

L-亮氨酸发酵过程氮源反馈与非反馈控制的初步研究

李彤 龚建华* 黄和容

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

氮源可直接影响氨基酸发酵过程中菌体生长与氨基酸生成。但是关于氨基酸发酵过程中氮源控制的研究报道并不多。本文作者在 L-亮氨酸发酵过程碳源流加研究及动力学特征分析基础上⁽¹⁾, 比较了几种非反馈型、反馈型补加硫酸铵的发酵结果, 提出了较佳的控制方法。

1 材料与方 法

1.1 菌种

钝齿棒状杆菌 (*Corynebacterium crenatum*) 突变株 B20-1⁽¹⁾。

1.2 培养基

1.2.1 普通牛肉汁斜面、液体种子培养基⁽¹⁾。

1.2.2 发酵培养基 (%、W/V): 葡萄糖 5.0, 磷酸二氢钾 0.1, 脯氨酸 200 μ g/ml, 硫酸镁 0.04, 硫酸铁 0.002, 硫酸锰 0.002, 生物素 5 μ g/100ml, 维生素 B₁ 30 μ g/100ml, 维生素 B₂ 2mg/100ml, 烟酸 2mg/100ml, 豆饼水解物 0.4, pH6.8, 硫酸铵浓度随试验要求。补料液由葡萄糖与硫酸铵组成。

1.3 发酵设备及基本工艺参数

日本 Marukiahi 公司产 2.6 升台式自控发酵罐。通气量 1.0v. v. m., 搅拌转速 400r/min, 培养温度 30 $^{\circ}$ C, pH6.5 用 10% 氢氧化钠溶液自控调节。

2 结果与分析

2.1 非反馈型控制氮源

2.1.1 一次补加氮源方式: 通过半开放发酵体系 (补料分批培养) 控制微生物生长的环境因子, 补料方法有非反馈型或反馈型。前者是基于发酵过程动力与生化学分析, 按预设补料模式进行补料控制。后者由发酵状态变量的变化值反馈后随时调整补料特征或其他控制因子。后者较前者更合理, 但检测与控制系统较复杂。一次性补料是最简单的非反馈型控制方式。相同的葡萄糖流加条件下, 硫酸铵为被控氮源。总浓度都为 40g/L, 比较了硫酸铵初始浓度 15g/L, 24 小时一次补入剩余量, 与初始浓度 25g/L, 24 小时又一次补入剩余量的发酵过程。并有初始浓度 40g/L 而无补加的作对照。前者发酵过程中硫酸铵浓度呈现前期较低, 补加后较高; 后者呈现前期较高, 补加后较低。第三种情况始终维持很高浓度 (图 1, 表 1)。由于细胞生长环境中过高的 (NH₄⁺) 会影响物质代谢特征、物质传递体系中关键酶活性、以及细胞内某些成分的生成⁽²⁾, 从而影响菌体生长和产物生成。所以, 初始硫酸铵浓度 40g/L 的菌体量和产物量都很低, 而宜采用补料方式对硫酸铵浓度进行合理控制。基于亮氨酸发酵是动力学 I 型。前期

* 通信联系人。

属国家自然科学基金资助项目中部分工作。

本文于 1993 年 7 月 12 日收到。

以菌体生长为主,中后期以亮氨酸生成为主。在生长期,较低的硫酸铵浓度有利菌体生长,最终直接影响菌体终浓度的高低。而在产酸期,较高的硫酸铵浓度(第三种情况)严重影响亮氨酸的生成,而维持在合适的浓度范围内(第一、二种情况)对于产酸无明显影响(图1,表1)。

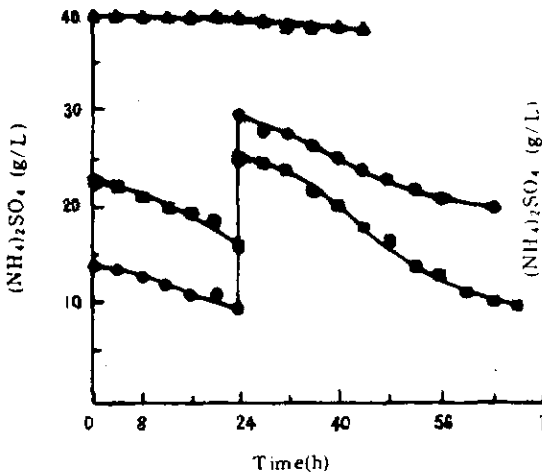


图1 硫酸铵浓度的变化过程

—○—15g/L, —●—25g/L, —▲—40g/L

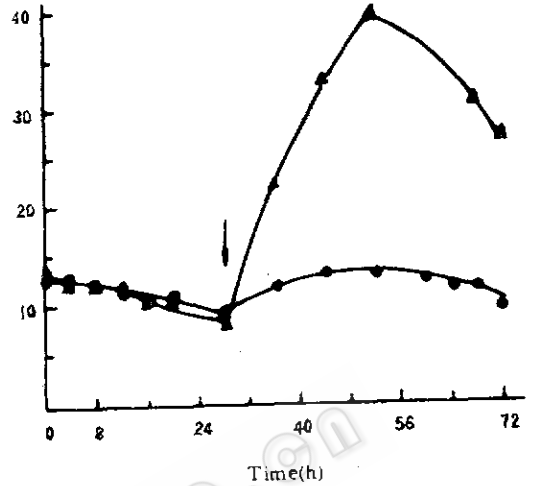


图2 补铵速度与硫酸铵浓度变化

—●—0.45g/h, —▲—2.09g/h

表1 硫酸铵的一次补加量及初始浓度对生长及产酸的影响 (g/L)

发酵初始硫酸铵浓度	一次补加硫酸铵量	菌体量	产酸量
15	25	14.13	12.15
25	15	7.356	12.38
40	0	3.950	4.68

2.1.2 恒速流加氮源方式:恒速流加氮源是一种较简单的非反馈型控制方法。在相同的补糖条件及初始硫酸铵浓度下,比较了以不同线性速率补加硫酸铵对发酵的影响。在发酵中后期,以相同体积流速补加不同硫酸铵浓度的补料液,使补铵速率分别为0.45g/h与2.0g/h。发酵过程中铵浓度都呈波峰状变化,前者范围在1.0—1.5%,后者1.0—4.0%(图2)。结果见表2。以0.45g/h速率补加时,体系耗铵速率与补铵速率相当,铵浓度只能维持在起补时的较低水平。补铵速度2.0g/h时,体系所维持的铵浓度相对提高(当然补铵总量也相应增加,分别为19.8克和88克)可促进菌体的生长和亮氨酸的积累。

表2 补加硫酸铵速度对生长及产酸的影响

速度 (g/h)	菌体量 (g/L)	产酸量 (g/L)
0.45	6.389	12.98
2.00	9.165	16.67

表3 维持不同硫酸铵浓度对生长及产酸影响

硫酸铵浓度 (g/h)	生长量 (g/L)	产酸量 (g/L)
17	5.818	13.32
25	10.08	18.10
47	8.773	12.70
65	6.074	9.81

2.2 反馈型控制氮源

2.2.1 发酵体系中恒定浓度控制方式:在相同补糖条件及初始铵浓度下,比较了发酵24小时起铵浓度维持水平分别为17.25, 47和65g/L的发酵结果。按时间间隔不断取样进行铵浓度的离线测定,用人控方法及时反馈调节相应的补铵速率,维持培养基内的恒定浓度(结果见图3,表3)。试验表明维持较低或较高的铵浓度都不利于菌体生长和亮氨酸积累,而以维持25g/L水平为佳,亮氨酸的积累水平可提高到18.1g/L。另外,作为Ⅰ型发酵,菌体生长和产物生成有一定的相关性,维持一个恒定的合适铵浓度(与有较大波动范围的控制方法相比

较)比较容易达到适度地促进菌体生长,又更利于亮氨酸生成。用反馈控制方法,由于体系的被控变量

按预设规律变化,便于进行发酵过程分析、构建数学模型以及过程优化。

2.2.2 幂函数补铵模式:从统计学角度,对上述发酵条件下的四种流加速率变化进行曲线拟合,结果表明能较好地近似于幂函数方程 $V = a \cdot (t)^b$, V 是流加速率 (g/h), t 是流加时间 (h), a 、 b 分别是方程参数 (图 4, 表 4)。在一定发酵条件和浓度范围内可以选择某 a 、 b 值。按上述幂函数方程所确定的流加速率随时间间隔调速,即可使发酵体系内的铵浓度维持在一相应的恒定值,从而可减少频繁的取样及铵浓度检测,使反馈型控制转化成较简单的非反馈型控制,以求在缺乏在线检测传感器及反馈自控系统的情况下能近似达到控制要求。对不同 a 、 b 值进行试验结合数学处理可确定较佳的 a 、 b 值。

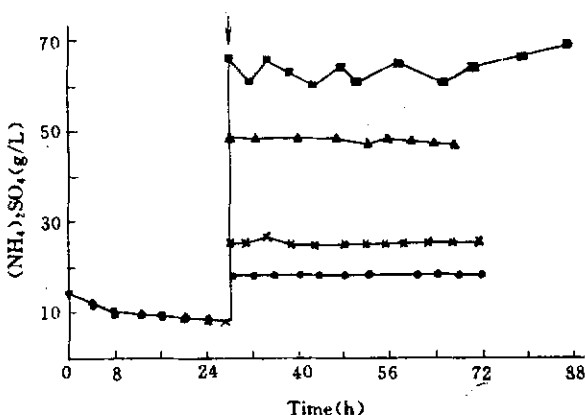


图3 补料分批培养中维持不同硫酸铵浓度

表4 维持硫酸铵恒浓度补料过程的幂函数方程

硫酸铵浓度 g/L	幂函数方程 ($\times 10^{-4}$)	方差和	残差和	相关系数
17	$V = 3.25t^{1.88}$	0.0110	0.00979	0.9861
25	$V = 1.17t^{2.29}$	0.0145	0.02779	0.99698
47	$V = 2.30t^{3.29}$	0.0848	0.0177	0.9597
65	$V = 3.56t^{2.08}$	0.1234	0.07852	0.9845

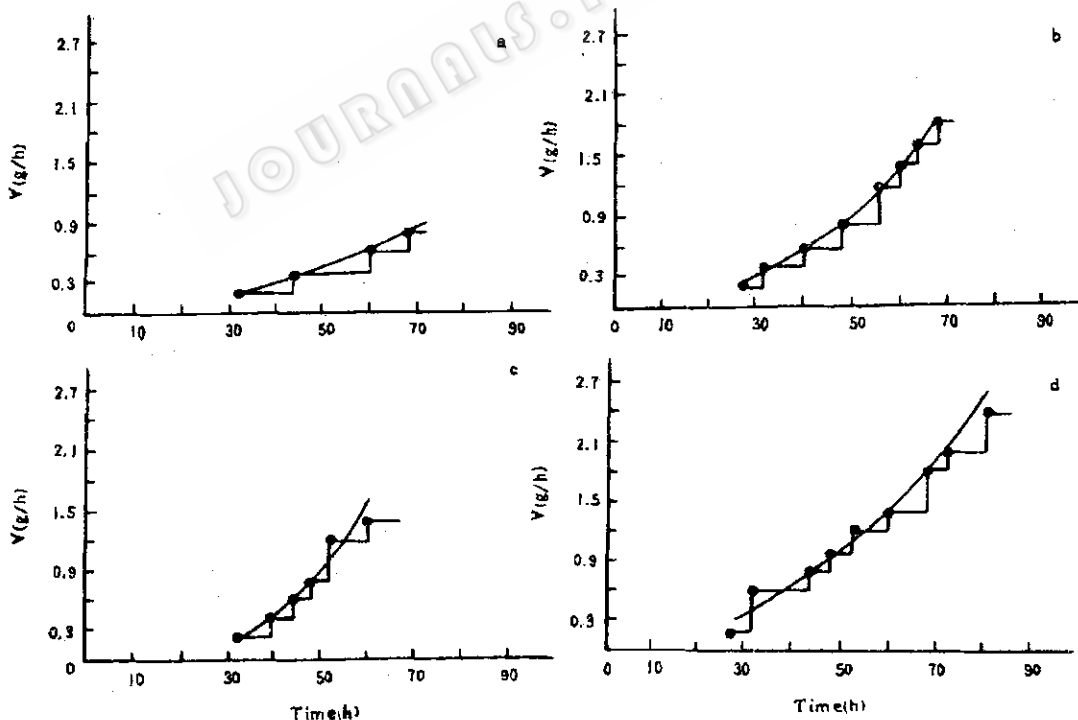


图4 硫酸铵补料过程的拟合

- a. 维持 17g/L,
- b. 维持 25g/L,
- c. 维持 47g/L,
- d. 维持 65g/L

参 考 文 献

- [1] 李 彤, 黄和容, 微生物学通报, 1991, 2: 96—97.
[2] Sumner T B *et al.* J Biol Chem. 1925, 63: 393.
[3] 潘家秀等. 蛋白质化学研究技术, 北京: 科学出版社, 1962, P. 27, 28, 79—81.
[4] Deniel, Wang J C *et al.* : Fermentation And Enzyme Technology, Chapter 6, A Wiley-Inter-Science Publication, New York, 1979.

A Study on the Feedback/Non -Feedback Nitrogen Source Controls in *L*-Leucine Fermentation

Li Tong Gong Jianhua Huang Herong

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing 100080)

Abstract The reserches on *L*-leucine fermentation were made in a 2.6 L fermenter by a *L*-leucine producing mutant of *Corynebacterium crenatum* B20-1. Using fed-batch culture with feedback (the constant conc. in the broth) or non-feedback (the linear mode of feed rate) to control the nitrogen source, the more *L*- leucine was produced in the broth. It was found that the feed rate profiles, coincided with the power functions for the fermentation course, keeping the different constant concentrations of nitrogen source in the cultures.

Key words *L*-leucine, feedback control, non-feedback control, power function