

生物工程基础

第三章 细胞反应动力学

生物反应是非常复杂的反应过程

- 反应体系中有细胞的生长，基质消耗和产物的生成，有各自的最佳反应条件。
- 微生物反应有多种代谢途径。
- 微生物反应过程中，细胞形态、组成要经历生长、繁殖、维持、死亡等若干阶段，不同菌龄，有不同的活性。

细胞反应动力学的定义及分类

细胞反应动力学是研究生物反应速率的规律，即细胞生长速率、底物消耗速率和产物生成速率的变化规律，是进行细胞反应过程优化和生物反应器设计的重要理论依据。

主要包括：细胞生长动力学、底物消耗动力学和产物生成动力学。

方法：用数学模型定量地描述生物反应过程中细胞生长速率、底物消耗速率和产物生成速率等因素变化，达到对反应过程的有效控制。

细胞生长动力学

第一、细胞生长动力学的定义及分类特点

第二、细胞生长动力学模型

第三、影响细胞生长的因素及其模型

细胞生长动力学的定义及分类特点

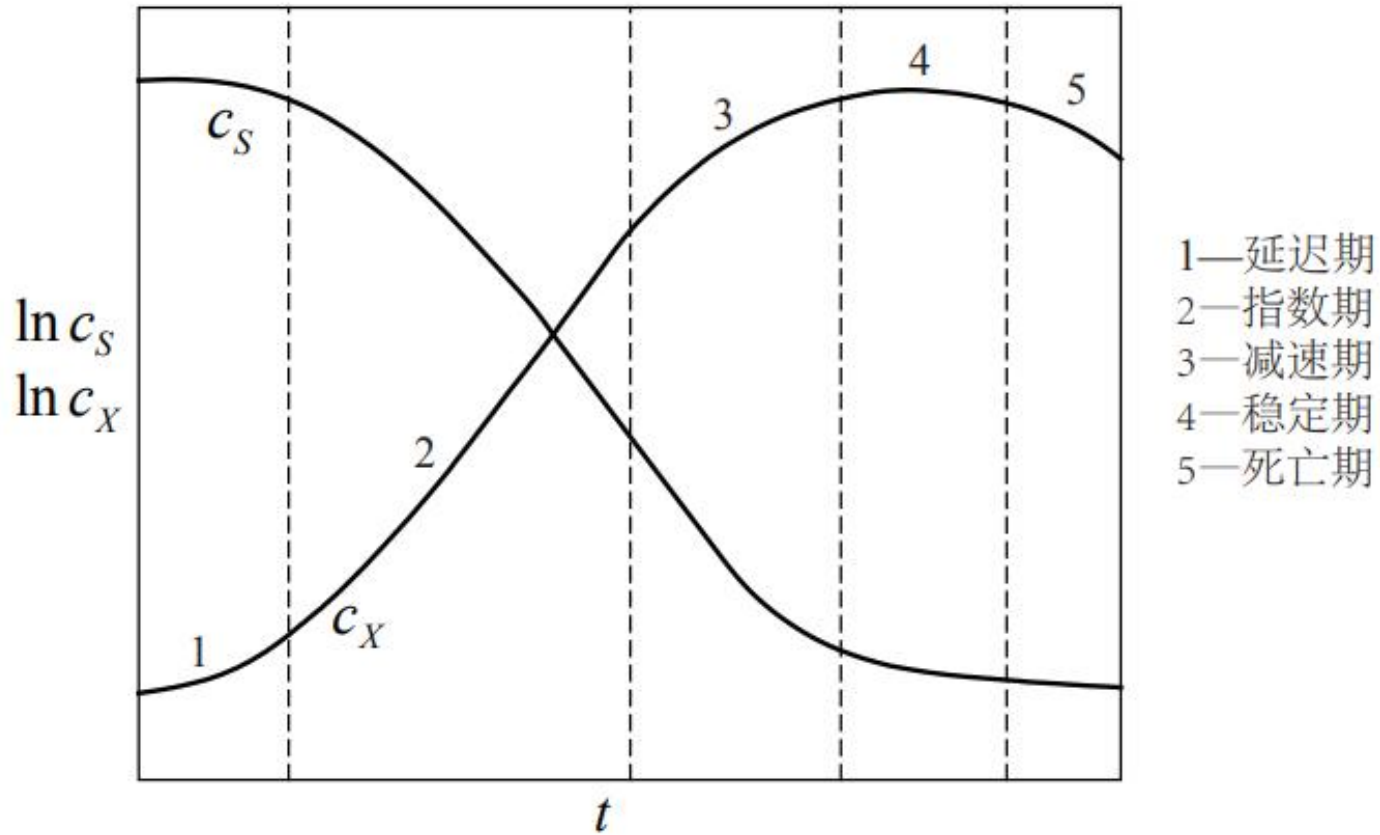
单个生物体是具体和实际的生命单元，但细胞反应体系的动力学描述采用群体来表示。

描述细胞动力学的方法不是指生物分离呈不连续的单个生物，而是指群体的存在。

一般地，可将微生物群体的变化过程分为生长、繁殖、维持、死亡、融胞、能动性形态变化及物理的群体变化等过程。

细胞生长动力学是研究细胞生长过程的速率及其影响因素，从而获得相关信息。

细胞生长动力学的定义及分类特点



分批培养的细胞生长曲线

延滞期

- 把微生物从一种培养基中转接到另一培养基的最初一段时间里，尽管微生物细胞的重量有所增加，但细胞的数量没有增加。这段时间称之为延滞期。
- 这个期间是细胞的适应调整期，细胞在一个新的环境中生存，需要根据新环境的营养特点重新调整细胞体内的酶系及代谢过程，以使自身能适应新的环境并开始生长和繁殖。
- 怎样减少延滞期的时间？
- 可以让细胞有一个预适应的过程，种子的二级培养；种龄是对数期的（年青，有生命力）；加大接种量；优化培养基的培养条件（化学组成和物理条件）；加入一些生长因子（微量元素，维生素等）。

指数生长期

- 对细菌、酵母等单细胞微生物来讲，单位时间内其细胞数目将成倍增加。
- 而对于丝状微生物而言，单位时间内其生物量将加倍。
- 此时，如以细胞数目或生物量的对数对时间作一半对数图，将得一直线，因而这一时期称作指数生长期。

稳定期

- 在细胞生长代谢过程中，培养基中的底物不断被消耗，一些对微生物生长代谢有害的物质在不断积累。受此影响，微生物的生长速率和比生长速率就会逐渐下降，直至完全停止，这时就进入稳定期。
- 处于稳定期的生物量增加十分缓慢或基本不变；
- 但微生物细胞的代谢还在旺盛地进行着，细胞的组成物质还在不断变化。

死亡期

- 在死亡期，细胞的营养物质和能源储备已消耗殆尽，不能再维持细胞的生长和代谢，因而细胞开始死亡。
- 这时，以生存细胞的数目的对数对时间作半对数图，可得一直线，这说明微生物细胞的死亡呈指数比率增加。
- 在微生物工业生产中，在进入死亡期之前应及时将发酵液放罐处理。

细胞生长的速率

定义： 均衡生长条件下，细胞的生长速率 r_X 的定义式为：

$$r_X = \frac{dX}{dt} = \mu X$$

式中， X 为细胞的浓度； μ 为细胞的比生长速率，其受细胞自身遗传信息支配外，还受到环境因素所影响。

细胞生长的速率

比生长速率 μ 的意义:

举例：比较一下两种情况下的那种细菌的生长效能大？

A：在一个1mL的反应容器中，1个细菌1min分裂产生10个细菌；

B：在一个1mL的反应容器中，100个细菌1min分裂产生200个细菌。

细胞生长的速率

比生长速率 μ 的意义:

举例：比较一下两种情况下的那种细菌的生长效能大？

A: 在一个1mL的反应容器中，1个细菌1min分裂产生10个细菌；

B: 在一个1mL的反应容器中，100个细菌1min分裂产生200个细菌。

反应速率：A < B

A: 9个/mL.min; B: 100个/mL. min

生产效能：A > B

$$\text{A: } \mu = \frac{dX}{Xdt} = \frac{(10\text{个/mL} - 1\text{个/mL})}{1\text{个/mL} \times 1\text{ min}} = 9\text{ min}^{-1}$$

$$\text{B: } \mu = \frac{dX}{Xdt} = \frac{(200\text{个/mL} - 100\text{个/mL})}{100\text{个/mL} \times 1\text{ min}} = 2\text{ min}^{-1}$$

比生长速率就是细胞生长速率与培养基中细胞浓度之比，它与细胞的生命活力联系密切。

细胞生长的速率

μ 与倍增时间 (doubling time) t_d 的关系

由 $r_X = \frac{dX}{dt} = \mu X$

当 $t=0$, $X=X_0$, 积分上式: $\ln X = \mu t + \ln X_0$

t_d 是指 $X/X_0=2$ 时所需的时间, 因此 $\ln 2 = \mu t_d$

μ 与倍增时间 t_d 的关系为: $\mu = \frac{\ln 2}{t_d} = \frac{0.693}{t_d}$

细胞生长的速率

指数生长期的生长具有**均衡生长**的特性 (balanced growth)

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

$$\mu_{max} = \frac{\ln 2}{t_d}$$

最大比生长速率的含义：营养充分，不存在底物对生长限制和代谢副产物抑制等条件下的均衡生长速率。

减速期的生长模型：就是在底物浓度限制条件下（代谢副产物抑制）的生长模型：

$$\mu < \mu_{max}$$

细胞生长的模型分类

模型分类

结构模型和非结构模型：根据是否考虑细胞组成的变化，可将模型分为非结构模型与结构模型。

非结构模型：细胞个体的平均密度、体积和组成保持恒定。可以用来描述细胞均衡生长时的动力学行为。

结构模型：描述细胞中不同组分的变化规律。细胞生长行为不符合均衡生长假设。

均衡生长：细胞内各种组成均以相同比例增加；

非均衡生长：细胞内各组分合成速率不同而使各组分增加比例不同。

非结构模型 $\xrightleftharpoons{\text{均衡生长}}$ 结构模型

细胞生长的模型分类

确定论模型和概率论模型：根据是否考虑细胞之间的差异，可以将模型分为确定论模型与概率论模型。

确定论模型：不考虑细胞间的差异，而是取性质上的平均值，在此基础上建立的模型称为确定论模型。

概率论模型：如果考虑每个细胞差别，则建立的模型为概率论模型。

细胞生长的模型分类

- **确定论的非结构模型**：不考虑细胞内部结构，每个细胞之间无差别，细胞群体作为一种溶质。
- **确定论的结构模型**：每个细胞无差别，但细胞内部由多个组分存在；
- **概率理论的非结构模型**：不考虑细胞内部结构，每个细胞之间有差别。
- **概率理论的结构模型**：细胞内部结构有差别，每个细胞之间也有差别。

细胞生长的模型分类

从工程角度看，理想的细胞生长模型应具备下列条件：

- **要明确建立模型的目的。为进行细胞反应器的设计找到最佳操作条件，确定反应过程的合理管理方法；**
- **明确地给出建立模型的假设条件，这样才能明确模型的使用范围；**
- **希望所有参数能够通过实验逐个确定；**
- **模型应尽可能简单。**

目前最易使用的模型是确定论的非结构模型。

Monod模型及其特点

非结构的动力学模型：Monod模型—典型的确定论非结构模型

模型的基本假设：

- 细胞生长中，培养基中只有一种物质的浓度（其他组分过量）会影响其生长速率，这种物质被称为限制性（生长）底物；
- 细胞为均衡生长且为简单的单一反应，细胞浓度是描述细胞生长的唯一变量； Y_{XS} 为常数。
- μ 取决于限制性底物的浓度 S ，此时，细胞生长速率随着限制性底物浓度的变化而呈抛物线变化。

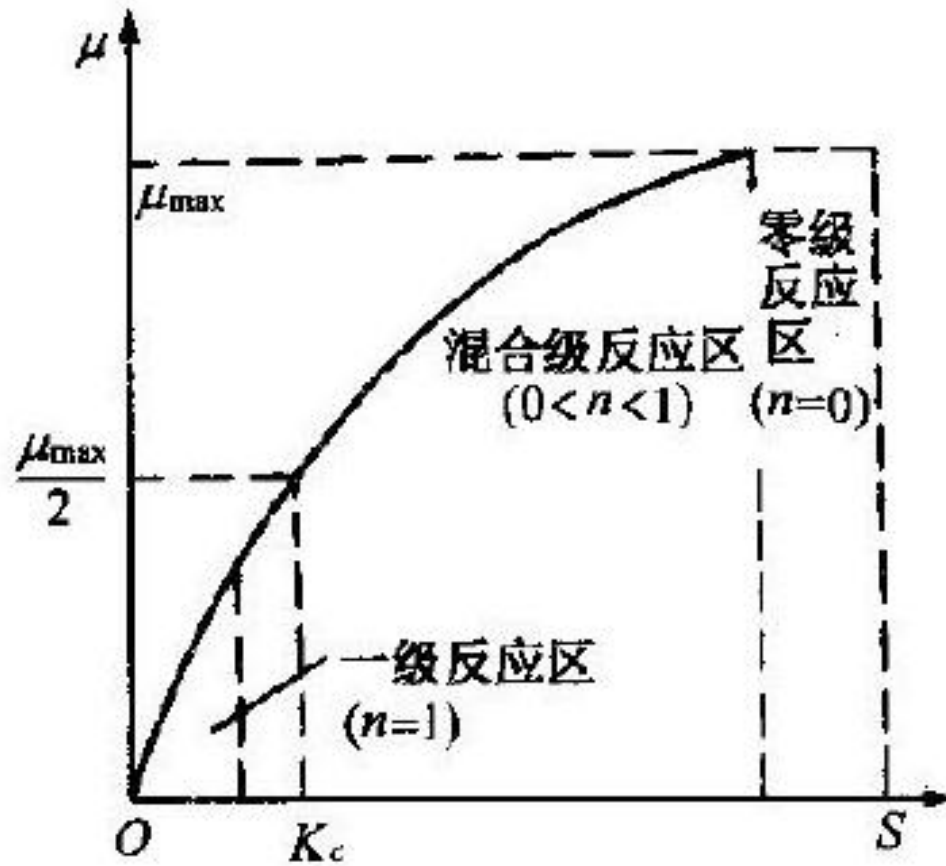
Monod方程的基本形式：

$$\mu = \frac{\mu_{max}[S]}{K_S + [S]}$$

μ ：比生长速率 S^{-1} ； μ_{max} ：最大比生长速率 S^{-1} ；随细胞种类不同而不同。 $[S]$ ：限制性底物浓度，g/L；

K_S ：饱和常数，为当细胞的 μ 等于 μ_{max} 的一半时的底物浓度。除与细胞种类有关，还与底物类型关系密切。

Monod模型及其特点



Monod模型及其特点

Monod模型:

比生长速率表达式: $\mu = \frac{\mu_{max}[S]}{K_S + [S]}$

当底物浓度很小, 即 $[S] \ll K_S$ 时, $\mu \approx \frac{\mu_{max}}{K_S} [S] \propto [S]$

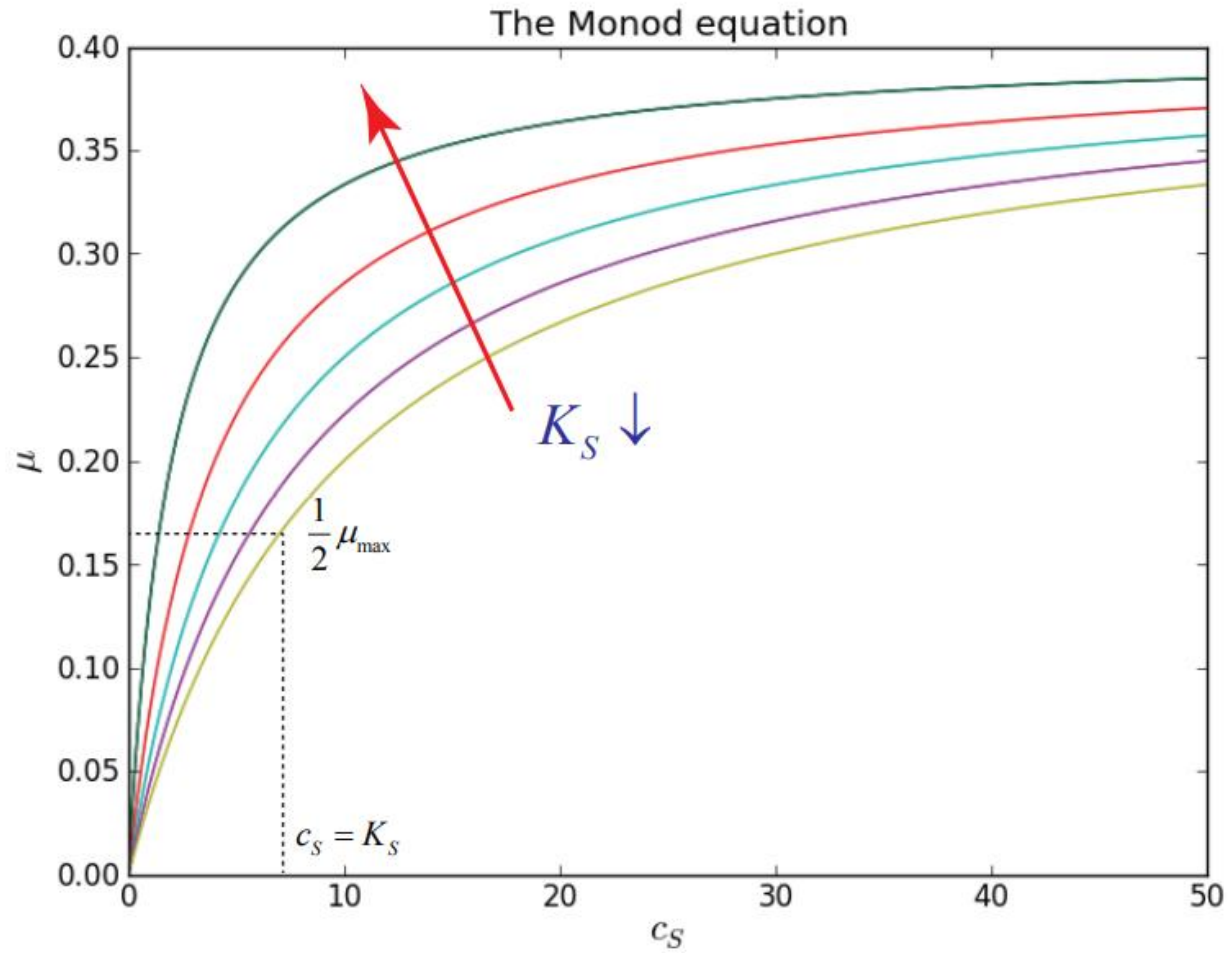
当底物浓度很大, 即 $[S] \gg K_S$ 时, $\mu = \mu_{max}$

细胞的生长速率可以表示为:

$$r_X = \frac{\mu_{max}[S]X}{K_S + [S]}$$

注意: 对于不少微生物 $K_S < 1-10 \text{ mg/L}$ ($10^{-4}-10^{-5} \%$)(w/v), 而且通常在培养过程中的关键阶段控制 $C_S = K_S$, 此时有 $\mu = \mu_{max}/2$

Monod模型及其特点



Monod模型及其特点

动力学参数:

最大比生长速率 μ_{\max} , 为底物浓度过量时的生长速率, 它的数值大小与微生物种类和环境条件有关。

饱和常数 K_s , 表示微生物与底物亲和力的大小, 与微生物的种类、底物类型和培养条件有关。 K_s 值较小, 微生物能在较低的底物浓度下快速生长。

Monod 方程的**适用性**问题: 对最低培养基或碳源组成单一的合成培养基较适用, 培养体系不存在底物和有害副产物的抑制作用。

Monod模型及其特点

Monod方程中 K_S, μ_{max} 求解

Monod 方程变形为：

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

绘制 $\frac{1}{\mu} - \frac{1}{[S]}$ 曲线，为一直线，直线截距为： $\frac{1}{\mu_{max}}$ ，斜率为： $\frac{K_S}{\mu_{max}}$

可以计算出： K_S, μ_{max} (L-B法)

数据处理中发现：对于底物浓度较低的情况下，该方法误差较大。

Monod模型及其特点

Monod方程中 K_S, μ_{max} 求解

Monod 方程变形为：

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

绘制 $\frac{S}{\mu}$ — S 曲线，为一直线，直线截距为： $\frac{K_S}{\mu_{max}}$ ，斜率为： $\frac{1}{\mu_{max}}$

可以计算出： K_S, μ_{max} （H-W法）

优点：数据处理简单，误差小。

常见微生物的 μ_{\max} 和 K_S 值

微生物	限制性底物	μ_{\max} (h^{-1})	K_S ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)
大肠杆菌	葡萄糖	0.8-1.4	2-4
大肠杆菌	甘油	0.87	2
大肠杆菌	乳糖	0.8	20
酿酒酵母	葡萄糖	0.5-0.6	25
热带假丝酵母	葡萄糖	0.5	25-75
产气克雷伯氏菌	甘油	0.85	9
产气气杆菌	葡萄糖	1.22	1-10

Monod模型及其特点

Monod方程 $\mu = \frac{\mu_{max}[S]}{K_S + [S]}$	米氏方程 $r = \frac{r_{max}[S]}{K_m + [S]}$
描述细胞生长，即比生长速率和底物浓度的关系	描述酶促反应，即反应速率与底物浓度的关系
经验性方程	理论推导的机理方程
比反应速率	反应速率
适用于单一限制性底物，不存在抑制情况。	适用于单底物酶促反应，不存在抑制的情况

Monod模型及其特点

Monod模型的特点:

- 具有模型简单，参数少的优点，应用广泛，是细胞生长动力学最重要的方程之一；
- 仅适用于细胞生长缓慢和细胞密度较低环境；
- 很多情况下，它不足以完整地说明复杂的生物过程。

其它生长模型

- 初始底物浓度过高而造成的细胞生长过快的细胞反应：

$$\mu = \frac{\mu_{max}S}{K_S + K_0S + S}$$

- 存在两种限制性底物的细胞生长模型：

$$\mu = \frac{\mu_{max}S_1}{K_{S1}+S_1} \cdot \frac{\mu_{max}S_2}{K_{S2}+S_2}$$

- 存在竞争性抑制的细胞生长模型：

$$\mu = \frac{\mu_{max}S}{K_S (1+C_I/K_I) + S}$$

- 存在非竞争性抑制的细胞生长模型：

$$\mu = \frac{\mu_{max}S}{(K_S + S) \cdot (1 + C_I/K_I)}$$

与Monod模型类似的其它非结构模型

- **Teissier方程** $dX/dt = \mu_{max}(1 - e^{-[S]/K_S})X$
- **Moser 方程** $dX/dt = \mu_{max}X/(1 + K_S[S]^{-c})$
- **Contois 方程** $dX/dt = \mu_{max}[S]X(K_SX + [S])$
- **Mosen方程** $dX/dt = \mu_{max}[S]^nX/(K_S^n + [S]^n)$

与Monod模型类似的其它非结构模型

*其他对Monod方程的修正模型

Blackman方程（近似计算）：

$$\begin{aligned} c_S &\gg 2K_S & \mu &= \mu_{\max} \\ c_S &< 2K_S & \mu &= \frac{\mu_{\max}}{2K_S} c_S \end{aligned}$$

当 $c_S = K_S$, $\mu = \frac{1}{2}\mu_{\max}$ 。

三参数方程（隐函数形式）： Dabes

$$c_S = K\mu + \frac{K_S\mu}{\mu_{\max} - \mu}$$

或

$$\mu(c_S) = \frac{1}{2K} \left[(c_S + K\mu_{\max} + K_S) - \sqrt{(c_S + K\mu_{\max} + K_S)^2 - 4Kc_S\mu_{\max}} \right]$$

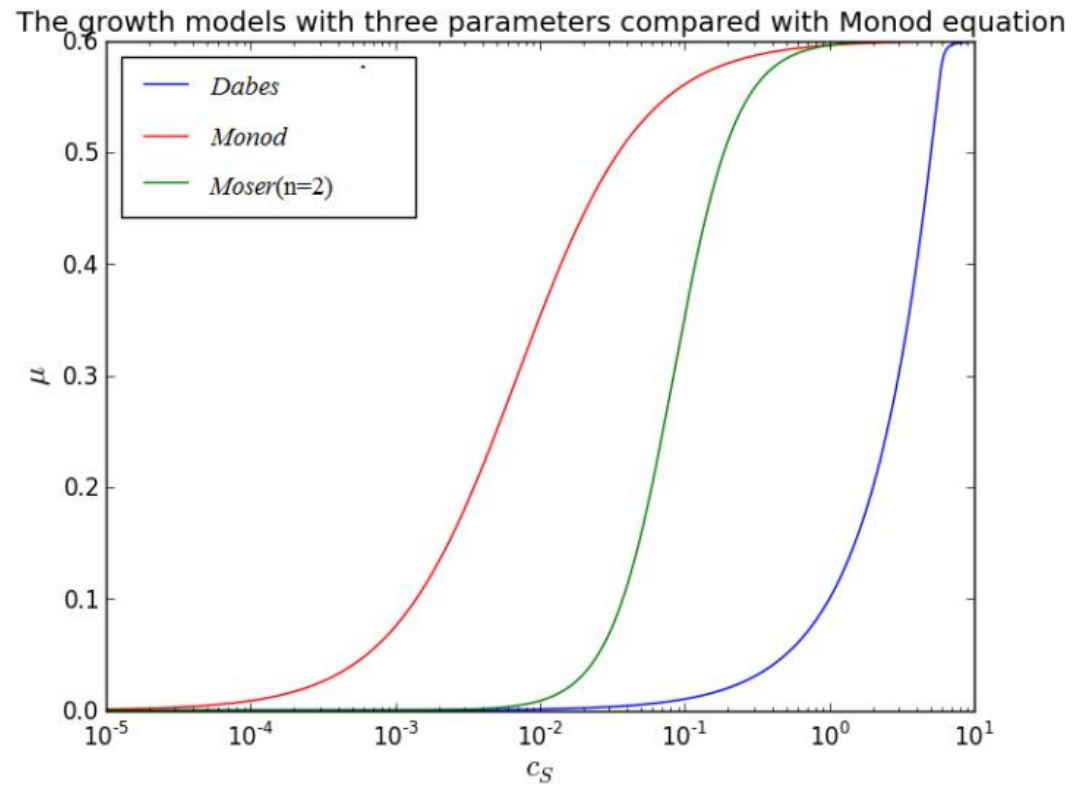
与Monod模型类似的其它非结构模型

Moser方程（三参数）：

$$\mu = \mu_{\max} \frac{c_S^n}{K_S + c_S^n} \quad (43)$$

以上生长模型在 c_S 和 K_S 都很小的情况下对细胞生长的描述都有它们的特点。这些模型能充分描述细胞的生长。但是由于如葡萄糖等组分在极低浓度下难以测量，所以在一定条件下动力学参数的确定很困难。

与Monod模型类似的其它非结构模型



影响细胞生长动力学的因素

· 温度的影响

对不同的微生物都存在它们各自的最适生长温度。
当温度小于最适温度时，温度上升能增加生长速率，

$$\mu_G = A_G \exp(-E_G/RT)$$

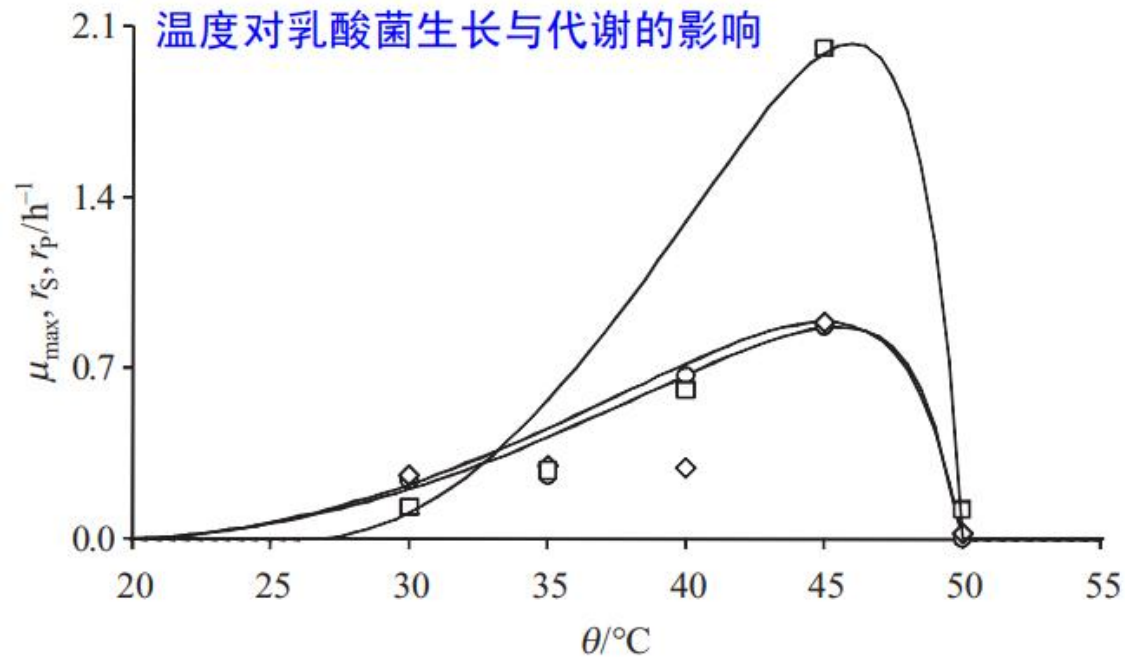
当温度大于最适温度时，存在微生物的死亡，

$$\mu = \mu_G - k_d \quad k_d \text{ 是细胞比死亡速率, } h^{-1}$$

$$k_d = A_d \exp(-E_d/RT)$$

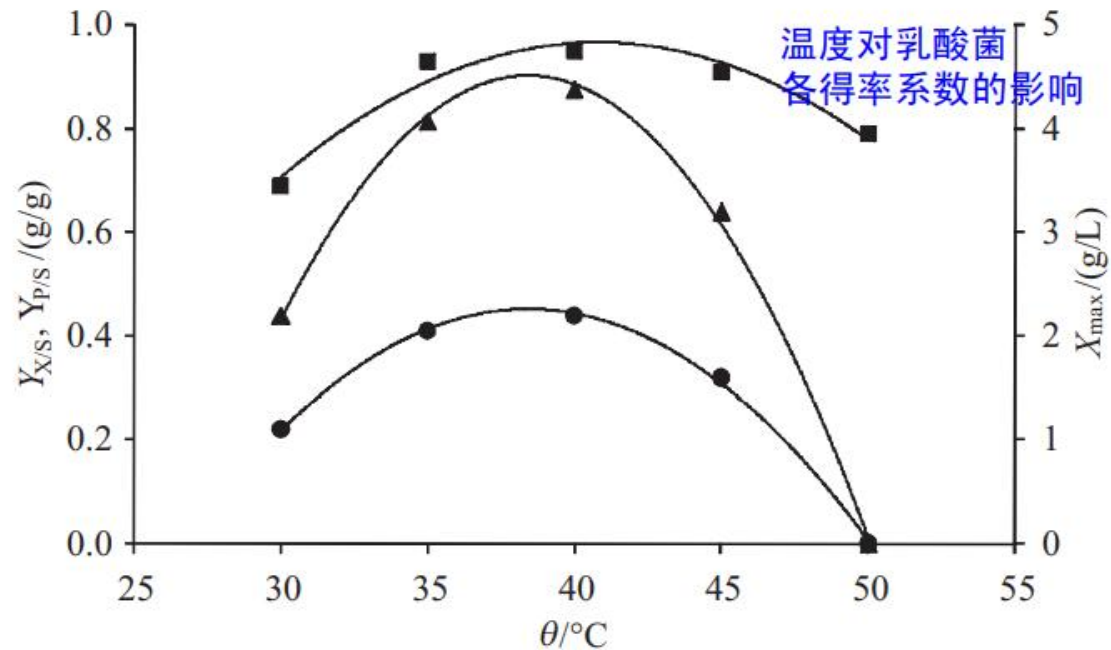
温度也能影响细胞的得率系数。

影响细胞生长动力学的因素



Effect of temperature on maximum specific growth rate (μ_{\max} , ○), substrate consumption rate (r_s , ◇), and the product formation rate (r_p , □) by *L. amylovorus* DSM 20531^T grown in MRS-starch medium at a constant pH value (5.5)

影响细胞生长动力学的因素



Effect of temperature on maximum biomass concentration (X_{\max} , ▲), biomass yield coefficient ($Y_{X/S}$, ●), and product yield coefficient ($Y_{P/S}$, ■) in MRS-starch medium at a constant pH value (5.5)

影响细胞生长动力学的因素

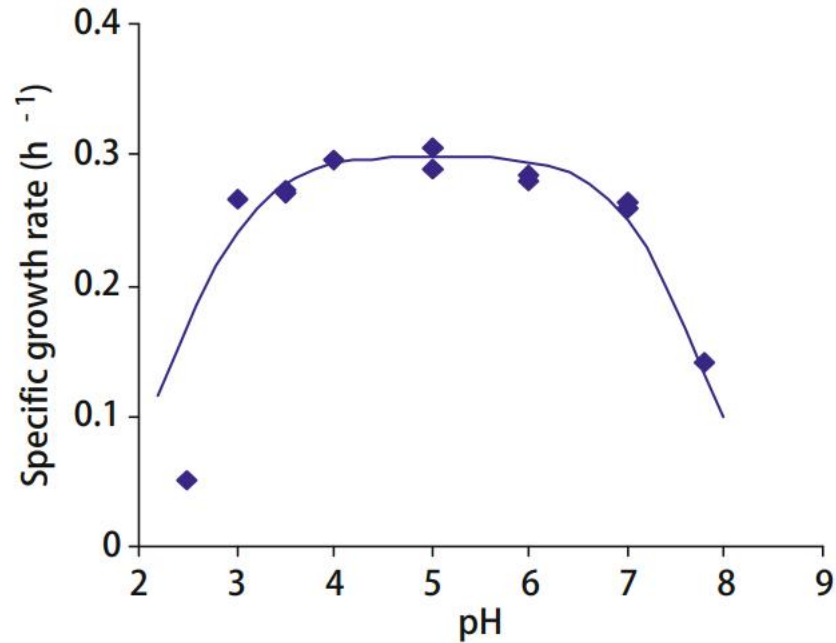
pH的影响

最适生长的pH对不同的微生物有特征性。

pH对表观最大比生长速率 μ_{\max}^* 的影响，

$$\mu_{\max}^* = \frac{\mu_{\max}}{1 + \frac{K_1}{c_{H^+}} + \frac{c_{H^+}}{K_2}}$$

影响细胞生长动力学的因素



pH对曲霉病丝状菌的最大比生长速率的影响

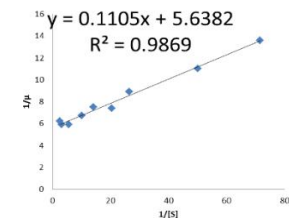
例：乙醇唯一碳源进行面包酵母培养，获得的数据如下表所示，求： K_S, μ_{max}

S (g/L)	0.40	0.33	0.18	0.10	0.071	0.049	0.038	0.20	0.014
μ (h ⁻¹)	0.161	0.169	0.169	0.149	0.133	0.135	0.112	0.0909	0.0735

解：将Monod 方程变形为：
$$\frac{1}{\mu} = \frac{1}{\mu_{max}} + \frac{K_S}{\mu_{max}} \cdot \frac{1}{[S]}$$

由所给数据，以 $1/[S]$ 为横坐标， $1/\mu$ 为纵坐标，作图得一直线，由直线与X轴和Y轴相交，可分别求得：

$K_S = 0.02$ (Kg/m³), $\mu_{max} = 0.18$ (h⁻¹)



例：以甲醇为底物，进行某种微生物的好氧分批培养，获得如下数据，求：

- (1) μ_{\max} ; Y_{XS} ; 倍增时间 t_d ; 饱和常数 K_S ;**
- (2) 当 $t=10$ h时，微生物的比生长速率;**

时间/h	0	2	4	8	10	12	14	16	18
X (g/L)	0.2	0.211	0.305	0.98	1.77	3.2	5.6	6.15	6.2
S(g/L)	9.23	9.21	9.07	8.03	6.8	4.6	0.92	0.077	0

解：根据题义可得如下数据

ΔC_X	C_S 平均值	C_X 平均值	V_X	C_X/V_X	$1/C_S$
0.011	9.220	0.206	0.005	41.200	0.108
0.094	9.140	0.258	0.047	5.489	0.109
0.675	8.550	0.643	0.169	3.807	0.117
0.790	7.415	1.375	0.395	3.481	0.135
1.430	5.700	2.485	0.715	3.476	0.175
2.400	2.760	4.400	1.200	3.667	0.362
0.550	0.499	5.875	0.275	21.364	2.006
0.050	0.039	6.175	0.025	247.000	25.974

由

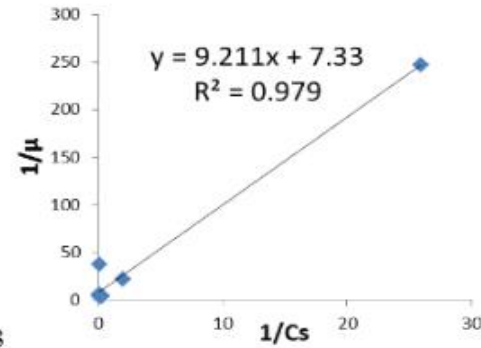
$$\mu = \frac{\mu_{\max} \cdot C_S}{K_S + C_S}$$

$$\frac{1}{\mu} = \frac{1}{\mu_{\max}} + \frac{K_S}{\mu_{\max}} \cdot \frac{1}{C_S} \quad r_X = \mu C_X \rightarrow \mu = \frac{r_X}{C_X} \rightarrow \frac{1}{\mu} = \frac{C_X}{r_X}$$

作图可得: $y=9.211x+7.33$

$$1/\mu_{\max}=7.33, K_s/\mu_{\max}=9.211$$

$$\text{因此 } \mu_{\max}=0.1364 \text{ h}^{-1}, K_s=1.257 \text{ kg/m}^3$$



$$Y_{XS} = \Delta X / \Delta S = (6.2-0.2)/(9.23-0)=0.65 \text{ g/g}$$

$$t_d = \ln 2 / \mu_{\max} = 0.693 / 0.1364 = 5.08 \text{ h}$$

$$t = 10 \text{ h 时}, \mu = \frac{\mu_{\max}[S]}{K_s + [S]} = \frac{0.1364 \times 6.8}{1.257 + 6.8} = 0.115 \text{ h}^{-1}$$

小结

细胞生长动力学、细胞生长速率与比速率；

细胞生长动力学模型（Monod）及其各种修正模型；

思考题:

1. 细胞指数生长期的比生长速率是否为最大比生长速率。在指数期细胞是否为均衡生长?
2. 对大多数微生物, 若Monod方程适用, 饱和系数一般处于哪个范围? 若限制性底物为葡萄糖, 如何利用Monod生长模型结果控制葡萄糖浓度以避免葡萄糖效应?
3. Monod 方程中的最大比生长速率的求取时, 若用指数生长期的细胞浓度随时间变化的数据直接求导计算得出。试问这种做法的正确性如何?

作业

以乙醇为唯一碳源进行产气杆菌培养，菌体初始浓度 $X_0 = 0.1 \text{ Kg/m}^2$ ，培养至3.2 h，菌体浓度为 8.44 Kg/m^3 ，如果不考虑延迟期，比生长速率 μ 一定，求倍增时间 t_d 。

谢谢!