

国外应用微生物

(第三辑)

《国外应用微生物》编译组

上海科学技术情报研究所

毛主席语录

思想上政治上的路线正确与否是决定一切的。

学习有两种态度。一种是教条主义的态度，不管我国情况，适用的和不适用的，一起搬来。这种态度不好。另一种态度，学习的时候用脑筋想一下，学那些和我国情况相适合的东西，即吸取对我们有益的经验，我们需要的是这样一种态度。

我们是主张自力更生的。我们希望有外援，但是我们不能依赖它，我们依靠自己的努力，依靠全体军民的创造力。

中国人民有志气，有能力，一定要在不远的将来，赶上和超过世界先进水平。

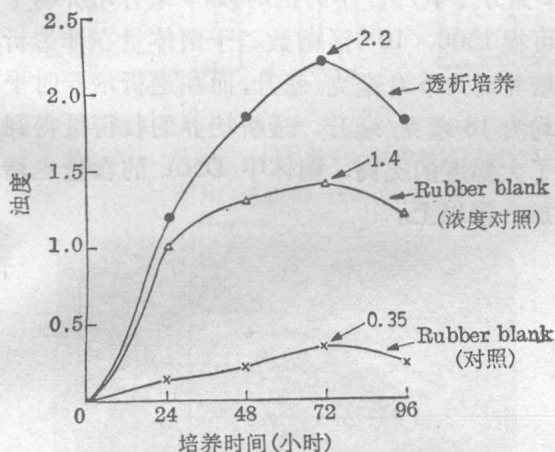
目 录

1. 透析培养法 (1)
2. 生物工程中的摇瓶机 (8)
3. 发酵过程中的机械消沫 (10)
4. 现代工业微生物发酵及其对技术发展的影响 (13)
5. 从不纯的稀薄液中浓缩天然成份 (23)
6. 核酸抽提的新尝试 (31)
7. 辅酶 A 生成研究的展望 (36)
8. 工业上用微生物浸出铀的方法 (42)
9. 用固相青霉素酰胺酶裂解苄青霉素为 6-氨基青霉烷酸 ... (46)

透 析 培 养 法

序 言

著者曾从植物中分离得到同化戊糖的酵母菌 *Mycotorula japonica*, 发现它对碳氢化合物也有很强的同化作用。但其在碳氢化合物培养基中的生长却不及在以葡萄糖或戊糖为碳源的培养基中好, 这可能是由于用碳氢化合物培养时会产生和积累某种抑制生长的物质, 因此, 试行了透析培养(图 1)。结果表明, 该菌的生长有明显改善, 证实用含碳氢化合物的培养基培养时, 在透析外液中存在有抑制生长的物质。



限定培养基为煤油, 内含表面活性剂聚乙二醇单硬脂酸酯 (polyethyleneglycol monostearate) 0.01%

图 1 同化戊糖的酵母菌 *Mycotorula japonica* 在 5.5% Visking 纤维素管中透析培养时的生长曲线

所谓透析培养, 一般指在围有半透膜的培养环境中, 使微生物生长的方法。即在培养物与培养基之间隔着半透膜, 代谢产物与营养物进行扩散与交换。例如, 在一个小的玻璃纸袋或套子里放入培养物, 将其悬吊于含有营养物的槽内。营养物透过膜扩散到袋里或套子里, 微生物利用其营养而生长。微生物

因为不能透过膜而留在玻璃纸袋或套子里, 代谢产物透过膜扩散到槽里去。透析培养具有许多特点, 其中主要的是能够显著地提高微生物的细胞浓度。

透析培养的发展情况

1896 年 Metchnikoff 等首先在动物体内用半透膜培养微生物。他们将盛有霍乱菌的火棉胶薄膜袋放入动物腹腔内, 证实存在着可溶性毒素。并以增加毒素的实验研究抗毒血清疗法。后来 Olitsky 等为了研究伤寒菌的致病原因, Ogg 等进行去除鼠疫菌毒性的研究, 以及 Nocard 等对肺炎菌、结核菌的研究都在动物体内做过透析培养的试验。

另外, 还有三个研究所分别在试管内进行了透析培养的研究, 并取得了进展。这就是 1900 年 Carnot 等, 为了获得毒性强的肺炎菌毒素, 把培养物装入火棉胶薄膜袋里, 悬吊于含有普通培养基的烧瓶中进行培养试验; Ruffner 等进行了同样的试验, 并且阐明了透析培养的可能性; Frost 用透析培养法研究伤寒菌与土壤或水中细菌的拮抗作用。

后来, M' Ewen、Lewis、Harmsen、Wentzel 和 Gorelick 等研究了膜的多种用途, 但主要的还是把培养物装入小袋或套子里, 悬吊在含有培养基的槽内, 通过扩散把营养物传递给培养物, 同时将代谢产物传递出来。除通过膜的透析外, 还有溶质通过界面扩散时产生的透析。Tyrrell 将这一原理应用于微生物培养而能使其增殖。他用琼脂做成固体培养基装在摇瓶内, 再放入少量发酵液, 研究固-液双相培养系统。这样竟可将各种细菌的活菌数培养浓缩至 6×10^{11} /毫升。

用膜或界面透析培养的主要优点是能

够使生长中的细胞浓缩到异常高的浓度。Tyrrell 等进一步证实了固体琼脂-液体培养基能增加细胞的总收得量。在 Hestrin 和 Rogers 关于酶的报道以及 Fredette 关于破伤风杆菌 (*Clostridium tetani*) 产生外毒素的报道中都指出, 与此同时还有高分子产物聚积。另外, 槽内装的虽是成份复杂的培养基, 而扩散到培养室被利用的却是易于扩散的单纯的溶液。结果非但维持生长的培养基被简化了, 而且还能获得干净的细胞或高分子产物。

这个原理现正应用于培养条件复杂营养要求严格的细菌培养 (Gerhardt 等对淋菌的浓缩培养)、培养哺乳动物细胞悬浮液 (Eagle 用不含蛋白质的培养基维持人和动物的细胞生长)、细菌外毒素的生产 (Polson 等关于强力肉毒杆菌毒素的生产) 和孢子生产 [Schneider 等用肉毒杆菌 (*Clostridium botulinum*) A, B, E 型和产气荚膜杆菌 (*Clostridium perfringens*) 进行透析培养生产孢子]。

透析培养还曾应用于共生繁殖。Ritter 培养流行性感冒病毒和 Nurmikko 对微生物产生的维生素和氨基酸进行微生物定量测定时, 都试验过透析共生培养。透析培养还有一个优点, 这就是由于空气通过膜扩散, 不是直接地而是间接地接触培养物, 这样可以免去因直接通气而使微生物变性的危险或受消泡剂毒性的影响 (Gladstone 在研究炭疽免疫中用玻璃纸袋获得不含细胞的免疫抗原)。其次, 透析培养还有一些特点, 例如, 旺盛增殖时间延长; 无论在培养液里或细胞洗净贮藏时, 都能保持活菌; 自溶现象缓慢。此外, Kohn 还把透析培养作为浓缩蛋白液体的一种简便方法。即在 Visking 透析管内装入干燥的聚乙二醇, 然后把管子弯成 U 形, 浸入含蛋白的液体内进行透析。Flodin 等采用干燥的 Sephadex 由多孔菌属 (*Polyporus versicolor*) 的培养液浓缩纤维素酶。

透析培养的应用

为了发挥上述透析培养的作用和潜在效用, 要得到高浓度的细胞, 必须扩大装置和通气搅拌。由于原来的透析培养系统受到限制, 于是 1963 年 Gerhardt 等根据这种要求, 设计了图 2 所示的透析培养瓶。使用时在培养瓶下部装满培养基, 利用聚四氟乙烯小球的转动来搅拌。瓶的上部装入少量培养物, 上、下部之间的透析膜用网夹住。透析培养瓶置于摇瓶机上, 在 30°C 下进行培养。Gerhardt 将粘质赛氏杆菌 (*Serratia marcescens*) 在 30°C 培养 48 小时, 用各种透析膜试验, 结果如下: 采用 Graver 玻璃纸 (cellophane) 和 Gelman PVA-Dynel-尼龙 (nylon) 6408 时, 测定的活菌数和菌体收得量都较满意, 虽然膜和其他条件各有不同, 但一般在氧供给速率为 1 克分子氧/升/小时的时候, 1 毫升培养物中可得 1.66×10^{11} 活菌数。干菌体量在非透析培养时为 5.6 毫克/毫升, 而在透析培养时平均为 18 毫克/毫升, 透析培养的收得量得到了大幅度的提高, 菌体中 DNA 的含量也增加一倍以上。

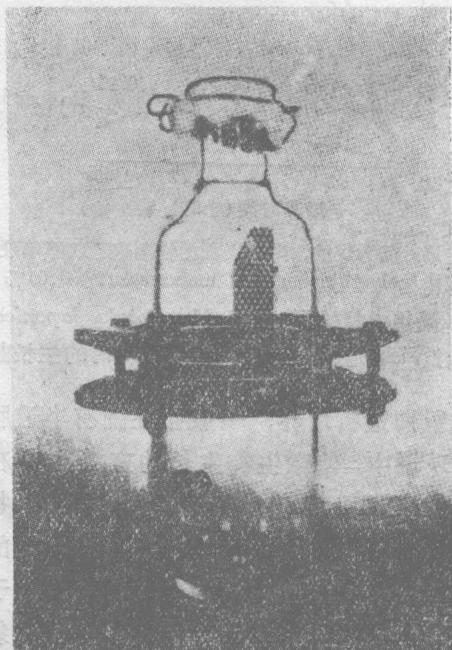
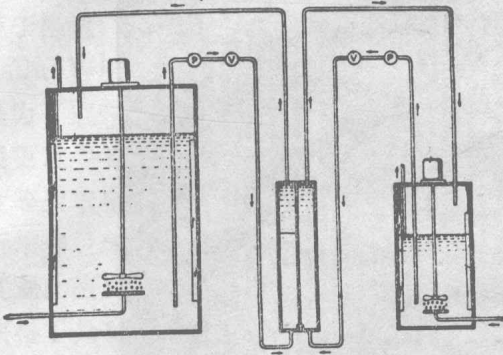


图 2 透析培养瓶(由透析膜隔成上、下两部分)

用 Gerhardt 的透析培养瓶培养同化戊糖的酵母菌 *Mycotorula japonica*, 证实了该菌产生脂肪酸, 因而抑制了该菌的生长。透析培养中使用 $C_8 \sim C_{16}$ 的正烷烃, 特别是正十六烷, 易于利用, 收率也很高。

Gallup 等为了放大透析培养装置, 把培养室与培养槽分开, 当中另置一透析器, 用管道和泵使培养物与培养基在透析器中循环来进行培养, 装置如图 3 所示。他用的透析器是由一种丙烯树脂制成的板框透析器(图4)。在隔离物的前后两面装上透析膜, 再用框子



左一培养室, 中一透析器, 右一培养槽, P—泵, V—阀门。箭头表示培养基和培养物循环方向

图 3 透析器-透析系统

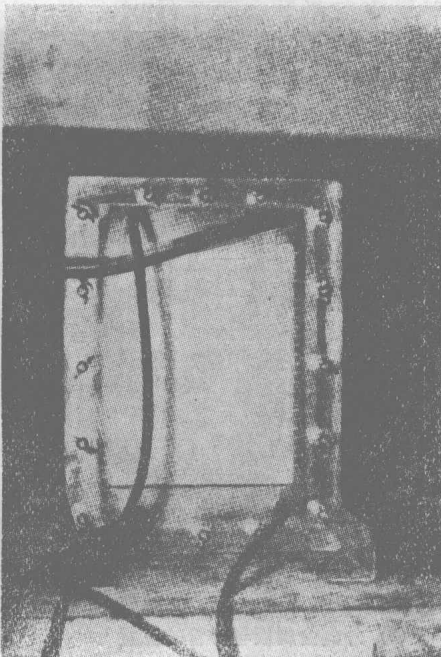


图 4 板框透析器的正面图

把它固定。这样相互交叉组合起来, 其剖视图如图 5 所示。液体流经板框时的情况示于图 6。这个透析器用 3 升培养基, 培养粘质赛氏杆菌(*Serratia marcescens*), 可以获得活菌数为 10^{12} /毫升的高浓度细胞。由于放大培养室和使用多层膜的透析器的出现, 因此将有可能利用透析培养法来培养大量微生物。

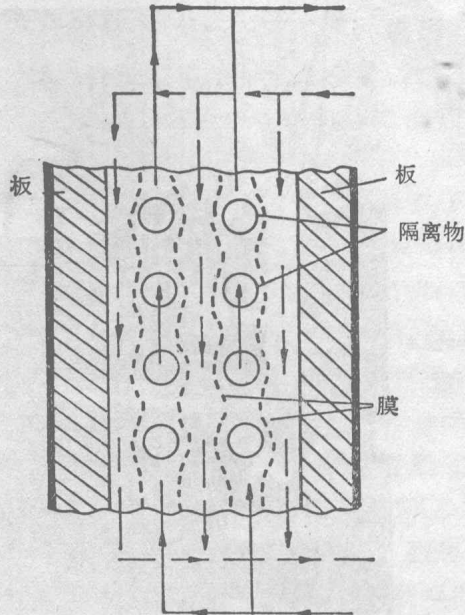


图 5 透析器剖视图

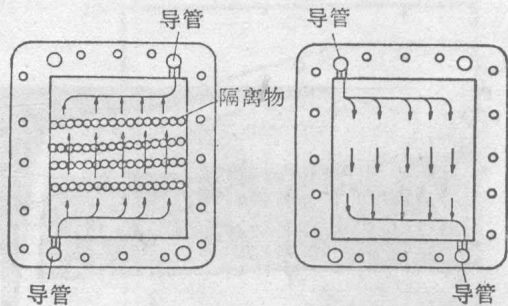


图 6 液流通过透析膜的情况

作者使用图 7 那样的装置, 按 Gallup 的方法, 透析培养同化戊糖的酵母菌 *Mycotorula japonica*。在 5 升发酵罐中加入 2 升 2% 浓度十六烷的限定培养基, 接种培养, 通气量为 1 升/分, 搅拌数为 1, 028 转/分, 用 50 毫升/分流速的定量泵由左侧下面的导管输入。另外在 15 升发酵罐中放入不含十六烷的营养物

10 升, 通气量为 10 升/分, 搅拌数为 300 转/分, 用另一只 50 毫升/分流速的定量泵, 由左侧上部的导管送入透析器使之循环。结果与透析培养瓶相同, 在 15 升发酵罐的营养物中证实存在扩散来的抑制生长的物质。透析培养比非透析培养的菌体量和活菌数都多, 菌的世代时间缩短。

H. E. B. Humphrey 等设计了如图 8 的生物透析器。在硅树脂板上先做许多山形小凸块, 再装上透析膜并用金属网和金属框重迭组合, 最外层用金属板固定。液体循环基本上与 Gallup 等的透析器相同。

田中等报道, 曾重复 Sterne 的通气透析培养实验, 培养流产布鲁氏杆菌 (*Brucella*

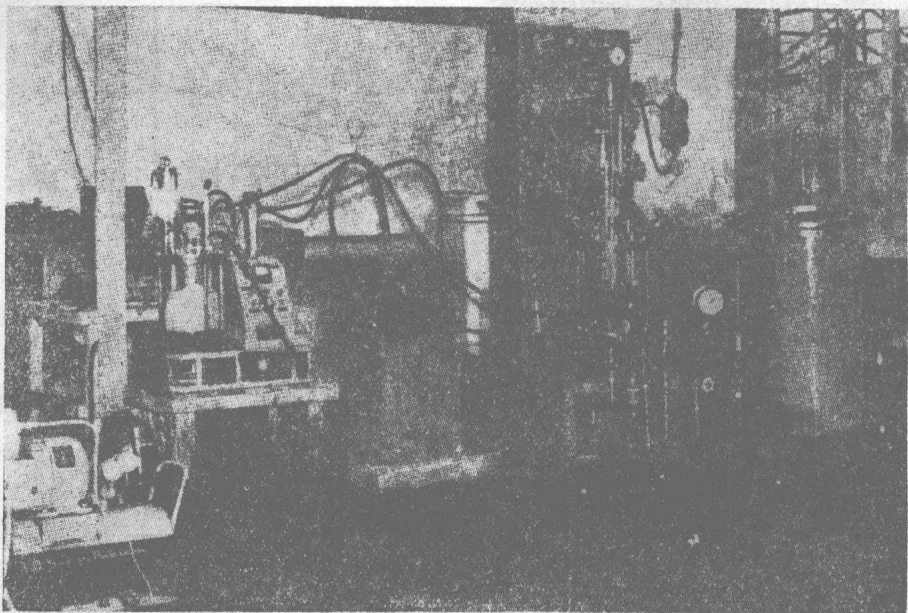
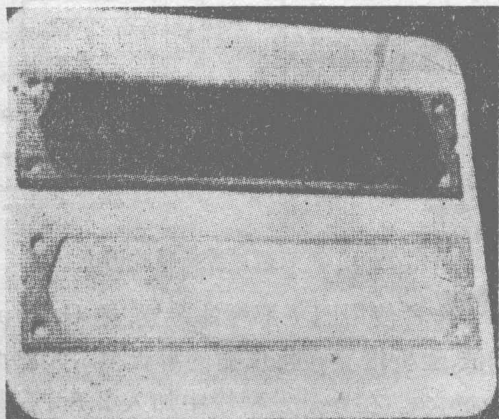
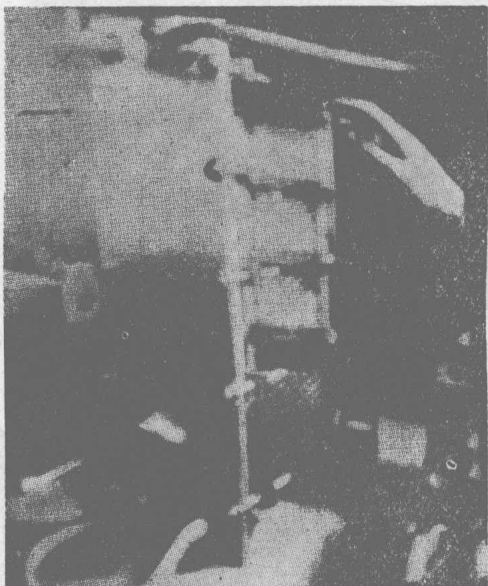


图 7 透析培养装置



(1) 上部为树脂板, 下部为金属框



(2) 外侧金属板与导管的位置

图 8 生物透析器

abortus), 得到 10^{11} /毫升浓度的菌体。这是培养此菌的良好方法。所得菌的抗原与用原来的方法培养的菌无差异。所以此法适用于制造诊断用菌液。

中村等使用类似 Humphrey 等设计的透析装置培养足球菌属 (*Pediococcus soya*), 获得高浓度的活菌。这种透析器是把切成长方形的树脂板框和玻璃纸薄膜重迭, 再用不锈钢板固定。利用膜把小室隔开, 使培养基和培养菌液分别交错定量通过, 在培养室与培养基贮槽之间循环。在装膜时要注意不使膜的透析面减少, 而且要在流液接触时也不至于松弛。上述 Gerhardt 透析器的隔离物和 Gallup 等所制的山形小凸块以及金属网等都是为了这一目的而设计的。而对透析培养来说更重要的还是根据强度、杀菌性和扩散速度等要求来选择适当的透析膜。中村等在透析培养足球菌属 (*Pediococcus halophilus*) 时, 发现此菌具有荚膜, 其透析培养液经沉淀后获得了具有抗原活性的物质。用常规法培养 *Mycoplasma*, 难于达到分析或细菌学试验所要求的浓度, 而 Pollock 报道, 将 *Mycoplasma laidlawii* A 进行透析培养时, 每代世代时间虽不短(约一小时), 但生长活动期延长, 最后收得量为常规法培养的 10 倍, 甚至原来 *Mycoplasma* 不能生长的限定培养基, 用透析培养非但活菌率和收得率都未减少, 还可代替成份复杂的大豆-蛋白胨-酵母浸膏培养基。

S. H. Black 用 Gerhardt 的透析培养瓶成功地进行了 *Bordetella pertussis* 菌的浓缩培养。而用透析共生培养, 又获得了浓度更高的活菌数。在 250 毫升爱尔兰马耶烧瓶构成的双相培养瓶里, 放入 12.5 毫升液体培养基覆盖在 48 毫升 Cohen 和 Wheeler 琼脂培养基上, 接种单相的 *B. pertussis*, 然后置于摇瓶机上, 在 37°C 下培养 24 小时, 再取出 1 毫升接种到 Gerhardt 透析培养瓶上部的 100 毫升 Cohen 和 Wheeler 培养基上。透析瓶的

下部放入 1 升 Cohen 和 Wheeler 培养基, 再用 Visking 纤维素膜将瓶的上、下部隔开。瓶下部用如同培养 *B. pertussis* 的方法将假白喉棒状杆菌 (*Corynebacterium pseudodiphthericum*) 接种。非共生培养实验时, 或者在透析培养瓶的下部不接种(透析培养), 或者用不锈钢片把培养物隔开(对照培养), 然后把培养瓶置于摇瓶机上, 在 37°C 下振荡培养 60 小时, 实验结果示于图 9。不仅透析培养 *B. pertussis* 的浓缩培养成功, 而且透析共生培养比单纯透析培养的收得量还要高得多。*B. pertussis* 和假白喉棒状杆菌 (*C. pseudodiphthericum*) 之间的共生关系尚不了解。Pollock 阐明了共生培养之所以促进生长, 是因为 *B. pertussis* 在生长时释放出的有毒脂肪酸被类白喉(diphtheroid)除去的缘故。而在透析瓶下部放入假白喉棒状杆菌 (*C. pseudodiphthericum*) 的培养滤液, 则 *B. pertussis* 的生长和透析共生培养时的情形相同。*B. pertussis* 的非透析对照培养经 12 小时细胞数达到高峰, 以后便迅速降低。而透析培养或透析共生培养 24 小时以后仍继续生长, 以后仍保持原来水平。另外, 将粘质赛氏杆菌

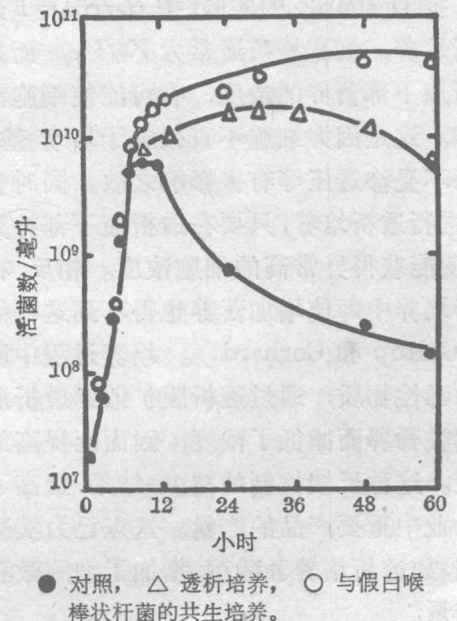


图 9 液体培养 *Bordetella pertussis* 的生长曲线

(*Serratia marcescens*) 进行透析培养时, 其生长也与此相仿。

透析培养的理论研究

为了阐明微生物在透析培养时的生长情况和透析培养的效用, J. S. Schultz 与 Gerhardt 等共同研究了透析培养的理论和实验。认为透析瓶内的细胞浓度与微生物利用的营养量有关。如果细胞生长不被限制的话, 透析培养细胞浓度与非透析培养的细胞浓度之比为:

$$\frac{X_d}{X_{nd}} = \frac{S_d}{S_{nd}} \cdot \frac{V_r}{V_f} \dots\dots\dots (1)$$

X_d 为透析培养瓶上部的细胞浓度(克/厘米³);

X_{nd} 为非透析培养瓶中等容量的细胞浓度(克/厘米³)。

该式比值表示透析培养理论值的最高浓度, 同时还表明, 它依赖于透析瓶下部营养浓度(S_d)(克/厘米³)与非透析瓶内营养浓度(S_{nd})(克/厘米³)之比值, 以及透析瓶下部容量(V_r)(厘米³)与上部培养液容量(V_f)(厘米³)之比值。

据 Gerhardt 的实验, 按 $S_d/S_{nd}=1$ 进行透析培养, 细胞增殖通常为 V_r/V_f 。而提高透析瓶下部营养的浓度, 有可能使细胞浓度增加。这是因为细胞不直接置于培养基中, 因而不受渗透压等有害影响之故。同时也表明, 进行透析培养, 只要在透析瓶下部补充营养, 便能获得异常高的细胞浓度。相反, 在非透析培养中即使增加营养也得不到这样的结果(Gallup 和 Gerhardt)。培养过程中所产生的毒性物质, 通过透析膜扩散到透析瓶的下部被稀释而减低了浓度, 因而能提高细胞浓度。这种反馈抑制的减少, 结果, 提高了发酵工业中重要产品的产量。这点已为实验所证明, 如透析培养乳酸菌, 增加了细胞数和乳酸产量。

有的细菌在进行透析培养时, 细胞收得

率达不到理论值, 这可能是限制细胞生长的内生代谢的影响, 或是通气不足的缘故。克服后者可在瓶内装一挡板或将培养瓶改成广口瓶来提高细胞浓度。

另外, 透析膜的面积不必限制为每100毫升培养液 30 厘米²。因为通气率与膜面积之间的关系涉及到细胞浓度, 所以当改进通气和搅拌后, 为了很好地保持营养物的流动速率, 所以有必要把膜的面积改为每 100 毫升培养液 80 厘米²。由于透析培养中培养物与成份复杂的培养基隔开了, 因此它除能培养出高浓度细胞外, 还适合于生产高分子化合物。用透析膜把瓶分成上、下两部分, 培养基全部装在瓶的下部, 只有低分子的营养进入瓶的上部, 而上部的高分子产物扩散不出来, 因此它不受培养基中相同分子的物质的污染而浓缩。发酵终了时, 只要用适当的方法把高分子产物与细胞和低分子溶质分开即可。后来由于有了分级透析瓶(differential-dialysis flask), 高分子产物的分离和浓缩又改进了。这种装置有三个部分(上面为培养物, 中间为产生物, 下面为培养基), 即在装有透析膜(细孔如 GA-10, 孔径为 0.05 微米)的普通透析瓶中加上一个过滤膜(粗孔如 GA-8, 孔径为 0.2 微米)而制成(图 10)。高分子产物通过过滤膜与细胞分开, 积聚在瓶的中间部分。现在正在试用这种分级透析培养法, 培养产生外毒素的白喉杆菌和葡萄球菌。

还试验过一种多元透析培养方法。它称为“透析器-透析系统”, 是由分开的培养罐、培养基罐和透析器组成的, 通过泵和管道连接, 使培养基和培养物连续地在透析器内循环。这种装置可任意放大应用, 又能分开单独操作。无论是连续培养、分批培养或是两者结合培养都适用。试验结果表明, 分批液体培养, 实际上是不限制生成细胞浓度的。如粘质赛氏杆菌(*Serratia marcescens*)的细胞数中活菌数超过了 10^{12} /毫升, 细胞浓度达到

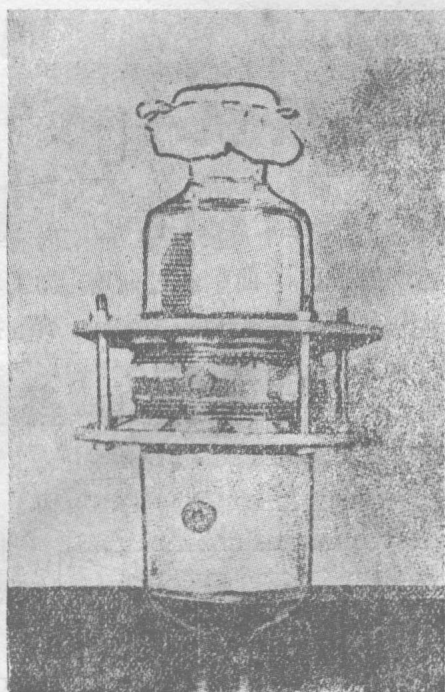


图 10 分级透析培养瓶
(由孔径不同的两个膜隔成三个部分)

全培养液的 50%。在生长周期过后,用吸湿性胶体淤浆吸附培养基罐里剩下的培养基;经过渗透性脱水,可浓缩细胞。葡萄糖通过透析膜的最大流动率,在 100 毫升的透析器的每一个室获得 3 升/分的流速。在这个流速下,单位透析器内停留时间约为 2 秒,所以可认为透析器内的流液与循环液的流速保持一致。当培养好气菌时由于在透析器内或连接管道内都不能进行通气,因此缩短透析器内液体停留时间是非常重要的。另外还对这种多元透析培养的理论也作过探讨。细胞生长率、培养基利用率和透析速度的关系式如下:

$$\text{细胞生长率} \left(\frac{dx}{dt} \right)_G = \mu_m \left(\frac{s}{k_s + s} \right) x$$

$$\text{培养基利用率} \left(\frac{ds}{dt} \right)_G = -\frac{1}{Y} \left(\frac{dx}{dt} \right)_G$$

$$\text{透析速度} \quad N = P_m A_m (s_r - s_f)$$

式中, x 为微生物浓度, s 为基质浓度, t 为时间, μ_m 为最大生长率, k_s 为饱和常数, Y 为收得量常数, P_m 为膜的透过系数(克/分-厘米²克/厘米³), A_m 为膜的面积(厘米²),

G 为生长。

在连续透析培养中(液体流过培养基罐和培养罐时保持稳定),细胞浓度为两个罐中的稀释率与膜面积的函数。细胞浓度不依赖于培养基罐的容量,从分析得到的这个结论是值得重视的。为了要扩大连续透析培养,只要按比例放大膜的面积和培养罐的容量即可。

液体通过培养罐时,在流速低的条件下(稀释率低),细胞数与流速成反比。在这个培养条件下能获得非常高的细胞浓度。这种效果即在低稀释率的情况下逐渐地达到一定的细胞浓度,与普通连续培养是很不相同的。连续透析培养得到的细胞浓度比非透析培养得到的细胞浓度提高 5~10 倍。用同样的稀释率和同样浓度的培养基,与普通连续培养相比较,连续透析培养时影响细胞浓度的变数如下式:

$$\frac{X_d}{X_{nd}} = \frac{1}{F_f \left[\frac{1}{P_m A_m} + \frac{1}{F_r} \right]} + 1 \dots \dots (2)$$

式中, F_f 为流经培养罐的流速(厘米³/分), F_r 为流经培养基罐的流速(厘米³/分), P_m 为膜的透过系数, A_m 为膜的面积。分批培养表明,最终细胞收得量如果不受内生代谢或通气影响的话,则与膜的面积无关;如果营养通过透析膜的扩散限制细胞生长的话,达到一定数量的细胞所需要的时间与膜的面积成反比;倘若细胞生长缓慢,即使放大膜的面积,也不是行之有效的方法。装有连续补充培养基装置的分批培养罐,能获得一定的生长率(即生长与时间成直线关系),其生长率与营养物直接透过透析膜的扩散成正比。在这种装置中使用较稀的培养基,如果培养时间足够长的话,便可得到很高浓度的细胞。对细胞代谢的研究表明,只要变更膜的面积,便能调整细胞生长率,而得一定数值的细胞。

(下转第 12 页)

生物工程中的摇瓶机

摇瓶机是生物学试验和研究中最普通的设备之一。

制药工业中就常常在菌种繁殖、菌种筛选和培养基配方等方面用到摇瓶机。摇瓶运动显著地影响细菌生长条件的均一性。虽然在其固定装置内的运动有时也能提供高产率,但重演性差,有时甚至不可能。因此,固定摇瓶在一定的牢固位置上对细胞的生长是很重要的。

往复式摇瓶机

往复式摇瓶机的转速和冲程对氧的吸收率有显著的影响。例如,冲程为4吋,转速为200转/分钟,氧吸收率可达2.41毫克分子氧/升/分钟;冲程为2吋,转速为240转/分钟,氧吸收率仅达1.25毫克分子氧/升/分钟。由于液体冲出所产生的雾沫,容易使棉花塞潮湿而造成培养基的污染。

旋转式摇瓶机

早期抗菌素发酵最常用的一种旋转式摇瓶机是一个水平盘中心固定在一根传动曲轴上的装置。摇瓶固定在平盘上。平盘的四周用万向接(又称十字接)或弹簧拉牢,以防止平盘倾转(revolving)。此种装置的缺点在于其传递到各摇瓶的振荡运动是不均一的,因此放在平盘四周和中间各摇瓶内所产生的搅拌效果基本上是不相同的。近年来广泛地采用了一种新设计的立式多轴结构的旋转式摇瓶机,这种结构能使盘上所有摇瓶都得到均一的运动。为了提高摇瓶机的转速从而提高氧的吸收率,设计这种新型摇瓶机时必须考虑动平衡。经过动平衡校正的旋转式摇瓶机,其中心有一根主动曲轴,四周有四根从动

曲轴,共同支承一个旋转框架,框架内有一块固定摇瓶的平盘。曲轴经过研磨,加工精密度达0.0002吋,轴承座的中心距必须维持在0.0005吋以内。

动平衡是通过正确选定固定在主轴上的重量和位置而达到如图1所示。

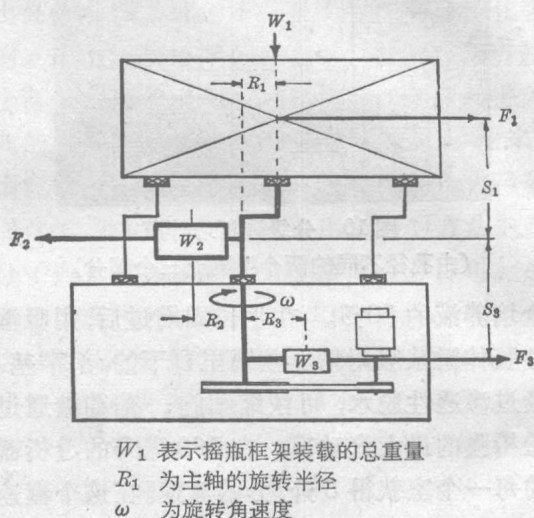


图1 旋转式摇瓶机动平衡的示意图

旋转框架及其载重所产生的离心力为:

$$F_1 = \frac{W_1 \omega^2 R_1}{g} \quad (1)$$

W_2 与 W_3 为固定在框架下面主轴上的两个重量;

W_2 产生与 F_1 相反的离心力 F_2 ;

W_3 产生的 F_3 则用以消除由于 F_1 与 F_2 所产生的离心力偶。

为了达到动平衡,必须满足下列力的方程式:

$$F_1 + F_3 = F_2 \quad (2)$$

由于整个系统的旋转角速度均为 ω , (2) 式又可以重量表示之, 即

$$W_1 R_1 + W_3 R_3 = W_2 R_2 \quad (3)$$

用以消除离心力偶所需的重量 W_3 ，取决于它与总平衡重量的垂直位置、转动半径及离心力偶的大小。即必须满足下列关系式：

$$F_1 S_1 = F_3 S_3 \quad (4)$$

$$\therefore F_3 = \frac{F_1 S_1}{S_3}$$

式中， S_1 表示 F_2 至 F_1 的垂直距离； S_3 表示 F_2 至 F_3 的垂直距离。

这种摇瓶机已定型的有旋转直径（或称冲程）为 0.5 吋（12.7 毫米）、0.75 吋（19 毫米）、1 吋（25.4 毫米）和 2 吋（50.8 毫米）四种。转速可随意调节，最高可达 800 转/分钟。

在这种摇瓶机上，用具有各种挡板的 300 毫升和 500 毫升的三角摇瓶进行比较试验，并且还将摇瓶以不同倾斜程度固定之。例如垂直固定或分别与垂直线作 15° 、 30° 和 45° 倾斜固定，进行比较。其结果示于图 2 和图 3。

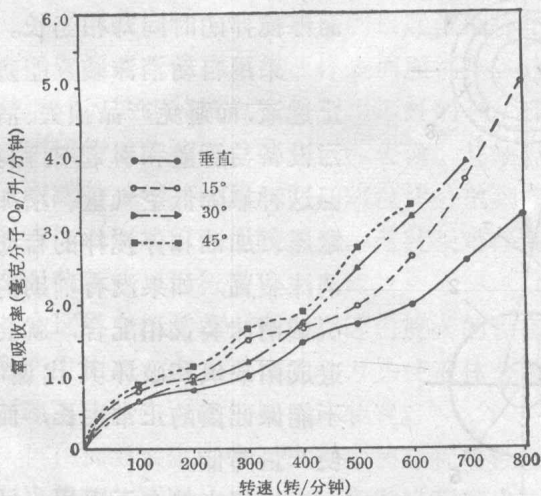


图 2 转速和摇瓶角度对氧吸收率的影响

图 3 表示转速在 500 转/分钟和具有各种挡板条件下的，氧吸收率与实装培养基 10 升的具六叶涡轮搅拌器的发酵罐（空气量为培养基的 1.6 容积，转速为 1,000 转/

分钟）的数值一样。在 3,000 毫升以下的三角摇瓶的试验结果表明：摇瓶愈小，氧吸收率愈高，值得注意的是世界各国最常用的 250 毫升三角烧瓶的氧吸收率反而最低（图 4）。

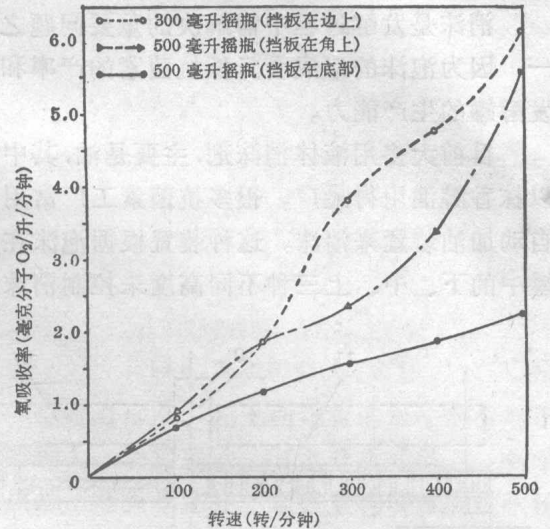


图 3 转速与挡板的位置对氧吸收率的影响

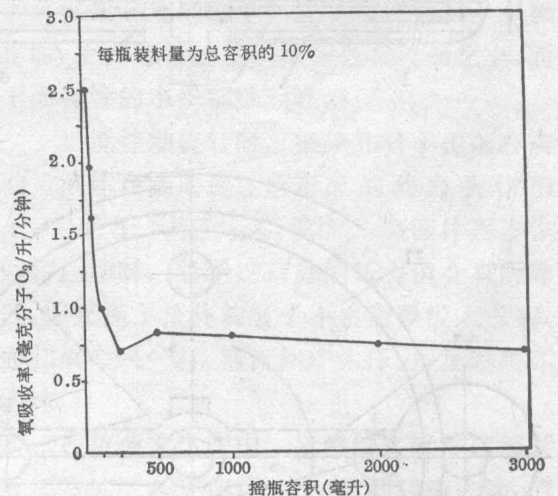


图 4 摇瓶的大小对氧吸收率的影响

由于利用摇瓶机可能获得与习用的搅拌发酵罐相比较的氧吸收率。这就必然使摇瓶机成为放大过程中的一种更有价值的工具。

摘译自《Process Biochemistry》
4(3):35~40(1969)

发酵过程中的机械消沫

消沫是发酵过程中需解决的重要问题之一，因为泡沫的形成会降低抗菌素的产率和发酵罐的生产能力。

目前大多用液体消沫剂，主要是油，其中以抹香鲸油用得最广。很多抗菌素工厂常用自动加油装置来消沫。这种装置根据泡沫在罐中的下、中、上三种不同高度来控制消沫

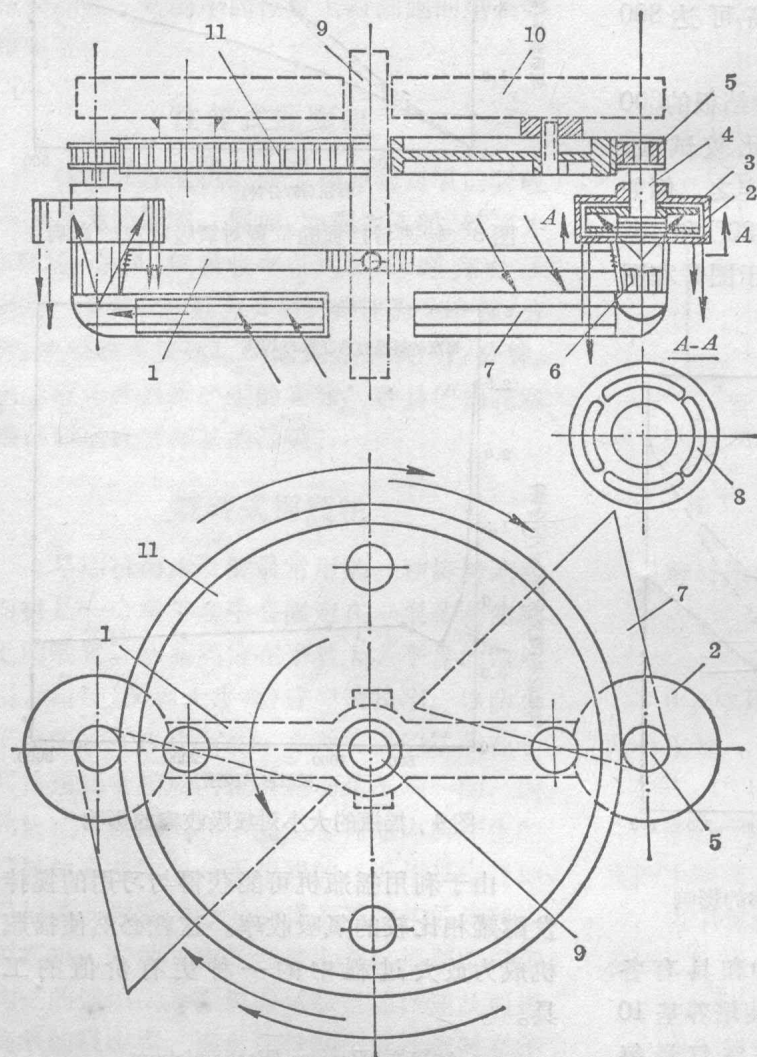
(后者是最大允许高度，超越此高度，就会有发酵液溢出)。

自动消沫装置的操作方式如下。当泡沫升到下面控制高度时，开始每隔一定时间，加入一点油，一直到泡沫降低到控制高度以下。如泡沫继续上升，而达到中间控制高度时，排气管就关闭，罐压增加，以使泡沫减少。

但这些措施不足以完全消沫，泡沫常常很快地达到第三个高度，即最大控制高度，此时搅拌停止，而通入空气的量降到最低。于是泡沫慢慢下降，而后重新开动搅拌，通入空气量也增大。但在发泡最激烈的一段时间内，搅拌开动的时间比较短，而停搅拌的时间却相当长。

采用自动消沫装置能防止逃液，而避免产品损失、沾污设备与管道和引起染菌。但这种靠降低空气量、增加罐压、加油和停搅拌的自动消沫装置，如果没有辅助的机械消沫装置相配合，就会造成菌缺氧和破坏其代谢，不能保证菌的正常生长，而使产量降低。

近年来趋向于采用机械消沫和物理化学方法消沫相结合。实践表明，用这种方法，只要用有限的化学消沫剂，就能把坚固、有弹性的泡沫除去或稳定在一定高度。



上图为正视图，下图为顶视图
图1 涡轮机械消沫装置

下面介绍两种新型机械消沫装置。

两种机械消沫装置

第一种消沫装置(图 1),包括框架 1, 两端对称地装有壳体 2, 其内有涡轮 3, 涡轮装在轴 4 上, 轴 4 上端装有行星齿轮 5。壳体以其下部和吸入管 6、泡沫收集器 7 相连。壳体底部开有孔 8。框架 1 连壳体装在搅拌轴 9 上。

在发酵罐顶盖 10 的内表面上, 连有固定齿轮 11, 后者和行星齿轮 5 相连。

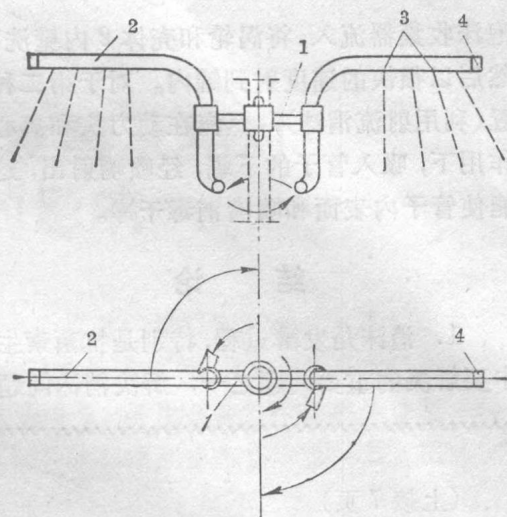
当搅拌轴转动时, 框架和壳体 2 也随着转动, 行星齿轮也随着固定齿轮而滚动, 于是带动涡轮, 而泡沫经泡沫收集器和吸入管吸入壳体中。当将泡沫甩出和壳体壁相碰时, 泡沫就破坏, 液体从孔 8 流入发酵液中。

消沫的原因有两个方面: 一方面由于泡沫受到离心碰撞作用; 另一方面是由于从吸入管流经涡轮翼子的通道时, 速度很快, 而使静压头急速降低的缘故。

第二种机械消沫装置是利用起泡液体本身以射流形式喷到起泡液体表面而消沫。这种形式的消沫装置过去是利用罐外的泵, 通过附属管道将液体分散到泡沫表面。其缺点是在罐外必须装一泵, 同时将液体分散到起泡液体表面的管道也较复杂, 这就很难保证在无菌条件下进行操作。

这里介绍的是一种利用罐内旋转的设备所产生的离心力和液体的动力头使液体分散到起泡液体表面的机械消沫装置。

在抗菌素生产中, 由于生物过程的性质和培养基的不同, 泡沫性质和发泡程度也不一样, 要打碎气泡的膜所需的射流的力也不相同。现介绍的消沫装置(图 2), 在构造上有如下的特点, 即改变装置的尺寸和转速, 能得到所需的射流力。该装置包括框架 1, 其上对称地装有两根管子 2, 每根管子有两个弯管, 分布在两个平面上, 而形成一个水平和



上图为正视图, 下图为顶视图

图 2 射流机械消沫装置

一个垂直部分。在上面弯管的水平部分的下部焊上一块厚扁铁, 其上开有喷嘴 3。管子顶端用塞头 4 塞住。扁铁上喷嘴按棋盘状排列。下面弯管的水平部分与垂直部分成一角度, 以便吸入液体。

框架 1 连同管子一起装在搅拌轴上。操作时, 上面弯管的水平部分处在液面之上, 而下面弯管的水平部分则在液面下。

当搅拌轴旋转时, 框架和管子也随着转动。液体在圆周速度所形成的动力头作用下, 经管子下端而注满管子。当液体逐步作回转运动时, 管子进口处的压力值会有所降低, 但充满了液体的管子不再需要汲入水头, 而和离心泵一样, 液流能产生压力, 足以破坏泡沫。

在抗菌素生产中, 发酵罐在操作前须做好细致的准备工作(将上一批的残渣去除, 清洗, 并用蒸汽消毒)。因此机械消沫装置应该是容易清洗的。例如, 在第一种机械消沫装置中(图 1), 吸入管 6 连同泡沫收集器 7 和壳体 2 的底面容易拆下。在第二种机械消沫装置中, 塞头 4 可以取下, 以便用软性钢索的刷子很容易将它冲洗干净。

附有机机械消沫装置的发酵罐, 用蒸汽消毒时, 应开动搅拌。对于第一种装置, 蒸汽从

泡沫收集器流入,将涡轮和壳体2内壁洗净,然后以很快的速度射到罐内。对于第二种装置(利用射流消沫),蒸汽在动力头和离心力作用下,吸入管子的下端,经喷嘴射出,这样能使管子内表面和喷嘴消毒干净。

结 论

1. 消沫是发酵过程,特别是抗菌素生产中要解决的重要问题之一,解决消沫问题能

(上接7页)

以上是根据典型的微生物代谢进行的理论探讨。这只是为透析培养的研究和实验提供实质性的参考意见,在数量方面可能会有出入。

结 束 语

上面叙述了透析培养,包括不使用透析膜的固-液双相培养。利用透析培养可进行含高浓度细胞的浓缩培养,菌体收率高,这已为培养各种细菌和酵母菌所证实。此外也发现,透析培养中还有细胞外酶和毒素等高分子产物蓄积。用碳氢化合物作为培养基进行透析培养时,由于碳氢化合物不能透析,而把它和培养物一道加入培养瓶的上部,只把营养物质加入培养瓶的下部,这样反而有利于研究微生物利用碳氢化合物的情况。

进一步提高产率和发酵罐的生产能力。

2. 应用油类和化学消沫剂,如不和机械消沫装置相配合,则不能确保产生菌的正常生长。将两者配合起来使用,消沫效果最好。

3. 所述机械消沫装置的效力很好。射流消沫装置的结构尤其简单。

译自《Антибиотики》16(10):907~911
(1971)

近年来研究微生物利用碳氢化合物的发酵已引起注意。现已明确,由于培养同化戊糖的酵母菌 *Mycotorula japonica* 时产生脂肪酸,而抑制了菌体生长。采用透析培养,则可使抑制菌体生长的毒性物质扩散到透析膜外面的液体中,从而改善了培养物对碳氢化合物的同化作用。

在石油蛋白的生产中,营养盐的费用约占全部费用的30%,看来再度使用剩有营养盐的培养基似乎是合理的。但是若再度使用这种培养基,会给微生物带来毒害。这种有毒物质也许与著者所称的抑制生长的物质是一致的。希望今后在微生物利用碳氢化合物代谢氨基酸、有机酸和抗菌素等的生产与研究中使用透析培养。同时也希望能在微生物混合培养系统的生态分析方面应用透析培养。

译自《醸酵協会誌》27(2):9~17(1969)

现代工业微生物发酵及其对 技术发展的影响

[摘要] 由于发酵的许多新方法和新技术的发展,用微生物生产主要的和次生的代谢物不仅大大扩大了,而且在许多方面已经简化了,因此,有可能广泛的工业化。本文追述了主要的发酵方法及设备类型,并指出向连续发酵及增强自动化方向发展的趋向,同时阐述了在动物细胞培养或产生电能以及特别是用微生物生产蛋白质等方面的一些新进展。

主要代谢物的分离

几千年来,人们竭力用最适合微生物需要的各种方法和专门技术来研究控制微生物培养的装置。随着大量微生物的发现及其许多生物化学性能的阐明,证实适用于今天的培养方法是十九世纪末和二十世纪初发展起来的。培养是在开口或封闭的发酵罐中进行的,一般对外来微生物没有预防措施。生长条件尽可能保持只使所需要的微生物发育。发酵过程的主要目的是生产细胞本身,如生产酵母或是生产它的主要代谢物(乙醇、丁醇、丙酮、甘油及许多简单的有机酸)。简单地说,工业微生物的最初阶段可看作是制取主要的代谢物,即起始于制取酒精饮料或有机酸,该阶段直到本世纪的中叶。

次生代谢物的分离及衍生出来的方法

青霉素是重要的次生代谢物,需要量极大。它的生产导致了发酵新方法的发展,这些新方法可以总称为无菌通气沉浸发酵,与已知的极为费力的无菌表面法相比是简化了,即微生物在恒定条件下,生长于通气和搅拌的培养液,而无外来微生物污染的可能性,发酵罐的有效容量为 50,000~250,000 升。

在发展这些方法中克服的困难和采用的方法:

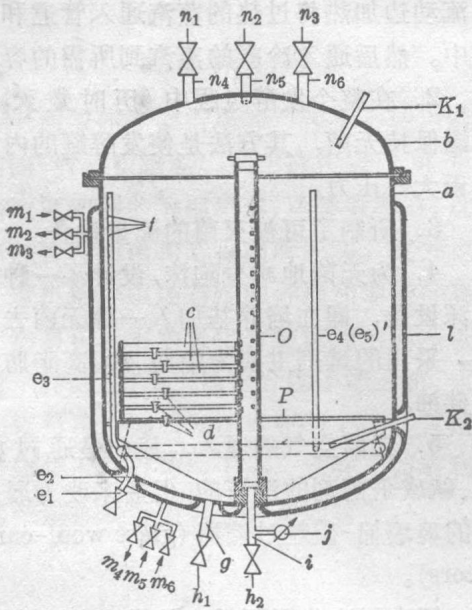
1. 发酵罐和营养液的灭菌是使培养液边流动边加热将过热的蒸汽通入管道和发酵罐中。然后通入冷凝的蒸汽到所需的容量。
2. 在整个发酵过程中(历时数天),发酵罐保持无菌,其方法是使发酵罐的内压稍高于大气压力。
3. 研制了可被灭菌的测量设备。
4. 为无菌地减少泡沫,设计了一种自动消沫设备,即在培养基加入一种无菌去沫液体。采用的试剂主要为脂肪、油、高脂肪族醇及硅油。
5. 无菌空气的通入,最初是通过盛有酸、碱或杀菌剂的洗塔的,但后来改为通过无菌的玻璃棉-碳粒过滤器(glass wool-carbon filters)。

解决了这些问题后,使微生物适合于沉浸发酵培养。为微生物生产其他许多次生代谢物提供了发酵方法。随着产物的多样化,包括抗菌素、酶、生物碱、多糖、核苷酸、赤霉素以及维生素,就需要设计新的发酵罐,从而又导致了多种发酵罐的发展。

当然,微生物发酵法的进一步发展,并不停止在沉浸发酵法上。实际上对微生物培养在沉浸发酵条件下的实验室振荡器的制造也

引起了重视。除了根据一般原理设计的几种(如恒温调节,一定的振荡速度等等)之外,还出现了崭新的设计,由于通用振荡器的重心不适当,使几个平台的稳定发生困难。为此,Infors AG(巴塞尔-瑞士)作了新的设计,其驱动的作用点正好在移动上部的重心上使之平衡。

对表面发酵法也做了进一步研究,这种方法对于制取某些产物依旧是需要的。Schröder 和 Brandl 阐述的一种用于表面培养的发酶盘方法即为一例,这种无菌通气的表面发酵法,可使许多费力的操作合并和实现自动化,例如培养基的自动加料、表面生长盘的自动灭菌(利用沉浸发酵法中的经验),整个溶液接种简单,可以无菌通气,而且温度控制简单(图1)。



a—容器; b—盖; c—可更换的发酶盘; d—溢流装置; e~e₅—通气装置; f—空气出口孔; g—出料管; h₁, h₂—阀; i—除气管; j—压力计; k₁, k₂—温度计管; l—夹套(double wall); m₁~m₆—热蒸汽阀(m₁, m₄)、冷水阀(m₂, m₅)及循环水阀(m₃, m₆); n₁~n₆—营养物进料; o—多孔中间管; p—多孔底

图1 发酵盘容器的纵向截面

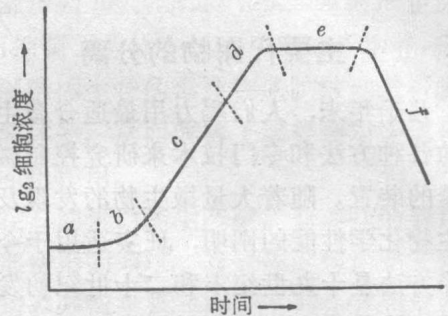
间歇沉浸发酵的动力学

在具有微生物的稳定生长条件后,才可

能获得沉浸发酵过程动力学的确实知识。大约自1946年起,特别是从1954年起,发表了许多有关文章。

微生物在发酵罐中的发育图

发酵罐中的微生物能大大地延长对数生长阶段,从而可缩短培育时间(图2),而在一般微生物的培养中必须要有很长的培育时间。微生物的发酵,特别受培养基的消耗、最终产物的产生以及生物数量发展的影响和限制。培养基的运动、通气、中间产物的积累和消失以及其他较易保持恒定的因素,如温度和pH值的变化对微生物发酵均极为重要。



各种发育阶段: a—培育阶段, b—加速阶段, c—对数生长阶段, d—转化阶段, e—静止阶段, f—衰死阶段

图2 细菌生长曲线

发酵产物的生成图

发酵可根据各种规则分类。由E. L. Gaden 和 F. H. Deindorfer 提出的一种分类似乎是合理的,即将之分为三类:

第一类: 主要发酵产物由基本的能量代谢作用而生成,且经常在直接氧化基本碳水化合物时生成,如酒精发酵或从葡萄糖生成乳酸。许多微生物细胞的大量培养也应视为这类发酵[图3(a)]。

第二类: 主要发酵产物仅间接地由能量代谢作用而生成,如衣康酸和柠檬酸的生成;氨基酸的发酵也可属于这一类。这类反应步骤复杂,产生抑制或反常的代谢。图3(b)列示了生长和糖消耗有两个高峰。特殊的产量曲线[图3(c)]表示出在起始阶段生长和糖消