

# 赖氨酸流加发酵最优控制的研究

官 衡

伦世仪

(华东理工大学生化工程系 上海 200237) (无锡轻工大学生物工程系 无锡 214036)

**摘 要** 在赖氨酸发酵动力学模型和庞特里金明小值原理的基础上, 得出流加发酵的最优化底物流加方式。并进一步对流加发酵的全过程进行了分析, 得出了在实际控制中较为可行的流加发酵全过程的总控制策略, 实际控制表明在小型反应器中赖氨酸产生菌 FB42 的发酵水平为 81.6g/L、转化率为 0.418%、生产强度为 1.16g/h·L, 和分批发酵相比分别提高了 45.4%、9.7%和 28.4%。

**关键词** 赖氨酸发酵, 流加发酵, 最优化

近年来, 在发酵行业中有关流加发酵研究的文献报道不断增多, 其中一个主要的研究热点就是实现发酵过程的最优化。流加发酵最优化的研究, 使得人们更为理性地认识发酵过程的本质, 从而为发挥菌种潜力, 提高生产水平提供了一定的条件, 体现了现代发酵工业的研究趋势。目前在流加发酵最优化的理论研究方面, 虽已取得一些进展<sup>[1~4]</sup>, 但真正能成功地应用于生产的实例还不多见。究其原因主要表现在两个方面: 一是由于微生物反应过程的复杂性, 建立合理的能描述微生物反应过程的动力学模型非常困难; 二是求解出的最优化控制策略往往非常复杂, 实际实施的难度较大。

作者曾就赖氨酸发酵的动力学特性及赖氨酸发酵过程的动力学模型进行了较为详细的研究<sup>[5]</sup>, 在此基础上我们对赖氨酸流加发酵的最优化展开深入的研究, 力求找出简单易行的优化流加控制策略。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种

L-赖氨酸产生株黄色短杆菌 (*Brevibacterium flavum*) FB42 (leu<sup>-</sup>, Thr<sup>1</sup>, AEC<sup>r</sup>, str<sup>r</sup>, AHV<sup>r</sup>, Lys Hx<sup>r</sup>) 无锡轻工大学提供。

### 1.2 培养基

1.2.1 斜面培养基(%): 葡萄糖 1, 牛肉膏 0.5, 酵母膏 0.5, NaCl 0.5, 琼脂 2.0, pH7.0。

1.2.2 种子培养基(%): 葡萄糖 2, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.4, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.1, 玉米浆 2.5, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5, 豆饼水解液 0.5, CaCO<sub>3</sub> 1.0, pH7.0。

1.2.3 发酵培养基(%): 葡萄糖 4.0, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3.0, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.1, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.05, 玉米浆 3.0, 豆饼水解液 2.0, 泡敌 0.03, pH7.2。

1.2.4 流加培养基: 除葡萄糖外, 其它均同发酵培养基, 葡萄糖浓度按实验要求定。

### 1.3 发酵设备

瑞士 INFORS, 30L 实验用自控发酵罐, 发酵液溶氧自动指标, 温度自动控制, pH

自动控制。

## 1.4 培养条件

斜面活化 24h。种子在 31~32℃ 下振荡培养 17~19h。30L 的发酵罐中开始装入 8L 发酵液, 接种量 10%, 温度为 32℃, 通风量 8L/min, 罐压 0.05MPa, 流加氨水控制所需的 pH 值, 搅拌转速根据所需的要求定。当分批发酵进行一段时间后, 开始流加, 最终发酵液体积为 16L。

## 1.5 分析方法

1.5.1 菌体量的测定: 样品菌液摇匀后, 吸出 0.2ml, 加入 4ml 0.25mol/L 的盐酸溶液, 于波长 620nm 处读 OD 值。所得 OD 值与 OD 值-菌体干重标准曲线对照, 计算出菌体浓度。

1.5.2 葡萄糖浓度: 用 3, 5-二硝基水杨酸法<sup>[6]</sup>测定。

1.5.3 赖氨酸浓度: 用酸性茚三酮法<sup>[7]</sup>测定。

## 2 结果与讨论

### 2.1 赖氨酸分批发酵的动力学模型

考虑到基质的抑制作用和赖氨酸发酵的特点, 采用如下的一组模型用来描述赖氨酸的发酵过程:

$$\mu = \mu_{\max} \cdot \left(1 - \frac{X}{X_{\max}}\right) \cdot \left(\frac{1}{1 + S/X_i}\right) \quad (1)$$

$$\pi = K_1 \cdot \mu + K_2 \cdot \left(\frac{S}{S + K_{ip}}\right) \cdot \left(\frac{1}{1 + S/K_{ip}}\right) \quad (2)$$

$$\sigma = \frac{1}{Y_x} \cdot \mu + \frac{1}{Y_p} \cdot \pi + m \quad (3)$$

分析该组模型可以看出, 菌体生长模型(1)式既反映了菌体生长对自身的抑制作用又反映了高浓度基质对菌体合成的抑制作用; 同样产物形成模型(2)式不但可以反映出二类发酵的特征, 也可同时反映出基质对菌体形成产物的影响。用该组模型描述赖氨酸分批发酵过程取得了非常理想的结果<sup>[5]</sup>。模型参数见表 1。

表 1 模型参数取值汇总

Table 1 The value of parameters of the model

Parameter	$\mu_{\max}/$ $\text{h}^{-1}$	$X_{\max}/$ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	$K_i/$ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	$K_1$	$K_2$	$K_{ip}/$ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	$K_{ip}/$ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	$Y_x/$ $\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$	$Y_p/$ $\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$	$m/$ $\text{g} (\text{g} \cdot \text{h})^{-1}$
Value	0.28	17.75	102.1	0.46	0.18	12.2	41.5	0.51	0.61	0.04

### 2.2 流加发酵系统的最优化问题

引入状态变量  $X_1, X_2, X_3, X_4$  分别代表  $XV, SV, PV, V$ 。另再加一状态变量  $X_5$ , 并令  $\dot{X}_5 = 1, X_5(0) = t_0, X_5(f) = t_f$ , 实质上  $X_5$  代表发酵时间。可以得到流加发酵系统的状态方程:

$$\frac{d}{dt} \begin{pmatrix} X_1 \\ X_2 \\ X_3 \\ X_4 \\ X_5 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \mu X_1 \\ -\sigma X_2 \\ \pi X_3 \\ 0 \\ 1 \end{pmatrix} + \begin{pmatrix} 0 \\ S_F \\ 0 \\ 1 \\ 0 \end{pmatrix} F \quad (4)$$

写成向量式为:  $x = a(x) + bF$

(5)

$$x(0) = x_0$$

为实现发酵终点的产物浓度最高,目标泛函为:  $J = -P_f$

因此对于赖氨酸流加发酵系统的最优化问题就是如何得出最佳的度物流加方式,使得发酵终点时产物的浓度最高。从  $\mu, \pi$  的关系式中看出,在赖氨酸发酵过程中产物的形成和菌体的生长同时受抑制,考虑到实际发酵中起始阶段总能维持一定的初糖浓度,这样最优流加方式包括:最小、单一、最小三个阶段<sup>[8]</sup>。

在庞特里金最小值原理的基础上,应用  $\text{Lim}^{[8-9]}$  等给出的运算步骤,对赖氨酸流加发酵系统进行最优化流加方式的求解。表 2 为模型计算的初始值,计算出的最优化流加方式以及菌体、残糖、产物的变化曲线如图 1 所示。

表 2 模型计算的初始值

Table 2 The initial value for model calculation

$S_0/\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	$V_0/\text{L}$	$V_f/\text{L}$	$S_T/\text{g}$	$S_f/\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$
40	8	16	3200	360

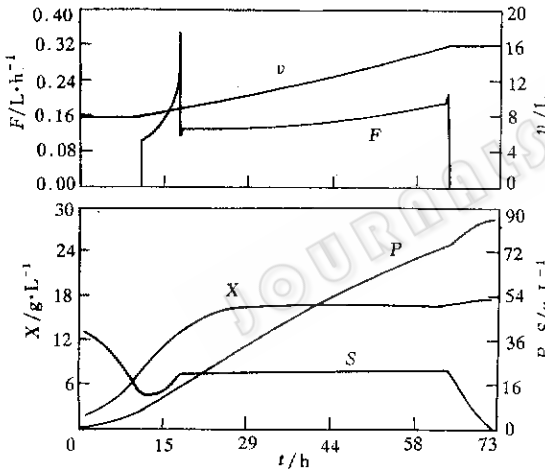


图 1 最优化流加方式下发酵过程曲线  
(模型计算)

Fig. 1 Fermentation courses in optimal feeding process (model calculation)

从图 1 最优化流加方式包括开始的分批阶段 (0~11.1h), 单一控制阶段 (11.1~63.9h) 和停止流加后的一个分批阶段 (63.9~72.4h)。从图中可以看出单一控制阶段分为明显的两个过程: 在 11.1~17.4h 之间流加速度增长很快, 此时葡萄糖的浓度很快从 13.54g/L 增加到 22.5g/L; 当  $t > 17.4$ h 后流加速度突然从 0.35L/h 降到 0.128L/h, 其后流加速度一直缓慢地增加, 增加趋势几乎呈线性的变化, 在这阶段葡萄糖浓度一直维持在 22.5g/L 这个恒定的水平。菌体浓度的变化在发酵开始阶段增加很快, 当  $t > 17.4$ h 后, 菌体浓度基本达到饱和。产物浓度的变化在整个发酵过程中一直保持增长的趋势, 按此最佳操作, 发酵 72.4h 后, 发酵液中的产物浓度为 85.85g/L, 总转化率为 0.429%。

### 2.3 最优化流加策略的简化

流加发酵最优操作时, 在单一控制阶段蕴涵有这样一个内在的物理本质: 即若要获得最高产物浓度在单一控制阶段必须始终维持产物的瞬时转化率处于最大<sup>[10]</sup>, 特别是当  $\mu, \pi, \sigma$  只是基质  $S$  的函数时, 在单一控制阶段最佳的基质浓度是一个定值, 因此在单一控制阶段基质浓度一直处于一个恒定的水平<sup>[8]</sup>。在赖氨酸发酵过程中, 瞬时转化率为:

$$Y = \frac{\pi(S, X)}{\mu(S, X)/Y_X + \pi(S, X)/Y_P + 0.04} \quad (6)$$

从式(6)中可以看出,对于赖氨酸发酵 $\pi$ 、 $\mu$ 均是 $S$ 、 $X$ 的函数,所以在单一控制阶段要使每一时刻的转化率处于最大,基质浓度必然随菌体浓度的变化而变化。当 $X$ 接近 $X_{\max}$ 时,由赖氨酸发酵的动力学模型(1)、(2)可知:

$$\mu(S, X) \approx 0 \quad (7)$$

$$\pi(S, X) \approx K_2 \cdot \left( \frac{S}{S + K_{i_p}} \right) \cdot \left( \frac{1}{1 + S/K_{i_p}} \right) \quad (8)$$

所以

$$Y' \approx d \left( K_2 \cdot \left( \frac{S}{S + K_{i_p}} \right) \cdot \left( \frac{1}{1 + S/K_{i_p}} \right) \right) / dS = 0 \quad (9)$$

得: $S = \sqrt{K_{i_p} \cdot K_{i_p}} = 22.5 \text{ g/L}$

上述分析结果和图1直接计算出的结果完全一致:流加开始阶段(11.4 - 17.4h)随着菌体浓度的变化,基质浓度从7.9g/L增加到22.4g/L。当 $t > 17.4$ h后,菌体浓度基本上接近其最大值,此时基质浓度一直维持在22.4g/L。

但是分析图1可以看出,最优化的流加方式非常复杂,特别是流加开始阶段 $S$ 随 $X$ 变化造成 $F_s$ 急剧升高,因此直接按此流加方式进行实际控制非常困难。事实上对于赖氨酸发酵在流加阶段菌体浓度能很快地接近其最大值,所以流加过程的开始阶段在流加过程中所占份额很小,据此可以尝试如下的次优化流加方式,即:流加过程从开始到结束均维持基质浓度处于22.5g/L。这样整个发酵过程为:①开始的一段分批发酵过程;②当基质浓度为22.5g/L时开始流加,在流加阶段一直维持基质浓度处于22.5g/L;③流加结束后再经过一个分批发酵阶段,直至发酵结束。

图2为依次优化流加方式计算出的流加方式以及菌体( $X$ )、残糖( $S$ )、产物( $P$ )的变化曲线,模型计算初值选用表2的数据,按此流加方式经过72.8h后,发酵液中的产物浓度为85.65g/L,总转化率为0.428%。这和图1中按最优化方式计算出的结果非常接近。

#### 2.4 流加发酵的全过程分析

通过前面的研究,我们得到了流加过程的操作方式:流加阶段应维持基质的浓度处于22.5g/L。但流加发酵的全过程不仅仅包括流加阶段还包括分批阶段。以表2的数据进行分析:发酵的总糖为3200g,分批阶段投入的糖为320g,流加阶段投入的糖为2880g。可见在整个发酵过程中糖的消耗被分为二个部分,因此要考察流加发酵全过程是否合理,还有一个问题需要考虑:对于一定的总糖,在分批阶段和流加阶段应如何合理地分配?

分批阶段所消耗的糖为( $S_0 \times V_0$ ),流加阶段所消耗的糖为( $S_T - S_0 \cdot V_0$ )可见在总糖

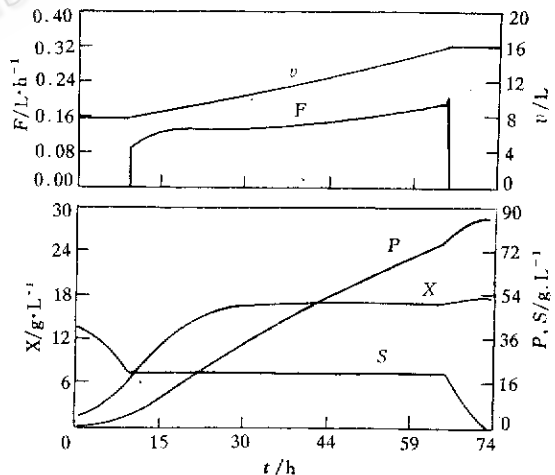


图2 次优化流加方式下发酵过程曲线(模型计算)  
Fig. 2 Fermentation courses in sub-optimal feeding process (model calculation)

一定时,上述分配比例仅仅和  $S_0$ 、 $V_0$  有关。下面讨论总糖为 3200g、 $V_f = 16$  升时,  $S_0$ 、 $V_0$  对整个发酵的影响, 依此决定较适的  $X_0$  和  $V_0$ 。并进一步分析流加阶段基质浓度变化时对整个发酵的影响。

2.4.1  $S_0$ 、 $V_0$  的变化对流加发酵全过程的影响: 从图 3(模型计算初始体积  $V_0 = 8L$ ) 中可以看出, 在较低的初糖浓度范围内 ( $S_0 < 50g/L$ ) 流加发酵过程能保持高的总转化率 ( $Y$ ), 当初糖浓度提高时转化率呈下降的趋势, 且初糖浓度越高转化率下降的幅度越大, 这进一步说明浓度基质对赖氨酸合成的抑制作用。因此在流加发酵中不但要保持流加阶段处于最适的条件, 在开始的分批阶段也应维持较适当的初糖浓度, 才能充分发挥流加操作的优势。

$V_0$  增加意味着更多的糖在分批发酵中消耗。当分批阶段初始糖浓度较高时, 赖氨酸的合成会受抑制作用, 此时随  $V_0$  的增加发酵过程中赖氨酸形成受抑制的时间将会延长, 造成发酵过程的总转化率呈下降的趋势。

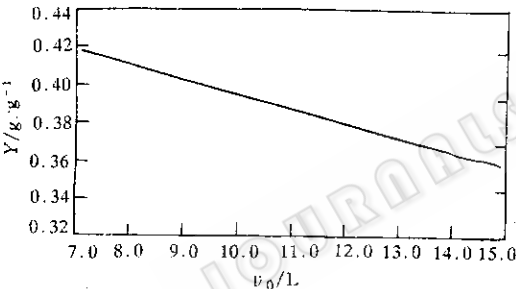


图 4  $V_0$  的变化对发酵过程转化率的影响

Fig. 4 The influence of  $V_0$  on the overall yield ( $S_0 = 150g/L$ )

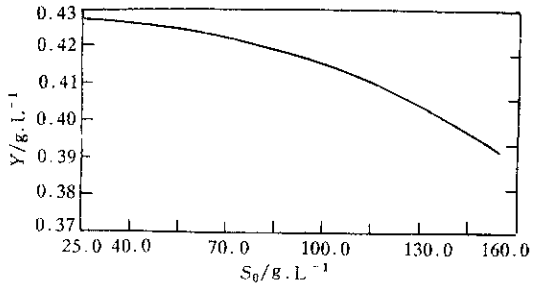


图 3  $S_0$  变化对发酵过程转化率的影响  
Fig. 3 The influence of  $S_0$  on the overall yield

在初糖浓度较低时 (5%),  $V_0$  的变化对发酵过程的影响如图 5 所示, 在初糖浓度较低时分批阶段赖氨酸的形成几乎不受抑制, 再加上分批阶段所消耗的糖相对较少, 因而  $V_0$  的增加对发酵过程的总转化率影响不大。从图 5 中可以看出, 和初糖浓度较高时不同, 发酵过程的总转化率没有表现出随  $V_0$  升高而下降的趋势, 其值几乎保持不变。不但如此由于  $V_0$  的增加, 增加了分批培养阶段所获得的菌体量, 有利于整个发酵时间的缩短, 从图

5 中可以进一步看出随  $V_0$  的增加, 发酵过程的生产强度几乎呈线性的增长。因此在初糖浓度低时  $V_0$  的增加, 发酵过程的生产强度几乎呈线性的增长。因此在初糖浓度低时  $V_0$  的增加对整个流加操作是有利的。

从上述对  $S_0$  和  $V_0$  的分析可以得出如下的结论: 分批阶段应保持较低的  $S_0$ , 在此基础上  $V_0$  应尽可能取较大的值。当  $S_B$ 、 $V_f$  和  $S_0$  一定时,  $V_0$  的增加将造成流加液中基质浓度  $S_f$  的增加, 图 5 同时示出  $S_f$  随  $S_0$  的变化关系, 实际生产中  $S_f$  常常不可能取很大的值, 所以

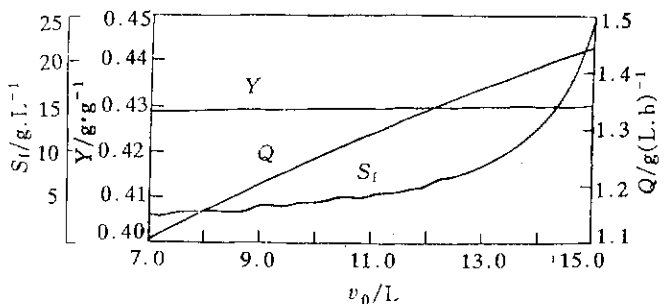


图 5  $V_0$  的变化对发酵过程转化率、生产强度和流加液糖浓的影响

Fig. 1 The influence of  $V_0$  on  $Y, I$  and  $S_f$  ( $S_0 = 50g/L$ )

$V_0$  的取值是有限制的,可由式(10)计算出该值。

$$V_0 = (V_f \cdot S_f - S_0) / (S_f - S_0) \tag{10}$$

**2.4.2 流加阶段基质浓度变化对发酵过程的影响:**模型计算得到的结论为:流加阶段的糖浓度应过于 22.5g/L。这在图 6(模型计算初始值为  $V = 8L, S_0 = 50g/L$ )中得到直观地表达:流加阶段糖浓度( $S^*$ ) > 22.5g/L 时,随  $S^*$  的升高发酵过程的转化率下降,但当  $S^* < 22.5g/L$  时发酵过程的转化率随  $S^*$  的升高而升高,当  $S^*$  能维持在 22.5g/L 时,发酵过程可以获得最高的转化率。但值得一提的是当  $S^*$  在 15 ~ 30g/L 范围内,发酵的转化率均大于 0.42,因此如果条件不允许,可更粗略地控制糖浓度在 1.5 ~ 3% 之间。

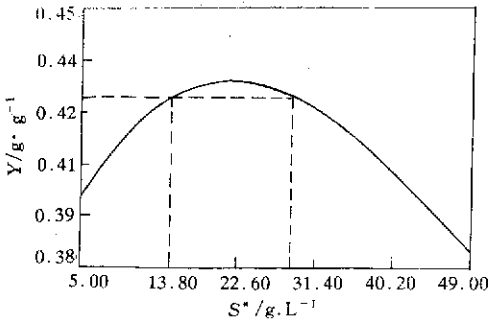


图 6  $S^*$  的变化对发酵过程转化率的影响  
Fig. 6 The influence of  $S^*$  on the overall yield

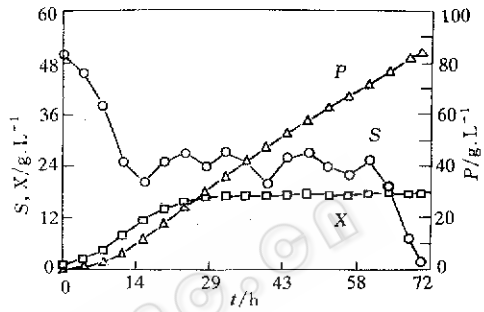


图 7 46 批实际发酵过程曲线  
Fig. 7 The practical fermentation courses of No. 46

**2.5 流加发酵优化控制的结果**

通过前面的研究,我们可以总结出赖氨酸产生菌 *FB42* 流加发酵优化控制的策略:① 选取分批阶段适宜的初糖浓度,其值为 5% 左右;② 选取分批阶段适宜的操作体积,该值可由(10)式得出;③ 在流加过程中控制糖浓度处 22.5g/L,如果条件不允许,可更粗略地控制糖浓度在 1.5% ~ 3% 之间。

按上述控制方式进行试验,实验结果列于表 3.中。图 7 为 46 批发酵过程曲线。从表 3 中可以看出平均发酵产酸为 81.6g/L,转化率为 0.418%,生产强度为 1.16g/L · h。和分批发酵相比(见表 4)分别提高了 45.4%、9.7% 和 28.3%。

表 3 流加发酵的实验结果

Table 3 The experimental results of fed-batch fermentation

No	$S_0/g \cdot L^{-1}$	$V_0/L$	$V_f/L$	$S_f/g \cdot L^{-1}$	$P/g \cdot L^{-1}$	$Y/\%$	$t/h$	$I/g \cdot (L \cdot h)^{-1}$
46	45.6	8.7	16.3	20.1	85.2	42.3	71	1.2
48	53.2	9.2	15.9	18.8	78.3	41.6	70	1.11
49	50.2	8.8	16.2	19.2	80.0	41.6	71	1.13
Average					81.6	41.8		1.16

注:表 3 中  $S_f$  以浓度表示等于投入的总糖除以发酵总体积。

表 4 流加发酵和分批发酵的比较

Table 4 The comparison between batch and fed-batch fermentation

Model	$P/g \cdot l^{-1}$	$Y(\%)$	$I/g \cdot (L \cdot h)^{-1}$
Fed-batch	56.1	38.1	0.904
Batch	81.6	41.8	1.16

注:表 4 中分批发酵的数据取之文献<sup>[10]</sup>。

## 附 号 说 明

$\alpha, \beta, K, K_1, K_2$ ——模型常数	$I$ ——生产强度 / $\text{g} \cdot (\text{L} \cdot \text{h})^{-1}$
$\cdot$ ——字母上的点表示对时间 $t$ 的微分	$T$ ——发酵时间
$'$ ——表示对基质浓度 $S$ 的微分	$\mu$ ——菌体的生长比速 / $\text{h}^{-1}$
$S$ ——基质浓度 / $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	$\mu_{\max}$ ——菌体的生长比速 / $\text{h}^{-1}$
$S_0$ ——基质初始浓度 / $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	$\pi$ ——表示产物的形成比速 / $\text{h}^{-1}$
$S_{ss}$ ——基质残留浓度 / $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	$\sigma$ ——表示基质的消耗比速 / $\text{h}^{-1}$
$S_f$ ——流加液中基质的浓度 / $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	$Y_x$ ——基质形成菌体的真实转化率 / $\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$
$S_T$ ——整个发酵过程中投入糖的总量 / $\text{g}$	$Y_p$ ——基质形成产物的真实转化率 / $\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$
$X$ ——菌体浓度 / $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	$Y$ ——产物的表现转化率 / $\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$
$X_{\max}$ ——菌体浓度 / $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	$m$ ——细胞的维持消耗 / $\text{g} \cdot (\text{g} \cdot \text{h})^{-1}$
$P$ ——产物浓度 / $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	$K_s$ ——基质对菌体生长的饱和常数 / $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$
$V$ ——表示反应器中液体的体积 / $\text{L}$	$K_i$ ——基质对菌体生长的抑制常数 / $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$
$V_0$ ——发酵液的初始体积 / $\text{L}$	$K_{sp}$ ——基质对产物形成的饱和常数 / $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$
$V_f$ ——发酵液的最终体积 / $\text{L}$	$K_{ip}$ ——基质对产物形成的抑制常数 / $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$
$F$ ——流加速率 / $(\text{L} \cdot \text{h})^{-1}$	

## 参 考 文 献

- (1) Modak J M, Lim H C. *Biotechnol Bioeng*, 1987, **30**: 528~540.
- (2) Modak J M, Lim H C. *Biotechnol Bioeng*, 1987, **33**: 11~15.
- (3) Ka-yun San and Stephanopoulos G. *Biotechnol Bioeng*, 1989, **34**: 72~78.
- (4) Kurtanek Z. *Biotechnol Bioeng*, 1991, **37**: 814~823.
- (5) 宫 衡, 伦世仪. (拟在增刊上发表“赖氨酸分批发酵动力学研究”)
- (6) 蔡武城. 生物物质常用化学分析方法, 北京: 科学出版社, 1982: 56~58.
- (7) 石渡昭男. 特许公报, 1975, 20: 374~879.
- (8) Modak J M, Lim H C, Tayeb Y H. *Biotechnol Bioeng*, 1986, **28**: 1396~1407.
- (9) Lim H C, Tayeb Y J, Modak J M *et al.* *Biotechnol Bioeng*, 1986, **28**: 1408~1420.
- (10) 宫 衡, 伦世仪. 无锡轻工业学院学报, 1994, **13** (3): 212~218.

## Optimization of Lysine Fed-batch Fermentation

Gong Heng

*(The Department of Biochemical Engineering of East China University of Sci. & Technol. Shanghai 200237)*

Lu Shiyi

*(The Department of Fermentation Engineering of Wuzi Light Industry University, Wuzi 214036)*

**Abstract** Based on kinetics of lysine fermentation and minimum principle of Pontryagin's, the optimal policy for fed-batch lysine fermentation has been formulated and calculated. The lysine process including initial batch period and fed period was then comprehensively analyzed, and a total control strategies was established successfully. The practical results indicated; the lysine produce level, overall yield and productivity of Fb42 from fed-batch fermentation of in a 30L bioreactor reached 81.6g/L, 0.418 and 1.16g/h · L, which was higher than that of the batch fermentation by 45.4%, 9.7% and 28.3%.

**Key words** Lysine fermentation, fed-batch fermentation, optimization