

发酵过程 优化原理与实践

● 陈坚 李寅 著



化学工业出版社

现代生物技术与医药科技出版中心

发酵过程优化原理与实践

陈 坚 李 寅 著

化 学 工 业 出 版 社

现代生物技术与医药科技出版中心

·北 京·

(京) 新登字 039 号

图书在版编目 (CIP) 数据

发酵过程优化原理与实践/陈坚, 李寅著. —北京:
化学工业出版社, 2002. 2
ISBN 7-5025-3504-7

I. 发… II. ①陈…②李… III. 发酵-过程控制-
最佳化 IV. TQ920.6

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2001) 第 081474 号

发酵过程优化原理与实践

陈 坚 李 寅 著

责任编辑: 郎红旗 孟 嘉

责任校对: 陶燕华

封面设计: 于 兵

*

化 学 工 业 出 版 社 出版发行
现代生物技术与医药科技出版中心

(北京市朝阳区惠新里 3 号 邮政编码 100029)

发行电话: (010) 64982530

<http://www.cip.com.cn>

*

新华书店北京发行所经销

北京市彩桥印刷厂印刷

北京市彩桥印刷厂装订

开本 787×1092 毫米 1/16 印张 23 字数 568 千字

2002 年 3 月第 1 版 2002 年 3 月北京第 1 次印刷

ISBN 7-5025-3504-7/TS·46

定 价: 45.00 元

版权所有 违者必究

该书如有缺页、倒页、脱页者, 本社发行部负责退换

前 言

几十年来，生物技术已经成为许多物质生产的经济、有效手段，这些物质包括青霉素等抗生素和柠檬酸等化学品。20 世纪 70 年代 DNA 重组技术的出现给生物加工技术和产品带来了新的生机，由重组菌生产高价值的生物药品引起人们的广泛兴趣，与此同时，生物技术在其它方面的应用也日益增长。然而，任何一项生物技术的研究成果要从实验室走向产业化，都需要上、中、下游的密切配合。作为中游技术关键的发酵过程优化技术，不但关系到能否发挥菌种的最大生产性能，而且会影响下游处理的难易程度，因而发酵过程优化技术在整个生物产品的开发过程中起着特别重要的作用。

虽然国内外学术期刊每年都发表大量关于发酵过程优化的研究报告，但对发酵过程优化原理进行系统介绍的专著尚不多见。在借鉴了国外过程优化理论最新研究成果的基础上，本书提出了系统优化的新理论，并通过作者自身完成的研究实例对系统优化的原理进行了详细阐述，还引入了代谢工程领域最新的代谢网络构建与速率分析方法。因此，写作本书的目的是阐述对发酵过程进行优化的基本原理和技术，并通过对特定产品发酵过程优化的分析，为读者开展类似研究提供分析问题和解决问题的思路与方法。生物产品的类别非常之多，但优化的思路和方法是可以通用或借鉴的。在这一方面，作者相信本书会对读者产生积极的影响。

作者撰写此书，一方面得益于作者所工作的学院为国家发酵工程重点学科点，从 1952 年开始积累的发酵过程优化科学研究与工程实践的经验，是作者从学生时代到留校工作一直能够生存和生长的学术土壤；另一方面受助于作者所在研究室许多年轻的博士和硕士，他们和作者一起完成了与本书内容相关的 6 项国家级和部省级科研项目，包括国家自然科学基金项目、国家“八五”科技攻关项目、教育部优秀青年教师基金项目、原轻工总会科技基金项目、霍英东教育基金会青年教师科研基金项目、江苏省“九五”工业重大科技攻关项目，并撰写了 5 篇博士学位论文和 2 篇硕士学位论文，而这些学位论文正是本书的主体。此外，作者还得到了教育部跨世纪优秀人才培养计划的资助。

负责本书中部分章节写作的有：宫衡（第四章），高海军（第六章），郑美英（第七章），堵国成（第八章）。参与本书写作的还有：李华钟、金大勇（第三章），卫功元（第二章）。作者特别感谢中国工程院院士、江南大学（原无锡轻工大学）生物工程学院伦世仪教授的鼓励和指导，感谢所在研究室的博士、硕士研究生给予的帮助。

尽管作者力图在本书中注重结合理论性和实践性，突出系统性和科学性，体现前沿性和创新性，但限于作者的学术功底、研究经验和写作能力，书中定有不少错误。若蒙赐教，不胜感激！

作 者

2001 年 7 月

目 录

第一章 绪论	1
第一节 发酵过程优化在生物工业中的地位及其研究内容.....	1
一、发酵过程优化在生物工业中的地位.....	1
二、发酵过程优化的研究内容.....	1
第二节 发酵过程优化的研究进展.....	3
一、发酵过程优化是生物反应工程的研究前沿之一.....	3
二、流加发酵.....	4
三、高生产率和高细胞密度发酵.....	7
参考文献	11
第二章 发酵过程优化原理	12
第一节 发酵过程优化的微生物反应原理	12
一、概述	12
二、微生物生长反应	12
第二节 发酵过程数量化方法	20
一、数量化方法的基础	20
二、发酵过程的速度	22
三、化学计量学和热力学	24
第三节 微生物反应动力学	28
一、微生物生长的非结构动力学模型	29
二、微生物产物形成动力学模型	32
三、多底物动力学	34
第四节 微生物反应优化的一般原理	35
一、发酵过程优化的一般步骤	35
二、分批微生物反应过程的优化	36
参考文献	39
第三章 生物反应过程的系统优化技术	40
第一节 系统优化技术概述	40
一、系统的定义	40
二、系统的形态	40
三、系统的特征	41
四、系统优化方法的基本原则	42
第二节 ATP 再生系统及其在谷胱甘肽生物合成中的应用	43
一、ATP 再生系统	43
二、ATP 再生和谷胱甘肽生物合成的耦合系统	48
三、生物合成谷胱甘肽种间耦合 ATP 再生系统的构建.....	53

第三节 有机废水处理和聚羟基烷酸生产的耦合系统	57
一、实验装置	59
二、有机废水生产 PHAs 的初步研究	59
三、 <i>R. eutrophus</i> 利用不同有机酸生产 PHAs 的比较研究	60
四、有机废水生产 PHAs 的机理	62
五、有机废水厌氧酸化的最佳工艺条件	64
六、PHAs 分批发酵	66
七、以有机废水酸化产物为底物进行 PHAs 流加发酵	69
第四节 生物反应与产物分离的组合系统	70
一、随程溶剂萃取	71
二、渗透萃取	72
三、渗透蒸发	73
四、其它生物反应与产物分离技术	73
五、生物反应与产物分离组合系统的发展趋势	76
参考文献	76
第四章 赖氨酸发酵过程优化	77
第一节 赖氨酸发酵概述	77
一、发酵法生产赖氨酸技术的发展	77
二、赖氨酸发酵研究的目的是主要内容	79
第二节 赖氨酸生产菌 FB42 的获得	81
一、出发菌株 FB21 的遗传特性	81
二、FB31 菌株摇瓶发酵性能的初步研究	82
三、赖氨酸产生菌 FB42 的获得	84
四、环境因子对 FB42 分泌赖氨酸的影响	86
五、响应面分析法优化 FB42 菌株发酵培养基	88
第三节 连续培养中 FB42 菌株的动力学特性及其代谢流分析	90
一、连续培养中的操作特性	91
二、连续培养中赖氨酸发酵的动力学特性	93
三、FB42 的真实转化率	94
四、赖氨酸发酵的最大理论转化率	95
五、黄色短杆菌 FB42 的代谢流分析	99
第四节 分批发酵过程的控制及分批发酵动力学	100
一、初糖浓度对发酵的影响	100
二、溶氧对发酵的影响	101
三、pH 对发酵的影响	102
四、发酵过程的溶氧与 pH 控制	103
五、赖氨酸分批发酵动力学	106
六、分批发酵动力学模型的评价	110
七、分批发酵的模型分析	111
第五节 赖氨酸流加发酵的最优控制	112

一、最小值原理简介	113
二、连续系统的最小值原理	114
三、流加发酵系统的最优化问题	115
四、流加发酵最优控制的算法	116
五、赖氨酸流加发酵的优化控制	120
参考文献	128
第五章 丙酮酸发酵过程优化	129
第一节 丙酮酸发酵概述	129
一、国外研究水平和发展趋势	129
二、发酵法生产丙酮酸研究中存在的问题	133
第二节 营养条件对光滑球拟酵母 WSH-IP12 生产丙酮酸的影响	135
一、酵母粉浓度对丙酮酸发酵的影响	135
二、蛋白胨浓度对丙酮酸发酵的影响	135
三、豆饼水解液和无机氮源对丙酮酸发酵的影响	136
四、分批培养中供氧方式和培养基碳氮比对丙酮酸发酵的影响	136
五、葡萄糖流加培养中氮的供给对丙酮酸发酵的影响	138
第三节 维生素在丙酮酸过量合成中的重要作用	141
一、突变株 <i>T. glabrata</i> WSH-IP303 的获得及其氮源同化能力	141
二、维生素对 WSH-IP303 过量合成丙酮酸的影响	143
三、维生素亚适量供给下的分批发酵过程	146
第四节 丙酮酸分批发酵的供氧控制模式	149
一、丙酮酸分批发酵过程的溶氧变化情况	149
二、不同 k_La 下 WSH-IP303 发酵生产丙酮酸的动力学特征	149
三、分阶段供氧控制模式的提出和实验验证	151
第五节 丙酮酸发酵过程的代谢网络分析	154
一、代谢网络构建和代谢通量计算	155
二、不同硫胺素浓度和不同 DOT 下的分批发酵结果	159
三、不同硫胺素浓度和不同 DOT 下 NADPH 的产生与消耗	162
四、不同硫胺素浓度和不同 DOT 下 NADH 的产生与消耗	163
五、不同硫胺素浓度和不同 DOT 下 ATP 的产生与消耗	164
第六节 丙酮酸发酵的逐级放大和中间试验	168
一、30 L 发酵罐中葡萄糖浓度对 WSH-IP303 菌株生产丙酮酸的影响	168
二、300 L 规模的丙酮酸发酵试验	170
三、5 m ³ 规模丙酮酸发酵中试	170
参考文献	170
第六章 透明质酸发酵过程优化	172
第一节 透明质酸发酵概述	172
一、透明质酸的分布、结构、性质与应用	172
二、透明质酸的生物合成	173
三、透明质酸的生产	175

四、透明质酸生产中需要解决的问题·····	177
第二节 透明质酸摇瓶的发酵条件·····	178
一、种子培养基组成及培养条件对透明质酸发酵的影响·····	179
二、种子生长过程曲线和种龄·····	181
三、发酵培养基组成对透明质酸发酵的影响·····	181
四、培养条件对透明质酸发酵的影响·····	184
五、透明质酸摇瓶发酵过程曲线·····	185
六、透明质酸摇瓶补料发酵实验·····	185
第三节 分批发酵生产透明质酸的条件·····	186
一、初糖浓度对透明质酸发酵的影响·····	186
二、pH 对透明质酸发酵的影响·····	188
三、温度对透明质酸发酵的影响·····	189
四、搅拌转速对透明质酸发酵的影响·····	190
五、通气量对透明质酸发酵的影响·····	190
六、分批发酵培养条件的优化与控制·····	191
第四节 透明质酸分批发酵动力学及分批发酵过程模型化·····	191
一、理论与模型建立·····	191
二、乳酸对透明质酸发酵的影响·····	194
三、动力学模型参数的求解·····	194
四、动力学模型的适用性·····	196
五、功能单元的酶学一致性·····	196
第五节 高效生产透明质酸的搅拌与溶氧浓度控制策略·····	198
一、发酵体系的流变学特性与传质性能·····	199
二、搅拌转速对透明质酸发酵过程的影响·····	203
三、溶氧浓度对发酵生产透明质酸的影响·····	207
四、透明质酸发酵的搅拌与溶氧浓度控制策略·····	208
五、氧代谢途径及其影响透明质酸合成的作用机制·····	208
第六节 不同发酵模式生产透明质酸的组合操作与优化·····	210
一、补料分批发酵优化理论·····	210
二、重复分批发酵·····	213
三、非优化补料分批发酵与分批发酵的比较·····	214
四、奇异优化控制的补料发酵·····	215
五、重复操作与优化补料组合发酵模式生产透明质酸·····	220
第七节 应用代谢工程方法高效生产透明质酸·····	221
一、理论·····	222
二、分批发酵不同阶段的代谢网络模型·····	225
三、不同溶氧水平下透明质酸发酵的代谢网络模型·····	227
四、代谢节点对透明质酸合成的影响·····	228
五、透明质酸发酵过程中能量、还原力的需求与供给·····	231
六、采用代谢工程方法高效生产透明质酸·····	232

参考文献	237
第七章 谷氨酰胺转氨酶发酵过程优化	238
第一节 谷氨酰胺转氨酶发酵概述	238
一、新型蛋白食品与谷氨酰胺转氨酶	238
二、谷氨酰胺转氨酶的功能性质	238
三、谷氨酰胺转氨酶在食品工业中的应用	239
四、谷氨酰胺转氨酶的生产	240
五、谷氨酰胺转氨酶生产过程中存在的问题	241
第二节 谷氨酰胺转氨酶的摇瓶发酵条件研究	242
一、种子生长过程曲线及种龄	243
二、环境条件对 MTG 摇瓶发酵过程的影响	243
三、营养条件对 MTG 发酵过程的影响	244
四、MTG 合成的摇瓶发酵过程分析	246
第三节 谷氨酰胺转氨酶分批发酵的 pH 及温度控制策略	247
一、控制不同 pH 对发酵过程的影响	247
二、pH 对细胞比生长速率及 MTG 比合成速率的影响	248
三、MTG 发酵过程中 pH 值优化控制策略	250
四、不同温度下的 MTG 分批发酵过程	250
五、温度对细胞生长及产酶的影响	252
六、MTG 分批发酵过程分阶段温度控制策略	253
第四节 搅拌及溶氧浓度对谷氨酰胺转氨酶发酵过程的影响	254
一、搅拌转速对细胞生长及 MTG 酶活的影响	255
二、溶氧浓度对细胞生长及 MTG 合成的影响	257
三、搅拌及溶氧浓度控制模式	258
四、MTG 发酵体系的搅拌功率	259
第五节 茂原链轮丝菌的菌丝球形态与产酶之间的关系	262
一、菌丝球形成过程的理论分析	262
二、茂原链轮丝菌摇瓶种子菌丝状及菌球体状的形态	264
三、培养条件对茂原链轮丝菌增殖形态及 MTG 发酵的影响	264
四、MTG 小罐发酵过程中菌球的形成过程	269
五、菌球大小与产酶之间的关系	269
六、控制菌球增殖形态的策略	270
第六节 谷氨酰胺转氨酶分批发酵过程中氨基酸代谢流分析	271
一、理论分析	271
二、MTG 分批发酵过程分析	275
三、游离氨基酸对 MTG 发酵的影响	277
四、铵离子的解交联作用	279
参考文献	280
第八章 聚羟基烷酸酯发酵过程优化	282
第一节 聚羟基烷酸酯发酵概述	282

一、PHAs 的结构、物理化学性质和应用	282
二、PHAs 的生物合成	283
第二节 真养产碱杆菌生产 PHB 摇瓶发酵条件	290
一、PHB 摇瓶发酵条件研究与补料优化	290
二、PHB 发酵过程中理论产率的计算	295
第三节 真养产碱杆菌连续培养动力学及二级连续培养系统生产聚羟基丁酸	298
一、真养产碱杆菌一级连续培养动力学	298
二、二级连续培养生产 PHB 的动力学分析	301
三、二级连续培养系统中 PHB 的生产强度和 PHB 对葡萄糖的产率系数	305
第四节 聚羟基丁酸分批发酵过程动力学模型及优化	306
一、不同供氧水平对 PHB 发酵过程的影响	306
二、不同初糖浓度对 PHB 发酵过程的影响	308
三、PHB 分批发酵过程分析和控制	312
四、PHB 分批发酵动力学	313
五、PHB 分批发酵过程动力学的分析	316
第五节 聚羟基丁酸流加发酵条件	318
一、氮源的限制、缺乏和恢复氮源供应对 <i>R. eutrophus</i> 菌体生长和 PHB 合成的影响	318
二、葡萄糖的限制、缺乏和恢复供应对 <i>R. eutrophus</i> 菌体生长和 PHB 合成的影响	320
三、限氧和恢复氧供应对生长和 PHB 合成的影响	322
四、培养过程中的不同停氮时间对 PHB 形成的影响	324
五、PHB 合成期不同的氮源流加速率对 PHB 合成的影响	326
第六节 聚羟基丁酸双底物流加发酵准优化控制策略	330
一、菌体生长阶段的准优化	331
二、PHB 合成阶段的准优化	333
第七节 羟基丁酸与羟基戊酸共聚物发酵条件的优化	342
一、PHBV 摇瓶发酵条件	342
二、2 L 罐中 PHBV 流加发酵过程的准优化控制	348
参考文献	352
附录 英文名称缩写中文对照	354

第一章 绪 论

第一节 发酵过程优化在生物工业中的地位及其研究内容

一、发酵过程优化在生物工业中的地位

20 世纪 70 年代以重组 DNA 技术为标志的现代生物技术的诞生,意味着人们可以直接操纵细胞的遗传机制,使之成为人类的需要服务,这就从根本上扩大了生物系统的应用范围。现代生物技术不仅能在生产新型食品、饲料添加剂、药物的过程中发挥重要的作用,还能经济、清洁地生产传统生物技术或一般化学方法很难生产的特殊化学品,在解决人类面临的人口、粮食、健康、环境等重大问题的过程中必将发挥积极的作用。

然而,生物技术要真正造福于人类,必须走产业化的道路,这意味着仅仅依靠重组 DNA 技术或其它改造生物系统的技术是不够的。以工业微生物为例,选育或构建一株优良菌株仅仅是一个开始,要使优良菌株的潜力充分发挥出来,还必须优化其发酵过程,以获得较高的产物浓度(便于下游处理)、较高的底物转化率(降低原料成本)和较高的生产强度(缩短发酵周期)。现代生物技术已经把过程优化作为一项重要研究内容来对待。

发酵是生物技术产业化的基础。为了追求经济效益,发酵工厂的规模不断扩大,由于反应器结构不当或控制不合理引起的投资风险也急剧增加。要规避这种风险,就必须首先在实验室中对发酵过程优化进行研究,特别是生物反应宏观动力学和生物反应器的研究。简而言之,生物反应动力学是有关生物的、化学的与物理过程之间的相互作用,诸如生物反应器中发生的细胞生长、产物生成、传递过程等。生物反应动力学研究的目的是为描述细胞动态行为提供数学依据,以便进行数量化处理。生物反应宏观动力学是发酵过程优化的基础。生物反应器则是发酵过程的外部环境,反应器类型对发酵过程的效率及发酵过程优化的难易程度影响很大。发酵过程优化的目标就是使细胞生理调节、细胞环境、反应器特性、工艺操作条件与反应器控制之间这种复杂的相互作用尽可能地简化,并对这些条件和相互关系进行优化,使之最适于特定发酵过程的进行。

二、发酵过程优化的研究内容

发酵过程和化工过程最主要的不同之处在于发酵过程有微生物参与进行。微生物作为有生命的一种物质,其行为与化学催化剂相比更加难以控制,因而导致某些发酵过程参数难以检测,过程可控性也比化工过程有所下降。因此,如何把发酵过程模型化的概念和一些微生物生理学的基本问题结合起来已经成为生化工程学者在进行发酵过程优化研究时的主要问题之一。因为只有了解了微生物的生理生化特性,才能更好地驾驭微生物使之造福于人类。

发酵过程通常在一个特定的反应器中进行,由于微生物反应是自催化反应,故而其自身也是反应器,所有要从细胞这个微反应器中出来的物质都必须通过细胞和环境之间的边界线,使得所有在细胞体内(即生物相)所发生的反应都与环境状况(即非生物相)密切联系在一起。实际的生物反应系统是一个非常复杂的三相系统,即气相、液相和固相的混合体,且三相间的浓度梯度相差很大,达几个数量级。要对如此复杂的系统进行优化研究,必须作大量的假设使问题得以简化,因为有关生物反应的单个步骤、进/出细胞物质的传递以及反

反应器内的混合等问题的研究已经相当成熟，如果能通过适当的假设使复杂的反应过程简化至能够进行定量讨论的程度，一般来说就能够实现反应过程的优化。

发酵过程优化主要涉及四个方面的研究内容。

第一个方面是细胞生长过程（cell growth reaction）研究。如果不了解微生物的生理特性和胞内的生化反应，研究反应动力学是没有意义的，更谈不上发酵过程优化。因此，细胞生长反应的研究是发酵过程优化的重要基础内容。研究细胞的生长反应，不仅要清楚地了解微生物从非生物培养基中摄取营养物质的情况和营养物质通过代谢途径转化后的去向，还要确定不同环境条件下微生物的代谢产物分布。

第二个方面是微生物反应的化学计量。微生物利用底物进行生长，同时合成代谢产物，底物中的含碳物质作为能源和氮源一起促进细胞内的合成反应。理论上，所有投入的碳和氮都可以在生物反应器的排出物——菌体细胞、剩余底物以及代谢产物中找到，因此微生物反应的化学计量似乎是件很容易的事情，然而事实并非如此。缺少传感器、在生化系统中进行连续检测的困难、或者由于对微生物的生理特性缺乏深入的认识而导致遗漏了代谢产物，这些都会使得发酵过程的质量衡算很难进行。而对来自工业研究的动力学数据进行质量衡算则更困难。对微生物反应进行化学计量和质量衡算的优越性在于：即使没有任何有关该微生物反应动力学的参考资料，运用基于化学计量关系的代谢通量分析方法，仍可以提出该微生物代谢途径的可能改善方向，为过程优化奠定基础。

发酵过程优化涉及的第三个方面的内容是生物反应动力学。生物反应动力学是发酵过程优化研究的核心内容，主要研究生物反应速率及其影响因素。发酵过程的生物反应动力学一般指微生物反应的本征动力学或微观动力学，即在没有反应器结构、形式及传递过程等工程因素的影响时，微生物反应固有的反应速率。除了反应本身的性质外，该反应速率只与各反应组分的浓度、温度及溶剂性质有关。在一定反应器内检测到的反应速率即总反应速率及其影响因素，属于宏观动力学研究范畴。根据宏观动力学及其对反应器空间和反应时间的积分结果，可推算达到预计反应程度（转化率或产物浓度）所需要的反应时间和反应器容积，从而进行反应器设计。建立动力学模型的目的就是为了模拟实验过程，对适用性很强的动力学模型，还可以推测待测数据，进而确定最佳生产条件。

发酵过程优化涉及非结构模型和结构模型的建立。如果把细胞视为单组分，则环境的变化对细胞组成的影响可被忽略，在此基础上建立的模型称为非结构模型。非结构模型是在实验研究的基础上，通过物料衡算建立起经验或半经验的关联模型。它是原始数据的拟合，可以体现主要底物浓度的影响，大多数稳态微生物反应都能用相当简单的非结构模型来描述，但只有当细胞内各种成分均以相同的比例增加，即所谓平衡生长状态时才能这样处理。如果由于细胞内各组分的合成速率不同而使各组分增加的比例不同，即细胞生长处于非均衡状态时，非结构模型对外推范围可能有所出入，此时就必须运用从生物反应机理出发推导得到的结构模型。在考虑细胞组成变化的基础上建立的模型，称为结构模型。在结构模型中，一般选取 RNA、DNA、糖类及蛋白质的含量作为过程变量，将其表示为细胞组成的函数。但是，由于细胞反应过程极其复杂，加上检测手段的限制，以至缺乏可直接用于在线确定反应系统状态的传感器，给动力学研究带来了困难，致使结构模型的应用受到了限制。

第四个方面的内容是生物反应器工程，包括生物反应器及参数的检测与控制。生物反应器的形式、结构、操作方式、物料的流动与混合状况、传递过程特征等是影响微生物反应宏观动力学的重要因素。在工程设计中，化学计量式、微生物反应和传递现象都是需要解决的问题。参数检

测与控制是发酵过程优化最基本的手段，只有及时检测各种反应组分浓度的变化，才有可能对发酵过程进行优化，使生物反应在最佳状态下进行。限于篇幅，生物反应器工程不是本书讨论的重点，感兴趣的读者可以参考德国学者卡尔·许格尔著的《生物反应工程》一书。

第二节 发酵过程优化的研究进展

一、发酵过程优化是生物反应工程的研究前沿之一

20 世纪 40 年代初抗生素工业的兴起，标志着发酵工业进入了一个新阶段。自此，发酵工业在产品更新、新设备和新技术的应用上都达到了前所未有的水平。一门反映生物和化工相交叉的学科——生化工程也随之在 20 世纪 40 年代末诞生，并取得了飞速的发展。

Hasting 指出（1954 年），生化工程要解决的十大问题是深层培养、通气、空气除菌、搅拌、结构材料、容器、冷却方式、设备及培养基除菌、过滤、公害。到 20 世纪 60 年代中期，生化工程的研究人员在发酵及与之相关的管路网络设计、操作中推行了无菌的概念，建立了无菌操作的一整套技术。1964 年 Aiba 等人认为通气搅拌与放大是生化工程学科的核心，其中放大是生化工程的焦点。由于通气搅拌尤其是发酵罐的放大问题不仅仅与发酵罐的特性、液体的动态有关，而且与微生物的代谢反应紧密相连，因此 1973 年 Aiba 等人进一步指出，在大规模研究方面，仅仅把重点放在无菌操作、通气搅拌等过程的物理现象解析和设备的开发上是不够的，应当进一步开展对微生物反应本质的研究。其后，生化工程的研究重点就逐步从对过程的物理特性研究过渡到对微生物反应进行定量研究上来。

综上所述，自 20 世纪 50 年代中后期以来，有关微生物反应动力学的研究已经逐步发展成为生化工程的一个重要分支——生物反应工程（Bioreaction Engineering）。这一名词最早于 1971 年被英国的阿特金森采用。1974 年，他在编著的《生物反应器》一书中指出，生物反应工程的目的是提供合适的能描述微生物体系的动力学表达式，并通过实验求出半经验常数。1979 年，日本学者山根恒夫编著了《生物反应工程》一书，认为生物反应工程是一门以速度为基础，研究酶反应、微生物反应及废水处理过程的合理设计、操作和控制的工程学。1985 年，德国学者卡尔·许格尔提出生物反应工程的研究应当包括两个方面的内容，一是宏观动力学，它涉及生物、化学、物理之间的相互关系；二是生物反应器工程，它主要涉及反应器本身，特别是不同的反应器对生物化学和物理过程的影响。

目前一般认为生物反应工程是一门以生物反应动力学为基础，研究生物反应过程优化和控制以及生物反应器的设计、放大与操作的学科。生物反应工程的研究主要采用化学动力学、传递过程原理、设备工程学、过程动态学及最优化原理等化学工程学原理，也涉及到生物化学、微生物学、微生物生理学和遗传学等许多学科领域，因此是一门综合性很强的边缘学科。它的核心是生物反应过程的数量化处理和动力学模型的建立，实现发酵过程优化则是生物反应工程的研究目标。

美国麻省理工学院（MIT）的 Cooney 指出，要实现发酵过程的优化与控制，必须解决好 5 个问题：①生物模型；②传感器技术；③适用于生物过程的最优化技术；④系统动力学；⑤计算机-检测系统-发酵罐之间的接口技术。卡尔·许格尔也强调：细胞形态、细胞

环境、反应器特性及过程操作和控制之间的关系非常复杂（图 1-1），由于目前对这种复杂的关系了解还很不充分，因此所掌握的一些观察方法

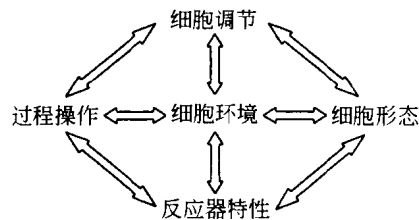


图 1-1 生物反应器中复杂的相互关系

和获得的一些动力学模型还仅仅只是一个起步。

发酵过程优化的目的是更好地控制发酵过程，然而由于高效、耐用生物传感器的制造比较困难，再加上对生物反应过程的机理并不是非常清楚，因此，目前真正将生物反应工程原理运用到发酵过程优化和反应器设计中的生产实例还不多见，但其重要性却越来越受到各国学者的重视。此方面的研究工作概括起来大致可分为以下 3 个方面：

① 针对有关发酵产品的生产过程进行微生物生长和产物形成的动力学研究，提出新的或修正的动力学模型或表达式；

② 结合现代生物技术产品的开发，进行基因工程菌、哺乳动物细胞或植物细胞的生长动力学和产物形成动力学的研究；

③ 在动力学研究的基础上进行过程优化控制的研究，包括状态观察方程的建立、观察数据的噪声过滤、不可测参数及状态的识别、过程离线或在线的优化控制。其中尤以流加发酵的最优化研究报道居多。

二、流加发酵

(一) 概述

流加发酵即补料分批发酵 (fed-batch fermentation)，有时又称半连续培养或半连续发酵，是指在分批发酵过程中间歇或连续地补加新鲜培养基的发酵方法。

流加发酵的应用可追溯到很早。20 世纪初，人们就知道利用麦芽汁生产酵母时会使酵母生长过旺，造成缺氧的环境，导致乙醇的产生，进而引起酵母减产。于是 1915 年至 1920 年间在酵母的工业生产中采用了向初始培养基中补加营养源的方法，抑制乙醇的产生，提高酵母产量。迄今，流加发酵的应用范围已相当广泛，包括单细胞蛋白、氨基酸、生长激素、抗生素、维生素、酶制剂、有机酸、高聚物、核苷酸等的生产，几乎遍及整个发酵行业。

在早期的工业生产中，补料方式非常简单，最经常采用的就是在发酵进行到一定时间时，称取一定量的营养物投入到发酵液中。这是一种经验方法，操作比较简单，但对控制发酵不太有效。近年来随着理论研究和应用的不断深入，流加发酵的内容大大丰富了，尽管它属于分批发酵到连续发酵的过渡形式，但在某些情况下，几乎不再含有分批发酵的概念而更接近于连续操作，如多级重复补料分批培养。从物料流入速度和流出速度考虑，流加发酵操作可分为 5 类 (图 1-2)，其中 1, 2 类目前应用最广，通常所指的流加发酵一般都是针对这两类。

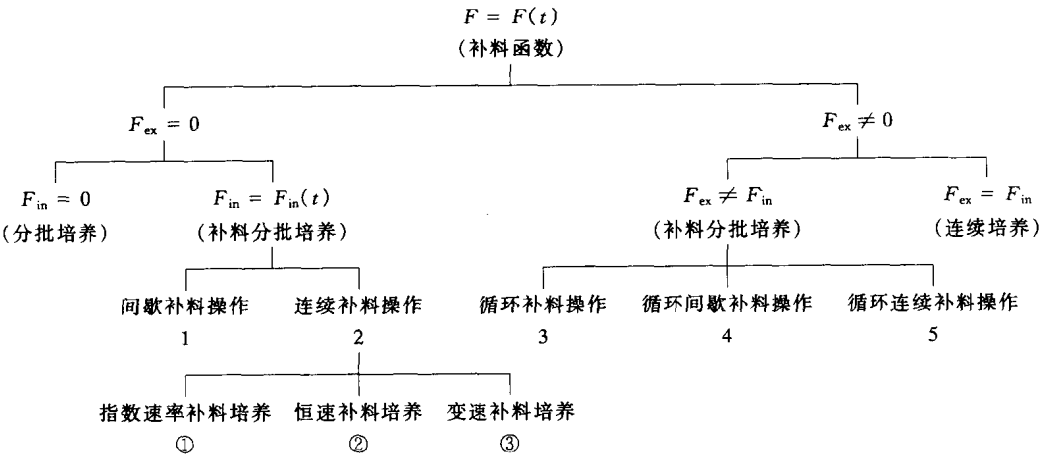


图 1-2 流加发酵的分类

F —流速; F_{in} —流入速度; F_{ex} —流出速度

(二) 流加发酵与连续发酵和分批发酵的比较

流加发酵介于分批发酵和连续发酵之间,兼有两者的优点,同时又克服了两者的缺点。与传统的分批发酵相比,流加发酵可以解除底物抑制、葡萄糖效应和代谢阻遏等;与连续发酵相比,流加发酵则具有染菌可能性小,菌种不易老化变异等优点。卡尔·许格尔从投资、操作、控制、环境等方面对分批、连续和流加3种操作方式进行了比较(如表1-1),并指出由于分批发酵一般生产强度较低,而连续操作过程又受到许多限制,故常常采用流加发酵。

表 1-1 分批、连续、流加操作方式的比较

方 式	优 点	缺 点
分批发酵	1. 一般投资较小 2. 易转产、生产灵活 3. 分批操作中某一阶段可获得高的转化率 4. 发酵周期短,菌种退化率小	1. 因放罐、灭菌等原因,非生产时间长 2. 经常灭菌会降低仪器寿命 3. 前培养和种子的花费大 4. 需较多的操作人员或较多的自动控制系统
连续发酵	1. 可实现有规律的机械、自动化 2. 操作人员少 3. 反应器体积小、非生产时间少 4. 产品质量稳定 5. 操作人员接触毒害物质的可能性小 6. 测量仪器使用寿命长	1. 操作不灵活 2. 因操作条件不易改变,原料质量必须稳定 3. 若采用连续灭菌,加上控制系统和自动化设备,投资较大 4. 必须不断地排除一些非溶性的固型物 5. 易染菌,菌种易退化
流加发酵	1. 操作灵活 2. 染菌、退化的几率小 3. 可获得高的转化率 4. 对发酵过程可实现优化控制 5. 因经常灭菌会降低仪器使用寿命	1. 非生产时间长 2. 需较多的操作人员或计算机控制系统 3. 操作人员接触一些病原菌和有毒产品的可能性大

(三) 流加发酵的研究进展

流加发酵的理论研究在20世纪70年代以前几乎是个空白,流加过程控制仅仅以经验为主,流加方式也仅仅局限于间歇或恒速流加,直到1973年日本学者Yoshida等人首次提出了“fed-batch fermentation”这个术语,并从理论上建立了第一个数学模型,流加发酵的研究才开始进入理论研究阶段。其后,随着研究的不断深入,流加发酵在以下3个方面取得了重大的进展。

1. 20世纪70年代中后期对流加发酵过程的动力学解析

Yoshida最早提出的数学模型相当简单,在计算过程中假定补料过程前后的体积不变。1974年Pirt考虑了体积的变化,在研究恒速流加的补料分批发酵提出了“准稳态”的概念,并认为,假如补料分批培养中所补加的限制性基质仅用于合成细胞,则符合Monod动力学,在 $dx/dt \approx 0$, $ds/dt \approx 0$ 的情况下, $\mu = D$,这个状态称为“准稳态”。Dunn等在进一步的研究中指出,虽然流加发酵的动力学在形式上和连续培养相似,但状态是不一样的,在保持低的流加速度和低的限制性营养基质浓度时,流加过程可以达到准稳态,此时 $\mu = D$, $dx/dt = 0$,但 $ds/dt \neq 0$, s 随时间下降。故恒速流加只能出现在 μ 和 D 相等并同步变化的准稳态。

Keller等人研究发现,当补料速度按指数变化时,可以得到真正的稳态。Yamane等在酵母培养过程中以指数方式进行补料,并以 μ 作为 s 的函数,研究表明当 $f(s) > 0$ 时,即可得到稳定的操作。Keller等对流加发酵动态过程进行了计算机模拟,在3种情况下($\mu = 0$, $\mu = \mu_{\max}$, $s = 0$)与恒化器进行了比较,指出流加发酵在某些情况下和连续培养是非常相

似的，流加发酵的动力学模型必须考虑体积的变化。

2. 结合发酵过程的可测参数对流加过程进行反馈控制

1958 年 Ohhashill 最早将底物的流加和发酵液中的 DO（溶解氧）值联系起来，通过 DO 值对流加速度进行反馈控制。在建立反馈控制模型的基础上，利用计算机对流加过程实现自动控制，稳定流加发酵过程操作，避免了发酵过程中不可逆状态的出现。其后随传感器技术的进步，除 DO 法外陆续发展了 CO₂ 法、RQ（呼吸商）法、pH 法、代谢物法、荧光法等方法对流加发酵过程进行反馈控制。CO₂ 法指利用尾气中 CO₂ 的浓度作为反馈控制参数对底物的流加进行反馈控制的方法；RQ 法是指通过测定 CO₂ 的生成速度和 O₂ 的消耗速度，计算出 RQ 值，再与设计值进行比较，决定如何控制底物流加速度；代谢物法一般是通过测定副产物的形成速度反馈控制流加速度，如酵母生产中根据乙醇生成最小原则来调节底物的流加速度。

3. 流加发酵的最优化研究

图 1-3 为流加发酵反馈控制示意图。一般设定值由实验得出，且在发酵过程中保持不

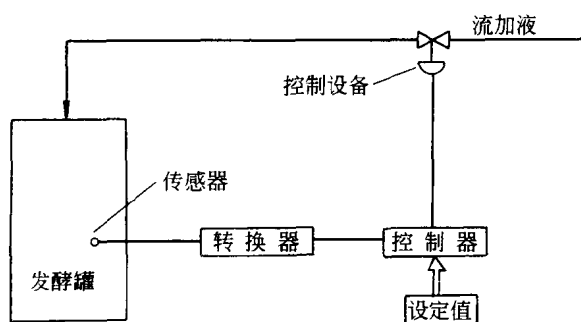


图 1-3 流加发酵反馈控制示意

变。然而由于发酵过程中各种状态参数是不断变化的，保持某个恒定的值通常不能使发酵过程始终处于最佳的状态。因而产生了流加发酵最优化的研究，其核心问题即是找出最佳的底物流加方式，以维持发酵过程始终处于最佳状态。这是一个受控系统的最优化问题，其研究内容包括状态方程的建立、目标泛函的确定和最优化底物流加方式的求解。

流加发酵的状态方程是以流加发酵动力学为基础，由物料衡算式得出。流加发酵的物料衡算式一般可以表达为：

$$\frac{d(xV)}{dt} = \mu xV \quad (1-1)$$

$$\frac{d(sV)}{dt} = -\sigma xV + s_f f \quad (1-2)$$

$$\frac{d(pV)}{dt} = \pi xV \quad (1-3)$$

$$\frac{dV}{dt} = f \quad (1-4)$$

方程组中， μ 、 π 、 σ 分别代表菌体、产物生成比速度及基质消耗比速，在等式中是一个相对于 X, P, S 的函数，它可以是 X、P、S 中某单一因子的函数，也可以是 X、P、S 中两个或三个因子的函数。引入状态变量 x_1, x_2, x_3, x_4 分别代表 xV, sV, pV, V 。另外再加一状态变量 x_5 ，并令 $x_5=1, x_5(0)=t_0$ ，所以 $x_5=t-t_0$ ，实质上 x_5 代表发酵时间，将 x_1, x_2, x_3, x_4 代入式 (1-1) ~ 式 (1-4)，并结合 x_5 得出了流加发酵系统的状态方程：

$$\frac{d}{dt} \begin{bmatrix} x_1 \\ x_2 \\ x_3 \\ x_4 \\ x_5 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \mu x_1 \\ -\sigma x_2 \\ \pi x_3 \\ 0 \\ 1 \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} 0 \\ s_f \\ 0 \\ 1 \\ 0 \end{bmatrix} f$$

写成向量式为：

$$\begin{aligned}x &= a(x) + bf \\ x(0) &= x_0\end{aligned}$$

最优化问题的求解是针对特定的目标泛函。对于流加发酵这个受控系统，发酵过程的目的不外乎时间最短、产物得率最大、发酵终点产物浓度最高等，因此目标泛函可以用发酵终点状态表示：

$$J = \phi[x(t_f)]$$

最优化流加方式的求解是流加发酵优化研究中的一个关键问题。各国生化工程学者由于背景和研究对象的不同，因此在求解过程中从运用最优化的数学方法到采用同一种数学方法求解不同问题上都存在着差距。从文献报道来看，被应用于流加发酵的最优化理论有格林原理、庞特里金最小值（最大值）原理等。格林原理最早应用于赖氨酸流加发酵的最优化研究，它的缺点是解决问题的范围有一定的局限性，如物料衡算式最多只能有两个，边界条件（发酵始、终态）要已知等等。最小值原理是最优化控制理论中寻求最佳控制的一个最基本的数学理论方法，20 世纪 50 年代苏联数学家庞特里金等在研究当时工程技术中出现的最佳控制问题时提出了最小值原理。同其它寻求最优控制的理论和方法相比（如动态规划），最小值原理有更为完整和具体的算法，它将问题归结为常微分方程组使求解更为方便。最小值原理最早应用于青霉素的流加发酵中。

由于以底物流加速度为控制变量所决定的受控系统是一个线形系统，直接用最小值原理无法对单一控制阶段的最优化流加方式进行求解。Yamane 等以比生长速度代替底物流加速度作为控制变量，将单一控制阶段转变为非单一控制阶段，得出了比生长速度的最优曲线，间接地得到了流加速度最优曲线。Lim 等总结了前人的研究，指出虽然通过简化和改变控制变量可以得出最优化的流加方式，但该流加方式的使用范围很窄。基于此，他们以一般发酵类型为研究对象，针对 4 个物料衡算式（菌体、产物、基质、体积）、一个控制变量（流加速度）的系统，进行了理论上的分析，得出了单一控制阶段的数学表达式，据此可直接求出底物流加的最优曲线。这是流加发酵最优化研究中的一个重要进展。在随后的研究中，Lim 等将求解范围进一步扩大至物料衡算式可以多于 4 个控制变量、可以多维的流加发酵系统。

流加发酵的最优化研究不但有助于提高发酵水平，而且为应用发酵过程计算机控制提供了潜力，体现了现代发酵技术的研究趋势。目前流加发酵最优化研究仍存在着实践上的一些障碍，如合理动力学模型建立的困难、流加发酵的最优化理论有待进一步完善等，但可以设想随着研究的深入，流加发酵最优化研究必将为流加发酵的应用带来广阔的前景。

三、高生产率和高细胞密度发酵

生物技术研究者追求的两个主要目标，一是新型生物产品的开发，另一就是为传统的或新型生物产品寻求更经济的生产方式。近十年来，利用遗传工程技术来生产一些重要的生物药物，是生物技术领域中迅速发展的重要方向。在这一研究领域里，如何创造更经济、更有效的方法，来提高生产过程的经济性和产品的市场竞争力，已经成为生物技术领域的科学家们所关注的焦点问题。

利用重组 DNA 技术生产重要的生物药物，在人类文明史上具有划时代的意义。由于生产成本和生产率的高低直接影响公司的生存，重组生物药物生产过程的优化已经成为一个重要问题。它包括以下 6 个方面：①适宜宿主的选择；②重组蛋白积累位点（如可溶的胞内积累、胞内聚合积累、周质积累或胞外积累）的确定；③重组基因最大表达的分子策略；④细