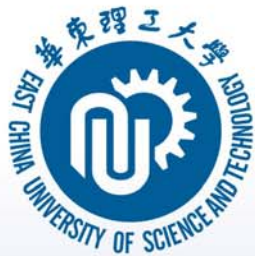


华东理工大学

East China University of Science And Technology

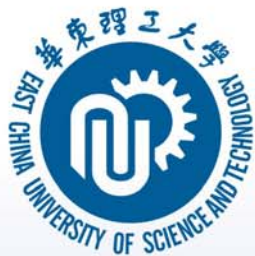
新型发酵优化与放大技术 在谷胱苷肽大规模生产中的应用

华东理工大学
国家生化工程技术研究中心(上海)
庄英萍 教授



报告提纲

- 发酵过程研究的背景
- 基于细胞生理与过程信息处理的发酵优化与放大新技术介绍
- 新技术在谷胱苷肽大规模发酵过程中的应用



工业发酵技术在国民经济发展中的作用

- 数千年历史
- 技术持续发展

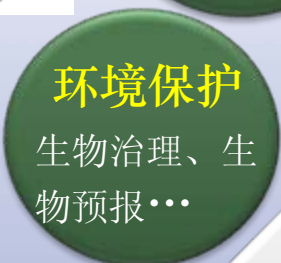


需求

生物能源

纤维素乙醇、
生物柴油...

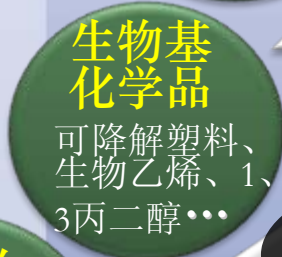
- 工业生物技术基础
- 社会经济发展必须



社会可持续发展
生物技术发展

动物细胞
大规模培养

新药、抗体
疫苗、酶...



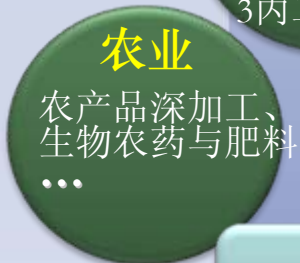
微生物
药物

抗生素、维生素、
基因产品

医药、食品领域的重要内容和关键技术

食品

新型食品添加剂、
防腐剂、功能食品...



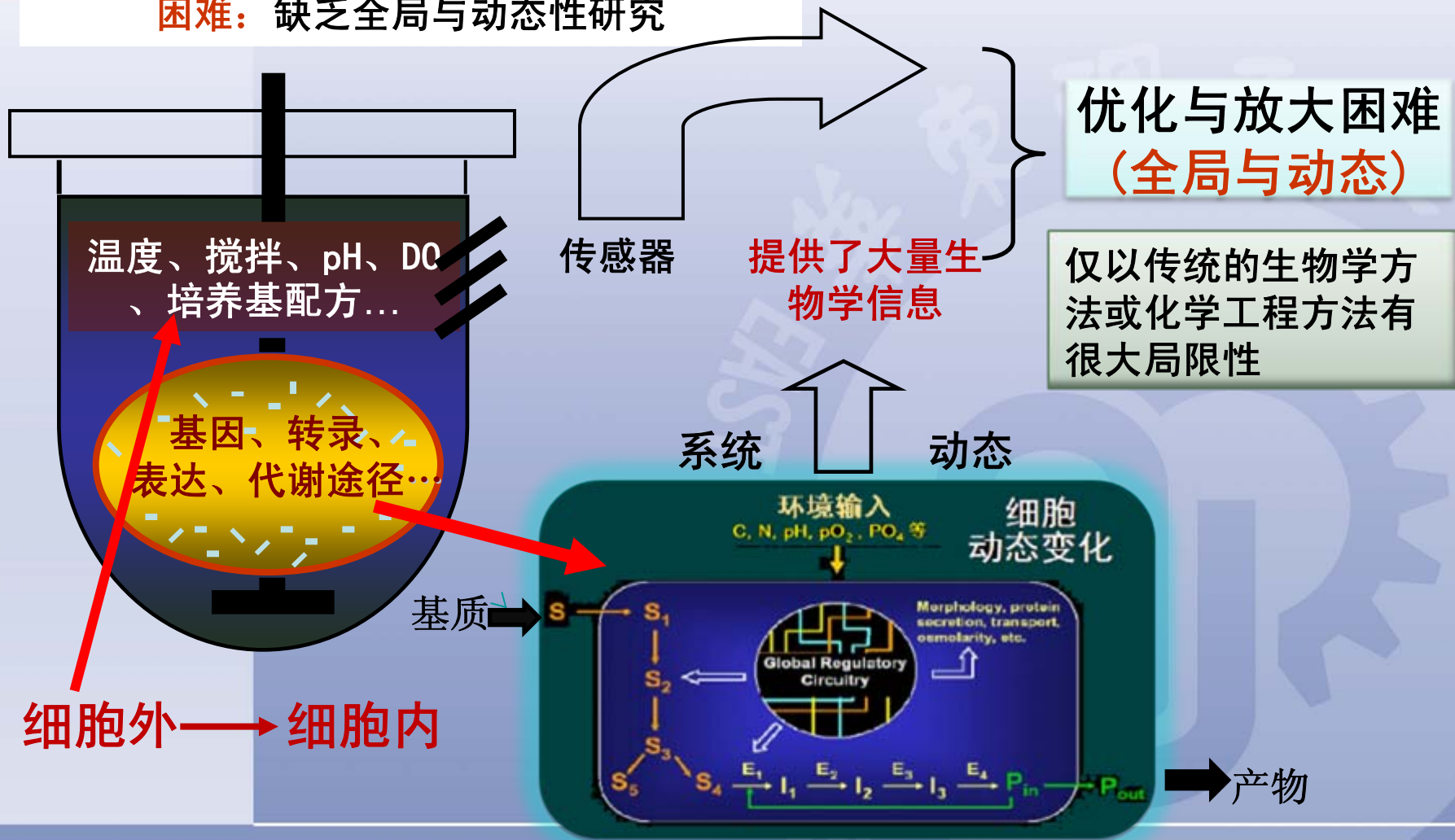
发酵工程

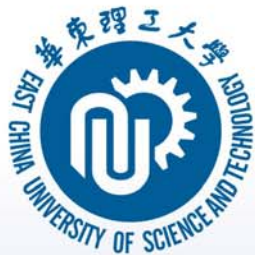
医药、轻工食品、农业、环保、能源、...



发酵过程优化的复杂系统

存在问题：优化与放大效果差，研究周期长
困难：缺乏全局与动态性研究





发酵过程优化的基础与应用技术研究

基础研究

• 科学问题

- 发酵过程全局优化研究与高度分支的生命科学研究的关系
- 过程放大时的生物反应器流场不均匀性对细胞生理特性的影响机制
- 发酵过程生物学与工程学研究

应用基础研究

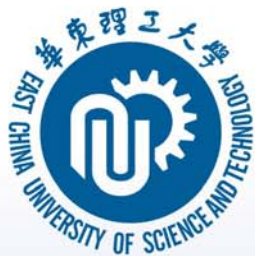
• 关键共性技术

- 方法与技术路线：多尺度参数相关、流场特性与生理特性研究相结合的放大、**13C**代谢流等
- 用于研究的装备技术
- 数据处理与软件包

应用技术研究

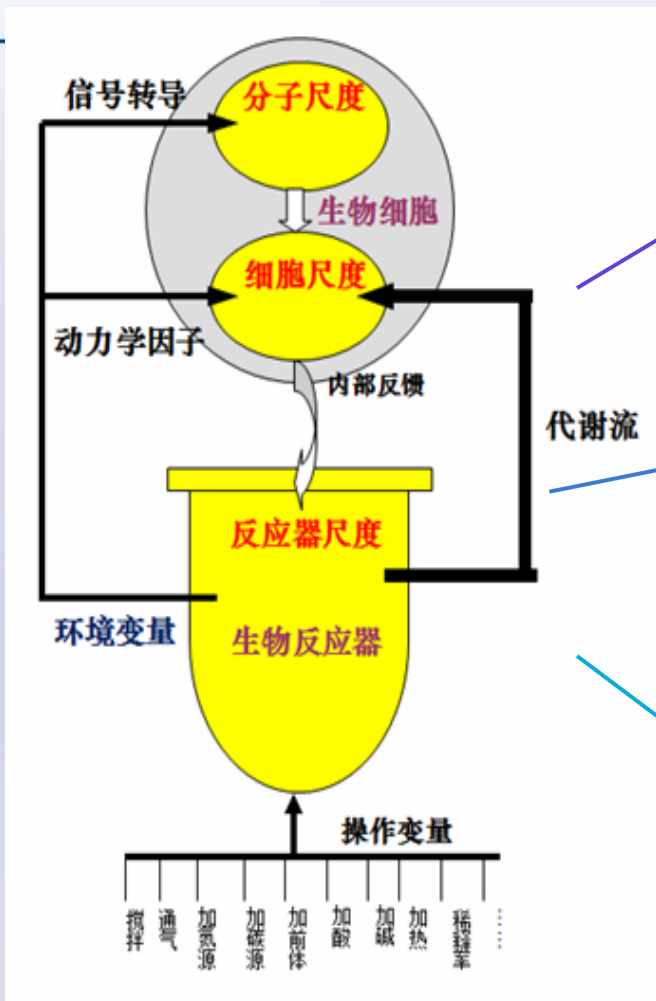
• 发酵产品或过程

- 医药与食品发酵产品
- 生物基发酵产品
- 生物能源发酵
- 环境治理
-



发酵过程研究的工程学方法

为解决过程优化关键技术提供基本方法和理论



问题

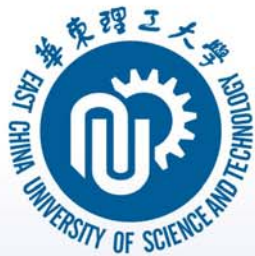
细胞内成千上万个基因、代谢物和反应器的混合传递

工程学方法

- 动力学研究的工程学方法的局限性
- 提出发酵过程复杂系统多尺度参数相关分析理论与方法 (2002年)

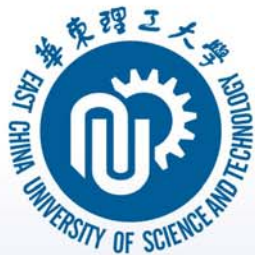
特性

- 不同的空间尺度和时间尺度的基因、细胞代谢、反应器混合传递等网络;
- 网络间存在物质流、能量流、信息流等多输入多输出关系



报告提纲

- 发酵过程研究的背景
- 基于细胞生理与过程信息处理的发酵优化与放大新技术介绍
- 新技术在谷胱苷肽大规模发酵过程中的应用



关键技术1:

集成开发了用于生物反应器细胞生理代谢特性检测与分析的装备体系，为建立发酵过程宏观现象（发酵表型）与菌体生理特性的微观机制间的关联研究提供软硬件基础

解决发酵过程特殊传感器应用和测定技术的困难，
现各种操作参数和生理参数的实时动态检测

——传感器技术

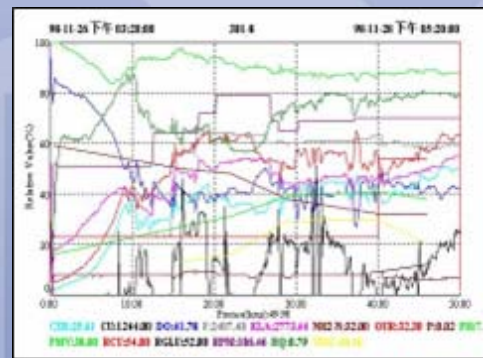


专业软件包与模型的建立：发酵过程海量数据处理，
集工艺研究与数据动态相关分析为一体

——数据处理与计算机技术

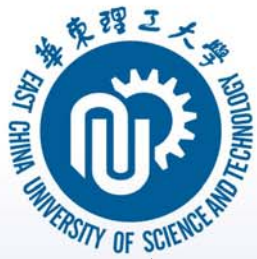
不同尺度参数相关：每个尺度（基因、细胞、反应器）
网络通过网络间的输入输出，形成对复杂系统的影响

——生物学研究



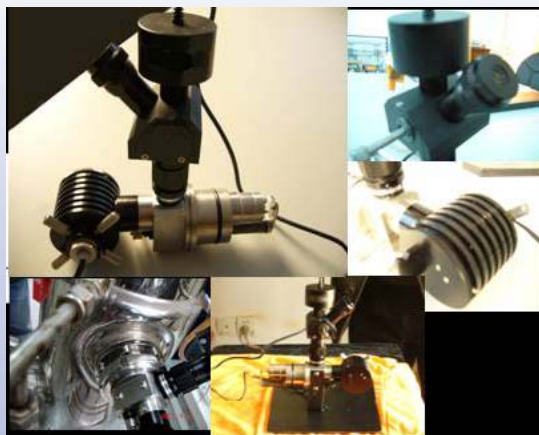
海量数据中寻找过程优化敏感参数

——发酵过程优化与放大的关键点

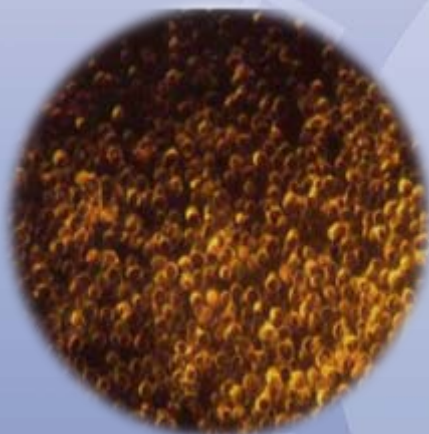


生物过程先进传感技术

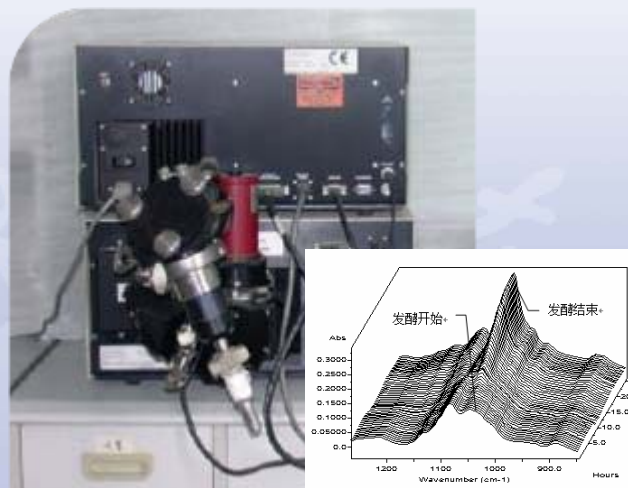
(1) 尾气在线质谱技术



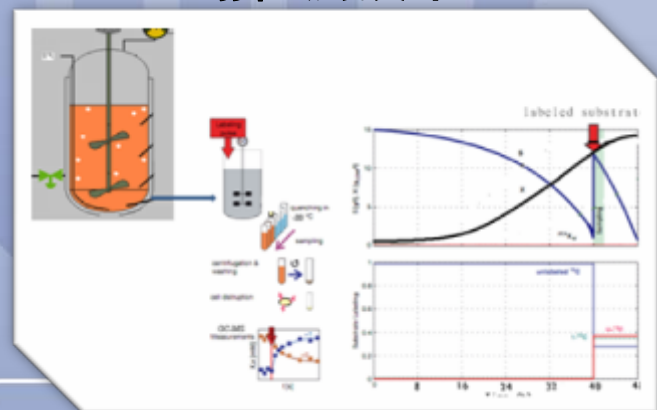
(3) 在线显微观察仪



(4) 原位红外光谱检测技术

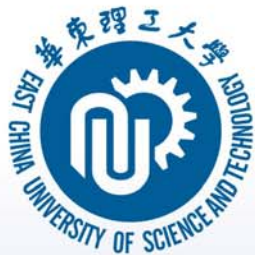


(5) 同位素¹³C的细胞微观代谢检测技术



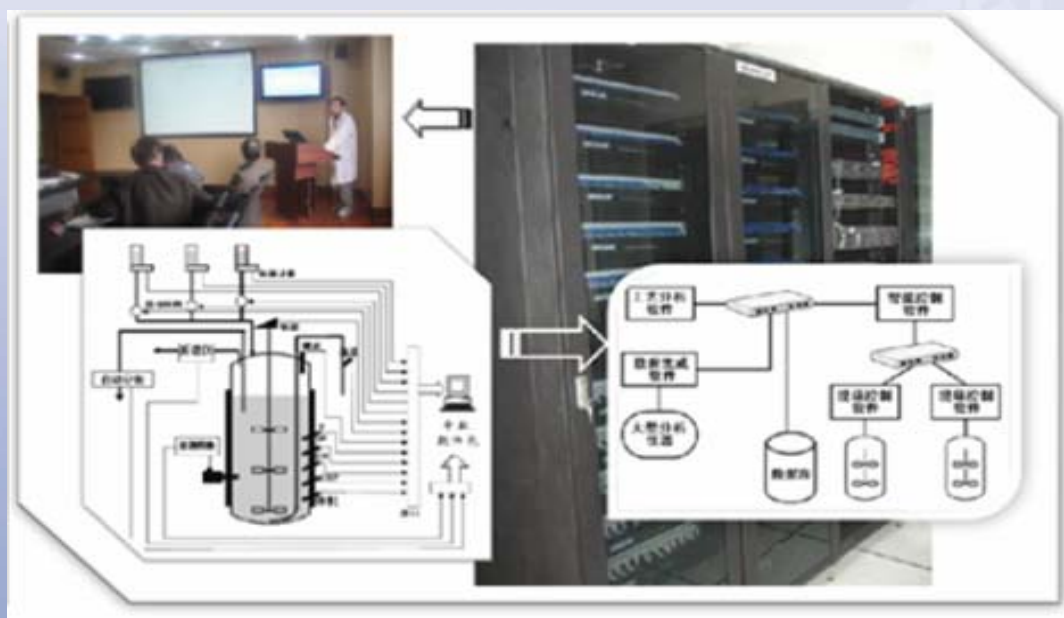
(2) 活细胞量在线测定技术



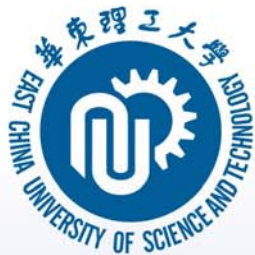


过程信息处理系统

基于工业以太网技术，多种分析仪器与执行装置的信息无缝对接，不同中间分析实验室或异地工厂的发酵过程数据可同步实时共享



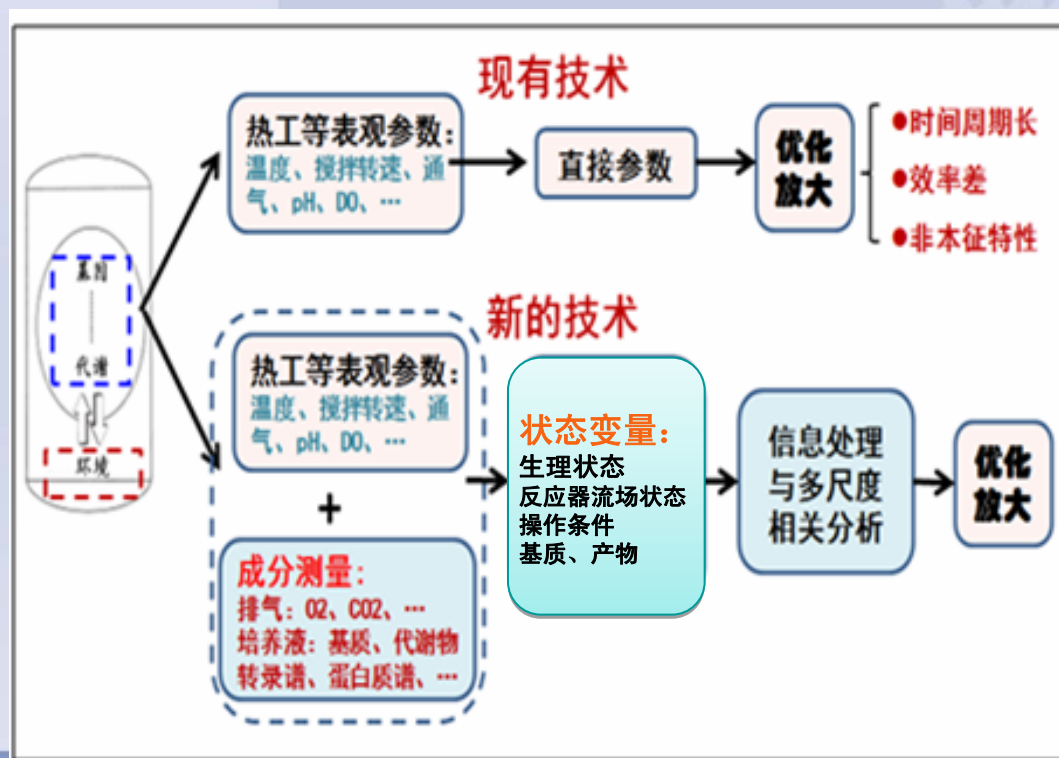
- 中国发明专利：ZL200710042189.0，ZL03129230.5；
- 国际专利申请：PCT/CN2008/071348；
- 软件登记：登记号 2009SR027762 (软著登字第0154761号)；
登记号 2009SR027760 (软著登字第0154759号)。



关键技术2:

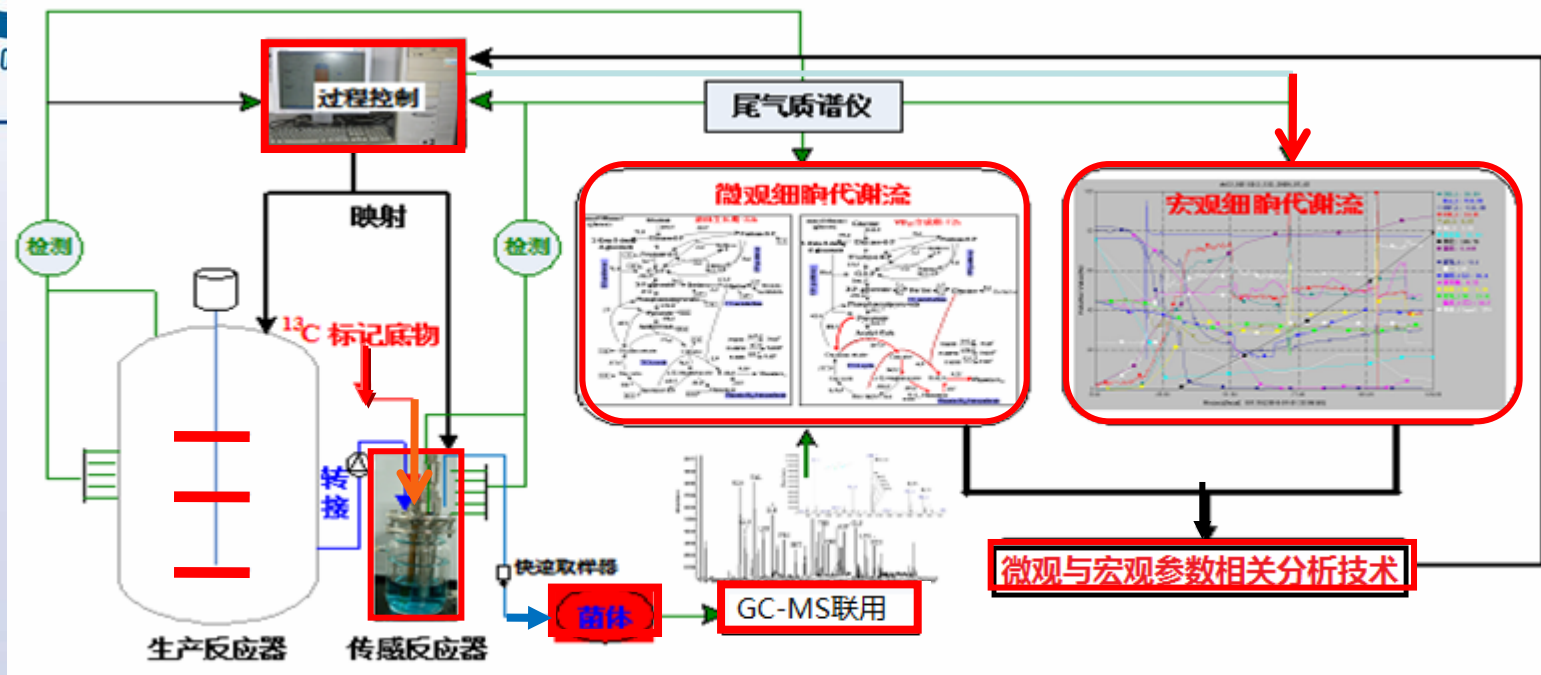
基于微观与宏观相结合的发酵过程代谢流分析，实现菌体细胞微观代谢特性的宏观观测与控制——发酵过程优化的关键问题

1. 按照多尺度关联与调控的要求，采集发酵过程宏观与微观参数，形成状态变量估计，由此研究宏观细胞生理状态、反应器流场状态特征与微观机制（包括生化代谢网络）的关联。



- 中国发明专利:
ZL01105699.1
ZL200710047439.X
ZL200710036807.0
- 申请专利:
201010176549.8
201010186010.0

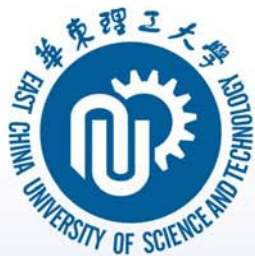
2. 实现分批发酵时变系统的动态¹³C微观代谢流测量，并实现了与宏观代谢流分析的关联。



案例：维生素B₁₂发酵：阐明甜菜碱(前体)的代谢流向、羧化途径固定CO₂的回补作用等分子机理在VB₁₂合成中的作用。将获得的**微观代谢信息**与**过程宏观代谢参数**OUR、RQ、尾气CO₂等进行**关联分析**，建立了VB₁₂的好氧发酵新技术。

发酵单位从90 μg/mL → 250 μg/mL以上 (国际先进水平)

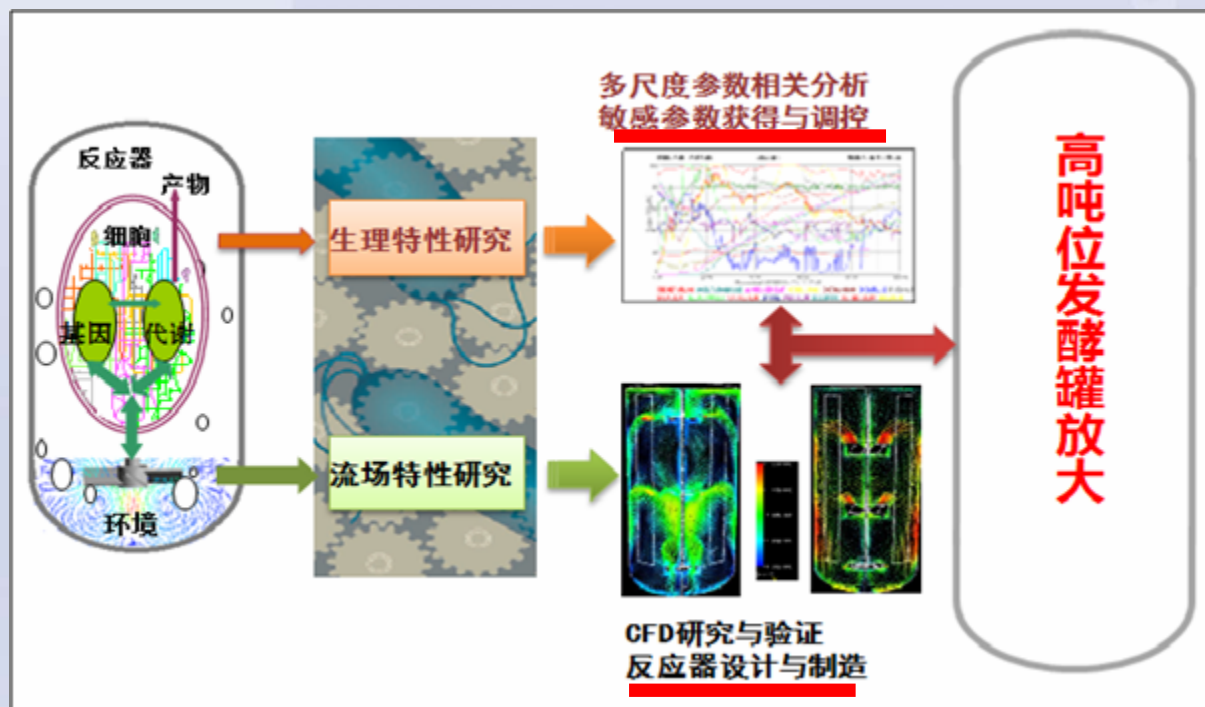
Wang ZJ, et al, *Bioresource Technology*. 2010, 101: 2845 (IF 4.253)



关键技术3:

建立了大型生物反应器流场特性与细胞生理代谢特性研究相结合的发酵过程放大技术。

- 环境对细胞代谢作用的影响机制
- 生物反应器流场特性的计算流体力学（CFD）研究（计算与验证）
- 采用多尺度参数相关分析方法挖掘过程放大的敏感参数



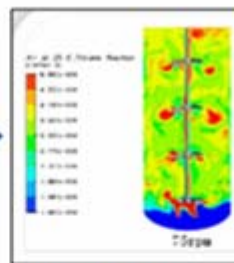
克服了目前发酵过程放大时通常依据相似原理，采用量纲分析法和因次分析法的缺陷（逐级放大，周期长，效率低，风险大）

- Zhang SL, et al. *Advance Biochemical Engineering-Biotechnology*. 2010, 122: 105
- Xia JY, et al. *Biochemical Engineering Journal*, 2009,43: 252
- 发明专利: ZL200610117828.0, ZL200610117828.0
- 中国发明专利公开: CN101671381A, CN101671712A, CN101775430A, CN101775424A

案例1：红霉素发酵优化与放大

- 基于理论流体力学及数值计算理论
- CFD模拟的核心——NS方程及湍流模型
- CFD求解的基础——网格划分

$$\frac{\partial \phi}{\partial t} + \frac{\partial (rU\phi)}{r\partial r} + \frac{\partial (v\phi)}{r\partial \theta} + \frac{\partial (w\phi)}{\partial z} = S_\phi + \frac{\partial}{\partial r} \left(\Gamma \frac{\partial \phi}{\partial r} \right) + \frac{\partial}{\partial \theta} \left(\Gamma \frac{\partial \phi}{\partial \theta} \right) + \frac{\partial}{\partial z} \left(\Gamma \frac{\partial \phi}{\partial z} \right)$$

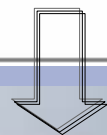
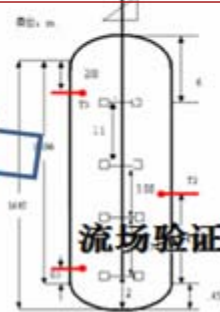
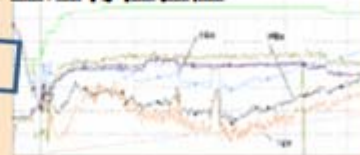


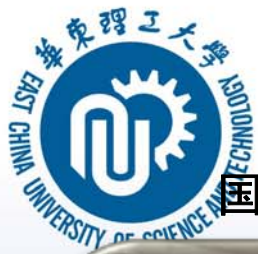
计算流体力学 (CFD) 模拟: 温度、浓度、剪切、...等流场分布



372m³高耗氧搅拌发酵罐车间建设

生理特性验证





先进的检测仪表与控制系统

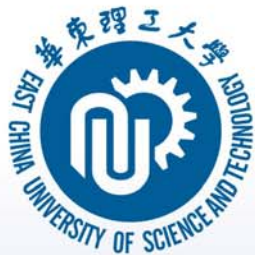
国际一流水平的自动化发酵车间

车间全自动控制系统



生产车间质谱仪





研究技术的总体优势

- 由细胞内微观到宏观研究
- 操作条件到流场特性研究
- 精密仪器和传感器技术
- 国际一流水平的全自动计算机控制技术

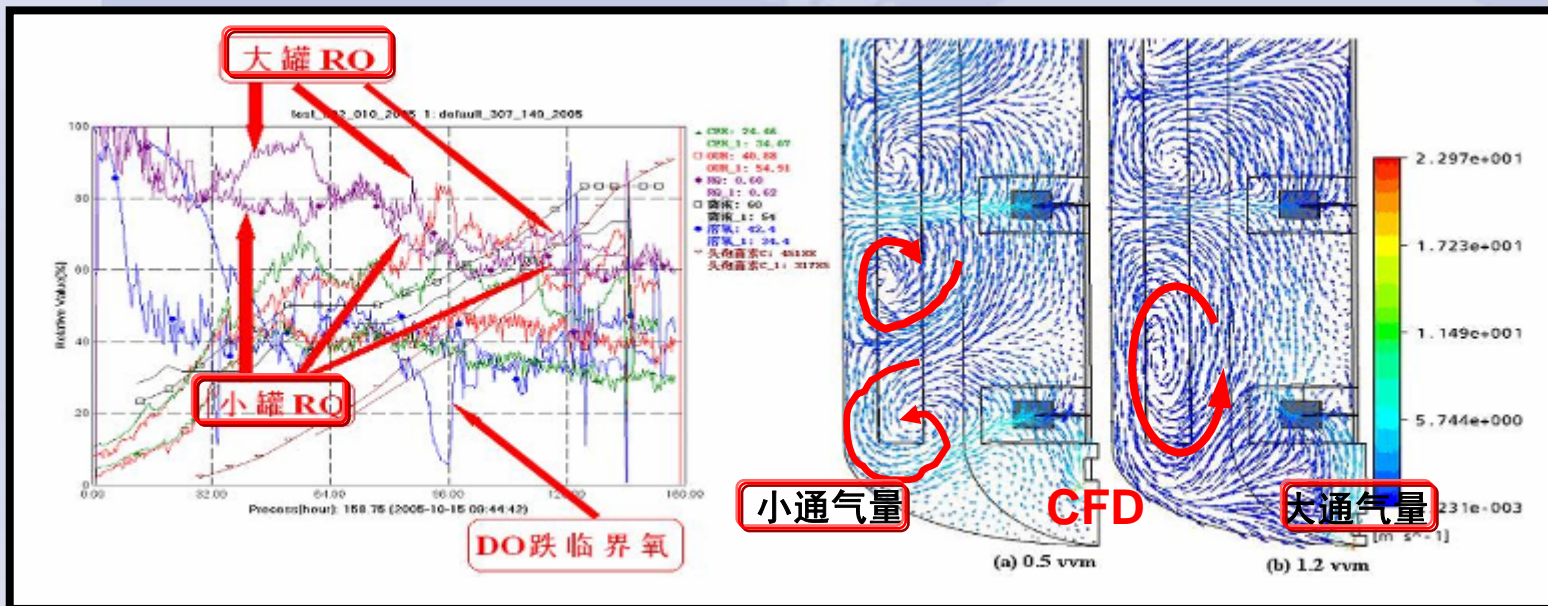


解决了国际上未见报道的**372m³大吨位、高耗氧**发酵罐的流场特性研究问题，实现了**从50L到372m³的过程优化与放大**，杂质组分**B、C由3.7%下降到2.7%**（优于雅培公司）；发酵单位、产品质量和发酵技术水平，**达国际先进水平**；国际市场占有率**30%**以上。

Zou X, et al. *Bioresource Technology*. 2009, 100 : 1406 (IF 4.253)

Zou X, et al. *Bioresource Technology* , 2011,102 : 3360

案例2: 头孢菌素C发酵优化与放大



发现了以油为主要碳源时生理特性参数呼吸商RQ值在小试与生产罐间存在明显差异



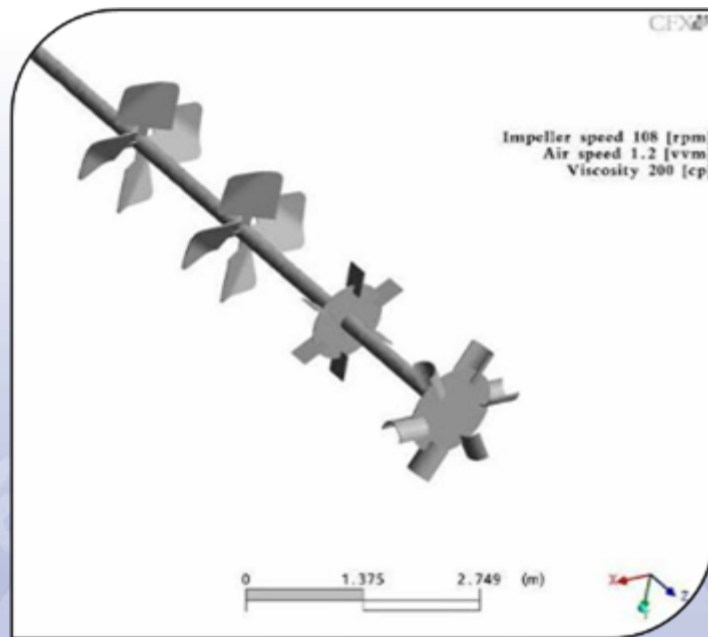
大型搅拌装置改造与生产工艺改造

160m³工业规模发酵罐搅拌系统进行改造，
发酵单位提升20%以上

(工厂开车后多年没有解决的问题4个月解决)

建立了新型碳源替代豆油新工艺，生产
成本又降低了30%以上

- 企业年生产能力由**400吨**提高到**780吨**
- 为新厂区建设提供了依据



Li JH, et al. *Bioprocess & Biosystems Engineering*, 2010, 33 : 1119



建设中的新厂区



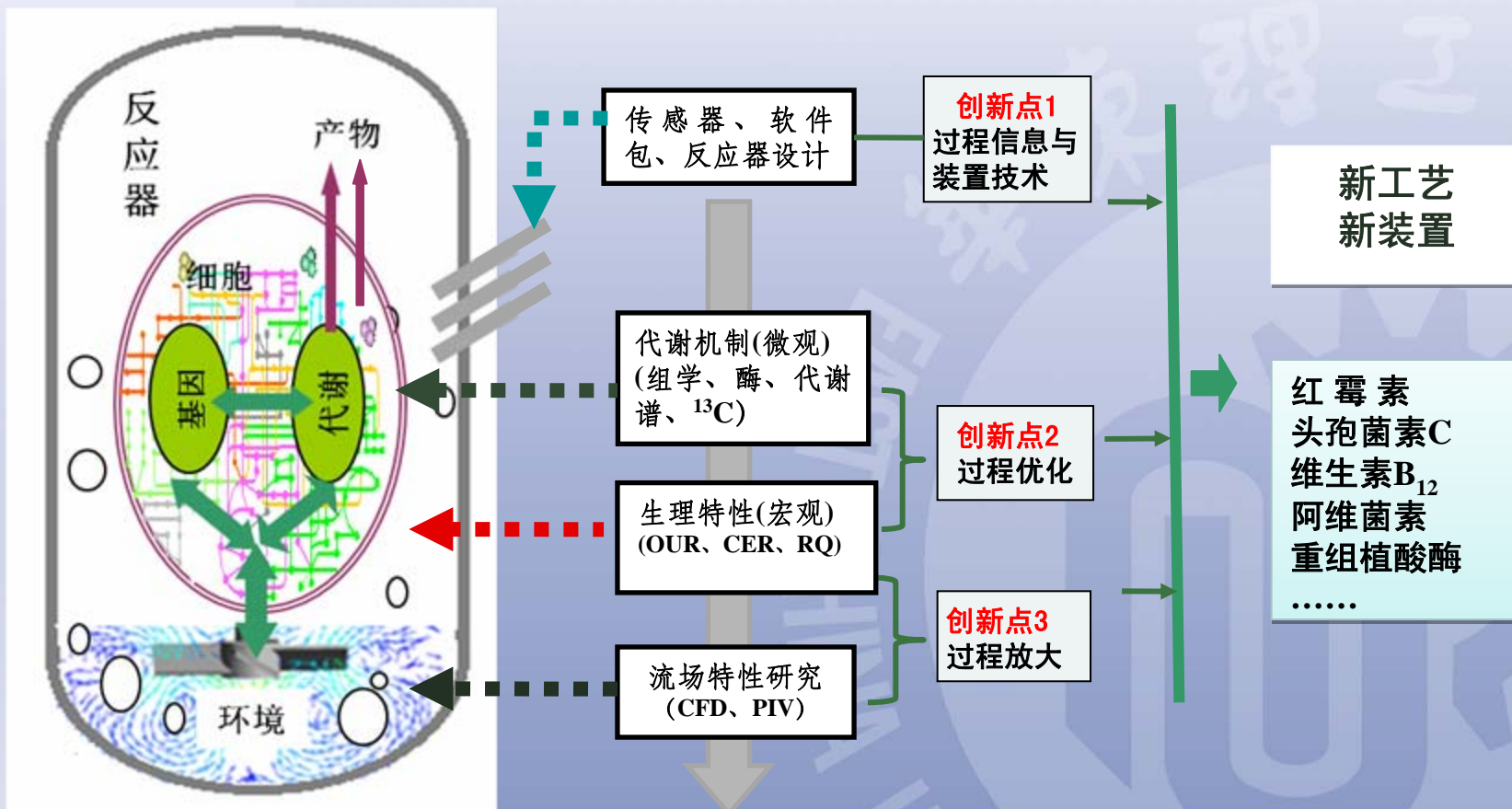
建成的新车间

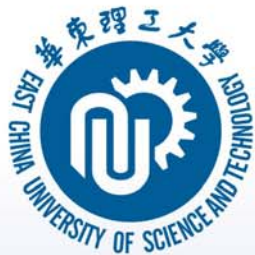
总体思路

研究对象

内容与创新点

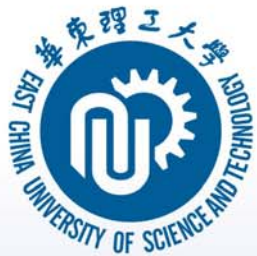
应用与推广





报告提纲

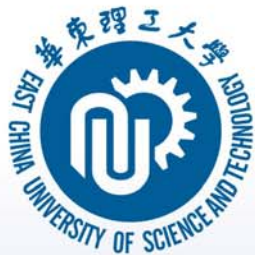
- 发酵过程研究的背景
- 基于细胞生理与过程信息处理的发酵优化与放大新技术介绍
- 新技术在谷胱苷肽大规模发酵过程中的应用



华东理工大学

East China University of Science And Technology

活细胞量准确检测



复合培养基的生物量检测

● 离线检测方法

干重法 Dry cell weight (DCW)

湿重法 Wet cell weight (WCW)

菌体离心体积计数法 Packed mycelial volume (PMV)

光密度法 Optical density (OD)

菌落计数法 Colony forming units (CFU)

缺点

- 比较费时
 - 受操作人员影响
 - 发酵时间内取样数有限
- (Arnold et al., J Biotechnol., 2004)

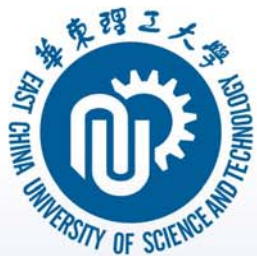
■ 在线检测方法

电容法

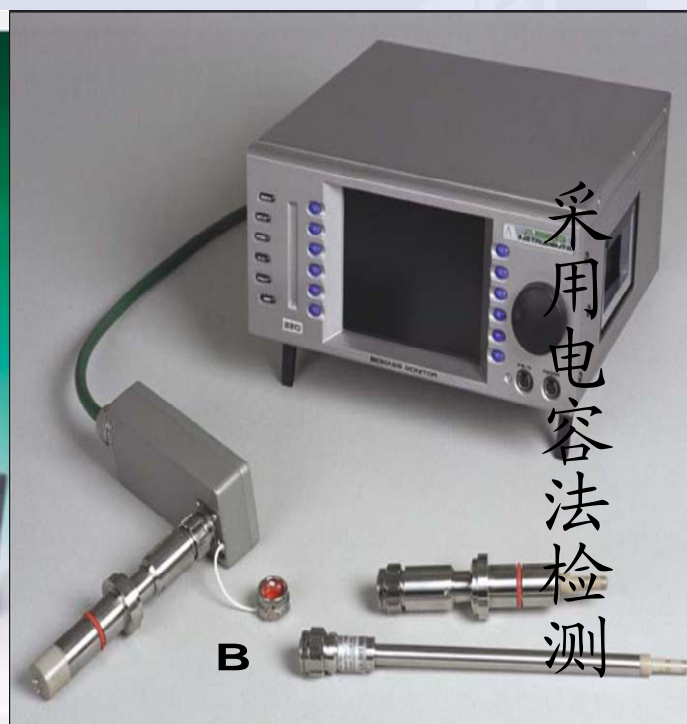
荧光检测法

光密度法

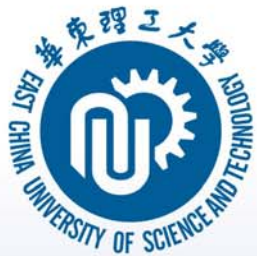
在线显微镜技术



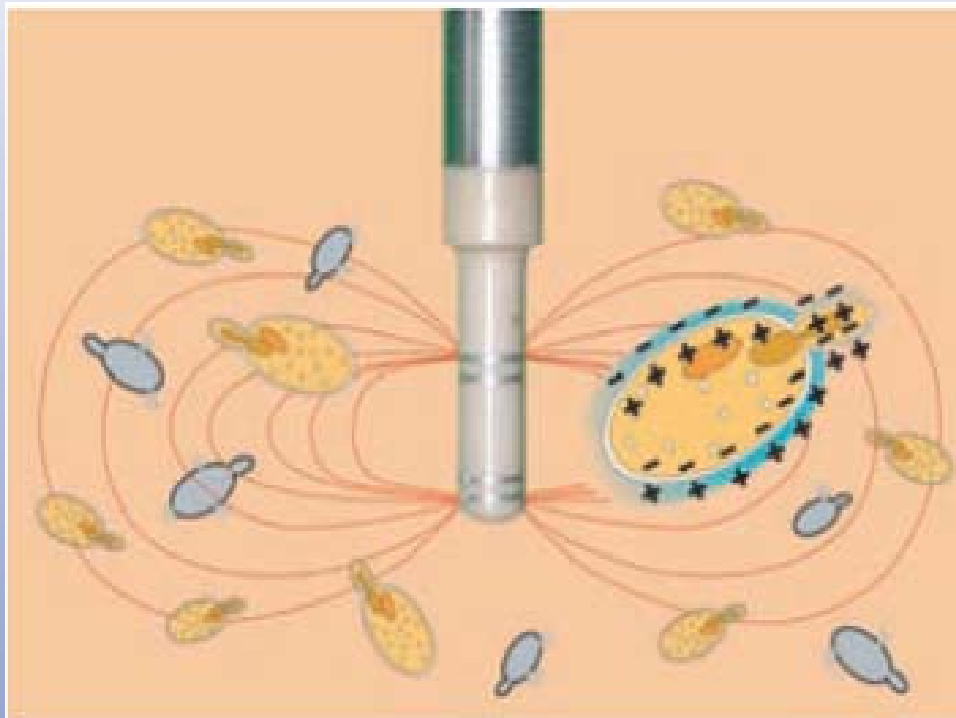
Biomass monitor 220活细胞传感器



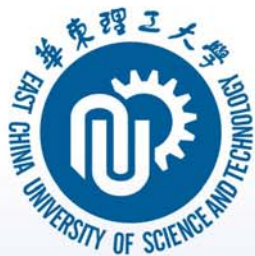
采用电容法检测



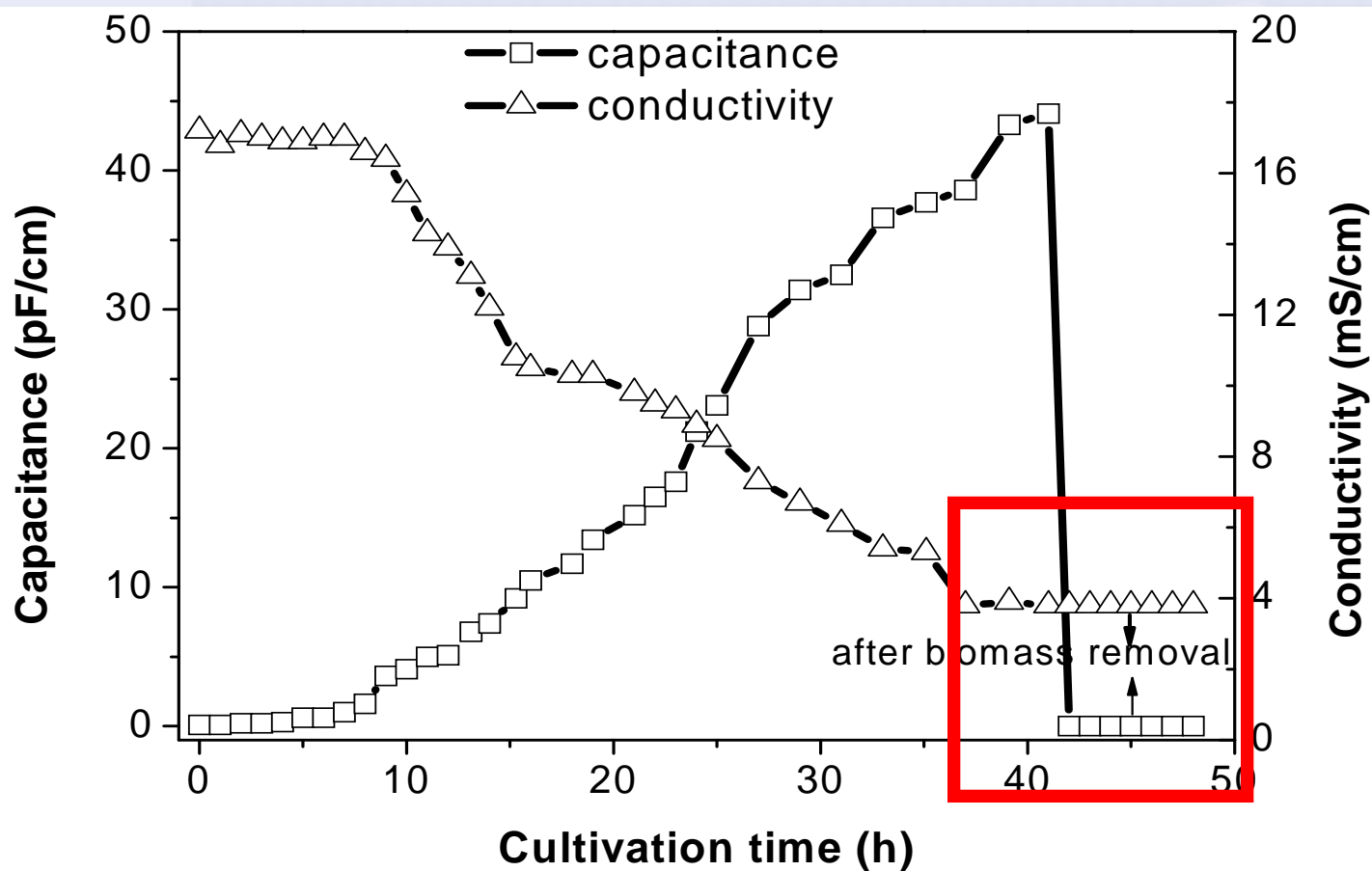
Biomass monitor 220活细胞传感器

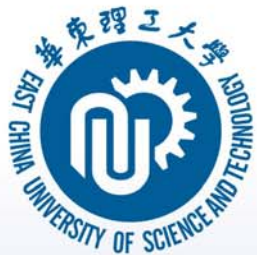


■ 在一定的电场频率下，只有活细胞细胞膜内外才会堆积正负电荷，从而传感器能检测到电容信号。而死细胞、泄漏的细胞等都不能堆积正负电荷，所以传感器不能检测到信号

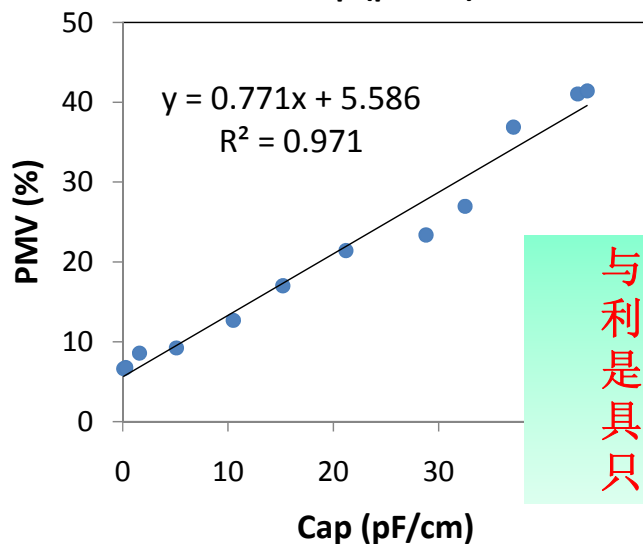
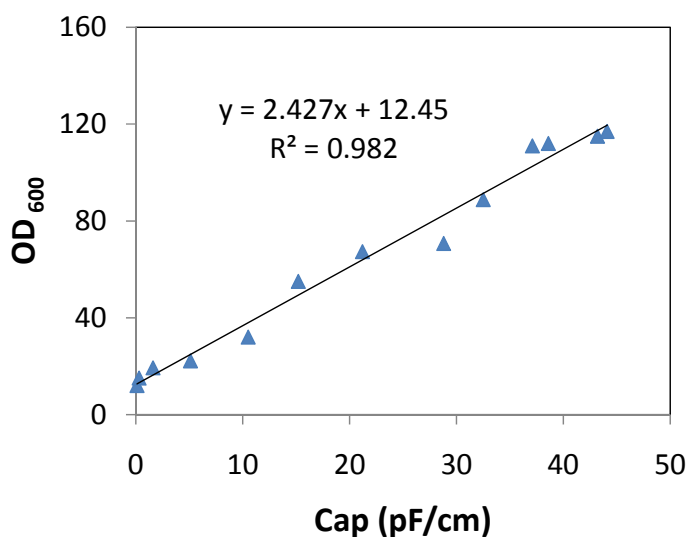
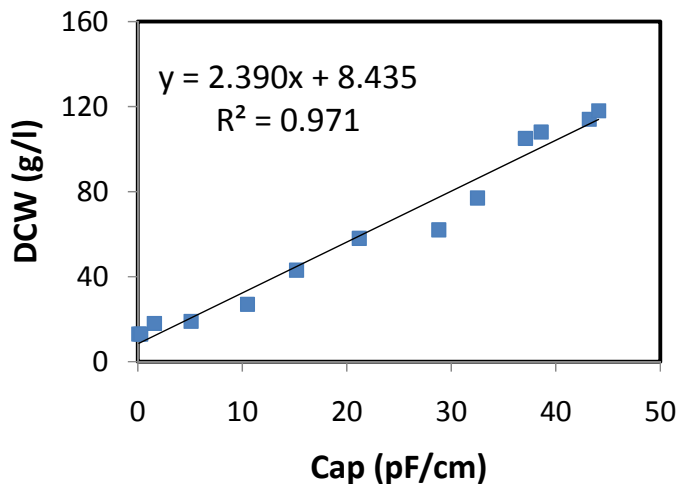
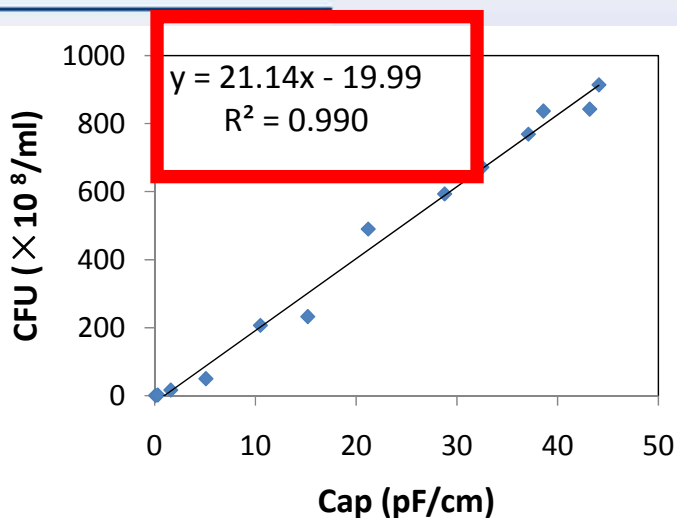


验证电容法检测的有效性

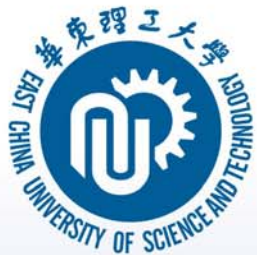




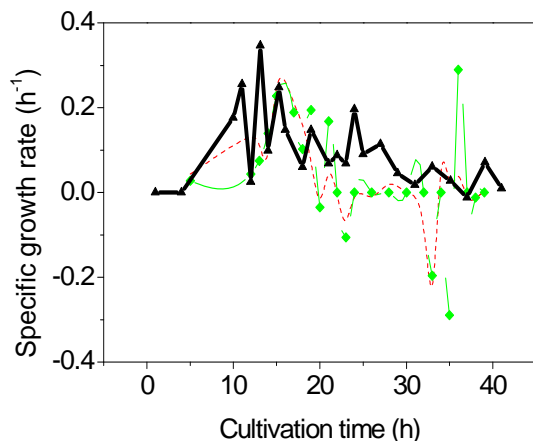
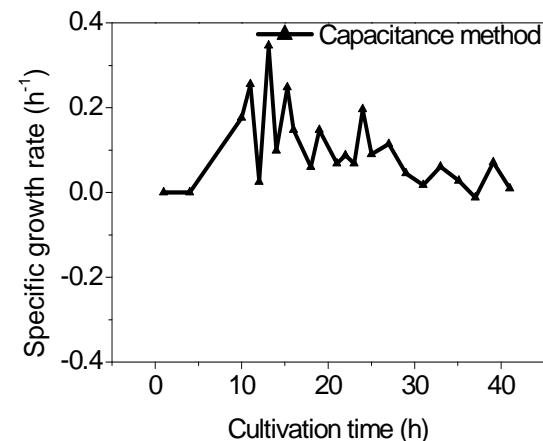
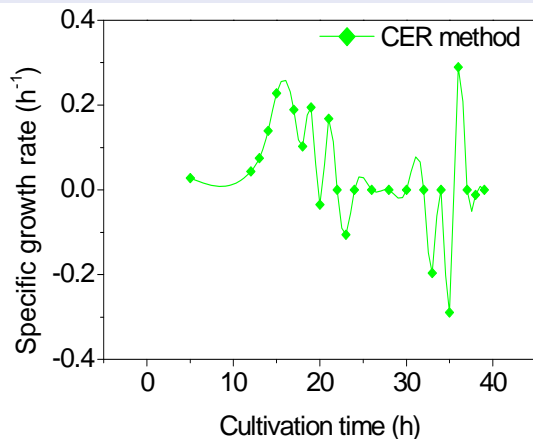
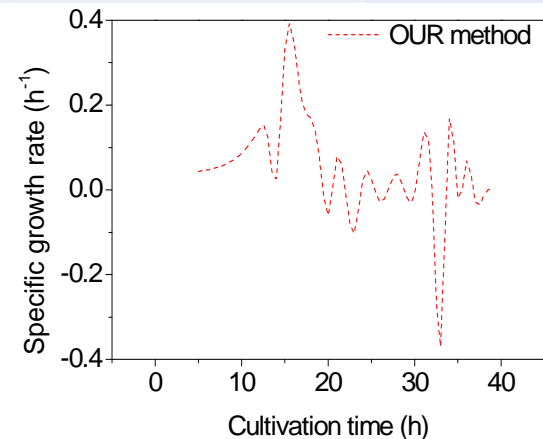
电容法与四种离线方法的线性关系



与四种离线检测方法相比较，利用电容技术来检测生物量是一种可信的检测方法，具有在线实时检测和只检测活细胞等优点。



比生长速率在线估算



$$\frac{dOUR(CER)}{dt} = \alpha X \frac{d\mu}{dt} + \alpha\mu \frac{dX}{dt} + \beta \frac{dX}{dt}$$

(Levisauskas et al., *Bioprocess Biosyst Eng*, 1996)

$$X = \alpha Cap$$

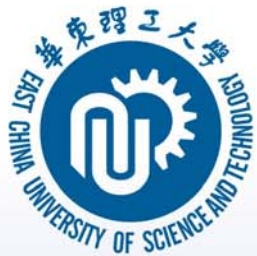
$$\mu = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} = \frac{1}{Cap} \frac{dCap}{dt}$$

(Ferreira et al., *J Biotechnol.*, 2005)

三种在线方法在发酵过程中对比生长速率估算值均呈现振荡现象，但采用电容法估算的比生长速率 (μ) 更稳定可靠

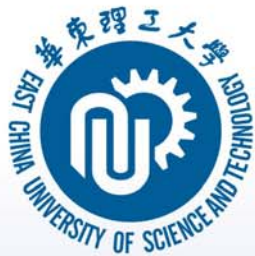
生物反应器实时显微观察器





发酵过程在位显微系统

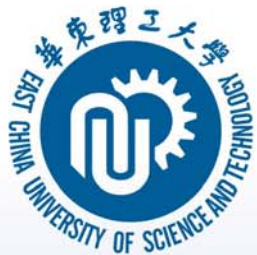




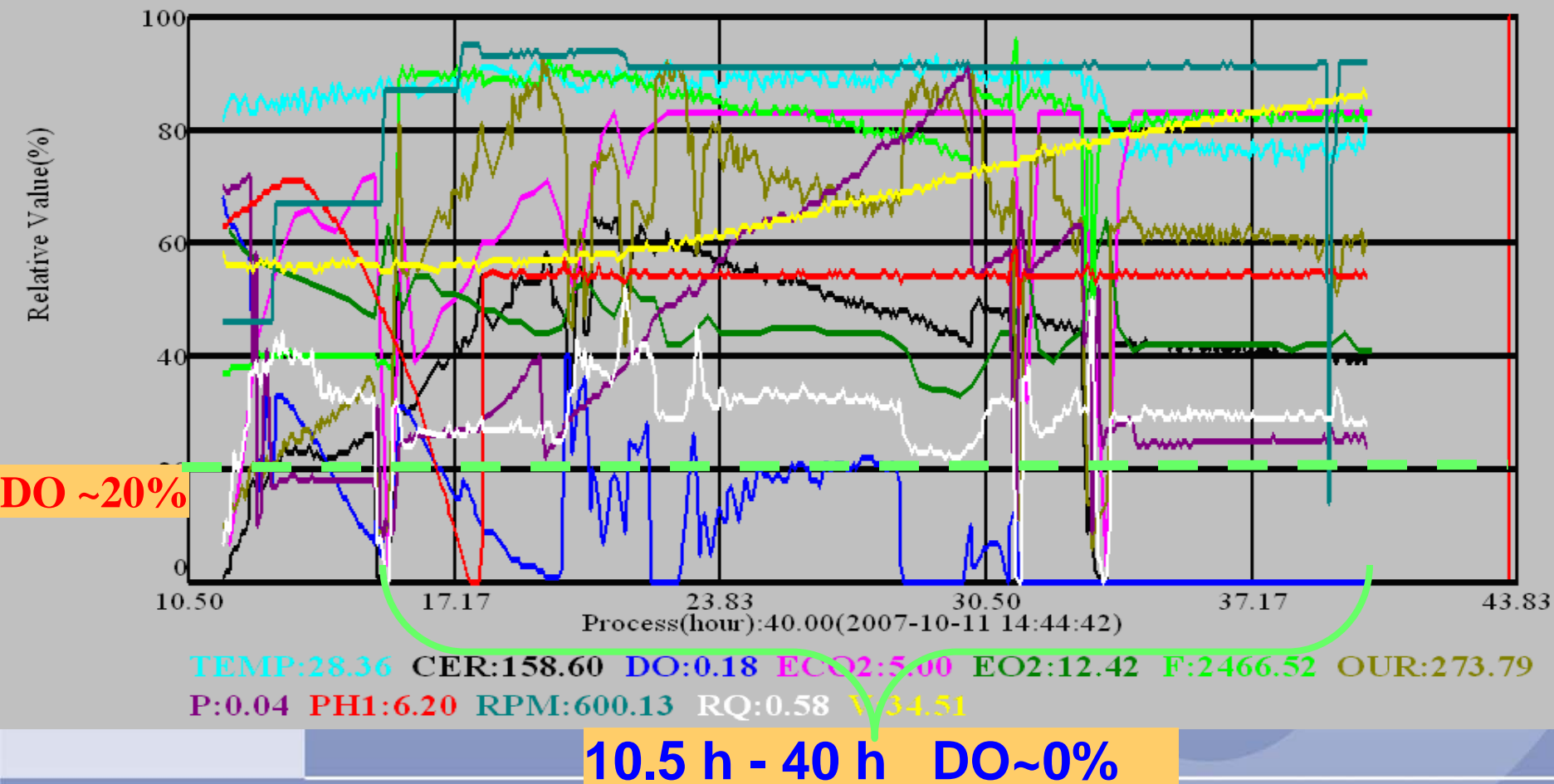
华东理工大学

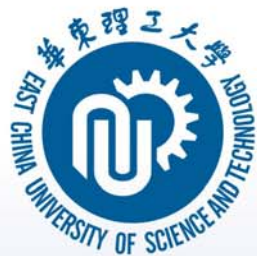
East China University of Science And Technology

在50L发酵罐上采用注氧技术 控制策略研讨

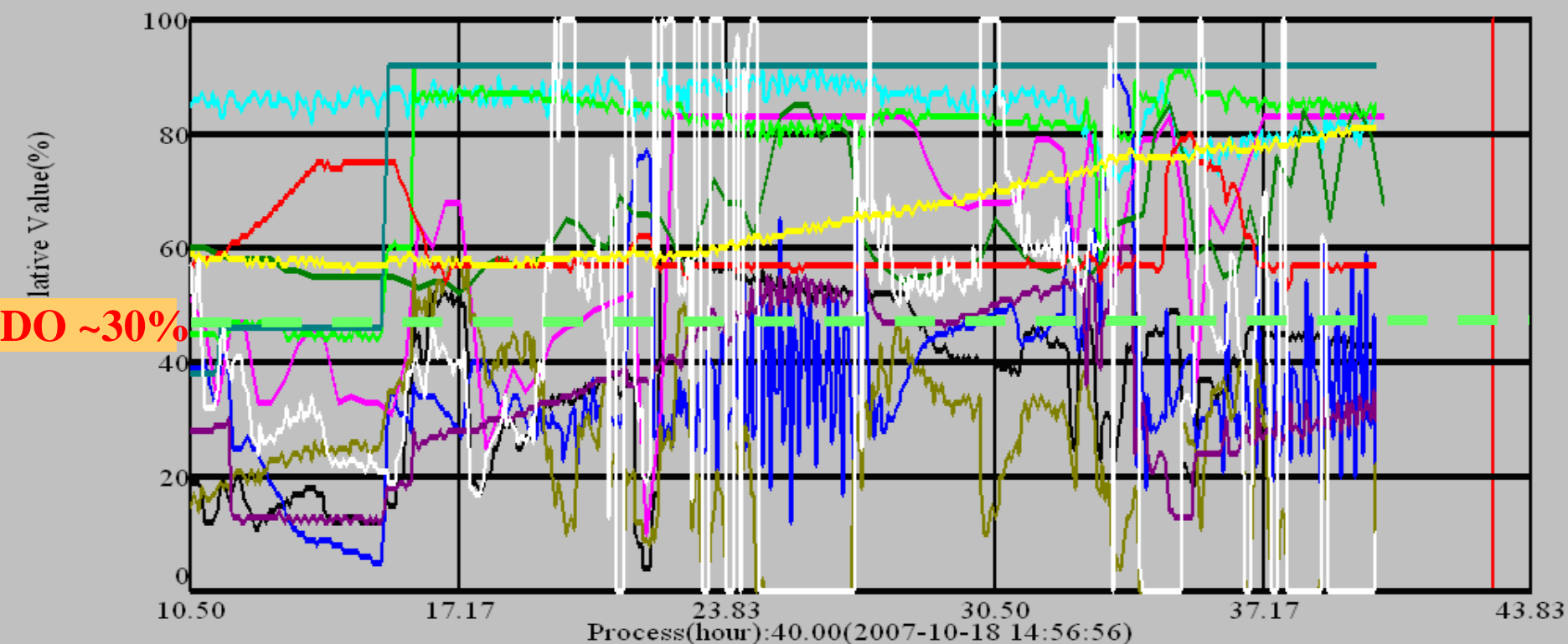


不同控氧(DO)策略: 优化前(对照)

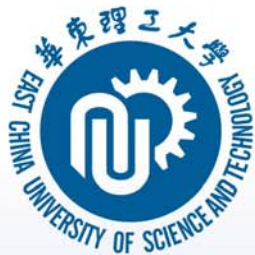




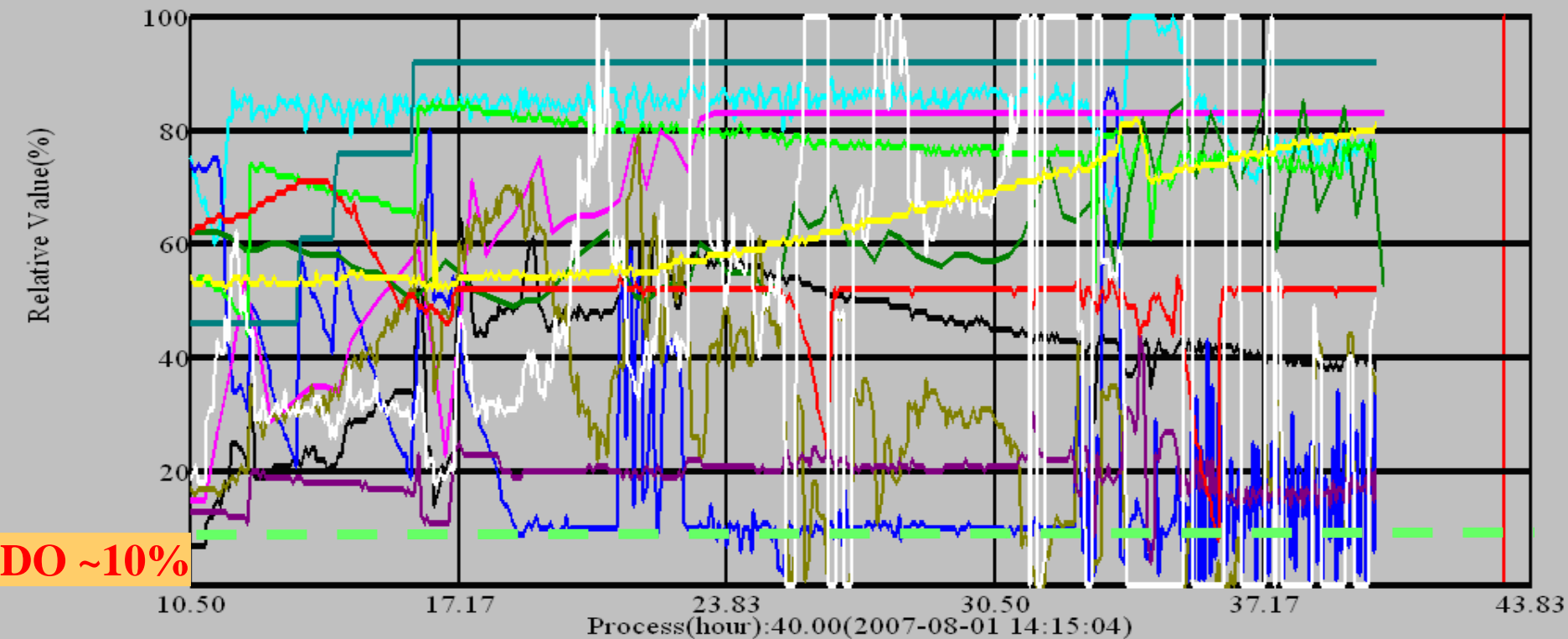
不同控氧策略：优化策略2 (DO控制DO~30%)



TEMP:28.85 CER:170.82 DO:21.71 ECO2:5.00 EO2:15.46 F:2504.29 OUR:190.36
P:0.05 PH1:6.29 RPM:600.52 RQ:0.90 V:32.54



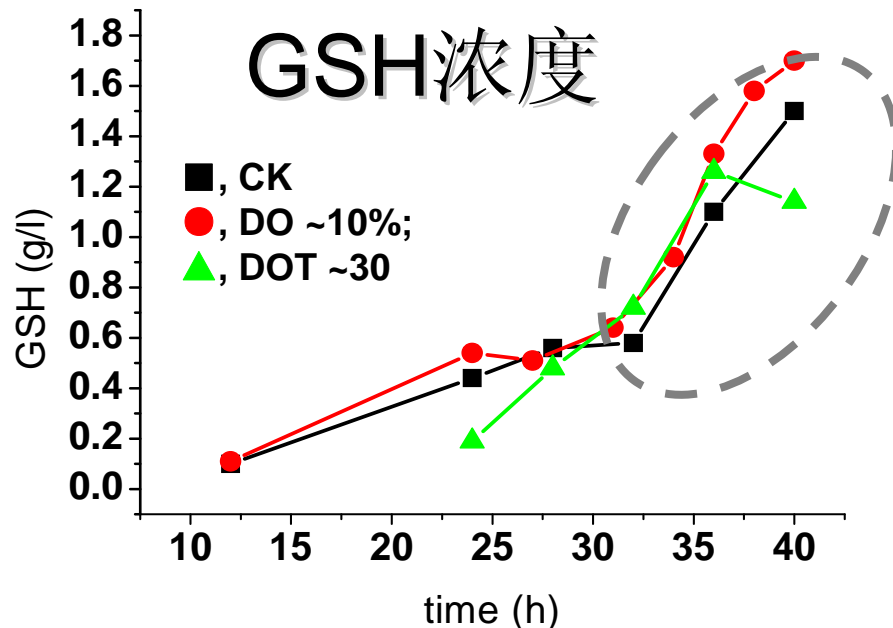
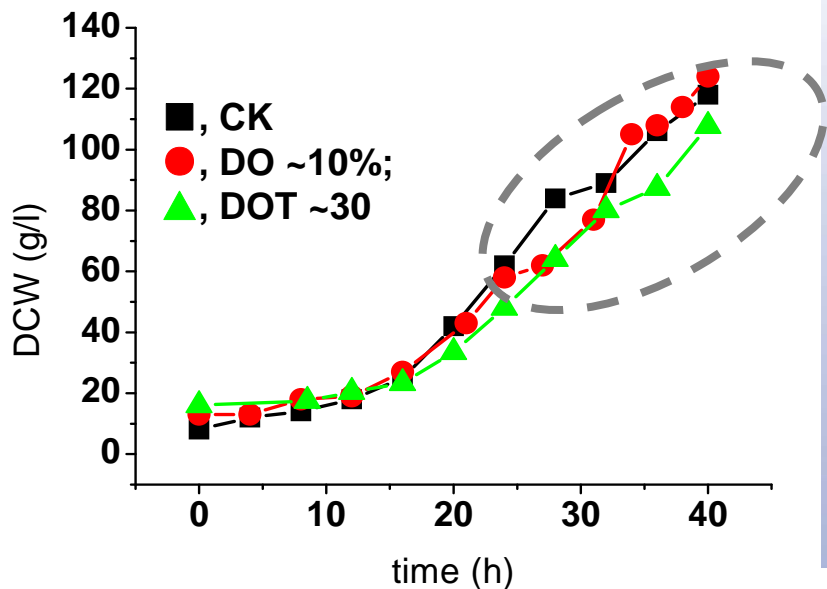
不同控氧 (DO) 策略: 优化策略2 (DOI控制DO~10%)



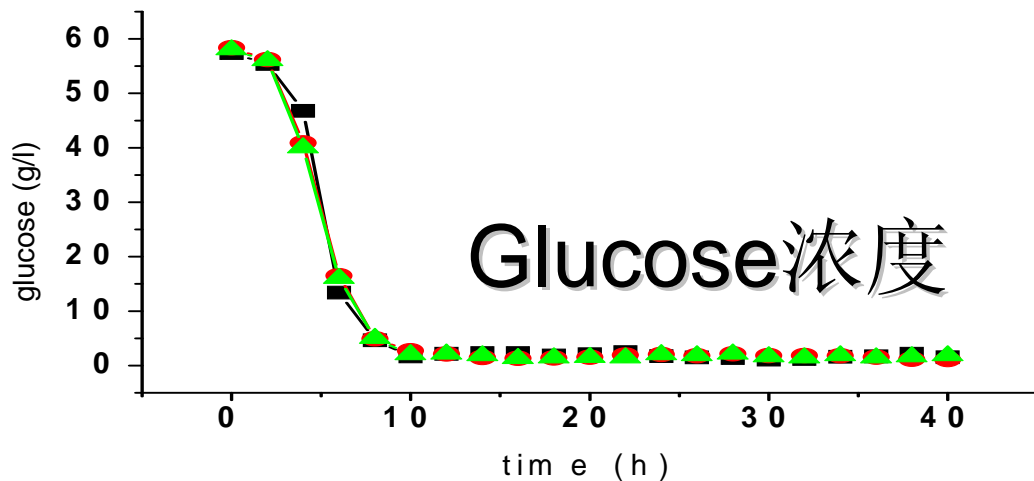
TEMP:26.90 CER:156.59 DO:67.58 ECO2:5.00 EO2:16.11 F:2298.52 OUR:154.06
P:0.03 PH1:6.09 RPM:599.76 RQ:1.02 V:32.57

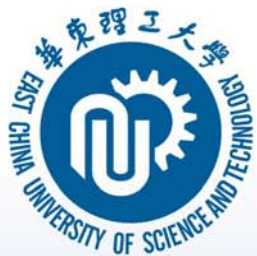


不同控氧策略细胞干重、GSH浓度和GLU浓度比较

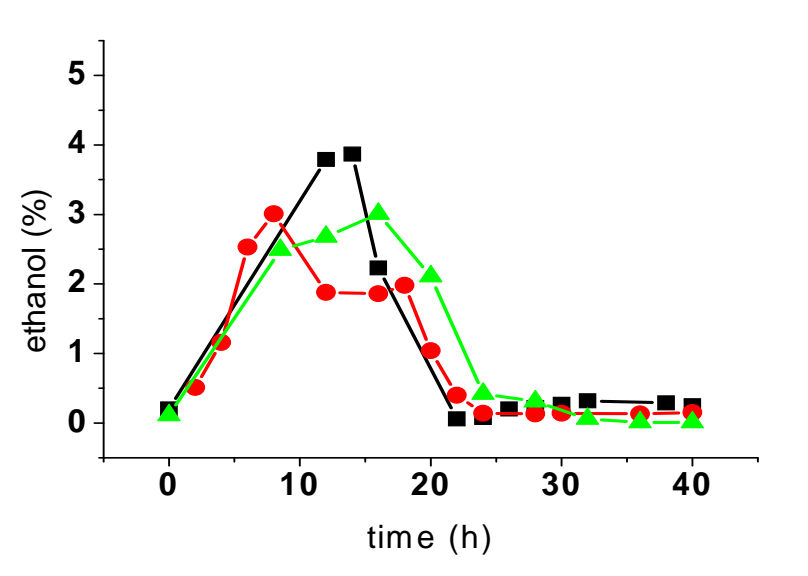
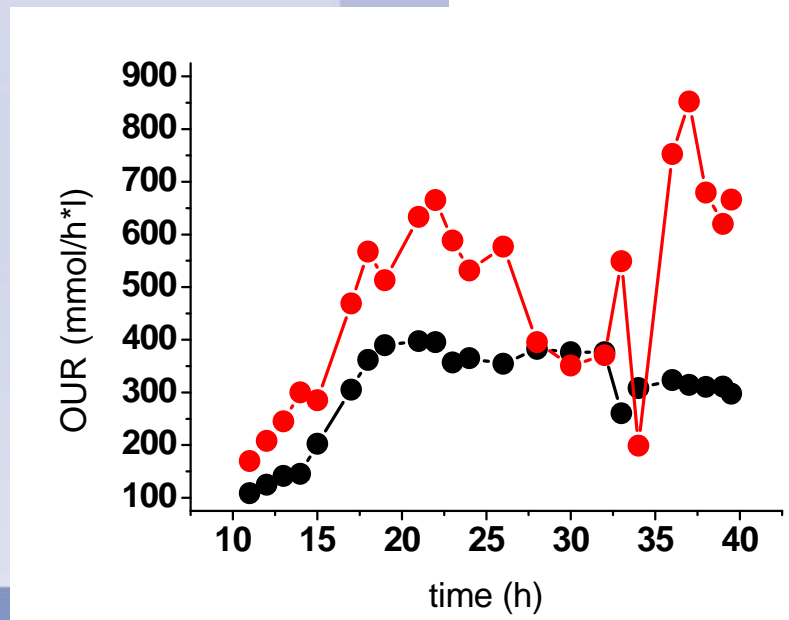
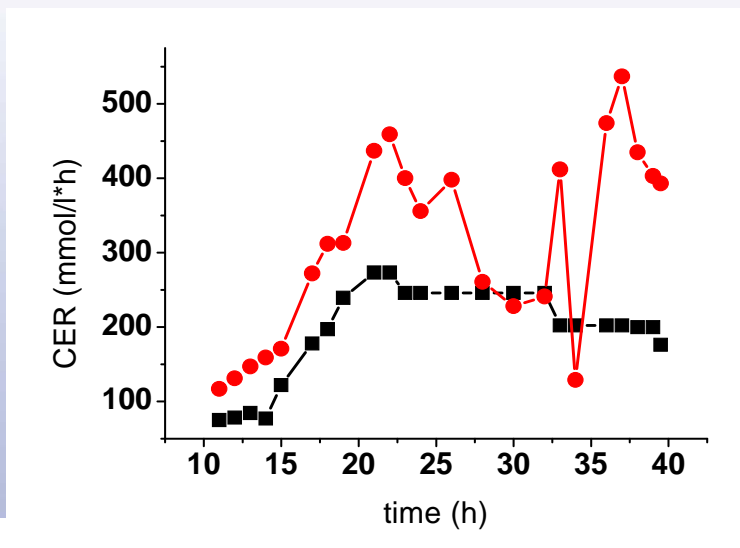


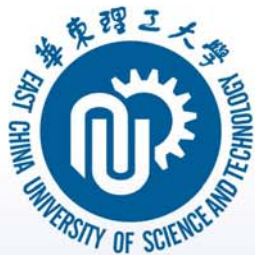
Dry Cell Weight





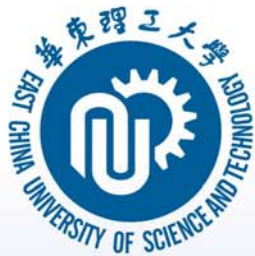
不同控氧策略CER、OUR和副产物代谢比较





不同控氧策略(优化前后比较)

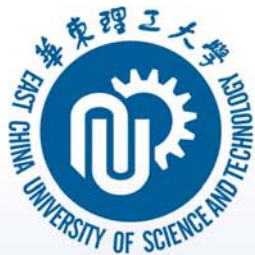
Fermentation mode	Control	DO~10%	DO~30%
Maximum GSH yield (g l ⁻¹)	1.5 ± 0.2	2.2 ± 0.2	1.26 ± 0.2
Final DCW (g l ⁻¹)	118	124	107.7
Maximum GSH content (%)	1.27	1.39	1.44
Final GSH content (%)	1.27	1.37	1.06
Culture time (h)	40	40	40
Average GSH productivity (g l ⁻¹ h ⁻¹)	0.037	0.042	0.029



华东理工大学

East China University of Science And Technology

基于生理代谢特性的谷胱甘肽发 酵优化策略研究



基于比生长速率在线估算的GSH高密度发酵

$$F = \frac{\mu(VX)_0}{Y_{X/S}(S_F - S)} \exp(\mu t)$$

(Liang et al., *Enzyme Microb Technol.*, 1996)

不同的比生长速率对酵母生长和GSH产量的影响

Parameters		Results		
μ (h ⁻¹)	0.15	0.20	0.25	
Dry cell weight (g/l)	65	120	103	
GSH yield (g/l)	0.6	1.8	1.1	
Glucose consumption (g)	4432	5380	6352	
Intracellular GSH content (%)	0.92	1.5	1.06	
Cell productivity (g/l/h)	1.58	2.8	2.5	
GSH productivity (mg/l/h)	14.6	43.9	26.8	
Cell yield on glucose (g/g)	0.14	0.22	0.16	
GSH yield on glucose (mg/g)	1.35	3.34	1.73	

成功的实现高密度发酵，但高密度发酵并不意味着实现了高水平发酵，还未实现高产目标。



GSH高密度补料分批发酵

1. DO-stat 控制
2. pH-stat 控制
3. Ethanol反馈控制

缺点

在高密度发酵过程中不可避免的使胞内的GSH含量降低

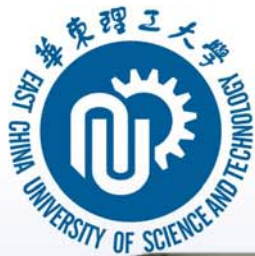
(Li et al., Appl. Microbiol. Biotechnol., 2004)

问题

一种补料控制方法克服上述缺点?

补料与生理特性、代谢流相结合?

更有利于放大?



用于细胞生理特性研究的实验室装置

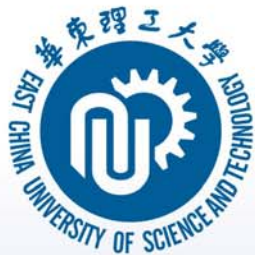


多参数实验室发酵罐

(包括CO₂、OPR、生物量等16个传感器和控制回路)

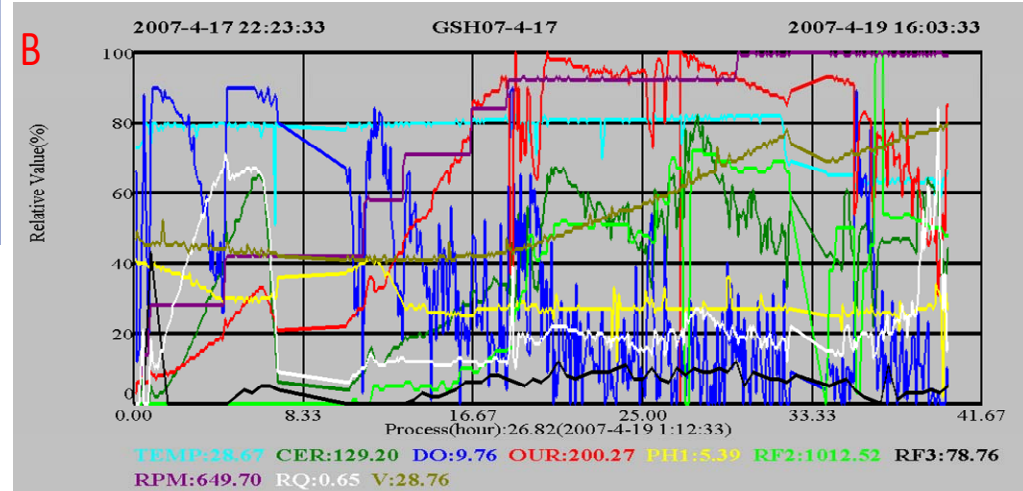
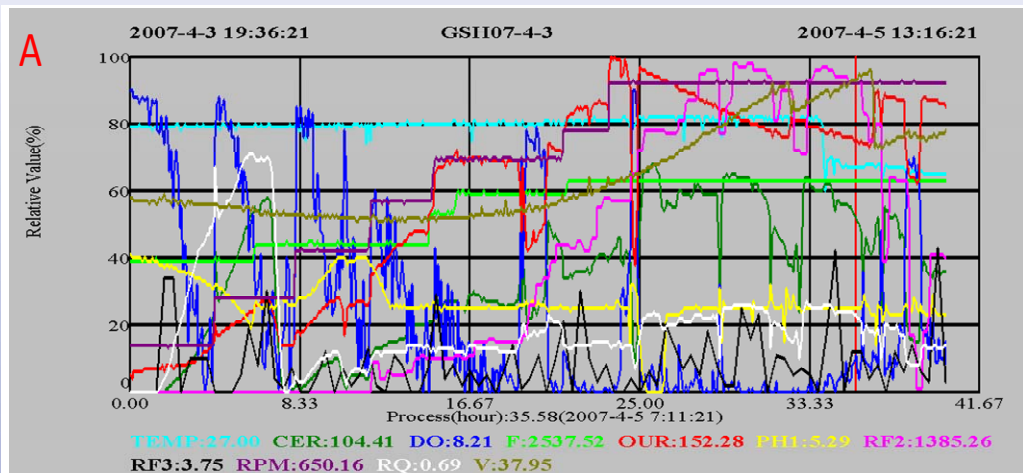
尾气分析系统—质谱仪





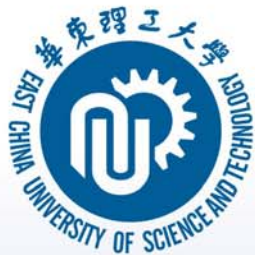
GSH高密度发酵多参数相关分析

通过多参数相关分析，
建立一个基于生理参数
RQ的反馈控制

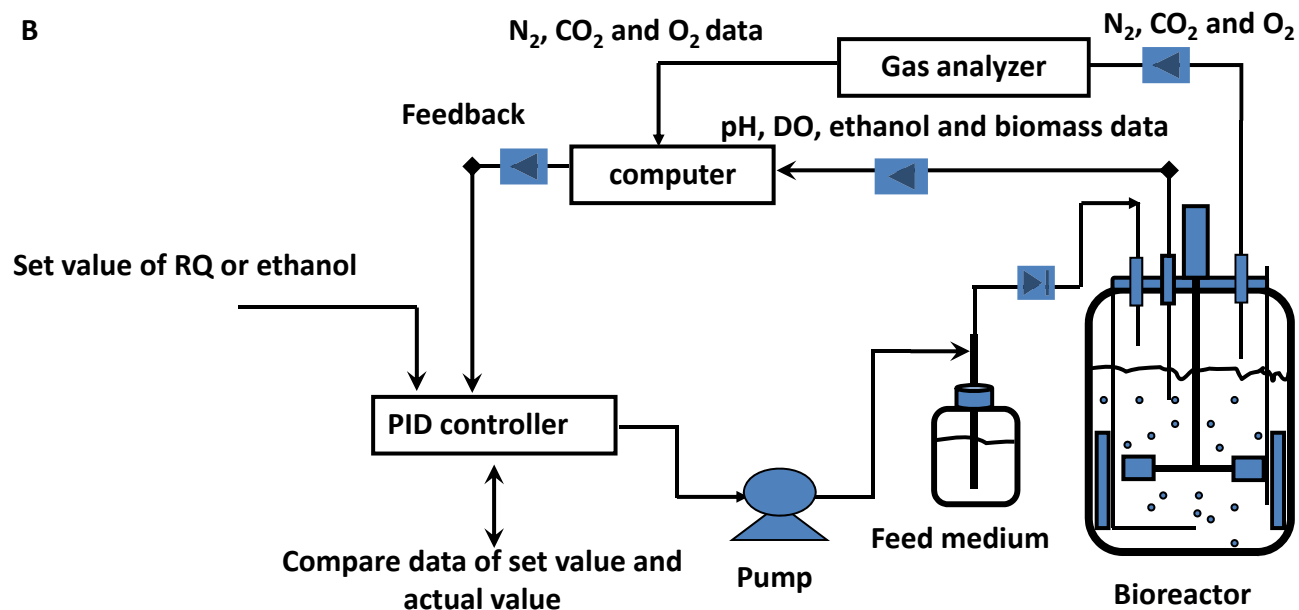
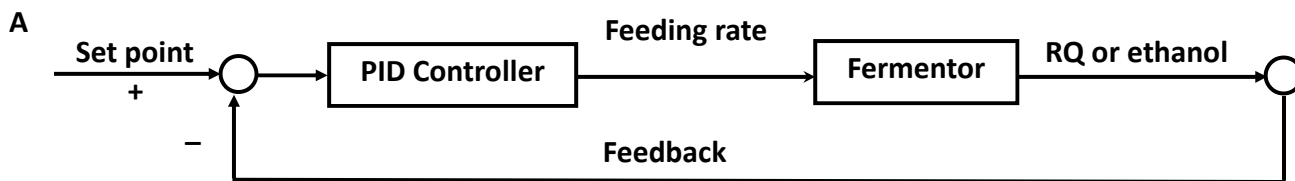


RQ是一个细胞内重要的生理参数，
在发酵过程中和OUR、CER和溶氧
等参数相关。

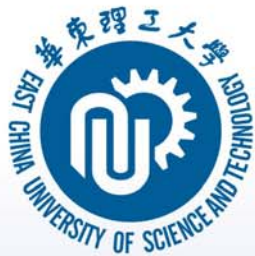
(Zhou et al., Bioresour Technol. 2009)



RQ/乙醇反馈控制



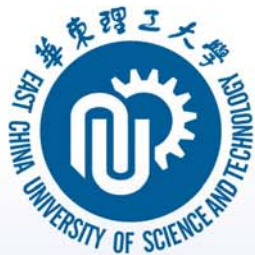
(Xiong et al., Enzyme Microb Technol., 2010)



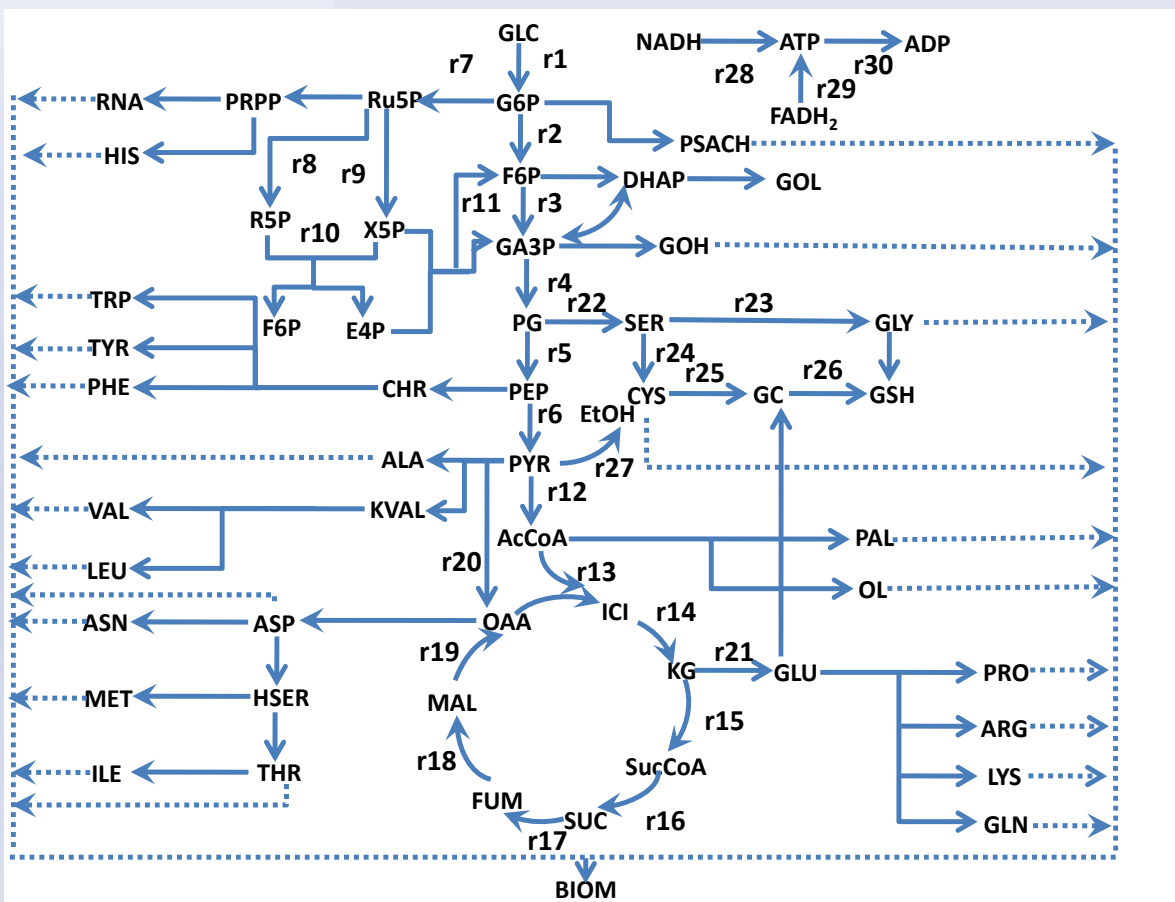
RQ反馈控制补料

在补料分批发酵阶段不同的RQ对酵母生长和GSH产量的影响（没有添加前体氨基酸）

Parameters		Results	
RQ	0.50	0.65	0.80
Dry cell weight (g/l)	68	112	103
GSH yield (g/l)	0.71	1.5	1.16
Intracellular GSH content (%)	1.04	1.34	1.12
Cell productivity (g/l/h)	2.12	3.5	3.21
GSH productivity (mg/l/h)	22.1	46.9	36.2
Cell yield on glucose (g/g)	0.19	0.31	0.29
GSH yield on glucose (mg/g)	1.97	4.17	3.22

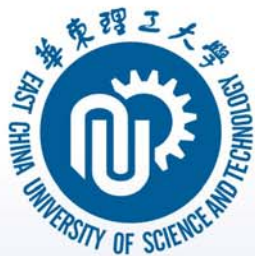


构建GSH生物合成代谢网络



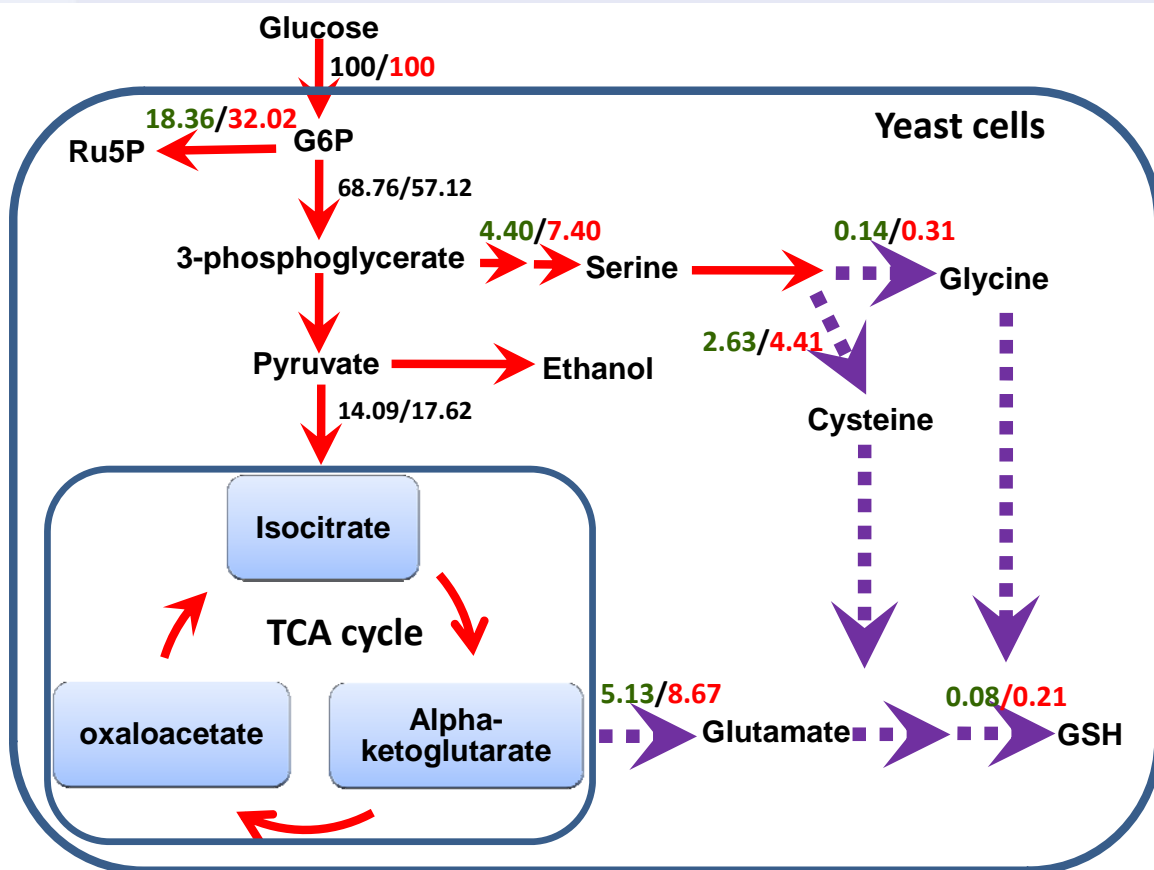
代谢网络成立依据:

- (1) 假设以葡萄糖为唯一碳源，并且乙醛酸循环基本不工作；
- (2) 假设TCA循环中产生的NADPH全部用于细胞合成而不进行氧化磷酸化，GTP与ATP等价，且1步ATP→AMP反应相当于2步ATP→ADP反应；
- (3) 假设能量形成环节的NADH和FADH₂氧化的P/O分别为2.5和1.5；
- (4) 细胞内中间代谢产物处于拟稳态和参考文献中*S. cerevisiae*生长的前体需求系数



不同RQ控制策略下主要代谢途径 代谢通量 (mmol/l/h)

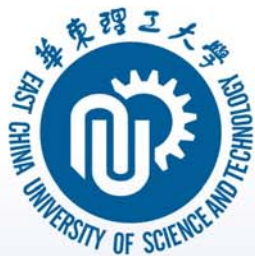
HMP途径



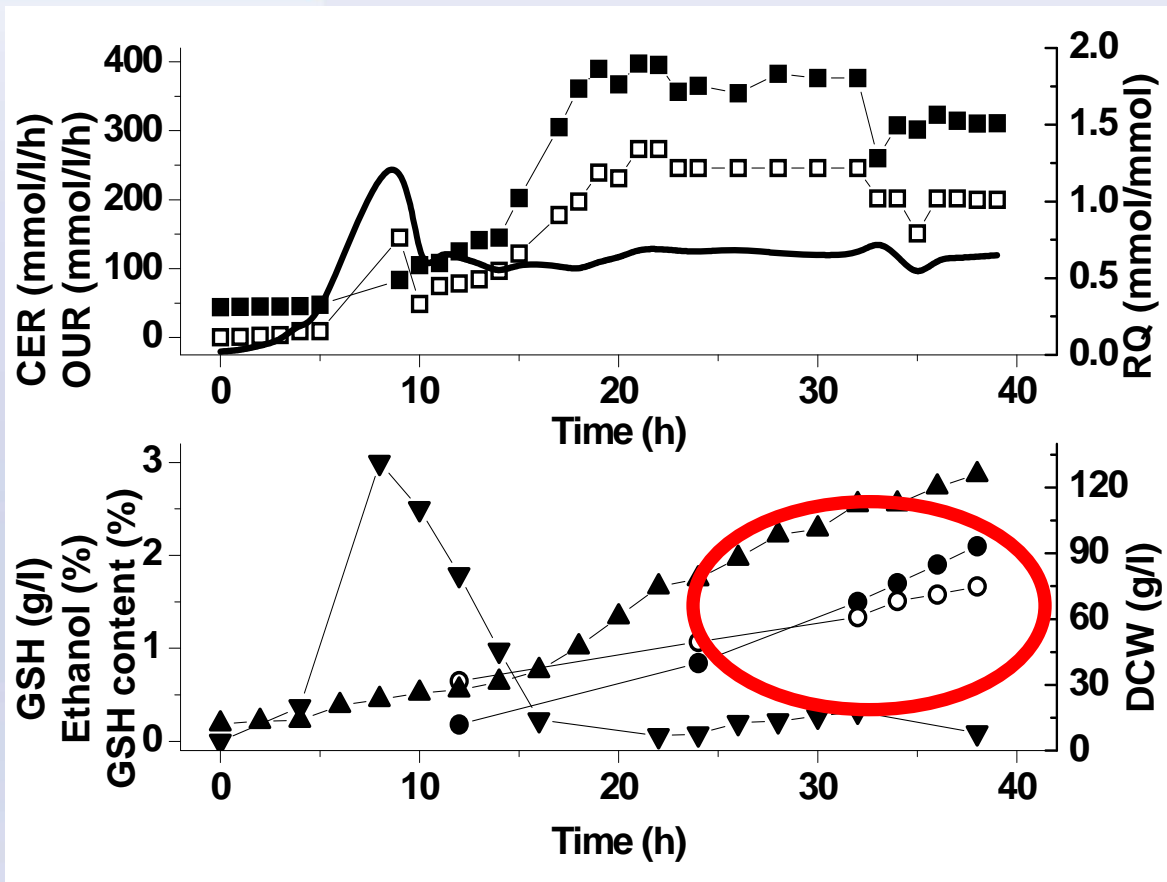
GSH前体
合成途径

GSH合成途径

(代谢流通量标示说明: A/B; A: RQ控制在0.5, B: RQ控制在0.65)

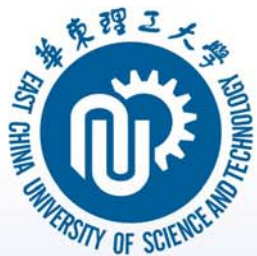


RQ反馈控制在0.65时 高密度发酵生产GSH

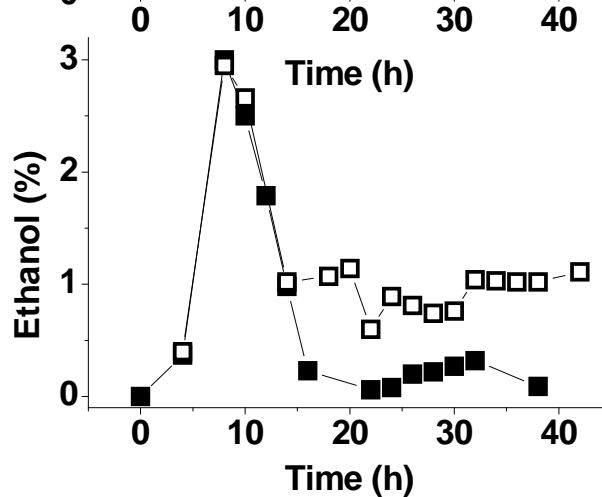
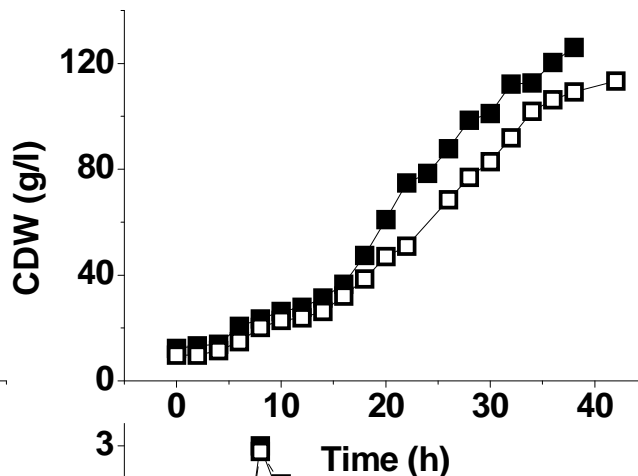
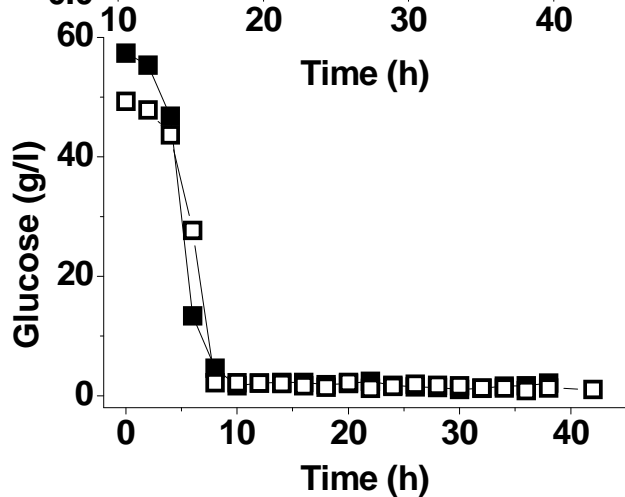
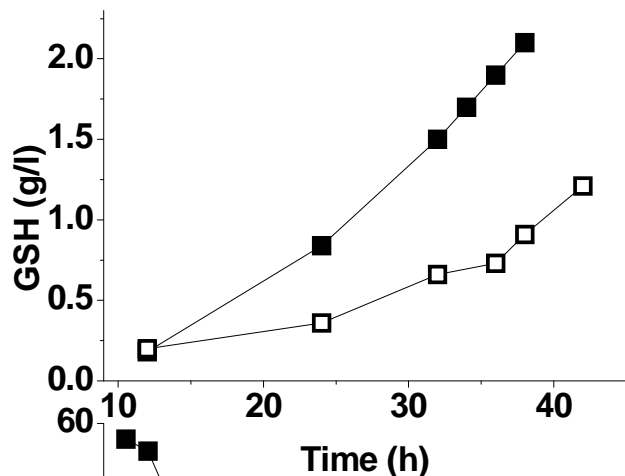


成功实现同时
提高GSH产量和
胞内GSH含量

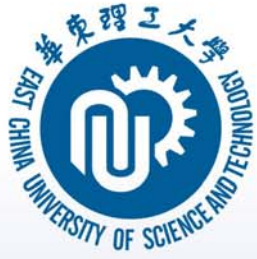
OUR (■)、CER (□)、RQ (—)、GSH yield (●)、
GSH content (○)、ethanol (▼)和DCW (▲)



RQ反馈控制与乙醇反馈控制比较



RQ-Feedback (■)、
Ethanol-feedback (□)

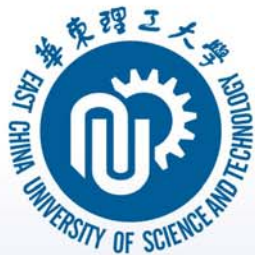


RQ反馈控制与乙醇反馈控制比较

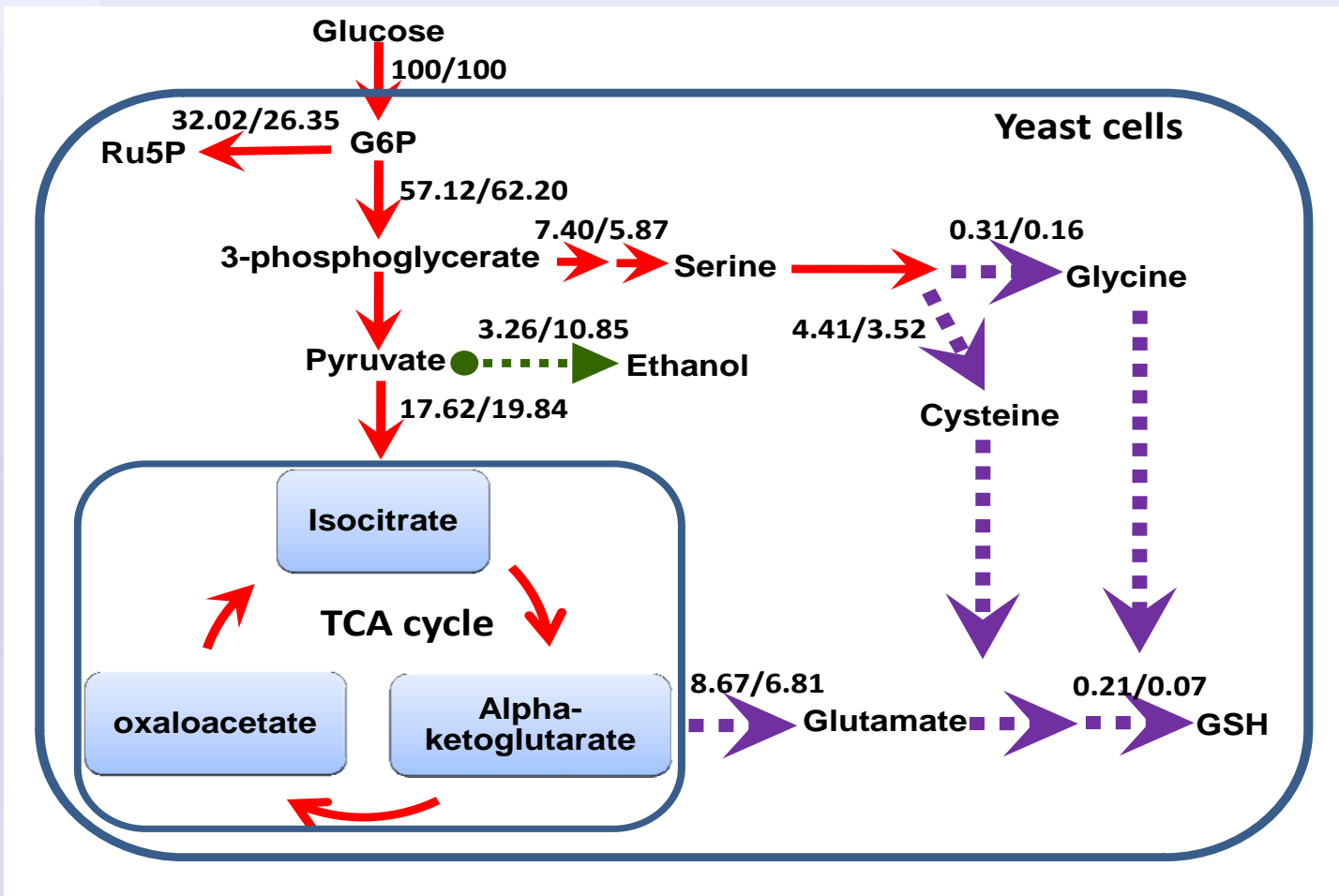
	Feedback control mode	
	RQ ^a	Ethanol ^b
Time (h)	38	42
Dry cell weight (g/l)	126	113
GSH yield (g/l)	2.1	1.2
GSH content (%)	1.67	1.06
Cell productivity (g/l/h)	3.32	2.69
GSH productivity (mg/l/h)	55.3	28.6
Cell yield on glucose (g/g)	0.37	0.33
GSH yield on glucose (mg/g)	6.1	3.5

a keeping RQ at 0.65.

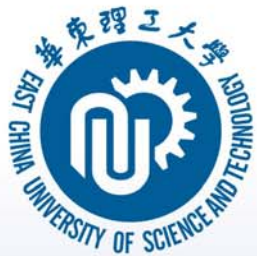
b keeping ethanol concentration at 1%.



RQ反馈控制与乙醇 反馈控制的代谢流分布



(代谢流通量标示说明: A/B; A: RQ控制, B: 乙醇控制)



谢谢!

