $\mu$



利用预测方程,对  $\Delta r_o$ 、 $\Delta r_c$ 、 $\Delta r_p$  和  $\Delta r_n$  进行了预测,结果如表 1 所示(calculated 表示计算结果)。与实验结果比较,可见,对  $\Delta r_o$ 、 $\Delta r_c$ 、 $\Delta r_p$  除个别点外,大部分点能较好的预测。对  $\Delta r_n$  预测值普遍较

低,这主要是所消耗的氨水中,只有一部分用于代谢,相当多的部分被用于中和由代谢过程中产生的有机酸,以及被空气带走进入尾气。

表 1 CTC 合成过程的预测结果

Table 1 The predicted results of CTC biosynthesis process

Ser.	$r_x$	$r_p$	$\Delta r_s$	$\Delta r_o$	$\Delta r_o$	$\Delta r_c$	$\Delta r_c$	$\Delta r_p$	$\Delta r_p$	$\Delta r_n$	$\Delta r_n$
	Mea.	Mea.	Mea.	Mea.	Cal.	Mea.	Cal.	Mea.	Cal.	Mea.	Cal.
1	0.335	0.288	-11.3	-13.9	-7.36	9.54	11.2	2.02	2.03	-3.53	-0.379
2	0.682	0.389	-14.6	-14.1	-9.17	10.4	13.0	2.73	2.28	-3.95	-0.558
3	0.120	0.299	-20.8	-18.9	-14.2	14.2	19.6	3.00	3.06	-3.76	-0.659
4	0.087	0.251	-14.9	-13.1	-10.5	10.2	14.3	1.76	2.11	-3.09	-0.429
5	0.066	0.260	-16.8	-12.5	-11.3	11.3	15.2	1.82	2.28	-2.47	-0.557
6	0.178	0.251	-15.1	-12.0	-8.42	9.06	10.0	2.51	3.12	-4.36	-0.656
7	0.158	0.213	-7.68	-8.22	-5.21	6.29	6.15	1.49	1.25	-2.64	-0.240
8	0.160	0.187	-14.9	-8.11	-7.39	6.05	8.70	1.31	3.40	-1.83	-0.745
9	0.191	0.174	-11.3	-11.5	-7.85	8.51	9.19	1.74	1.73	-3.58	-0.330
10	0.328	0.337	-10.4	-7.88	-6.43	5.35	7.48	2.36	1.90	-3.56	-0.392
11	0.142	0.112	-8.86	-7.16	-6.15	5.14	7.11	0.79	1.35	-3.74	-0.264
12	0.149	0.216	-10.8	-9.63	-8.43	6.95	9.70	2.16	1.29	-3.64	-0.227
13	0.170	0.216	-9.90	-5.39	-6.71	4.17	7.71	1.51	1.56	-2.95	-0.313

Note: Unit—C-mol or mol; Mea.—measured; Cal.—calculated

从结果可知,所得的代谢衡算方程能较好地对应金色链霉菌培养过程的宏观反应速率进行预测。但是,要使预测误差进一步减小,必须对代谢途径考虑更充分,同时也有必要对方程建立方法作进一步改进。

由预测方程,可得到菌体生长及产物合成与底物糖消耗的关系:

$$\begin{aligned} \text{(I) } 26 \text{ h} \sim 57 \text{ h: } \mu &= -0.5375 \times q_s - 0.0206 \\ q_p &= -0.1056 \times q_s - 0.0040 + \\ &0.2742/x \end{aligned} \quad (18)$$

$$\begin{aligned} \text{(II) } 57 \text{ h} \sim 122 \text{ h: } \mu &= -0.2859 \times q_s - 0.0051 \\ q_p &= -0.2492 \times q_s - 0.0044 \\ &+ 0.0523/x \end{aligned} \quad (19)$$

菌体的比生长速率是可以通过补料速率限制糖耗速率得以控制,同时结合其它的调控策略,使比生长速率达到对产物合成最有利的值。通过这种方法,结合其它参数相关性分析,对 CTC 发酵生产进行了合理的调控,取得了良好的效果<sup>[5]</sup>。

$a_h$  表示氧化磷酸化作用的大小即磷氧比 P/O,  $a_h = 1.8 \sim 2.8$  (mol-ATP·C-mol<sup>-1</sup>),与一般认为大部

分需氧生物的 P/O = 3 较接近。不同的(微)生物,在不同条件下,得到的 P/O 比存在较大差异,如酵母的 P/O = 2.0,而细菌 P/O = 0.5 ~ 1.0<sup>[7,8]</sup>。维持系数  $m = 0.1 \sim 0.2$  之间,与利用连续培养方法得到的结果相近,在同一数量级,但比酵母的维持系数要小些<sup>[8,9]</sup>。

合成产物 CTC 所需的能量为  $a_p = 2.0 \sim 3.6$  (molATP·C-mol<sup>-1</sup>) 之间,该值未见文献报道。若将单位换算成 1mol 产物,则要乘以 22,得  $a_p = 44 \sim 80$  molATP·mol<sup>-1</sup>,即产生 1 分子 CTC 要消耗 44 ~ 80 分子的 ATP。CTC 作为一种次级代谢产物,由于其合成过程的复杂性,该值对 CTC 合成来说是合理的。

综上所述,利用 EMB 方法对发酵过程进行定量研究,不仅可以建立反映宏观反应速率之间关系的衡算方程,而且还能反映能量代谢对过程的影响,具有明显的生物学意义,能够对发酵过程作有益的指导。

符号说明

物质 i 的能量系数,消耗或形成单位物质 i 所需或

形成的 ATP 的量  $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$  或  $\text{mol}\cdot\text{C}\cdot\text{mol}^{-1}$  ;  
 $C_m$ —物质 i 中的氮含量  $\mu\text{mol}\cdot\text{C}\cdot\text{mol}^{-1}$  ;  
 $m$ —菌体的维持系数  $\mu\text{mol}\cdot\text{C}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$  ;  
 $q_i$ —物质 i 的比消耗或比生成速率  $\mu\text{mol}\cdot\text{C}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$  或  
 $\text{C}\cdot\text{mol}\cdot\text{C}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$  ;  
 $\mu$ —菌体的比生长速率  $\text{h}^{-1}$  ;  
 $r_i$ —物质 i 或第 I 个代谢反应的反应速率  $\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}$  或  $\text{C}\cdot\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}$  ;  
 $Y_{ij}$ —得率系数  $\mu\text{mol}\cdot\text{C}\cdot\text{mol}^{-1}$  或  $\text{C}\cdot\text{mol}\cdot\text{C}\cdot\text{mol}^{-1}$  ;  
 $\gamma_i$ —物质 i 的氧化还原度 ;  
 $\sigma_i$ —物质 i 形成所需的碳源量  $\text{C}\cdot\text{mol}$

## REFERENCES (参考文献)

- [ 1 ] Stouthamer A H. Quantitative aspects of growth and metabolism of microorganism. Kluwer Academic Publisher Group, London, 1992, pp. 257 - 274
- [ 2 ] Stouthamer A H. Quantitative aspects of growth and metabolism of microorganism. Kluwer Academic Publisher Group, London, 1992, pp. 275 - 292
- [ 3 ] Minkevich I G. Mass-Energy Balance for Microbial Product Synthesis- Biochemical and Culture Aspects. *Biotechnology and Bioengineering*, 1983 **35** :1276 - 1293
- [ 4 ] Heijnen J J, Roels J A. Application of Balancing Methods in Modeling the Penicillin Fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*, 1979 **31** :2175 - 2201
- [ 5 ] FU J L (扶教龙), CHU J (储炬), FAN T (樊涛) *et al.* The metabolic characteristics and the regulative strategy of chlorotetracycline fermentation process. *Chinese Journal of Antibiotics* (中国抗生素杂志), 2002 **27** (3) :141 - 144
- [ 6 ] YANG B (杨冰). Practical Methods of Optimization and Compute Programming. Heilongjiang Harbin Institute of Shipping Engineering Press (哈尔滨船舶工程学院出版社), 1994
- [ 7 ] SHEN T (沈同), WANG J Y (王镜岩). *Biochemistry* (下册). Beijing :Advanced Education Press (高等教育出版社), 1991, pp. 51 - 133
- [ 8 ] HUANG M Z (黄明志), GUO M (郭美锦), CHU J (储炬) *et al.* Metabolic Calculation of Growth Phase in rHSA Fermentation. *Chinese Journal of Biotechnology* (生物工程学报), 2000, **16** (5) :631 - 635
- [ 9 ] Stouthamer A H. Quantitative aspects of growth and metabolism of microorganism. Kluwer Academic Publisher Group, London, 1992, pp. 325 - 357

## Application of Element and Metablism Balancing for the Cultivation Process with *Streptomyces aureofaciens*

FU Jiao-Long ZHUANG Ying-Ping HUANG Ming-Zhi CHU Ju ZHANG Si-Liang\*

(State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China)

**Abstract** On the base of element and metablism balancing, the mathematical model of the cultivation process with *Streptomyces aureofaciens* was developed, and the unknown parameters in the model were estimated with the method of nonlinear optimization. Firstly the energetic coefficient of CTC biosynthesis was gained, which was  $1.8 \sim 2.8 \text{ mol-ATP}\cdot\text{C}\cdot\text{mol}^{-1}$ . The macroscopic reaction rates were predicted in the process and compared with the experimental values. The results show that the model can preferably describe the relationships between several macroscopic reaction rates in the process and can supervise the optimization of CTC fermentation process theoretically.

**Key words** element balancing and metablism balancing, *Streptomyces aureofaciens*, Chlorotetracycline, fermentation