

第八章

发酵过程



定 义

发酵过程即细胞的生物反应过程，是指由生长繁殖的细胞所引起的生物反应过程。它不仅包括了以往“发酵”的全部领域，而且还包括固定化细胞的反应过程、生物法废水处理过程和细菌采矿等过程。

为什么要研究发酵过程

微生物发酵的生产水平不仅取决于生产菌种本身的性能，而且要赋以合适的环境条件才能使它的生产能力充分表达出来。为此我们必须通过各种研究方法了解有关生产菌种对环境条件的要求，如培养基、培养温度、pH、氧的需求等，并深入地了解生产菌在合成产物过程中的代谢调控机制以及可能的代谢途径，为设计合理的生产工艺提供理论基础。同时，为了掌握菌种在发酵过程中的代谢变化规律，可以通过各种监测手段如取样测定随时间变化的菌体浓度，糖、氮消耗及产物浓度，以及采用传感器测定发酵罐中的培养温度pH、溶解氧等参数的情况，并予以有效地控制，使生产菌种处于产物合成的优化环境之中。

本章讲述的内容

- 第一节 发酵过程的代谢变化规律
- 第二节 发酵工艺的控制
- 第三节 发酵过程的主要控制参数
- 第四节 发酵过程的自动控制
- 第五节 发酵动力学
- 第六节 发酵过程优化

第一节 发酵过程的代谢变化规律

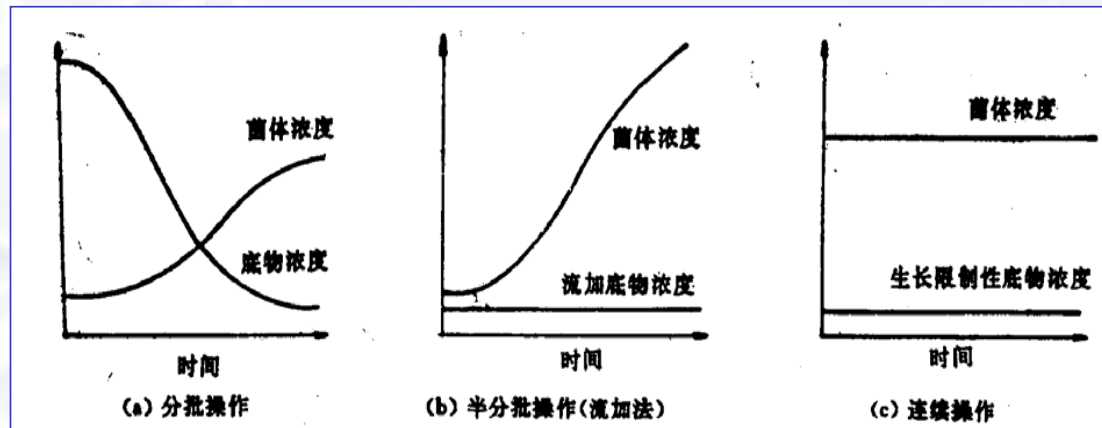
- **代谢变化**就是反映发酵过程中菌体的生长，发酵参数（培养基，培养条件等）和产物形成速率三者间的关系。
- 了解生产菌种在具有合适的培养基、pH、温度和通气搅拌等环境条件下对基质的利用、细胞的生长以及产物合成的代谢变化，有利于人们对生产的控制。

代谢曲线

代谢变化是反映发酵过程中菌体的生长，发酵参数（培养基，培养条件等）和产物形成速率三者间的关系。把它们随时间变化的过程绘制成图，就成为所说的代谢曲线。

■ 发酵过程按进行过程有三种方式：

- ✓ 分批发酵(Batch fermentation)
- ✓ 补料分批发酵(Fed-batch fermentation)
- ✓ 连续发酵(Continuous fermentation)



本节介绍分批发酵、补料分批发酵及连续发酵三种类型的操作方式下的代谢特征。

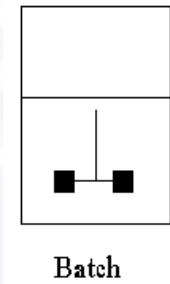
一、分批发酵

1. 分批发酵的定义

- 是指在一封闭系统内含有初始限量基质的发酵方式。在这一过程中，除了氧气、消泡剂及控制pH的酸或碱外，不再加入任何其它物质。

发酵过程中培养基成分减少，微生物得到繁殖

。



2、分批发酵的特点

- 微生物所处的环境在发酵过程中不断变化，其物理，化学和生物参数都随时间而变化，是一个不稳定的过程。

3、分批发酵的优缺点

● 优点

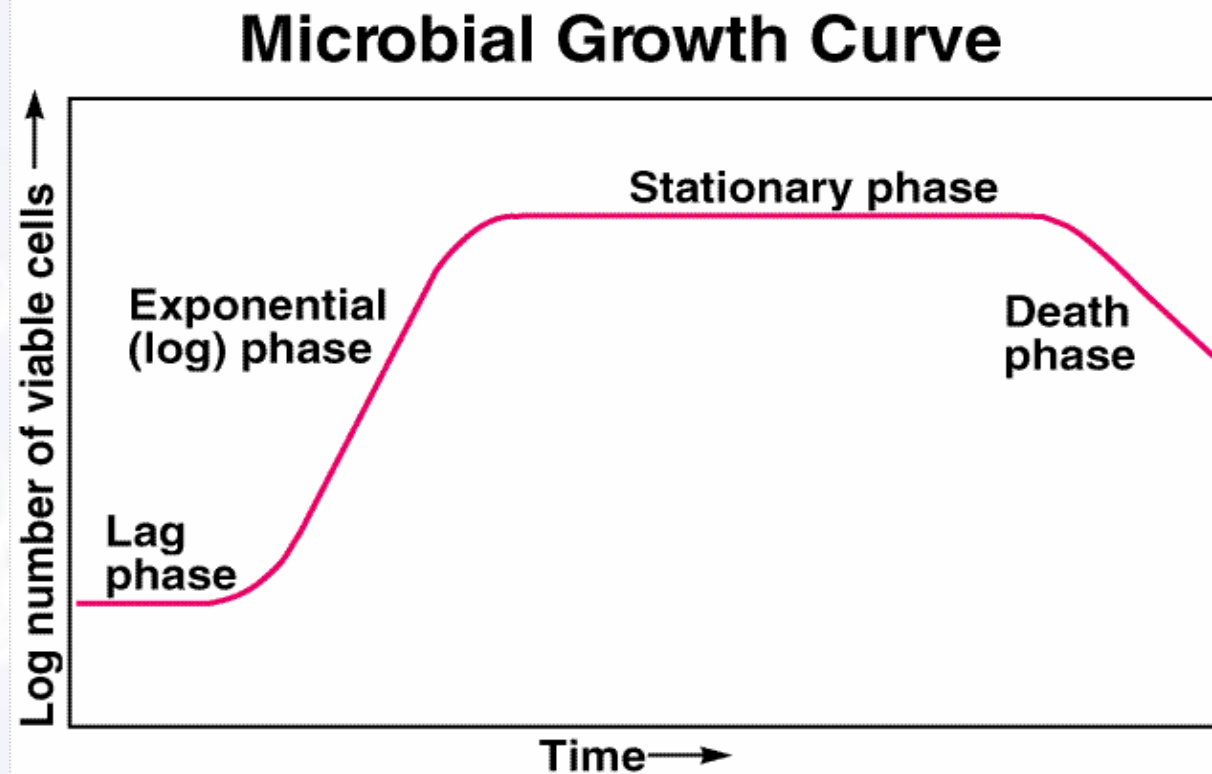
- 操作简单；
- 操作引起染菌的概率低。
- 不会产生菌种老化和变异等问题

● 缺点

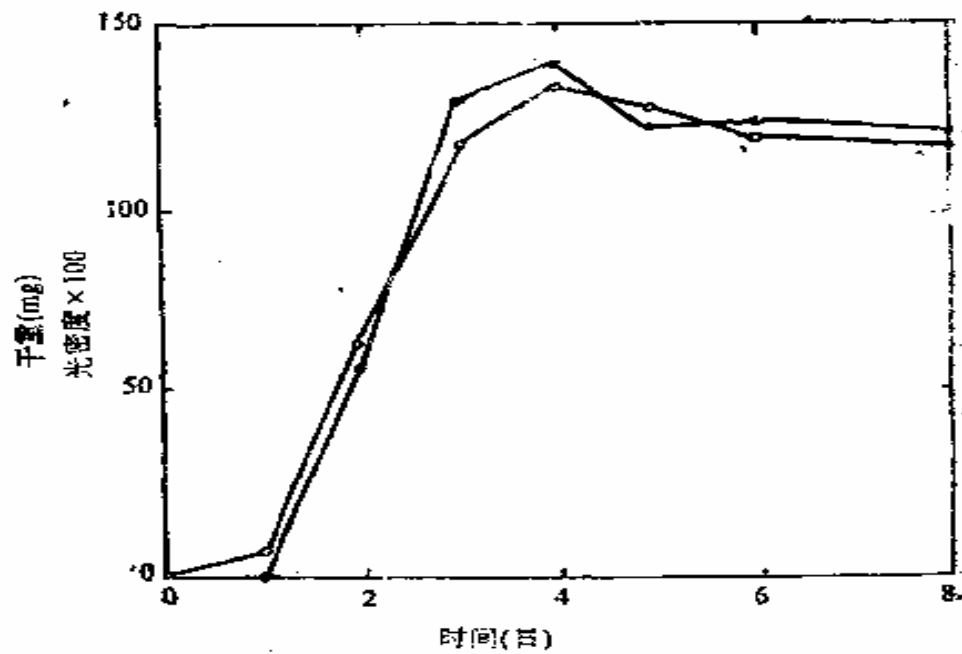
- 非生产时间较长、设备利用率低。

4、分批发酵的生长曲线

单细胞微生物



丝状真菌和放线菌



5、分批发酵的类型

- Gaden's fermentation classification（按照菌体生长，碳源利用和产物生成的变化）
 - 第一类型
 - 第二类型
 - 第三类型
- Piret's fermentation classification（按照产物生成与菌体生长是否同步）
 - 生长关联型（第一类型）
 - 生长无关联型（第二，三类型）

第一类型 (生长关联型)

■产物直接来源于产能的初级代谢（自身繁殖所必需的代谢），菌体生长与产物形成不分开。

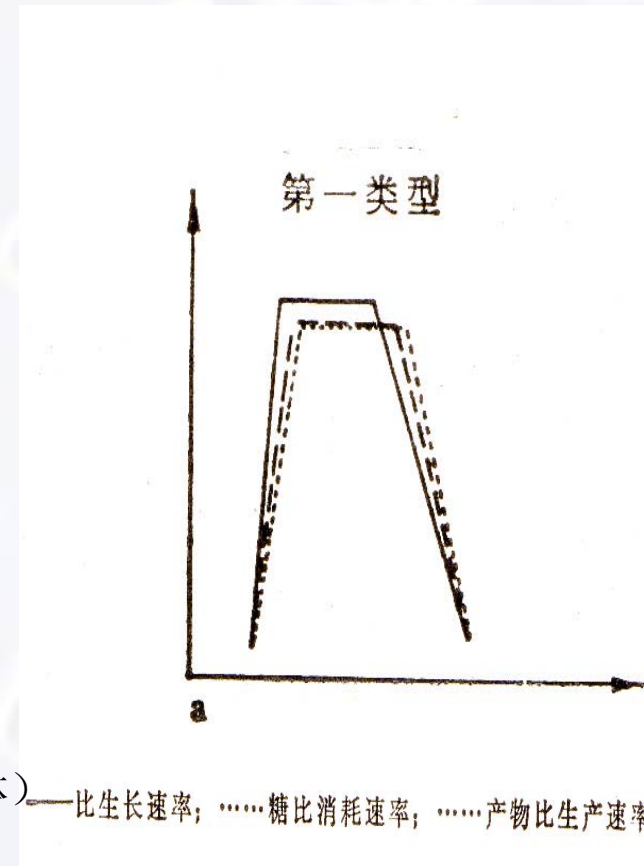
■例如单细胞蛋白和葡萄糖酸的发酵

$$\frac{dP}{dt} = \alpha \mu x \quad \text{或}$$

$$Q_p = \frac{dP}{Xdt} = \alpha \mu$$

α : 生长关联型产物的形成比例 (g产物 / g菌体) —— 比生长速率;糖比消耗速率;产物比生产速率

Q_p : 产物合成的比速率



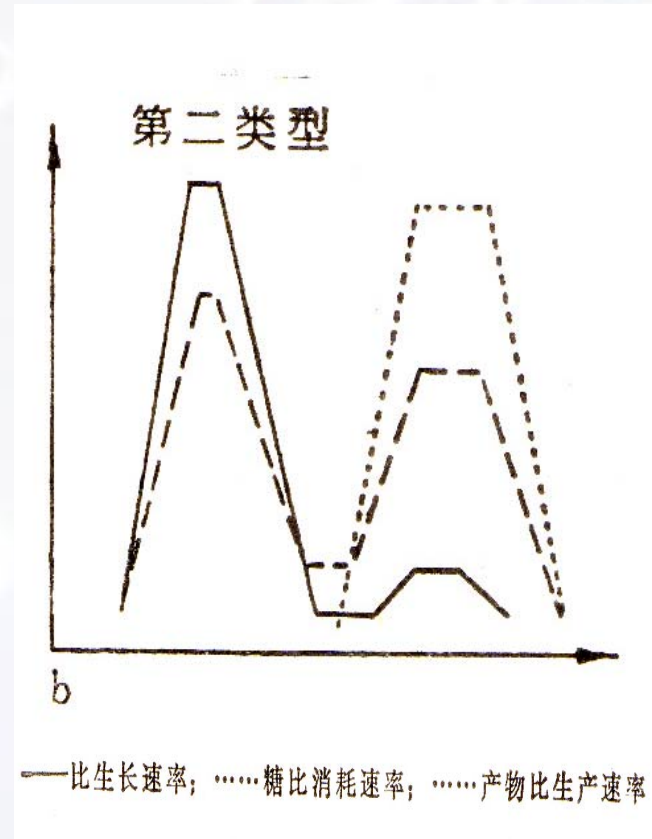
第二类型（部分生长关联型）

➤产物也来源于能量代谢所消耗的基质，但产物的形成在与初级代谢分开的次级代谢中，出现两个峰，菌体生长进入稳定期，出现产物形成高峰。

➤例如，柠檬酸和某些氨基酸的发酵。

$$\frac{dP}{dt} = \alpha\mu X + \beta X$$

$$Q_p = \frac{dP}{Xdt} = \alpha\mu + \beta$$



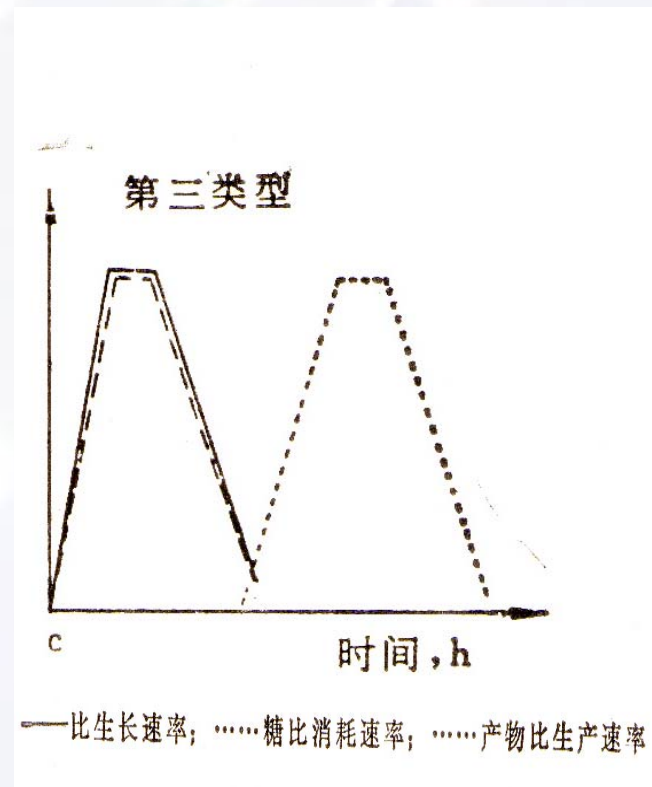
第三类型（非生长关联型）

■产物是在基质消耗和菌体生长之后，菌体利用中间代谢反应来形成的，即产物的形成和初级代谢是分开的。

■如抗生素发酵。

$$\frac{dP}{dt} = \beta X$$

$$Q_P = \frac{dP}{Xdt} = \beta$$



■ 生长关联型

(growth associated)

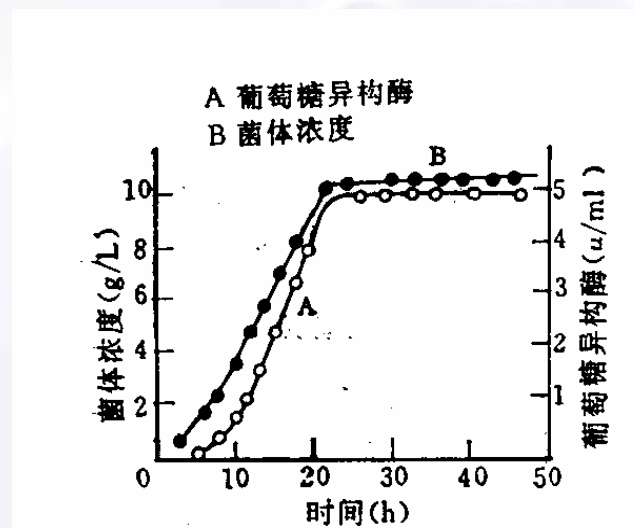
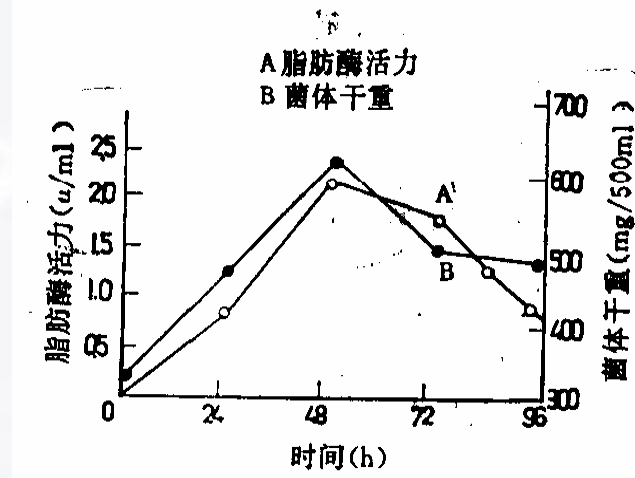
产物形成与生长有关，如酒精、某些酶等。

$$Q_P = Y_{P/x} \cdot \mu$$

Q_P : 产物形成比速率 ($g/h \cdot L$)

$Y_{P/x}$: 菌体生长为基准的产物的率 (g/g)

μ : 比生长速率 (h^{-1})



■ 非生长关联型 non-growth associated

产物的形成速度与生长无关，只与细胞积累量有关。如，抗生素。

$$\frac{dP}{dt} = \beta X$$

β : 比例常数

$\frac{dP}{dt}$: 产物合成速度 ($g/L \cdot h$)

X : 菌体浓度 (g/L)

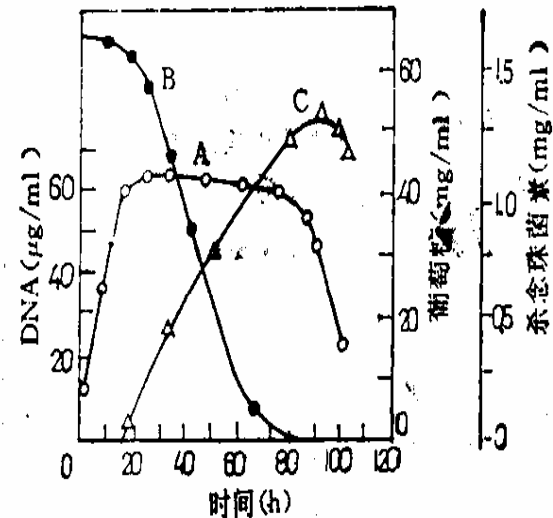


图 6-6 杀念珠菌素发酵中葡萄糖、DNA、
抗生素产量的代谢变化

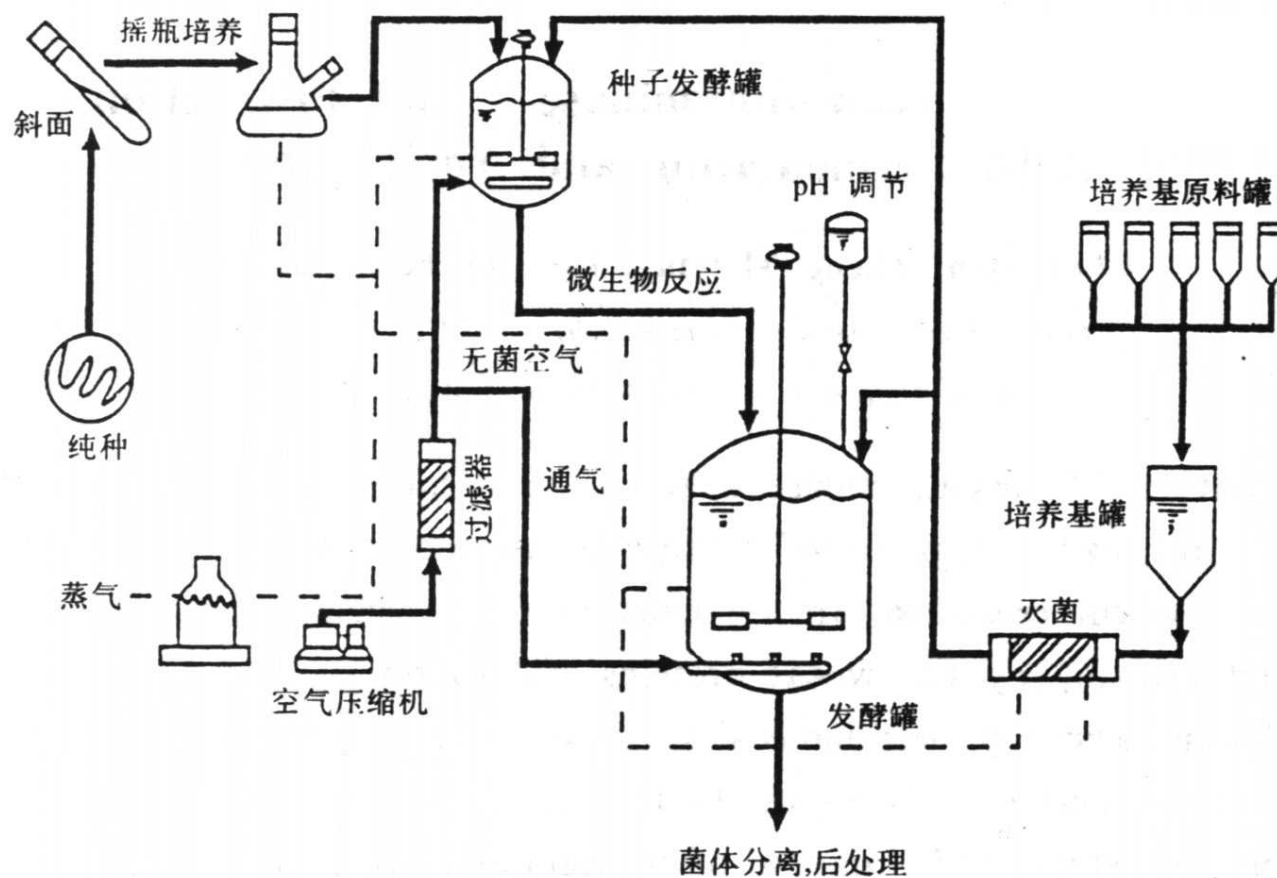
A—DNA, $\mu\text{g}/\text{ml}$; B—葡萄糖, mg/ml ;
C—杀念珠菌素产量, mg/ml

■ 分批发酵的分类对实践的指导意义

从上述分批发酵类型可以分析：

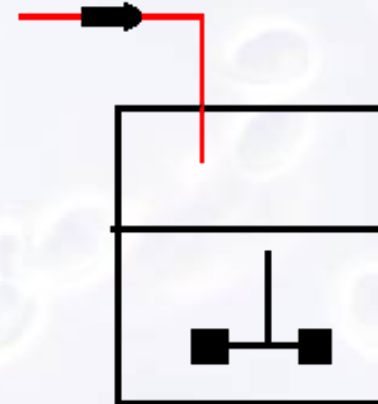
- ▶ 如果生产的产品是生长关联型（如菌体与初级代谢产物），则宜采用有利于细胞生长的培养条件，延长与产物合成有关的对数生长期；
- ▶ 如果产品是非生长关联型（如次级代谢产物），则宜缩短对数生长期，并迅速获得足够量的菌体细胞后延长平衡期，以提高产量。

典型的分批发酵工艺流程



二、补料分批发酵

- 补料分批发酵又称半连续发酵或流加分批发酵，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式。



Fed-batch

2、补料分批发酵的优缺点

- 优点

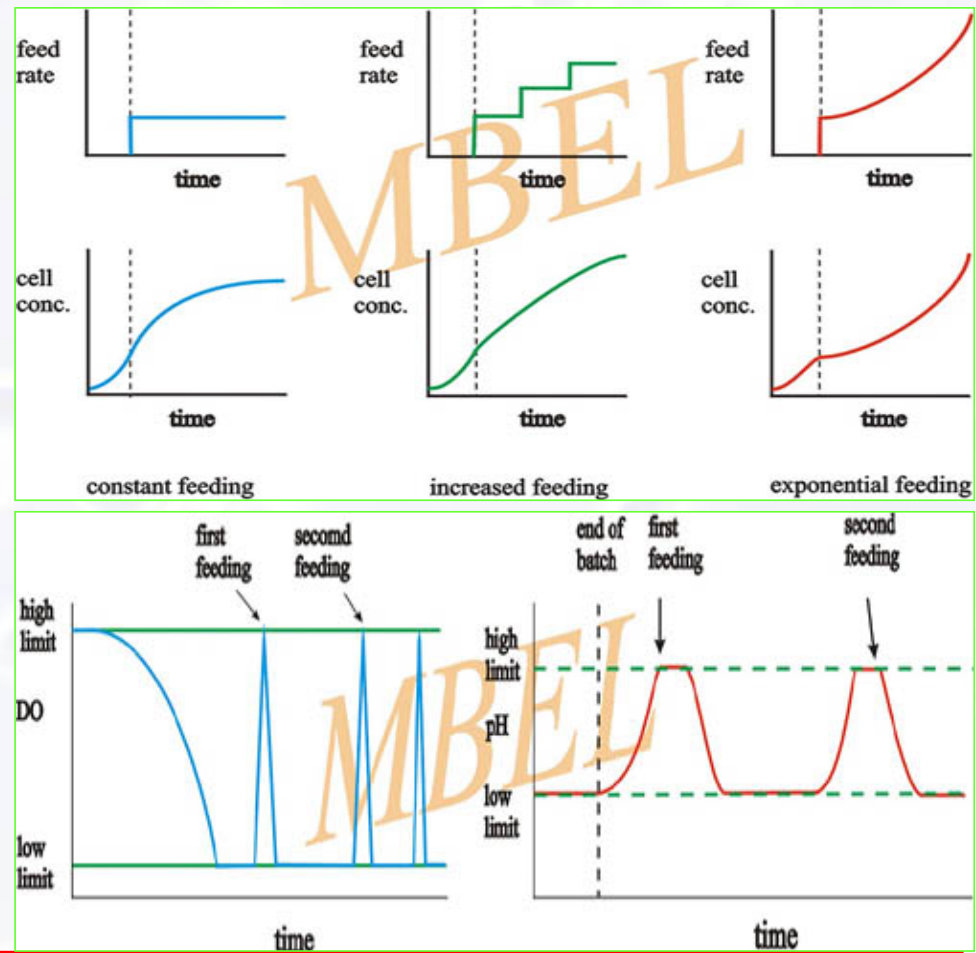
- 使发酵系统中维持很低的基质浓度；
- 和连续发酵比、不需要严格的无菌条件；
- 不会产生菌种老化和变异等问题。

- 缺点

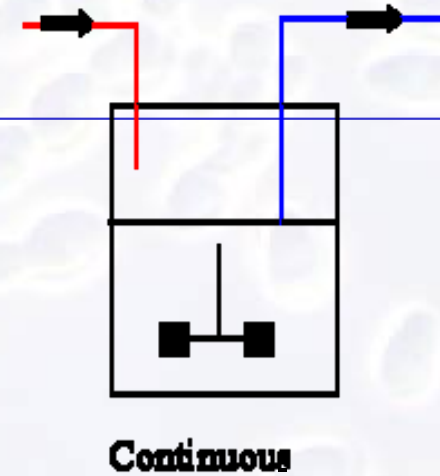
- 存在一定的非生产时间；
- 和分批发酵比，中途要流加新鲜培养基，增加了染菌的危险。

3、补料分批发酵的类型

- 补料方式
 - 连续流加
 - 不连续流加
 - 多周期流加
- 补料成分
 - 单一组分流加
 - 多组分流加
- 控制方式
 - 反馈控制
 - 无反馈控制



四、连续发酵



1. 定义

- 培养基料液连续输入发酵罐，并同时放出含有产品的相同体积发酵液，使发酵罐内料液量维持恒定，微生物在近似恒定状态（恒定的基质浓度、恒定的产物浓度、恒定的pH、恒定菌体浓度、恒定的比生长速率）下生长的发酵方式。

2、连续发酵的优缺点

- 优点

- 能维持低基质浓度；
- 可以提高设备利用率和单位时间的产量；
- 便于自动控制。

- 缺点

- 菌种发生变异的可能性较大；
- 要求严格的无菌条件。

3、连续发酵的类型

- 恒化培养
 - 使培养基中限制性基质的浓度保持恒定
- 恒浊培养
 - 使培养基中菌体的浓度保持恒定

4、连续发酵的代谢曲线

从分批培养出发，无论在哪个时候开始加入新鲜培养基过渡到连续操作，达到一定的菌体浓度及限制性基质浓度则培养系统一定能成为稳定状态。

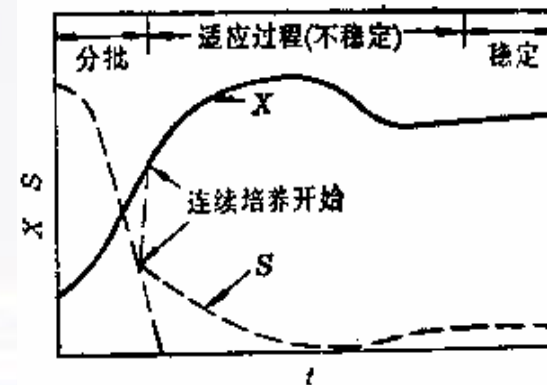


图 9-6 从分批培养过渡到连续培养
X—菌体浓度; S—限制性基质浓度;
t—时间

第二节 发酵工艺的控制

工艺条件控制的目的是：就是要为生产菌创造一个最适的环境，使我們所需要的代谢活动得以最充分的表达。

一、温度对发酵的影响及控制

1, 影响发酵温度的因素

产热因素：生物热

搅拌热

散热因素：蒸发热

辐射热

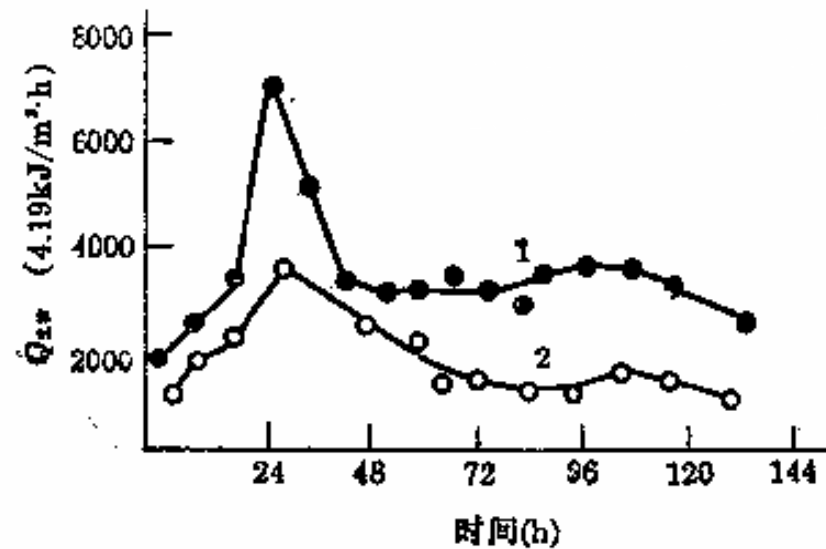
发酵热

发酵热就是发酵过程中释放出来的净热量。

$$Q_{\text{发酵}} = Q_{\text{生物}} + Q_{\text{搅拌}} - Q_{\text{蒸发}} - Q_{\text{辐射}}$$

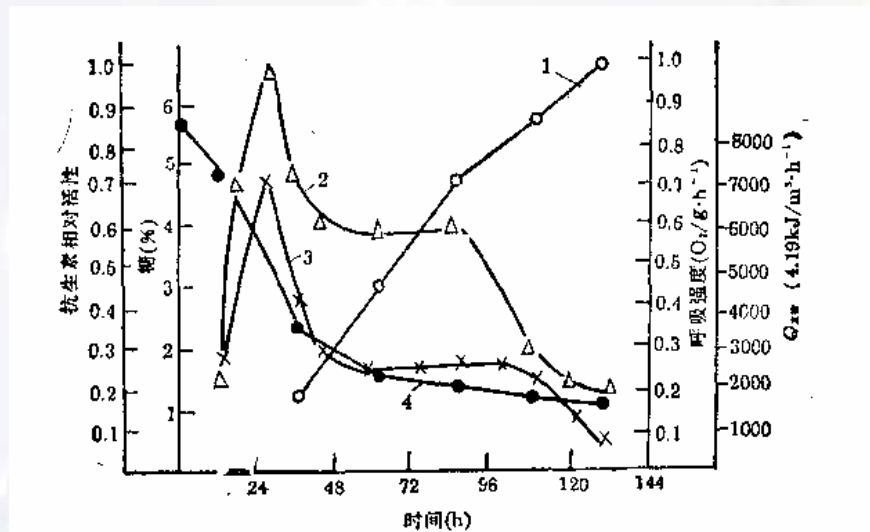
- ✓ 生物热：生物热是生产菌在生长繁殖时产生的大量热量。培养基中碳水化合物，脂肪，蛋白质等物质被分解为 CO_2 , NH_3 时释放出的大量能量。
- ✓ 用途：合成高能化合物，
供微生物生命代谢活动
热能散发
- ✓ 影响生物热的因素：生物热随菌株，培养基，发酵时期的不同而不同。生物热的大小还与菌体的呼吸强度有对应关系。

实验发现抗生素高产量批号的生物热高于低产量批号的生物热。说明抗生素合成时微生物的新陈代谢十分旺盛。



发酵过程中生物热的变化

在四环素发酵中，还发现生物热和菌的呼吸强度的变化有对应关系，特别是在80小时以前。从此实验中还可看到，当产生的生物热达到高峰时，糖的利用速度也最大。另外也有人提出，可从菌体的耗氧率来衡量生物热的大小。



四环素生物合成过程中系列参数的动态变化过程

1: 效价; 2: 呼吸强度; 3: 生物热; 4: 糖浓度

- 搅拌热：通风发酵都有大功率搅拌，搅拌的机械运动造成液体之间，液体与设备之间的摩擦而产生的热。

$$Q_{\text{搅拌}} = 3600 (P/V)$$

3600：热功当量 (kJ/ (kW.h))

(P/V)：通气条件下单位体积发酵液所消耗的功率 (kW/m³)

- 蒸发热：通入发酵罐的空气，其温度和湿度随季节及控制条件的不同而有所变化。空气进入发酵罐后，就和发酵液广泛接触进行热交换。同时必然会引起水分的蒸发；蒸发所需的热量即为蒸发热。
- 蒸发热的计算：

$$Q_{\text{蒸发}} = G (I_2 - I_1)$$

G：空气流量，按干重计算，kg/h

I_1 、 I_2 ：进出发酵罐的空气中的热焓量，J/kg
(干空气)

- 辐射热：由于发酵罐内外温度差，通过罐体向外辐射的热量。
- 辐射热可通过罐内外的温差求得，一般不超过发酵热的5%。

发酵热的测定

(1) 通过测定一定时间内冷却水的流量和冷却水进出口温度，由下式求得这段时间内的发酵热。

$$Q_{\text{发酵}} = GC(t_2 - t_1) / V \quad (\text{J/m}^3 \cdot \text{h})$$

式中 G ——冷却水流量, kg/h ; C ——水的比热, $\text{J/kg} \cdot ^\circ\text{C}$;

t_1 、 t_2 ——进出口的冷却水温度, $^\circ\text{C}$; V ——发酵液体积, m^3 。

(2) 通过罐温的自动控制，先使罐温达到恒定，再关闭自控装置测得温度随时间上升的速率S，按下式可求得发酵热：

$$Q_{\text{发酵}} = KS$$

式中 S——温度随时间上升的速率， $^{\circ}\text{C}/\text{h}$ ；

K——总参数，代表系统的热容量， $\text{J}/\text{L}\cdot^{\circ}\text{C}$ 。

K值可由下式求得：

$$K = (MC_p)_{\text{发酵液}} + (MC_p)_{\text{容器}} + (MC_p)_{\text{附件}}$$

式中M代表以每升发酵液计的发酵液、容器及附件的重量； C_p 代表各自的比热。

2, 温度对发酵的影响

- 影响各种酶的反应速率和蛋白质性质
- 影响发酵液的物理性质
- 影响生物合成的方向。
 - 例如，四环素发酵中金色链霉菌同时能产生金霉素。在低于30 °C温度下，该菌种合成金霉素能力较强。当温度提高，合成四环素的比例也提高。在温度达35°C则只产生四环素而金霉素合成几乎停止。

发酵过程，微生物生长速率变化

$$dX/dt = \mu X - \alpha X$$

μ : 比生长速率

α : 比死亡速率

当处于生长状态时， $\mu \gg \alpha$ ， α 可忽略。

μ 与 α 与温度有关

根据Arrhenius公式

$$\mu = Ae^{-E/RT}$$

$$\alpha = A'e^{-E'/RT}$$

通常 E' 大于 E ，所以 α 比 μ 对温度变化更为敏感。

例：青霉菌生产青霉素

青霉菌生长活化能 $E=34\text{kJ/mol}$

青霉素合成活化能 $E=112\text{kJ/mol}$

青霉素合成速率对温度较敏感，温度控制相当重要。

3, 最适温度的确定

- ✓ 最适温度是一种相对概念，是指在该温度下最适于菌的生长或发酵产物的生成。
- ✓ 最适发酵温度与菌种，培养基成分，培养条件和菌体生长阶段有关。
- ✓ 最适发酵温度的选择
 - 在发酵的整个周期内仅选一个最适培养温度不一定好。
 - 温度的选择要参考其它发酵条件。
 - 温度的选择还应考虑培养基成分和浓度

4, 温度的控制

发酵罐：夹套 (10M^3 以下)

盘管 (蛇管) (10M^3 以上)

二、pH对发酵的影响及控制

- 发酵过程中培养液的pH值是微生物在一定环境条件下代谢活动的综合指标，是一项重要的发酵参数。它对菌体的生长和产品的积累有很大的影响。因此，必须掌握发酵过程中pH的变化规律，及时监测并加以控制，使它处于最佳的状态。尽管多数微生物能在3~4个pH单位的pH范围内生长，但是在发酵工艺中，为了达到高生长速率和最佳产物形成，必须使pH在很窄的范围内保持恒定。

1, pH值对微生物的生长繁殖和产物合成的影响

- pH影响酶的活性
- pH影响微生物细胞膜所带电荷的状态
- pH影响培养基某些组分和中间代谢产物的离解
- pH不同, 往往引起菌体代谢过程的不同, 使代谢产物的质量和比例发生改变

2, 发酵过程中pH的变化

- ❖ 生长阶段
- ❖ 生成阶段
- ❖ 自溶阶段

3, 引起pH下降的因素

- ❖ 碳源过量
- ❖ 消泡油添加过量
- ❖ 生理酸性物质的存在

4, 引起pH上升的因素

- ❖ 氮源过多
- ❖ 生理碱性物质的存在
- ❖ 中间补料, 碱性物质添加过多

5, 最适pH的选择

- ✓ 原则：有利于菌体生长和产物的合成。一般根据实验结果确定。
- ✓ 最适pH与菌株，培养基组成，发酵工艺有关。应按发酵过程的不同阶段分别控制不同的pH范围。

- ✓ 最适pH与微生物生长，产物形成之间相互关系有四种类型：
- 菌体比生长速率 μ 和产物比生产速率 Q_p 的最适pH在一个相似的较宽的范围内（比较容易控制）；
 - μ 较宽， Q_p 范围较窄，或 μ 较窄， Q_p 范围较宽（难控制，应严格控制）；
 - μ 和 Q_p 对pH都很敏感，其最适pH相同（应严格控制）；
 - 更复杂， μ 和 Q_p 对pH都很敏感，并有各自的最适pH（难度最大）；

6, pH的控制

❖ 调节基础培养基的配方

❖ 调节碳氮比 (C/N)

❖ 添加缓冲剂

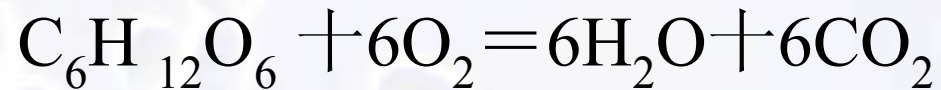
❖ 补料控制

— 直接加酸加碱

— 补加碳源或氮源

三、氧对发酵的影响

- 大多数发酵过程是好氧的，因此需要供氧。如果考虑呼吸的化学计量，则葡萄糖的氧化可由下式表示：

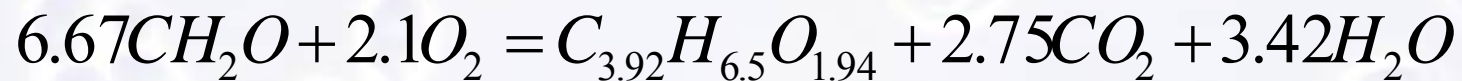


- 只有当这两种反应物均溶于水后，才对菌体有用。
- 氧在水中的溶解度比葡萄糖要小约6000倍左右(氧在水中的饱和度约为10mg/L)。许多发酵的生产能力受到氧利用限制，因此氧成为影响发酵效率的重要因素。

1, 发酵过程中氧的需求

尽管考虑了呼吸的化学计量而使供氧问题得以正确评价，但由于未曾将转化为生物物质的碳加以考虑而使菌体的真实需氧情况难以表明。许多研究工作者已经考虑到氧、碳源、氮源转化为生物物质的总化学计量关系，并利用这样的关系来预测发酵的需氧情况。从这些测定结果发现菌体的需氧似乎完全取决于培养基中的碳源。

Darlington (1964) 以 $C_{3.92}H_{6.5}O_{1.94}$ 来表述 100 克酵母菌体 (干重) 的组分, 并对由碳氢化合物和碳水化合物生产酵母推导得到如下方程式:



根据 Darlington 方程式, 可知同样生 100g 菌体, 用碳氢化合物所需的氧约为用碳水化合物生产时的 3 倍。

Johnson (1964) 得出如下方程:

$$\frac{A}{Y} - B = C$$

A为燃烧1g底物成CO₂、H₂O和NH₃（如底物中有氮存在）所需氧的量，此值易于计算获得；

B为燃烧1g菌体成CO₂、H₂O和NH₃所需氧的量，如果菌体组分已知的话，则也可计算获得。

C为生产1克菌体所需氧的量；

Y为1克底物转化成菌体的克数。

因此，A/Y为燃烧生成1g菌体的底物所需的氧，而B为燃烧菌体所需氧的量；它们之间的差为C，即为转化底物成菌体所需氧的量。

将Johnson方程式应用于利用葡萄糖和烷烃生产酵母的下列方程式为：

$$\text{对葡萄糖 } C \text{ (mmol/g)} = \frac{33.33}{Y} - 41.7$$

$$\text{对烷烃 } C \text{ (mmol/g)} = \frac{1017}{Y} - 41.7$$

如果对葡萄糖来说Y值取50%，而对烷烃来说Y值取100%；

则：C对葡萄糖 = 24.95 mmol氧/g菌体；

C对烷烃 = 65.4 mmol氧/g菌体；

Mateles (1971) 推导得一种碳源与需氧间关系的方程式，他假定代谢产物仅为菌体、 CO_2 、 H_2O ；以及菌体的正常组分C为53%、N为12%、O为19%、H为7%，则

$$\frac{\text{耗氧的克数}}{\text{菌体形成的克数}} = \frac{32C+8H-16O}{Y \times M} - 1.58$$

Y : 与碳源有关的菌体生成量

M : 碳源的分子量

Mateles利用此关系式对许多菌体利用各种基质所需的氧进行了计算

生长于不同基质上的不同微生物的需氧要求

基 质	微生物	g氧/g干菌体
葡萄糖	大肠杆菌	0.4
甲 醇	假单孢菌C	1.2
辛 烷	假单孢菌	1.7

上述方程式与生物物质的形成有关，并假定微生物除产生水、二氧化碳外，无其它产物形成。因此，这些方程仅能适用于菌体生产过程中预测氧的要求，而对菌体能形成其它产物的过程则需要加以修正。例如Cooney (1979) 建议用下列方程式计算青霉素发酵：

$$Y_{O/P} = \frac{0.53}{Y_{P/O}} - \frac{0.6X}{P} - 0.43$$

$Y_{O/P}$ ：形成每克卞青霉素钠所需氧的克数

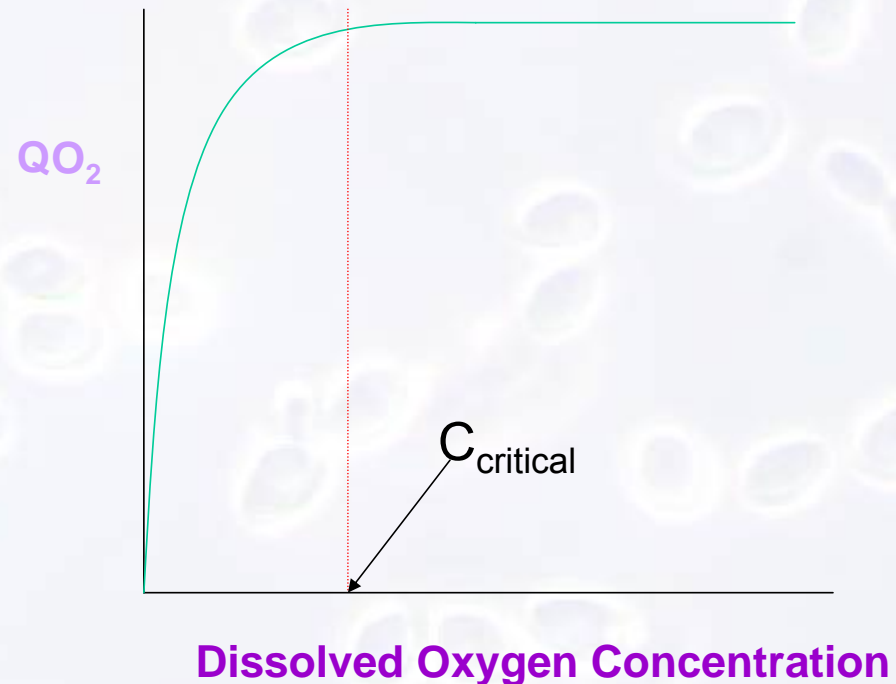
$Y_{P/O}$ ：消耗每克葡萄糖所形成的卞青霉素钠的克数

X ：形成的干菌体克数

P ：形成的卞青霉素钠的克数

但是，由于菌体的代谢是受发酵液中的溶氧浓度的影响，故简单地依据总需求来供氧是欠妥的。溶氧浓度对比摄氧率 (Q_{O_2} 每克干菌体每小时所消耗的氧的毫摩尔数) 用米氏型曲线表示。

临界氧浓度 ($C_{\text{临}}$) :
指不影响菌体呼吸所允许的最低氧浓度，或微生物对发酵液中溶解氧浓度的最低要求。



某些微生物的临界氧浓度

微生物	温度 (°C)	临界氧浓度 (mmol/L)
固氮菌	30	0.018
大肠杆菌	37	0.008
酵母	30	0.004
产黄青霉	24	0.022

2、溶氧对发酵的影响

由此可知，只有使溶氧浓度高于其临界值，才能维持菌体的最大比摄氧率，得到最大的菌体合成量。如果溶氧浓度低于临界值，则菌体代谢受到干扰。但是，发酵工业的目标是要得到菌体发酵的产物而不是菌体本身。因此，由氧饥饿而引起的细胞代谢干扰，可能对形成某些产物是有利的；同理，当提供的氧浓度远大于临界值时，虽对菌体形成无妨，但也许能刺激产物的形成；所以，某种产物形成的最佳条件可能不同于菌体生长的最佳通气条件。

根据需氧不同，可将初级代谢发酵分为：

a. 供氧充足条件下，产量最大；若供氧不足，合成受强烈抑制；

如：谷氨酸，精氨酸，脯氨酸等

b. 供氧充足条件下，可得最高产量；若供氧受限，产量受影响不明显；

如：异亮氨酸，赖氨酸，苏氨酸等

c. 若供氧受限，细胞呼吸受抑制时，才获得最大量产物；若供氧充足，产物形成反而受抑制；

如：亮氨酸，缬氨酸，苯丙氨酸等

- 但在实际生产过程中需注意：
 - 溶解氧浓度过低（代谢异常，产量降低）
 - 溶解氧浓度过高（代谢异常，菌体提前自溶）



实例一

在对黄色短杆菌 (*Brevibacterium flavum*) 生物合成氨基酸进行研究时发现，溶氧浓度对相关氨基酸的生物合成具有很大的影响。研究表明：菌体的临界溶氧浓度为 0.01mg/L ；并根据“安全”的程度予以考虑供氧的程度，也即把菌体的呼吸率作为最大呼吸率的一个组成部分。因此，氧安全值低于最大呼吸率就意味着其溶氧浓度低于临界值。

当溶氧浓度低于1.0时，谷氨酸和天冬氨酸族氨基酸合成受到影响，但苯丙氨酸，缬氨酸和亮氨酸最佳合成的溶氧浓度分别为0.55、0.60和0.85。从合成途径中可知，谷氨酸和天冬氨酸族的氨基酸来自于三羧酸循环(TCA)的中间体，而苯丙氨酸、缬氨酸和亮氨酸来自于糖酵解的中间体，即来自于丙酮酸和磷酸稀醇式丙酮酸

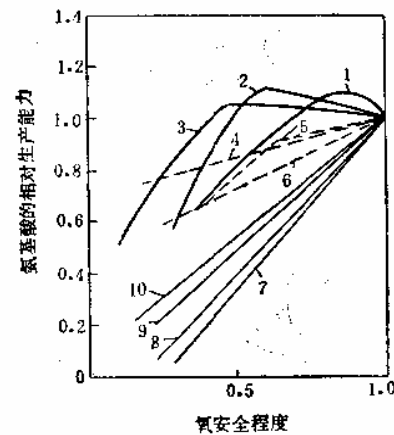


图 9.2 溶氧对产生氨基酸的影响 (Hirose and Shibai, 1980)

- 1. 亮氨酸; 2. 缬氨酸; 3. 苯丙氨酸; 4. 赖氨酸;
- 5. 异亮氨酸; 6. 苏氨酸; 7. 脯氨酸; 8. 谷氨酸;
- 9. 谷氨酰胺; 10. 精氨酸

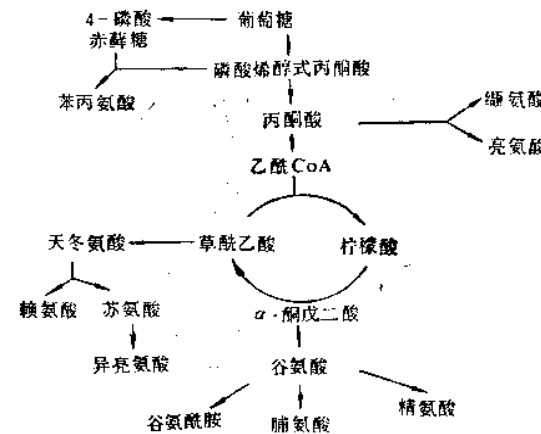


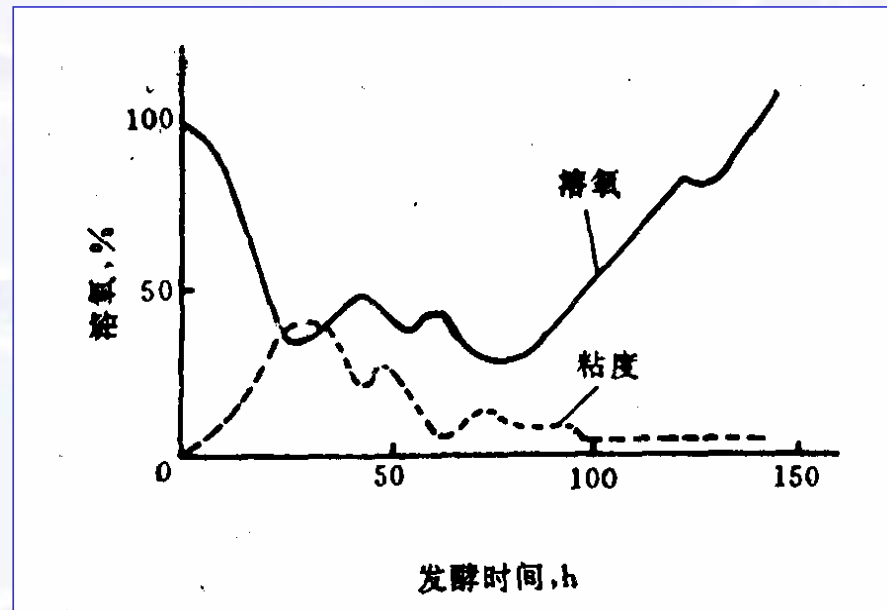
图 9.3 黄色短杆菌生物合成氨基酸途径

实例二

- Feren和Squires(1969)对顶头孢霉产生头孢菌素和卷曲霉素(Capreomycin)的研究即是一个氧对次级代谢影响的例子。他们的研究表明，头孢菌素产生菌的临界氧浓度在0~7%的空气饱和度间；而对卷曲霉素产生菌则为13~23%。但就抑制抗生素生物合成的溶氧浓度来说，对头孢菌素为低于10-20%；而对卷曲霉素则为8%。因此，在生产头孢菌素时，应使其溶氧浓度远大于临界值，而在生产卷曲霉素时，则应使其溶氧浓度低于临界值。

3、发酵过程的溶氧变化

- 发酵前期：由于微生物大量繁殖，需氧量不断大幅度增加，此时需氧超过供氧，溶氧明显下降
- 发酵中后期，溶氧浓度明显地受工艺控制手段的影响，如补料的数量、时机和方式等
- 发酵后期由于菌体衰老，呼吸减弱，溶氧浓度也会逐步上升，一旦菌体自溶，溶氧就会明显地上升



4. 溶氧的控制

- ▶ 调节通风与搅拌（具体内容在通风发酵设备中介绍）
- ▶ 限制基础培养基的浓度，使发酵器内的生物体浓度维持于适当水平；并以补料方式供给某些营养成分而控制菌体生长率和呼吸率。

四、CO₂对发酵的影响及控制

CO₂是微生物的代谢产物，同时也是某些合成代谢的基质。它是细胞代谢的重要指标。在发酵过程中，CO₂有可能对发酵有促进作用，也有可能抑制作用。

1、CO₂对发酵的影响

➤CO₂对菌体具有抑制作用，当排气中CO₂的浓度高于4%时，微生物的糖代谢和呼吸速率下降。例如，发酵液中CO₂的浓度达到 $1.6 \times 10^{-1} \text{mol}$ ，就会严重抑制酵母的生长；当进气口CO₂的含量占混合气体的80%时，酵母活力与对照相比降低20%。

- CO₂对发酵也有影响
 - 对发酵促进。如牛链球菌发酵生产多糖，最重要的发酵条件是提供的空气中要含5%的CO₂。
 - 对发酵抑制。如对肌苷、异亮氨酸、组氨酸、抗生素等发酵的抑制
 - 影响发酵液的酸碱平衡

2、CO₂对发酵影响的机理

- CO₂及HCO₃⁻主要是影响细胞膜的结构，导致膜的流动性及表面电荷密度发生改变，影响到细胞膜的输送效率，导致细胞生长受到抑制、形态发生改变。
- 培养液中的CO₂主要作用于细胞膜的脂质核心部位；
- HCO₃⁻影响细胞膜的膜蛋白。

3、CO₂的控制

CO₂在发酵液中的浓度变化不像溶解氧那样有一定的规律。它的大小受到许多因素的影响，如细胞的呼吸强度、发酵液的流变学特性、通气搅拌程度、罐压大小、设备规模等。在发酵过程中通常通过调节通风和搅拌来控制。

五、发酵过程中的泡沫及其控制

1, 泡沫的性质

泡沫是气体被分散在少量液体中的胶体体系。泡沫间被一层液膜隔开而彼此不相连通。发酵过程中所遇到的泡沫，其分散相是无菌空气和代谢气体，连续相是发酵液。



2, 泡沫的类型

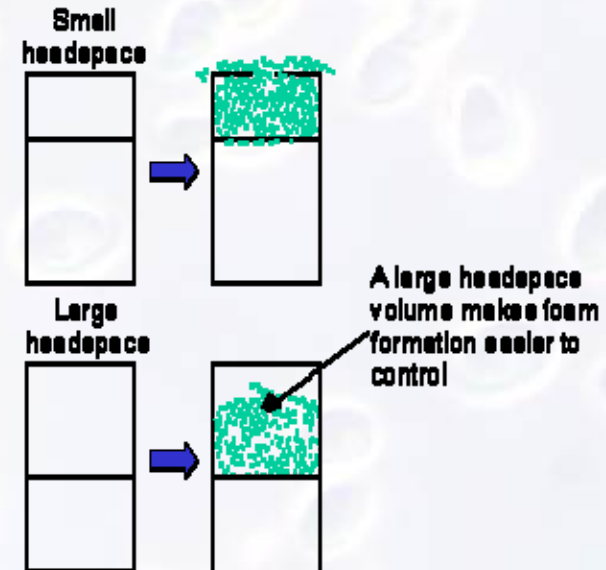
- ✓ 一类存在于发酵液的液面上，这类泡沫气相所占比例特别大，并且泡沫与它下面的液体之间有能分辨的界线。如在某些稀薄的前期发酵液或种子培养液中所见到的。
- ✓ 另一种泡沫是出现在粘稠的菌丝发酵液当中。这种泡沫分散很细，而且很均匀，也较稳定。泡沫与液体间没有明显的波面界限，在鼓泡的发酵液中气体分散相占的比例由下而上地逐渐增加。

3, 泡沫产生的原因

- ✓ 由外界引进的气流被机械地分散形成（通风、搅拌）；
- ✓ 发酵过程中产生的气体聚结生成（发泡性物质）。

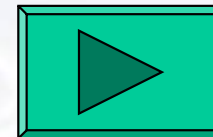
4, 泡沫对发酵的不利影响

- ❖ 降低发酵设备的利用率
- ❖ 增加了菌群的非均一性
- ❖ 增加了染菌的机会
- ❖ 导致产物的损失
- ❖ 消泡剂会给后提取工序带来困难

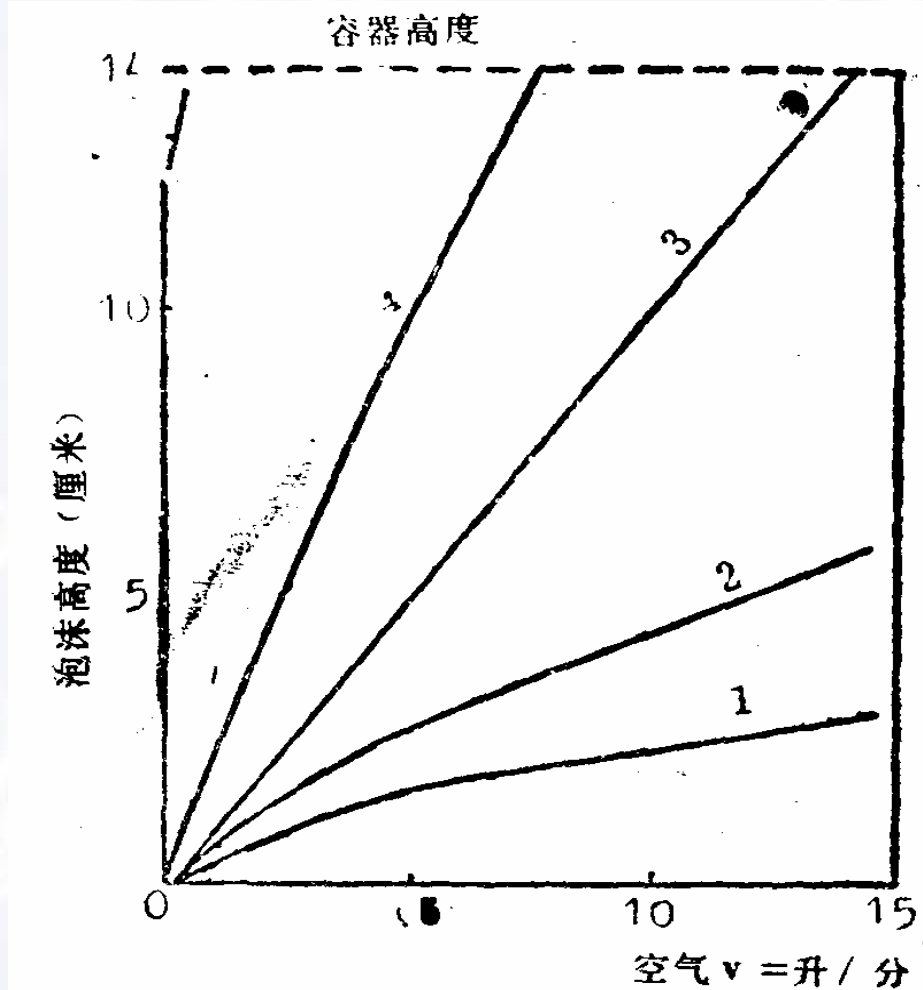


5, 影响泡沫稳定的因素

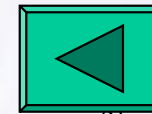
- ❖ 通气与搅拌的强度
- ❖ 培养基的配比及原材料组成
- ❖ 培养基的破坏程度
- ❖ 接种量的大小
- ❖ 培养液本身性质的变化
- ❖ 培养基灭菌的方法和操作
- ❖ 染菌



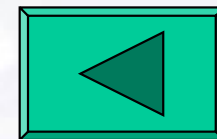
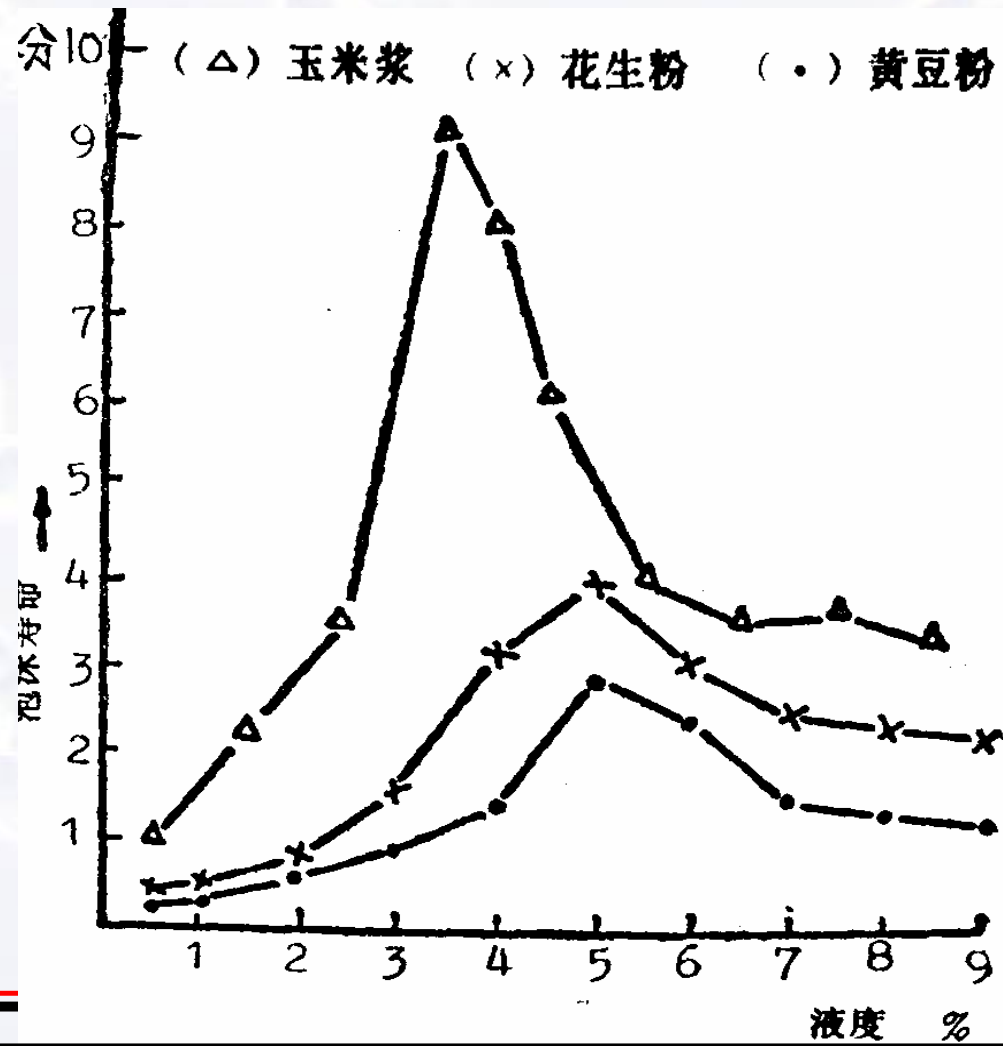
不同搅拌速度和通气量对泡沫影响



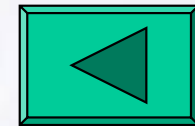
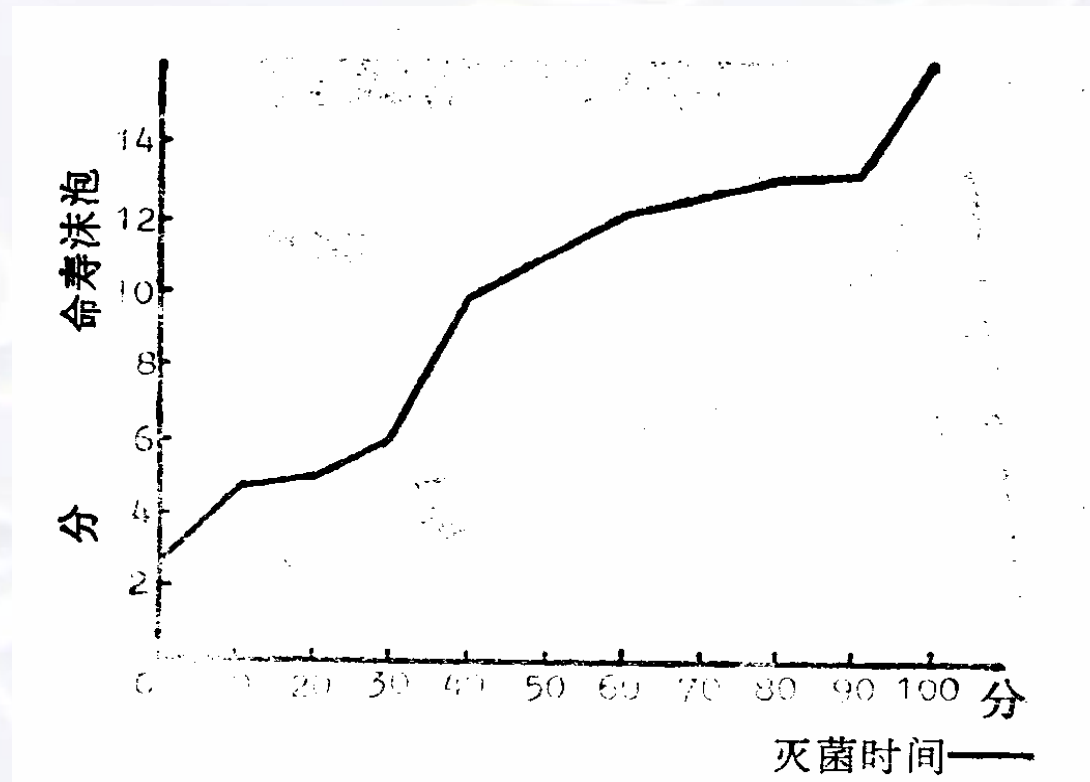
1. 300转 / 分 2. 400转 / 分 3. 500转 / 分 4. 600转 / 分



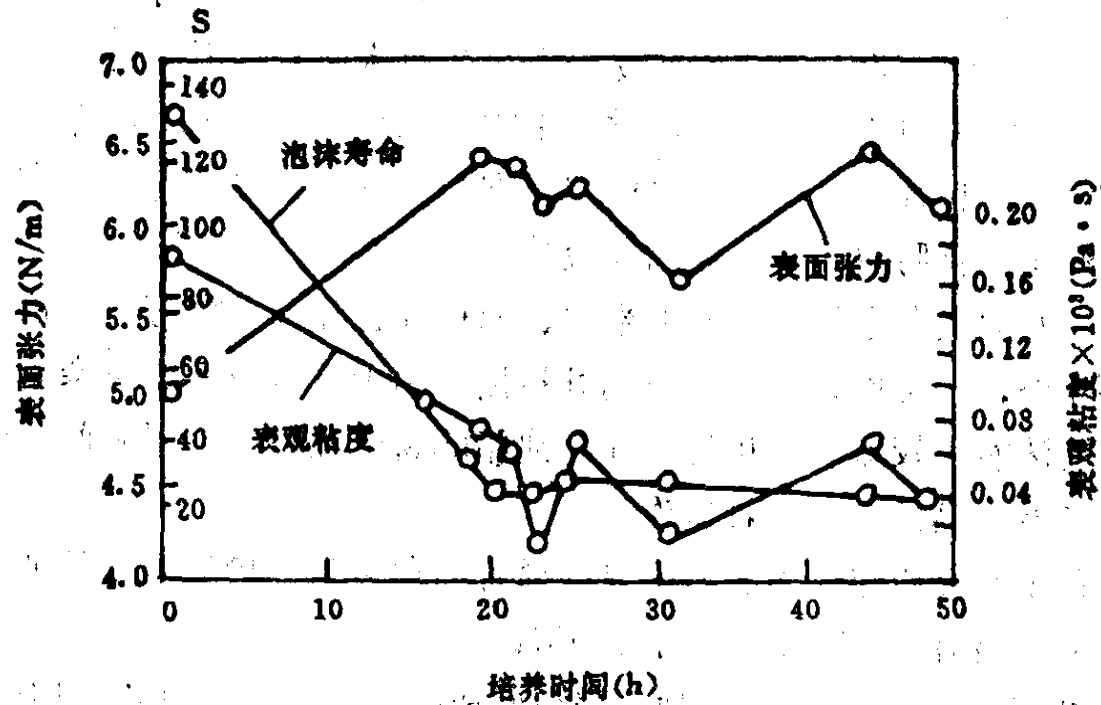
不同浓度蛋白质原料的起泡作用



灭菌时间对泡沫稳定性的影响



6, 发酵过程泡沫的变化



霉菌发酵过程中液体性质与泡沫的关系

7, 发酵过程泡沫控制的方法

- 物理消沫法
- 化学消沫法

物理消泡法

原 理

靠机械力引起强烈振动或者压力变化，促使泡沫破裂，或借机械力将排出气体中的液体加以分离回收。

方 法

罐内消沫法：

罐外消沫法：

优 点

不需要引进外界物质、节省原材料、减少污染机会

缺 点

不能从根本上消除引起稳定泡沫的因素。

化学消泡法

机 理

- 当泡沫的表层存在着由极性的表面活性物质形成双电层时，可以加入另一种具有相反电荷的表面活性剂，以降低泡沫的机械强度或加入某些具有强极性的物质与发泡剂争夺液膜上的空间，降低液膜强度，使泡沫破裂。
- 当泡沫的液膜具有较大的表面粘度时，可以加入某些分子内聚力较小的物质，以降低液膜的表面粘度，使液膜的液体流失，导致泡沫破裂。

选择消泡剂的依据

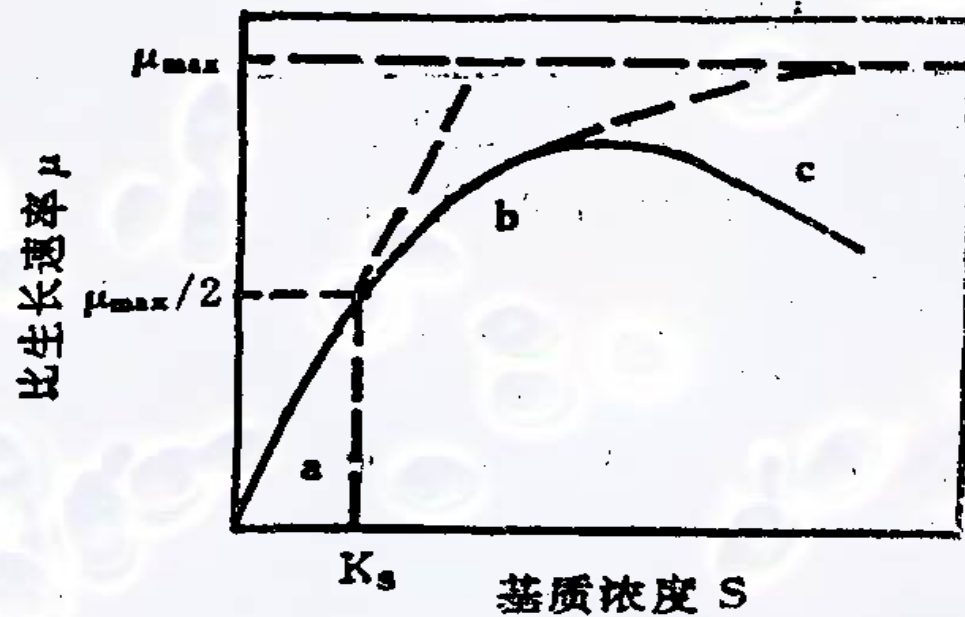
- 对发酵过程无毒，对人、畜无害和不影响酶的生物合成。
- 消泡作用迅速，效果高和持久性能好
- 能耐高压蒸气灭菌而不变性，在灭菌温库下对设备无腐蚀性或不形成腐蚀性产物。
- 不影响以后的提取过程。
- 消沫剂的来源多，价格低，添加装置简单。
- 不干扰分析系统，如溶解氧、pH测定仪的探头。
- 最好还能做到不影响氧的传递。

消泡剂的种类和性能

- 天然油脂：常用的有玉米油、米糠油、豆油、棉子油、鱼油及猪油等。
- 聚醚类：在生产上应用较多的是聚氧丙烯甘油和聚氧乙烯氧丙烯甘油(又称泡敌)。
- 高级醇类 十八醇是较常用的一种，可以单独或与载体一起使用。据报导，它与冷榨猪油一起控制青男素发酵的泡沫，效果较好。聚二醇具有消沫效果持久的特点，尤其适用于霉菌发酵。
- 硅酮类 硅酮类消沫剂主要是聚二甲基硅氧烷及其衍生物。

六、补料控制

1, 基质浓度对发酵的影响



$$a: \mu = \frac{\mu_{max}}{K_s} \cdot S, \quad b: \mu = \mu_{max} \frac{S}{K_s + S}$$

$$c: \mu = \frac{\mu_{max} K_i}{K_i + S}$$

2, 补料控制目的

- ❖ 解除基质过浓的抑制
- ❖ 解除产物的反馈抑制
- ❖ 解除葡萄糖分解代谢阻遏效应

3、补料的内容

- ▶ 补充微生物能源和碳源的需要。
- ▶ 补充菌体所需要的氮源。
- ▶ 补充微量元素或无机盐。

4、补料的原则

- ▶ 控制微生物的中间代谢，使之向着有利于产物积累的方向发展。
- ▶ 为实现这一目标，在中间补料控制时，必须选择恰当的反馈控制参数和补料速率。

5、补料控制的策略

- 大多数补料分批发酵均补加生长限制性基质
 - 以经验数据或预测数据控制流加；
 - 以pH、尾气、溶氧、产物浓度等参数间接控制流加；
 - 以物料平衡方程，通过传感器在线测定的一些参数计算限制性基质的浓度，间接控制流加；
 - 用传感器直接测定限制性基质的浓度，直接控制流加。

6、补料控制参数的选择

- 为了有效地进行中间补料，必须选择恰当的反馈控制参数，以及了解这些参数与微生物代谢、菌体生长、基质利用以及产物形成之间的关系。采用最优的补料程序也是依赖于比生长曲线形态、产物生成速率及发酵的初始条件等情况。因此，欲建立分批补料培养的数学模型及选择最佳控制程序都必须充分了解微生物在发酵过程中的代谢规律及对环境条件的要求。

- 例如，在谷氨酸发酵过程中的某阶段，生产菌的摄氧率和基质消耗速率之间存在着线性关系。

$$K = \frac{OUR}{QsX} = \frac{\text{耗氧量 (mmolO}_2\text{)}}{\text{糖耗 (mmol)}}$$

连续补料和分批补料发酵的比较

项 目	连 续 法	分 批 法
批 数	4	4
加糖总量, g	190±3	189±4
残糖, g/L (以最终体积计)	23.3	24.6
发酵时间, h	23.0	27
最终谷氨酸浓度	95.2	90.8
糖转化率, g/g	0.504	0.479

7、补料速率的确定

- 优化补料速率也是补料控制中十分重要的一环，因为养分和前体需要维持适当的浓度，而它们则以不同的速率被消耗，所以补料速率要根据微生物对营养等的消耗速率及所设定的培养液中最低维持浓度而定。
- 例如，用连续培养方法测定了在不同比生长速率下青霉素生产菌产黄青霉的碳、氮、氧、磷、硫和乙酸盐及菌最适生长所需的各种基质的补料速率。

养分或前体	比吸收速率	所需补料速率
己糖	0.33mmol/g·h 1.6(最适)mmol/g·h	13.2mmol/L·h 64.0mmol/L·h
NH ₃	2.0mg/g·h	80mg/L·h
PO ₄ ³⁻	0.6mg/g·h	24mg/g·h
SO ₄ ²⁻	2.8mg/g·h	112.0mg/g·h
苯乙酸	1.8mg/g·h	72.0mg/g·h

七、厌氧发酵工艺要求与控制

- 发酵工业中，由于使用微生物不同，其代谢规律不一样，因而有的是需氧发酵，有的是厌氧发酵，也称静置培养。例如：酒精、啤酒、丙酮、丁醇及乳酸等均是属于厌氧发酵产品，其发酵设备因不需供氧，所以设备和工艺都较好氧发酵简单。
 - 固态发酵（如白酒）；
 - 液态发酵（如酒精、丙酮、丁醇、乳酸、啤酒）。

1、 固态发酵

- 固态发酵主要是一些传统发酵工艺。例如生产大曲酒、麸曲酒就是典型的固态发酵。固态发酵中无菌要求不高，整个生产过程都是敞口操作。除原料蒸煮过程能起到灭菌作用外，空气、水、工具和场所，窖池等都存在大量的多种多样的微生物，并把这些微生物带到发酵原料中，它们与曲中的微生物一起协同作用，生产出丰富的香味物质，因此固体厌氧发酵是多菌种的混合发酵。
- 发酵过程中，一般都采用比较低的温度，让糖化作用和发酵作用同时进行；即采用边糖化边发酵的工艺。当采用20~30℃低温时，糖化酶作用缓慢，故糖化时间要延长。

固态发酵的温度控制

- 固态发酵的温度控制靠控制进窖温度和淀粉含量来解决。因在窖内部没有冷却或加热装置，这样只好把进窖温度控制得比较低(18~22℃)。糖化进行缓慢，发酵也就缓慢，窖内升温慢些，酵母就不易衰老，发酵率就升高。进窖时原料淀粉含量不能太高，在发酵过程中一部分能量被放出，升高了发酵温度，一般发酵过程中，淀粉含量降低1.0%时，酒醅温度实际约上升2℃左右。所以淀粉含量控制在14~16%，随气温的高低不同进行适当地调整。

固体发酵的pH控制

- 一般工厂用酸度表示。酸度来自原料本身，曲和酒醅是最主要的。在发酵过程中酸度增加的原因，主要是杂菌的影响，淀粉浓度过高，糖化快，细菌生长繁殖快，造成酒醅酸度升高，也反过来影响酵母的生长，影响发酵，酸度低又影响糖化速度。因此控制酸度既适宜酵母生长又抑制了细菌生长。一般控制在1.4~2.0的酸度。

水分的控制

- 固体发酵中水份是微生物生长的条件，适当的水份是良好发酵的重要因素。但入窖水分过高，会引起糖化和发酵作用加快，升温过猛，使发酵不彻底；而水分过少，会引起酒醅发干，残余淀粉高，酸度过低，糟不柔软，影响发酵正常进行；一般大曲酒入窖水分为53~57%，小曲57~62%，因原料而异，冬天与夏天也不同。另一方面为了调整淀粉浓度，增加疏松性，调节酸度，以利于微生物的生长繁殖，保持水在固态发酵时常常加入填充料、如谷壳等。

2、液态发酵

- 厌氧发酵在液体状态下进行，液体发酵速度快，发酵完全，发酵周期短，原料利用率高，而且适于大规模机械化、连续化、自动化生产。
- 液态厌氧发酵对无菌要求较高，因此培养基必须经过灭菌，对发酵容器也要定期灭菌。
- 在发酵过程中对pH、温度进行连续控制，中间分析也与好气发酵相似。

第三节 发酵过程的参数检测

✓ 物理参数

✓ 化学参数

✓ 生物参数

一、物理参数

1, 温度

- ✓ 指发酵整个过程或不同阶段所维持的温度。
- ✓ 温度的高低与下列参数有密切关系
 - 发酵中的酶反应速度
 - 菌体生长速度, 产物合成速度
 - 氧在培养液中的溶解度, 传递速度

2, 压力

- ✓ 发酵罐维持的压力。
- ✓ 罐内维持正压，可防止外界空气中杂菌的侵入，保证纯种培养。
- ✓ 罐压的高低与氧， CO_2 在培养液中的溶解度有关，间接影响菌体代谢。
- ✓ 罐压一般维持在0.2~0.5公斤。

3, 搅拌转速

✓ 是指搅拌器在发酵罐中转动速度。

✓ 搅拌转速大小与发酵液的均匀性和氧在发酵液中的传递速率有关。

发酵罐的容积(L)	搅拌转速范围(r/min)
3	200~2000
10	200~1200
30	150~1000
50	100~800
200	50~400
500	50~300
10000	25~200
50000	25~160

4, 搅拌功率

- ✓ 指搅拌器搅拌时所消耗的功率，常指每立方米发酵液所消耗的功率 (kW/m^3)。
- ✓ 它的大小与溶氧传递系数 K_{La} 有关。

5, 空气流量

- ✓ 指单位时间内单位体积发酵液通入空气的体积。
- ✓ 它的大小与氧的传递和其它控制参数有关。
- ✓ 一般控制在 $0.1 \sim 1.0 \text{vvm}$ 之间

6, 粘度

- ✓ 粘度大小可作为细胞生长或细胞形态的标志之一。
- ✓ 在发酵过程中通常用表观粘度表示。
- ✓ 粘度的大小可改变氧传递的阻力。
- ✓ 粘度的大小可表示相对菌体浓度。

7, 浊度

能及时反映单细胞生长状况。

二、化学参数

1, pH

- ✓ 发酵过程中各种产酸，产碱生化反应的
综合结果，与菌体生长和产物合成有重
要的关系。
- ✓ pH的高低与菌体生长和产物合成有着
重要的关系。

2, 基质浓度

- ✓ 指发酵液中糖, 氮, 磷与重要营养物质的浓度。
- ✓ 基质浓度的变化对产生菌的生长和产物的合成有重要影响, 也是提高代谢产物产量的重要控制手段。

3, 溶解氧 (DO) 浓度

- ✓ 氧是微生物体内一系列细胞色素氧化酶催化产能反应的最终电子受体，也是合成某些产物的基质。
- ✓ 利用DO浓度的变化，可以了解微生物对氧利用的规律，反映发酵的异常情况，是一个重要的控制参数。

4, 氧化还原电位

- ▶ 培养基氧化还原电位是影响微生物生长及其生化活性的因素之一。

5, 产物浓度

是发酵产物产量高低，代谢正常与否的重要参数，也是决定发酵周期长短的根据。

6, 尾气 O_2 浓度和 CO_2 浓度

- ✓ 尾气中 O_2 浓度与生产菌的摄氧率和 K_{La} 有关。
- ✓ 尾气中 CO_2 是产生菌呼吸放出的 CO_2 。
- ✓ 从尾气中 O_2 和 CO_2 浓度的含量可以算出产生菌的摄氧率、呼吸商和发酵罐的供氧能力。从而了解产生菌的呼吸代谢规律。

7, 其它参数

菌体RNA, DNA含量, 以及ATP, ADP,
AMP体系, NAD(P)-NAD(P)H体系。

分别表示菌体生长情况, 能量代谢能力,
生物合成能力。

三、生物参数

1, 菌（丝）体浓度（生物量biomass）

菌体浓度的大小和变化速度对生化反应有影响，特别是对抗生素等次级代谢产物的发酵，菌体浓度与培养液的粘度，DO都有关。

四、间接参数

- 根据发酵液的菌体量和单位时间的菌浓度、溶氧浓度、基质浓度和产物浓度等参数的变化值，可分别计算出菌体的比生长速率、氧的比消耗速率、基质的比消耗速率和产物比生产速率。

1、摄氧率

摄氧率 r : 单位体积培养液每小时所消耗的氧量 (mmol/L.h)

$$r = V(C_{\lambda} - C_{\text{出}}) \frac{1}{W} = Q_{O_2} X$$

V : 空气流量 (L/h)

W : 发酵液体积 (L)

C_{λ} : 空气进口 O_2 浓度

$C_{\text{出}}$: 空气出口 O_2 浓度

2、呼吸强度

呼吸强度 Q_{O_2} : 单位重量的干菌体每小时所消耗的氧量 (mmol/g.h)

$$Q_{O_2} = \frac{r}{X}$$

r : 摄氧率

X : 干菌体浓度

3、呼吸商

呼吸商RQ：发酵过程中氧的消耗比速与二氧化碳生成比速的商

$$RQ = \frac{\text{摩尔}CO_2\text{生成速率 } (Q_{CO_2} \text{ 或} CER)}{\text{摩尔}O_2\text{消耗速率 } (Q_{O_2} \text{ 或} OUR)}$$

物理参数

参数名称	单位	测试方法	意义、主要作用
温度	°C	传感器	维持生长、合成
罐压	Pa	压力表	维持正压、增加溶氧
空气流量	V/V.min	传感器	供氧、排泄废气、提高 K_{La}
搅拌转速	R/min	传感器	物料混合、提高 K_{La}
搅拌功率	KW	传感器	反映搅拌情况、 K_{La}
粘度	Pa.s	粘度计	反映菌的生长、 K_{La}
浊度	透光度	传感器	反映菌的生长情况
泡沫		传感器	反映发酵代谢情况
体积氧传质系数 KLa	1/h	间接计算	反映供氧效率

化学、生物参数

参数名称	单位	测试方法	意义、主要作用
pH		传感器	了解生长和产物合成
基质浓度	g/ml	取样	了解生长和产物合成
溶解氧浓度	ppm	传感器	反映氧供需情况
氧化还原电位	mV	传感器	反映菌的代谢情况
产物浓度	g/ml	取样	产物合成情况
尾气氧浓度	Pa	传感器	了解耗氧情况
尾气CO ₂ 浓度	%	传感器	了解菌的呼吸情况
菌体浓度	G(DCW)/ml	取样	了解生长情况
RNA、DNA含量	Mg(DCW)/g	取样	了解生长情况
ATP、ADP、AMP	Mg(DCW)/g	取样	了解能量代谢活力
NADH含量	Mg(DCW)/g	取样	了解菌的合成能力
摄氧率	gO ₂ /L.h	间接计算	了解耗氧速率
呼吸强度	gO ₂ /g菌.h	间接计算	了解比耗氧速率
呼吸商		间接计算	了解菌的代谢途径
比生长速率	1/h	间接计算	了解生长

125

- 目前较常测定的参数有温度、罐压、空气流量、搅拌转速、pH、溶氧、基质浓度、菌体浓度(干重、离心压缩细胞体积%)等。
- 不常测定的参数有氧化还原电位、粘度、尾气中的O₂和CO₂含量等。
- 参数测定方法有：
 - 在线测定
 - 取样测定（离线测定）

■ 参数在线测定的优点及问题

优点：

✓ 主要是及时、省力，且可从繁琐操作中解脱出来，便于用计算机控制。

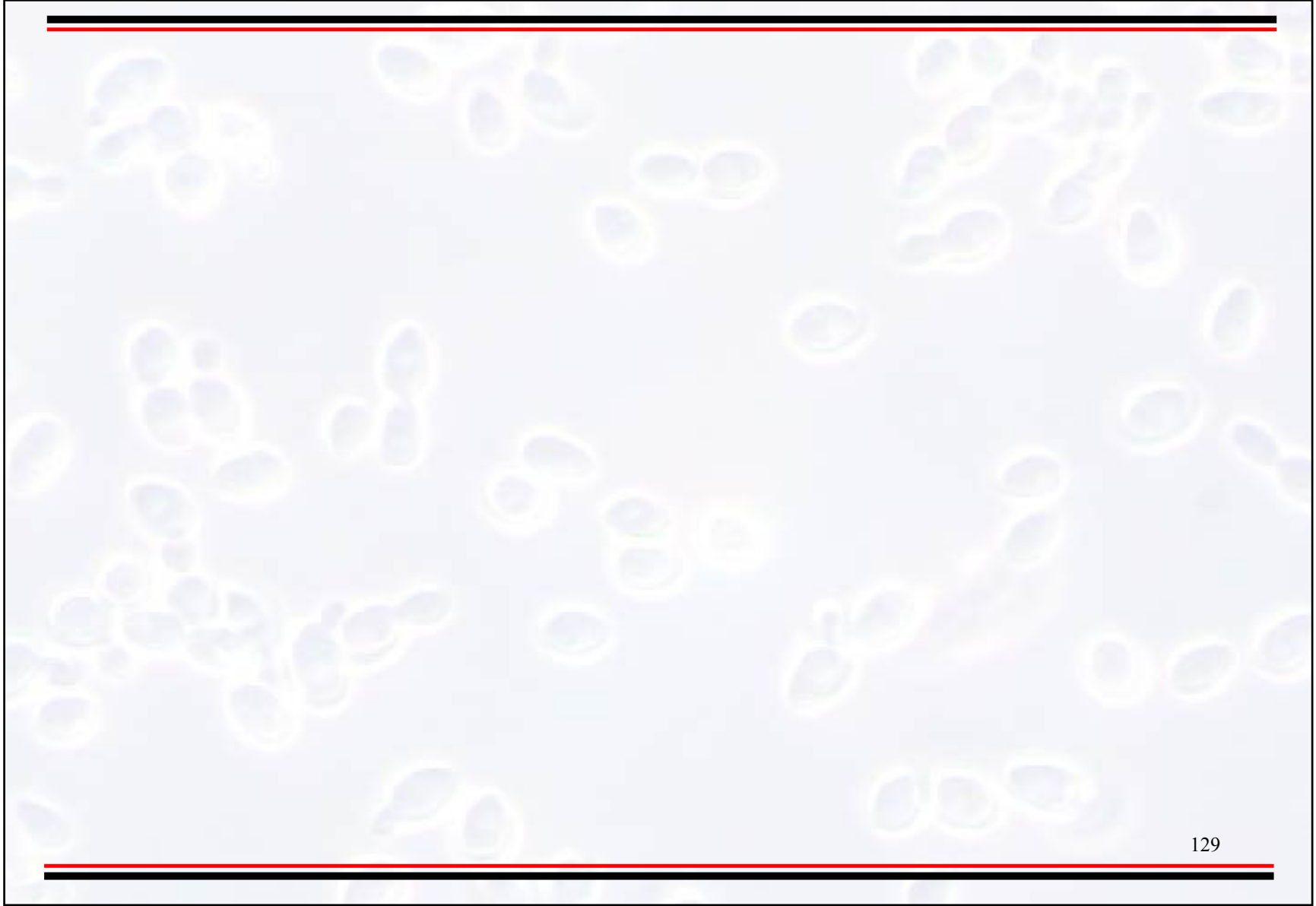
问题：

✓ 发酵液的性质复杂。一般培养液中同时存在三相，即液、气、固体不溶物或油；

✓ 发酵要求纯种培养，培养基和有关设备需用高压蒸汽灭菌。因而要求使用的传感器能耐蒸汽灭菌，这给各种传感器的制造带来很大的困难。

■ 发酵工业用的传感器应满足的要求

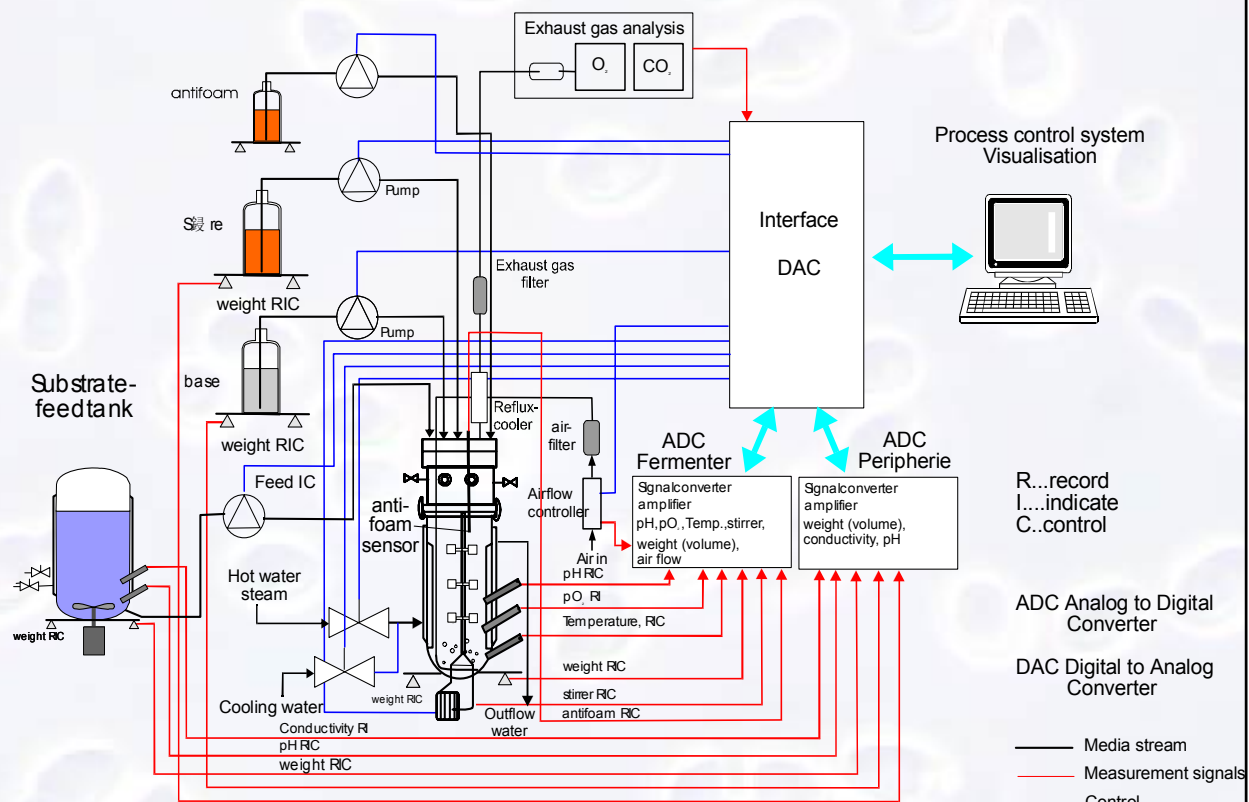
- 1) 传感器能经受高压蒸汽灭菌；
- 2) 传感器及其二次仪表具有长期稳定性；
- 3) 最好能在过程中随时校正；
- 4) 探头材料不易老化，使用寿命长；
- 5) 探头安装使用和维修方便；
- 6) 解决探头敏感部位被物料（反应液）粘住、堵塞问题；
- 7) 价格合理，便于推广应用。



第四节 发酵过程自动控制系统

Fermentation process monitoring and control

- ✓ 传感器
- ✓ 变送器
- ✓ 执行机构
- ✓ 转换器
- ✓ 过程接口
- ✓ 监控计算机



发酵自控系统的硬件组成

必须解决的五个问题:

- (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—发酵间的接口技术

发酵过程参数

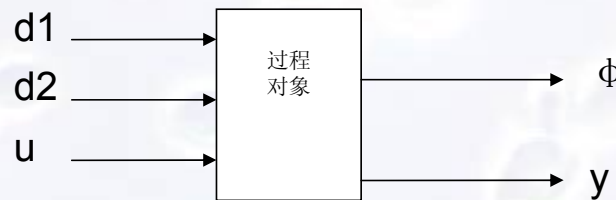
- 物理参数：温度，压力，搅拌转速，空气流量，粘度，浊度
- 化学参数：pH，基质浓度，溶氧，氧化还原电位，产物浓度，尾气CO₂和O₂，其他：ATP，RNA，DNA，NAD (P)
- 生物参数：细胞浓度
- 间接参数：摄氧速率，呼吸强度，呼吸商等。

软测量模型的应用

软测量模型的描述

- 软测量就是采用过程中比较容易测量的变量，构造推断估计器来推算出难以测量或根本无法测量的被检测量的一种间接测量方法。软测量模型主要反映了在线可测参数与不可直接测量参数之间的关系。
- 图中的 y 表示难测的主导变量； $d1$ 表示可测的干扰变量； $d2$ 表示不可测的干扰变量； u 表示可测的控制变量； ϕ 表示可测的被控变量。难测的主导变量的估计值可以表示为

$$y=f(d1,d2,u)$$



建立软测量模型的方法确定

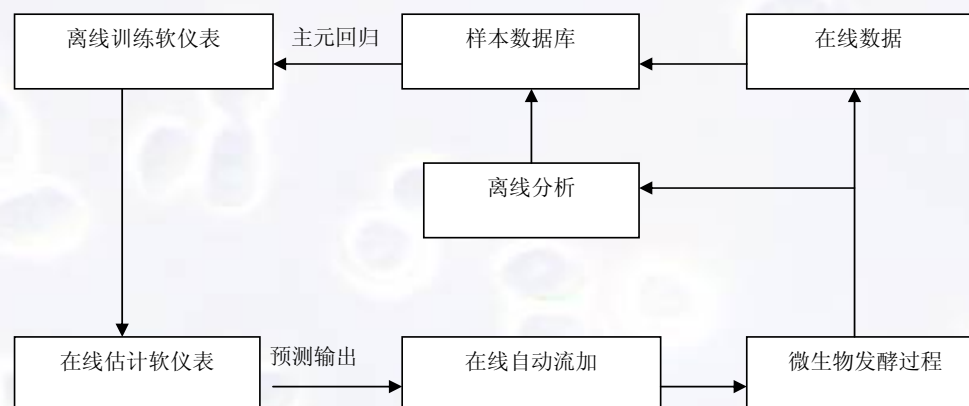
- 目前，建立软测量模型的方法很多，根据人们对过程的认识程度主要可分为机理建模方法(白箱模型)和基于数据驱动的建模方法(黑箱模型)
- **1机理建模方法**
- 机理建模方法建立在对工艺机理深刻认识的基础上，通过列写和求解宏观或微观的质量平衡、能量平衡、动量平衡方程以及反应动力学方程等来确定难测的上导变量和易测的辅助变量之间的数学关系。
- **2基于数据驱动的建模方法**
- 数据驱动方法即是一种从“海量”数据中挖掘出过程有用信息，构建主导变量与辅助变量之间的数学关系。由于该方法仅对采集到的数据进行处理，不需要过程内部状态或结构的显示表示，可实现性强，且代价较低，因此数据驱动方法得到了学术界和工业界的广泛重视。

建模常见方法

- 神经网络：它无需具备对象的先验知识，在解决高度非线性和严重不确定性系统控制方面其有十分巨大的潜力。然而，在实际应用中，离线计算量大，实现复杂，其各参数训练与初始值有关系，随机性很大。
- 主元回归法：寻找一组新变量来代替原变量，且新变量之间互不相关。由于忽略掉了次要的主元，还起到了抑制测量噪声对模型系数影响的作用。从而得到符合实际情况的模型。

微生物发酵过程中软测量技术的实现

基于主元回归方法的软仪表实现框架图



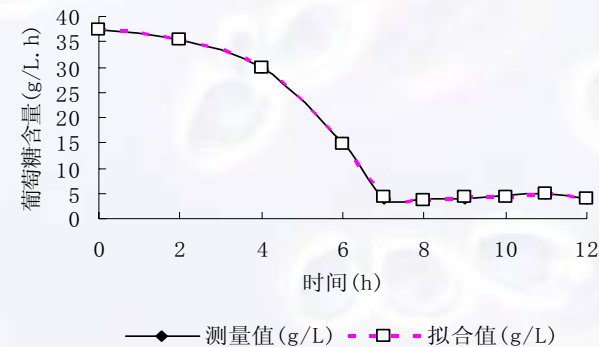
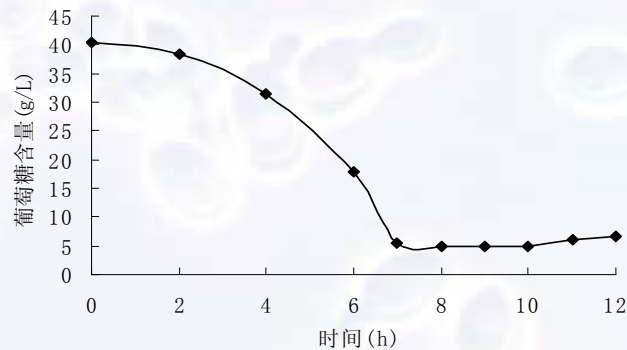
在线数据与离线数据

- 在实际的发酵过程中，对能够在线测量的变量（反应器温度，搅拌器马达转速PH值和DO浓度，通风量）1 min便可以自动记录一次。而要离线分析的变量（生物量，底物浓度，产物浓度等）由于受测量方法和人为操作熟练程度的限制，一般需要间隔较长的时间才能测量一次。
- 离线数据采集量远远小于在线数据量，没有足够的离线数据与相应的在线数据对应，而人工无法做到相当紧密的取样，这就给建模过程带来很大的困难。

。

在线数据与离线数据的匹配

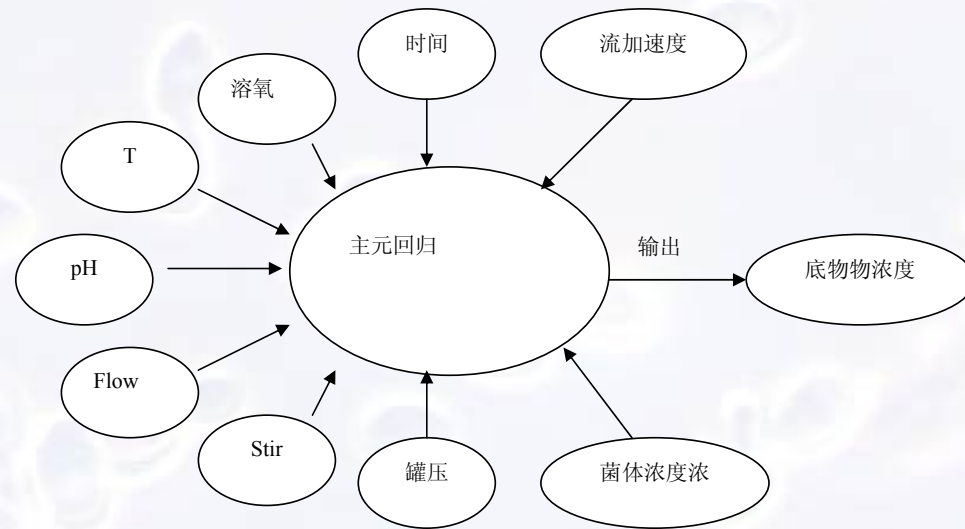
- 将离线数据中葡萄糖与时间变化的曲线进行优化拟合，找到其最优的拟合公式。拟合后的优化公式可以较好的反应真实的发酵情况。这样我便可以通过时间与葡萄糖含量的拟合公式，计算出任意时间里的葡萄糖含量，从而弥补了葡萄糖不能随时取样的缺点，通过拟合曲线将离线数据同在线数据一一对应起来，为模型的建立打下基础。



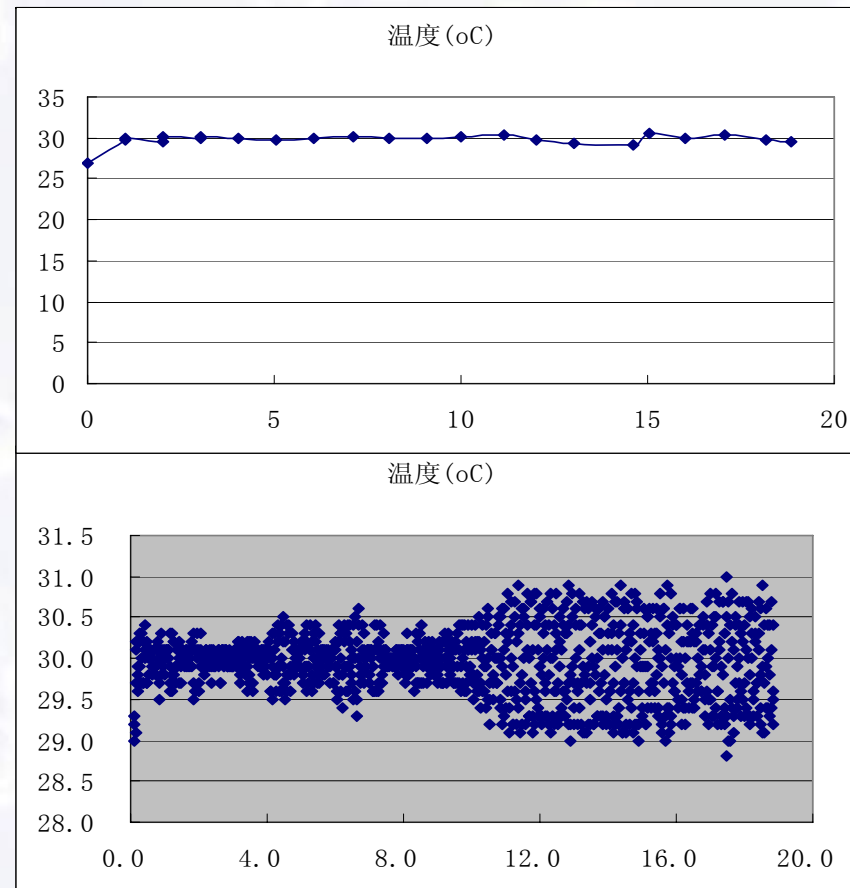
辅助变量的选择

- 辅助变量的选择对于软测量技术是至关重要的，确定结果的好坏往往大大影响软测量实施的效果。软测量仪表中辅助变量的选取包括变量类型的选择、变量数目的选择以及检测点位置的选择三个方面，它们是相互关联、相互影响的。根据输入变量选择的原则——输入变量必须选择对输出影响大且能够检测，同时，考虑到酵母生长的特点，故需对发酵过程中数据进行筛选，选出与葡萄糖浓度相关且适合的神经网络输入变量。因此，最好的办法是将各个可能的输入变量放入网络进行训练(如图所示)，然后比较含有和不含该输入变量的两个模型，对其效果进行比较。

输出变量进行模型训练的框架图

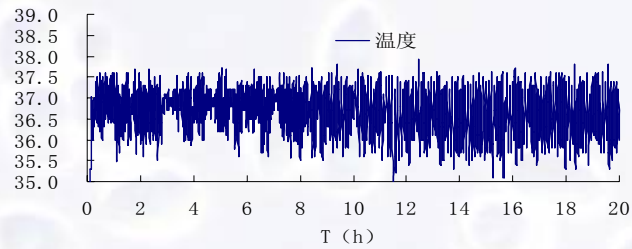


发酵温度恒温控制过程

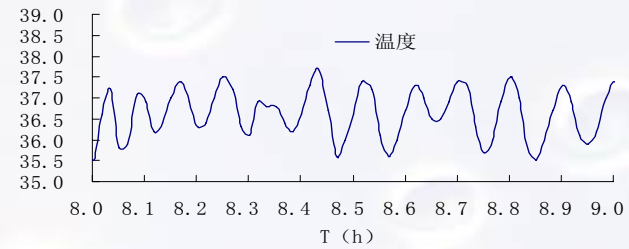


温度恒温控制过程（续）

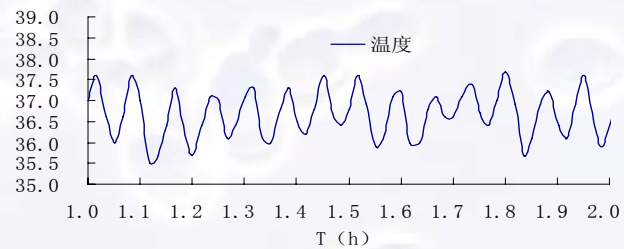
温度



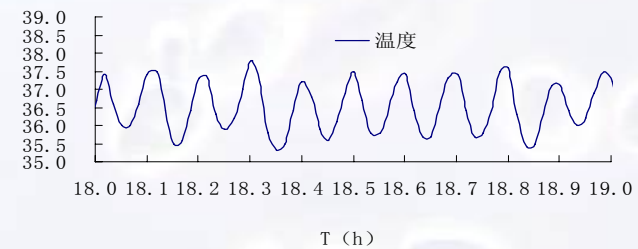
温度



温度



温度

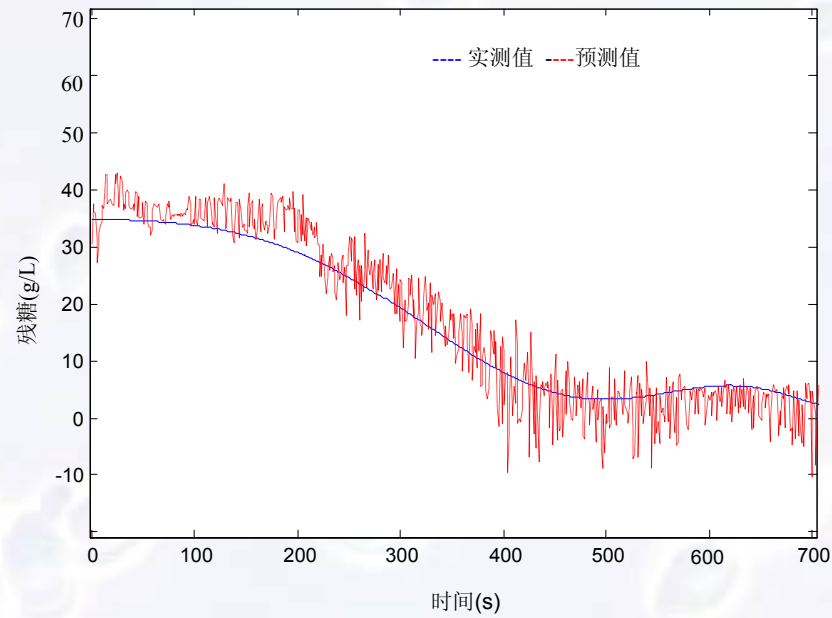


软测量模型的建立

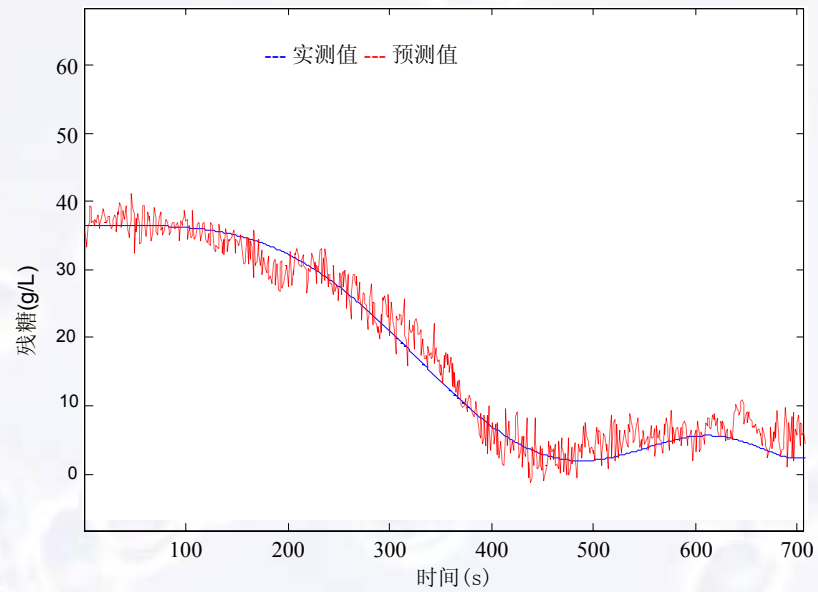
通过在线参数来预测发酵过程中葡萄糖的浓度

- 用来作为网络输入的在线变量：通风量、温度、溶氧、搅拌转速、pH、时间。
- 通过将各个可能的输入变量放入网络进行训练，完成建模，并对各个模型预测效果进行比较，确定出预测效果最好的软测量模型。

以时间、温度、溶氧、搅拌转速、pH为输入参数的 残糖模拟曲线



以时间、温度、溶氧为输入参的残糖模拟曲线



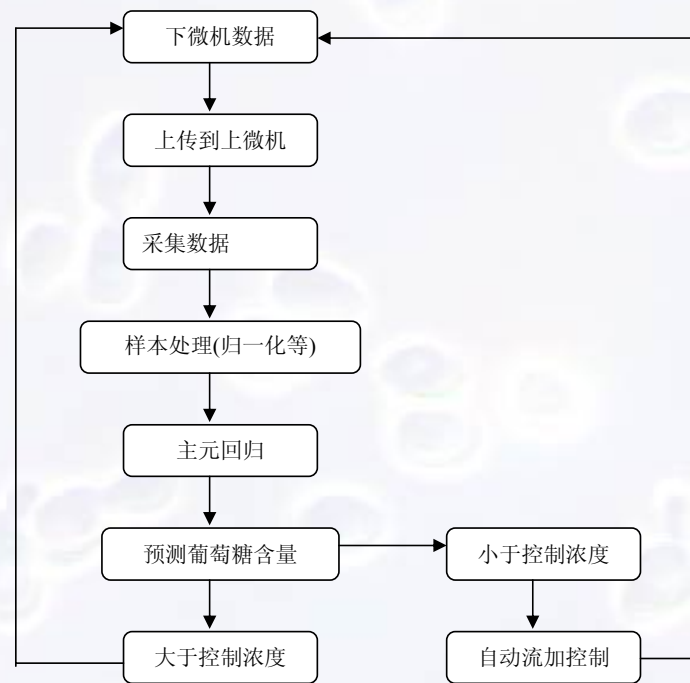
- 从模拟实验测试的曲线图中可以看出采用不同的输入参数对酒精发酵过程进行建模，实验值和模型预测值之间均有一定的误差，但发酵过程参数的总体走势基本一致，采用时间、温度、溶氧为输入参数建立的软测量模型其预测效果最好。

训练好的软测量模型可以实时预测难以在线测量的关键生物变量，并且精度较高，从而解决了工业生产中存在的试验数据滞后的情况,加快系统响应速度，可以有效地监控发酵过程，从而可以用来指导生产实践，为工业生产的自动化控制建立了一定的基础。

5 基于软测量的在线自动补料控制的实现

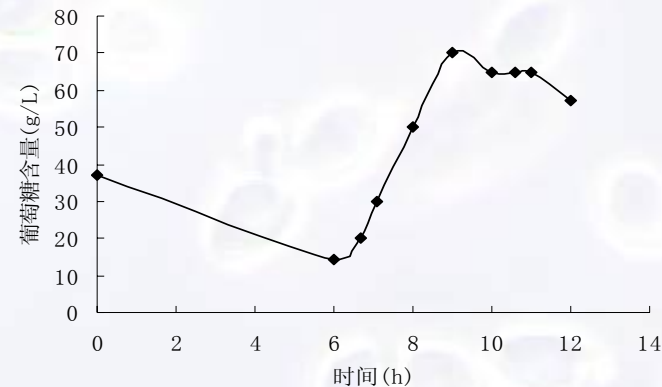


5.2 软测量控制补料流加模块



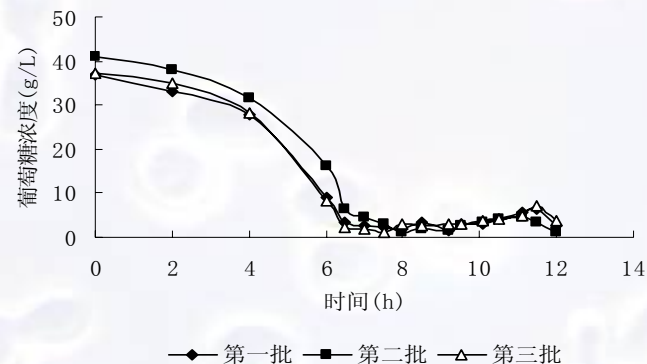
6实验验证残糖反馈自动流加结果

- 初始糖浓度为40g/L左右，将对葡萄糖浓度的控制设定为7g/L，每10分钟预测一次，当预测葡萄糖的浓度高于7g/L时，不流加；当葡萄糖的浓度低于7g/L开始流加，将其补至7g/L，保持发酵液中葡萄糖的浓度在0~10g/L之间。
- 如图所示，发酵过程中预测值偏小，流加葡萄糖量过多，葡萄糖浓度高于所要控制的浓度。



流加模型的校正

- 在流加模型中，加入各个时间段的葡萄糖的消耗速率来校正葡萄糖的流加量，使流加量尽可能准确。相同时间段不同批次的菌体对葡萄糖消耗速率是在一个范围内波动。以各个时间段内最大和最小的葡萄糖消耗速率作为控制流加的上限和下限。如果经预测后自动计算出的流加葡萄糖的体积大于最大糖耗速率，则按最大糖耗速率计算出的流加体积进行流加，反之，亦然。



通过自动流加软件基本上可以将每批发酵过程中葡萄糖的浓度控制在0~10g/L之间，证明了该软件可以较好控制实际的发酵过程，具有较好的应用价值，尤其是对一些需要将底物浓度控制在一个特定范围内的发酵过程，使发酵始终处于较优的条件下，同时也节省了大量的人力和物力。

第五节 发酵动力学(fermentation kinetics)

- 反应动力学：研究反应速度变化规律的学科。
- 发酵动力学：研究各种发酵过程变量在活细胞的作用下变化的规律，以及各种发酵条件对这些变量变化速度的影响。并以数学，工程学的原理，定量描述。

目的

- ✓ 通过动力学研究，优化发酵的工艺条件及调控方式；（研究各种物理，化学因素的影响，为调控提供依据）
- ✓ 建立反应过程的动力学模型来模拟最适当的工艺流程和工艺参数，预测反应的趋势；
- ✓ 控制发酵过程，甚至用计算机来进行控制。

■ 发酵动力学研究内容

发酵动力学是以化学热力学（研究反应方向）和化学动力学（研究反应速度）为基础，对发酵过程的物质变化进行描述

具体内容

1. 微生物生长，死亡动力学；
2. 基质消耗动力学；
3. 氧消耗动力学；
4. CO_2 生成动力学；
5. 产物合成和降解动力学；
6. 代谢热生成动力学。

■ 研究方法

- 宏观处理法
 - 结构动力学模型（通过研究微观反应机制建立）
 - 非结构动力学模型（不考虑微观反应机制，只考虑宏观变量之间的关系）
- 质量平衡法（根据质量守恒定律）

物质在系统中的积累速度=物质进入系统速度+物质在系统中生成的速度-物质在系统中排除的速度-物质在系统中消耗的速度

一、发酵过程的速度

1. 发酵动力学涉及的常规参数

符号	参数	测量方法
X	生物量	细胞干重, 浊度, 细胞数
S	底物	酶法分析, 化学法, 色谱法
P	产物	酶法分析、HPLC 或特殊方法
O	氧	P_{O_2} —专用电极分析
C	二氧化碳	P_{CO_2} —专用电极分析
H_v	发酵热	温度、热平衡

1. 发酵过程的速度概念

变量	动力学参数	物质传递	热传递
反应速度	定义式 $r_i = \pm \frac{dc_i}{dt}$ 包括 $r_x, r_s, r_o, r_p, r_c, r_{Hv}$	$n_i = \pm \frac{dc_i}{dt}$	$q = \frac{dH_v}{dt}$
	单位 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$	$\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$	$\text{kJ} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$
比反应速率	定义式 $\frac{dc_i}{dt} \cdot \frac{1}{x}$ 包括 $\mu, q_s, q_o, q_p, q_c, q_{Hv}$		
	单位 h^{-1}		
速度常数	定义式 $k = \frac{r_i}{(c_i)^n}$ 包括 k_r, k_p, k_d	k_{Tr}, k_{L1}, k_{L2} k_s, k_{CO_2}, k_g	k_{Hv}

速度

菌体生长速度为： $r_x = \frac{dx}{dt}$

氧和底物利用速度为：

$$r_s = -\frac{ds}{dt} \quad r_o = -\frac{d_o}{dt}$$

P、C和 H_v 生成速度为

$$r_p = \frac{dp}{dt} \quad r_c = \frac{dc}{dt} \quad r_{Hv} = \frac{dHv}{dt}$$

比速率

细胞生长的比速率为 μ :
$$\mu = \frac{1}{x} \cdot \frac{dx}{dt}$$

底物消耗的比速率为 q_s :
$$q_s = \frac{1}{x} \cdot \frac{ds}{dt}$$

产物形成的比速率为 q_p :
$$q_p = \frac{1}{x} \cdot \frac{dp}{dt}$$

比速率

氧消耗的比速率为 q_o :

$$q_o = \frac{1}{x} \cdot \frac{do}{dt}$$

二氧化碳生成的比速率为 q_c :

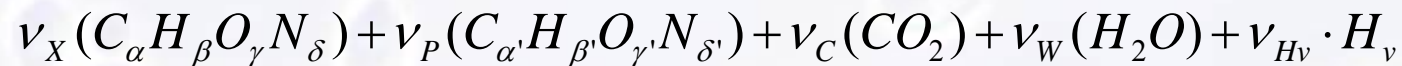
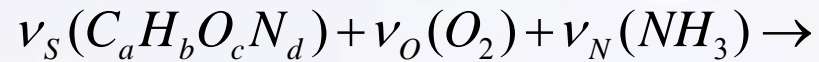
$$q_c = \frac{1}{x} \cdot \frac{dc}{dt}$$

发酵热生成的比速率:

$$q_{H_V} = \frac{1}{x} \cdot \frac{dH_V}{dt}$$

二、化学计量学(stoichiometry)

1、化学计量方程



$C_aH_bO_cN_d$ 表示通用化了的碳源

$C_\alpha H_\beta O_\gamma N_\delta$ 根据元素分析得出的细胞组成

$C_{\alpha'}H_{\beta'}O_{\gamma'}N_{\delta'}$ 表示产物

2、产率系数(yield coefficients)

(1) 宏观产率系数

- 宏观产率系数(或称得率系数) $Y_{i/j}$ 是化学计量学中一种非常重要的参数,常用于对碳源等底物形成菌体或产物的潜力进行评价,其中*i*表示菌体或产物, *j*表示底物
- 例如, 菌体对底物的产率系数可表示为:

$$Y_{x/s} = -\frac{\Delta X}{\Delta S} = \frac{X_t - X_0}{S_0 - S_t} \approx \frac{dx/dt}{ds/dt} = -\frac{r_x}{r_s} = \frac{dx}{ds}$$

生物反应过程中宏观产率系数的定义总览

产率系数	组分间的反应或关系	定义
$Y_{X/S}$	$S \rightarrow X$	$Y_{X/S} = -r_X/r_S$
$Y_{X/O}$	$O_2 \rightarrow X$	$Y_{X/O} = -r_X/r_{O_2}$
$Y_{P/S}$	$S \rightarrow P$	$Y_{P/S} = -r_P/r_S$
$Y_{C/S}$	$S \rightarrow CO_2$	$Y_{C/S} = -r_C/r_S$
$Y_{P/O}$	$O_2 \rightarrow P$	$Y_{P/O} = -r_P/r_{O_2}$
$Y_{Hv/S}$	$S \rightarrow Hv$	$Y_{Hv/S} = -r_{Hv}/r_S$
$Y_{C/O}$	$O_2 \rightarrow CO_2$	$Y_{C/O} = -r_C/r_{O_2}$
$Y_{Hv/O}$	$O_2 \rightarrow Hv$	$Y_{Hv/O} = -r_{Hv}/r_{O_2}$

有时，以摩尔为单位表示产率系数更有利：

$$Y_S^C = \frac{\text{细胞形成的碳摩尔数}}{\text{底物消耗的摩尔数}}$$

- 相似的概念可用于表达重要的常数：

$$Y_{ATP}^C = \frac{\text{细胞形成的碳摩尔数}}{\text{ATP形成的摩尔数}}$$

$$Y_O^C = \frac{\text{细胞形成的碳摩尔数}}{\text{氧消耗的摩尔数}}$$

- Y_O^C 值在实践中对推导元素平衡方程很重要，对与氧化磷酸化有关的理论问题也有重要意义

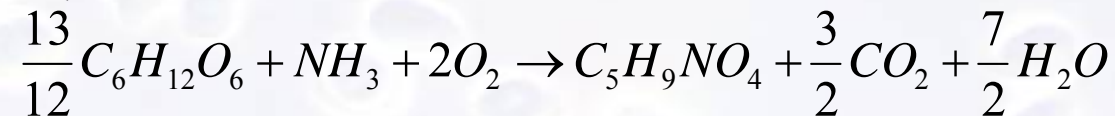
(2) 理论代谢产物产率

- 假设发酵过程中完全没有菌体生成，则 $Y_{P/S}$ 可达理论最高值，称为理论代谢产物产率 $Y_{P/S}^{theor}$
- (a) 根据化学计量关系计算
- 例如，由葡萄糖、氨和氧生成谷氨酸的化学计量方程为：
$$C_6H_{12}O_6 + NH_3 + 1.5O_2 \rightarrow C_5H_9NO_4 + CO_2 + 3H_2O$$
- 依此计算 $Y_{P/S}^{theor} = 147/180 = 0.82$
- 此处没有考虑反应过程中NADH及ATP等辅助底物的生成和消耗

(b) 由生物化学计量关系计算

- 根据由底物生成目标代谢产物的代谢途径，进行代谢过程中有关NAD(P)⁺和ATP等辅底物的物料衡算，结合化学计量关系可求出

- 上式：



- 由该反应式得

$$Y_{P/S}^{theor} = (147 \times 13) / (12 \times 180) = 0.75$$

- 此处α-酮戊二酸的氨基化还原反应中所需要的NADPH由异柠檬酸脱氢反应供给
- !! 用生化计量式时，必须清楚有关的代谢

途径

(3) 实际发酵过程中的产率系数

- 在实际发酵中，产率是变化的，产率取决于下列因素：
- $Y = f(\text{菌株、底物、}\mu、m、S; t、t_m、\text{OTR、C/N, P/O})$
- 式中 m 为混合度， S 为底物浓度， t 为平均滞留时间， t_m 为混合时间，OTR为氧传递速度，C/N为碳氮比，P/O为磷氧比

另外，Papoutsakis和Lim(1981)用碳流分支的概念来解释菌体产率变化的原因：

$$Y_{X/S} = \left(\frac{M_X}{v_X \cdot M_S} \right) \frac{1}{1 + r_1 / r_2}$$

- 其中 r_1 和 r_2 分别为碳源分支代谢途径1和途径2的反应速度， M_X 和 M_S 为菌体和底物的分子量， v_X 是 $S \rightarrow X$ 反应的化学计量系数，可见产率只随 r_2 或 r_1 变化
- 在甲基营养菌中存在两种不同的碳代谢流：同化(r_2)和氧化(r_1)
- 碳源和其它营养物的浓度或温度、pH等培养条件的任何变化都可能引起 r_2 或 r_1 变化
- 这一概念表明，甲基营养菌菌体产率的变化是一个动力学问题，而不是生物合成问题

3、化学计量的数学模型

(Stoichiometric Mathematical models)

- 细胞培养系统非常复杂，在过程中有许多输入和输出。而且和化学反应不同的是，在过程中，催化剂本身是在不断繁殖的；
- 相比较而言，化学反应过程则要简单得多。

一级反应(first order chemical reaction)动力学数学模型

一级反应的方程式



底物消耗动力学

$$\frac{d[S]}{dt} = -k[S] \quad (2)$$

产物生产动力学方程

$$\frac{d[P]}{dt} = n \frac{d[S]}{dt} \quad (3)$$

or

$$\frac{d[P]}{dt} = nk[S] \quad (4)$$

由 (2) 推导底物浓度随时间变化的模型

$$\frac{d[S]}{dt} = -k[S]$$

$$\frac{d[S]}{[S]} = -k dt$$

$$\int_{[S_1]}^{[S_2]} \frac{1}{[S]} d[S] = \int_{t_1}^{t_2} -k dt$$

$$\int_{[S_1]}^{[S_2]} \frac{1}{[S]} d[S] = -k \int_{t_1}^{t_2} dt$$

$$\ln[S_2] - \ln[S_1] = -k(t_2 - t_1)$$

$$\ln[S] \Big|_{[S_1]}^{[S_2]} = -kt \Big|_{t_1}^{t_2}$$

$$\ln \frac{[S_2]}{[S_1]} = -k(t_2 - t_1)$$

$$\frac{[S_2]}{[S_1]} = e^{-k(t_2 - t_1)}$$

$$[S_2] = [S_1] e^{-k(t_2 - t_1)}$$

由 (5) 推导产物浓度随底物浓度变化的模型

$$\begin{array}{ccccc} \frac{d[P]}{dt} = -n \frac{d[S]}{dt} & \longrightarrow & n = \frac{\frac{d[P]}{dt}}{-\frac{d[S]}{dt}} & \longrightarrow & n = \frac{d[P]}{-d[S]} \\ & & & & \downarrow \\ & & & & n = \frac{\Delta[P]}{-\Delta[S]} \\ & \longleftarrow & n = \frac{P_2 - P_1}{-(S_2 - S_1)} & \longleftarrow & \\ P_2 = n(S_1 - S_2) + P_1 & & & & \end{array}$$

计算举例

- A reaction has a rate constant (k) of 0.1 s^{-1} . At $t_1 = 1 \text{ s}$, $[S]$ and $[P]$ is 3 g.l^{-1} and 0 g.l^{-1} respectively. The stoichiometric yield coefficient for the formation of P from S is 2 g.g^{-1} . After 10 s, the $[S]$ and $[P]$ will be :

$$- [S]_2 = 2.10 \text{ g.l}^{-1} ; [P]_2 = 4.2 \text{ g.l}^{-1} ;$$

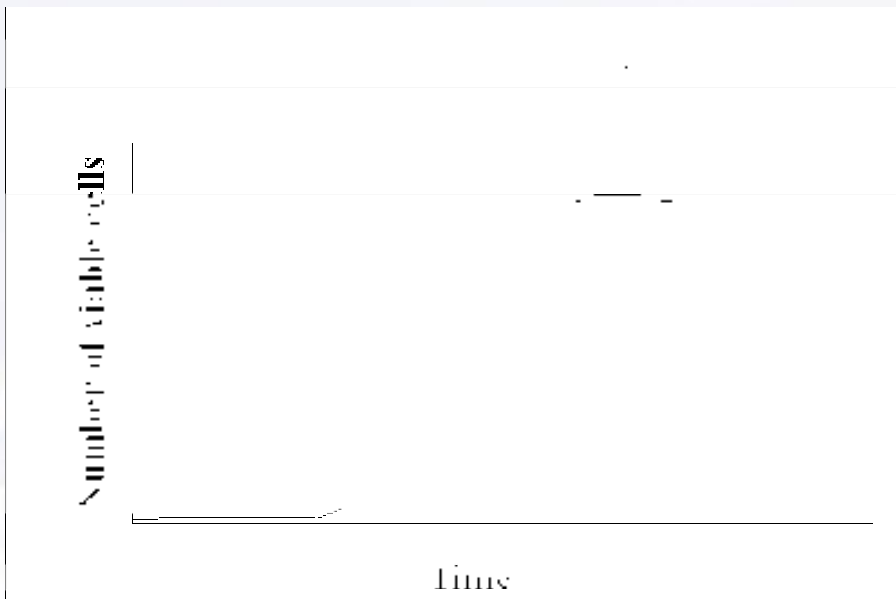
$$- [S]_2 = 1.10 \text{ g.l}^{-1} ; [P]_2 = 3.8 \text{ g.l}^{-1} ;$$

$$- [S]_2 = 1.10 \text{ g.l}^{-1} ; [P]_2 = 4.2 \text{ g.l}^{-1} ;$$

$$- [S]_2 = 2.10 \text{ g.l}^{-1} ; [P]_2 = 3.8 \text{ g.l}^{-1} .$$

三、分批发酵动力学 (kinetics of batch fermentation)

(一) 细胞生长动力学模型



$$\frac{dX}{dt} = \mu X \quad (1)$$

X is the concentration of biomass in the bioreactor. Biomass concentrations are typically expressed in g/l of **Dry weight**.

μ is the specific growth rate.

By splitting the variables in equation (1), we obtain:

$$\frac{1}{X} dX = \mu dt \quad (2)$$

If at time t_0 , the biomass concentration in the bioreactor is represented by X_0 and at time t_1 the biomass concentration is represented by X_1 , equation (2) becomes:

$$\int_{X_0}^{X_1} \frac{1}{X} dX = \int_{t_0}^{t_1} \mu dt \quad (3)$$

Since μ is constant during the exponential phase:

$$\int_{X_0}^{X_1} \frac{1}{X} dX = \mu \int_{t_0}^{t_1} dt \quad (4)$$

Integrating both sides gives:

$$\ln X_1 - \ln X_0 = \mu(t_1 - t_0) \quad (5)$$

$$\ln \frac{X_1}{X_0} = \mu(t_1 - t_0) \quad (6)$$

Finally:

$$X_1 = X_0 e^{\mu(t_1 - t_0)} \quad (7)$$

1. 无抑制作用的细胞生长动力学Monod方程

Monod发现细菌的比生长速率与单一限制性基质(**growth limiting nutrient**)之间存在着一定模式关系（饱和双曲线函数），创建了生化工程中著名的Monod方程（1942年）。

Monod方程(Monod model)

- 温度和pH恒定时，对于某一特定培养基组分的浓度s，Monod方程为：

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{K_s + S}$$

- 式中： μ_{\max} 称为最大比生长速率(h^{-1})， K_s 称为半饱和常数(g/L)
- 底物消耗速率方程对应为：

$$q_s = q_{s,\max} \frac{S}{K_s + S}$$

Monod方程

K_S , 微生物对底物的半饱和常数,与亲和力成反比。

当 $\mu = 1/2 \mu_{\max}$, $S=K_S$

当 $S \ll K_S$, 基质浓度很低时,

$$\mu = \frac{\mu_{\max}}{K_S} S$$

$$dX/dt = \mu X$$

提高 S , 可明显提高 μ , 一级反应。

Monod方程

当 $S \gg K_S$, 基质浓度较高时,

$$\mu \approx \mu_{\max}$$

μ 与 S 无关, 零级反应。

当 $S \rightarrow \infty$ 时,

$$\mu = \mu_{\max}$$

μ_{\max} 是理论上最大的生长潜力。

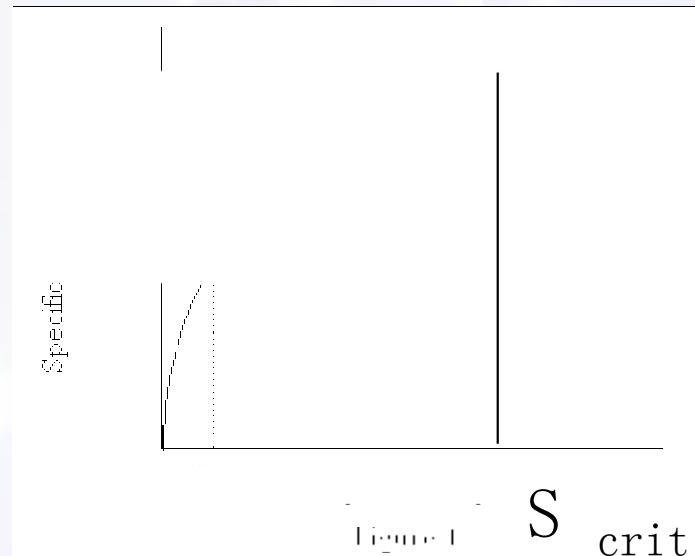
Monod方程

S_{crit} 临界底物浓度，比生长速率 μ 达到最大比生长速率 μ_{max} 时的最低底物浓度。

对于任一营养物质

$S > S_{crit}$ ，为非限制性底物

$S < S_{crit}$ ，为限制性底物



Monod方程

表 9-4 一些微生物的最大比生长率和 Monod 饱和常数

微生物	生长限制基质	μ_m, h	$K_s, /gm^2$
大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)	葡萄糖	0.85	2.0~4.0
大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)	乳糖		20.0
酿酒酵母 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	葡萄糖	0.13	25.0
巴克红曲菌 (<i>Monascus sp.</i>)	葡萄糖	0.13	154.8
木霉菌 (<i>Trichoderma sp.</i>)	葡萄糖	0.13	43.2
产朊假丝酵母 (<i>Candida utilis</i>)	氧	0.44	0.03
产朊假丝酵母 (<i>Candida utilis</i>)	甘油		4.5

Monod方程

- Monod方程中单一限制性底物可以是培养基中任何一种与微生物生长有关的营养物质，只要该基质相对贫乏，就成为限制性生长因子。实际过程中，可能出现多种限制性基质和抑制性物质，影响了Monod方程的适用性。

Monod方程

Monod方程应满足：

- (1) 菌体生长为均衡型非结构生长；
- (2) 培养基中只有一种底物是生长限制性底物；
- (3) 菌体产率系数恒定。

Monod方程与米氏方程的区别与联系

Monod方程是对实验现象的总结

是经验方程 (*empirical model*)

米氏方程是根据酶反应极力推导得出

是机理方程 (*mechanistic model*)

Monod方程与米氏方程的相似性。

Monod方程

Monod方程参数(Monod model parameters)的确定:

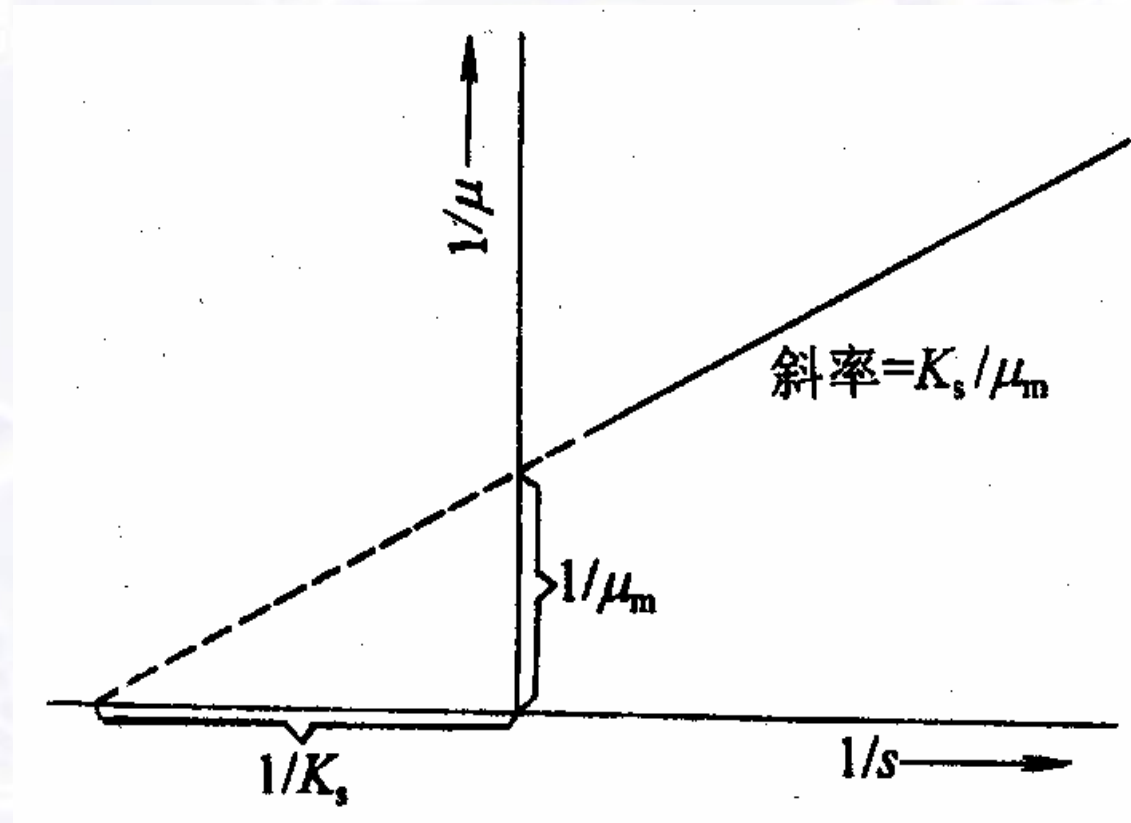
双倒数法, 线性回归, 求得 μ_{\max} 和 K_S

$$\frac{1}{\mu} = \frac{1}{\mu_{\max}} + \frac{K_S}{\mu_{\max}} \cdot \frac{1}{S}$$

以 $1/S$ 对 $1/\mu$ 作图, 为一直线

斜率 = K_S/μ_{\max} , 纵轴截距为 $1/\mu_{\max}$

Monod方程



Monod方程式中 μ_{\max} 与 K_S 的图解求法

Monod方程

或者

$$\frac{S}{\mu} = \frac{K_S}{\mu_{\max}} + \frac{1}{\mu_{\max}} \cdot S$$

以S对S/ μ 作图，为一直线

斜率 $K=1/\mu_{\max}$ ，纵轴截距为 $C=K_S/\mu_{\max}$

μ_{\max}

计算举例

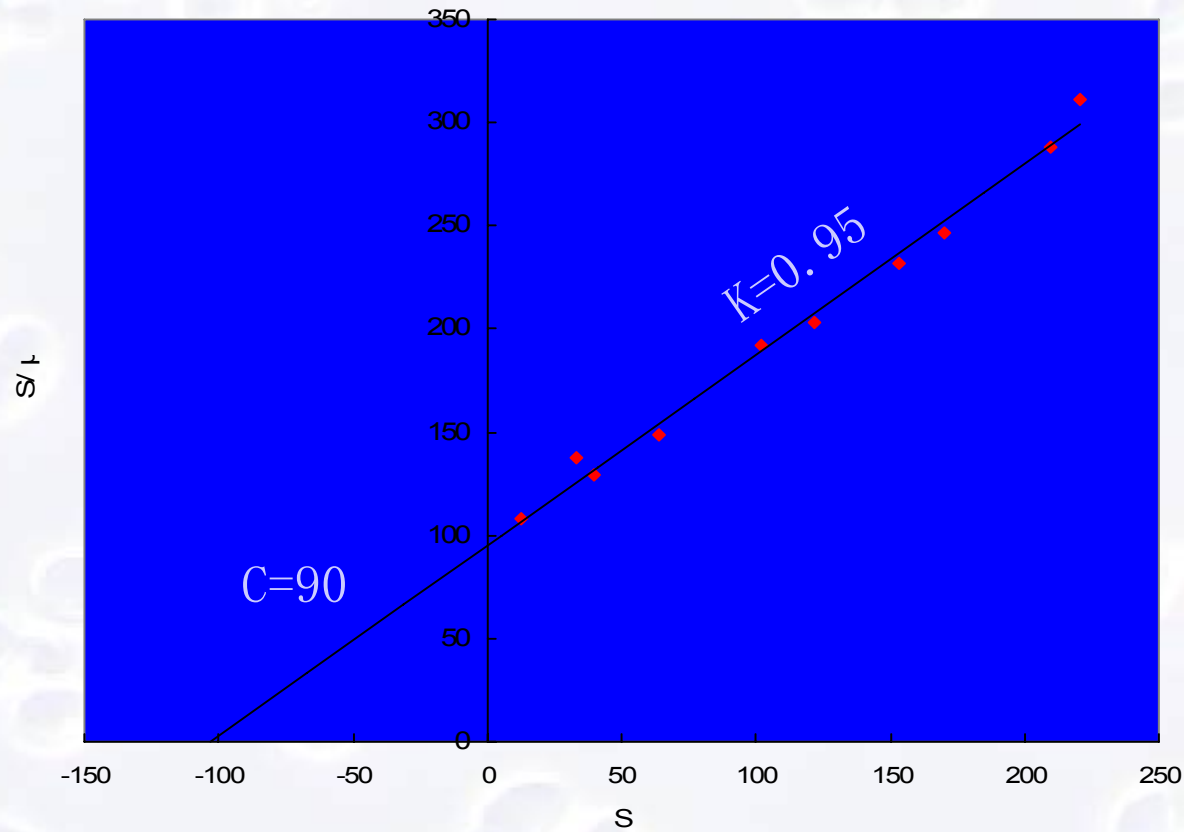
- 在一定培养条件下，培养大肠杆菌，测得实验数据如下表。求：该条件下，大肠杆菌的最大比生长速率 μ_m ，半饱和常数 K_s 。

S (mg/L)	μ (h ⁻¹)	S (mg/L)	μ (h ⁻¹)
6	0.06	122	0.60
13	0.12	153	0.66
33	0.24	170	0.69
40	0.31	221	0.70
64	0.43	210	0.73
102	0.53		

先计算S/ μ

S (mg/L)	μ (h ⁻¹)	S/ μ	S (mg/L)	μ (h ⁻¹)	S/ μ
6	0.06	100	122	0.60	203.3
13	0.12	108	153	0.66	231.8
33	0.24	137.5	170	0.69	246.4
40	0.31	129	221	0.70	311.3
64	0.43	148.8	210	0.73	287.7
102	0.53	192.5			

做S/μ-S图



由 $K=1/$
 $\mu_m,$
 $C=K_S/$
 μ_m
得:
 $\mu_m = 1.05h^{-1}$
 K_S
 $= 0.095g/L$

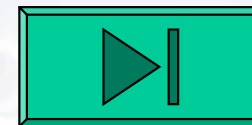
- 用 S/μ 与 S 的数据做线性回归，得回归方程：

$$S/\mu = 95.14 + 0.926S$$

- 线性相关系数 $r=0.9960$
- 由该回归方程计算得：

$$\mu_m = 1.08\text{h}^{-1}$$

$$K_S = 0.103\text{g/L}$$



(2) 双基质限制生长动力学

两种基质浓度较低时，共同限制微生物生长，
有以下方程：

$$\mu = \mu_{\max} \left(\frac{S_1}{K_{S1} + S_1} \right) \left(\frac{S_2}{K_{S2} + S_2} \right)$$

多种限制性底物时

$$\mu = \mu_{\max} \left(\frac{S_1}{K_{S1} + S_1} \right) \left(\frac{S_2}{K_{S2} + S_2} \right) \dots\dots\dots$$

(3) 对于粘稠发酵液

由于菌体对基质的扩散阻力，Monod方程有偏差，采用Contois公式。这一方程对高密度培养，丝状真菌比较满意。

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{K_X \cdot X + S}$$

(4) 普通基质抑制生长动力学

某些基质对生长是必需的，但过量后对生长产生抑制，适用Andrews公式；

$$\mu = \frac{\mu_{\max} S}{K_S + S + S^2 / K_i}$$
$$\approx \mu_{\max} \frac{S}{K_S + S} \cdot \frac{1}{1 + S / K_i}$$

(当 K_S 较小时)

K_i ，基质抑制常数

(5) 产物抑制生长动力学

当微生物被其自身代谢产物抑制时，Aibe提出

$$\mu = \frac{\mu_{\max} S}{K_i + S} \cdot \frac{K_P}{K_P + P}$$

K_P : 产物抑制常数

K_i : 饱和常数

(6) 其他一些动力学模型

表 9-3 单一限制基质, 无抑制条件下
微生物生长的各种数学模型

模 型	提 出 者	年 代
$\mu = \mu_{\max}[1 - \exp(-S/K_s)]$	Teissier	1942
$\mu = \mu_{\max}(1 + K_s S^{-1})^{-1}$	Moser	1958
$\mu = \mu_{\max} \frac{S/X}{K_s + S/X}$	Contois	1959
$\mu = \mu_{\max} S / (K_s X + S)$	藤 本	1963
$\mu = K \cdot S^n$	Manago	1972
$S = A \mu + B \mu / (\mu_{\max} + \mu)$	Dabes 等	1973
$\mu^2/K - (K_s + S) \mu - \mu_{\max} \cdot S = 0$	沢田等	1975
$\mu = \mu_{\max} S / (K_s + S) - b$	Bailey	1977

2. 细胞生长稳定期和延迟期的Monod型动力学

(1) 延迟期动力学模型的建立

$$\mu(s, t) = \mu_{\max} \frac{s}{K_s + s} (1 - e^{-t/t_L})$$

(2) 生长稳定期动力学模型的建立

$$r_x = \alpha \cdot x \left(1 - \frac{x}{\beta}\right)$$

式中 α 和 β 是经验常数，取 $\alpha = \mu_{\max}$ 和 $\beta = x_{\max}$

3. 微生物死亡期和内源代谢

(1) 微生物死亡期的动力学模型

$$k_d = -\frac{1}{x} \cdot \frac{dx}{dt} \quad K_d \text{ 为比死亡速率 (h}^{-1}\text{)}$$

对应于由底物生成菌体的一级反应速率为：

$$r_x = (\mu - k_d)x$$

(2) 内源代谢的动力学模型

$$-r_s = \frac{1}{Y_{X/S}^*} \cdot \mu \cdot X + m_s \cdot X \quad \text{或} \quad q_s = \frac{1}{Y_{X/S}^*} \cdot \mu + m_s$$

m_s 为细胞的维持系数 (s^{-1}), $Y_{X/S}^*$ 为最大细胞产率

微生物的生长:

$$\mu = \mu_s - \mu_d$$

μ 表观比生长率

μ_s 真比生长率

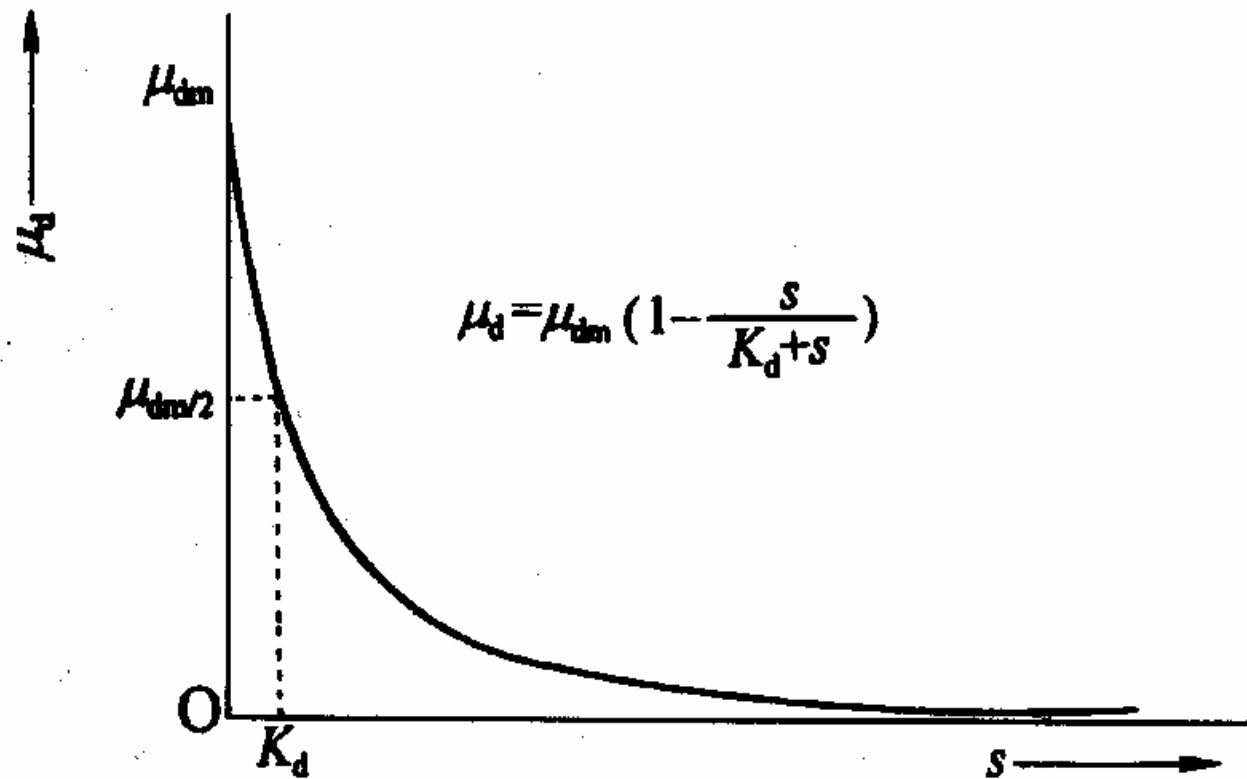


图 9-5 微生物生长中的死亡动力学曲线

(二) 产物合成动力学

产物的合成（指除细胞以外的产品），特别是次级代谢产物的生物合成是一个非常复杂的过程，目前大多数研究只限于以宏观过程变量描述的模型，应用上有一定的局限性。

产物合成动力学

- Gaden根据产物生成速率和细胞生长速率之间的关系，将产物形成区分为三种类型
- 类型 I：也称为偶联模型（醇类、葡萄糖酸、乳酸）

$$r_P = Y_{P/X} r_X = Y_{P/X} \mu X \quad q_P = Y_{P/X} \mu$$

- 类型 II：也称部分偶联模型（柠檬酸、氨基酸）

$$r_P = \alpha \cdot r_X + \beta \cdot X \quad q_P = \alpha \cdot \mu + \beta$$

- 类型 III：也称为非偶联模型（抗生素、酶、维生素、多糖）

$$r_P = \beta \cdot X \quad q_P = \beta$$

产物合成动力学

- 上述三种类型外还有一种模型是 q_p 与 μ 负偶联的模型，例如黑曲霉生产黑色素，其 q_p 与 μ 的关系可表示为：

$$q_P = q_{P,\max} - Y_{P/X} \mu$$

- 当考虑到产物可能存在分解时：

$$r_P = \alpha \cdot r_X + \beta \cdot X - k'_d \cdot P$$

- 式中， k'_d 为产物分解常数

产物合成动力学

以产物生产率作为菌体生长率和菌体量的函数（Luedeking和Piret模型）

$$\frac{dP}{dt} = k_1 \frac{dX}{dt} + k_2 X$$

k_1 与菌体生长率关联的产物合成常数

k_2 与菌体生长关联的产物合成常数

产物合成动力学

$$\frac{dP}{dt} = \alpha \frac{dX}{dt} + \beta X$$

按 k_1, k_2 常数分,

- a. $k_1 > 0, k_2 = 0$, 生长偶联型
- b. $k_1 > 0, k_2 > 0$, 部分生长偶联型, 混合型
- c. $k_1 = 0, k_2 > 0$, 非生长偶联型

产物合成动力学

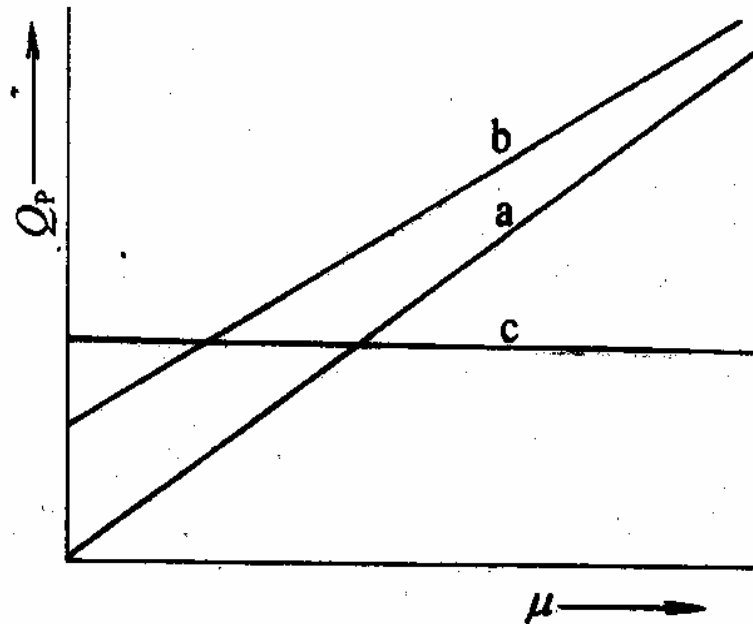


图 9-14 Luedeking 和 Piret 模型的
动力学参数图解

产物合成动力学

生长关联型:

当 $k_1=Y_{P/X}$, $k_2=0$,

$$dP/dt = Y_{P/X} \cdot dX/dt,$$

$$Q_P = Y_{P/X} \cdot \mu$$

非生长关联型:

当 $k_1 = 0$, $k_2=Q_P$,

$$dP/dt = Q_P \cdot X$$

产物合成动力学

k_1, k_2 的确定:

以 μ 对 Q_P 作图

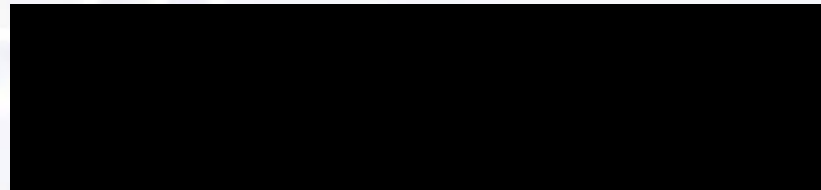
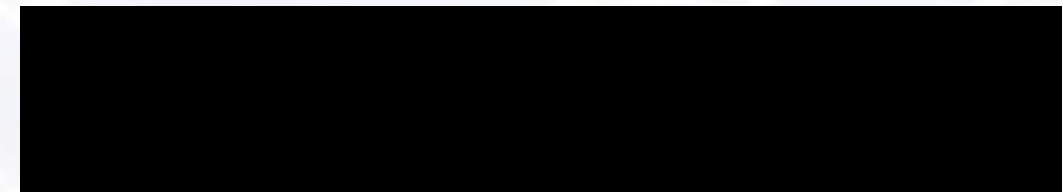
$$Q_P = k_1 \mu + k_2$$

Q_P , 产物比生产率

(三) 基质消耗动力学

- 基质包括细胞生长与代谢所需的各种营养成分，其消耗分为三个方面：
 - ✓ 细胞生长，合成新细胞；
 - ✓ 细胞维持生命所消耗能量的需求；
 - ✓ 合成代谢产物。

基质消耗动力学



基质比消耗率 $Q_S = -dS/Xdt$

产物比生产率 $Q_P = dP/Xdt$

基质消耗动力学

维持系数 m :

单位质量菌体在单位时间内因维持代谢消耗的基质量。是微生物的一种特性。

得率系数 Y :

两种物质得失之间的计量比。

生长得率:

$$Y_{X/S} = -dX/dS \quad \text{或} \quad -\Delta X / \Delta S$$

产物得率:

$$Y_{P/S} = -dP/dS \quad \text{或} \quad -\Delta P / \Delta S$$

基质消耗动力学

维持系数 m 和得率系数 $Y_{X/S}$, $Y_{P/S}$ 的确定:

a. Q_p 为常数的情况

某些非生长偶联型产物发酵中, 若控制得当, Q_p 可保持稳定(如恒化器中)。

以 μ 对 Q_s 作图, 为一直线,

斜率为 $1/Y_{X/S}$,

纵轴截距 $M_S = m_S + Q_p/Y_{P/S}$

作为广义的维持常数。

基质消耗动力学

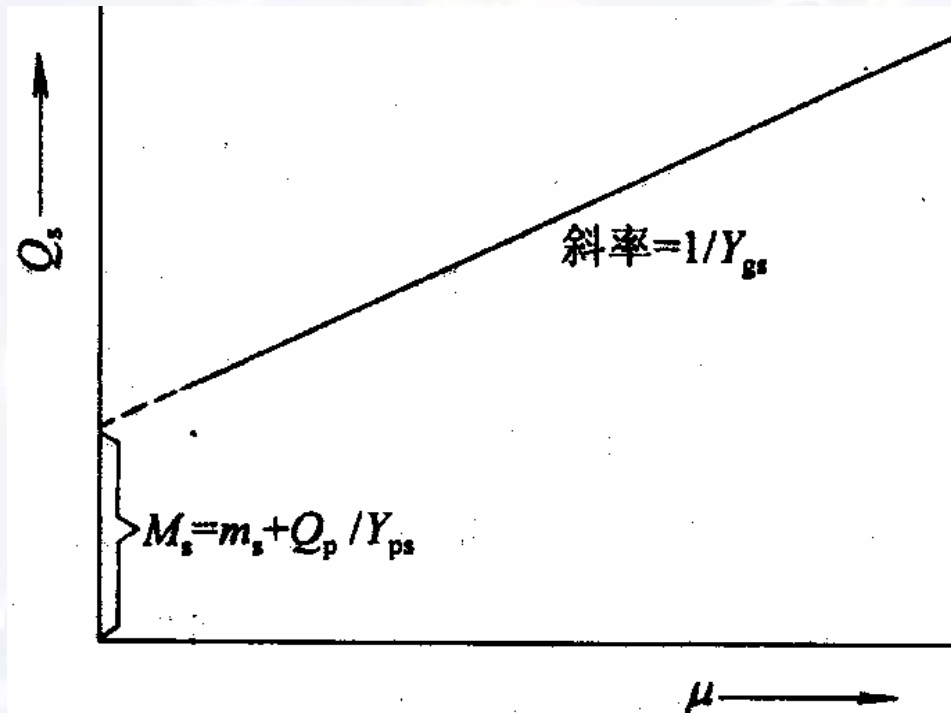


图 9-15 广义维持因数 M_s 和
纯生长得率 Y_{gs} 的图解求法

基质消耗动力学

b. Q_p 为变数的情况

多数情况下， Q_p 随发酵条件，特别是比生长速率 μ 的变化而变化；利用恒化器在不同稀释率 D 下可得到稳定状态下的多组 Q_s ， μ 和 Q_p 的观测值，利用一个多元线性回归，由回归系数可得到所需的参数值。

(四) 分批发酵过程的生产率

- 体积生产率是以每升发酵液每小时产生的产物克数表示的，是对发酵过程总成果的一种衡量。
- 对于分批发酵过程，有必要计算总运转时间内的生产率。
- 总运转时间不仅包括发酵周期，也包括从前一批放罐、洗罐和消毒新培养基所需的时间。这一段时间的间隔可以少到6个小时（酵母生产），多到20小时左右（抗生素生产）。
- 在分批发酵过程中，产物的生成速率如图所示。

分批发酵过程的生产率

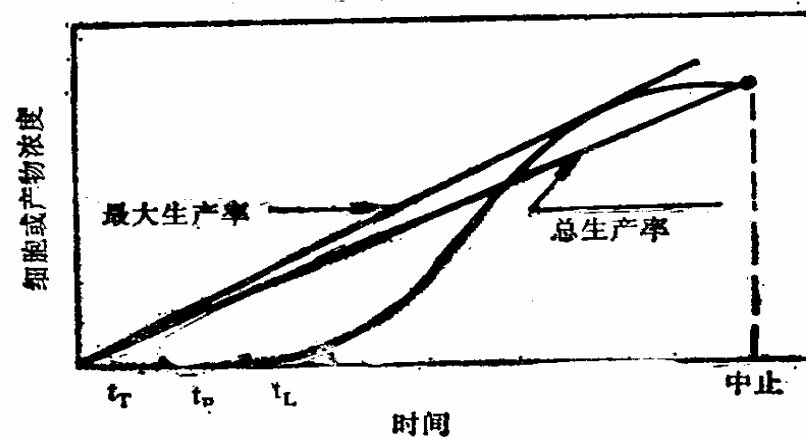
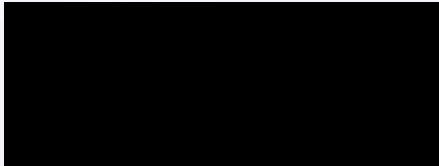


图6.3 分批培养的生产率图中 t_T 、 t_D 和 t_L 分别为培养结束和放罐检修的工作时间、打料和灭菌时间以及生长停滞期。

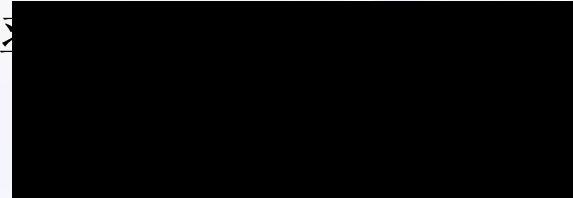
总的生成率可用自发酵过程的起点到终点的直线斜率表示，最高生产率由通过原点与单产曲线相切的直线的斜率表示，切点位置的细胞产物浓度比终点（最大值）低。

分批发酵过程的生产率

发酵过程总的运转周期:



总的生产



式中 t_T , t_D 和 t_L 分别为放罐所需时间（包括放罐, 洗罐和检修）、进罐时间（包括打料, 灭菌）和生长停滞期; X_0 和 X_t 是起始和终了的细胞浓度。

由此式可以求出发酵操作过程的变化对总生产率的影响。较大的种子量将增加 X_0 , 从而缩短发酵的过程, 减少放罐、检修、打料、灭菌时间, 同样可缩短总周期。使用生长活力强的种子可缩短生长停滞期。例如, 在发酵周期短（18-48小时）的面包酵母或谷氨酸的生产过程中, 放罐和检修时间对总的生产率影响较大; 对于长周期（160-200小时）的抗生素发酵过程来说, 几小时的发酵罐准备时间的差别对总的生产率的影响不大²¹⁹

四、补料分批发酵动力学

- **Fixed volume fed-batch**

- *Feeding the growth limiting substrate in undiluted form, for example, as a very concentrated liquid or gas (ex. oxygen);*
- *Dialysis;*
- *Cyclic fed-batch culture for fixed volume systems*

- **Variable volume fed-batch**

- *repeated fed-batch process or cyclic fed-batch culture*
;
- *single fed-batch process.*

1 Kinetics of Fixed volume fed-batch fermentation

- The mathematical development that is going to be presented here has the following assumptions:
 - The feed is provided at a constant rate;
 - The production of mass of biomass per mass of substrate is constant during the fermentation time and;
 - A very concentrated feed is being provided to the fermentor in such a way that the change in volume is negligible.

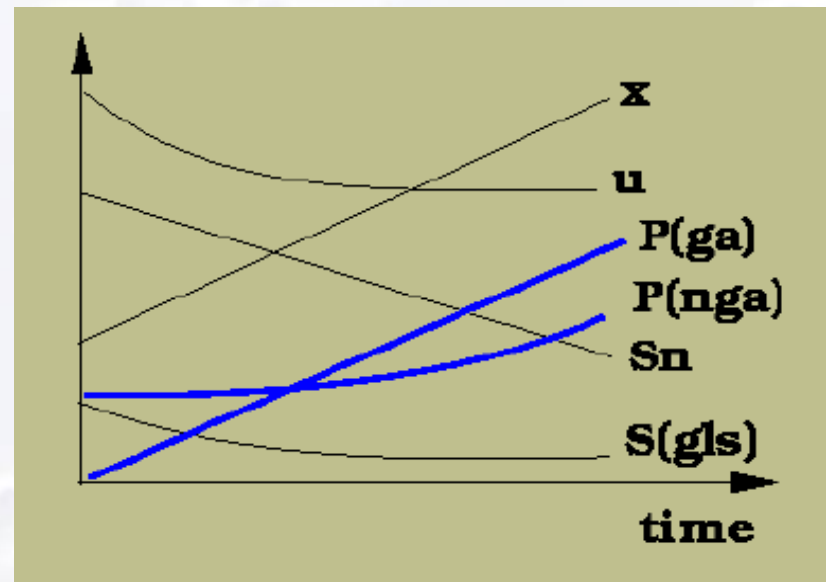
1.1 Mathematical modelling of fixed volume fed-batch

Parameter	Equation	Equation
Specific Growth Rate	$\mu = (F \cdot Y_{x/s}) / x$	1.1.1
Biomass (as a function of time)	$x_t = x_0 + F \cdot Y_{x/s} \cdot t$	1.1.2
Product Concentration (non-growth associated)	$P = P_i + q_p \cdot x_0 \cdot t + q_p \cdot F \cdot Y_{x/s} \cdot t^2 / 2$	1.1.3
Product Concentration (growth associated)	$P = P_i + r_p \cdot t$	1.1.4

- F : the substrate feed rate [mass substrate/(volume.time)]
- $Y_{x/s}$: the yield factor [mass biomass/mass substrate]
- P : the product concentration {mass product/volume} and
- q_p : the specific production rate of product [mass product/(mass biomass . time)]
- r_p : the product formation rate [mass product/(volume . time)]

Mathematical modelling of fixed volume fed-batch

- From equations (1.1.1) , (1.1.2), (1.1.3)and (1.1.4), it can be observed that
 - the specific growth rate decreases with time, because the biomass (in the denominator) is increasing with time;
 - the biomass increases linearly with time
 - The product variation with time will depend on its being growth or non-growth associated



- Time profiles for a fixed-volume fed-batch culture. μ = specific growth rate, x = biomass concentration, $S(GLS)$ = growth limiting substrate, $S(N)$ = any other substrate other than the $S(GLS)$, $P(nga)$ is the non-growth associated product and $P(ga)$ is the growth associated profile for product concentration.

1.2 Fixed volume fed-batch (derivations)

- The mathematical development that is going to be presented here has the following assumptions:
 - The feed is provided at a constant rate;
 - The production of mass of biomass per mass of substrate is constant during the fermentation time and;
 - A very concentrated feed is being provided to the fermentor in such a way that the change in volume is negligible.

1.2.1 μ (derivations)

- Consider a batch culture in which the growth of the process organism has depleted the limiting substrate to a limiting level. If this limiting substrate is fed to the fermentor in such a way that the volume does not change, then
- $dx/dt = F \cdot Y_{x/s}$
- $dx/dt = \mu \cdot x$ (1.1.5)
- then $\mu \cdot x = F \cdot Y_{x/s} \Leftrightarrow \mu = (F \cdot Y_{x/s}) / x$ (1.1.1)

1.2.2 x_t (derivations)

- Considering that $(F \cdot Y_{x/s})/x$ has as a upper limit u_{\max} , then ds/dt is approximately zero, being "s" the concentration of substrate inside the fermentor [mass substrate/volume]. However, because cells are growing in the fermentor and then biomass is increasing with time, dx/dt is not zero. Integrating equation (1.1.5) between the initial time ($t=0$) and between time t , and between the biomass concentration at the onset of the fed-batch culture (x_0) and the biomass concentration after operating the fed-batch system after t time (x_t), equation (1.1.2) is obtained.
- $$x_t = x_0 + F \cdot Y_{x/s} \cdot t \quad (1.1.2)$$

1.3 Product Concentration(non-growth associated)

- In terms of a product P , the product balance is
$$dP/dt = q_p \cdot x \quad (1.1.6)$$

- If equation (1.1.2) is substituted into equation (3.6.1.5), then

$$dP/dt = q_p \cdot (x_o + F \cdot Y_{x/s} \cdot t) \quad (1.1.7)$$

- if q_p is constant (non-growth associated products). If equation (1.1.6) is integrated between the initial time ($t = 0$) and time t , and initial product concentration P_i and the concentration P for time t

$$P = P_i + q_p \cdot x_o \cdot t + q_p \cdot F \cdot Y_{x/s} \cdot t^2 / 2 \quad (1.1.3)$$

1.4 Product Concentration(growth associated)

- If q_p is related with u (growth associated product). By definition q_p is defined as the ratio of the product production rate over the biomass concentration in accordance to equation (1.1.8)

$$q_p = r_p / x \quad (1.1.8)$$

- Assume that r_p is a constant. Combining equations (1.1.2), (1.1.6) and (1.1.8), it comes to

$$dp/dt = r_p \quad (1.1.9)$$

- If equation (1.1.6) is integrated between the initial time ($t = 0$) and time t , and initial product concentration P_i and the concentration P for time t

$$P - P_i = r_p \cdot t \quad (1.1.10)$$

2 Kinetics of Variable volume fed-batch fermentation

- In a variable volume fed-batch fermentation, an additional element should be considered: the feed. Consequently, the volume of the medium in the fermenter varies because there is an inflow and no outflow. Again, it is going to be considered that the growth of the microorganism is limited by the concentration of one substrate.
- For the mathematical developments that will be presented, the assumptions are
 - Specific growth rate is uniquely dependent on the concentration of the limiting substrate
 - The concentration of the limiting substrate in the feed is constant
 - The feed is sterile
 - The yields are constant during the fermentation time

2.1 Mathematical modelling of Variable volume fed-batch

Component	Mass Balance Equation	Equation #
Overall	$F = dV/dt$	2.1.1
Biomass	$dx/dt = x \cdot (u \cdot V - K_d \cdot V - F) / V$	2.1.2
Substrate	$ds/dt = F \cdot (s_0 - s) / V - u \cdot x / V$	2.1.3
Product	$dP/dt = q_p \cdot x - P \cdot F / V$	2.1.4

- F : the substrate feed rate [mass substrate/(volume.time)]
- K_d :the specific death rate [time⁻¹]
- $Y_{x/s}$: the yield factor [mass biomass/mass substrate]
- P : the product concentration {mass product/volume} and
- q_p : the specific production rate of product [mass product/(mass biomass . time)]
- R_p : the product formation rate [mass product/(volume . time)]

2.1.1 F(derivations)

- Considering the overall mass balance
 $\{\text{in}\} = \{\text{out}\} + \{\text{accumulation}\}$
 $F = 0 + dV/dt \Leftrightarrow F = dV/dt \quad (2.1.1)$
- Where
V is the volume of the fermentor
t is the time
F is the feed rate [volume/time].

2.1.2 Biomass

- Considering now the balance to the biomass
{accumulation} = {in} + {produced} - {lost by cell death}

$$d(Vx)/dt = F \cdot x_0 + r_x \cdot V - r_d \cdot V$$

- The feed is considered to be sterile, then the {in} amount equals zero.

$$V \cdot dx/dt + x \cdot dV/dt = V \cdot dx/dt + x \cdot F = r_x \cdot V - r_d \cdot V$$

- But $r_x \cdot V = u \cdot X \cdot V$ and $r_d \cdot V = K_d \cdot x \cdot V$
 $dx/dt = x \cdot (u \cdot V - K_d \cdot V - F) / V$ (2.1.2)

2.1.3 Substrate

- For a matter of simplicity, the specific death rate is considered to be much smaller than the specific growth rate and consequently, it can be neglected.
- Considering now the balance to the limiting substrate

$$\{\text{accumulation}\} = \{\text{in}\} + \{\text{consumed}\}$$

$$d(V \cdot s)/dt = F \cdot s_0 - r_s \cdot V$$

$$r_s \cdot V = u \cdot X \cdot V / Y_{x/s}$$

$$d(V \cdot s)/dt = V \cdot ds/dt + s \cdot dV/dt = V \cdot ds/dt + s \cdot F$$

$$ds/dt = F \cdot (s_0 - s)/V - u \cdot x / Y_{x/s} \quad (2.1.3)$$

2.1.4 Product

- Considering a mass balance for the product

$$\{\text{accumulation}\} = \{\text{produced}\}$$

$$d(V \cdot P)/dt = r_p \cdot V$$

$$r_p = q_p \cdot X$$

$$dP/dt = q_p \cdot X - P \cdot F / V \quad (2.1.4)$$

P: the product concentration [mass product/volume] and

r_p : the product formation rate [mass product/(volume.time)]

q_p : the specific product formation [mass product/(volume.
time)]

235

五、连续发酵动力学

✓ 按种类（设备）分：

全混流反应器

活塞流反应器

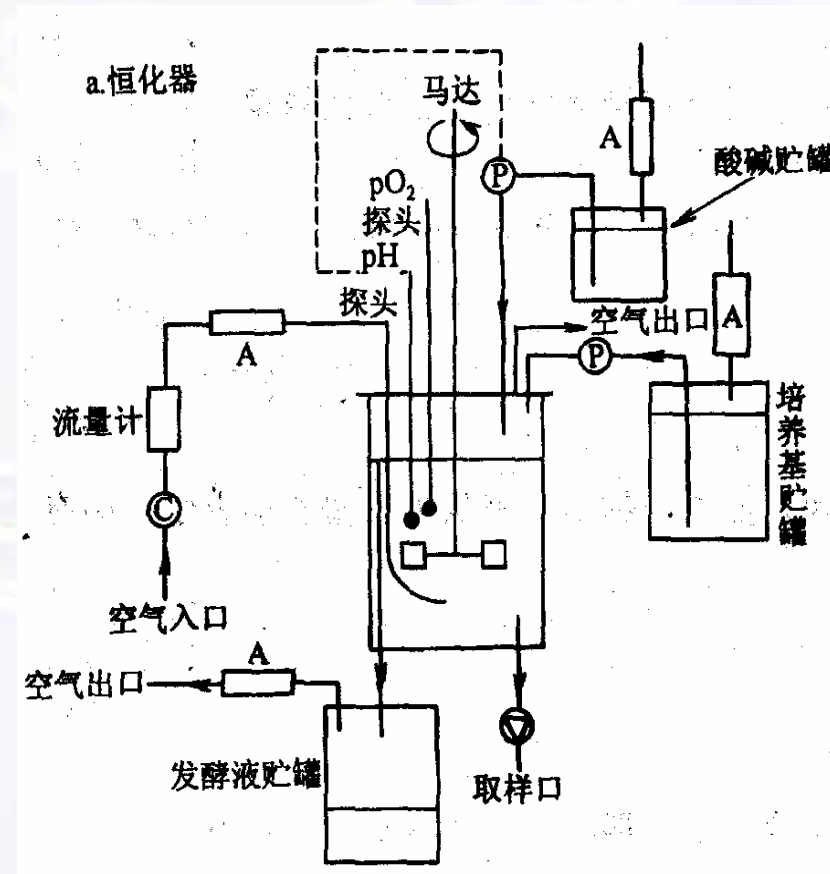
✓ 全混流反应器分为：

恒化器

恒浊器

✓恒化器:

以某种必需营养作为生长限制基质，通过控制流加速率造成适应这种条件的细胞生长密度和生长速率，培养液中限制性底物浓度保持恒定。



✓恒浊器:

通过控制
生长限制性基
质的流量维持
恒定的菌体密
度。

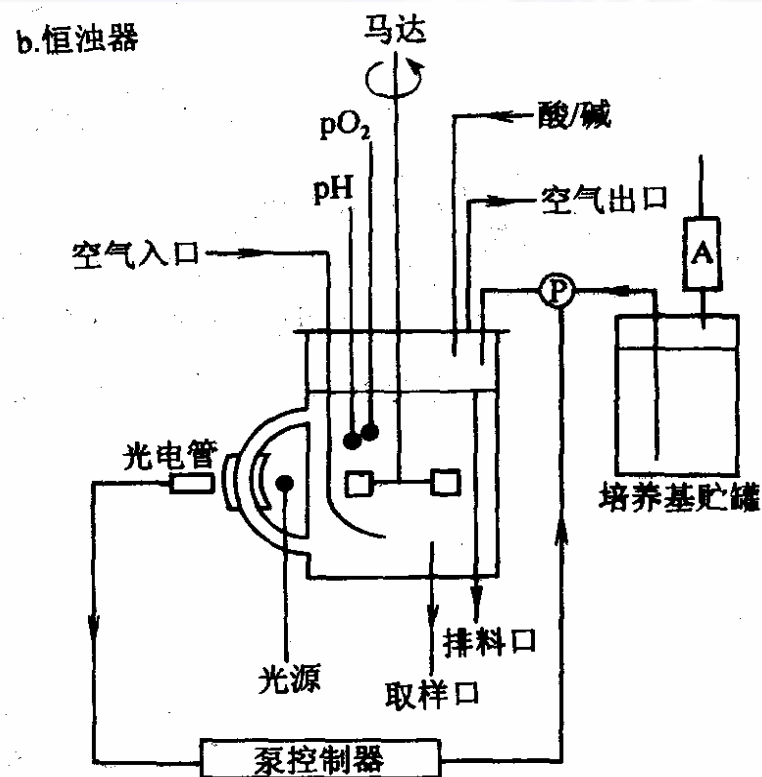
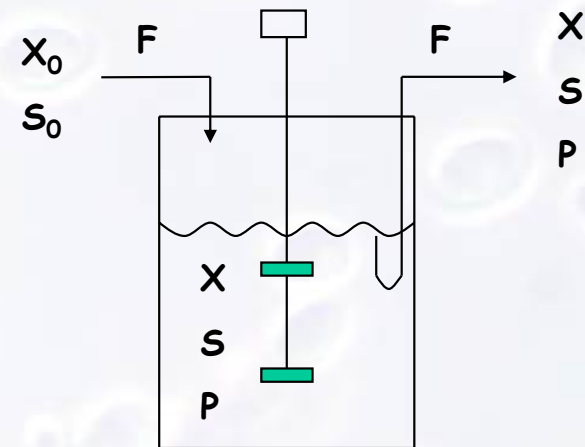


图 9-10 恒化器和恒浊器结构示意图

A. 空气过滤器; P. 泵

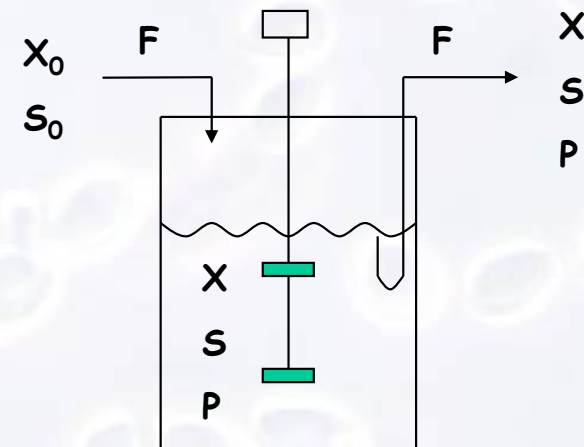
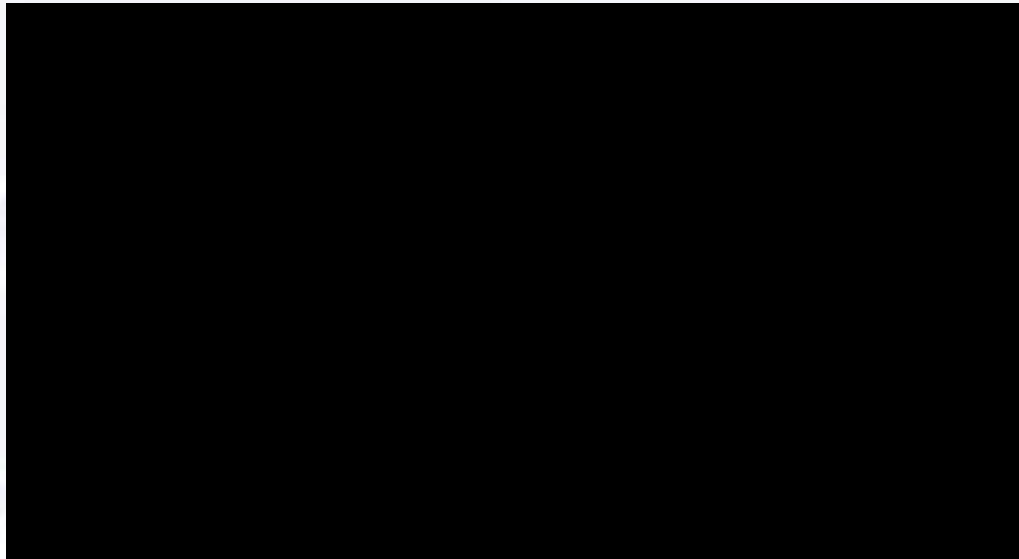
1、单级恒化器的发酵动力学

- S : 限制性底物浓度 (g/L)
- X : 菌体浓度 (g/L)
- P : 产物浓度 (g/L)
- V : 培养液体积 (L)
- F : 培养基体积流率 (L/h)



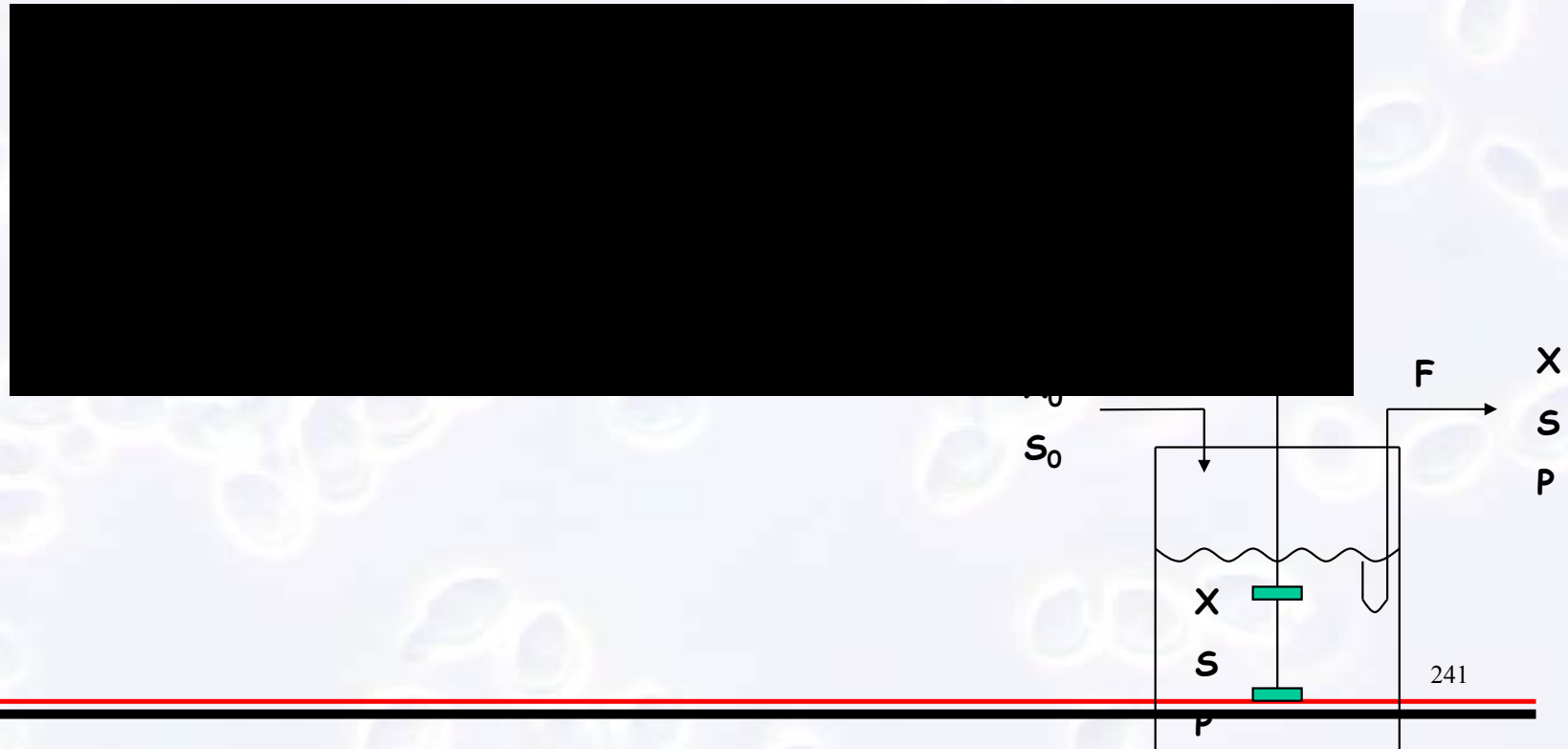
对菌体

积累的细胞=(进入-流出)的细胞+(生长-死亡)的细胞



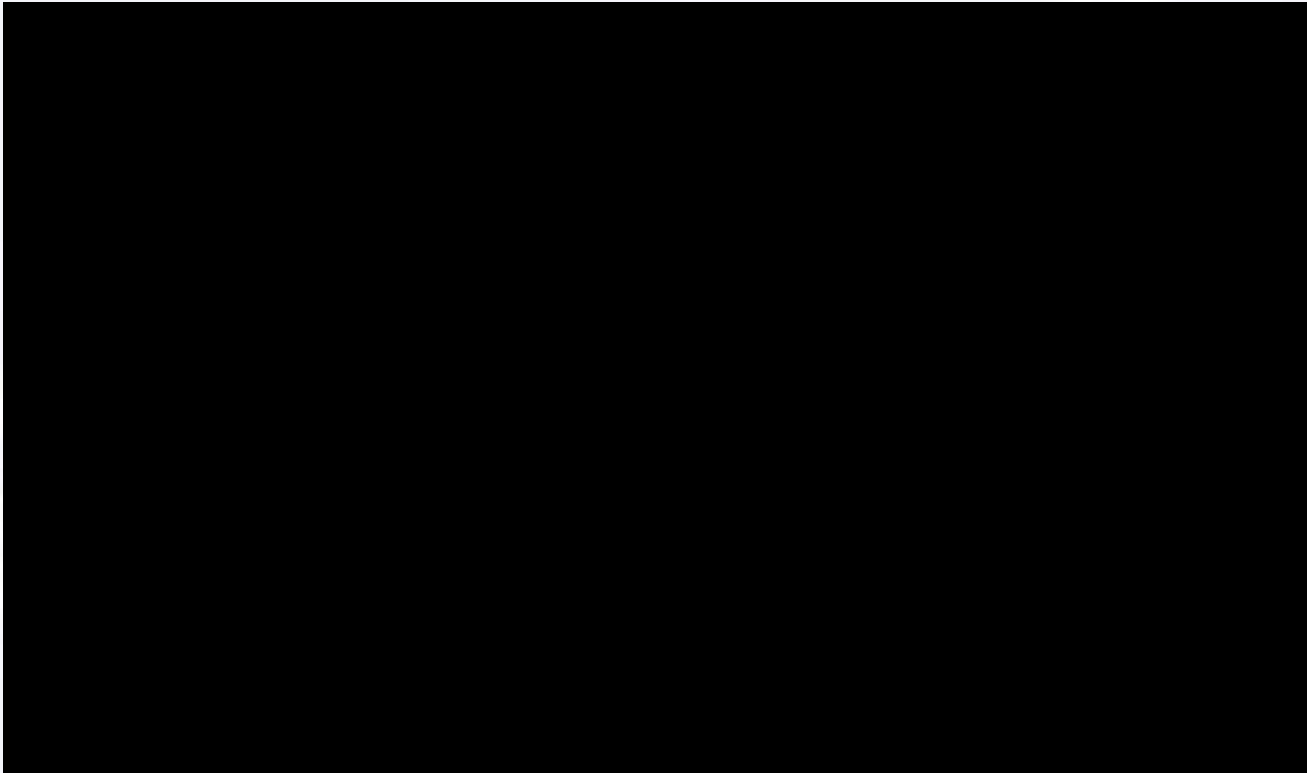
对限制性底物

- 积累的底物 = (进入 - 流出) 的底物 - (生长 + 形成产物 + 维持代谢) 消耗的底物



对产物形成

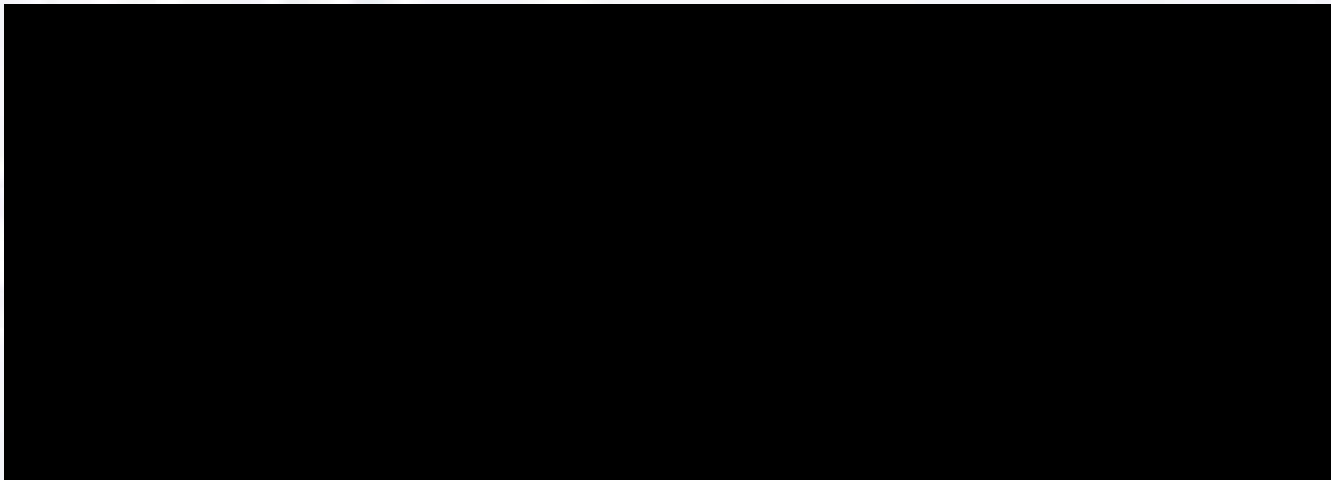
积累的产物 = (生成 - 流出) 的产物



处于稳态时,



由 (5.1.2)、(5.1.5) 和 (5.1.9) 得:

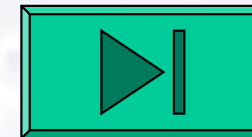
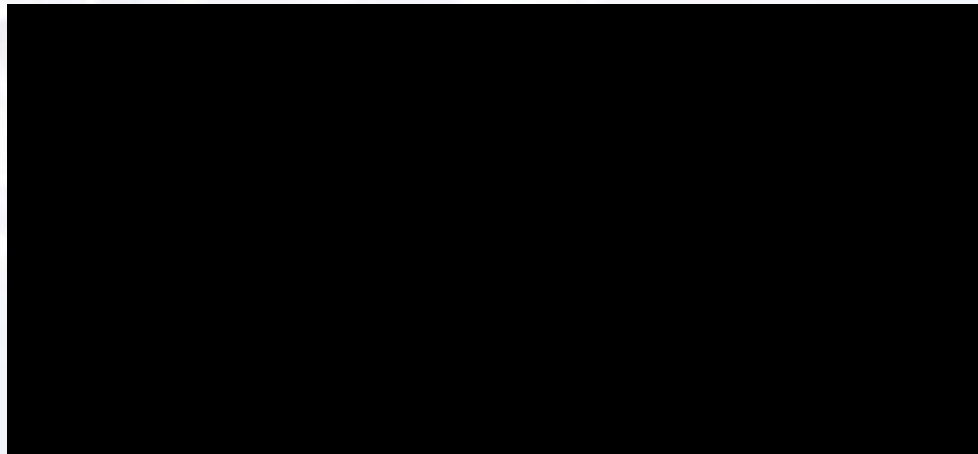


在只培养微生物的特定连续培养过程中，假定：

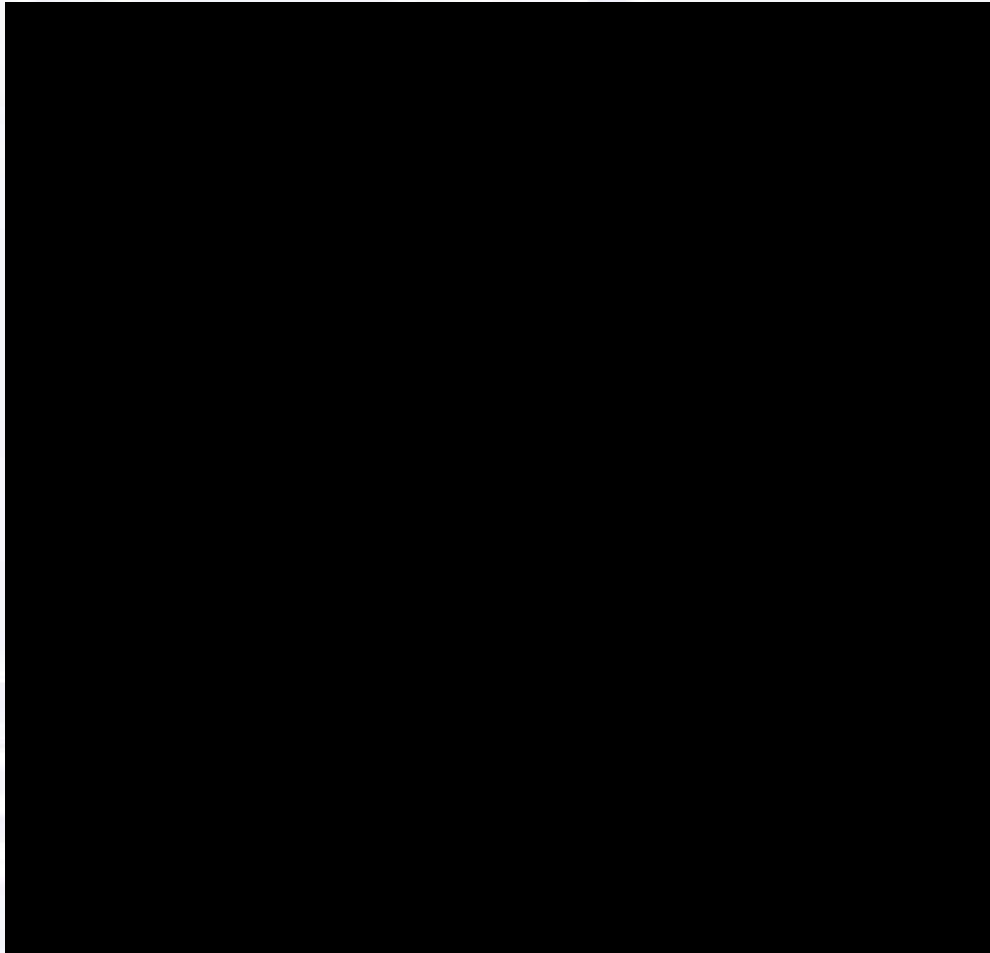
- 无产物形成或形成很少，可忽略不计；
- 维持代谢所消耗的的底物很少，可忽略不计。



根据Monod方程



244



当 $D \geq D_{crit}$ 时， $X=0$ ， $P=0$ ，恒化器内无菌体与产物，这种现象称为“洗出”，因此当以生产菌体为目的时，不能在最高产率的稀释率下操作，菌体容易洗出，应降低 D ，操作也稳定。

代谢产物浓度与产率

r_p , 产物生产率

Q_p , 产物比生产率

$$dP/dt = r_p - DP$$

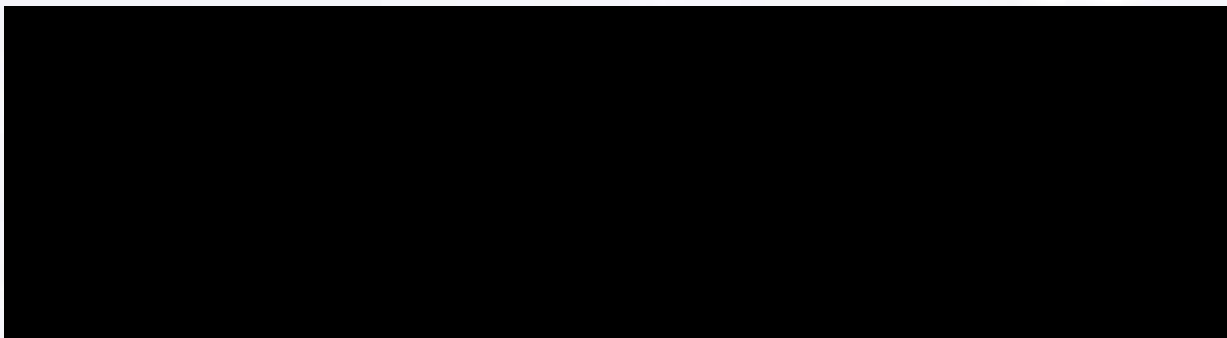
稳定状态下, $dP/dt = 0$

$$r_p = DP$$

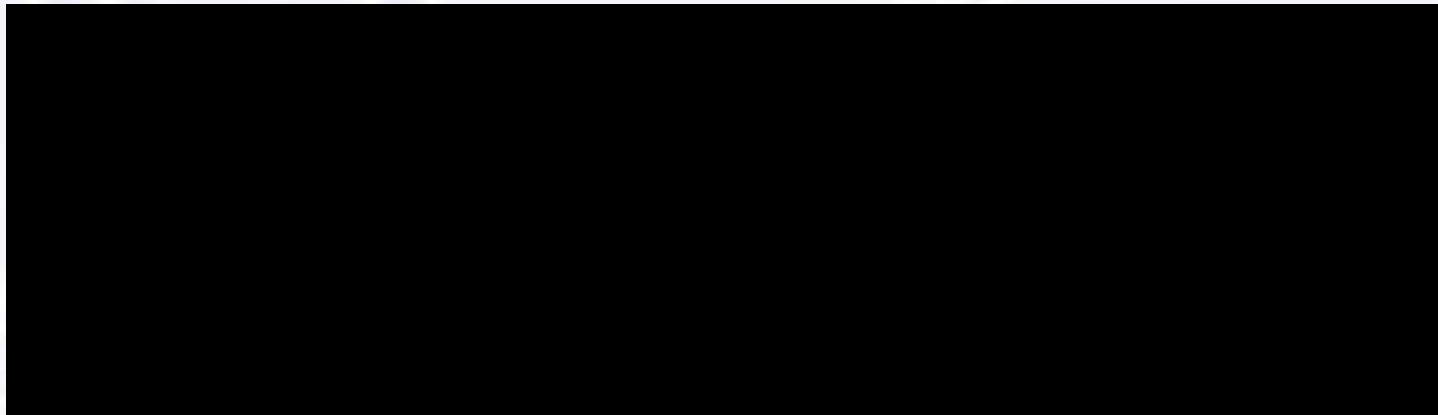
若产物合成为非生长偶联型, $r_p = Q_p X$



若产物合成为生长偶联型



若产物合成为部分生长偶联型

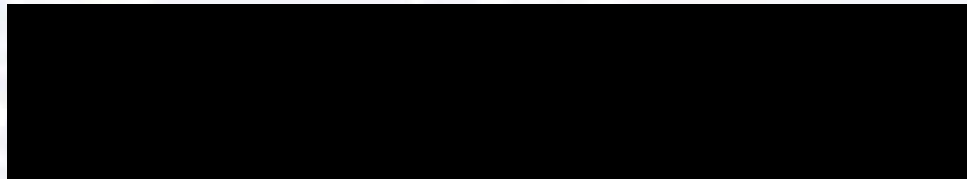


2、单级恒化器生产率与分批发酵生产率的比较

- 连续培养的生产率为：

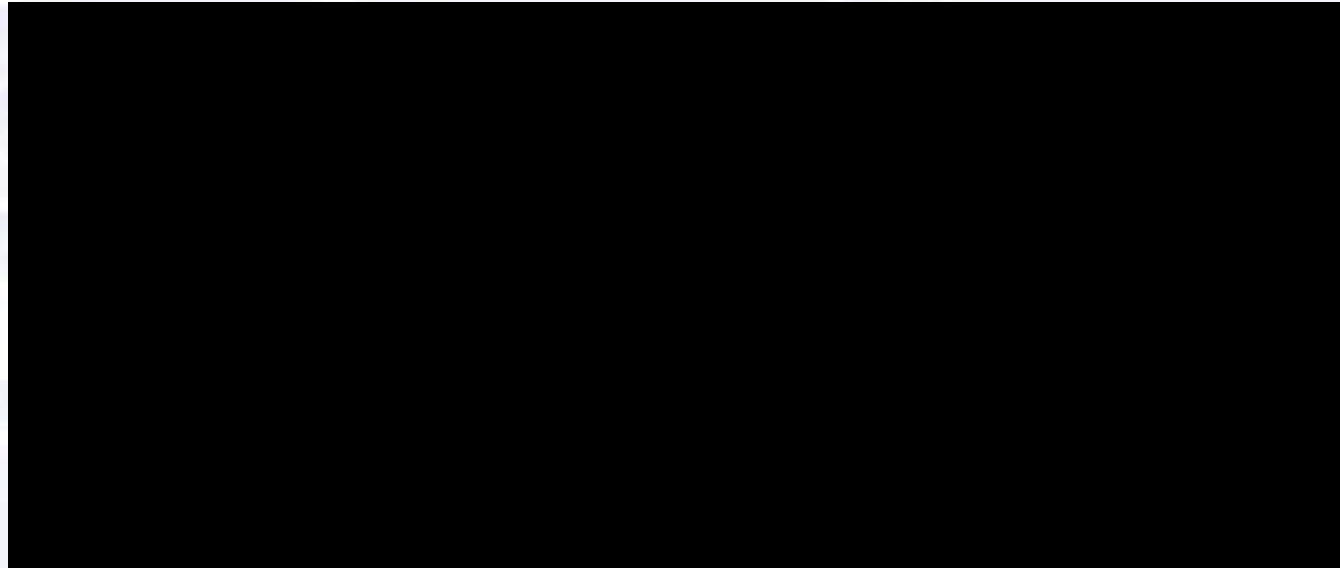
$$P=DX \quad (5.2.1)$$

- 将 (5.1.17) 代入 (5.2.1) ， 得

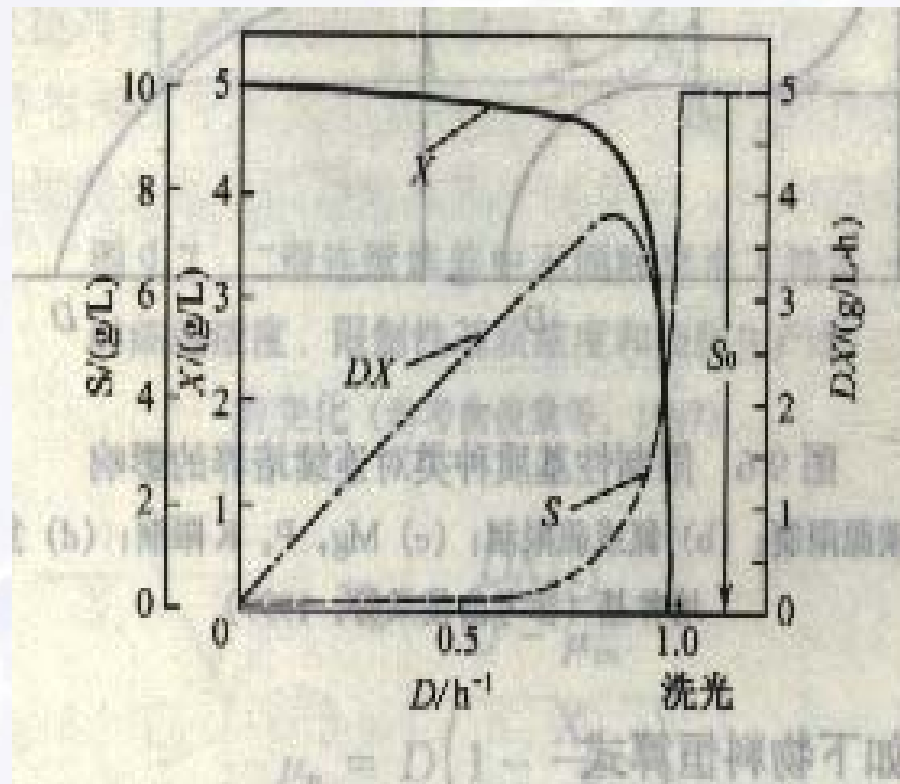


连续培养的最大生产率

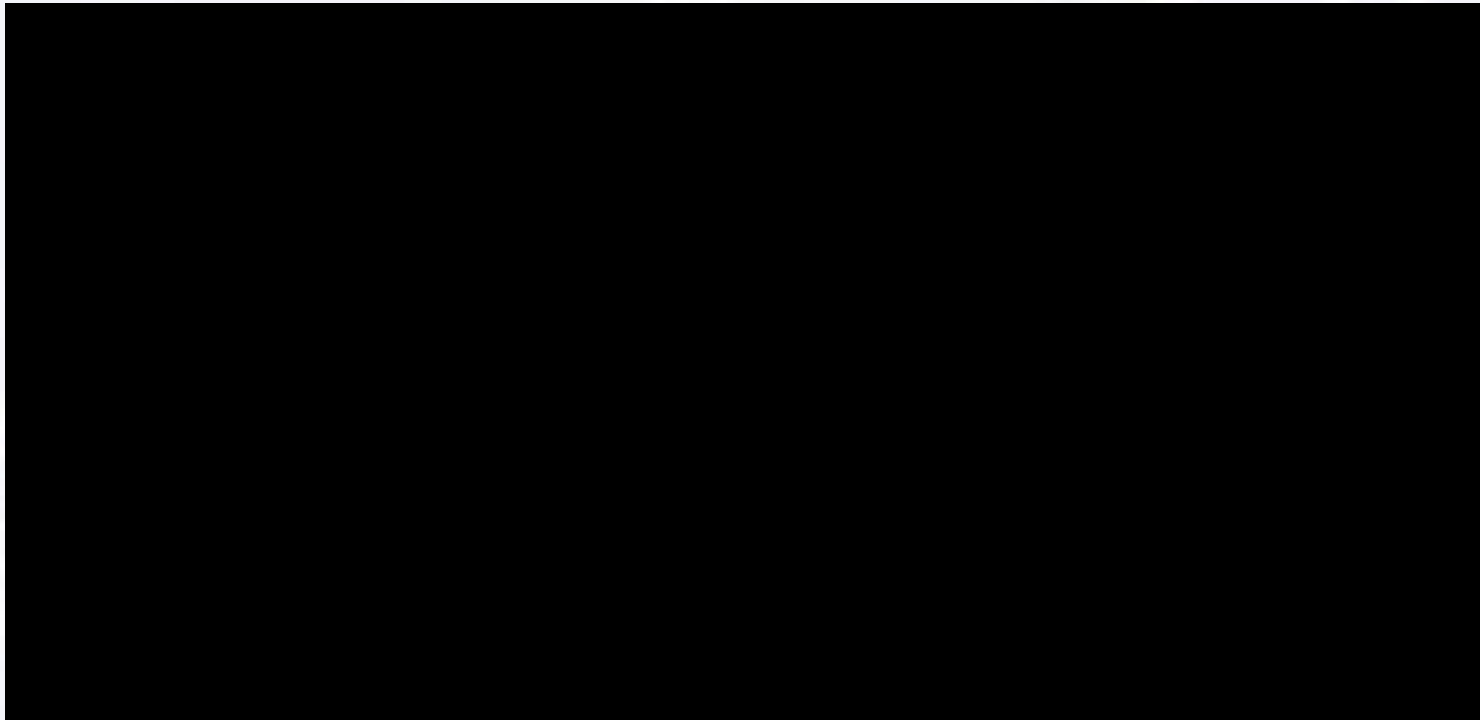
- 对 (5.2.2) 求一阶导数并使其为零，计算出：



连续培养时细胞浓度、限制性基质浓度、细胞生产率与稀释率的关系



P_c 与 P_b 的比较



实例

- 以葡萄糖为限制性底物，连续培养大肠杆菌，在培养条件下测得实验数据如下表：

葡萄糖S (mg/L)	稀释率D (h ⁻¹)	菌体X (mg/L)	葡萄糖S (mg/L)	稀释率D (h ⁻¹)	菌体X (mg/L)
6	0.06	427	122	0.60	434
13	0.12	434	153	0.66	422
33	0.24	417	170	0.69	430
40	0.31	438	221	0.70	390
64	0.43	422	210	0.73	352
102	0.53	427	$S_0=0.968\text{g/L}$		

254

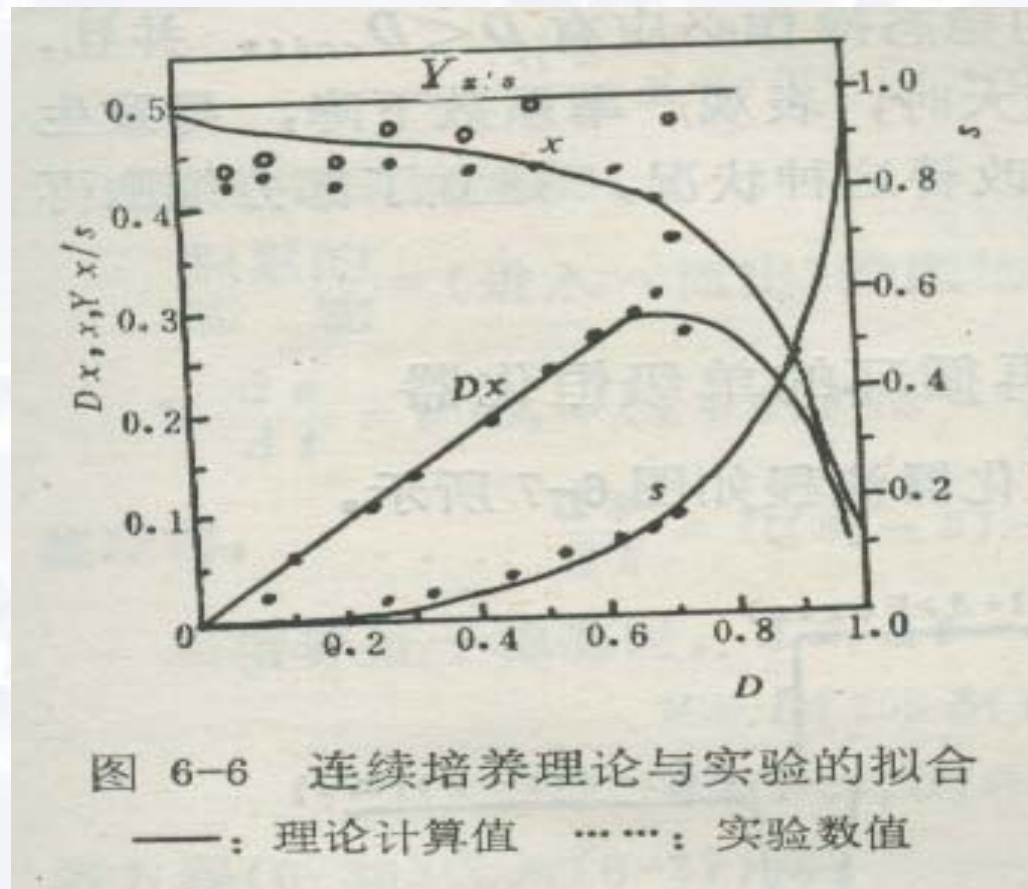
- 由S/ μ -S回归方程，求得：

$$\mu_m = 1.08\text{h}^{-1}$$

$$K_S = 0.103\text{g/L}$$

- 将实验数据X、S代入 (5.1.15)，求出不同X、S下的 $Y_{X/S}$ ，取 $0.3 \leq D \leq 0.7$ 之间的 $Y_{X/S}$ 平均值，得：

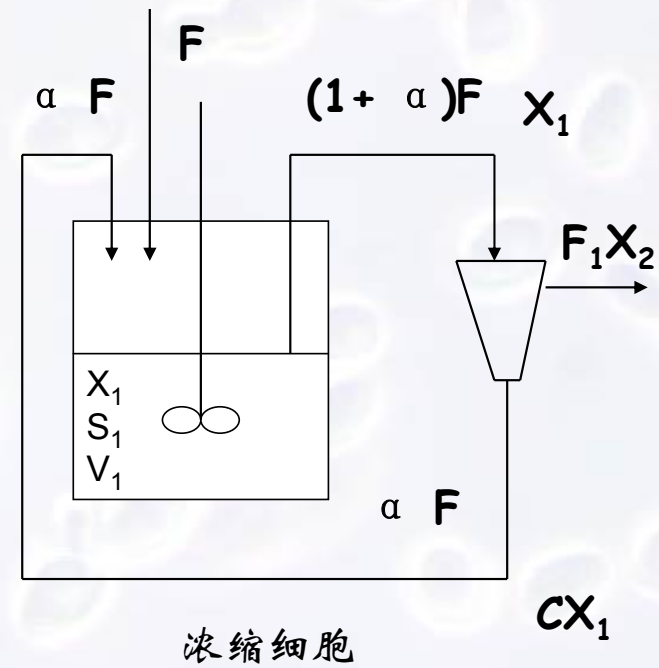
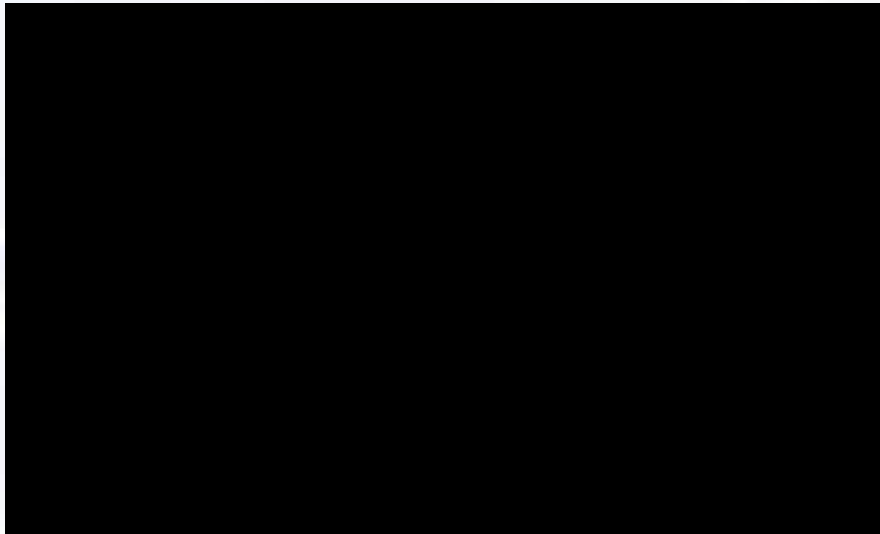
$Y_{X/S}$	D	P_t	$Y_{X/S}$	D	P_t
0.44	0.06	0.026	0.52	0.60	0.260
0.45	0.12	0.052	0.52	0.66	0.278
0.45	0.24	0.10	0.55	0.69	0.297
0.47	0.31	0.136	0.50	0.70	0.277
0.47	0.43	0.181	0.47	0.73	0.257
0.49	0.53	0.226			



连续培养结果与正常情况发生偏差

- ✓ 限制性基质为碳源时，部分消耗的碳源作为能量供生命活动， X 偏低；
- ✓ N , S 为限制性基质， D 较小时会积累多糖，脂肪等， X 偏高；
- ✓ Mg , P , K 为限制性基质时，同上，但细胞内这些物质下降， $Y_{X/S}$ 增大，细胞浓度偏高；
- ✓ 复合培养基时，情况复杂，随着 μ 变化，限制性基质会改变， X 下降。

3、带有细胞再循环的单级恒化器



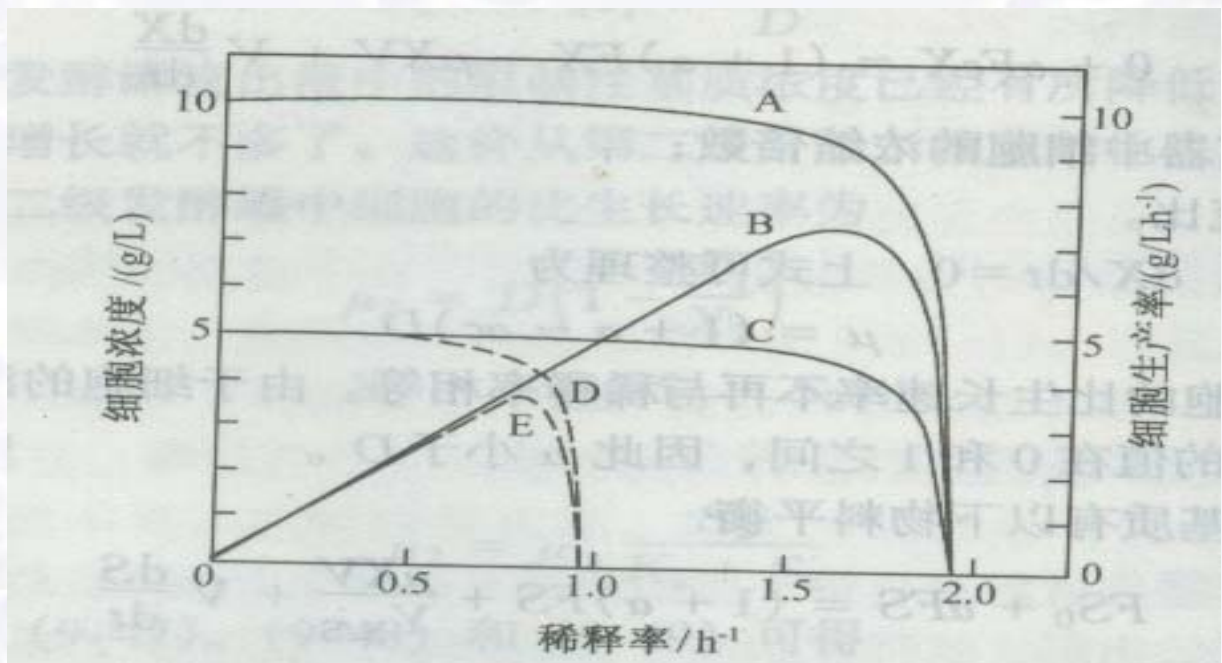
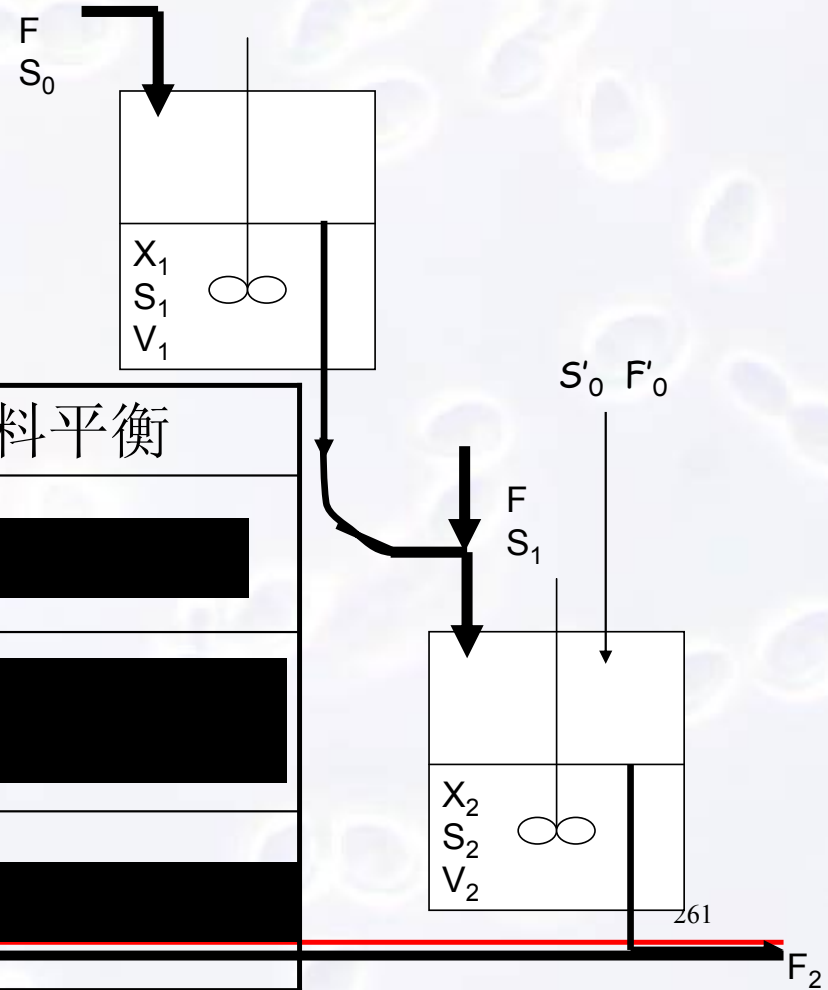


图 9-9 细胞回流与不回流的单级连续培养的比较
 A. 细胞回流时的稳态比较；B. 细胞回流时的稳态 DX ；
 C. 细胞回流时的稳态 X_c ；D. 细胞不回流的稳态 X ；
 E. 细胞不回流的稳态 DX (参考俞俊棠等, 1997)

4、多级连续培养



	X物料平衡	S物料平衡
F_{mentor_1}		
F_{mentor_2} (不补加)		
F_{mentor_2} (补加)		

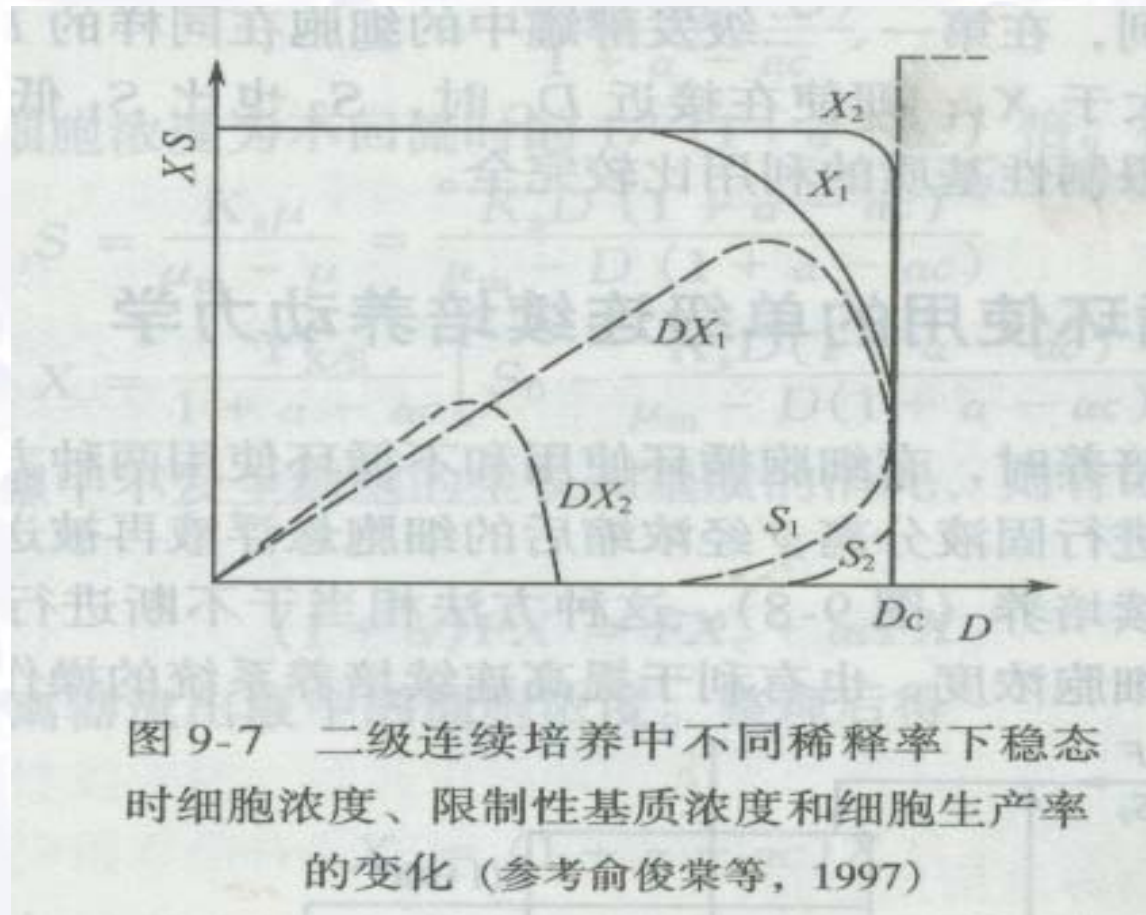


图 9-7 二级连续培养中不同稀释率下稳态时细胞浓度、限制性基质浓度和细胞生产率的变化 (参考俞俊棠等, 1997)

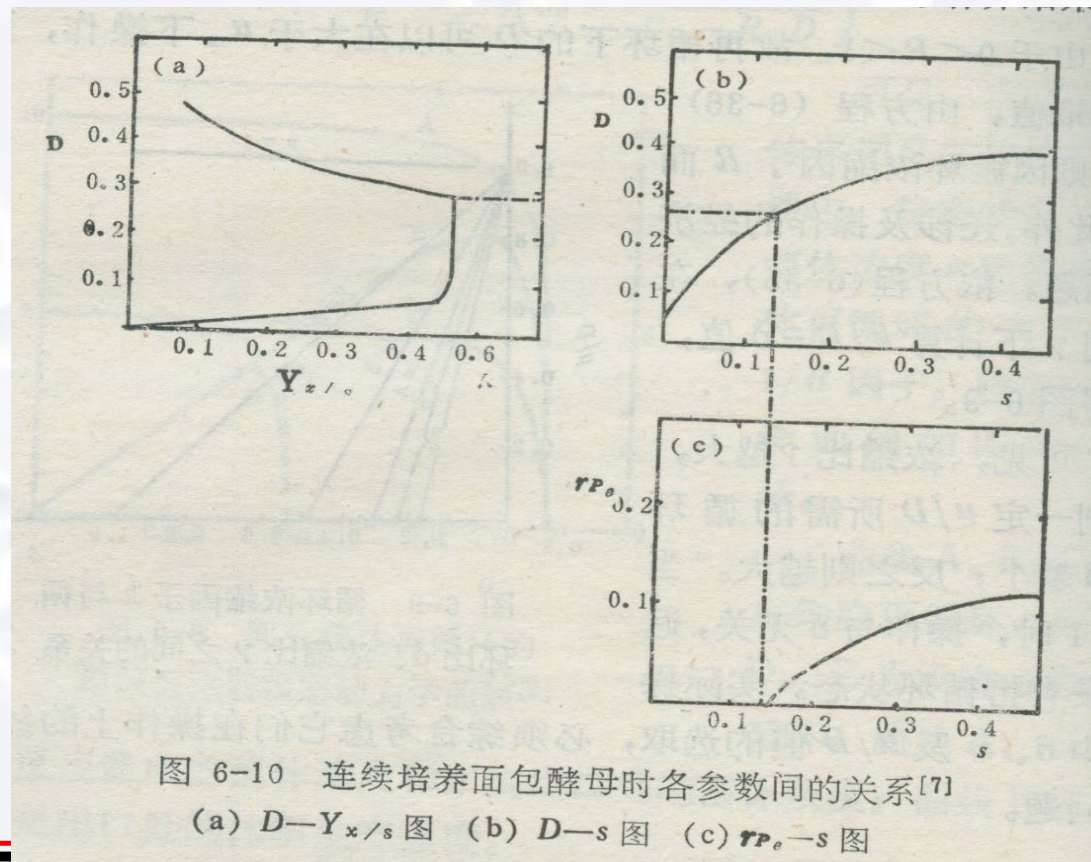
5、连续培养动力学的应用

- 确定最佳培养条件
- 富集，选育特殊形状菌种
 - 建立选择性的培养环境
 - 生长速率不同的菌种在连续培养中的“去”“留”。

确定最佳培养条件

- 在发酵生产中，一般所关心的问题是：
 - 如何获得最大的生产强度；
 - 在怎样的环境条件、生长速率下可取得最高的转化率；
 - 控制什么限制性底物，在何种浓度水平下才能最大限度地避免其它副产物形成。

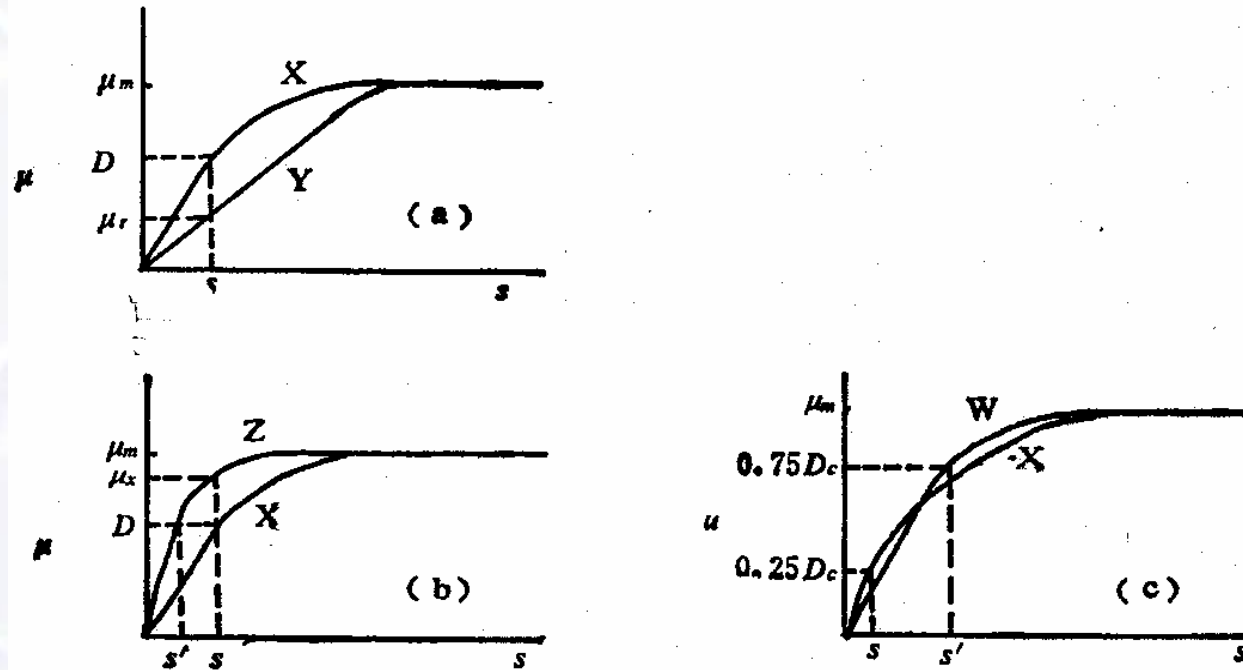
- 例如面包酵母的培养



建立选择性的培养环境

- 应用独特的限制性底物、培养的温度、pH极端值、添加各种生长促进或抑制物质等，能够建立起具有高度选择性的培养环境。

生长速率不同的菌种在连续培养中的“去”“留”。

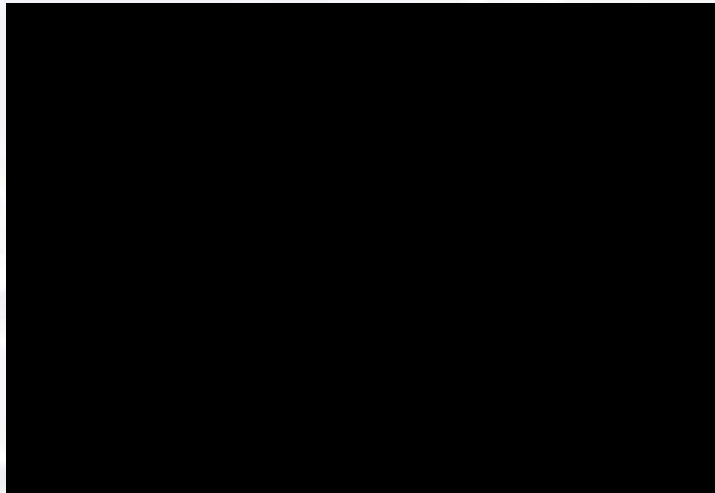


$\mu_Y < \mu_X$
 $\mu_Z > \mu_X$
 μ_W 与 S 的
 浓度有关

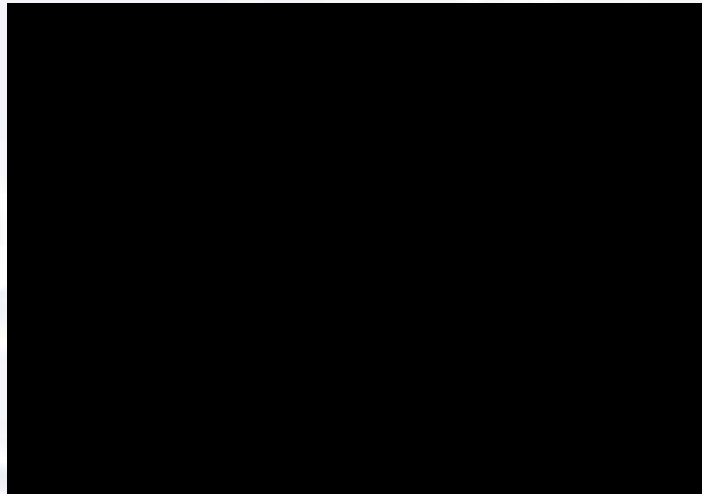
图 6-12 杂菌Y、Z和W与微生物X在连续培养中比生长速率与限制性底物浓度的关系^[6]

(a) Y与X (b) Z与X (c) W与X

对于Y



对于Z



Z的积累导致导致S浓度的下降，建立新的平衡。

对于Z

- $D=0.25D_c$ 时，比生长速率小于X;
- $D=0.75D_c$ 时，比生长速率大于X;

第六节 发酵过程优化

一、概述

- 如何才能更好地发挥现代生物技术的作用？
- 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)

1、发酵过程优化的主要研究内容

- 第一个方面是细胞生长过程研究
- 第二个方面是微生物反应的化学计量
- 第三个方面是生物反应过程动力学的研究
（主要研究生物反应速率及其影响因素）
- 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）

2、发酵过程优化的目标

- 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。
- 发酵过程优化的基础是进行生物反应宏观动力学和生物反应器的研究。

3、如何实现发酵过程的优化控制？

生物反应过程动力学



动力学模型的建立



发酵过程优化控制

实现发酵过程优化控制的过程

- 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

非结构模型

- 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，即细胞的生长处于所谓的平衡生长状态，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关联模型

结构模型

- 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，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

生物反应器工程的研究内容

- 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

4、发酵过程优化的研究进展

- 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
- 40年代末一门反映生物和化工相交叉的学科——生化工程诞生
- 1954年，Hasting指出，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
- 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
- 20世纪60年代中期，建立了无菌操作的一整套技术

发酵过程优化的研究进展

- 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
- 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

发酵过程优化的研究进展

- 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
- 生化反应工程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

实现发酵过程的优化与控制，必须解决的五个问题：

- (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

运用生物反应工程原理进行发酵过程优化控制的研究

- 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告居多

二、发酵过程优化原理

- ▶ 发酵过程优化的微生物反应原理
- ▶ 发酵过程数量化方法
- ▶ 微生物反应动力学
- ▶ 微生物反应优化的一般原理

1、发酵过程优化的微生物反应原理

(1) 大肠杆菌生长过程中观察到下列现象：

- 在大肠杆菌快速生长期，生物合成的中间体很少渗漏到胞外培养基中，结构单元(氨基酸、核酸等)的合成速率和聚合形成大分子的速率一致
- 大肠杆菌胞内的大分子物质随比生长速率而变化
- 一旦生长培养基中的结构单元足够，细胞就不再合成这些物质
- 特定的代谢途径代谢特定的底物，只有底物存在时，细胞才合成相应的酶
- 若两个不同的底物同时存在于培养基中，细胞先合成能在一种底物上以较高比生长速率生长的酶系，当这种底物消耗完毕，再合成利用另一底物的酶。

285

(2) 细胞生长过程可分为三个步骤:

- 底物传递进入细胞
- 通过胞内反应，将底物转变为细胞质和代谢产物
- 代谢产物排泄进入非生物相，即胞外培养基

(3) 底物、代谢产物和细胞质成分的定义为：

- 底物是一种存在于初始非生物相或者摄入物中起作用的可交换的化合物
- 代谢产物是一种作为代谢物产生于某代谢途径进入非生物相的化合物
- 细胞质成分是一种细胞利用底物产生的不可交换的化合物

- 研究表明在膜上可能存在三种不同的运输机制：
 - (1) 自由扩散
 - (2) 协助扩散
 - (3) 主动运输
- 前两种机制是沿着浓度梯度进行运输，是被动的过程，在运输过程中不需要提供外部能量。而主动过程逆着浓度梯度进行运输，需要输入一定的吉布斯自由能。

微生物体内不同底物和代谢产物的扩散过程

化合物	细菌	真菌
氨基酸	主动运输	主动运输
葡萄糖	主动运输	协助扩散和主动运输
乳糖	主动运输	协助扩散和主动运输
甘油	自由扩散, 协助扩散	自由扩散, 协助扩散
乙醇	自由扩散	自由扩散
乳酸	主动运输和自由扩散	自由扩散
乙酸	自由扩散	自由扩散
二氧化碳	自由扩散	自由扩散
氧气	自由扩散	自由扩散
水	自由扩散	自由扩散

(4) 微生物细胞的胞内反应

- 分解代谢反应
 - 糖类在转化为代谢产物(CO_2 、乳酸、乙酸和乙醇等)的同时,还形成ATP、NADH和NADPH。NADH和NADPH都在分解代谢反应中产生,但NADPH主要消耗于合成代谢中,NADH则主要消耗于分解代谢途径,如氧化磷酸化
- 生物合成和聚合反应
 - 为了合成细胞物质,需要合成结构单元并将其聚合。合成蛋白质需消耗大量的自由能,细胞一般根据其自身需求来调节蛋白质的合成,其合成由蛋白质合成系统(PSS)负责,该系统中核糖体是主要部分
 - *E. coli*中大约70%的能量和还原力用于合成蛋白质

合成*E. coli*细胞对前体代谢物的需求

前体代谢物	分子式	摩尔质量(g/mol)	需要量($\mu\text{mol/g}$ 细胞)
6-磷酸-葡萄糖	$\text{C}_6\text{H}_{13}\text{O}_9\text{P}$	260	205
6-磷酸果糖	$\text{C}_6\text{H}_{13}\text{O}_9\text{P}$	260	71
5-磷酸核糖	$\text{C}_5\text{H}_{11}\text{O}_8\text{P}$	230	898
4-磷酸赤藓糖	$\text{C}_4\text{H}_9\text{O}_7\text{P}$	200	361
3-磷酸甘油醛	$\text{C}_3\text{H}_7\text{O}_6\text{P}$	170	129
3-磷酸甘油酸	$\text{C}_3\text{H}_7\text{O}_7\text{P}$	186	1496
磷酸烯醇式丙酮酸	$\text{C}_3\text{H}_5\text{O}_6\text{P}$	168	519
丙酮酸	$\text{C}_3\text{H}_4\text{O}_3$	88	2833
乙酰辅酶 A	/	/	3747
α -酮戊二酸	$\text{C}_5\text{H}_6\text{O}_5$	146	1079
琥珀酰辅酶 A	/	/	/
草酰乙酸	$\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_5$	132	1787

•细胞合成所需要的结构单元数在75~100之间，这些物质都是从12种前体代谢物合成得到的，这些前体代谢物就是分解代谢反应的中间产物，因此分解代谢在细胞生长过程中起着双重的作用(为生物合成提供能量和前体代谢物)

- 次级细胞代谢

- 细胞代谢和生长过程偶联在一起的过程，称之为初级代谢
- 但许多工业上重要的产品，其合成反应并不与生长过程偶联，我们称之为次级代谢，这些反应合成的产物叫次级代谢产物，就象初级代谢形成的产物叫初级代谢产物一样
- 乳酸是初级代谢产物，但它是乳酸菌在非生长条件下形成的，许多其它的初级代谢产物也同样是在非生长条件下产生的

2. 发酵过程数量化方法

- 发酵过程的数量化处理包括：
 - 发酵过程的速度
 - 化学计量学和热力学
 - 生产率、转化率和产率
- 只有当变量可测量时，才有可能对发酵过程进行数量化处理

3、微生物反应优化的一般原理

(1) 发酵过程优化的一般步骤

- 反应过程的简化：是指把工艺过程的复杂结构压缩为少数系统，这些系统可以用关键变量来表示
- 定量化：系统、准确地检测发酵过程的各种参数
- 分离：是指在生物过程和物理过程的各种速度相互不影响的情况下，精心设计实验以获得关于生物和物理现象的数据

- 数学建模

- 数学模型是能以简化的形式表征过程行为，并实现特定目的的数学公式
- 数学模型可将特定结果通用化，并为推论系统的其它性质提供基础
- 建立数学模型的主要目标是：
 - (a) 为了预见任何系统的转化率或生产率；
 - (b) 用以检查在各种操作条件下工厂操作的性质和行为，检查模型适用的范围(包括外推性)；
 - (c) 用于进行工艺优化和计算机模拟；
 - (d) 用于检测出可能重要但被忽视了的参数；
 - (e) 检查是否已有效地区分生物现象和物理现象；
 - (f) 有助于阐明反应机理

— 微生物反应动力学模型的分类

模型类型	着眼点	说明
A 概率论模型	微生物个体	必须考虑每个细胞的差异，以说明某一特定现象；或用以说明平均值附近的波动情况
B 决定论模型	微生物群体	不考虑每个细胞的差异，而是取菌体性质及数量的平均值进行数学处理
B-1a 均相模型	微生物群体	是一种认为菌体均匀分散于培养液中，可作为均相处理的决定论模型。
B-1b 生物相分离模型	微生物群体	是将菌体作为与培养液(连续相)分离的生物相处理所建立的决定论模型。这种模型需要说明培养液与菌体间的物质传递及分配效应。在高菌体浓度时，考虑微生物所占的体积分率，以及解析废水生物处理过程中洒水滤床和旋转圆盘的微生物膜，都是利用生物相分离模型。
B-2a 结构模型	微生物群体	考虑菌体组成的变化，将活菌体和死菌体分别处理从而建立的模型。在单一菌体的结构模型中，将整个菌体分为两种或两种以上成分，并认为代谢过程是各种成分共同作用的结果。均相模型和生物相分离模型都可分别构成结构模型
B-2b 非结构模型	微生物群体	与结构模型的主要区别在于它不考虑细胞组成的变化。

建立数学模型的一般原则

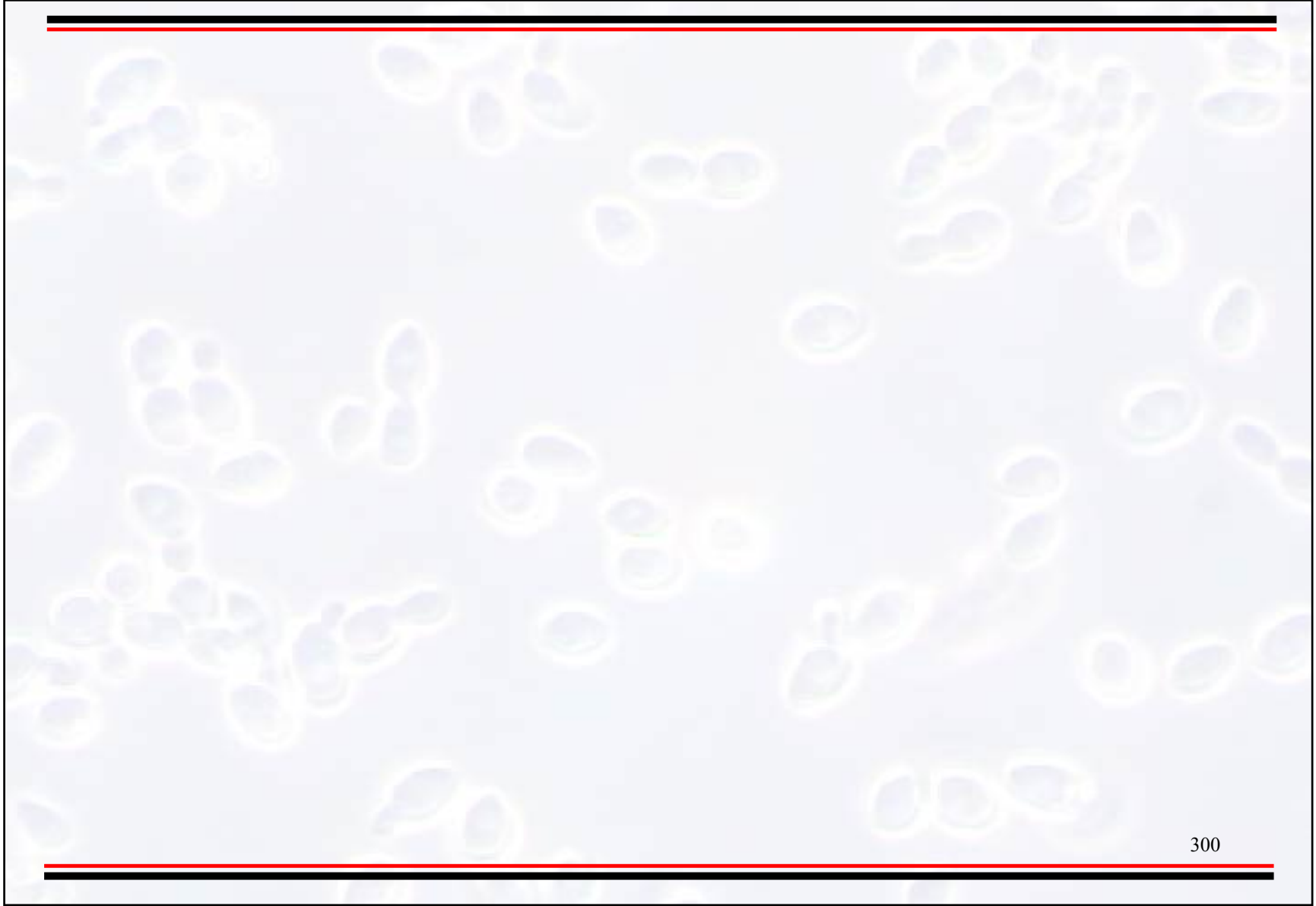
- **原则**从工程角度来看，要建立比较理想的模型应遵循以下原则
 - 首先要明确建立模型的目的。除为了深入研究微生物生长这一复杂现象之外，多数是为了设计微生物反应器、探索最优操作条件，或者对反应过程进行最优控制
 - 要明确建立模型的假设，从而明确模型的适用范围。
 - 模型中所含的参数，最好能分别通过实验测定。
 - 模型应尽量简单。
- 据以上4点，可以说决定论的均相模型最合适，且使用方便。
- 微生物是微生物反应的主角，所以希望由底物得到目的代谢产物的量最大，或者像废水的生物处理过程那样希望底物消耗量最大时，根据对微生物生长速率的影响来考虑环境条件。单一细胞或悬浮絮凝物微生物的反应动力学研究的核心是微生物的生长速率。

(2) 分批微生物反应过程的优化

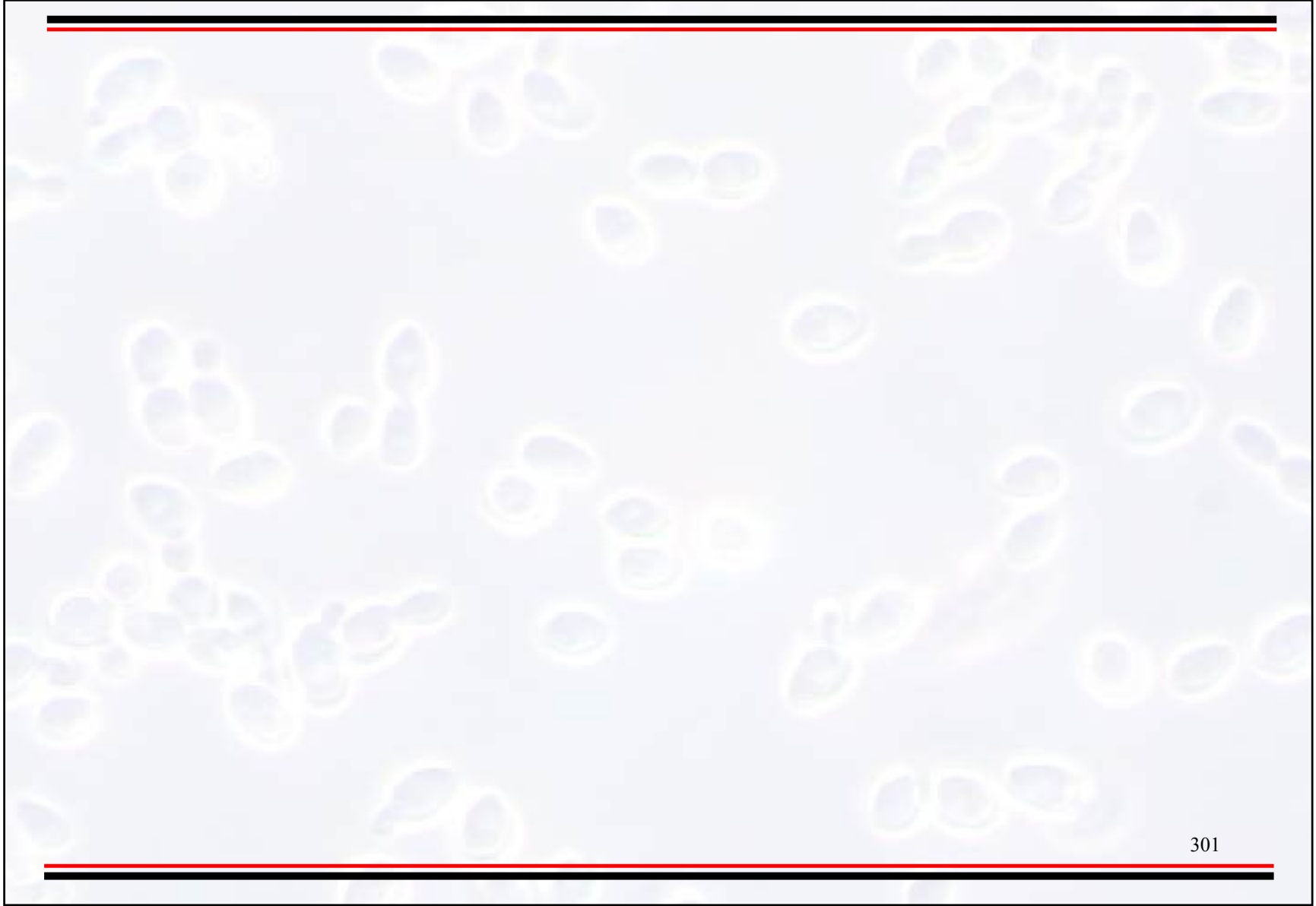
- 最优化的目标函数：产量、生产率、纯利润等，有时也对这些指标的其中二个以上进行多目标函数优化
- 最优化的操作变量：反应时间、培养基组成、温度、pH、溶氧等
- * 培养基组成的优化
 - 预先设定 X_T 为最大菌体浓度，则由可得到底物 S_i 的初始浓度为：

$$S_{i,0} = \frac{1}{Y_{X/S_i}} (X_T - X_0)$$

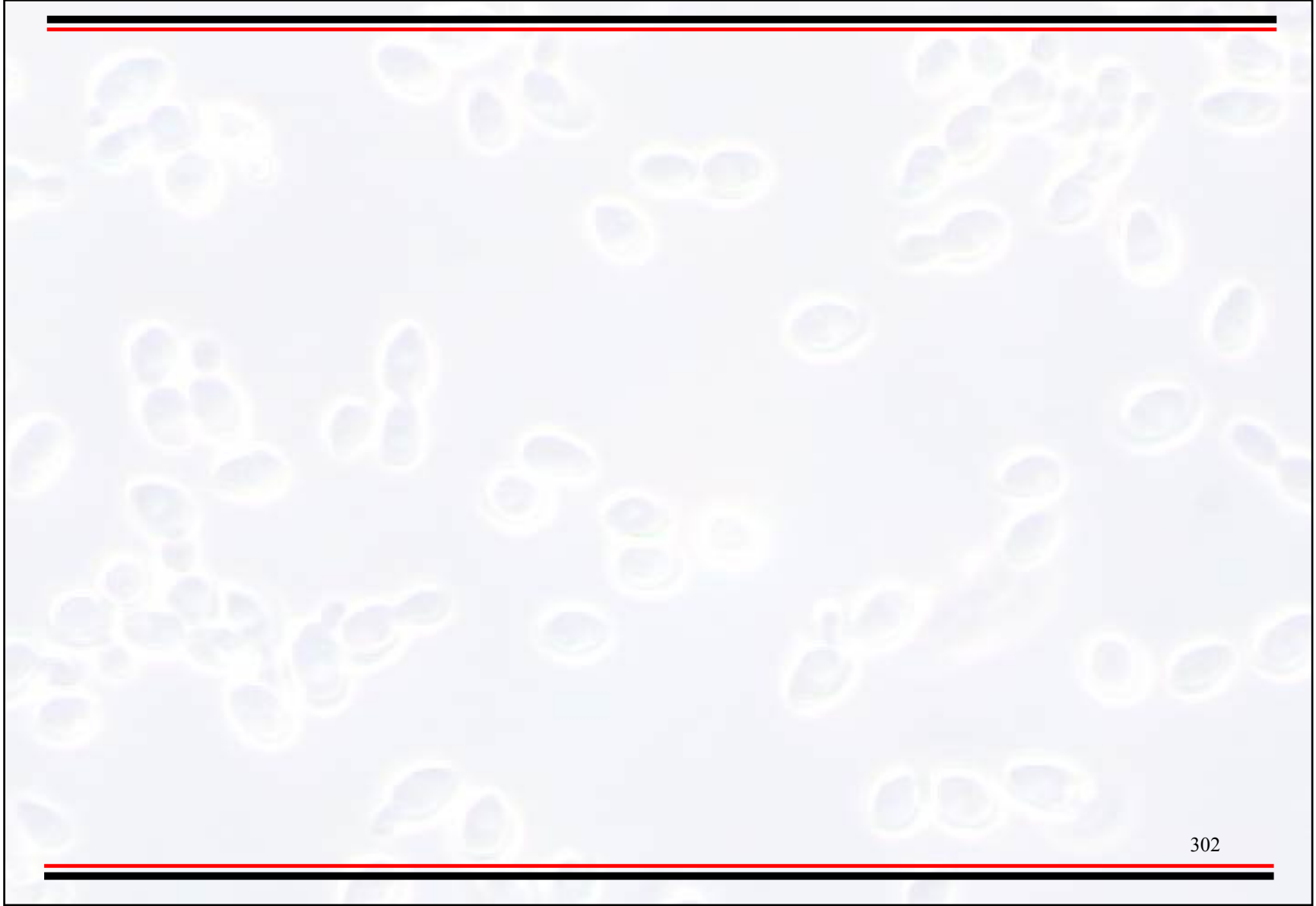
- 无机离子或生长因子等一旦被细胞吸收，在细胞内保持原化学状态，且含量恒定不变。这类营养物质称为储存性底物。可根据这些物质在菌体内的实际含量，用类似于上式的方法确定其需要量
- 当代谢产物的产量与培养基组成之间的关系很复杂，不能用解析函数的方式表示时，可采用实验设计法确定最优初始浓度
- 利用最优实验设计法，即使不能提高产量，也可探索培养基组分的最小需用量，从而避免不必要的浪费

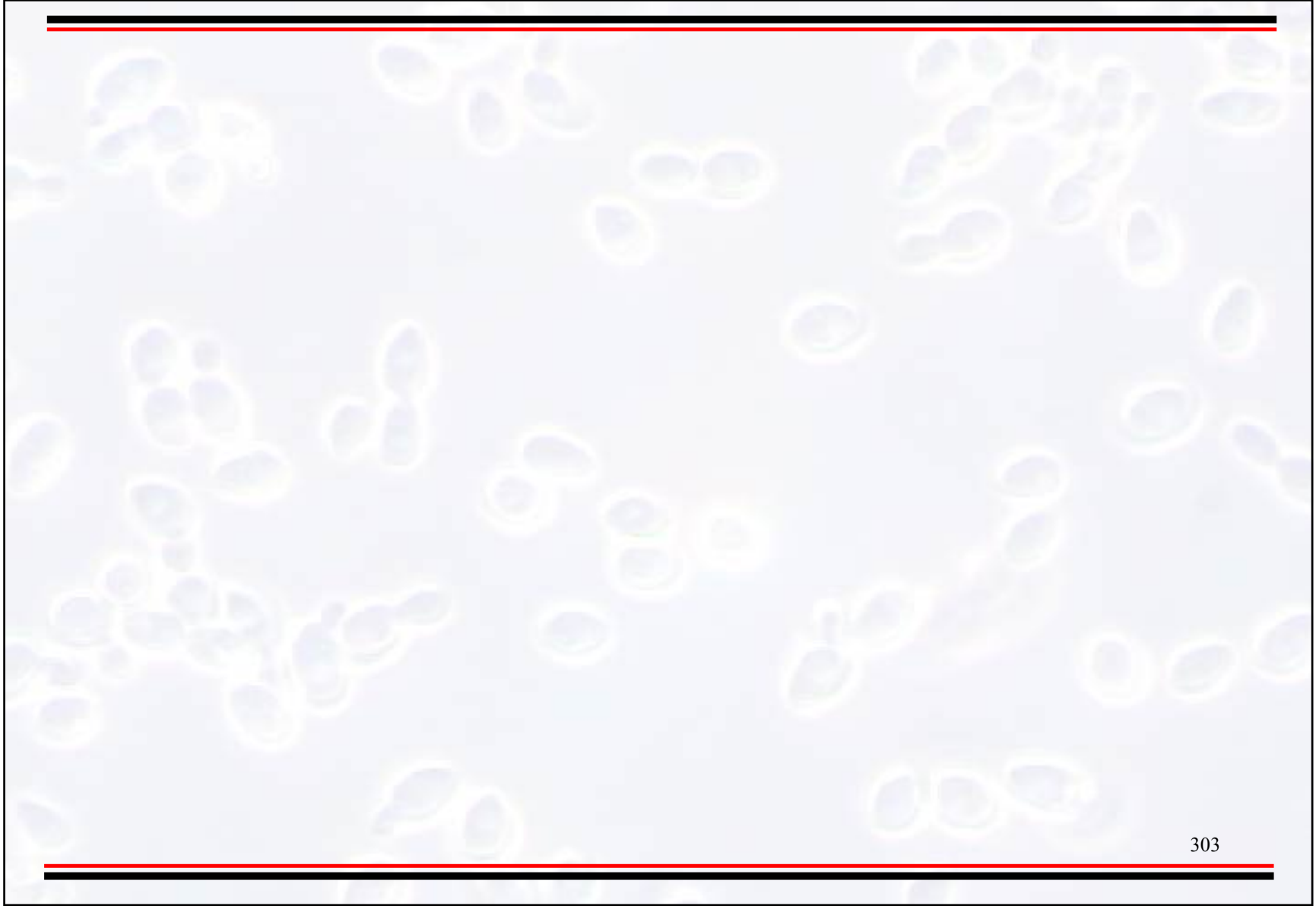


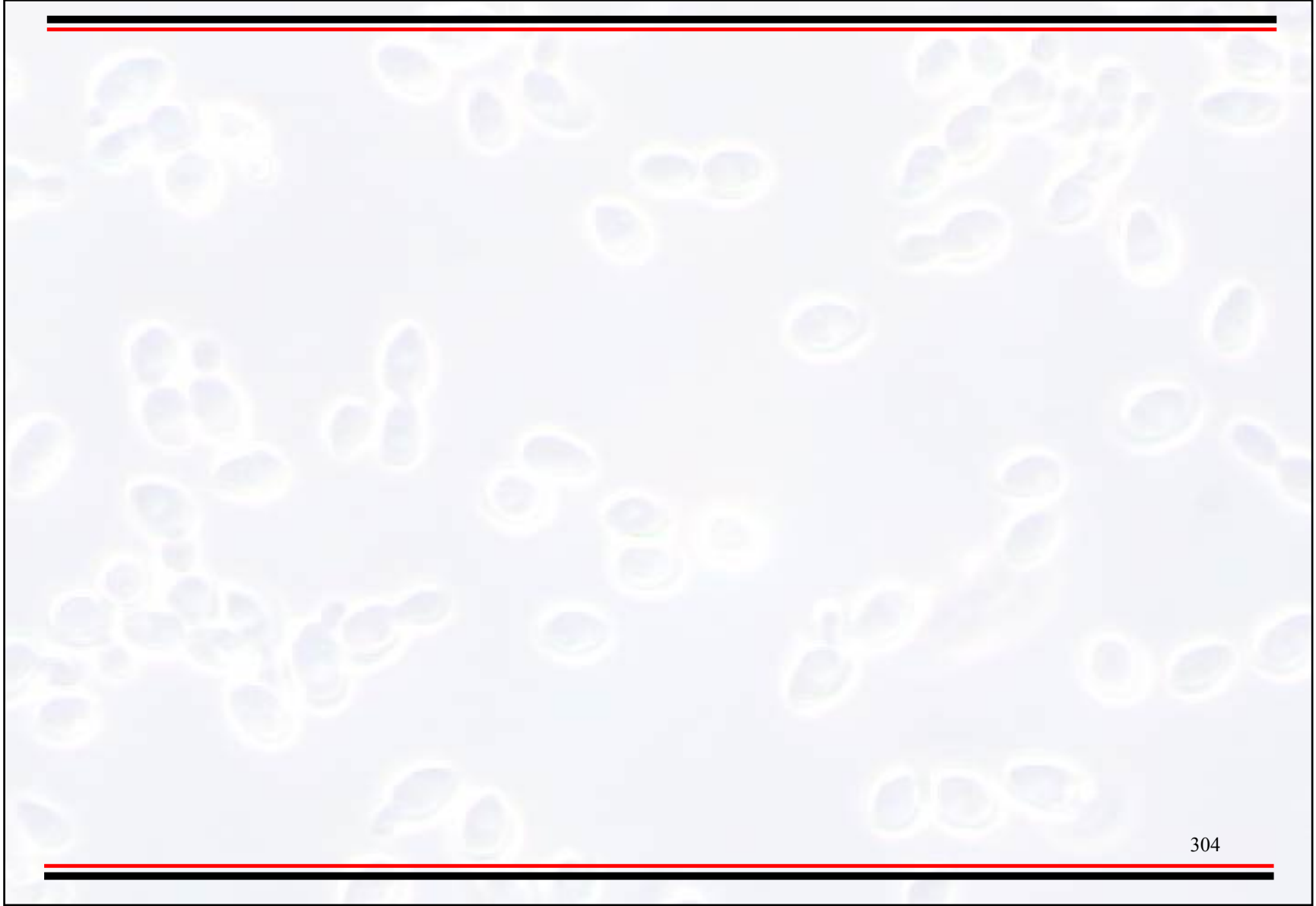
300

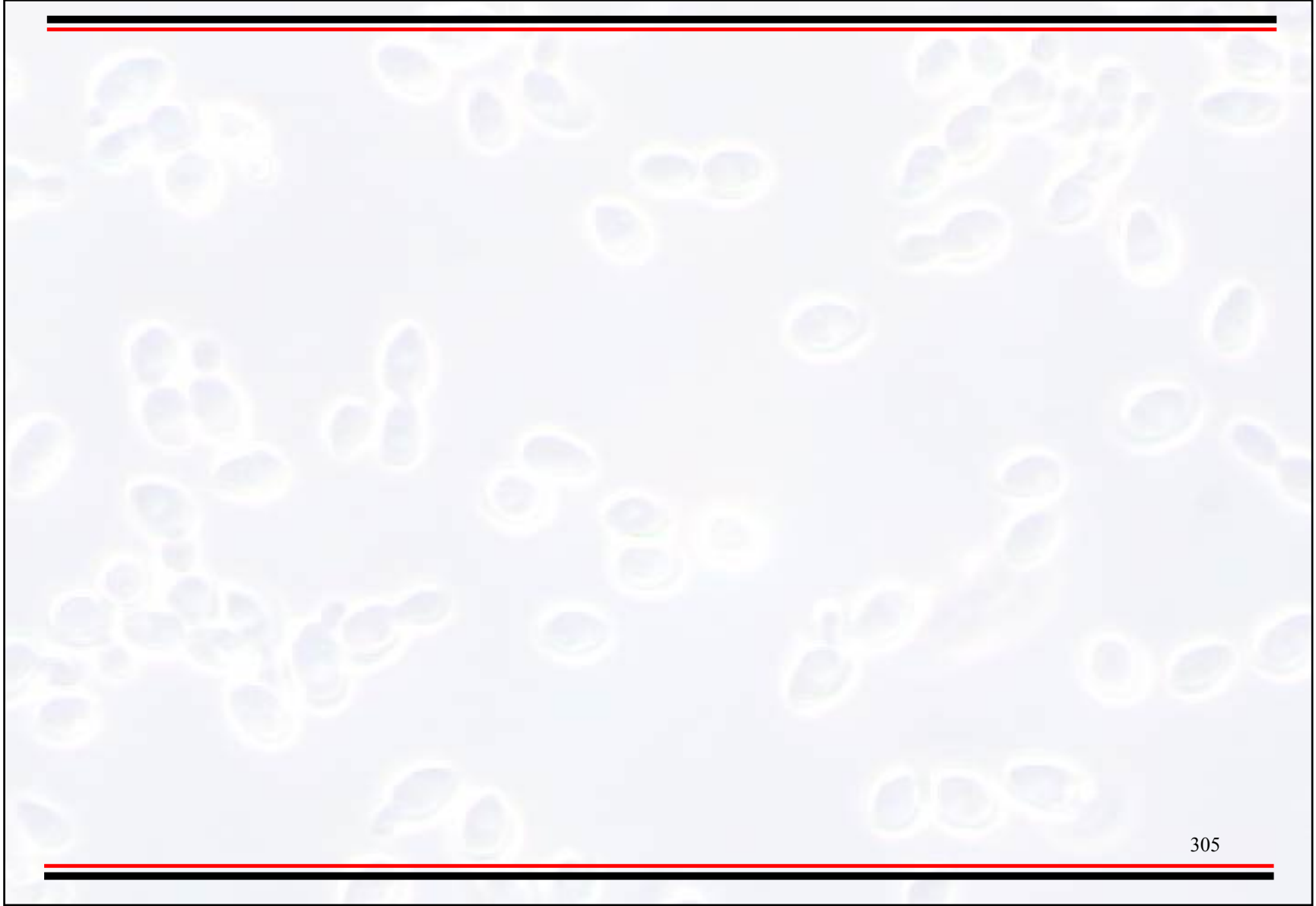


301









305

