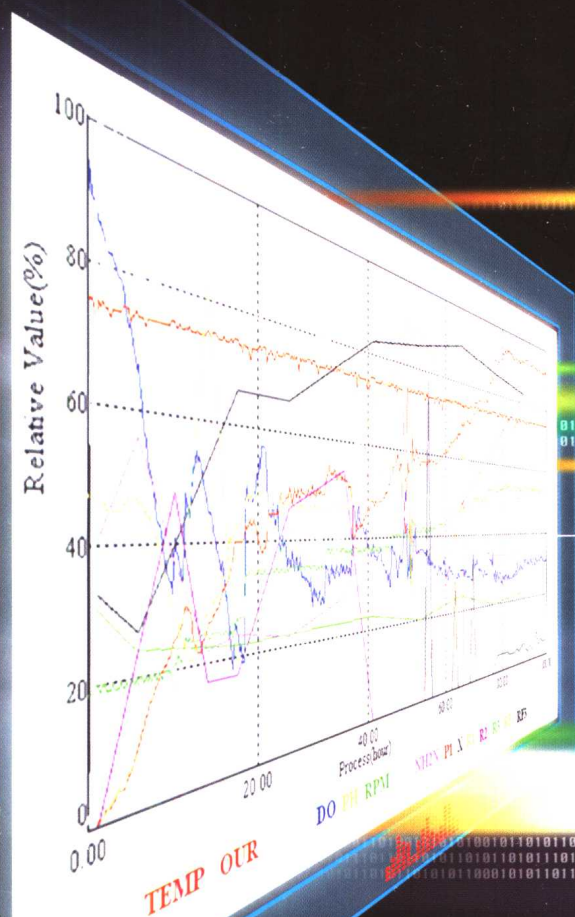


多尺度 微生物过程优化

张嗣良 储炬 编著



化学工业出版社

T892.01
Z 295

多尺度微生物过程优化

张嗣良 储 炬 编著



化学工业出版社

· 北 京 ·

(京) 新登字 039 号

图书在版编目 (CIP) 数据

多尺度微生物过程优化 / 张嗣良, 储炬编著.
北京: 化学工业出版社, 2003.7
ISBN 7-5025-4595-6

I. 多… II. ①张…②储… III. 微生物学: 发酵学 IV. TQ920.1

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2003) 第 059898 号

多尺度微生物过程优化

张嗣良 储炬 编著

责任编辑: 赵玉清

责任校对: 顾淑云

封面设计: 郑小红

*

化学工业出版社出版发行

(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

聚鑫印刷有限责任公司印刷

三河市延风装订厂装订

*

开本 787 毫米×1092 毫米 1/16 印张 20½ 彩插 2 字数 485 千字

2003 年 9 月第 1 版 2003 年 9 月北京第 1 次印刷

ISBN 7-5025-4595-6/G · 1264

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

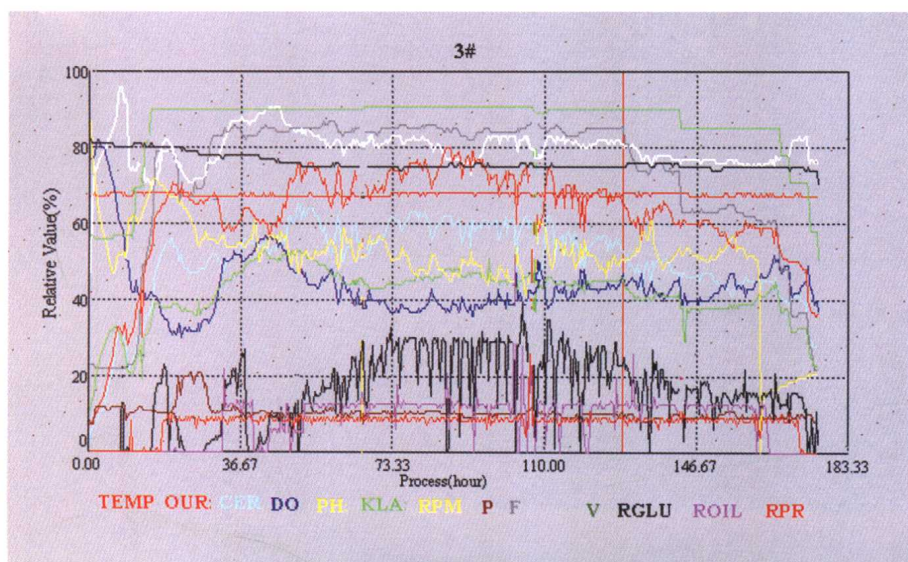
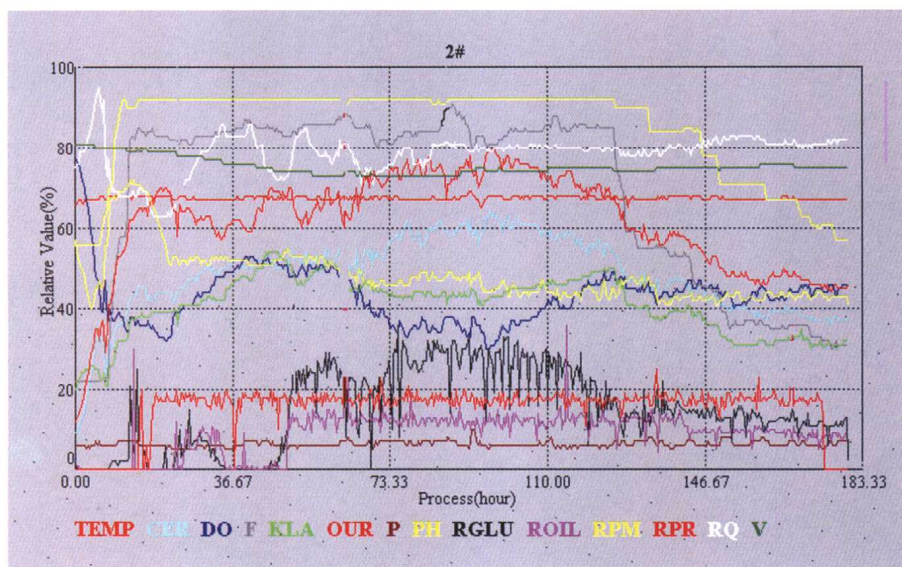
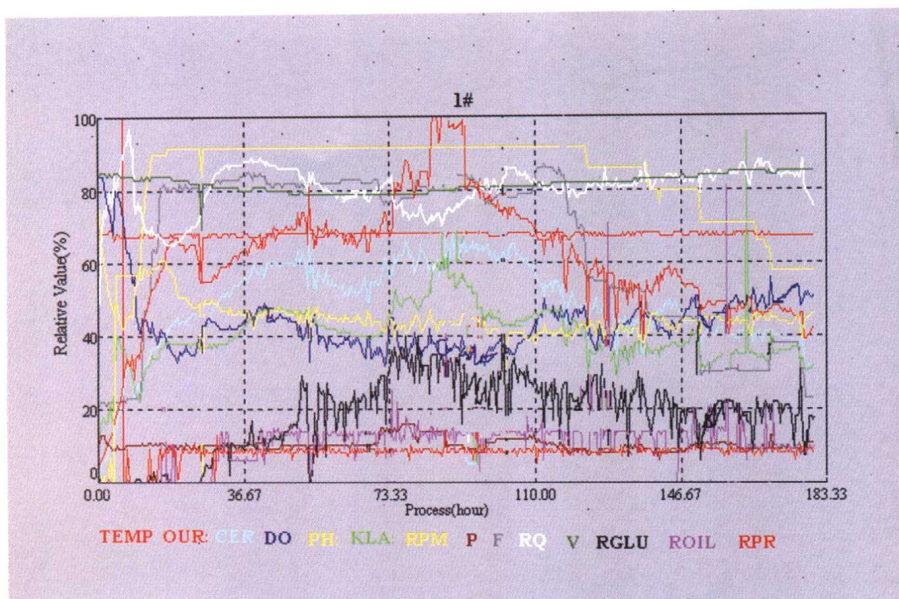


图 4-1 红霉素发酵趋势曲线

Hamp/06

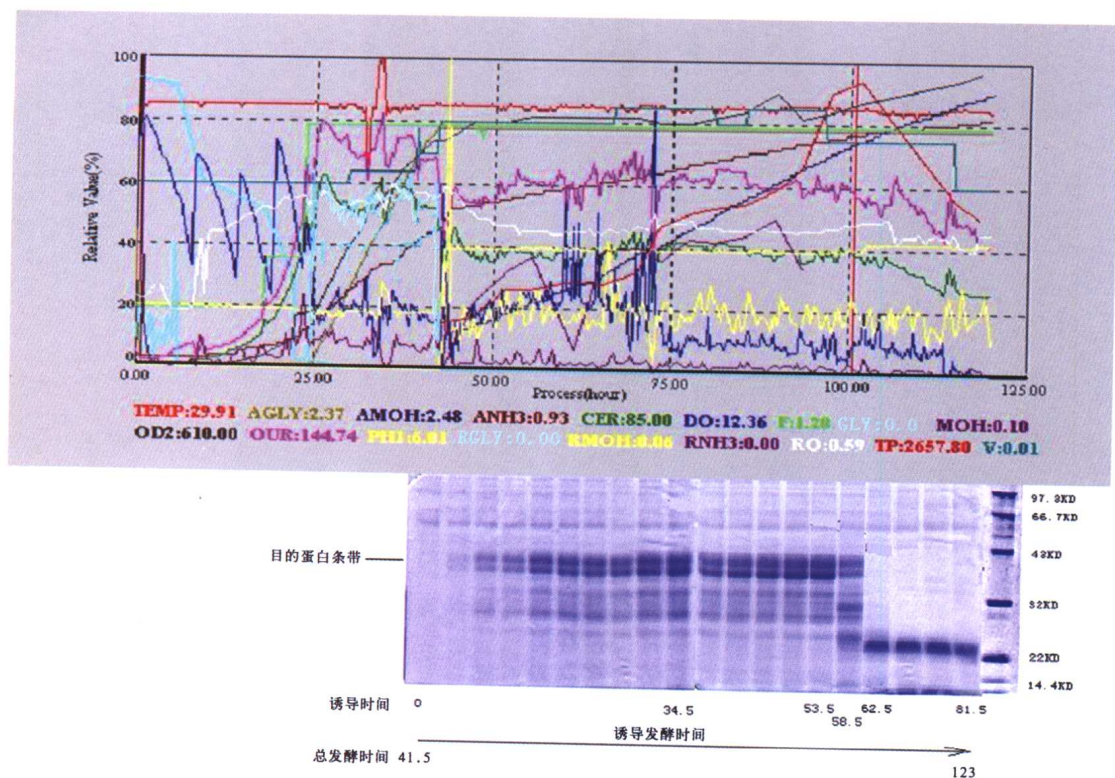


图 4-28 毕赤酵母表达疟原虫疫苗的发酵过程参数变化趋势图

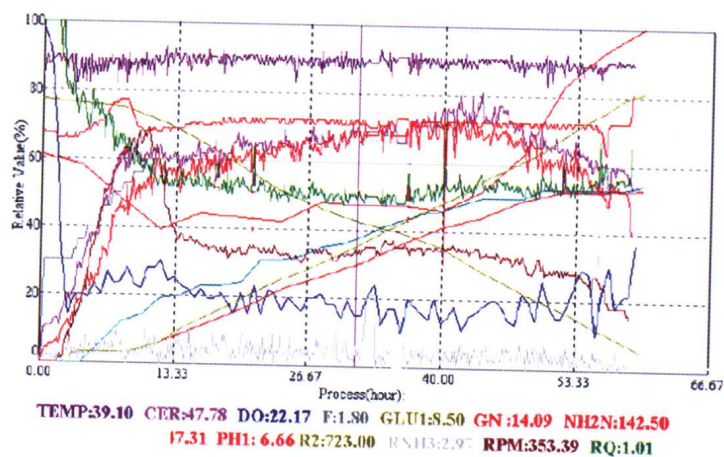


图 7-8 典型的鸟苷发酵过程曲线

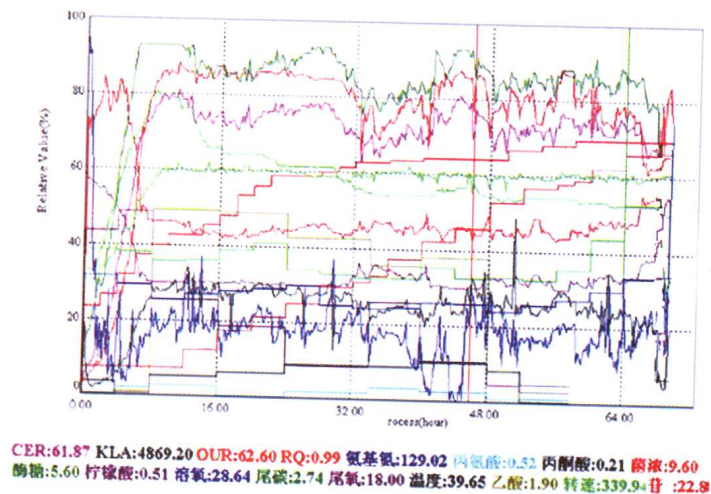


图 7-36 工艺调整后的鸟苷发酵趋势曲线

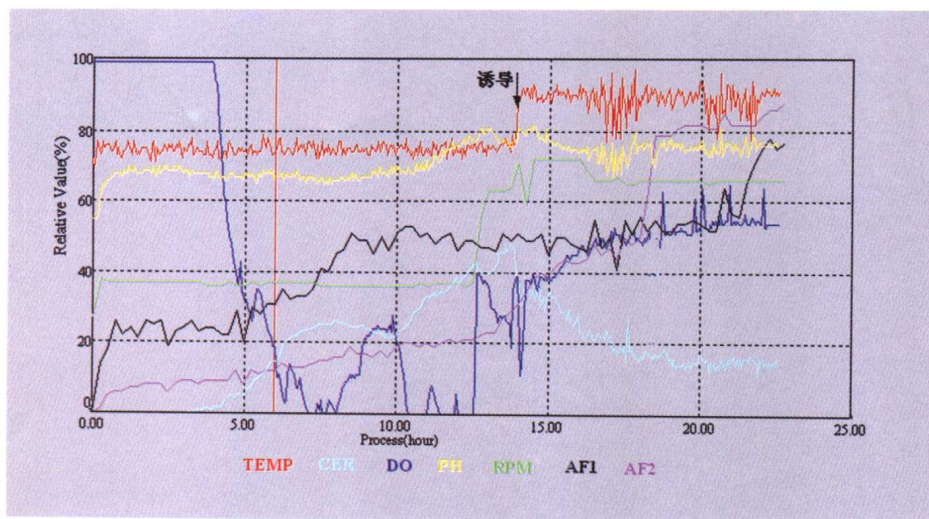


图 8-3 *E.coli* JM109菌株温度诱导发酵过程参数曲线图

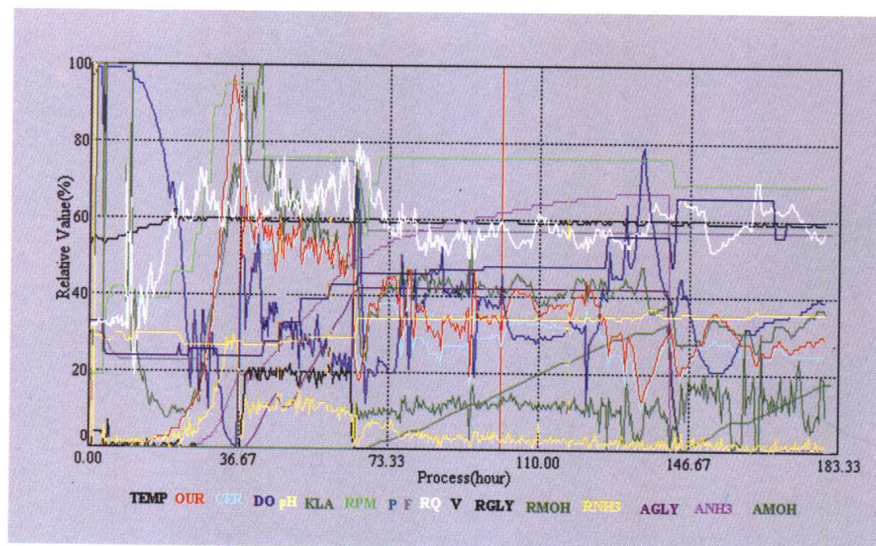


图 8-15 500L rh-SA高密度高表达发酵过程参数趋势曲线

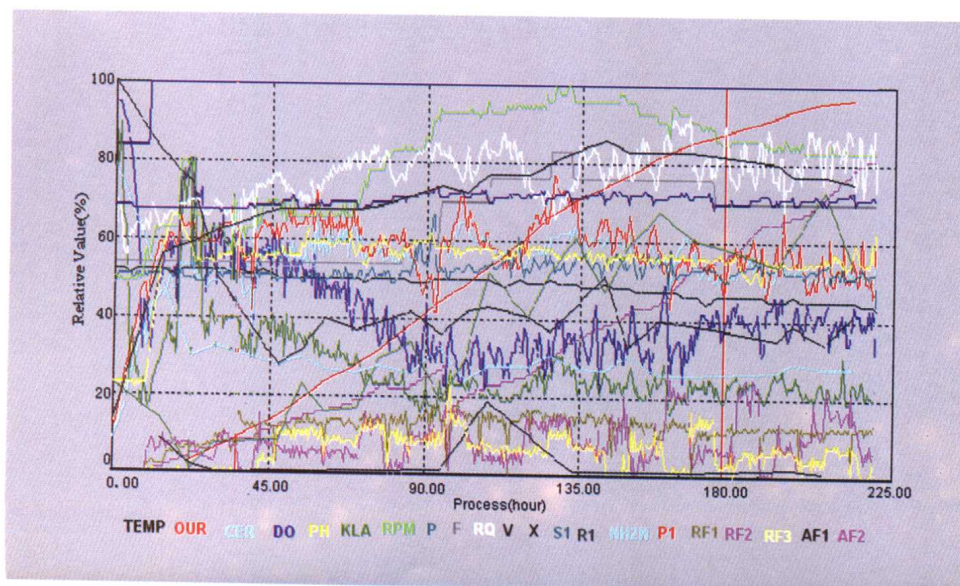


图 9-2 青霉素发酵过程参数趋势曲线图

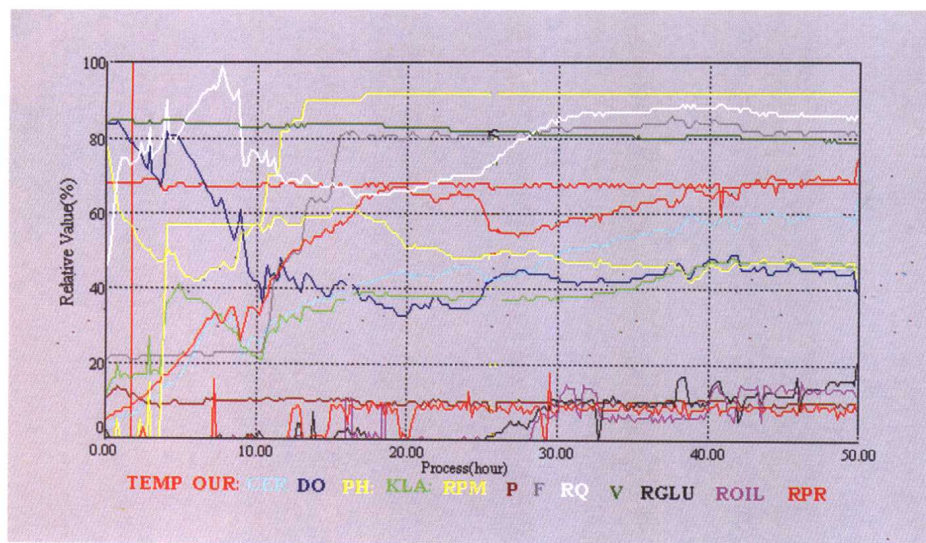


图 9-6 红霉素发酵50h的趋势曲线

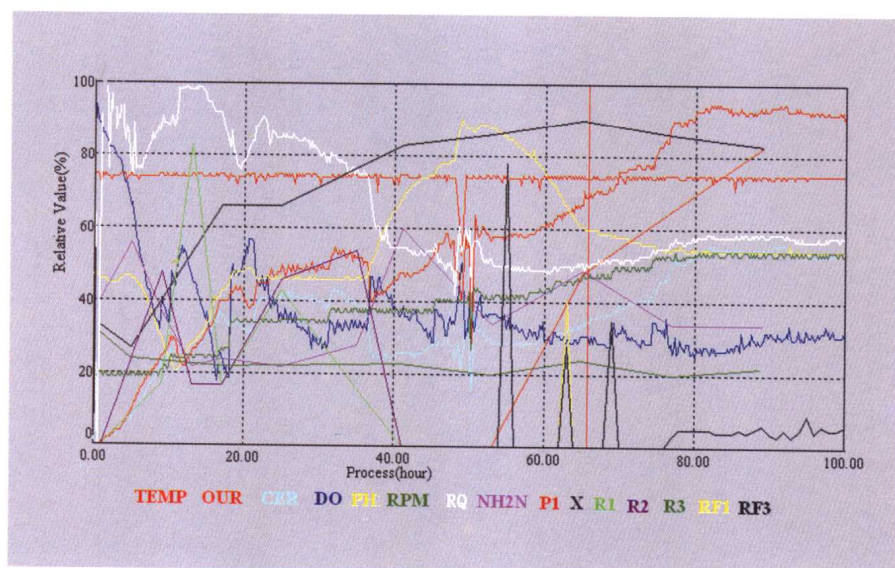


图 9-21 泰乐菌素发酵过程代谢趋势曲线

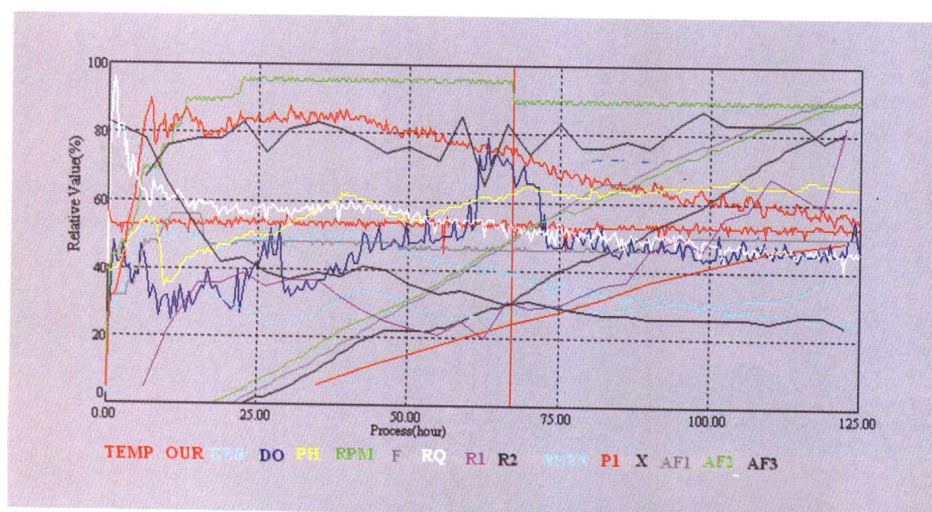


图 9-24 链霉素发酵趋势曲线

序 一

华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室在 1992 年刚成立时，邀我担任第一届学术委员会主任，也许这是张嗣良教授约我撰序的原因。

随着生物技术的深入发展，加强生物技术产业化是必然的趋势，如何把化学工程学科与生物技术相结合就成为重要的研究内容。特别是生物反应工程针对生物材料所特有的反应复杂性，需要通过冷态和热态试验，并结合宏观和微观动力学研究，才能有效设计和开发反应器和反应系统。目前使用的基于单一尺度的平均方法，难于反映过程的内在机理，因此预测性差，不易解决定量放大和调控的问题。为此，多尺度方法得到了重视。

张嗣良教授总结了他二十余年来在发酵工程方面的科研工作，撰写了本书，有理论，有范例，内容丰富，是生物化工方面一本重要的著作。尽管如作者所述，当时研究时，并未关注生物化工系统中的多尺度问题及其复杂性，但总结成书时，却认识到多尺度方法的有效性，并将多尺度的概念贯穿到全书的结构中，这是一个很大的进步和重要的起点。

生物系统本身属于高度复杂的自组织系统，其特征之一是多尺度结构及其内部的非线性和非平衡作用。近年来，复杂性科学和多尺度方法都得到广泛关注，多尺度方法有望成为分析复杂系统的有效方法之一。自然，在生物系统中，多尺度方法的应用，也将越来越得到重视，此书是这方面的创举。祝愿作者在这方面取得更多的进展，对复杂系统的研究作出贡献，同时本书的读者也有所收益。

中国科学院

郭慕然 院士

序 二

青霉素的发现和开发生产，不但使人们的寿命延长了十几年，还使微生物发酵工业从表面培养发展为通气搅拌的液体沉层培养。微生物发酵大规模工业生产的崭新品貌出现，给发酵工业带来了一次革命，从此发酵工业进入了新的发展里程碑。我作为长期从事抗生素药物生产的研究者，深深体会到几十年来随着发酵工业的快速发展，发酵工程趋向设备大型化、高效和自动化，也不断出现发酵新品种、新工艺、新技术和新设备。自从青霉素的代乳糖发酵生产工艺的研究成功和投入应用，发酵水平大幅提高，人们称之为抗生素工业生产的一次飞跃，获得国家发明奖。实际上这是微生物次级代谢调控理论的完善和对分解代谢阻遏机理的认识的提高。但由于发酵过程数据采集的困难，这些研究与实际正在进行的发酵过程不能紧密联系，缺乏实时性。因此，在发酵工程研究中上述以青霉素为代表的发酵工业生产的基本操作模式没有变，发酵过程优化与放大问题不时地困惑着我们。

20 世纪 50 年代初我作为我国抗生素工业的奠定者之一，经历和见证了当时我国生物医药的发展历程。为了进一步培养发展抗生素工业所需的人才，当时卫生部决定由马誉徵教授领衔，在化学工程学科力量最强的华东化工学院（即华东理工大学前身）筹建抗生素制造专业，专门解决微生物制药的工程技术问题，之后在俞俊棠教授的领导下，这个专业为全国培养了大量的专业人才。近年来，在这种环境下成长的张嗣良教授以微生物反应与发酵工程为研究对象，结合长期的实践，引进了化学工程的“多尺度”概念，提出了微生物过程多尺度问题研究，并进一步形成了以代谢流分析与控制为核心的发酵过程参数相关分析方法，成功地应用于许多产品的发酵过程优化。所提出的有关发酵控制理论和方法，是继青霉素代乳糖发酵工艺后的又一个飞跃，先后多次获国家科技进步奖，这是发酵工程技术上的重大突破。

在经过了长期实践并结合生物技术的发展研究，这本题为“多尺度微生物过程优化”的专著终于问世，我深感欣慰。全书提出了一个如何认识“发酵工程”的微生物过程问题的新概念和新理论，认为发酵过程实质上是基因分子尺度、细胞代谢尺度与生物反应器介尺度的网络结构的复杂系统，提出了在生物反应器中以细胞代谢物质流为核心的发酵工程学观点，这些新的思考为我们进一步实现微生物过程优化提供了重要基础。书中内容涉及生物技术、化学工程、控制理论、传感、计算机、信息技术等，反映了多学科的交叉，对解决综合性工程技术也具有重要意义。我认为本书的出版是作者长期实践的总结，希望本书能给读者带来有益的启示！

中国工程院

张嗣良 院士

前 言

发酵工程这一古老而又前沿的技术领域始终与人类社会发展息息相关。当前,无论是抗生素和氨基酸等药物或化学品的生产,还是由 DNA 重组菌生产高附加值的生物药品,都离不开微生物发酵。发酵工程涉及医药工业、轻工业、食品工业、化学工业、农林渔牧业和环境保护,甚至包括冶金、能源等许多领域,为人类社会带来巨大的经济和社会效益。在人类基因组测序完成以后,以功能基因为主要内容的内容的后基因组学研究,其中包括蛋白组学和最近形成的代谢组学,在表达研究时也离不开微生物系统,所以发酵工程是一个永恒的课题。

发酵过程优化与放大技术具有极其重要的意义。长期以来,人们致力于这个课题的研究和探索,虽然国内外每年有大量文章和报告发表,但真正有普遍意义的进展不多。作者长期从事发酵工程技术研究,得益于参加有关国家攻关项目的制定,并具体领导了攻关项目、863 课题的研究。其中“八五”攻关期间,在华北制药厂作为项目负责人,开展工艺、工程、装备一体化的优化技术研究,发现了发酵过程中的物料平衡与不平衡的关键问题,提出了把研究重点放在在不平衡问题的发现、分类与解决的方法上。“九五”期间组织红霉素发酵过程优化技术研究攻关,从工程工艺控制上找到了次级代谢调控方法,改变了我国发酵单位长期落后的局面。与此同时,又在其他发酵产品以及基因工程微生物高密度高表达培养研究上取得了重要进展。

一系列发酵产品优化与放大所取得的初步成功,使我们不得不从根本上思考一个问题:由于发酵过程酶学研究的困难,以及过程数据采集和处理的困难,长期以来发酵过程优化技术研究基本上停留在化学工程的宏观动力学方法上,忽视了以微生物细胞代谢流分析与控制为核心的问题,这就是我们编写这本专著的目的。

近年来,复杂系统的多尺度理论迅速发展,特别在化学工程学科从以“单元操作”和“过程传递”为标志的传统方法向多尺度系统理论的发展,有可能形成三传一反多尺度的综合学问。我感到我们在前面所遇到的发酵过程优化和放大问题,实质上就是缺乏复杂系统的多尺度理论指导。造成上述问题的一个重要原因,是人们往往以各自研究的技术背景(基因、细胞代谢或反应器工程)从单一尺度去理解和分析研究发酵过程的特点,观察不到尺度之间的关系和现象,因而限制了对生物过程的认识。因此,尽管我们刚涉及“多尺度”理论概念,但还是把书名定为“多尺度微生物过程优化”,把原计划书名中的“发酵工程”改为“微生物过程”,以便广泛地把这一理论与我们的长期实践结合起来,以益于读者,也起到抛砖引玉的作用。

本书第 1、2 章在对微生物发酵过程优化技术的历史发展作综述评论以后,提出微生物过程多尺度系统问题,然后对微生物过程的多尺度现象、理论与方法作系统的讨论。第 3 章讨论以多尺度研究为核心的发酵优化研究装置技术,为便于读者在实际应用中参考,尽可能作具体介绍。第 4 章重点讨论数据相关分析技术,以大量的研究实例,采用人机界面形式,对各参数趋势曲线的相关性进行分类研究,这也是发酵过程多尺度系统中跨尺度观察的重要基本手段。第 5 章讨论过程优化,把重点放在如何阐明发酵工程优化试验设计

和数据处理时存在的很多模糊概念上,主要反映在对操作变量和状态变量的认识,以及对微生物代谢体系的了解。第6章在简述能量代谢的热力学分析后,重点讨论了代谢的计量化学衡算,其中包括元素平衡和代谢平衡计算,这是多尺度系统中细胞代谢流分析的重要手段。第7章以肌苷、鸟苷酸发酵为研究实例,进行工程、细胞代谢和基因结构多尺度问题研究并实现过程优化。第8、9章分别对基因工程高密度高表达以及抗生素等其他发酵产品、结合我们实验室研究实例进行过程优化分析。

作者力图在本书中体现前沿性和创新性,并注意理论与实践相结合。因此本书的内容具有理论性和实用性,作者采用自身完成的研究实验数据和实例,以适应各层次读者的需要。为了不使内容太庞杂,在内容筛选上,凡是理论或技术方法较成熟、并有其他参考资料的内容都不作赘述。由于编著时间匆忙及对多尺度理论的理解尚不全面,书中不当之处,希望共同探讨。

特此一提的是书中很多实例都是本实验室受合作单位委托研究的课题,我们只能对部分实例作些理论和方法上的探讨,以加深对微生物过程多尺度问题与过程优化的理解,详细的工艺过程不作介绍,有些数据也经过处理或采用相对值表示,望读者谅解!

在完稿之时,特别感谢我的老师李友荣教授对我的支持,他在退休之余,为本书提供了大量资料并书写整理了有关内容。也感谢我的同事和学生,储炬、庄英萍、黄明志、郭美锦、杭海峰、钱江潮、王永红、蔡显鹏、谌颀、张恂、刘健、欧阳立明等为本书整理资料并编写了有关内容。

化学工业出版社对本书的出版作了不懈的努力,责任编辑对书稿作了精心的审阅修改,特此表示由衷的感谢。

张嗣良

于华东理工大学

2003年5月

内 容 提 要

本书以多尺度的观点对微生物发酵过程进行分析,认为发酵过程实质上是基因分子尺度、细胞代谢尺度与生物反应器介尺度的网络结构的复杂系统。对过程的多尺度现象、理论与方法作了系统的讨论。研究了用于过程优化的发酵装置技术,跨尺度观察的数据相关分析技术,过程优化试验和数据处理时的操作变量和状态变量的设计与估计,以能量代谢热力学与计量化学衡算为基础的细胞代谢流分析。最后以鸟苷发酵作为实例进行了深入讨论,对不同鸟苷产生菌负责编码关键酶的基因进行了比较研究,并分别结合实例对基因工程高密度高表达以及抗生素次级代谢产物等发酵产品进行分析。本书体现了研究的前沿性和创新性,在内容上具有理论性和实用性,并采用作者长期以来自身完成的研究实验数据和实例,以适应从实验室理论研究到工厂车间生产等各层次读者的需要。

目 录

1 微生物发酵过程优化技术回顾与发展	1
1.1 发酵工程技术的历史发展及其意义	1
1.2 发酵工程中涉及的主要技术问题及其研究的局限性	2
1.2.1 主要技术问题	2
1.2.2 计算机控制与传感器技术在发酵工程中的应用	2
1.2.3 经典控制与现代控制理论应用	3
1.2.4 生化工程技术进展	5
1.2.4.1 微生物生长和反应过程研究	5
1.2.4.2 发酵过程的化学计量学和热力学研究	6
1.2.4.3 微生物反应动力学与生物反应工程	7
1.2.4.4 微生物过程优化原理研究	8
1.2.4.5 系统优化	8
1.2.4.6 初步结论	9
1.2.5 过程放大技术的局限性	9
1.2.6 代谢工程研究	12
1.3 发酵过程多尺度问题的提出	13
参考文献	15
2 微生物过程的多尺度研究理论与方法	20
2.1 生物反应器中的多尺度问题与工程学观点	20
2.1.1 例 1: 青霉素发酵技术进展	22
2.1.2 例 2: 发酵过程的碳源选择	23
2.1.3 例 3: 温度诱导基因工程菌生长与表达时的体系结构性突变	24
2.1.4 例 4: 代谢过程的变构效应	24
2.1.5 例 5: 代谢网络中代谢流分配的结构性变化	25
2.1.6 例 6: 微生物细胞对外界环境变化的调节机制	26
2.2 细胞代谢流分布变化的现象特征	27
2.3 细胞代谢物质流与生物反应器物料流变化的相关性	28
2.4 数据驱动型的方法	29
2.5 以细胞代谢流分析与控制为核心的多尺度研究方法	31
参考文献	32
3 用于微生物过程多尺度研究的装置技术	34
3.1 概述	34
3.2 参数检测与二次仪表	35
3.2.1 概况	35
3.2.2 检测参数的选择与传感器的配置	35
3.2.3 尾气分析质谱仪	38
3.2.3.1 概述	38
3.2.3.2 尾气的预处理	38

3.2.3.3	多通道采样系统 (RMS M3)	39
3.2.3.4	检测部分	39
3.2.3.5	自动控制与数据采集	40
3.2.3.6	尾气测定数据的标定	40
3.2.4	活菌浓度传感技术	41
3.2.4.1	概述	41
3.2.4.2	活细胞的双电极测量原理	42
3.2.4.3	测量装置	43
3.2.4.4	应用	44
3.2.5	间接参数的选择与计算	45
3.2.6	实验室离线参数	47
3.2.6.1	概述	47
3.2.6.2	培养液成分分析	47
3.2.6.3	细胞特性与胞内组分分析	48
3.3	计算机数据采集与过程控制系统配置	56
3.3.1	发展概述	56
3.3.2	数据采集系统中有关“时间响应”问题的研究	58
3.3.2.1	生物过程的“实时性”	58
3.3.2.2	生物系统动力学的时间响应	59
3.3.2.3	连续信号和非连续分析的频率	60
3.3.3	嵌入式系统在生物反应过程数据采集和控制中的应用	60
3.3.3.1	嵌入式系统介绍	60
3.3.3.2	嵌入式微控制器系统在生物反应过程数据采集和控制中的应用	61
3.3.3.3	PLC 在生物反应过程数据采集和控制中的应用	62
3.3.4	现场总线在发酵控制中的应用	65
3.3.4.1	系统原理	66
3.3.4.2	系统软件	66
3.3.4.3	系统评价	66
3.3.5	工业控制计算机	67
3.3.5.1	概念	67
3.3.5.2	基本结构功能	67
3.3.5.3	工业控制计算机控制软件	67
3.3.5.4	应用实例	68
3.3.6	试验与生产规模数据采集系统研制	68
3.3.7	集散控制系统	69
3.3.8	计算机控制的网络化与远程化	69
3.3.9	智能传感器	71
3.4	数据分析应用软件设计	71
3.4.1	数据采集系统软件设计基本要素	72
3.4.2	部件化体系	72
3.4.2.1	基于函数库的上位机软件设计	73
3.4.2.2	传统的面向对象的上位机软件设计	73
3.4.2.3	部件化上位机软件设计体系	73
3.4.3	多线程技术	74

3.4.3.1	多线程技术的优越性	75
3.4.3.2	多线程技术的上位机软件	75
3.4.3.3	主线程	76
3.4.3.4	采样线程	76
3.4.3.5	过程分析与控制线程	76
3.4.3.6	报警线程	77
3.4.3.7	储存线程	77
3.5	实验室整机装置与操作	77
3.5.1	热质量流量计和控制	77
3.5.2	罐压测量	78
3.5.3	补料测量与控制系统	79
3.5.4	搅拌电机选型和转速测量控制系统设计	79
3.5.5	发酵液全罐称量技术研究及选型	80
3.5.6	排气氧和二氧化碳测定	80
3.5.7	计算机硬件与软件设计	81
	参考文献	81
4	发酵过程参数相关分析原理	85
4.1	概述	85
4.1.1	人机界面与多参数趋势曲线	85
4.1.2	参数相关基本特性	86
4.2	发酵过程的理化相关	86
4.2.1	传热与酸碱反应	86
4.2.2	搅拌功率(转速)引起的 DO 变化	86
4.2.3	通气流量变化所引起的物理过程	86
4.2.4	罐压测量变化与 DO 值	87
4.2.5	加入消泡剂所引起的物理过程参数变化	88
4.2.6	测量技术的操作条件	88
4.3	发酵过程的生物相关	89
4.3.1	菌体生长导致发酵液物性变化及其参数变化相关分析	89
4.3.1.1	菌体生长与 K_La 、DO 的相关特性	89
4.3.1.2	菌体生长与培养液的流变特性	91
4.3.1.3	泡沫与 K_La 的关系	91
4.3.1.4	流变特性的结构性突变	92
4.3.1.5	搅拌与 DO 组成的控制回路特性	92
4.3.2	代谢特性及其参数相关	93
4.3.2.1	发酵过程 OUR 与 DO 的基本相关特征	93
4.3.2.2	OUR、CER 与 RQ 的相关特征	95
4.3.2.3	发酵过程中补糖引起的参数相关	96
4.3.2.4	发酵过程中的 pH 变化与参数相关	100
4.3.2.5	补油的作用与参数相关分析	101
4.3.2.6	菌体生长与参数相关分析	104
4.3.2.7	多基质利用与参数相关	105
4.4	基于参数相关的工艺操作分析	107
	参考文献	109

5 基于多尺度观点的过程优化基础	110
5.1 概述	110
5.2 操作变量	110
5.3 状态变量	112
5.3.1 概述	112
5.3.2 状态变量的测定与估计	113
5.3.2.1 各种生理变量的计算关系	113
5.3.2.2 代谢速率 (生理变量, PVs) 的计算	114
5.3.2.3 积分与平均数量的计算	119
5.3.2.4 生理状态变量 (PSVs) 的计算	120
5.3.2.5 生物过程参数的状态估计	123
5.4 微生物代谢体系	134
5.4.1 概述	134
5.4.2 分解代谢途径	134
5.4.3 恩特纳-多多罗夫 (ED) 途径和磷酸解酮酶 (PK) 途径	136
5.4.4 各种葡萄糖分解途径的相互关系	136
5.4.5 次级代谢产物	137
5.4.5.1 微生物次级代谢的特征	137
5.4.5.2 初级与次级代谢途径相互关系	137
5.4.6 代谢过程的控制与代谢工程	138
5.4.6.1 代谢流	138
5.4.6.2 代谢控制机制	139
5.4.6.3 分解代谢物阻遏	139
5.4.6.4 碳源分解代谢物的调节	141
5.4.6.5 氮源分解代谢物的调节	142
5.4.6.6 磷酸盐的调节作用	143
5.4.6.7 分解代谢产物对次级代谢控制的作用部位	146
5.4.6.8 分解代谢产物对次级代谢产物合成的胞内调控因子	146
5.4.6.9 抗生素生物合成启动的控制	147
5.4.6.10 链霉菌次生代谢的调节因子——A 因子	149
5.4.6.11 青霉素的生物合成与调节	151
参考文献	155
6 发酵过程元素与代谢的计量化学衡算	157
6.1 能量代谢的热力学	157
6.1.1 热力学第一定律和热焓	157
6.1.2 热力学第二定律和熵	158
6.1.3 测定自由能的方法	159
6.2 能量的产生与耦合	160
6.2.1 能量的产生	160
6.2.2 能量的耦合	161
6.3 生物能的产生与微生物生长之间的关系	162
6.3.1 形成生物量所需 ATP 的计算	162
6.3.1.1 培养基的复杂程度与碳源的影响	162
6.3.1.2 运输过程对 ATP 的需求	163

6.3.1.3 细胞组分的影响	164
6.3.1.4 氮源的影响	164
6.3.1.5 碳同化途径的影响	164
6.3.2 好气生长理论得率的计算	164
6.3.3 形成细胞物质 ATP 需求的实验测定	165
6.3.3.1 厌氧分批培养	165
6.3.3.2 厌氧恒化培养	167
6.3.3.3 好气培养	167
6.3.4 微生物生长得率	167
6.4 化学计量方法	168
6.4.1 微生物的元素组成	168
6.4.2 生长得率的测量	169
6.4.3 维持效应	169
6.4.4 以守恒原理计算生长的全化学计量系数	171
6.4.5 还原度的衡算	172
6.5 基于自由能消费的化学计量学预测	173
6.5.1 维持自由能能量的关联	174
6.5.2 生长所需的自由能的计算	174
6.5.3 用自由能相关作化学计量学预测	175
6.5.4 计算化学计量学的代数关系	175
6.5.5 有关热量的计算	176
6.5.6 用热力学方法预测得率的限制	176
6.6 从热力学观点分析生长动力学	176
6.7 代谢流研究	177
6.8 基于元素平衡和代谢平衡的综合研究方法	179
参考文献	181
7 嘌呤核苷发酵过程多尺度研究与优化	182
7.1 发酵法生产嘌呤核苷(酸)类物质的研究概况	182
7.1.1 核苷(酸)类物质应用的发展简史	182
7.1.2 嘌呤核苷酸合成途径及其调控机制	184
7.1.2.1 嘌呤核苷酸的合成途径	184
7.1.2.2 枯草芽孢杆菌嘌呤核苷酸合成的调控机制	184
7.1.2.3 枯草芽孢杆菌嘌呤核苷酸的补救合成途径	185
7.1.3 生产菌株及其发酵工艺研究	186
7.1.3.1 肌苷	186
7.1.3.2 鸟苷	187
7.1.3.3 基因工程技术在嘌呤核苷菌种选育中的应用	188
7.1.3.4 嘌呤核苷发酵工艺研究进展	189
7.2 嘌呤核苷发酵过程分析及鸟苷发酵的代谢流迁移的推断	190
7.2.1 引言	190
7.2.2 嘌呤核苷发酵过程代谢分析	191
7.2.2.1 嘌呤核苷的产芽胞能力比较	191
7.2.2.2 50L 发酵罐上的发酵过程趋势曲线	191
7.2.2.3 鸟苷形成过程参数相关分析	191