

评论

补料分批技术的动力学与优化操作述评

毛维颖

(中国科学院微生物研究所, 北京)

发酵过程可分为分批和连续两大类。补料分批 (Fed-batch) 界于两者之间, 它是指在微生物分批发酵中以某种方式连续地补加一定物料的培养技术。这种技术与化学工程中半分批技术实质上是相同的。补料分批方法用于酵母培养由来已久^[1]。在其它发酵中, 无论国内还是国外, 经验地采用此法也颇为多见。但迟至1973年才见到第一篇涉及其数学模型 的报道^[2], 比连续培养的理论研究晚了20多年。补料分批技术促进了微生物生理学中诸如比生长速率、维持能和过渡阶段行为等基础课题的研究。在生产方面尽管大多数发酵过程还是分批方式, 但这一技术既能弥补分批操作的不足, 又能减轻连续操作中存在的 一些困难, 尤其避免了维持恒定体积的技术难题, 因此已用于发酵法生产酵母、单细胞蛋白、抗生素、维生素、酶制剂、氨基酸、醋酸和酒精等产品的工艺过程中。凡是那些对一个或多个底物浓度的变化敏感的发酵过程, 使用补料分批技术特别有效。Yamane等^[3]归纳出这一技术适用的场合有: 底物抑制、高细胞浓度、葡萄糖效应、代谢降解物阻遏、营养缺陷型突变株、扩大操作时间、补充蒸发失去的水分和降低发酵液粘度等。

早期补料分批技术采用间断操作。后来又有连续操作和重复操作。所谓重复补料是包含以一定时间间隔从罐内排出一部分发酵液做法的操作方式。随着动力学研

究的深入和测量与控制手段的进步, 这一技术从无反馈控制操作发展到反馈控制操作。前者包括恒定、指数、最优及其它形式流率的操作; 后者包括非直接和直接两种反馈类型。每种类型都有底物浓度保持恒值和最优值两种操作方式。

在理论研究方面, 人们对无反馈控制操作进行了较系统的研究。为节省篇幅, 本文不涉及有关数学模型的具体内容, 下面仅对它们的物理意义和有用结论作扼要介绍和评论。

恒定流率是最通常的流加方式, 所以先回顾一下恒定流率补料分批操作最重要的几个数学模型工作。最早由Yoshida等^[2]提出的数学模型是相当简单的。在烷烃发酵实验中, 可观察到培养前期酵母处于指数生长期, 后期处于线性生长期。此时生长限制底物浓度很小, 模型建立在限制底物质量平衡基础上, 并假定补料前后罐内液体体积始终不变。从模型推导获得两个时期细胞/底物得率常数的计算公式。Pirt^[4]研究了更为常见的补料引起发酵液体积增加的情况, 提出了准稳态 (Quasi-steady state) 理论。该理论指出, 遵循Monod动力学的过程在 $dX/dt \approx 0$, $dS/dt \approx 0$ 情况下, $\mu \approx D$ 。这个状态称为准稳态。上述 X 是细胞(质量)浓度, S 是限制底物浓度, t 是时间, μ 是比生长

本文于1985年9月20日收到。

速率, D 是稀释率。这个理论和连续恒化培养稳态理论在形式上是一致的, 因而有概念清楚、简单易懂的优点。不过当补料分批处于准稳态时, μ 与 D 以相同速率下降, 而当恒化培养处于稳态时, μ 与 D 均不变。几年后 Pirt^[6] 还阐述了恒体积操作的特征。当生长开始受到底物的限制时, X 线性增加, μ 随 X 增加而下降。Dunn 等^[6] 以平衡生长和 Monod 动力学等为前提条件, 也以质量平衡原理为基础, 建立了变体积连续培养和增体积补料分批培养的数学模型。不难理解补料分批和恒化培养均是变体积连续培养的特例。在数学模拟中, 采用了无因次变量, 因而所得结果更简明和更有普遍意义。值得指出 Dunn 等只将 $dX/dt = 0$ 和 $\mu = D$ 作为准稳态的特征, 当过程处于准稳态时, $dS/dt \approx 0$, S 随时间而下降。如保持低流率和小的 S 值, 使过程维持平衡生长情况, 处于准稳态的恒定流率体积增加的连续培养和补料分批培养两种情况与稳态的流率下降的恒化培养是相当的。换句话说, 它们可以互相模拟。利用补料分批操作可造成一种可控的动态条件, 给科研与生产带来方便。理论分析还得出从分批培养无过渡阶段直接进入补料分批准稳态和从后者直接进入恒化培养稳态的条件。这一结果是有实用价值的。Yamane 等^[7] 亦用无因次化方法和 Monod 动力学建立了变体积和恒体积操作的数学模型。用计算机模拟研究了初始条件和包括操作条件及系统常数(维持能系数和饱和常数)在内的控制参数对处在过渡阶段的微生物生长活动的影响。结果表明在一定条件下, 生长从指数期转变为线性期是非常突然的。在指数期末无因次底物浓度很小。在线性期无因次比生长速率和底物浓度及两者的变化率均很小。在某些条件下, 根本没有指数期。值

得注意的是模拟中采用了总细胞质量, 因而只有体积恒定时, 才同时表现出细胞浓度的线性增加。如果计入维持能影响, 自始至终见不到线性的动力学行为。此外无因次细胞浓度随时间进程究竟增加、减少还是恒定取决于稀释率和初始条件。这一工作与 Yoshida 等的相似, 没有将准稳态作为一个重要特征, 在模拟中也没有涉及到它。为减少理论研究和生产实践的困难, 作者建议尽可能补加浓溶液, 实行恒体积操作。同年 Yamane 等又给出了一系列的条件与公式^[8], 其中有关于在一开始就得到线性生长的条件, 关于指数期和线性期细胞浓度和底物浓度与时间的关系以及确定从指数期转变为线性期的时间的计算公式。Lim^[9] 曾怀疑 Yoshida 等^[2] 在计算得率常数时所作假设 $dS/dt \approx 0$ 和 $S \approx 0$ 的可靠性。Yamane 等在文章中声称在他们的模拟与实验中, 作这些假设是允许的。甚至也采用了准稳态概念, 并用实验验证了它能在线性生长期出现。不过他们在最近的综述中又提到^[3], 恒定流率补料操作处于准稳态时, 只有 $dX/dt = 0$, 而 dS/dt 和 S 均不为零。总之应该指出, 过程处于准稳态时, 所谓 $dS/dt \approx 0$, $S \approx 0$ 及 $X \approx YS_i$, 显然都是数学上的近似处理。上述 Y 是得率系数, S_i 是补料液中限制底物浓度。根据他们的研究, 如果 $S_0 < K_s$ 和 $S_i = X_0/Y$ 的条件不能被满足, 达到准稳态是很费时的, 且常常由于所需要的补料量超出了发酵罐的实际容积而使操作无法进行下去。上述 S_0 是初始限制底物浓度, K_s 是饱和常数, X_0 是初始菌浓度。Kologerakis 等^[10] 以简单的过程模型为基础, 发展了一整套算法, 实行计算机在线操作, 迫使过程迅速达到准稳态。

为了在短时间内获得最大量细胞, 人们采用指数流率补料操作。这种方法可真

正实现 $dS/dt = 0$, 还可以通过变更流率指数随意控制比生长速率。Yamane等^[11]以抑制性底物甲醇为原料, 用恒定体积指数流率补料操作培养微生物。借助这一培养过程的数学模型研究了操作的稳定条件。假如 μ 是 S 的函数, 当函数的一阶导数 $f'(S)$ 大于零时, 可得到稳定的操作。应当指出实施指数流率流加的装置是相当复杂的。Lim等^[12]对延长培养(Extended culture)和指数流率补料分批培养中微生物生长情况进行了理论分析。延长培养和补料分批培养很相似, 是指用一定方式连续补料维持限制底物浓度恒定的一种操作。数学分析指出: 假如比生长速率和底物消耗速率仅取决于限制底物的浓度, 在一定条件下, 延长培养相当于指数流率补料分批培养。而指数流率补料操作可达到 X 与 S 恒定的状态, 即真正的稳态。这种稳态可用恒化培养予以模拟。不过在恒化培养中需不断排出发酵液。如果混合不完全, 两者的菌年龄分布有所不同。这一操作的动态行为也可分别用流率增加、恒定或下降的连续培养进行模拟。

Keller等^[13]和Dunn等^[14]以平衡生长为前提, 对循环(重复)补料分批操作中菌体生长情况进行理论分析与模拟。该工作中采用了单纯循环和在每次循环中包含一个分批阶段两种操作方式。如果实行快速补料, 后者基本上可视为一种循环分批操作。以Monod动力学为例, 模拟结果表明, 单纯循环操作中, 有一部分时间出现准稳态; 而循环分批操作中, 全然没有准稳态。生物量产率与稀释率及初始体积的关系图显示, 在低无因次稀释率情况下, 两种操作的产率-稀释率曲线都是与恒化培养相似的。显然恒化培养可看作循环操作的极限情况。这种理论分析对估计恒化培养中体积波动所造成的影响是十分

有用的。

上述内容告诉我们, 在补料分批技术的动力学研究中, 大部分都是有关细胞生长的内容。而且 μ 与 S 的关系, 主要采用Monod形式。大家知道比产品形成速率往往并不是简单地为一个常数, 而是 μ 的函数或其他更复杂的函数, 因此给产品形成动力学的研究带来困难。无论如何, 生长动力学的研究成果既是深入开展理论研究的基础, 也是从事优化和反馈控制的基础。后两种工作在很大程度上依赖于数学知识。随着计算机技术的发展与普及, 已经可能用离线方式计算或模拟复杂的数学模型和用在线方式实现优化控制。下面介绍一些重要事例并加以评述。

关于非反馈控制操作的最优化, 早期以经验为基础, 后来出现了严格的数学方法。Fishman^[15]在青霉素补料分批发酵中, 以产物浓度为目的函数研究了葡萄糖流加的最优化战略。生长动力学采用有抑制因素存在的改良Monod型式。数学模型的特殊之点是比产品形成速率作为菌的平均积累年龄的函数。以固定时间为约束条件, 运用Pontryagin连续最大原理, 可得到包含一个流率增加阶段在内的最优操作曲线。众所周知, 连续最大原理在计算中要遇到相当困难的两点边值问题。以Green理论为基础的最优化方法比较简单, 这一方法通常仅适于只具有两个状态变量而且初始及最终状态固定的问题。Ohno等^[16]在赖氨酸补料分批发酵中以产率作为目的函数研究了流率最优化问题。在所计算的问题中流率具有线性性质, 但底物最终状态不固定, 因此要通过一个迭代过程确定底物在最终状态的浓度。研究结果表明, 在不同条件下, 存在三种最优操作模式, 其中两个模式都包含流率按一定最优曲线变化的操作阶段。不过真正这

样实施起来,困难是很大的。一种实用的亚优方法是将流率曲线改为最优值的平均值。Yamane 等^[17]从工程观点出发,宁可损失一些数学上的严格性,将模型加以简化,因而也简化了运用连续最大原理的计算工作。以产量作为目的函数,以比生长速率代替流率作为控制变量,获得了比生长速率最优曲线,从而间接得到流率最优曲线。Shioya 等^[18]应用化学反应工程中所用的图解方法,研究了生物量和发酵产品的产率问题,从理论上揭示补料分批操作适用的场合。如果无因次比生长速率和产品形成速率函数是单调上升的或 Monod 动力学形式,分批操作是最优的方式;如果这两个函数有极大值,例如象底物抑制动力学形式那样,分批-指数流率补料分批-分批操作曲线是最优的。有趣的是这种简便的图解法所得的结果与连续最大原理的相同。

在反馈控制中,非直接方法是以溶氧、pH、呼吸商、排气二氧化碳分压和代谢物浓度等作为反馈参数。直接方式是以底物浓度作为反馈参数。目前只有少数底物象甲醇和乙醇等能直接测量,加上还需有底物浓度如何影响微生物生理活动的知识,因而直接方式的应用受到了限制。Dairaku 等^[19]在酵母培养中使用一个有比例积分微分功能的非直接反馈控制系统。当细胞浓度增加或发生大的控制扰动

时,为保持发酵液中乙醇浓度恒定,需要对比例积分微分三系数重新定值。用一个与微计算机偶联的控制系统可做到这一点。该系统在运行中利用了简单的数学模型和能对三系数定值的控制器。Kishimoto 等^[20]在流加乙醇的谷氨酸发酵中,用直接反馈控制方式实现了自适应最优控制。由大计算机离线计算递推等式,得出所谓约束最大函数的数值;同时将小型计算机与发酵罐偶联,对几个状态变量在线进行回归分析,并考虑到约束最大函数值,预测所需的最优流率和乙醇浓度。

总的来说由于缺乏能直接测量重要参数的传感器,而且通常仅部分或很少知道非反馈控制中状态变量与流率之间及反馈控制中状态变量、控制变量与目的函数之间的数学关系,也就是说缺少完善的数学模型,因此要实现补料分批技术基于数学理论的最优化,不仅在动态方式中,就连非反馈的程序方式中,也存在着相当大的困难,尤其动态最优化还包含过程状态估计和系统辨识等难题。在现阶段作为生化工程师,究竟选择最优、次优还是经验性补料战略,必须权衡可行性和经济性等因素。

有关实验室和工业规模补料分批技术的大量事例以及高细胞浓度培养,重复补料操作和过程起动等问题的最新研究成果,均可参阅 Yamane 等^[3]的长篇综述。

参 考 文 献

- [1] Burrows, S.: *The Yeast* (Ed. by Rose, A. H. et al.), Vol. 3, p. 350, Academic Press, New York, 1970.
- [2] Yoshida, F. et al.: *Biotech. Bioeng.*, 15: 257, 1973.
- [3] Yamane, T. et al.: *Advances in Biochemical Eng./Biotech.*, Vol. 30, p. 147, Springer-Verlag, New York, 1984.
- [4] Pirt, S. J.: *J. Appl. Chem. Biotechnol.*, 24: 415, 1974.
- [5] Pirt, S. J.: *Anal. N. Y. Acad. Sci.*, 326: 119, 1979.
- [6] Dunn, I. J. et al.: *Biotech. Bioeng.*, 17: 1805, 1975.
- [7] Yamane, T. et al.: *J. Ferment. Technol.*, 55: 156, 1977.
- [8] Yamane, T. et al.: *J. Ferment. Technol.*, 55: 380, 1977.
- [9] Lim, H. C.: *Biotech. Bioeng.*, 18: 1635, 1976.

- (10) Kalogerakis, N. et al.: *Biotech. Bioeng.*, 23: 921, 1981.
- (11) Yamane, T. et al.: *J. Ferment. Technol.*, 54: 229, 1976.
- (12) Lim, H. C. et al.: *Biotech. Bioeng.*, 19: 425, 1977.
- (13) Keller, R. et al.: *J. Appl. Chem. Biotechnol.*, 28: 784, 1978.
- (14) Dunn, I. J. et al.: *Anal. N. Y. Acad. Sci.*, 326: 127, 1979.
- (15) Fishman, V. M. et al.: *Biotech. Bioeng. Symp.*, 4: 647, 1974.
- (16) Ohno, H. et al.: *Biotech. Bioeng.*, 18: 847, 1976.
- (17) Yamane, T. et al.: *J. Ferment. Technol.*, 55: 587, 1977.
- (18) Shioya, S. et al.: *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, 29: 180, 1979.
- (19) Dairaku, K. et al.: *J. Ferment. Technol.*, 61: 189, 1983.
- (20) Kishimoto, M. et al.: *J. Ferment. Technol.*, 59: 125, 1981.

JOURNALS.IM.AC.CN