

# 第 5 章 培养技术与理论

桑庆亮

泉州师范学院

2018 年 6 月 1 日

### 一、微生物反应过程的主要特征

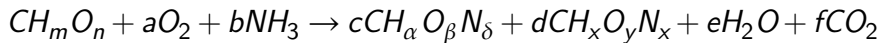
- 反应过程的主体是微生物细胞：微生物细胞的特性及其在反应过程中的变化是影响反应过程的因素。
- 反应的本质是复杂的酶催化反应：
- 反应过程非常复杂：微生物细胞经历生长、繁殖、维持、死亡等阶段，细胞的形态、组成等都是动态变化的；多条代谢形成代谢网络；反应体系中细胞生长、基质消耗和产物形成的复杂关系。

### 二、微生物反应过程的计量关系

#### 1、化学计量式

营养物 → 细胞 + 代谢产物

C 源、N 源、O<sub>2</sub>、无机盐等                      (目的产物、CO<sub>2</sub> 等)



CH<sub>m</sub>O<sub>n</sub> 是碳源的元素组成；CH<sub>α</sub>O<sub>β</sub>N<sub>δ</sub> 是无灰干菌体的元素组成；CH<sub>x</sub>O<sub>y</sub>N<sub>z</sub> 为代谢产物的元素组成。

## 5.1 微生物反应过程概论

对于以 C、H、O 构成的碳源和以  $\text{NH}_3$  为氮源组成的培养基，通过好氧过程仅生成  $\text{CO}_2$ 、 $\text{H}_2\text{O}$  和另一种产物  $P$  时，可建立如下化学元素平衡方程式：

$$\left. \begin{array}{l} C: 1 = c + d + f \\ H: m + 3b = c\alpha + dx + 2e \\ O: n + 2\alpha = c\beta + dy + e + 2f \\ N: b = c\delta + dz \end{array} \right\}$$

$\alpha, \beta, \delta$  和  $x, y, z$  通过分析菌体和代谢产物的元素组成获取； $a, f$  可测定  $\text{O}_2, \text{CO}_2$  的含量来获取。

## 5.1 微生物反应过程概论

根据实验数据确定的某些关系式可建立相关计量系数之间的关系，如根据需氧反应中的**呼吸商  $RQ$** 建立下式：

$$RQ = \frac{CO_2\text{释放速率}}{O_2\text{消耗速率}} = \frac{CER}{OUR} = \frac{f}{a}$$

其中，呼吸商  $RQ$  是细胞反应中每消耗 1 mol  $O_2$  所产生的  $CO_2$  物质的量，单位  $\text{mol}_{CO_2}/\text{mol}_{O_2}$ 。

## 5.1 微生物反应过程概论

2. 得率系数：描述微生物反应中计量关系的宏观参数之一，用以简化描述微生物反应中各物质的计量关系。

对基质的细胞得率系数： $Y_{X/S}$

$$Y_{X/S} = \frac{\text{生成细胞的量}}{\text{消耗基质的量}} = -\frac{\Delta X}{\Delta S}$$

要明确： $Y_{X/S}$  是一个表观值，与时间跨度和中间状态无关，而只与始末状态有关。

## 5.1 微生物反应过程概论

分批培养时间为  $t$ ，则细胞得率系数

$$Y_{X/S} = \frac{\Delta X}{\Delta S} = \frac{X_t - X_0}{S_0 - S_t}$$

$X_0, X_t$  —— 起始，终止时的细胞浓度；

$S_0, S_t$  —— 起始，终止时的基质浓度；

## 5.1 微生物反应过程概论

分批培养过程中，基质浓度和细胞浓度不断变化，因而得率系数随状态而改变。在某一瞬间的细胞得率系数称为**微分得率系数**或瞬间得率系数，定义式如下：

$$Y_{X/S} = \frac{r_X}{r_S} = \frac{dX/dt}{dS/dt} = \frac{dX}{dS}$$

$r_X$ ,  $r_S$  均为瞬时速率。



**对碳的细胞得率系数**  $Y_c$ : 由碳同化为细胞过程的转化效率.

$$Y_c = \frac{\text{生成细胞量} \times \text{细胞含碳量}}{\text{基质消耗量} \times \text{基质含碳量}} = \frac{X_c \Delta X}{S_c \Delta S} = Y_{X/S} \cdot \frac{X_c}{S_c}$$

$X_c, S_c$  —— 细胞、基质的含碳量;

$Y_c$  仅考虑基质与菌体共同含有的碳元素, 比  $Y_{X/S}$  更合理.

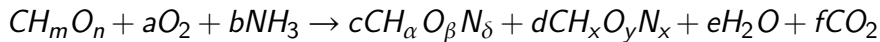
$1 - Y_c$  表示转化成细胞以外其他产物中的碳的分数.

对 ATP 的细胞得率系数  $Y_{ATP}$ : 每生成 1 mol ATP 所增加的细胞量.

$$Y_{ATP} = \frac{\Delta X}{\Delta ATP} = \frac{\Delta X / \Delta S}{\Delta ATP / \Delta S} = \frac{Y_{X/S}}{Y_{ATP/S}}$$

大量实验发现, 厌氧培养时的  $Y_{ATP}$  与微生物、基质的种类无关, 基本为常数, 即  $Y_{ATP} \approx 10 \text{ g/mol}$ .

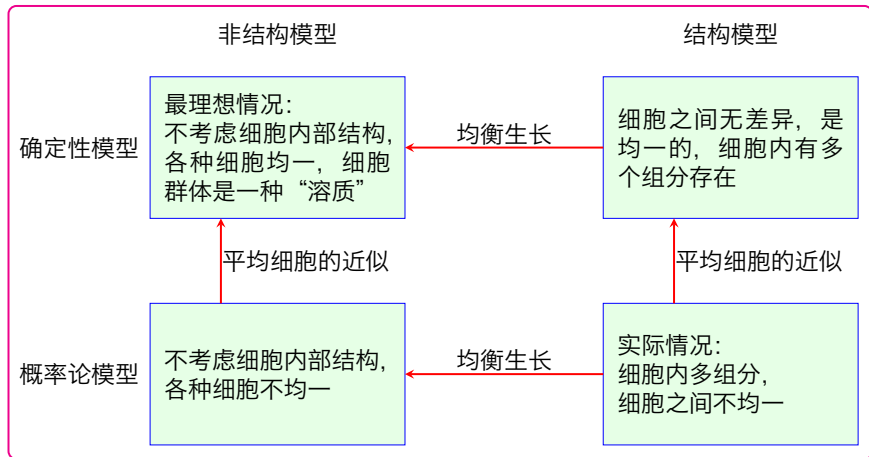
### 得率系数与化学计量关系



$$Y_{X/S} = \frac{M_x}{M_s} c \quad Y_{P/S} = \frac{M_p}{M_s} d \quad Y_{X/O} = \frac{M_x}{M_o} \frac{c}{a}$$

## 三、微生物反应动力学的描述方法

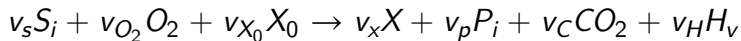
### 1. 模型简化：细胞群体水平、细胞无差异、均衡生长



## 5.1 微生物反应过程概论

### 2. 反应速率的定义

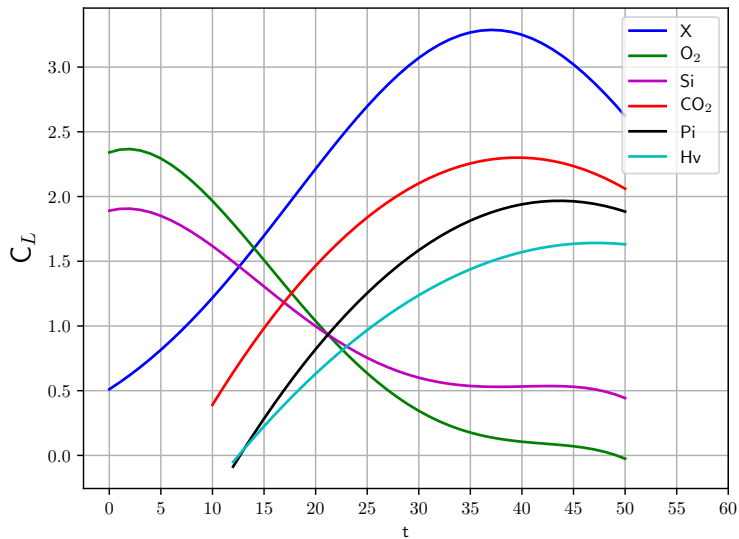
典型微生物好氧反应模式如下：



其中， $S_i$ 、 $O_2$ 、 $P_i$  和  $CO_2$  —— 基质、氧、产物和二氧化碳； $X_0$ 、

$X$  —— 接种细胞量、细胞量； $H_v$  —— 反应热

## 5.1 微生物反应过程概论



## 5.1 微生物反应过程概论

要描述各量的消耗/积累速率，常采用**绝对速率**和**比速率**两种速率概念。

**绝对速率**：又称速率 ( $r_x$ )。如细胞积累、基质消耗、氧消耗的速率分别定义如下

$$r_x = \frac{dX}{dt} \quad r_s = \frac{dS}{dt} \quad r_{O_2} = \frac{dO_2}{dt}$$

产物积累、二氧化碳积累、反应热积累的速率分别定义如下

$$r_p = \frac{dP}{dt} \quad r_C = \frac{dCO_2}{dt} \quad r_{H_v} = \frac{dH_v}{dt}$$

## 5.1 微生物反应过程概论

**比速率**：单位细胞中细胞浓度、基质浓度、氧浓度、二氧化碳浓度、产物浓度、反应热随时间的变化。

$$\mu = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} \quad Q_s = \frac{1}{X} \frac{dS}{dt} \quad Q_{O_2} = \frac{1}{X} \frac{dO_2}{dt}$$

$$Q_p = \frac{1}{X} \frac{dP}{dt} \quad Q_C = \frac{1}{X} \frac{dCO_2}{dt} \quad Q_{H_v} = \frac{1}{X} \frac{dH_v}{dt}$$



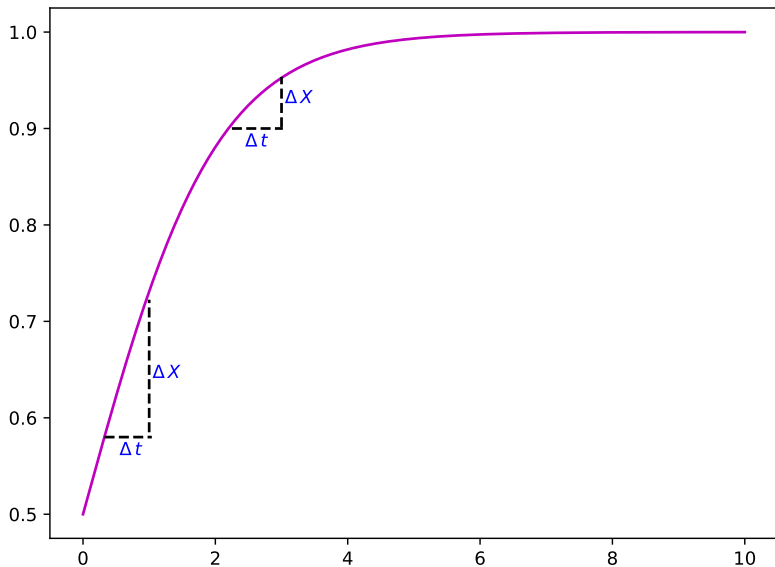
## 5.2 微生物分批培养及动力学

生长阶段：延迟期 → 指数生长期 → 稳定期 → 衰亡期

各阶段营养条件不同，细胞浓度不同，最终表现为比生长速率（表观生长比速率）不同。

$$\mu^* = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt}$$

## 5.2 微生物分批培养及动力学



## 5.2 微生物分批培养及动力学

$$\mu = \frac{dX}{dt} \rightarrow \frac{dX}{X} = \mu dt \quad \text{积分如下:}$$

$$\int_{X_0}^X \mu dt = \int_{t_0}^t \mu dt \rightarrow \ln \frac{X}{X_0} = \mu(t - t_0)$$

$$\text{当 } X = 2 \cdot X_0, \text{ 且 } t_0 = 0 \rightarrow t = \frac{\ln 2}{\mu}$$

$$\text{即: } t = \frac{0.693}{\mu} \quad \text{倍增时间, 记为: } t_d$$

## 5.2 微生物分批培养及动力学

**Monod 方程**：描述细胞比生长速率与限制性基质浓度的关系

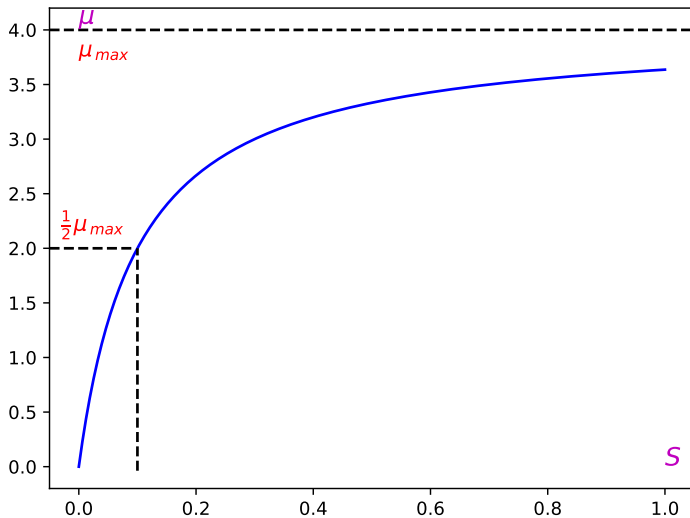
$$\mu = \frac{\mu_{max} S}{K_s + S}$$

$S$  — **限制性基质**浓度     $K_s$  半饱和常数

Monod 方程的基本假设：

- 细胞为均衡式生长，细胞浓度是描述细胞生长的唯一变量
- 培养基中只有一种限制性基质，其他组分过量且不影响细胞生长
- 细胞生长为简单的单一反应，细胞得率为一常数

## 5.2 微生物分批培养及动力学



## 5.2 微生物分批培养及动力学

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

当  $K_s = S$ , 有  $\mu = \frac{1}{2} \mu_{\max}$

当  $K_s \gg S$ , 有  $K_s + S \approx K_s \quad \therefore \mu \approx \frac{S}{K_s} \mu_{\max}$

当  $K_s \ll S$ , 有  $K_s + S \approx S \quad \therefore \mu \approx \mu_{\max}$

## 5.2 微生物分批培养及动力学

$$\mu = \frac{\mu_{\max} S}{K_s + S} \quad r_x = \frac{dX}{dt} = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} \cdot X = \mu \cdot X$$

$$r_x = \frac{\mu_{\max} S}{K_s + S} \cdot X$$

当  $S \ll K_s$  时, 有:  $r_x = \frac{S}{K_s} \cdot X \cdot \mu_{\max}$

当  $S \gg K_s$  时, 有:  $r_x = X \cdot \mu_{\max}$

## 5.2 微生物分批培养及动力学

实验测定  $\mu_{\max}$  和  $K_s$ : 双倒数作图.

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

测定不同  $S$  对应的  $\mu$ , 以  $\frac{1}{S} \sim \frac{1}{\mu}$  作图, 回归曲线呈线性



有抑制的细胞生长:

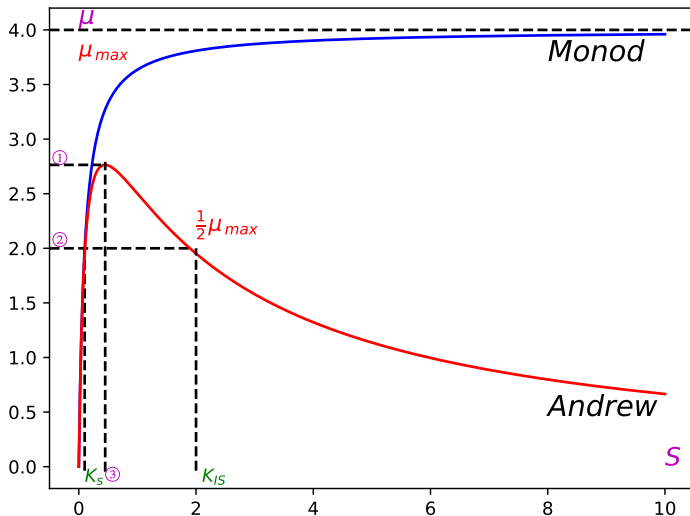
基质抑制动力学, 最常用的是 Andrew 模型

$$\mu = \frac{\mu_{\max} S}{K_s + S + S^2/K_{IS}}$$

其中,  $K_{IS}$  —— 基质抑制常数.

$$\textcircled{1} \mu = \frac{\mu_{\max}}{1 + 2\sqrt{K_s/K_{IS}}} \quad \textcircled{2} \mu = \frac{S}{K_s} \cdot \mu_{\max} \quad \textcircled{3} S = \sqrt{K_s K_{IS}}$$

## 5.2 微生物分批培养及动力学



## 5.2 微生物分批培养及动力学

根据上图可估计 Andrew 模型的参数值.

当基质浓度为  $\sqrt{K_s K_{IS}}$  时, 细胞生长速率达到最大值

$$\frac{\mu_{\max}}{1 + 2\sqrt{K_s/K_{IS}}}$$

当  $S \gg K_s$  时, 可由下式确定  $K_{IS}$ :

$$\frac{1}{\mu} = \frac{1}{\mu_{\max}} + \frac{S}{\mu_{\max} K_{IS}}$$

**产物抑制动力学**: 有时细胞的一些代谢产物会影响细胞生长, 称产物抑制.

产物抑制分为**线性下降式**、**指数下降式**和**分段下降式**.

## 5.2 微生物分批培养及动力学

**基质的消耗**: 底物/基质用于合成新细胞物质、胞外产物及供能。氧作为最终电子受体，最终生成水并释放 → 氧随基质的消耗而消耗。

**基质的消耗速率与比消耗速率/消耗比速率**: 基质的消耗速率可通过细胞得率系数与细胞生长速率相关联。

## 5.2 微生物分批培养及动力学

单位体积培养液中的  $S$  的消耗速率  $r_s$  可用下式表示：

$$Y_{x/s} = \frac{\Delta X}{\Delta S} = \frac{r_x \cdot \Delta t}{r_s \cdot \Delta t} = \frac{\frac{1}{X} r_x}{\frac{1}{X} r_s} = \frac{\mu}{Q_s}$$

$$Q_s = \frac{\mu}{Y_{x/s}} = \frac{1}{Y_{x/s}} \cdot \frac{\mu_{\max} S}{K_s + S}$$

若定义基质最大消耗比速率： $Q_{s,\max} = \frac{\mu_{\max}}{Y_{x/s}}$ ，则

$$Q_s = \frac{\mu}{Y_{x/s}} = \frac{1}{Y_{x/s}} \cdot \frac{\mu_{\max} S}{K_s + S}$$

## 5.2 微生物分批培养及动力学

**基质消耗动力学**：分批培养时，培养液中基质的减少是由于细胞和产物的生成，如果限制性基质是碳源，消耗掉的碳源中一部分形成细胞物质，一部分形成产物，一部分供细胞维持生命活动之用。基质消耗速率物料衡算可表示为：

$$r_s = \frac{1}{Y_G} r_x + mX + \frac{1}{Y_P} r_p$$

$Y_G$ ：细胞得率系数（对用于生长的基质）       $m$ ：维持系数

$Y_P$ ：产物得率系数（对用于产物的基质）       $m$ ：维持系数

## 5.2 微生物分批培养及动力学

因为  $Q_p = \frac{1}{X} \frac{dP}{dt} = \frac{1}{X} \cdot r_p$ , 所以  $r_s = \frac{1}{Y_G} r_x + mX + \frac{1}{Y_p} \cdot Q_p X$

两边均除以  $X$ , 得

$$Q_s = \frac{1}{Y_G} \mu + m + \frac{1}{Y_p} \cdot Q_p$$

Diagram illustrating the components of the specific substrate consumption rate ( $Q_s$ ):

- $\frac{1}{Y_G} \mu$ : 生长消耗 (Growth consumption)
- $m$ : 维持 (Maintenance)
- $\frac{1}{Y_p} \cdot Q_p$ : 产物消耗 (Product consumption)



## 5.2 微生物分批培养及动力学

**产物的生成**: 根据产物生成速率与细胞生长速率之间的关系,

Gaden 将代谢产物生成的动力学模型分为三种类型:

- 类型 I: 相关模型  $r_p = Y_{p/x} r_x = Y_{p/x} \mu X$   $Q_p = Y_{p/x} \mu$
- 类型 II: 部分相关模型  $r_p = \alpha r_x + \beta X$   $Q_p = \alpha \mu + \beta$
- 类型 III: 非相关模型  $r_p = \beta X$   $Q_p = \beta$

**一、单级恒化器:** 仅一个反应器/发酵罐，培养过程中无细胞加入，有基质加入和发酵液流出。反应器容积恒定。

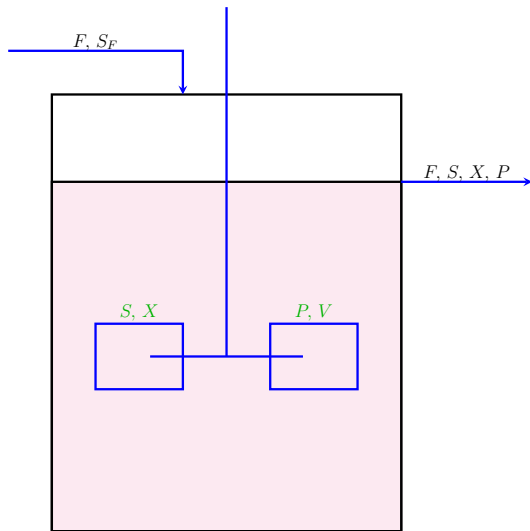
菌体、限制性底物、产物的物料平衡/衡算式：

$$\text{菌体: } V \frac{dX}{dt} = FX_F - FX + \mu XV$$

$$\text{限制性底物/基质: } V \frac{dS}{dt} = FS_F - FS - \frac{\mu XV}{Y_{x/s}}$$

$$\text{产物: } V \frac{dP}{dt} = FP_F - FP + Q_p XV$$

## 5.3 微生物连续培养及动力学



## 5.3 微生物连续培养及动力学

∴ 发酵罐/反应器容积恒定，因此有

$$\text{菌体: } \frac{dX}{dt} = F/V \cdot X_F - F/V \cdot X + \mu X$$

$$\text{限制性底物/基质: } \frac{dS}{dt} = F/V \cdot S_F - F/V \cdot S - \frac{\mu X}{Y_{x/s}}$$

$$\text{产物: } \frac{dP}{dt} = F/V \cdot P_F - F/V \cdot P + Q_p X$$

## 5.3 微生物连续培养及动力学

流体中定义**稀释率** ( $D$ ):  $D = \frac{F}{V}$ , 且培养过程中不加入细胞和产物, 即  $X_F = 0$   $X_P = 0$ , 进一步整理:

$$\text{菌体: } \frac{dX}{dt} = (\mu - D) \cdot X$$

$$\text{限制性底物/基质: } \frac{dS}{dt} = D \cdot S_F - D \cdot S - \frac{\mu X}{Y_{x/s}}$$

$$\text{产物: } \frac{dP}{dt} = Q_p X - D \cdot P$$

## 5.3 微生物连续培养及动力学

稳态时假设 (即恒化培养):  $\frac{dX}{dt} = 0$   $\frac{dS}{dt} = 0$   $\frac{dP}{dt} = 0 \therefore$

菌体:  $\frac{dX}{dt} = (\mu - D) \cdot X \rightarrow \mu = D$

基质:  $\frac{dS}{dt} = D \cdot S_F - D \cdot S - \frac{\mu X}{Y_{x/s}} \rightarrow S_F - S = \frac{X}{Y_{x/s}}$

产物:  $\frac{dP}{dt} = Q_p X - D \cdot P \rightarrow P = \frac{Q_p}{D} \cdot X$

用  $D$  代替  $\mu$ , 则 Monod 方程可整理如下:

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

该式即为基质浓度与稀释率之间的关系. 若  $D \uparrow$ , 则  $S \uparrow$ ,  $D$  改变前后为两个稳态, 即  $D$  由  $D_1 \rightarrow D_2$ , 由一个稳态  $\rightarrow$  另一稳态, 细胞浓度分别为  $S_1$  和  $S_2$ . 若  $D_1 > D_2 \rightarrow S_1 > S_2$

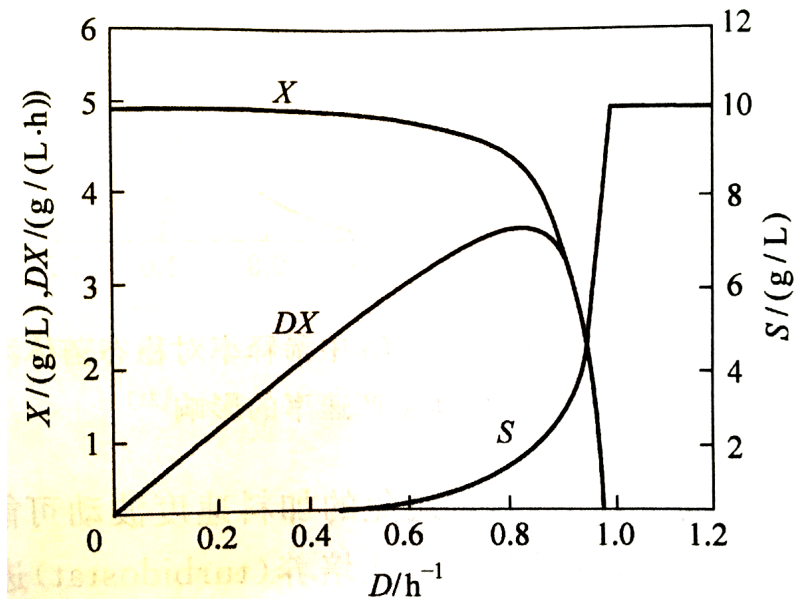
将基质浓度与稀释率之间的关系式代入下式即导出细胞浓度  $X$  与稀释率  $D$  之间的关系式：

$$S_F - S = \frac{X}{Y_{x/s}} \rightarrow X = Y_{x/s} \cdot \left( S_F - \frac{K_s D}{\mu_{\max} - D} \right)$$

由上式可以看出：若  $D \uparrow$ ，则  $X \downarrow$ ， $D$  改变前后为两个稳态，即  $D$  由  $D_1 \rightarrow D_2$ ，由一个稳态  $\rightarrow$  另一稳态，细胞浓度分别为  $X_1$  和  $X_2$ 。若  $D_1 > D_2 \rightarrow X_1 < X_2$



## 5.3 微生物连续培养及动力学



## 5.3 微生物连续培养及动力学

在连续培养中，稀释率存在一个临界值，超过该临界值，细胞被“冲出”或“洗法”，使培养无法进行，即临界稀释率 ( $D_c$ )。

临界稀释率取决于微生物生长动力学特征以及限制性基质浓度，可通过下式计算临界稀释率：

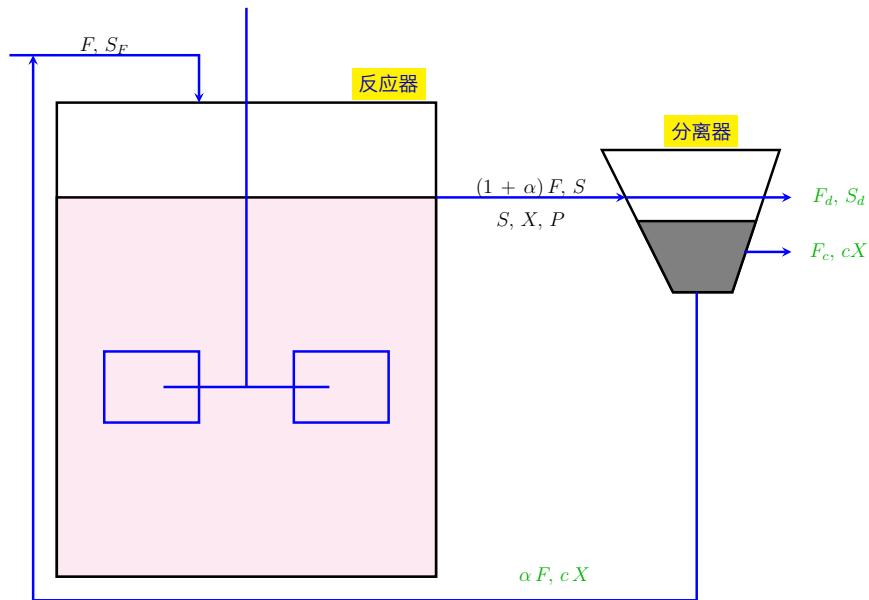
$$D_c = \frac{\mu_{\max} S_F}{K_s + S_F}$$

**二、部分菌体再循环的单线恒化器：**通过沉降、离心或过滤等方法浓缩流出液菌体，再将菌体送回反应器循环利用。

$$\begin{array}{c}
 \begin{array}{ccc}
 \text{循环} & \text{生长} & \text{流出} \\
 \downarrow & \downarrow & \downarrow \\
 \text{菌体物料衡算: } V \frac{dX}{dt} = \alpha F_c X + \mu X V - (1 + \alpha) F X
 \end{array} \\
 \\
 \begin{array}{ccccccc}
 \text{限制基质衡算: } V \frac{dS}{dt} = & F S_F & + \alpha F S & - \frac{\mu X V}{Y_{x/s}} & - (1 + \alpha) F S \\
 & \uparrow & \uparrow & \uparrow & \uparrow \\
 & \text{流入} & \text{循环} & \text{生长消耗} & \text{循环}
 \end{array}
 \end{array}$$

式中， $\alpha$  —— 回流比； $c$  —— 浓缩倍数，且流入细胞  $X_0 = 0$

## 5.3 微生物连续培养及动力学



## 5.3 微生物连续培养及动力学

达到稳态时, 假设: (1)  $dX/dt$ 、 $dS/dt$ 、 $dP/dt$  均为零; (2) 没有细胞死亡, 即  $\alpha = 0$ ; (3) 发酵罐内各向同质 (完全混匀).

$\therefore V$ 、 $X$  均相同,  $\therefore$  两侧同除以  $VX$

$$V \frac{dX}{dt} = \alpha F c X + \mu X V - (1 + \alpha) F X \rightarrow$$

$$\alpha c F/V + \mu - (1 + \alpha) F/V = 0 \quad \therefore \text{定义稀释率 } D = F/V \rightarrow$$

$$\mu = \alpha c D - (1 + \alpha) D \quad \text{即: } \mu = D(1 + \alpha - \alpha c)$$

式中, 由于流出的菌体多于回流菌体, 故  $1 + \alpha - \alpha c > 0$

$$\text{又由于 } 0 < \alpha < 1, c > 1, \therefore 1 + \alpha - \alpha c < 1 \rightarrow 0 < \mu < D$$

## 5.3 微生物连续培养及动力学

细胞生长遵循 Monod 方程, 因此可导出稳态时限制性底物浓度

$$\mu = \frac{\mu_{\max} S}{K_s + S} \rightarrow S = \frac{K_s \mu}{\mu_{\max} - \mu} = \frac{K_s D(1 + \alpha - \alpha c)}{\mu_{\max} - D(1 + \alpha - \alpha c)}$$

代入基质衡算式:  $V \frac{dS}{dt} = F S_F + \alpha F S - \frac{\mu X V}{Y_{x/s}} - (1 + \alpha) F S$

稳态时, 整理为:  $D S_F = \frac{\mu X}{Y_{x/s}} + D S, \because \mu = D(1 + \alpha - \alpha c), \therefore$

$$X = \frac{Y_{x/s}}{1 + \alpha - \alpha c} [S_F - S] = \frac{Y_{x/s}}{1 + \alpha - \alpha c} \left[ S_F - \frac{K_s D(1 + \alpha - \alpha c)}{\mu_{\max} - D(1 + \alpha - \alpha c)} \right]$$

## 5.3 微生物连续培养及动力学

部分菌体再循环的单级恒化器稳态临界稀释率：

$$D_c = \frac{\mu_{\max} S_F}{K_s + S_F} \cdot \frac{1}{1 + \alpha - \alpha C} > \frac{\mu_{\max} S_F}{K_s + S_F}$$

对于部分菌体回收利用的单级恒化器，稳态下菌体比生长速率**小于**稀释率，临界稀释率比不进行菌体回流时**高**。

菌体回收利用相当于不断对反应器接种，结果是增大了反应器中的菌体浓度，增加了底物的利用程度，提高了反应器的效率。

**三、多级连续培养：**将多个搅拌罐反应器串联起来，前一级反应器的出料作为后一级反应器的进料，即成多级连续培养系统。

将多个反应器串联起来，整个系统相当于一个活塞流式反应器。实际操作中可以在第二级以后的各反应器中加入新鲜培养基。



## 5.3 微生物连续培养及动力学

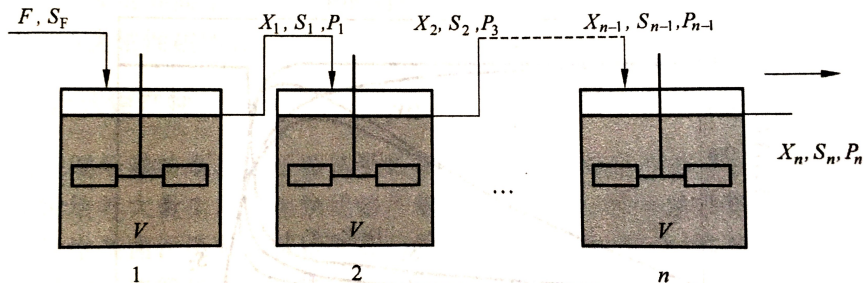
如果各级反应器中的培养液体积均为  $V$ ，中间不添加新培养基，各级进出料流速均为  $F$ ，则可写出第  $n$  级反应器的物料平衡式：

$$\text{菌体:} \quad V \frac{dX_n}{dt} = FX_{n-1} + \mu_n X_n V - FX_n$$

$$\text{限制性基质:} \quad V \frac{dS_n}{dt} = FS_{n-1} - \frac{\mu_n X_n V}{Y_{x/s}} - FS_n$$

$$\text{产物:} \quad V \frac{dP_n}{dt} = FP_{n-1} + Q_{p_n} X_n V - FP_n$$

## 5.3 微生物连续培养及动力学



## 5.3 微生物连续培养及动力学

稳态时,  $\frac{dX_n}{dt} = 0$   $\frac{dS_n}{dt} = 0$   $\frac{dP_n}{dt} = 0$ , 据此得出:

菌体: 
$$\mu_n = D \cdot \frac{X_n - X_{n-1}}{X_n}$$

限制性基质: 
$$X_n - X_{n-1} = -Y_{x/s} (S_n - S_{n-1})$$

基质: 
$$S_n = S_{n-1} - \frac{Q_{s_n} X_n}{D}$$

产物: 
$$P_n = P_{n-1} + \frac{Q_{p_n} X_n}{D}$$

## 5.3 微生物连续培养及动力学

第一级反应器： $\mu = D$ ，从第二级开始， $\mu < D$ 。

基质浓度逐级降低  $\rightarrow$  比生长速率逐级下降： $\mu_n < \mu_{n-1}$ 。

$D_c$  值不变，基质利用和菌体生长都比单级培养提高。

## 四、连续培养的应用:

1. 生产菌体：连续培养 vs. 分批培养

分批发酵时间：

$$t_B = t_{Lag} + \frac{1}{\mu_{max}} \ln \frac{X_0 + Y_{x/s} S_F}{X_0} + t_R + t_p$$

分批培养平均生产率为：

$$P_B = \frac{Y_{x/s} S_F}{\frac{1}{\mu_{max}} \ln \frac{X_0 + Y_{x/s} S_F}{X_0} + t_{Lag} + t_R + t_p}$$

## 5.3 微生物连续培养及动力学

连续培养最大菌体生产速率  $(DX)_{\max}$  (假定  $K_s \ll S_F$ ):

$$(DX)_{\max} = \mu_{\max} Y_{x/s} \left( \sqrt{K_s + S_F} - \sqrt{K_s} \right)^2 = \mu_{\max} Y_{x/s} S_F$$

若在最大比生长速率下连续培养, 并假定  $K_s \ll S_F$ , 将上式与分批培养生产率相比得:

$$\frac{(DX)_{\max}}{P_B} = \ln \frac{X_0 + Y_{x/s} S_F}{X_0} + \mu_{\max} (t_{\text{Lag}} + t_R + t_p)$$

连续培养生产率高于分批培养生产率, 且  $\mu_{\max}$  越大, 延迟期和辅助生产时间越长, 其优越性越明显.

## 5.3 微生物连续培养及动力学

### 2. 生产次生代谢物质:

工业上较少采用连续培养生产代谢物质.

Brown 等采用二级连续培养重组大肠杆菌连续培养生产  $\alpha_2$  干扰素, 其中第一级用于菌体生长和干扰素合成, 第二级加入氨苄青霉素 (氨苄西林) 促使菌体裂解释放干扰素.

### 3. 研究发酵动力学:

Monod 方程  $\rightarrow$  双倒数作图  $\rightarrow$  连续培养稳态时,  $\mu = D \rightarrow$   
 $\frac{1}{D}$  vs.  $\frac{1}{S}$  作图  $\rightarrow$  Y 轴截距为  $\frac{1}{\mu_{\max}}$ , X 轴截距为  $-\frac{1}{K_s}$

## 5.3 微生物连续培养及动力学

稳态: $D$	稳态: $S$	$1/D$	$1/S$
$D_1$	$S_1$	$1/D_1$	$1/S_1$
$D_2$	$S_2$	$1/D_2$	$1/S_2$
...	...	...	...
$D_n$	$S_n$	$1/D_n$	$1/S_n$



## 5.3 微生物连续培养及动力学

### 4. 研究细胞生理特性：改进发酵工艺

$D \rightarrow \mu$  ( $D < D_c$ ) 且  $X$ 、 $S$ 、 $P$  可测  $\rightarrow$  代谢调节/控制

### 5. 改进培养基：

连续培养、稳态  $\rightarrow$  固定  $D$  试验不同培养基  $\rightarrow$  根据限制性基质  $S$  残留情况判断培养基优劣  $\rightarrow$  改进发酵工艺

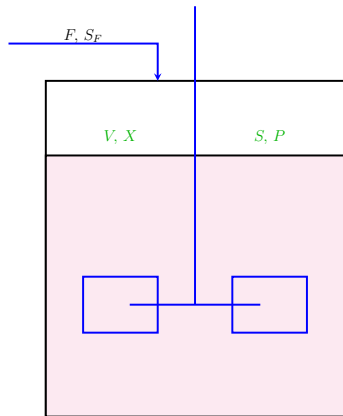
6. 筛选和富集菌种：  $\mu_{\max}$  高者保存，  $\mu_{\max}$  低者被淘汰。

7. 研究微生物遗传稳定性：连续培养  $\rightarrow$  遗传稳定的代数

## 5.4 补料分批培养

**补料分批培养**：介于分批培养和连续培养之间的培养方式，  
又称流加培养。操作方式有：间歇添加、连续添加。

**一、恒速流加**：以恒定流速加料液，是最简单的补料操方式。



## 5.4 补料分批培养

假设：理想混合状态，发酵液中仅一种限制性基质  $\rightarrow Y_{x/s}$  恒定

菌体：
$$\frac{d(VX)}{dt} = \mu XV$$

限制性基质：
$$\frac{d(VS)}{dt} = FS_F - \frac{1}{Y_{x/s}} \frac{d(VX)}{dt} = FS_F - \frac{\mu VX}{Y_{x/s}}$$

产物：
$$\frac{d(VP)}{dt} = O_p VX$$

发酵液体积：
$$\frac{dV}{dt} = F$$

## 5.4 补料分批培养

培养过程中，发酵液体积  $V$  和菌体浓度  $X$  均随时间而变化，因此有下式全微分：

$$\frac{d(VX)}{dt} = V \frac{dX}{dt} + X \frac{dV}{dt} \quad \because \quad \frac{d(VX)}{dt} = \mu VX \text{ 且 } \frac{dV}{dt} = F$$

$$\mu VX = V \frac{dX}{dt} + XF \quad \rightarrow \quad \frac{dX}{dt} = \mu X + \frac{F}{V} X = (\mu - D)X$$

## 5.4 补料分批培养

限制性基质整理得：

$$\frac{d(VS)}{dt} = V \frac{dS}{dt} + S \frac{dV}{dt} \quad \because \quad \frac{d(VS)}{dt} = FS_F - \frac{\mu VX}{Y_{x/s}} \text{ 且 } \frac{dV}{dt} = F$$

$$FS_F - \frac{\mu VX}{Y_{x/s}} = V \frac{dS}{dt} + SF \quad \rightarrow \quad \frac{dS}{dt} = D(S_F - S) - \frac{\mu X}{Y_{x/s}}$$

限制性基质整理得：

$$\frac{d(VP)}{dt} = V \frac{dP}{dt} + P \frac{dV}{dt} \quad \because \quad \frac{d(VP)}{dt} = Q_p VX \text{ 且 } \frac{dV}{dt} = F$$

$$Q_p VX = V \frac{dP}{dt} + PF \quad \rightarrow \quad \frac{dP}{dt} = Q_p X - DP$$

## 5.4 补料分批培养

当限制性基质浓度相对  $K_s$  很大时，发酵液中的菌体总量随时间指数增加，进入拟稳态后则随时间线性增加，即

$$XV = X_0V_0 + FS_F Y_{x/s}t$$

其中，拟稳态时菌体体积为  $X_0$ ，发酵液体积为  $V_0$ 。

自流加开始  $t$  时刻时发酵液体积满足： $V = V_0 + Ft$

稀释率为：
$$D = \frac{F}{V_0 + Ft}$$

稀释率随时间变化：
$$\frac{dD}{dt} = -\frac{F^2}{(V_0 + Ft)^2}$$

## 5.4 补料分批培养

如果  $V_0$  较小，流加时间很长， $V_0 \ll Ft$  且  $\mu = D$ ，则拟稳态的比生长速率变化率为：

$$\frac{dD}{dt} = -\frac{F^2}{(V_0 + Ft)^2} \rightarrow \frac{d\mu}{dt} = -\frac{1}{t^2}$$

拟稳态时，底物浓度较低，但不等于零：

$$\mu = \frac{\mu_{\max} S}{K_s + S} \text{ 且 } \mu = \frac{F}{V} = D \rightarrow S = \frac{K_s F/V}{\mu_{\max} - F/V}$$

## 5.4 补料分批培养

补料分批培养时，如果限制性底物是能源，则  $Y_{x/s}$  随比生长速率而变化，生成产物所消耗的限制性底物时，限制性底物的物料衡算式应改为：

$$\frac{d(VS)}{dt} = FS_F - \frac{1}{Y_G} \frac{d(VX)}{dt} - mVX$$

拟稳态时， $d(VS)/dt = 0$ ， $\frac{d(VX)}{dt} = \mu VX \quad \therefore$

$$FS_F = \frac{1}{Y_G} \frac{d(VX)}{dt} + mVX \quad \leftrightarrow \quad DS_F = \frac{1}{Y_G} \mu X + mX$$



## 5.4 补料分批培养

若在时间  $t_T$  菌体总量由指数增长转变为线性增长，这时的菌体浓度和发酵液体积分别为  $X_T$  和  $V_T$ ，将上式积分得

$$VX = \frac{FS_F}{m} - \left( \frac{FS_F}{m} - V_T X_T \right) \exp[-mY_G(t - t_T)]$$

当培养时间足够长或  $\frac{FS_F}{m} = X_T V_T$  时，菌体总量达到最大  $(VX)_{max}$ ，这时加入能源的消耗全用于维持：

$$(VX)_{max} = \frac{FS_F}{m}$$

## 5.4 补料分批培养

若比生产速率  $Q_P$  恒定不变, 则  $\frac{dP}{dt} = Q_P X - DP$  积分, 并代入  $V = V_0 + Ft$ , 得到

$$PV = P_0V_0 + Q_P X_{\max} \left( V_0 + \frac{Ft}{2} \right) t$$

$$\because X_{\max} = Y_{X/S} S_F \quad \therefore P = \frac{P_0V_0}{V} + Q_P Y_{X/S} S_F \left( \frac{V_0}{V} + \frac{Dt}{2} \right) t$$

$$\text{若 } Q_P \text{ 不恒定, 则 } P = \frac{P_0V_0}{V} + \frac{1}{V} \int_0^t Q_P(t) Y_{X/S} S_F \left( \frac{V_0}{V} + \frac{Dt}{2} \right) dt$$

**二、指数流加:** 如果采用指数流加, 可以保持恒定的比生长速率.

**三、限制性基质浓度线性增加:** 在恒速流加中, 使限制性基质浓度随时间线性增加.