

发酵过程多水平问题及其生物反应器装置技术研究

——基于过程参数相关的发酵过程优化与放大技术

张嗣良

(华东理工大学生物反应器国家重点实验室 国家生化工程技术研究中心, 上海 200237)

【摘要】 回顾了发酵过程优化与放大所依据的基本思想和方法, 认为采用以动力学为基础的最佳工艺控制点为依据的静态操作方法, 实质上只是化学工程宏观动力学概念在发酵工程上的延伸, 往往忽视细胞代谢流的存在。以细胞代谢流的分析与控制为核心的生物反应工程学的观点, 通过实验研究, 提出了基于参数相关的发酵过程多水平问题研究的优化技术和发酵过程多参数调整的放大技术。随着过程传感技术和计算机技术的发展, 设计了一种定型为 FUS-50L (A) 的新概念生物反应器。这种新型生物反应器是以物料流检测为手段, 过程优化与放大为目标, 成功地应用在青霉素、红霉素、金霉素、肌苷、鸟苷发酵和 *Pichia* 酵母表达系统的基因工程人血清白蛋白 (rh-SA)、疟疾疫苗等高密度高表达培养, 大幅度提高发酵水平, 并直接放大到几百升, 甚至 100 m³ 以上生产规模发酵罐。

【关键词】 生物反应器; 发酵; 优化; 放大

发酵工程是细胞大规模培养技术中最早被人们认识并发展利用的。迄今, 利用发酵技术进行包括医药、轻工、食品、农业、环保等产品生产, 在国民经济中占有很大比重, 可以分为以常规微生物的传统生物技术和以基因工程细胞培养的现代生物技术产业, 无论对当前或今后发展均具有重要的经济和社会意义。作者试图从工程学原理讨论发酵工程技术和作者实验室的一些研究成果, 以便推动以生物反应器为基本装置的细胞大规模培养技术的进步。

1 发酵工程中涉及的主要技术问题与工程学观点

为了提高发酵生产水平, 人们首先考虑的是菌种选育或基因工程构建, 往往忽视了生物反应器中工程问题所必须加以考虑的工艺变化和过程优化。在得到一个高产菌株后, 随后的逐级放大与优化基本上是以最佳工艺控制点为依据, 采用人工经验为

主的静态操作, 在方法上基本以正交试验为基础。发酵过程优化与放大始终是生化工程中一个复杂问题的二个侧面, 人们从不同的角度进行研究。

随着对细胞大规模培养技术的深入研究和对分批培养为主要对象的发酵过程参数的时变性、多样性、耦合性和不确定性的认识, 建立了以过程动力学为基础的数学模型, 引进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、直到各种混沌现象的研究^[1-6], 以实现过程优化。这种适应发酵过程非线性特征的研究方法对细胞大规模培养技术研究的深入开展以及提高学术研究水平起到很大的推进作用。但是, 也应该看到, 在实际工厂生产上仍有很大局限性, 效果不明显。

从发酵过程放大来说, 有人把“放大”分为两个基本问题, 其一是发酵条件的研究与设计; 其二是设计满足这些过程条件的反应器。就某种意义上, 第一个问题实质上是发酵过程动力学的问题,

【收稿日期】 2001-03-05; 修回日期 2001-05-19

【基金项目】 国家自然科学基金资助项目 (29976013)

【作者简介】 张嗣良 (1940-), 男, 浙江温州市人, 华东理工大学教授, 博士生导师

第二个是工程水平的传递和混和问题。必须认识到,除非完全以微生物反应动力学与周围环境传递条件相结合的模型建立,否则过程放大最终还是落实到系统几何相似、流体运动学相似和流体动力学相似等,具体来说有因次分析法、经验法则法、综合机理的数学模拟法以及时间常数法等放大方法^[7-9]。事实上,要同时满足这些相似条件是不可能的,于是,发酵过程放大仍旧是一个使人感到困惑的问题,从摇瓶到发酵罐的差异,甚至尽可能采用同样的操作条件,只不过发酵罐的容积从几十升放大到几十立方米,但结果往往面目全非。

作者认为造成上述问题的一个重要原因是研究发酵过程特点的基本方法是采用动力学为基础的最佳工艺控制点为依据的静态操作方法,实质上这只是化学工程宏观动力学概念在发酵工程上的延伸。例如,用氨水调节 pH 时,关心的是最佳 pH 值,却不注意氨水加量的动态变化及其与其他发酵过程参数的关系。在溶解氧浓度 w_{DO} 测量与控制时,关心的是最佳值 w_{DO} 或其临界值,而不注意细胞代谢时的摄氧率 R_{OUR} ,以及由此所引起的一系列参数相关特性。显而易见,用在以活细胞代谢为主体的发酵过程优化与放大时就有很大的局限性,应该重视过程中细胞代谢流的存在及其变化。有关细胞代谢流的问题,并不是什么新发现,特别是近年来细胞代谢工程的研究结果,有关代谢流的分布、基因水平和细胞水平的代谢调控研究文献大量报导^[10-13],但是一到发酵罐实际操作时,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最佳的温度、pH、 w_{DO} 等。因此,在发酵过程优化时就忽视了细胞代谢流的变化;在过程放大时,除非一些特例,基本上不可能建立完全的微生物反应动力学与周围环境传递条件相结合的模型,发酵过程优化与放大仍旧是个困难的问题。

针对上述情况,作者提出了以细胞代谢流分析与控制为核心的发酵工程学的观点:

1) 在生物反应器中所发生的反应是在分子水平的遗传特性,细胞水平的代谢调节和工程水平的传递特性 3 个水平上发生的,只要某一个因素成为限制条件,就会对生产产生严重影响。

2) 必须高度重视细胞代谢流分布变化的有关

现象特征的获得。以活细胞为对象的生物反应过程产物实质上是细胞代谢产物,胞内基因水平的信息流决定了细胞代谢流分布的空间与时间的基本特征,而反应器只是在环境条件和过程传递特性上,从物料和能量供应上对这一代谢流产生影响,正如 Seriven^① 文中所述:细胞的基因属性 (genotype) + 环境 = 细胞的表性 (phenotype)。当前生物工程技术发展的特点是化学工程与生物技术的深度结合;由宏观推向微观,强调在生物技术深入发展的认识基础上,以微尺度的工程学观点研究过程特性。

3) 细胞代谢物质流与生物反应器物料流变化的相关性,是研究上述 3 个水平问题并实现过程的数据优化和放大的基本观点和内容。Konstantlinov 和 Stephanopoulos^[14,15] 曾对生物反应器的物料及控制模块特性进行研究,图 1 是反应器物料流及变量控制示意图,由图可以看出细胞代谢物质流与反应器物料流之间的关系。生物反应器 (BR) 是一个相对简单的物理系统,其状态可由环境变量 (EVs) 描述,细胞生长 (CP) 是复杂系统,其状态只能由生长变量 (PVs) 部分描述,常规控制只是对 BR 的操作变量 (MV) 和 (EVs) 之间实现闭环控制,被排除在闭环回路之外的 CP 只能通过 IFB (内部反馈) 间接地发生作用,有时甚至还被作为噪声来处理,由此可见常规优化控制的局限性。作者认为必须高度重视 CP 的生长变化,应尽可能多地从变量 (PVs) 中得到有实际价值的分析,并进一步通过建立 PVs、MV 与 EVs 三者之间的关系,从关系特征中区分不同水平问题,才能有效地实现发酵过程优化。

4) 由上可知,生物过程的复杂性和高度非线性等诸多因素以及多容量过程特征,使系统具有动态性和难以预测性。用一个线性或拟线性关系的数学模型只能粗略地反映过程的状态,远远满足不了控制优化所需要的因子效果的响应关系。因此,对工业规模的发酵生产工艺的优化,作者建议采用非模型的处理方法,重视发酵过程参数趋势曲线相关的研究方法,即所谓数据驱动型的方法。

根据以上观点,作者对不同规模生物反应器试验装置进行了专门设计研究,并提出了基于参数相关的发酵过程多水平问题研究的优化技术和发酵过

① Seriven J. Coursebook of international training programme in ind. biotech. Part Z, Scal-up of bioreactor, GBF Germany, 1994

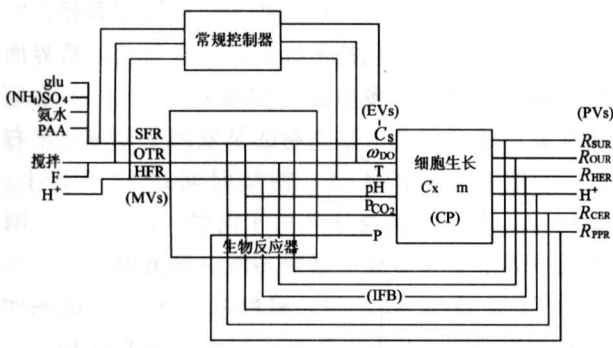


图 1 生物反应器物料流及变量控制示意图

Fig.1 Material flux and variable control in the bioreactor

程多参数调整的放大技术，对不同发酵产品进行了实验研究，取得了较满意的结果。

2 用于发酵过程数据优化与放大的装置

作者从生物反应器中物料流检测的观点出发，在实验室规模发酵罐配置了包括发酵液真实体积、高精度补料量与尾气 CO₂ 和 O₂ 分析仪在内的 14 个以上在线参数检测或控制。设计研制成能输入实验室手工测定参数的计算机控制与数据处理系统，由此可进一步精确得到发酵过程优化与放大所必须的包括各种代谢流特征或工程特征的间接参数，如摄氧率 R_{OUR} 、二氧化碳释放率 R_{CER} 、呼吸商 x_{RQ} 、氧体积传递系数 (K_{La})、比生长速率 (μ) 等。在装置研究的基础上，形成了商品化实验室生物反应器，定型为 FUS-50L (A)^[16]，发酵罐体积可为 50 L 以上。图 2 为计算机参数检测与控制系统示意图，图 3 为该装置的整机照片。

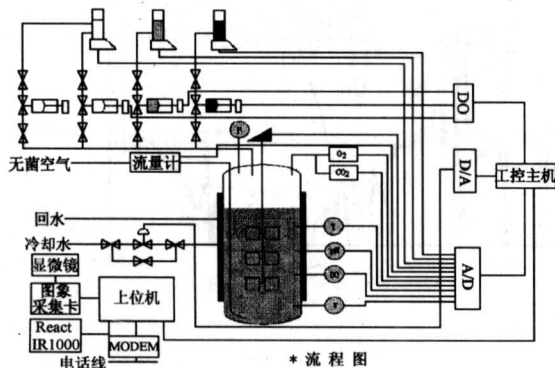


图 2 发酵过程计算机参数检测与控制示意图

Fig.2 Parameters monitoring and fermentation process

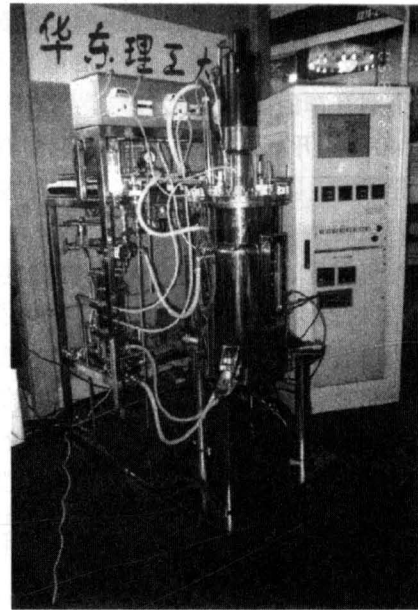


图 3 FUS-50L (A) 实验室发酵罐

Fig. 3 FUS-50L (A) lab. fermentor

研制能反映细胞代谢物质流所引起的生物反应器物料流变化的相关特性的计算机软件，是研究细胞与工程水平问题并实现过程数据优化与放大的最重要内容。作者集中力量开发了一个适应多种反应器特点，融合多种过程理论和控制理论，便于发酵过程工艺分析和优化操作的软件包，该软件包也可以通过远程通讯在异地进行数据传送和分析，定名为 BIORADAR^[16]。

3 不同产品的发酵过程优化与放大技术研究

3.1 概述

“八五”期间在华北制药厂以青霉素发酵为对象，通过参数相关分析，发现了发酵过程中物料平衡与不平衡问题是关键，进而发现了青霉素发酵过程中除溶氧外，发酵液的混合和传递特性所引起的溶解二氧化碳的重要影响，提出了克服措施，提高发酵单位 30% 以上^[17]。“九五”期间，以西安利君制药厂的红霉素发酵为对象，在多参数调整的放大技术指导下，通过工艺逐渐调整，水平提高 60% 以上，打破了我国红霉素发酵水平停滞不前达 20 多年之久的局面，进入了国际先进水平。为内蒙古金河工程开展饲料金霉素发酵过程优化与放大研究，在 FUS-50L (A) 实验室发酵罐进行实验研究达到了预定目标后，直接放大到 120 m³ 生产

罐规模，并采用了网络数据通讯技术，实现 1 500 km 外的远程发酵过程诊断，提高发酵水平 30% 以上，一个刚开车的 180 m³ 发酵罐生产车间生产能力提高 40%。开展了基因工程微生物高密度、高表达培养研究，其中特别是毕赤酵母表达系统研究，以基因工程人血清白蛋白 (rh-SA) 为例，在计算机软件包引导、控制下，克服了高密度培养零水平 w_{DO} 值时必须通纯氧的问题，效果提高 10 倍，并成功地放大到 500 L 规模，为建立规模化工厂生产作重要准备。此外，广东星湖公司的鸟苷发酵由 16 g/L 提高到 29 g/L，顶住了国际价格降低到 1/3 的竞争局面。上海二军医大的基因工程疟疾疫苗由 70 mg/L 提高到 2.6 g/L。其他有关研究也正在进一步开展。

3.2 红霉素发酵过程优化与放大

有关红霉素链霉菌产生红霉素的生物合成研究文献很多，红霉素生物合成的过程也较清楚，有的已深入到生物合成基因簇水平^[18]，但是如何把这些生理调控的研究与正在进行的发酵过程优化控制联系起来，未能得到很好解决。例如，大量生产经验告诉我们：黄豆饼粉是红霉素高产发酵的最佳氮源，但在具体发酵操作时很难解释它的作用机理，

只得靠一批批的试验和经验积累。采用作者提出的参数相关研究的优化技术以后，由计算机人机界面得到如图 4 所示的多参数代谢曲线，其中 I_{glu} 为葡萄糖流加速率。令人感兴趣的是发酵初期 9 h 左右的 x_{RQ} 值有明显的下降，持续时间达 15 h 以上。这种 x_{RQ} 值的下降也许是由于乙酰 CoA 在羧化酶作用下固定 CO₂ 形成甲基丙二酸。但值得注意的是 x_{RQ} 的下降峰与 R_{CER} 的下降峰同时发生，这期间一旦加入葡萄糖， x_{RQ} 又对应回升，说明这种 x_{RQ} 下降是利用还原性较高的基质作为碳源引起的，这只能是黄豆饼粉。从文献可知，某些氨基酸的利用有利于甲基丙二酰 CoA 的形成，计算机在线数据采集所得结果说明了黄豆饼粉以碳骨架通过氨基酸代谢进入菌体，有利于红霉素大环的形成。也有人进一步认为这是通过诱导作用启动编码抗生素合成酶的基因表达，加强次级代谢产物合成酶的合成，而时间正恰发生在高比生长期末。从控制论来说，这也是典型的混沌现象。曲线相关分析还进一步提出了黄豆饼粉利用的时间，利用方式和不同碳源间的竞争性利用特性，为过程工艺优化提供了重要线索。

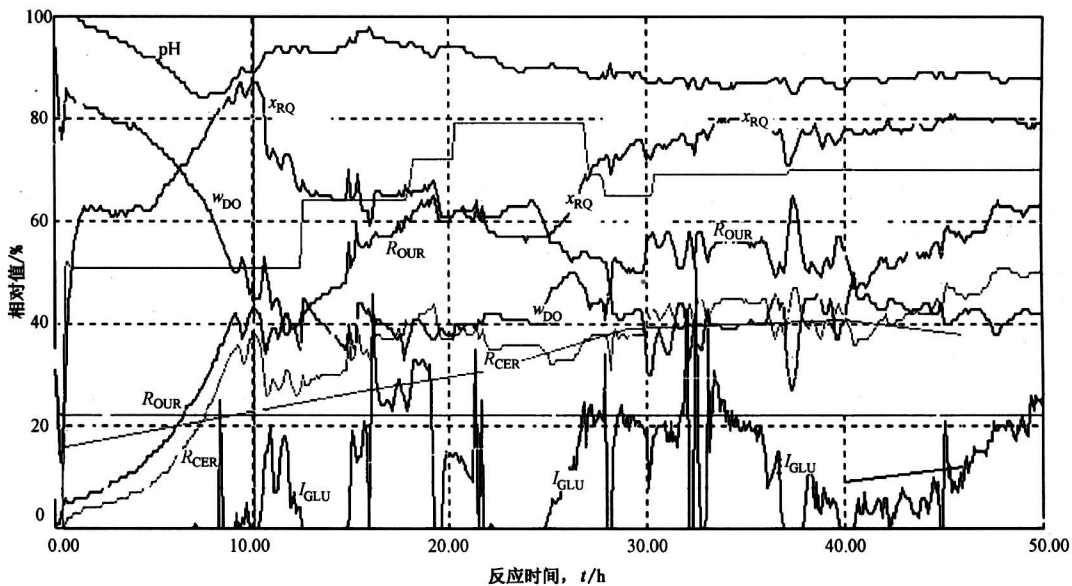


图 4 红霉素发酵参数趋势曲线

Fig. 4 The parameters curves of erythromycin fermentation

另外，引起我们注意的一个现象是 9 h 左右 R_{CER} 、 R_{OUR} 、pH 和 w_{DO} 都有一个对应的上升或下降峰。这种峰值的高低以及出现的时间反映了发酵初期的系统特征，这种特征与各种因素有关，也是稳定发酵生产过程的重要依据。

由此可见，有关细胞代谢物料流的相关分析对研究菌体代谢和反应器操作优化具有重要的理论与实践意义，也可以进一步以物料衡算进行推导和量化。以 pH 为例，从上述代谢趋势曲线图可以看出，pH 是重要的检测控制参数，它的改变会引起各种酶活的变化，影响菌体对基质的利用，甚至改变菌体的代谢途径和细胞结构，最终影响产品的形成。但是，另一个引人注意的是，pH 变化实质上是 H^+ 离子平衡的变化结果，这种结果与代谢流变化有关。图 5 是培养液中有关 H^+ 平衡的示意图， C_{S1} 、 C_{S2} 、 C_{S3} 、 C_{S4} 分别代表淀粉、葡萄糖、硫酸铵和黄豆饼粉的浓度。 K_1 至 K_9 为各反应的速率系数，其中 K_1 为淀粉酶活力系数，它的大小与菌体量及菌体活力有关，即 $K_1 = \alpha C_x$ ； K_2 为菌体转化还原糖为有机酸的速率系数，其值与菌量及菌体活力有关，即 $K_2 = \beta C_x$ ； K_{1N} 为菌体水解黄豆饼粉产生氨基酸的速率系数，同样假设 $K_{1N} = \gamma C_x$ 。

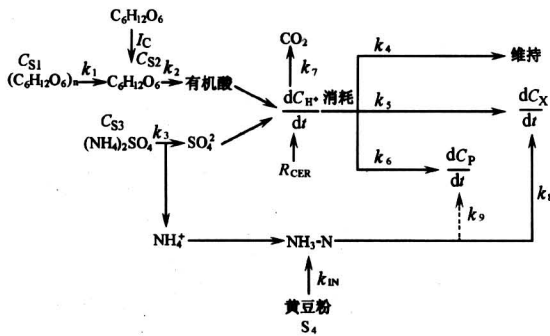


图 5 发酵液中 H^+ 平衡

Fig. 5 Balance of H^+ in the fermentation broth

经推导得以硫酸铵为氮源时 H^+ 的平衡式为：

$$\begin{aligned} \frac{dC_{H^+}}{dt} = & \beta C_x (\alpha C_{S1,t} + I_C) + \\ & K_3 k \frac{C_N}{k_N + C_N} \cdot \frac{C_C}{k_C + C_C} C_x + \\ & K_7 [R_{CER} - K_{L_{CO_2}} (C_{CO_2} - C_{CO_2}^*)] - \\ & K_4 m C_x - K_5 k \frac{C_N}{k_N + C_N} \cdot \frac{C_C}{k_C + C_C} C_x - K_6 \frac{dC_P}{dt} \end{aligned} \quad (1)$$

式中 k_N 、 k_C 为 monod 方程中与氮、碳源有关的常数

考虑黄豆饼粉作为氮源利用时，则：

$$\begin{aligned} \frac{dC_{H^+}}{dt} = & \beta \cdot (\alpha \cdot C_{S1,t} + I_C) + \theta \cdot \left(k \frac{C_N}{k_N + C_N} \cdot \right. \\ & \frac{C_C}{k_C + C_C} C_x + \frac{dC_N}{dt} - C_{S4,t} \gamma C_x + K_7 [R_{CER} - \\ & K_{L_{CO_2}} (C_{CO_2} - C_{CO_2}^*) - K_4 m C_x - K_5 k \frac{C_N}{k_N + C_N} \cdot \\ & \left. \frac{C_L}{k_C + C_C} C_x - K_6 \frac{dC_P}{dt} \right) \end{aligned} \quad (2)$$

由上述代谢流变化所引起的 H^+ 平衡的变化可以用来指导基础培养基的配比、中间补糖、pH 控制设定、通气流量等工艺优化操作。

3.3 基因工程 *Pichia* 酵母高密度高表达研究

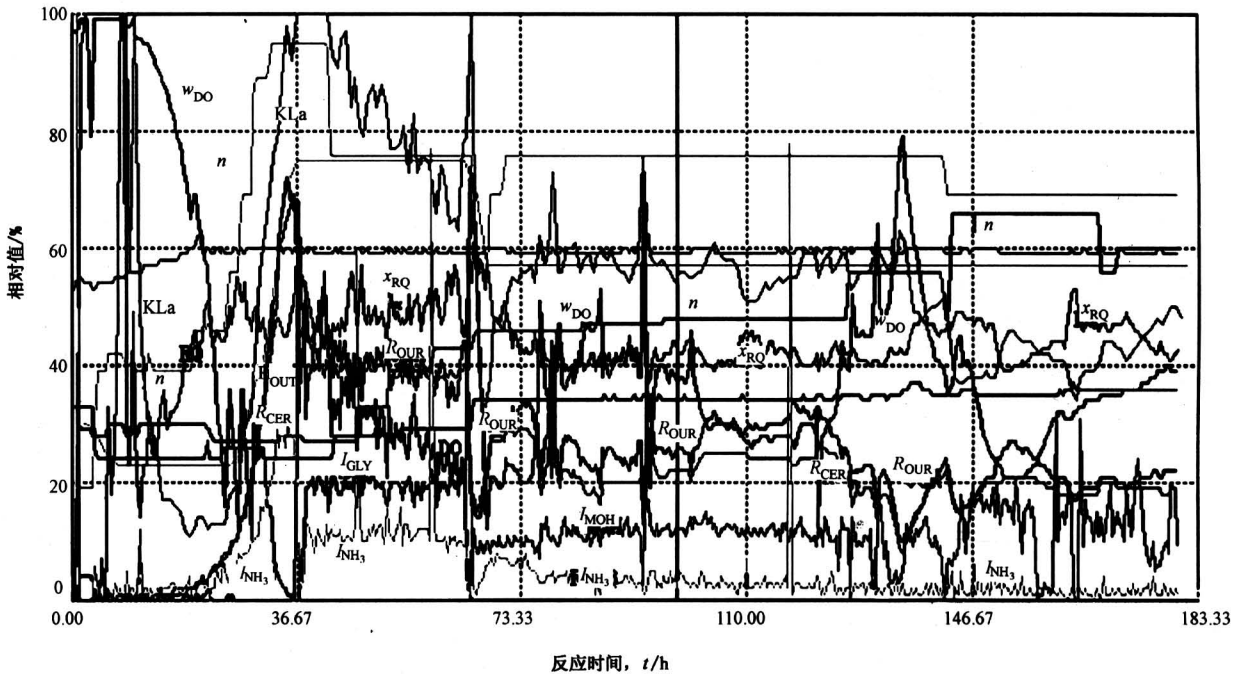
1987 年 Cregg 等^[19]首次报导甲醇营养型毕赤酵母 (*Methylotrophic Pichia pastoris*) 表达外源蛋白以来，由于它具有表达效率高、遗传稳定、产物可分泌等优点，已成为近年来极受青睐的基因表达系统宿主。短短 10 多年来，用该系统表达的外源基因已达 40 多种，其中大部分可成为医药制品，发酵规模可达 20 m³ 以上，它的研究进展具有重要的经济意义和社会意义。

有关 *Pichia* 酵母表达系统构建的研究如载体类型、分泌序列、载体单元等已有大量文献报导^[20-22]。其中高密度高表达的发酵过程优化也作为重要内容开展实验研究，但缺乏生物反应器中 3 个水平问题的相互联系。

我们以表达基因工程人血清白蛋白 (rh-SA) 为对象开展 *Pichia* 酵母表达系统研究，在 FUS-50L (A) 实验室发酵罐计算机人机界面上得到如图 6 所示的多参数代谢趋势曲线。由各可以看出细胞代谢流的某些分布特征以及反应器工程水平上传递特性的变化，为过程优化与放大提供了重要线索。例如，从接种后， w_{DO} 随着 R_{OUR} 上升而不断下降，反映了以供氧为质量传递的反应器物料平衡与氧为基质的微生物耗氧动力学特性；转速 (n)、通气流量 (F) 与 w_{DO} 相关特性，反映了在特定发酵液流变特性情况下有关供氧操作变量对氧传递系数 $K_L a$ 的影响。引人注意的是在 36.5 h 搅拌转速已达最高值，但由于酵母的高密度发酵的高耗氧 R_{OUR} 达 302 mol/ (m³h)， w_{DO} 接近零，说明耗氧

已远超过供氧能力。由此可见,用常规供氧的搅拌发酵罐已不能满足工业生产应用,克服零水平的 w_{DO} 值是该试验 36 h 的主要矛盾。在 BIORADAR

数处理软件包的趋势曲线引导下,采用设计合理的基础培养基的方法,在 20 min 内,即发酵时间 36.7 h 左右反弹, w_{DO} 达到 65% 左右,避免了必须采用通纯氧的方法。



TEMP:29.86 CER:89.87 DO:38.21 F:23.00 KLA:8533.69 OUR:105.46 P:0.03 PHI:5.40

RGLY:0.00 RMOH:0.40 RNH3:0.05 PRM:381.89 RQ:0.85 V:024

图6 rh-SA 发酵过程趋势曲线

Fig. 6 The parameter curves of rh-SA fermentation

在研究氮源利用时,发现 pH 与氨水补量、碳源流加以及 R_{CER} 之间的强相关特性。采用 FUS-50L (A) 罐的 pH 与补氨系统构成的闭环控制回路,由计算机控制 pH 在一定值。由图 6 可看出,通过 pH 值的自动调节,达到培养过程碳源消耗与氮源消耗的自动匹配来实现 C/N 比的调整。反映在菌体生长期和产物表达期的不同氨水流加速率,随着发酵周期的延长,表达量产率减少,氨水流加速率, I_{NH_3} 也减少,甚至停加氨水,发酵终止。在表达期甲醇过量时将对菌体代谢产生严重干扰,即所谓中毒现象,甚至转录翻译中止。在 BIORADAR 数据处理软件包显示的趋势曲线引导下,随着甲醇流加速率 I_{MOH} 的逐渐增加, R_{OUR} 逐渐上升,注意防止逆转产生,达到最高表达速率。

上述物料流也可以进一步通过元素平衡和代谢平衡进行数据处理并建立数学模型^[23],例如 rh-SA 发酵过程生长期中,理论上 有 5 个宏观反应速率可

以测定^[22],分别是甘油消耗速率, R_{gly} 、菌体生长速率, R_x 、氨消耗速率, R_N 、氧消耗速率, R_O 和二氧化碳生成速率, R_C 。考虑碳、氮和氧化还原度(氧和氢元素的综合表达)3 种元素的平衡,则有如下关系式:

$$B R_E = 0 \quad (3)$$

$$B = \begin{bmatrix} 1 & 1 & 0 & 0 & 1 \\ 0 & w_{N_x} & 1 & 0 & 0 \\ \gamma_{gly} & \gamma_x & \gamma_N & \gamma_O & \gamma_C \end{bmatrix} \quad (4)$$

$R_E = [R_{gly} R_x R_N R_O R_C]^T$ 。式(4)中 w_{N_x} 是菌体中氮的含量。 R_E 有 5 个分量,式(4)中有 3 个线性方程,模型自由度 $f=2$,故 R_E 中只有 2 个分量可自由变化,其他 3 个分量可由式(3)求出。令 $R_{E1} = [R_{gly} R_x]^T$, $R_{E2} = [R_N R_O R_C]^T$, B_1 取 B 的前两列, B_2 取 B 的后三列,式(3)可改写为

$$[B_1 B_2] \begin{bmatrix} R_{E1} \\ R_{E2} \end{bmatrix} = 0 \quad (5)$$

则

$$\mathbf{R}_{E2} = -\mathbf{B}_2^{-1} \mathbf{B}_1 \mathbf{B}_{E1} \quad (6)$$

结合菌体内部的代谢平衡, 可进一步降低模型的自由度, 例如考虑菌体生长时以葡萄糖和氨水为基质形成二氧化碳、甘油转化为葡萄糖、葡萄糖分

$$\mathbf{Z} = \begin{bmatrix} 0 & 1 & -\sigma_x & \sigma_x & \frac{1}{2}(\sigma_x \gamma_{\text{glu}} - \gamma_x) & -w_{\text{Nx}} & 0 & \sigma_x & -10 \\ -1 & 0 & 1 & -\alpha_{\text{gly}} & \frac{1}{2}(\gamma_{\text{gly}} - \gamma_{\text{glu}}) & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & & \alpha_{\text{glu}} & \frac{1}{2}\gamma_{\text{glu}} & 0 & 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & \alpha_{\text{H}} & -1 & 0 & -\frac{1}{2} & 0 & 1 \end{bmatrix} \quad (8)$$

与元素平衡式(3)得 R_x 、 R_N 、 R_O 、 R_C 与 R_{gly} 之间的关系

$$\begin{bmatrix} R_x \\ R_N \\ R_O \\ R_C \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} Y_{x/s} \\ -w_{\text{Nx}} Y_{x/s} \\ \frac{1}{4}(\gamma_{\text{gly}} - \gamma_x Y_{x/s}) \\ -(1 + Y_{x/s}) \end{bmatrix} R_{\text{gly}} \quad (9)$$

从代谢流的观点结合元素平衡和代谢平衡方法建立的数学模型克服了传统建模方法中参数意义不明、输入输出关系难以解释等缺点, 充分利用了发酵过程生物学知识, 具有很大的通用性和伸缩性。利用上述方法计算得甘油比消耗速率 $q_{\text{gly}} = 0.05785 + 1.5184\mu$, 即为甘油的比流加速度方程, 我们利用该方法控制甘油的流加速度, 达到了预期效果。

4 结语

本文以细胞代谢流的分析与控制为核心的生物反应工程学的观点, 并通过实验研究, 提出了基于参数相关的发酵过程多水平问题研究的优化技术和发酵过程多参数调整的放大技术。

必须说明的是, 在生物反应器中测定和研究细胞代谢物质流的变化不等同于代谢调控或代谢工程研究, 它强调的是生物反应器中细胞代谢流的存在, 着重在细胞代谢物质流分布变化的有关现象特征的获得。由于研究条件的限制, 这些现象特征也许与已经掌握的代谢调控知识关联不大, 更无法立即从胞内分子基因水平的信息流中得到认识, 但是只要反映的是客观存在的事实, 即使是表观的现象总结, 也会取得实际结果。相信随着生物技术的深入发展, 特别是代谢调控和代谢工程的深入认识,

解、以及氧化磷酸化为菌体生长和维持提供所需 ATP 等, 可用式 $\mathbf{Z}\mathbf{E} = 0$ 来表示, 其中

$$\mathbf{E} = [C_{\text{gly}} \ C_x \ C_{\text{glu}} \ C_{\text{ATP}} \ C_{\text{NADH}} \ C_{\text{NH}_3} \ C_{\text{O}_2} \ C_{\text{CO}_2} \ C_{\text{H}_2\text{O}}]^T \quad (7)$$

这种结果将会越来越明显。

此外, 发酵过程基因、细胞、工程 3 个水平问题是过程优化与放大的关键, 有关工程水平问题主要集中在化学工程的三传(动量、质量、热量), 这是一个规律研究已较清晰的学科领域, 从单元操作到系统工程, 从宏观到微观, 当前的重要内容就是与各高技术领域互相渗透融合, 形成边缘技术科学。化学工程学科与生物技术相结合的主要内容就是随着生物技术研究的深入发展如何从工程学的角度进行深入探索, 从宏观的经验描述到微观的本质认识。作者提出在生物反应器中借助化学工程学的观点和方法研究细胞代谢物质流的变化来区分 3 个水平问题, 这对于过程工艺优化和放大具有重要意义。

主要符号说明

a_i —— i 物质的能量因子

C_N ——物质中的氮浓度, mol L^{-1}

C_C ——物质中的碳浓度, mol L^{-1}

m_x ——菌体维持系数, h^{-1}

q_i —— i 物质比生成或消耗速率, h^{-1}

μ ——比生长速率, h^{-1}

γ_i —— i 物质的氧化还原度

σ_i ——生物合成 i 物质所需的碳源的数量, mol

C_{gly} ——Gly 的浓度, $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$

C_x ——菌体的浓度, $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$

C_{glu} ——葡萄糖的浓度, $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$

C_{ATP} ——ATP 的浓度, $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$

C_{NADH} ——NADH 的浓度, $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$

C_{NH_3} ——氨的浓度, $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$

C_{O_2} ——氧浓度, $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$

C_{CO_2} ——二氧化碳的浓度, $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$

C_{H_2O} ——水的浓度, $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$

参考文献

- [1] Monod J. The growth of bacterial Cultures[J]. Ann Review of Microbiol, 1949, 3, 371
- [2] Moser A. Bioprocess technology, Kinetics and Reactors [M]. New York: Springer Verlag, 1988
- [3] Bailey J E, Ollis D F. Biochemical Engineering Fundamentals [M]. New York: Me Graw-Hill, 1986
- [4] Bastin G, Dochain D. On-line Estimation and Adaptive Control of Bioreactors [M]. Amsterdam-Oxford-New York-Tokyo: Elsevier, 1990
- [5] Huber D, Hitzmann B, Rode M. Advanced control methods and expert systems [J]. Bitech Forum Europe, 1991, 8(6): 348~354
- [6] Shimizu K, Ye K. Development of intelligent bioreactor systems [J]. Sensors and Materials, 1995, 7(4): 233~247
- [7] Asenjo J A. Bioreactor System Design [M]. New York: Marcel Dekker, 1995
- [8] 戚以政, 汪叔雄. 生化反应动力学与反应器[M]. 北京: 化学工业出版社, 1999
- [9] Patnaik P R. Incomplete mixing in large bioreactors a study of its role in the fermentation production of streptokinase [J]. Bioprocess Eng, 1996, 12: 231~238
- [10] Bailey J E. Toward a science of metabolic engineering [J]. Science, 1991, 252: 1663~1674
- [11] 郁静怡, 杨胜利. 代谢工程[J]. 生物工程学报, 1996, 12(2): 109~112
- [12] Fell D A. Increasing the flux in metabolic pathways: a metabolic control analysis perspective [J]. Biotechnol. Bioeng, 1998, 58: 121~124
- [13] Stephanopoulos G. Metabolic engineering [J]. Biotechnol. Bioeng, 1998, 58: 119~120
- [14] Konstantinov K B, Artis R, Yoshida T. On the selection of variables representing the physiological state of the cell cultures [A]. Proc. IF AC Symp. Modelling and Control of Biotechnical Processes [C]. Keystone, Oxford: Pergmon Press, 1992
- [15] Stephanopoulos G, Konstantinov K, Sauer U, et al. Fermentation data analysis and control, in Biotechnology (Rehm, H. J. ed) [J]. Bioprocessing, 1993, 3: 359~400
- [16] 张嗣良. 用于过程优化与数据放大的自控发酵罐装置 [P]. 中国专利申请号(2000)00127307.8
- [17] 张嗣良. 青霉素发酵过程计算机控制与优化技术研究 [J]. 无锡轻工大学学报, 1996, 15(2): 6~12
- [18] Minas W, Brunker P, Kallio P T, et al. Improved erythromycin production in a genetically engineered industrial strain of *Saccharopolyspora erythraea* [J]. Biotechnol Prog, 1998, 14(4): 561~566
- [19] Cregg J M, Tschopp J F, Stilman C, et al. High-level expression and efficient assembly of hepatitis B surface antigen in methylotrophic yeast, *Pichia pastoris* [J]. Bio/Technology, 1987, 5: 479~485
- [20] Wolf k. (ed). Non-conventional Yeast in Biotechnology [M]. Spriger: Berlin, 1996. 203~290
- [21] 郭美锦, 储炬, 张嗣良, 等. 重组人血清白蛋白的表达研究进展 [J]. 生物工程进展, 2000, 20(5): 39~42
- [22] Kobayashi K, Kuwae S, Ohya T, et al. High level secretion of recombinant human serum albumin by fed-batch fermentation of the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*, Based on optimal methanol feeding strategy [J]. J. Bioscience and Bioengineering, 2000, 90(3): 280~288
- [23] 黄明志, 储炬, 张嗣良, 等. 重组人血清白蛋白发酵过程生长期的代谢计算 [J]. 生物工程学报, 2000, 16(5): 631~635

Study on the Fermentation Processes at Multi-levels in Bioreactor and Its Application for Special Purposes—— Optimization and Scaling Up of the Fermentation Process Based on the Parameter Correlation Method

Zhang siliang

(East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China)

[Abstract] After reviewing the basic idea, methods of optimization and scale up for fermentation process adopted by many researchers for quite a long time, the author believes that the static optimizing method based on

the kinetic conception with conventional optimum operating condition, in fact, is only an extension of kinetic conception of chemical engineering to the fermentation process. Such being the case, the existence of cellular metabolic flux is often neglected. Thus, the viewpoint to emphasize the metabolic flux analysis and control in bioreactor is put forward in this paper. Through several further experiments, the optimization technology of fermentation process at multi-levels based on the parameter correlation methodology and scaling-up strategy with multi parameters modulation have been realized. With the development of process sensing and computer technology, the new concept bioreactor (FUS-50L(A)) is used for fermentation processes optimization and scale up. This new bioreactor aimed at the measurement of material flux has been successfully applied to the fermentation of penicillin, erythromycin, aureomycin, inosine, guanosine, as well as the cultivation of recombinant human serum albumin, malaria vaccine, etc. As a result, thirty percent to several folds increase in titers were achieved. The process can be directly used for the scale up of Fermentor from 50 liters to several hundred liters, even to 100 m³.

[Key words] bioreactor; fermentation; optimization; scale up

攻克链球菌及其疾病的研究取得重要进展

20 世纪抗生素和疫苗的应用有效地控制了全球感染性疾病的流行,正在改变人类患疾病谱;但是,真正消灭的感染性疾病只有天花一种。抗生素耐药问题日益严重,使得我们对感染性疾病的治疗越来越困难,细菌感染性疾病(如肺炎、脑膜炎和败血症)仍然是威胁儿童健康的主要疾病。链球菌是引起儿科感染的重要细菌,A 族可引起猩红热、风湿和肾炎;B 族不仅引起新生儿感染,还是产科感染的重要病原,并引起不良产科并发症,对胎儿与新生儿也有影响。对这种细菌的研究,对保障儿童健康和优生优育关系重大。

国际上对链球菌的研究非常重视。世界卫生组织有专门机构对其进行研究,从 50 年代起组织并资助每两年召开一次链球菌国际会议,交流在细菌学、免疫学(包括疫苗)、临床和流行病学,以及分子生物学方面的进展。我国在细菌研究,尤其是链球菌研究方面还十分薄弱,临床诊断不明确,治疗上滥用抗生素。

圣彼得堡俄国医学科学院实验医学研究所建于 1890 年,是世界上最早的医学研究所之一,很多著名医学生物学专家出自此所,其中巴甫洛夫的神经生理学成果,即条件反射学说曾在医学界有很大影响并获诺贝尔医学奖。与北京儿童医院合作的 Totolian 教授为俄国医学科学院院士,他所领导的分子生物学部和链球菌中心在链球菌研究方面居国际领先地位,他不仅是世界卫生组织专家组成员,1993 年还主持过全球第 12 次链球菌会议。

北京儿童医院从 1990 年起与 Totolian 院士合作开展链球菌方面的研究,迄今 10 年。解决国内细菌培养阳性率低问题,引进快速诊断方法,并对分离细菌进行血清学分型。俄方为该医院提供了部分快速诊断试剂盒,并协助医院进行试制,提供抗血清并帮助制备抗血清,与研究人员一起对分离的 A 族链球菌和 B 族链球菌进行血清学分型,这些方面都居国内领先地位;并顺利完成两项国家自然科学基金课题,一项北京市自然科学基金课题,获得两项北京市科技成果奖。为此,北京儿童医院建立了卫生部链球菌专业实验室,负责并顺利进行一项“九五”攻关项目,对 B 族链球菌进行临床与基础的研究,已经在国内一级杂志及国外杂志上发表论文 20 余篇,并有 5 人先后 3 次参加儿科与细菌方面的国际会议进行交流。