

基于多尺度参数相关研究的 头孢菌素C生产过程优化

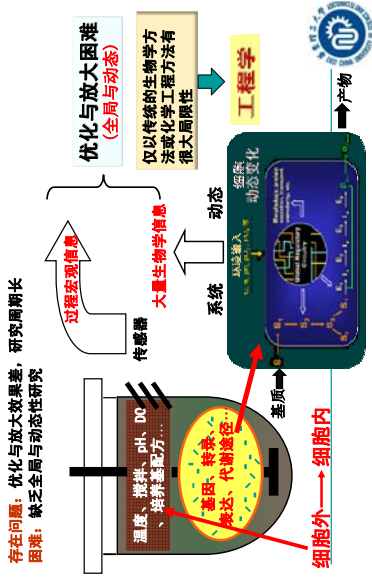
储炬
华东理工大学
国家生化工程技术研究中心（上海）



头孢菌素C的工业背景

- 7-氨基头孢烷酸（7-ACA）是生产头孢类抗生素最重要的一个母核
- 而7-ACA的工业生产通常都是由头孢菌素C (cephalosporin C, CPC)通过化学方法或者酶的裂解作用去除侧链而得到
- 所以CPC的工业生产是头孢类抗生素生产最重要的源头途径

发酵过程优化的复杂系统



主要内容

- 背景
- 影响头孢菌素C合成的重要因素
- 头孢菌素C工业发酵过程理性放大
- 结论与展望

一、背景

- 头孢菌素C及其衍生物是世界上位居销售首位的医药产品
 - 大宗抗生素的代表，7-ACA的重要原材料
 - 引进菌种和工艺，开发头孢菌素C原料药生产

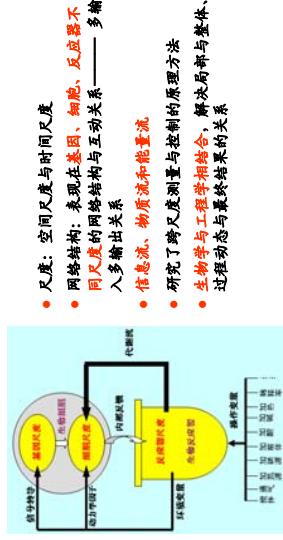


关键技术与难点

- 国外引进工艺中的原材料替代
包括一些稀有的碳、氮源的替代
- 全局优化的发酵过程调控有难度
- 规模化生产中需要有效过程放大理论与方法

1. 头孢菌素C发酵工艺优化

——多尺度参数相关原理与应用



发酵罐优化、放大的动态研究

以宏观代谢流分析
与控制为核心
发酵过程动态优化
与生理代谢差异研究

- 培养基的优化、廉价原材料的替代
- 菌丝形态变化及其对发酵过程的影响
- 其他发酵过程操作因子的优化
- 小试与大罐的联动优化

L-α-氨基己二酸 + L-半胱氨酸 + L-缬氨酸

三肽合成酶

↓

LLD-三肽 (ACV)

↓ 环化酶 O₂

异青霉素N (IPN)

↓ 异构酶

青霉素N (PN)

↓ 扩环酶 O₂

脱乙酰氧头孢菌素C (DAOC)

↓ 羧化酶 O₂

脱乙酰头孢菌素C (DAC)

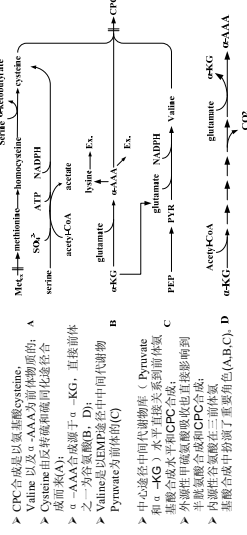
↑ 乙酰水解酶

↓ 乙酰转移酶

头孢菌素C (CPC)

头孢菌素C生物合成途径

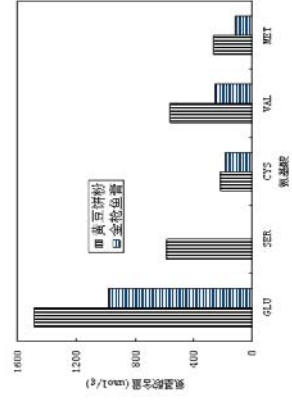
前体氨基酸合成途径及CPC合成途径



- > CPC合成是异氨基酸cysteine, Valine以及α-AAA为前体物质的, A
- > Cysteine由反转氨酶和同化途径合成
- > α-AAA合成来源于α-KG, 直接前体之一为谷氨酰胺(B, D), Pyruvate为前体(C)
- > 中心途径中间代谢物: Pyruvate和α-KG水平直接关系前体量
- > 外源氨基酸和中间代谢物也会影响前体量
- > 内源性氨基酸在CPC合成
- > 氨基酸合成中抑制了重要角色(A,B,C, D)

国产氨基酸的研究

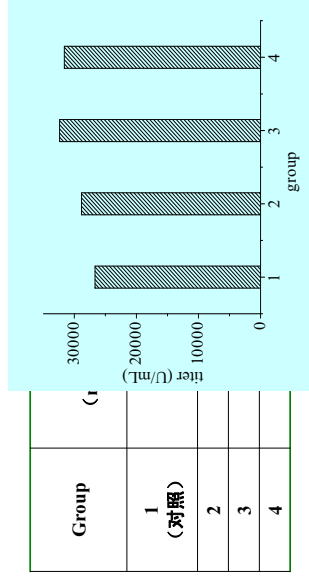
金枪鱼膏：价格贵、稀缺（建议换成国外进口原料A）



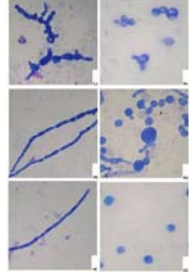
用1%的国产来源B来替代金枪鱼膏能达到同样的发酵单位，菌浓低于金枪鱼膏配方

国产原料B和进口原料A氨基酸含量对照

配方替代——果葡糖浆的替代

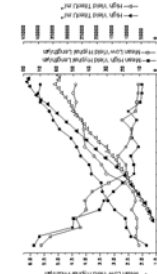


2 头孢菌素C发酵过程中菌丝形态变化及其对发酵过程的影响

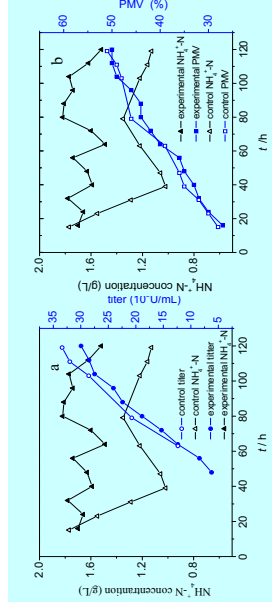


细长菌丝 → 膨胀菌丝 隆起
→ 节孢子 → 自溶

定量分析菌丝直径和长度
70h后两者产率速率不同，高产批次明显高于低产批次。
70h后高产批次菌丝平均直径增加速度快于低产批次。
菌丝平均长度的变化快慢与两者菌丝的膨胀程度相关。



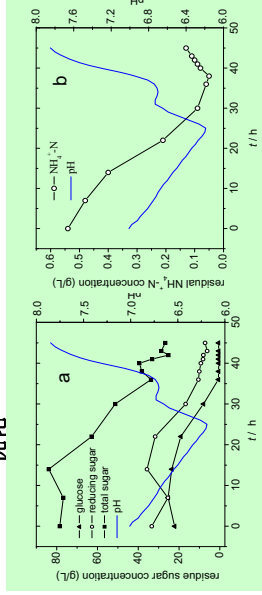
铵氮浓度对CPC合成期的研究



当发酵过程铵离子的浓度达到107mmol/L，它对CPC合成的抑制作用已显现，抑制CPC合成10%

CPC发酵生产过程特性研究

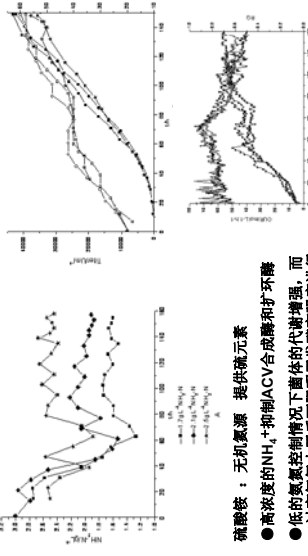
——顶头孢霉的生长特性研究及移种标准的优化



种子培养过程pH与残糖浓度与铵氮浓度曲线

(3) 发酵过程操作因子的优化

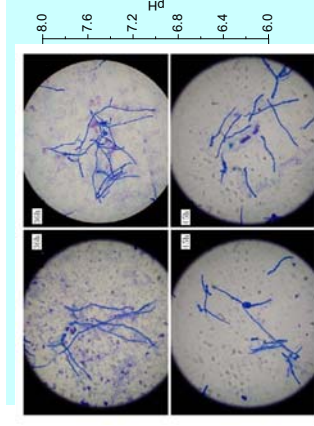
氨氮控制水平对头孢菌素C合成的影响



硫酸铵：无机氮源 提供磷元素

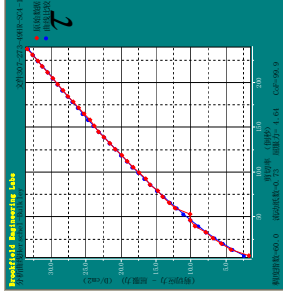
- 高浓度的NH₄⁺抑制ACV合成酶和扩环酶
- 低的氨氮控制情况下菌体的代谢增强，而过高氨氮水平反而阻碍了发酵高强度进行
- 随氨氮控制水平的降低菌体对豆油的利用程度越来越差

种子培养过程pH与菌丝生长



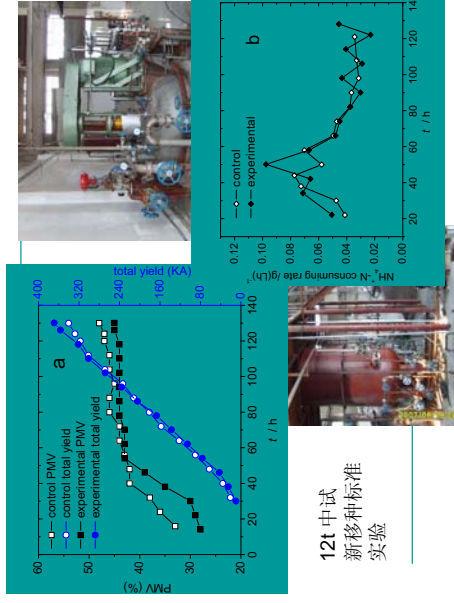
头孢菌素C发酵液的流体特性研究

——发酵液的流变特性确定



$$\tau = \tau_0 + K \dot{\gamma}^n$$

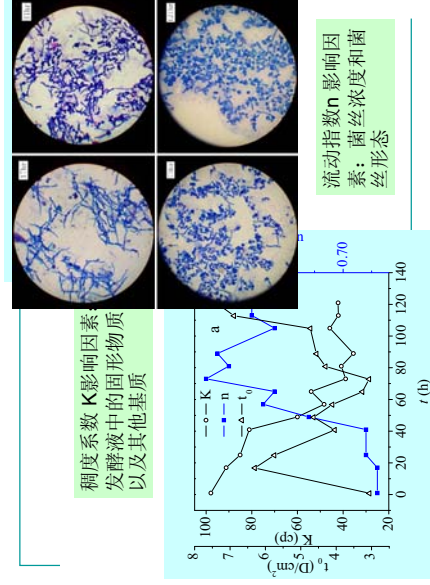
τ —剪切应力(D/cm²);
 τ_0 —屈服应力(D/cm²);
 $\dot{\gamma}$ —剪切率(1/s);
 K —稠度系数(cp);
 n —流动(态)指数



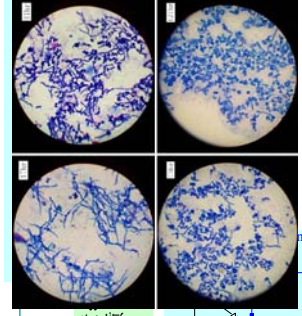
12h 中试
新移种标准
实验

种子种龄 (h)	种子pH	摇瓶发酵结果平均值		
		CPC(U/ml)	DAC (%)	噬嗑(%)
36	6.74	20050	8.50	1.08
38	6.95	19531	8.73	1.25
40	7.33	18995	9.11	1.50
41	7.49	18118	8.99	1.57
42	7.62	19539	8.44	1.26
43	7.72	19151	8.49	1.48
45	7.85	18995	8.28	1.28

新移种标准得到比以旧标准CPC高5.8%, DAC, DAOC, 噬嗑分别低0.6%, 22.9%, 10.2%。



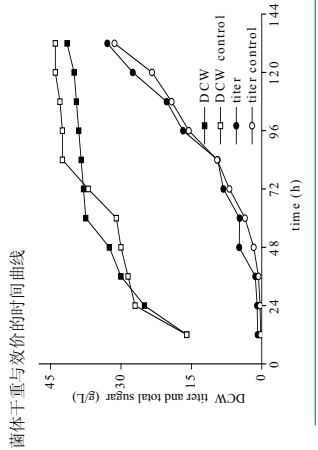
稠度系数 K 影响因素
发酵液中的固形物质
以及其他基质



流动指数n 影响因素：
菌丝浓度和菌丝形态

2.50L发酵罐结果

2.1 离线参数分析

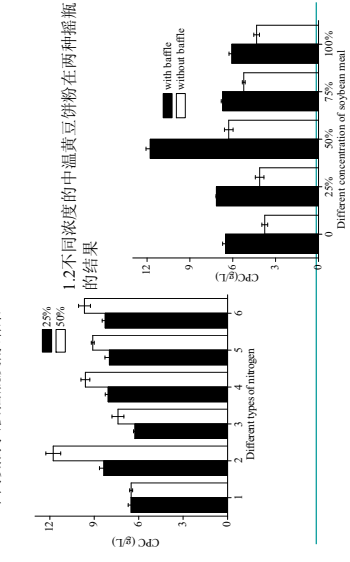


头孢菌素C生产菌株培养基优化及发酵过程研究

背景：
添加速效碳源类物质在全玉米浆干粉的培养基中易大量起泡沫。
目的：
寻找稳定、廉价的迟效氮源替换玉米浆，减少泡沫，节省成本。
方法：
在摇瓶上考察了五种有机氮源对头孢菌素C生物合成的影响，得出较优比例后，进行小试验证。

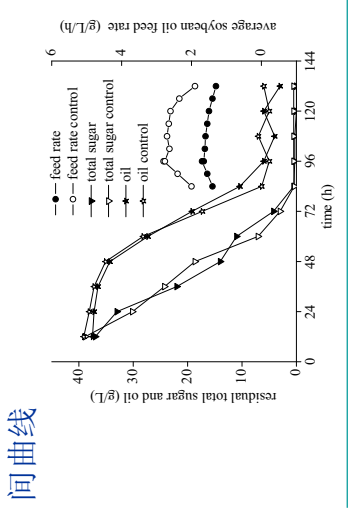
1. 摇瓶发酵结果

1.1 不同氮源挡板摇瓶发酵结果



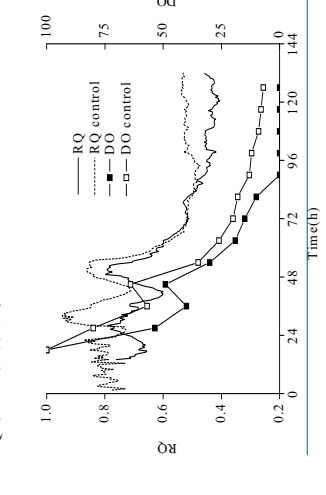
1.2 不同浓度的中温黄豆饼粉在两种摇瓶中
的结果

残余总糖、豆油及平均补油速率的时间曲线

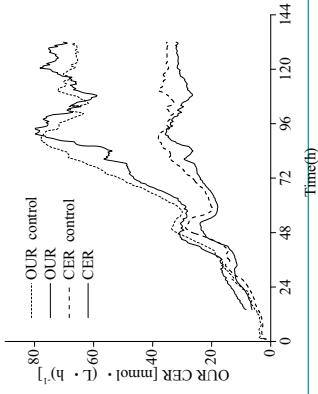


2.2 在线参数分析

RQ与DO时间曲线



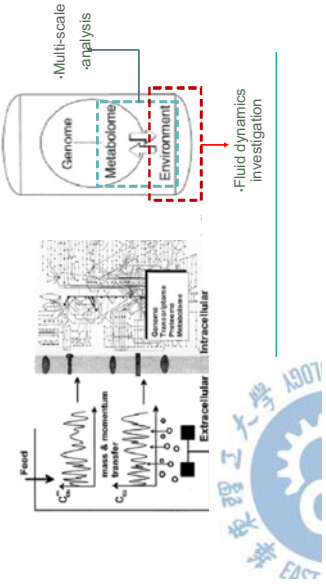
CER与OUR的在线曲线



结论

- 1: 摇瓶中用1:1的中温黄豆饼粉与玉米浆干粉混合使用CPC产量最高可达11.77 g/L.
- 2: 在发酵罐条件下, 实验组中产物浓度为32.9 g/L, 总豆油消耗量比对照组减少39.4%。黄豆饼粉处理工艺更简单, 成分更稳定且更廉价, 节省的氮源及豆油成本占总成本约8%左右。
- 3: 生产后期, 通气量(2500 L/h)和搅拌转速(800 r/min)均达上限, DO水平仍较低, 可能对CPC的合成带来不利影响。可考虑进行氮源的流加以避免氧限制, 流加时间及浓度需进一步考察。

Interaction of Microbial physiology and fluid dynamics in bioreactors



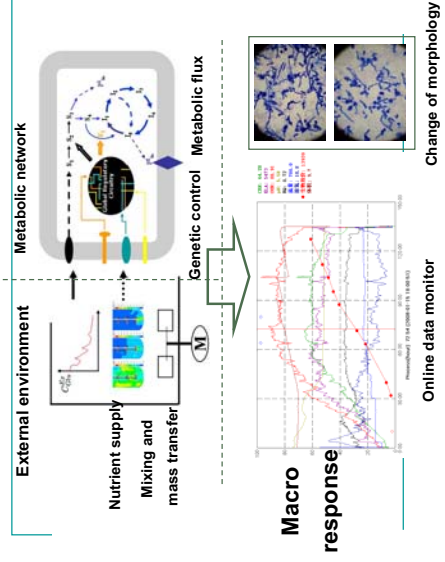
Fundamental aspects of CFD

- Navier-Stokes equation:
$$\frac{\partial \rho \phi}{\partial t} + \text{div}(\rho \vec{u} \phi) = \text{div}(\Gamma \text{grad}(\phi)) + S$$
- Discretization of the NS eqn.
$$a_1 \phi_1 = \sum a_{nb} \phi_{nb} + b_1$$

$$a_2 \phi_2 = \sum a_{nb} \phi_{nb} + b_2$$

$$a_n \phi_n = \sum a_{nb} \phi_{nb} + b_n$$

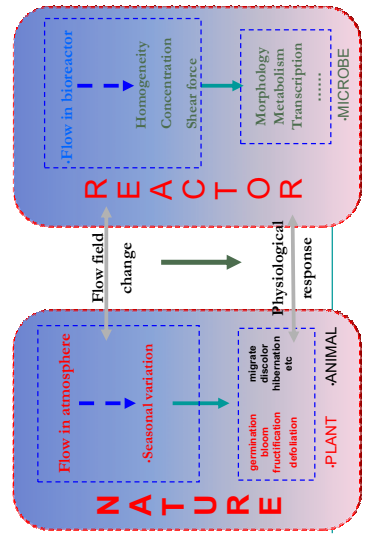
Solve of the linear system of equations



克服从单一生理调控机制出发的研究的局限性 解决发酵过程优化所面临的局部与整体的协调关系

2. 流场特性与生理特性相结合的研究技术——大型发酵装置研究技术的重大突破

环境与生理的相互作用



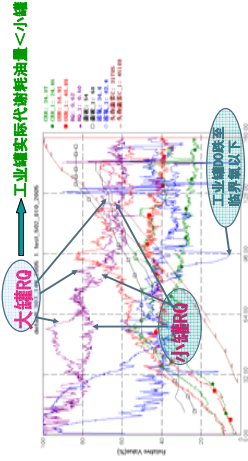
以油为基本原料的小试与生产规模生理特性差异分析 ——RQ值差异的重大发现

试验结果

- 50升发酵罐 (FUS-50L(A)) : 平均4万U/ml, 最高达4.5万U/ml, 用油少
- 160m³工业发酵罐: 平均2.5万U/ml, 最高达3万U/ml, 用油增加30%

RQ值差异的重大发现

发酵过程关键特征参数地发现



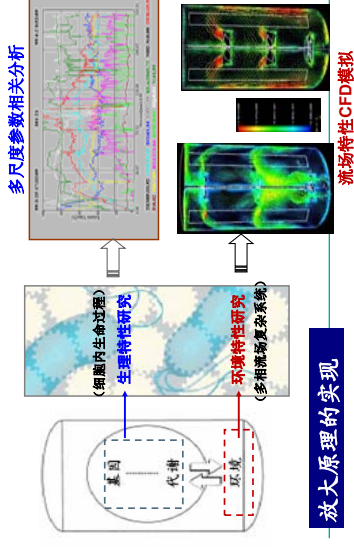
跨尺度测量

头孢菌素C发酵过程中：高耗氧，产氧阶段补入豆油作为碳源，RQ值的变化可很好地表征基质的利用

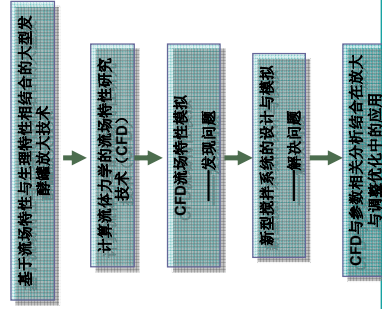
初步结论

- 头C发酵中后期菌体主要以豆油做为碳源，RQ值的高低可以反映出菌体对豆油的利用程度，RQ值越低菌体对豆油的利用越充分。
- 生产160吨发酵罐中菌体对豆油的利用程度较50L罐低。
- DO与RQ值的差异与罐内气体的分散、传递以及物料的混合有关，特别是油的混合程度直接决定了油的利用率。
- 需要借助计算流体力学的方法对160吨发酵罐内头孢菌素C发酵过程的流场分布进行研究。

生化反应过程放大原理与方法

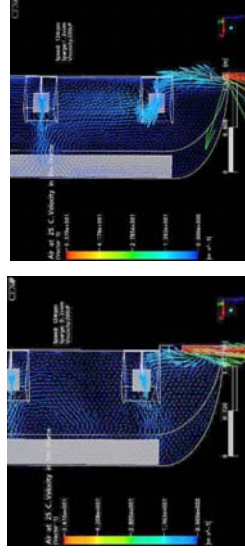


总体思路



建议：第一、二个框架内容调整（去掉？合并？也应没有箭头）

工业规模发酵罐的流场特性模拟

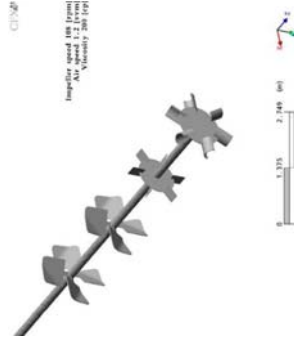


通气量从0.5vvm提高到1.2vvm时，发现浆液间流型干扰

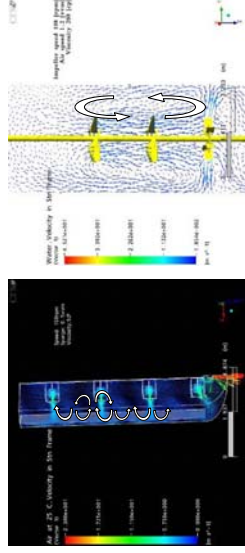
结论

- 现行生产160吨发酵罐搅拌系统设计不合理，引起工业生产罐混和不均的严重问题
- 出现发酵100小时高耗氧时的供氧不足
- 出现顶部加油区到发酵底部的含油浓度梯度，虽然生产大罐加油量，但实际耗油量减少
- 引起脂肪酶的诱导不均一性
- 发酵单位下降，用油成本增加，含油发酵液提取困难，影响产品质量

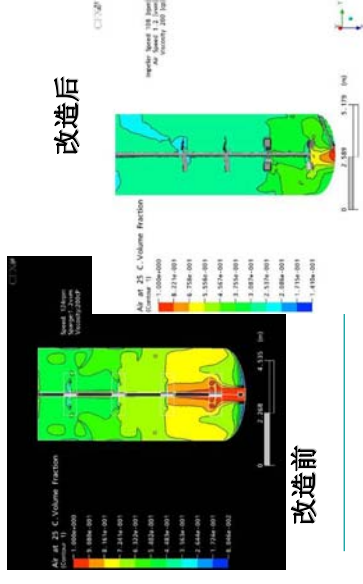
改造后搅拌桨模型



桨区速度矢量图比较



气含率分布比较





基于CFD模拟的不同搅拌形式对头孢菌素C生物合成的影响

Contents

- 1 Introduction
- 2 CFD modeling
- 3 Results and discussion
- 4 conclusions

CFD modeling

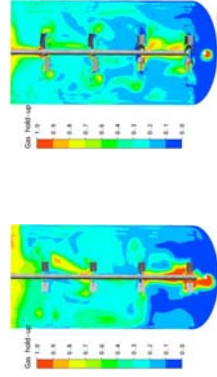
- 利用商业软件ANSYS CFX11.0有限元法求解控制方程。采用标准双方程模型模拟湍流，Euler两相流模型模拟气液相互作用。
- 搅拌桨的旋转模拟采用多参考坐标系法 (multiple reference frames)，即将计算区域分成两块，一块包含搅拌桨的转动区 (rotor region)，另一块包含罐体和冷却蛇管的静止区 (stator region)。
- 网格采用ANSYS ICEM CFD11.0进行划分，两个模型的网格数均在150万网格以上，模型收敛残差定为 10^{-4} ，能够满足工程需要。

Impeller type combination

	Radial impeller configuration (conventional)	Axial impeller configuration (novel)
Bottom stage	Rushton	BTD675
Diameter(mm)	600	675
Second stage	Rushton	HDY675
Diameter(mm)	600	675
Third stage	Rushton	KSY700
Diameter(mm)	600	700
Top stage	Rushton	KSY700
Diameter(mm)	600	700



Air volume fraction comparison

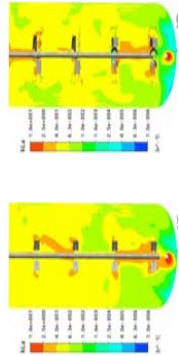


(a) radial flow impellers

(b) axial flow impellers

从气含率分布图来看，两种搅拌组合下反应器内已聚集有一定范围的气泡。径流桨气含率分布更集中于轴流桨组合底部，底部区域气含率明显高于轴流桨组合。另外轴流桨组合顶部气含率分布更广泛，整体气含率略高于径流桨组合。而轴流桨组合下部桨内平均气含率值分别为：轴流组合0.24，径流组合0.26。这是由于在液面处，径流桨的液深较大，造成该区域气含率明显增高造成的。对于轴流桨液深则较小，液面更平稳，而径流桨则液面较大，液面不平稳，与实际观察到的一致。

Comparison of volumetric oxygen transfer coefficient(K_La)



(a) radial flow impellers

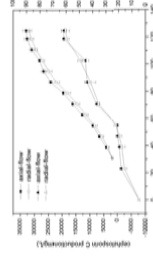
(b) axial flow impellers

图中可见径流桨的氧传质速率较轴流桨的氧传质速率高。这一现象的主要原因是：(1) 径流桨的桨叶比轴流桨的桨叶更宽，这有利于氧液度分布的均匀性。但从 K_La 分布均匀性来看轴流桨轴心分布更为均匀，这有利于氧液度分布的均匀性。

Comparison of theoretic power consumption

	径流桨组合功率(W)	轴流桨组合功率(W)
搅拌轴	1.63	1.61
底流搅拌	2755.33	2332.98
第二层搅拌	2450.44	1960.44
第三层搅拌	2684.02	1291.32
顶层搅拌	1851.18	1052.06
合计	9742.61	6538.4

表中显示了当前条件下两种搅拌组合，各层桨及搅拌轴消耗的功率。从表中可以看出轴流桨组合各层桨功率均大于径流桨组合中的搅拌桨。轴流桨组合整体节约功率约33%。

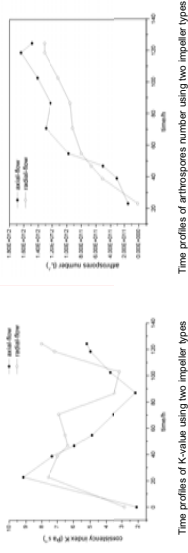


Time course of dry cell weight and captoposporin C production

Time profiles of OUR

从固体干重和报率率 (OUR) 变化趋势来看，不同搅拌组合对固体生长和菌体活力的影响可以忽略不计。从产率来看，轴流桨组合要略优于径流桨。这得益于轴流桨的混合效果要好，以及剪切环境较为温和。

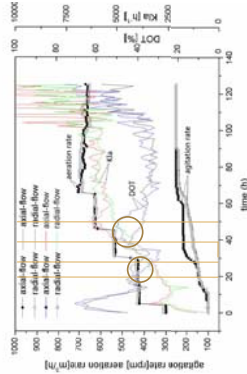
Rheological characteristics and morphological changes



Time profiles of K-value using two impeller types

流体的表观粘度与制度系数K值正相关。50h后轴流桨混批产生褶皱子数目及速率均高于径流桨混批。这大大改善了发酵液的流变特性(剪切稀化特性增强),使得该阶段的K值要低于径流混批。造成这一现象的主要原因则是轴流桨的剪切环境温和,对细胞团体的伤害较小,有利于菌体的正常形态变化。

Time profiles of DOT, aeration rate, agitation rate and KLa using two impeller types



20-28h在操作参数相同条件下,径向流桨混批氧耗kLa大于轴流,这与传统发酵罐中的一致。然而轴流桨的功耗大大低于轴流。

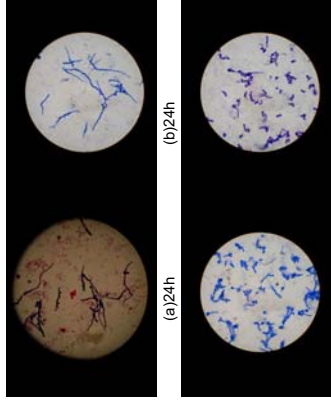
40-50h除了搅拌转速,其它操作参数和功耗与轴流相近的条件下,轴流混批桨混批氧耗高于径流,即氧传质效果良好。

上面分析可以得出,每消耗单位功率,轴流桨的传质表现要优于径流桨,传质效率大约提高15%。

总结与展望

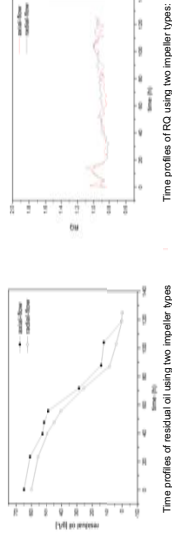
- ◆ 单一生理调控机制出发的研究往往只揭示了局部或某一时段的特点,因而难于实现发酵过程全局优化的困难,没有针对生物过程优化提出有效的方法。
- ◆ 生物反应器中多尺度参数相关的理论方法和在头胞菌素C发酵过程优化的应用。这些研究理论和方法在其他的相关文献中未见报道。
- ◆ 以生物反应器流场特性与生理特性研究相结合的发酵过程放大技术,为生物反应器的优化与放大开辟一条新的科学思路。

morphology changes using radial flow impellers (a, c) and axial flow impellers (b, d)



直观分析, 24h两罐批菌体形态为菌丝为主; 72h两罐批菌体主要形态为游离节孢子为主,而且轴流桨混批的菌体游离节孢子数目明显较径流多。

Substrate utilization



Time profiles of residual oil using two impeller types

由于轴流桨, 发酵液中的轴流桨一直高于径流桨, 说明轴流桨混合更加均匀, 与CFD模拟的结果相一致。

从ROI可以得出, 40-50h正相的轴流桨混批ROI明显高于径流桨, 可以得出轴流桨混批油的利用程度更高。这在一定程度上促进了头胞菌素C合成。同时, 发酵结束后, 残余油更少, 有利于后期分离纯化工艺。

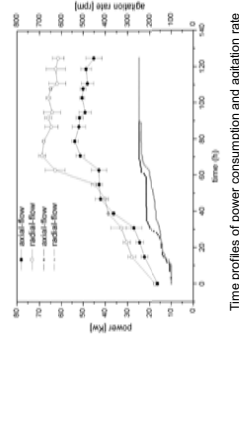
Conclusions

本实验在中试规模(12,000L)完成的, 我们设计了新型轴流搅拌桨, 通过CFD模拟和发酵实验, 与传统径流桨相比, 有以下优势:

- (1) 流场分布更均匀, 整体混合效果较好, 有利于提高底物产油转化率, 从而提高发酵水平
- (2) 轴流桨能够抵抗温和的剪切场, 有利于菌体形态的正常变化, 从而提高了产率
- (3) 液面翻动平稳得多, 有利于增加装液体积, 提高总乙
- (4) 消耗每单位功率, 轴流桨的体积氧传递系数提高约15%
- (5) 维持相同溶氧, 轴流桨大大降低了能耗, 整体下降幅度大约36%

上述结论对反应器的优化和放大有着重要价值。

Comparison of power consumption



Time profiles of power consumption and agitation rate

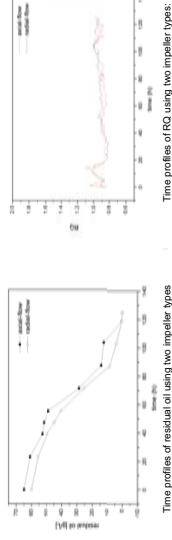
从图中可以看出, 除了40-50h功率消耗比较接近外, 其余时间轴流桨组合的功率消耗远低于径流桨组合, 整体节约能耗大约36%, 这与23h理论计算值(33%)很接近。

Acknowledgements

- Prof. Siliang Zhang
 Prof. Yingping Zhuang
 Dr. Jianye Xia
 Dr. Haifeng Hang
 Dr. Zejian Wang
 Dr. Mingzhi Huang
- Dr. Jianhua Li
 Dr. Yiming Yang
 Mr. Huiyu Yan
 Mr. Ju Lu
 Mr. Jun Tang
 Mr. Liang Li

This work was financially supported by a grant from the National High Technology research and Development Program of China (863 Program, No.2006AA020302), the Major State Basic Research Development Program of China (973 Program, No. 2007CB714303)

Substrate utilization



Time profiles of residual oil using two impeller types

由于轴流桨, 发酵液中的轴流桨一直高于径流桨, 说明轴流桨混合更加均匀, 与CFD模拟的结果相一致。

从ROI可以得出, 40-50h正相的轴流桨混批ROI明显高于径流桨, 可以得出轴流桨混批油的利用程度更高。这在一定程度上促进了头胞菌素C合成。同时, 发酵结束后, 残余油更少, 有利于后期分离纯化工艺。

Conclusions

本实验在中试规模(12,000L)完成的, 我们设计了新型轴流搅拌桨, 通过CFD模拟和发酵实验, 与传统径流桨相比, 有以下优势:

- (1) 流场分布更均匀, 整体混合效果较好, 有利于提高底物产油转化率, 从而提高发酵水平
- (2) 轴流桨能够抵抗温和的剪切场, 有利于菌体形态的正常变化, 从而提高了产率
- (3) 液面翻动平稳得多, 有利于增加装液体积, 提高总乙
- (4) 消耗每单位功率, 轴流桨的体积氧传递系数提高约15%
- (5) 维持相同溶氧, 轴流桨大大降低了能耗, 整体下降幅度大约36%

上述结论对反应器的优化和放大有着重要价值。

总结与展望

- ◆ 单一生理调控机制出发的研究往往只揭示了局部或某一时段的特点, 因而难于实现发酵过程全局优化的困难, 没有针对生物过程优化提出有效的方法。
- ◆ 生物反应器中多尺度参数相关的理论方法和在头胞菌素C发酵过程优化的应用。这些研究理论和方法在其他的相关文献中未见报道。
- ◆ 以生物反应器流场特性与生理特性研究相结合的发酵过程放大技术, 为生物反应器的优化与放大开辟一条新的科学思路。



Welcome to ECUST, Shanghai, China

