

陈 坚 刘立明 堵国成 等著

# 发 酵 过程优化

## 原理与技术

书中选择工业生物技术中具有代表性的微生物，代谢特征、营养要求、培养条件和产品特性大相径庭的工业生物技术产品为研究对象，针对发酵过程中微生物表现出的特殊生理状态进行优化，发展了综合考虑生物学、动力学和物理学现象的7种发酵过程优化技术，包括：

基于微生物反应计量学的培养环境优化技术 ◎ 基于微生物代谢特性的分阶段培养技术

基于反应动力学模型的优化技术 ◎ 基于代谢通量分析的优化技术

基于环境胁迫的优化技术 ◎ 基于辅因子调控的优化技术 ◎ 基于生物反应系统的优化技术



化学工业出版社

陈 坚 刘立明 堵国成 等著

# 发 酵 过程优化

## 原理与技术



化学工业出版社

· 北京 ·

以获得高产量、高底物转化率高和生产强度相对统一为目标的发酵物技术的关键核心。本书是作者在完成 10 多项国家科研项目的基础上，有代表性的微生物（细菌、放线菌、霉菌和酵母），代谢特征、营养要求、大相径庭的工业生物技术产品为研究对象，综合运用微生物反应计量学、生化学、生物反应器工程以及代谢工程理论，从优化微生物自身基因型、调节胞内微环境三方面，针对发酵过程中微生物表现出的特殊生理状态进行优化，发展了综合考虑动力学和物理学现象的 7 种发酵过程优化技术。本书结合作者自身完成的和同行完成的实例，详尽阐明了这些优化控制技术的基本原理和应用策略，为读者开展相关研究提供分析问题和解决问题的思路与方法。

### 图书在版编目 (CIP) 数据

发酵过程优化原理与技术/陈坚等著. —北京: 化学工业出版社, 2009. 8  
ISBN 978-7-122-05785-3

I. 发… II. 陈… 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 (2009) 第 088556 号

---

责任编辑: 孟 嘉  
责任校对: 周梦华

文字编辑: 周 侗  
装帧设计: 关 飞

---

出版发行: 化学工业出版社 (北京市东城区青年湖南街 13 号 邮政编码 100011)

印 装: 三河市延风印装厂

787mm×1092mm 1/16 印张 19 字数 555 千字 2009 年 8 月北京第 1 版第 1 次印刷

---

购书咨询: 010-64518888 (传真: 010-64519686) 售后服务: 010-64518899

网 址: <http://www.cip.com.cn>

凡购买本书, 如有缺损质量问题, 本社销售中心负责调换。

---

定 价: 68.00 元

版权所有 违者必究

# 前 言

以发酵工程为核心的工业生物技术是以可再生生物质资源为原料,采用工业微生物细胞或酶的生物催化功能,开发新产品的制造路线,进行大规模的物质加工与转化,生产人类生活所需的食品、能源、纺织、医药、化学品等的生物过程。工业生物技术通过阐明生物加工过程中微生物细胞的生理机制,构建高产工业菌株,发展高效低耗加工工艺,实现生物技术产品的工业化生产。以获得高产量、高底物转化率和高生产强度相对统一为目标的发酵过程优化技术,是工业生物技术的核心。其研究不仅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,因而在整个生物产品的研发过程中具有特别重要的作用。

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和技术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,综合运用微生物生理学、生物反应工程学和代谢工程的最新理论,从优化微生物自身基因型、调节胞内微环境和优化宏观环境三方面发展了七种发酵过程优化技术,并结合作者自身完成的和同行完成的研究实例,详尽阐述了发酵过程中进行优化的基本原理和技术,为读者开展类似研究提供了分析问题和解决问题的思路与方法。尽管工业生物技术产品种类繁多,但优化的思路和方法是通用或相互借鉴的。因此,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“863计划”、国家自然科学基金项目、国家科技攻关项目、教育部优秀青年教师基金项目、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9篇博士学位论文和4篇硕士学位论文,而这些学位论文正是本书资料和实例来源的主体。

负责本书中部分章节写作的还有:卫功元(第二章)、许庆龙(第四章)、周景文(第五章)、傅瑞燕(第六章)、秦义(第七章)。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。

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，书中存有疏漏和不足。若蒙赐教，不胜感激！

作者

2009年4月

# 目 录

<b>第一章 绪论</b> .....	1
<b>第一节 发酵工程在工业生物技术系统中的地位及其研究内容</b> .....	1
一、发酵工程处于工业生物技术体系的核心地位 .....	1
二、发酵工程的研究内容 .....	2
三、发酵过程优化的研究内容 .....	4
<b>第二节 发酵过程优化技术的研究与应用现状</b> .....	5
一、发酵过程优化是生物反应工程的研究前沿之一 .....	5
二、基于微生物功能理解的发酵过程优化技术 .....	6
三、高生产率和高细胞密度发酵 .....	7
四、发酵过程建模与控制策略 .....	11
<b>参考文献</b> .....	14
<b>第二章 基于微生物反应计量学的培养环境优化技术</b> .....	15
<b>第一节 微生物的营养与生理特性</b> .....	15
一、微生物的营养需求与营养类型 .....	15
二、营养物质进入细胞的方式 .....	17
三、微生物代谢 .....	20
<b>第二节 微生物代谢体系与营养环境条件之间的关系</b> .....	22
一、微生物对环境的适应 .....	22
二、常用的培养环境优化方法 .....	25
三、遗传算法与人工神经网络用于培养环境的优化 .....	30
<b>第三节 营养与环境条件对光滑球拟酵母过量合成丙酮酸的影响</b> .....	32
一、酵母粉质量浓度对丙酮酸发酵的影响 .....	33
二、蛋白胨质量浓度对丙酮酸发酵的影响 .....	33
三、豆饼水解液和无机氮源对丙酮酸发酵的影响 .....	33
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 .....	34
五、葡萄糖流加培养中氮的供给对丙酮酸发酵的影响 .....	35
六、关于培养基对丙酮酸发酵的影响需要考虑的问题 .....	37
<b>第四节 产肌假丝酵母发酵生产谷胱甘肽的营养及环境条件</b> .....	38
一、碳源种类对谷胱甘肽发酵的影响 .....	38
二、氮源种类对谷胱甘肽发酵的影响 .....	39
三、混合无机氮源对谷胱甘肽发酵的影响 .....	40
四、磷酸二氢钾和硫酸镁对谷胱甘肽发酵的影响 .....	40
五、谷胱甘肽发酵的营养条件正交优化实验 .....	41
六、环境条件对谷胱甘肽发酵的影响 .....	42

七、 <i>C. utilis</i> WSH 02-08 生产谷胱甘肽的摇瓶发酵过程	43
八、摇瓶分批补糖方式对谷胱甘肽发酵的影响	43
<b>第五节 氨基酸与表面活性剂在谷胱甘肽过量合成中的作用</b>	44
一、L-谷氨酸添加对谷胱甘肽发酵的影响	45
二、甘氨酸添加对谷胱甘肽发酵的影响	46
三、L-半胱氨酸在谷胱甘肽过量合成中的作用	46
四、表面活性剂对细胞生长的影响	50
五、低浓度离子型表面活性剂对谷胱甘肽合成的影响	51
六、高浓度离子型表面活性剂对谷胱甘肽胞外积累的影响	52
七、非离子型表面活性剂对谷胱甘肽合成的影响	53
<b>第六节 调配维生素供给方式强化丙酮酸生产的过程功能</b>	54
一、补加维生素对细胞生长和丙酮酸合成的影响	55
二、维生素浓度对细胞生长和丙酮酸合成的影响	56
三、维生素指数流加对细胞生长和丙酮酸合成的影响	57
四、分步指数流加维生素策略的提出	58
<b>参考文献</b>	59
<b>第三章 基于微生物代谢特性的分阶段培养技术</b>	60
<b>第一节 发酵过程中微生物的代谢特性</b>	60
一、微生物细胞的主要代谢途径	60
二、微生物代谢调节的特性	65
三、基于微生物代谢特性的发酵过程控制与优化	66
<b>第二节 透明质酸高效生产的搅拌与溶氧浓度控制策略</b>	71
一、发酵体系的流变学特性与传质性能	71
二、搅拌转速对透明质酸发酵过程的影响	75
三、溶氧浓度对发酵生产透明质酸的影响	79
四、透明质酸发酵的搅拌与溶氧浓度控制策略	80
五、氧代谢途径及其影响透明质酸合成的作用机制	80
<b>第三节 谷氨酰胺转胺酶分批发酵的 pH 及温度控制策略</b>	82
一、控制不同 pH 对发酵过程的影响	82
二、pH 对细胞比生长速率及 MTG 比合成速率的影响	84
三、MTG 发酵过程中 pH 值优化控制策略	85
四、不同温度下的 MTG 分批发酵过程	85
五、温度对细胞生长及产酶的影响	87
六、MTG 分批发酵过程分阶段温度控制策略	88
<b>第四节 丙酮酸分批发酵的供氧控制模式</b>	89
一、丙酮酸分批发酵过程的溶氧变化情况	89
二、不同 $k_L a$ 下 WSH-IP303 发酵生产丙酮酸的动力学特征	90
三、分阶段供氧控制模式的提出和实验验证	91
<b>参考文献</b>	94
<b>第四章 基于反应动力学模型的优化技术</b>	96
<b>第一节 发酵过程中动力学模型概述</b>	96
一、微生物生长的非结构动力学模型	96
二、微生物产物形成动力学模型	100
三、多底物动力学	101

<b>第二节 聚羟基丁酸分批发酵过程动力学模型及优化</b>	102
一、不同供氧水平对 PHB 发酵过程的影响	103
二、不同初糖浓度对 PHB 发酵过程的影响	104
三、PHB 分批发酵过程分析和控制	107
四、PHB 分批发酵动力学	108
五、PHB 分批发酵过程动力学的分析	111
<b>第三节 透明质酸分批发酵动力学及过程模型化</b>	112
一、理论与模型建立	113
二、乳酸对透明质酸发酵的影响	115
三、动力学模型参数的求解	116
四、动力学模型的适用性	117
五、功能单元的酶学一致性	117
<b>第四节 基于动力学模型强化丙酮酸生产的过程功能</b>	120
一、基于葡萄糖浓度的丙酮酸分批发酵动力学模型	120
二、基于动力学模型调控温度强化丙酮酸发酵的过程功能	126
<b>第五节 赖氨酸流加发酵与连续培养的最优控制</b>	132
一、初糖浓度对发酵的影响	133
二、溶氧对发酵的影响	133
三、pH 对发酵的影响	135
四、发酵过程的溶氧与 pH 控制	136
五、赖氨酸分批发酵动力学	138
六、分批发酵动力学模型的评价	141
七、分批发酵的模型分析	142
<b>参考文献</b>	143
<b>第五章 基于代谢通量分析的优化技术</b>	144
<b>第一节 代谢物及其通量分析在发酵过程中的应用</b>	144
一、微生物代谢物及代谢组学	144
二、微生物代谢物分析实验的注意事项	145
三、工业微生物代谢物分析平台	147
四、代谢物分析在工业微生物学中的应用	148
五、代谢物分析在发酵过程优化中的应用	151
<b>第二节 丙酮酸发酵过程的代谢网络分析</b>	152
一、代谢网络构建和代谢通量计算	152
二、不同硫胺素浓度和不同 DOT 下的分批发酵结果	156
三、不同硫胺素浓度和不同 DOT 下 NADPH 的产生与消耗	159
四、不同硫胺素浓度和不同 DOT 下 NADH 的产生与消耗	159
五、不同硫胺素浓度和不同 DOT 下 ATP 的产生与消耗	160
六、几个其他问题	161
<b>第三节 谷胱甘肽分批发酵过程代谢网络分析</b>	164
一、 <i>C. utilis</i> WSH 02-08 分批生产谷胱甘肽的代谢网络	164
二、代谢通量的计算	168
三、谷胱甘肽分批发酵不同阶段的代谢通量分布	168
四、分阶段温度控制策略下的代谢通量分布	171
五、L-半胱氨酸的添加对代谢通量分布的影响	171



<b>第四节 谷氨酰胺转胺酶分批发酵过程中氨基酸代谢流分析</b>	172
一、理论分析	172
二、MTG 分批发酵过程分析	175
三、游离氨基酸对 MTG 发酵的影响	177
四、铵离子的解交联作用	178
<b>参考文献</b>	179
<b>第六章 基于环境胁迫的优化技术</b>	181
<b>第一节 环境胁迫对微生物生理的影响</b>	181
一、工业微生物遇到的主要环境胁迫	181
二、工业微生物抵御非生宜环境的生理系统	184
三、提高工业微生物对非生宜环境适应能力的策略	186
<b>第二节 谷胱甘肽保护乳酸乳球菌抵抗氧、酸和冷冻胁迫</b>	187
一、半胱氨酸对乳酸乳球菌好氧生长的影响	188
二、GSH 对乳酸乳球菌 NZ9000 抵抗 $H_2O_2$ 氧胁迫抗性的影响	189
三、不同生长时期的乳酸乳球菌 NZ9000 对 $H_2O_2$ 胁迫的抗性	190
四、GSH 对乳酸乳球菌 NZ9000 抵抗甲萘醌引发的氧胁迫抗性的影响	190
五、GSH 对乳酸乳球菌 NZ9000 抵抗高剂量甲萘醌引发的短时间氧胁迫抗性的影响	191
六、GSH 对乳酸乳球菌 NZ9000 的 SodA 缺失的互补作用	192
七、GSH 在乳酸乳球菌 NZ9000SodA 突变株中的生产	193
八、GSH 对乳酸乳球菌 NZ9000SodA 突变株好氧生长的影响	193
九、GSH 对乳酸乳球菌 NZ9000SodA 突变株抵抗氧胁迫抗性的影响	194
十、GSH 在乳酸乳球菌 SK11 中的生产	194
十一、GSH 对乳酸乳球菌 SK11 生长的影响	195
十二、GSH 对乳酸乳球菌 SK11 氧胁迫抗性的影响	197
十三、GSH 对乳酸乳球菌 SK11 酸胁迫抗性的影响	197
十四、乳酸乳球菌 SK11 (pNZ9530/pNZ3203) 和乳酸乳球菌 SK11 (pNZ9530/pNZ8148) 发酵液中 $NH_4^+$ 浓度的比较	198
<b>第三节 活性氧胁迫促进 <i>Bacillus</i> sp. F26 过量合成过氧化氢酶</b>	198
一、不同浓度 $H_2O_2$ 在无细胞培养液中浓度变化曲线	199
二、初始添加不同浓度 $H_2O_2$ 对 CAT 合成的影响	199
三、培养不同时期添加 $H_2O_2$ 对 CAT 合成的影响	199
四、发酵罐中不同浓度 $H_2O_2$ 持续胁迫下 <i>Bacillus</i> sp. F26 的应激响应	201
五、 $H_2O_2$ 不同流加方式对细胞生长和 CAT 合成的影响	205
六、添加甘露醇对 $H_2O_2$ 胁迫下细胞生长和 CAT 合成的影响	207
七、超氧阴离子自由基 ( $O_2^{\cdot-}$ ) 胁迫对 CAT 合成的影响	208
八、不同浓度甲萘醌对 CAT 和 SOD 合成及细胞生长的影响	210
九、不同浓度外源 $O_2^{\cdot-}$ 对 CAT 和 SOD 合成的影响	210
十、发酵罐中不同浓度甲萘醌持续胁迫下 <i>Bacillus</i> sp. F26 的应激响应	211
十一、溶氧浓度对 <i>Bacillus</i> sp. F26 对甲萘醌氧化胁迫响应的影响	213
<b>第四节 pH 胁迫作用促进产朊假丝酵母生产谷胱甘肽</b>	216
一、pH 控制对谷胱甘肽发酵的影响	217
二、发酵 24h 时施加低 pH 胁迫对 GSH 发酵过程的影响	218
三、低 pH 对细胞活力及 GSH 胞外积累的影响	218
四、低 pH 胁迫及补料策略对 GSH 发酵的影响	219

<b>第五节 提高光滑球拟酵母耐受渗透压能力加强丙酮酸生产</b> .....	221
一、耐受高浓度氯化钠突变株的选育 .....	221
二、氯化钠、山梨醇浓度对 <i>T. glabrata</i> 生长及发酵生产丙酮酸的影响 .....	222
三、连续培养筛选耐高渗突变株 .....	223
四、氯化钠浓度对突变株与出发菌株的影响 .....	223
五、高葡萄糖浓度对突变株与出发菌株发酵生产丙酮酸的比较 .....	224
<b>参考文献</b> .....	225
<b>第七章 基于辅因子调控的优化技术</b> .....	226
<b>第一节 辅因子种类及其生理作用概述</b> .....	226
一、工业微生物中 ATP 调控策略与应用 .....	227
二、工业微生物中 NADH 的代谢调控 .....	229
三、工业微生物中乙酰辅酶 A 及其衍生物的代谢调控 .....	233
四、辅因子工程优化技术在发酵过程优化中的应用展望 .....	236
<b>第二节 调节 ATP 浓度调控糖酵解速率</b> .....	237
一、外源抑制剂降低电子传递链对 <i>T. glabrata</i> 能量代谢和酵解的影响 .....	237
二、 $F_0F_1$ -ATPase 活性降低突变株的获得 .....	239
三、降低 $F_0F_1$ -ATPase 活性对 <i>T. glabrata</i> 能量代谢和酵解的影响 .....	241
四、ATP 水平对糖酵解途径的影响 .....	243
<b>第三节 调节 NADH 浓度调控丙酮酸生产强度</b> .....	246
一、烟酸对糖酵解速率的影响 .....	248
二、改变 NADH 氧化途径加速葡萄糖消耗 .....	248
三、低溶氧下提高 ADH 活性加速葡萄糖消耗 .....	250
四、表达 NADH 氧化酶对光滑球拟酵母 NADH 代谢的影响 .....	253
<b>第四节 调控乙酰 CoA 库促进 <math>\alpha</math>-酮戊二酸过量积累</b> .....	258
一、过量表达 <i>acs2</i> 提高 <i>T. glabrata</i> 胞内乙酰 CoA 水平促进 $\alpha$ -KG 合成 .....	259
二、过量表达 <i>pdc1</i> 提高 <i>T. glabrata</i> 胞内乙酰 CoA 水平促进 $\alpha$ -酮戊二酸合成 .....	262
<b>第五节 维生素在调控光滑球拟酵母中碳代谢流中的重要作用</b> .....	265
一、调节维生素水平阻断碳流于丙酮酸节点 .....	266
二、提高硫胺素浓度增加丙酮酸脱氢酶途径代谢通量 .....	266
三、提高生物素浓度增加丙酮酸羧化酶途径代谢通量 .....	268
四、碳酸钙对碳代谢流流向和通量大小的影响 .....	268
五、同时增加 PDH 和 PC 途径代谢通量对代谢流分布的影响 .....	269
六、维生素和金属元素调控碳代谢流的重要作用 .....	269
<b>第六节 金属离子对 <math>\gamma</math>-CGT 酶生产的促进和细胞能量代谢的影响</b> .....	270
一、镁、锰、锌的添加对 $\gamma$ -CGT 酶合成的影响 .....	271
二、镁、锰、锌的不同添加方式对细胞生长的影响 .....	272
三、发酵过程中镁、锰、锌的消耗情况 .....	272
四、镁、锰、锌添加对发酵过程中总糖消耗的影响 .....	273
五、不同金属离子添加方式对胞内 ATP 和 ADP 含量的影响 .....	274
六、金属离子对微生物的生理作用 .....	274
<b>参考文献</b> .....	275
<b>第八章 生物反应系统优化技术</b> .....	276
<b>第一节 系统优化技术概述</b> .....	276
<b>第二节 ATP 再生系统及其在谷胱甘肽生物合成中的应用</b> .....	277
一、ATP 再生系统 .....	277

二、ATP 再生和谷胱甘肽生物合成的耦合系统 .....	281
三、生物合成谷胱甘肽种间耦合 ATP 再生系统的构建 .....	286
<b>第三节 生物反应与产物分离的组合系统 .....</b>	<b>289</b>
一、随程溶剂萃取 .....	290
二、渗透萃取 .....	291
三、渗透蒸发 .....	291
四、其他生物反应与产物分离技术 .....	292
五、生物反应与产物分离组合系统的发展趋势 .....	294
<b>参考文献 .....</b>	<b>294</b>

## 第一节 ● 发酵工程在工业生物技术系统中的地位及其研究内容

### 一、发酵工程处于工业生物技术体系的核心地位

发酵工程是指利用微生物的特定性状，通过现代工程技术，在发酵罐中生产人类所需的物质产品的一种技术系统。发酵工程是化学工程与生物技术相结合的产物，是生物技术的重要分支，是生物加工和生物制造实现产业化的核心技术。与传统化学工程相比，发酵工程有突出的特点：①主要以可再生资源为原料；②反应条件温和，多为常温、常压、能耗低、选择性好、效率较高的生产过程；③环境污染较少；④投资较少；⑤能生产目前不能生产的或用化学法生产较困难的性能优异的产品。而工业生物技术是以可再生生物资源为原料，以微生物或酶为催化剂进行物质转化，大规模生产人类所需的化学品、医药、能源、材料等，是解决人类目前面临的资源、能源及环境危机的有效手段。因此，发酵工程处于工业生物技术体系中的核心地位。

人们普遍认为工业生物技术将是生物技术革命的第三次浪潮。世界经济合作与发展组织(OECD)指出：“工业生物技术是工业可持续发展最有希望的技术”。可持续发展工业将为人类现代新文明提供充裕的物质财富，是现代新文明的支柱。到2020年，预计将有50%的有机化学品和材料产自生物质原料。工业生物技术与现代工业技术组合，可以迅速转化为生产力。例如，利用生物质资源生产成乙烯，所生产的乙烯可以直接和传统化工技术结合，生产各种各样的材料产品。工业生物技术将推动传统产业的结构调整和提升，大力发展工业生物技术，推行过程工业的生物制造，可以有效提升和改造现有传统生产技术，大大减少原材料和能源消耗，使产品精细化，提高经济效益，提高市场竞争力，进而形成新的产业和新的经济增长点。工业生物技术将会推动工业加工方式的一场重大革命。综上所述，工业生物技术不仅能在生产新型食品添加剂、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。

发酵工程是生物技术实现产业化的关键技术。研究探索如何从原料和微生物细胞出发，经过最优的发酵和分离纯化工艺，用最少的原料、最低的能耗、清洁的生产工艺、高效稳定地获得高质量的产品，是生物学、化学、工程科学等学科的交叉、集成。作为中游技术关键的发酵过程优化技术，不仅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，因而在整个生物产品的研发过程中具有特别重要的作用。作为利用微生物生产代谢产物的工程技术，研究对象微生物的复杂性和生产过程的工程技术特点，决定了深入研究发酵工程技术既需要系统的生物学基础理论知识，又需要很强的工程技术素养。国内外普遍存在的问题是：传统的发酵工程技术由于历史上作坊式生产的影响而具有经验主义的特点，对发酵过程的微生物生理学本质缺乏认

识；以分子生物学为主要研究手段的现代生物技术，虽然深入揭示了微生物的遗传机制和生理行为，但是对微生物生命活动过程所涉及的工程因素（包括物理、化学和生物因素）则难以顾及。因此，研究获得高产量（便于下游处理）、高底物转化率（降低原料成本）和高生产强度（缩短发酵周期）的相对统一的发酵过程优化理论，并成功地应用于工业实践，是国内外发酵工程领域的关键技术问题。

## 二、发酵工程的研究内容

发酵工程技术主要包括提供高性能生产菌种的菌种技术、实现低成本大规模生产产品的发酵技术及最终获得合格产品的分离提取技术。主要研究内容包括如下几点。

### 1. 高性能生产菌种选育与改造

微生物菌种是发酵工程的基础，是体现发酵过程成败以及体现经济效益和工作效率的关键。微生物菌种来源于自然，因此从自然界中分离和筛选微生物菌株是发酵工业的第一步。任何微生物产品或服务的开发首先需要合适的生产菌株，优良的微生物菌种是发酵工程的基础和关键，其特点是：①原料廉价，生产迅速，目的产物产量高；②易于控制培养条件，酶活性高，发酵周期较短；③抗杂菌和噬菌体的能力强；④菌种遗传性能稳定，不易变异和退化，不产生任何有害的生物活性物质和毒素，保证安全生产。获得优良生产菌种最基本的方法是根据所需菌种的形态、生理、生态和工艺特点的要求，从自然界特定的生态环境中以特定的方法分离出新菌株。重要步骤包括：①采用已知的、常用的分离方法以及特殊的分离方法寻找目的菌种；②根据作用机制、代谢途径靶位、酶反应机制、基因操作过程的各种调控因子、目的化合物的类型等设计准确、微量、快速、简便的筛选模型，以加速目的生产菌种的筛选过程，提高筛选效率。

为高效生产目标代谢产物，从自然界筛选获得的菌株需要综合运用遗传学原理和技术对某种具有特定生产目的的菌株进行改造，去除不良性质，增加有益新性状，以提高其产率并改善其工艺性能。工业微生物菌种选育的手段包括：自发突变、物理或化学诱变、原生质体融合、基因重组、基因重排、定点突变、代谢工程策略、基因组重排等。

### 2. 高效低廉培养基设计与制造

微生物的生产性能是其固有的遗传型和其生存环境相互作用的结果。因此，从微生物菌种利用的角度来看，可知：

工业微生物菌株生产性能 = 符合经济需求的、优良的遗传背景 + 人为设计的、优化的环境条件

通过诱变、基因重组或基因工程改造并经过初筛的菌种，已成为具有发酵潜力的菌种。其潜在的优异生产性能，还需要在人为精心设计的有利于目的产物或所需特性表现的优化环境中才能表现出来。所以发酵条件的优化研究是必须进行的重要步骤。优化的环境条件包括培养基、培养温度、pH、溶解氧、种子的生理条件、多菌培养的组合及比例等。

培养基的设计及优化处于培养条件优化的首要地位。培养基不仅为微生物提供碳源、氮源、能源、生长因子、无机盐和水六类营养要素，其组分还会显著影响发酵产物的浓度、转化率和生产强度。同时培养基（原料）的成本直接影响整个发酵过程的经济效益和下游产品分离提取的难易程度和成本。其设计原则为：①目的明确，根据培养菌的类别、产物类别，作种子培养还是作发酵培养的目的，运用生物学和微生物学知识，为提出最佳试验方案打下良好基础；②营养协调，以对微生物细胞组成元素的调查分析为基础，合理配置营养要素，如碳氮比（C/N）；③适宜的理化环境，要有适宜的培养基 pH 值、渗透压、水活度、氧化还原势等物理化学条件；④经济节约，由于工业发酵规模巨大，在设计工业发酵培养基时，一个十分重要的原则是经济节约。培养基设计中经常采用的两个策略是“封闭策略”（closed strategy）和“开放策略”（open strategy）。前者即设计中限定一定数量或种类的组分，其前提是先假定已经正确选定了某些组

分,但其缺点则是会把可能对发酵更为有利的培养基组分排除在外;而后者即是从可以提供的所有组分中,找出最佳的组合(搭配),优点是先不去假设哪些组分是最好的组分,但这种策略比较复杂,费时费力,难于操作。在培养基设计时一般可先用开放策略,一旦挑出最佳组分,再转为封闭策略。培养基设计、选用的方法包括:①生态模拟:在自然条件下,凡有某种微生物大量生长繁殖的环境,必定存在该微生物所必要的营养和其他生存条件。若直接去用这类自然基质或模拟这类自然条件,就可能获得一种最初的自然培养基。②参阅文献:即沿用他人已经发表的培养基配方,不必事事凭自己的直觉、经验,文献、资料上已有大量的培养基配方,可以作为培养基设计的第一步。③组分更换:这是一种逐一试验每种组分在培养基中的作用及效果的方法,即先选育一种培养基,然后一次更换一种组分,常用来比较不同碳源、氮源、磷源的效果。这种方法不考虑组分浓度的改变,也不考虑各种组分间的交互作用(interaction)效应,不能发现最佳培养基组成,但可删除效果不佳的组分。

### 3. 高经济性能发酵过程优化技术

发酵过程控制优化指的是在已经提供菌种或基因工程菌的基础上,在发酵罐中通过操作条件的控制或发酵罐装备的选型改造,实现目标代谢产物生产的高产量、高产率与高生产强度,这是发酵过程控制和优化的最基本的3个目标函数。①高产量,即目的产物的最终浓度或总活性;②高转化率,即基质或者说反应底物向目的产物的转化百分数;③生产强度或生产效率,也就是目的产物在单位时间内,单位生物反应器体积下的产量。目的代谢产物的最终浓度或总活性是发酵产品质量的一个标志。由于通常情况下,发酵过程代谢产物的浓度或总活性比较低,提高最终浓度或总活性可以极大地减少下游分离精制过程的负担,降低整个生产过程的生产费用。产物生产强度是生产效率的具体体现。在某些传统和大宗的发酵产品的生产过程中,如酒精、有机酸和某些有机溶剂的发酵过程,其下游分离精制过程相对容易,但人们仍要同时综合考虑产物的生产强度和最终浓度,这样才能够从商业角度上与化学合成方法相竞争。起始反应底物向目的产物的转化率,考虑的是原料使用效率的问题。在使用昂贵的起始反应底物或者反应底物对环境形成严重污染的发酵过程中,原料的转化效率至关重要,转化率通常要求接近100%(98%~100%)。通过优化发酵过程的环境因子、操作条件以及操作方式,可以得到所期望的最大终端产物浓度、最大生产效率,或者最高原料转化率。但是,通常情况下这三项优化指标是不可能同时取得最大的数值。例如,在酒精发酵过程中,通常情况下连续操作的生产效率最高,但其最终浓度和原料转化率却明显低于流加操作或间歇操作。提高某一项优化指标,往往需要以牺牲其他优化指标为代价,这时,需要对发酵过程进行整体的性能评价。

发酵过程的特征体现在:①动力学模型呈高度的非线性。②随着发酵或生物反应的进行,或者随着发酵批次的不同,过程的动力学模型参数常变化不定,呈现强烈的时变性特征。对于某些生物过程,甚至无法用数学模型来对动力学特性进行定量的描述。③除了某些简单的物理状态变量和化学状态变量,如温度、pH、压力、气体分压、溶解氧浓度外,绝大多数生物状态变量(如生物量、营养物质浓度、代谢产物浓度、生物活性等)是很难在线测量的。尽管近年来生物电极和传感器技术的飞速发展,使得某些生物状态量的在线测量成为可能,但测量噪声、稳定性、苛刻的操作维护条件、价格等因素依然制约着生物电极在生物过程中的实际应用。④最后,生物过程由于涉及许多物理过程和化学反应,其相互之间的作用和影响必然造就了生物过程的响应速度慢、在线测量带有大幅度时间滞后的特征。生物过程的上述特性,使得基于线性动力学模型的控制和优化理论难以适应和满足生物过程控制和优化的要求。随着发酵罐中微生物大规模培养技术的深入研究,以及对分批发酵过程参数的时变性、多样性、耦合性和不确定性的认识,建立以过程动力学为基础的数学模型,又引入了一系列现代控制理论,其中有静态和动态优化、系统识别、自适应控制、专家系统、模糊控制、神经网络,以及各种混沌现象的研究,以实现过程优化。近年来代谢工程研究与生化工程的研究逐渐结合起来,从宏观走向微观,把代谢网络中的代谢流分配与化学计量结合起来,并通过计算机仿真得到许多有价值的结果。这些在基

因水平和细胞水平的代谢调控研究为深入理解微生物过程起着重要的作用，但是在发酵罐实际操作时，由于发酵过程酶学研究的困难，以及过程特征数据采集和处理的困难，发酵工艺优化研究的基本思路仍旧是寻求培养基配方和确定最佳温度、pH、溶解氧等采用动力学为基础的以最佳工艺控制点为依据的静态操作方法，实际上这只是化学工程宏观动力学概念在发酵工程上的延伸。系统生物学的发展，为透彻理解和调控发酵过程优化提供了新的契机。

### 三、发酵过程优化的研究内容

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、液相和固相的混合物，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，必须做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。

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，特别是对生物反应宏观动力学和生物反应器进行研究。简而言之，生物反应动力学是有关生物过程、化学过程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。发酵过程优化主要涉及以下四个方面的研究内容。

(1) 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，细胞生长过程的研究是发酵过程优化的重要基础内容。研究细胞的生长过程，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。

(2) 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碳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。

(3) 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,即在无反应器结构、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的范畴。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的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,以致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。

(4) 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·许格勒著的《生物反应工程》一书。

## 第二节 ● 发酵过程优化技术的研究与应用现状

### 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。

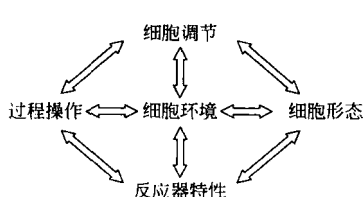
Hasting 指出(1954 年),生化工程要解决的十大问题是深层培养、通气、空气除菌、搅拌、结构材料、容器、冷却方式、设备及培养基除菌、过滤、公害。到 20 世纪 60 年代中期,生化工程的研究人员在发酵及与之相关的管路网络设计、操作中推行了无菌的概念,建立了无菌操作的一整套技术。1964 年 Aiba 等人认为通气搅拌与放大是生化工程学科的核心,其中放大是生化工程的焦点。由于通气搅拌尤其是发酵罐的放大问题不仅仅与发酵罐的特性、液体的动态有关,而且与微生物的代谢反应紧密相连。因此 1973 年 Aiba 等人进一步指出,在大规模研究方面,仅仅把重点放在无菌操作、通气搅拌等过程的物理现象解析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



ing)。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、物理过程之间的相互关系；二是生物反应器工程，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、过程动力学及最优化原理等化学工程学原理，也涉及生物化学、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及动力学模型的建立，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和获得的一些动力学模型还仅仅只是一个起步。

图1-1 生物反应器中复杂的相互关系 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、基于微生物功能理解的发酵过程优化技术

微生物功能受微生物自身的基因型、胞内微环境(如胞内能荷水平和氧化还原状态)和宏观环境(如温度、溶氧等物理和化学因素)等因素共同决定。

越来越多的研究表明，微生物将生物质(糖)转化生产目标代谢产物的过程，不是生化反应的简单流程，而是通过细胞内复杂的生化网络实现的。生化网络包括基因调控网络、蛋白质相互作用网络、信号传导网络和代谢网络，主要由胞内各种分子即基因、蛋白质和代谢物通过物理相互作用或者化学反应结合在一起形成。生化网络具有高度复杂的结构，如在基因组规模上重构的大肠杆菌代谢网络已经揭示了931个生化反应，酿酒酵母代谢网络则包括1149个反应。其复杂性不仅在于节点数目多、连接关系复杂，而且在于网络是一个动态结构，通过各个节点的代谢流随时空而动态变化。基于基因组序列数据、蛋白质组分析、代谢组分析和通量组计算重构代谢网络，已经成为对微生物性能进行调控和优化的基础。

许多基于对代谢网络的理解而设计的正向代谢工程策略并不总能达到预期目标。因为控制代