

The Periodic Intensification

Principles and Applications in Fermentation Process

发酵过程外界周期作用 ——原理与应用

陈洪章 著



化学工业出版社

The Periodic Intensification

Principles and Applications in Fermentation Process

发酵过程外界周期作用 ——原理与应用

陈洪章 著



化学工业出版社

· 北京 ·

图书在版编目 (CIP) 数据

发酵过程外界周期作用——原理与应用/陈洪章著. —北京: 化学工业出版社, 2011. 10
ISBN 978-7-122-12292-6

I. 发… II. 陈… III. 发酵工程 IV. Q81

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2011) 第 184793 号

责任编辑: 傅四周
责任校对: 王素芹

文字编辑: 焦欣渝
装帧设计: 史利平

出版发行: 化学工业出版社 (北京市东城区青年湖南街 13 号 邮政编码 100011)
印 刷: 北京永鑫印刷有限责任公司
装 订: 三河市万龙印装有限公司
710mm×1000mm 1/16 印张 10 字数 190 千字 2012 年 1 月北京第 1 版第 1 次印刷

购书咨询: 010-64518888 (传真: 010-64519686) 售后服务: 010-64518899
网 址: <http://www.cip.com.cn>
凡购买本书, 如有缺损质量问题, 本社销售中心负责调换。

定 价: 49.00 元

版权所有 违者必究

前言

PREFACE

发酵是生物技术产品生产的关键过程，生物反应器是生物技术产品得以商业化生产的关键装备，但是这些发酵和发酵设备的优化和放大从 20 世纪 40 年代以来基本上是沿用化工放大的理论和手段，这些理论和手段没有考虑到微生物和细胞所具有的生命特征，因而，其应用效果差，在对工艺和设备进行优化和放大时难以取得理想效果，“优化和放大是一门艺术而远非科学”。最近的研究使研究者逐渐达到这样的共识：细胞生理特性和传递特性相结合进行研究才是生物过程优化和放大的研究方向。但是，需要回答一个关键问题：细胞的生理特性和传递特性如何结合？是通过传统的剪切力还是法向力？通过我们的研究和思考，以法向力为基础的周期作用力和细胞生理特性相结合用于生物过程优化和放大的理论和手段逐渐形成。在本书中，我们想从以下几个方面详细展开以阐述这一理论及其应用。

1. 发酵过程原理：回顾经典的微生物生理、代谢、调控、分析理论和手段。

2. 外界工程强化生物反应与传递过程原理：从传统的剪切力和新奇的法向力（周期作用力）两方面进行对比。

3. 发酵过程周期作用原理的提出：回顾我们在建立这一理论的前期思考、理论来源、理论的形成过程、代表性的反应器设计。

4. 发酵工程周期作用原理解析：以大量的研究数据为基础，以周期作用力对发酵过程的方方面面的影响为主要内容，向读者展示周期作用力对发酵的影响。

5. 发酵工程周期作用原理应用：向读者展示这个原理在过程优化、过程放大和反应器设计方面的作用。

作者在此领域二十几年工作的成效，得益于中国科学院过程工程研究所给予宽松自由的学术氛围，使本人全身心投入到科研之中；作者在该领域的研究得到了国家重点基础研究发展计划（973 计划：2004CB719700、2011CB707400）和中国科学院知识创新工程重要方向性项目（KSCX1-YW-11A 和 KGCX2-YW-328）的资助。另外，我

的二十几位研究生的研究工作对本书编写作出了重要贡献，特别是参考了李宏强博士、李燕军博士、张志国博士、彭小伟博士、段颖异硕士、张玉针硕士的学位论文，他们也参与了本书中部分章节写作和许多文字工作。在本书编写过程中，参考了大量国内外前辈和同行们撰写的书籍和期刊论文资料，在此一并表示衷心的感谢。

书中有不当之处，诚请读者批评指正，并欢迎来函指导。

陈洪章

2011年11月

于北京市中关村北二条1号(100190)

中国科学院过程工程研究所生化工程国家重点实验室

E-mail: hzchen@home.ipe.ac.cn

目 录

CONTENTS

第 1 章 绪论	1
1.1 发酵工业的发展历史	1
1.1.1 传统发酵技术	1
1.1.2 第一代微生物发酵技术	1
1.1.3 第二代微生物发酵技术	2
1.1.4 第三代微生物发酵技术	3
1.2 发酵调控的理论基础	3
1.2.1 微生物的代谢类型和自我调节	3
1.2.2 酶活性调节	4
1.2.3 能荷调节	11
1.2.4 代谢系统的分子调控机制	12
1.2.5 代谢调节	14
1.2.6 次级代谢与次级代谢调节	16
1.2.7 代谢工程	17
1.3 微生物生理与代谢产物过量表达	21
1.3.1 微生物正常的代谢特征	21
1.3.2 微生物生理与过量表达的关系	23
1.3.3 发酵工程与微生物生理的关系	24
1.4 代谢流分析技术	25
1.4.1 化学当量代谢流分析	25
1.4.2 ^{13}C 代谢流分析	29
1.5 发酵调控理论的局限性和发展方向	35
1.5.1 发酵调控理论的局限性	35
1.5.2 发酵调控理论的发展方向	37
第 2 章 强化过程传递原理	39
2.1 过程强化	39

2.2	生物过程强化	41
2.3	剪切力对生物过程的影响	43
2.3.1	剪切力	43
2.3.2	剪切力对微生物发酵的影响	44
2.3.3	剪切力对动物细胞培养的影响	44
2.3.4	剪切力对植物细胞培养的影响	46
2.4	法向作用力对生物过程的影响	47
2.4.1	法向力	47
2.4.2	法向力强化生物过程	47

第3章 发酵过程周期作用原理的提出——51

3.1	周期现象的普遍性	51
3.2	典型的生物周期现象	52
3.2.1	生物的光周期	52
3.2.2	人体的周期节律	54
3.3	代谢周期振荡	56
3.3.1	酶振荡反应	56
3.3.2	钙振荡	58
3.4	生物反应系统中周期振荡现象与周期作用力	62
3.4.1	糖酵解振荡	66
3.4.2	代谢周期振荡的理论分析——非平衡非线性理论	66
3.5	生物周期节律与代谢网络调控	67
3.5.1	生物周期节律及外界刺激对生物的影响	67
3.5.2	生物周期节律机制	68
3.5.3	微生物的周期节律与代谢网络调控	69
3.6	发酵过程周期刺激理论的提出	72

第4章 发酵过程周期作用原理解析——75

4.1	周期作用对于发酵过程的宏观影响	75
4.1.1	气相周期刺激对于固态发酵培养基的影响	75
4.1.2	磁场对于微生物生长过程的影响	77
4.1.3	底物浓度脉冲对于微生物生长过程的影响	78
4.1.4	pH 脉冲对于微生物生长过程的影响	79

4.1.5	温度脉冲对于微生物发酵过程的影响	80
4.1.6	超声波对微生物发酵的影响	82
4.2	周期作用对于蛋白表达数量和种类的影响	83
4.2.1	压力脉动周期刺激对固态发酵微生物蛋白质的 影响	83
4.2.2	用 SDS-PAGE 电泳研究周期刺激对微生物蛋白 表达的影响	85
4.2.3	动态磁场对于微生物蛋白质表达的影响	86
4.3	周期作用对于微生物关键酶活力的影响	87
4.3.1	气相周期刺激对己糖激酶的影响	87
4.3.2	气相周期刺激对 ATPase 的影响	89
4.3.3	间歇通气对微生物关键酶活的影响	92
4.4	周期作用对微生物呼吸的影响	93
4.4.1	强制通风固态发酵微生物的呼吸特点	94
4.4.2	气相双动态固态发酵微生物的呼吸特点	95
4.4.3	气相周期刺激对于微生物呼吸强度的影响	99
4.4.4	气相周期刺激对于微生物呼吸商的影响	105

第 5 章 周期作用过程优化 108

5.1	发酵过程周期作用过程优化原理	108
5.2	基于微生物代谢物质需求的周期操作优化	109
5.2.1	碳氮源周期补充	110
5.2.2	矿物盐周期补充	112
5.2.3	特殊营养成分周期性补充	112
5.3	针对微生物发酵环境的周期作用	113
5.3.1	变压操作	113
5.3.2	变温操作	115
5.3.3	pH 改变	118
5.3.4	通氧速率改变	120
5.4	基于环境胁迫的周期作用过程优化	121
5.4.1	低速超声波周期作用原理及过程优化	122
5.4.2	交变磁场周期作用原理与优化	124
5.4.3	交变电场	125
5.4.4	微波	126
5.5	周期作用生物反应器设计	126

5.5.1	双环流气升式发酵反应器	127
5.5.2	气相双动态固态发酵反应器	128
5.5.3	填充床反应器的法相作用操作	132
5.5.4	磁场强化发酵反应器设计	133

第 6 章 周期作用原理应用新方向———— 135

6.1	用于菌种筛选	135
6.1.1	自发突变与育种	135
6.1.2	诱变育种	136
6.1.3	杂交育种	136
6.1.4	原生质体融合	137
6.1.5	基因工程	137
6.1.6	从病态微生物到易调控微生物	138
6.2	展望	139

参考文献———— 140

第 1 章

绪 论

1.1 发酵工业的发展历史

1.1.1 传统发酵技术

人类利用微生物的代谢产物作为食品和医药，已有几千年的历史。原始人从含糖的果实储藏发酵学会了酒精发酵。公元前 4000～前 3000 年，古埃及人学会了酒和醋的酿造方法。大约在公元前 2000 年，古希腊人和古罗马人已会利用葡萄酿造葡萄酒。公元前 3 世纪古巴比伦居民利用谷物酿造某些品种的啤酒。随后，发明出用烘焙的“啤酒面包”酿造的黑啤酒，以及加入了红花和各种植物果实作为香料的啤酒。而且许多啤酒的酒精含量达到 12%～15%。

据考古证实，我国在距今 4200～4000 年前的龙山文化时期已有酒器出现，公元前 1000 年前，商朝甲骨文中就有“醋、酒”的记载。北魏时期《齐民要术》记录了我国劳动人民已能用麴制造饴糖，用散曲中的黄曲霉的蛋白分解能力和淀粉糖化能力制造酱和醋等。属于传统的微生物发酵技术产品还有酱油、泡菜、奶酒、干酪等，此外还有面团发酵，粪便和秸秆的沤制，用发霉的豆腐治疡等技术。但那时候人们并不知道微生物与发酵的关系，因而很难人为控制发酵过程，生产也只能凭经验，口传心授，所以这个时期也被称为天然发酵时期^[1]。

1.1.2 第一代微生物发酵技术

1680 年，荷兰人安东尼·列文虎克（Anthony Leeuwenhoek）制成了放大率为 40～150 倍的显微镜，第一个通过显微镜观察到用肉眼看不到的微生物，包括细菌、酵母等。1857 年法国著名生物学家路易斯·巴斯德（Louis Pasteur）用巴氏

试验证明了酒精发酵是由活酵母引起的,各种不同的发酵产物是由不同的微生物产生的。1897年德国的爱德华·毕希纳(Eduard Buchner, 1907年诺贝尔奖得主)将酵母细胞磨碎,得到的酵母汁仍能使糖液发酵产生酒精,他将这种具有发酵能力的物质称为酒化酶。在这之后,德国人罗伯特·科赫(Robert Koch, 1905年诺贝尔奖得主)首先发明固体培养基,得到了细菌的纯培养物,由此建立了微生物的纯培养技术。这就开创了人为控制发酵过程的时期,再加上简单密封式发酵罐的发明,发酵管理技术的改进,发酵工业逐渐进入了近代化学工业的行列。这时候的产品有酵母、酒精、丙酮、丁醇、柠檬酸(表面培养)、淀粉酶(表面培养)、蛋白酶(表面培养)等,主要是一些厌氧发酵和表面固体发酵产生的初级代谢产物。这些产品的生产过程较为简单,对生产设备的要求不高,规模一般不大^[2]。

1.1.3 第二代微生物发酵技术

1928年英国细菌学家亚历山大·弗莱明(Alexander Fleming, 1945年诺贝尔奖得主)发现能够抑制葡萄球菌的点青霉(*Penicillium notatum*),其产物被称为青霉素,而当时弗莱明的成果并没有引起人们的重视。20世纪40年代初,第二次世界大战中对于抗细菌感染药物的极大需求,促使人们重新研究了青霉素。经过多年的发展,在1945年大规模地投入生产。同时由于采用了深层培养技术,即机械搅拌通气技术,从而推动了抗生素工业乃至整个发酵工业的快速发展。随后链霉素、氯霉素、金霉素、土霉素、四环素等好氧发酵的次级代谢产物相继投产。经过半个多世纪的发展,不仅抗生素产品的种类在不断增加,发酵水平也有了大幅度的提高。以青霉素为例,发酵的效价单位从最初的40U/mL提高到目前的90000U/mL,菌种的活力提高了2000倍以上。在产品分离纯化上,由最初的20%左右,得率约35%,提高到现在的纯度99.9%,得率90%。

抗生素工业的发展很快促进了其他发酵产品的出现。如20世纪50年代氨基酸发酵工业,在引进了“代谢控制发酵技术”后,得以快速发展,即将微生物通过人工诱变,获得代谢发生改变的突变株,在控制条件下,选择性地大量生产某种人们所需的产品。这项技术也被用于核苷酸、有机酸和抗生素的生产中。又如20世纪60年代,发现许多石油及其石油产品可以替代糖质原料进行发酵,而出现了石油发酵。已开始用醋酸为原料发酵生产谷氨酸、赖氨酸等氨基酸,利用正构石蜡发酵生产柠檬素等有机酸及单细胞蛋白。同时也有抗生素、酶制剂、辅酶和维生素等的石油发酵研究。可以说,这是一个近代发酵工业的鼎盛时代。新产品、新技术、新工艺、新设备不断出现,应用范围也日益扩大,如广泛用于能源开发、环境保护、细菌冶金和石油勘探等^[1]。

1.1.4 第三代微生物发酵技术

1953年,美国的詹姆斯·杜威·沃森(James Dewey Watson, 1962年诺贝尔奖得主)和弗朗西斯·克里克(Francis Crick, 1962年诺贝尔奖得主)发现了DNA双螺旋结构。1973年,美国加利福尼亚大学旧金山分校的Herber Boyer和斯坦福大学的Stanley Cohen将两个质粒用EcoR I酶切后,在连接酶存在的条件下连接起来,获得了具有两个复制起始位点的杂合质粒,并转化大肠杆菌。尽管他们的实验没有涉及任何目的基因,但意义却极为深远,为基因工程的理论和实际应用奠定了基础。此后很快全世界各国的研究人员发展出大量基因分离、鉴定和克隆的方法,不但构建出高产量的基因工程菌,还使微生物产生出它们本身不能产生的外源蛋白质,包括植物、动物和人类的多种生理活性蛋白,而且很快形成了产品,如胰岛素、生长激素、细胞因子及多种单克隆抗体等基因工程药物和产品^[1]。

1.2 发酵调控的理论基础

工业生物过程与传统化工过程的根本区别,在于工业微生物细胞具有生理活性及代谢的多样性。

微生物在生长过程中机体内的复杂代谢过程是相互协调和高度有序的,并对外界环境的改变能够迅速作出反应。其原则是经济合理地利用和合成所需的各种物质和能量,使细胞处于平衡生长状态。微生物细胞内外环境的统一是通过代谢调节的方式来实现的。代谢调节的方式多种多样,主要包括反馈抑制、反馈阻遏、酶的诱导调节、酶的共价修饰等。

在实际生产中,往往要高浓度地积累某一种代谢产物,而这个浓度又常常超过细胞正常生产和代谢所需的范围。因此要达到超量积累这种产物,提高生产效率,必须打破微生物原有的代谢调控系统,在适当的条件下,让微生物建立新的代谢方式,高浓度地积累人们所期望的产物。为了达到这一目的,控制微生物的各种培养条件,影响其代谢过程是常采用的方法。

1.2.1 微生物的代谢类型和自我调节

1.2.1.1 微生物的代谢类型

微生物的生长繁殖主要依赖于两种代谢途径,即分解代谢和合成代谢。微生物通过分解代谢从环境中吸收的各种碳源、氮源等物质降解为细胞的生命活动所需的能源和小分子中间体。分解代谢包括各种中心途径(如TCA、EMP和HMP)及

外周途径。微生物的合成代谢是利用分解代谢的能量和中间体合成氨基酸、核酸等单体物质,以及蛋白质、核酸、多糖等多聚物。因此,微生物的分解代谢和合成代谢是相互关联、相互制约的,成为生命活动的基础。

微生物小分子物质的合成和降解是由其自我调控的。如生长在含有单一有机化合物作为碳源的培养基中时,其合成大分子前体物质的速率与大分子物质的合成速率匹配得很好。而当一种前体存在于培养基中并能为微生物所吸收时,该前体物质在细胞中的内源合成便立即停止。微生物也常常合成异化存在于环境或培养基中基质的酶。如果同时存在两种不同的基质,细胞首先合成异化可维持更快生长的化合物的酶,如葡萄糖、甘露糖、木糖降解酶;只有这种化合物被利用完后,才开始合成异化第二种化合物的酶,如葡萄糖代谢阻遏现象。

1.2.1.2 微生物自我调节的位置

许多微生物代谢的部位是受到控制的,有三种控制的方式:①细胞膜对大多数亲水分子起一种屏障作用,但又存在着某些称为通道的输送系统,这些通道是输送某些化合物的系统,其中有些是需能的,它们受ATP的影响,并受透性酶的调节;②在原核生物中有两种控制通量的方法,即调节现有酶量和改变酶分子的活性,对酶量的调节可以通过增加或减少关键酶的合成或降解速率进行;③限制基质的有形接近,如真核生物有不同的细胞器,这些细胞器中包裹了各种代谢库,细胞中的基质可存在于位于不同细胞器的各个分隔的代谢库中。例如在链孢菌属中发现有两个动力学性质不同的精氨酸代谢库,一个在细胞质中,一个在液泡中。这两个地方参与精氨酸代谢的酶量相差很远。这类控制方式在原核生物中也存在,但各种酶以酶复合物或与细胞膜结合成整体的形式存在。

微生物自我调节的三个部位实际上是三个类型,但都涉及酶促反应调节。酶促调节的方式包括酶活性调节和酶合成调节两大类。

1.2.2 酶活性调节

酶活性调节包括两个方面,即酶的激活作用和酶的抑制作用。酶的激活作用是指在某个酶促反应系统中,某种分子量较低的物质加入后,导致原来无活性或活性很低的酶转变为有活性或活性提高,使酶促反应速率提高的过程。而酶的抑制作用是指在酶促反应系统中,某种分子量较低的物质加入后,导致酶活力降低的过程。这种能引起酶活力提高或降低的物质称为酶的激活剂或抑制剂。它们可以是外源物质,也可以是机体自身代谢过程中产生与积累的代谢产物^[1]。

酶活性调节的机制研究得较为清楚的是酶的变构理论和酶分子的化学修饰调节理论。前者是通过酶分子空间结构上的变化来引起酶活性的改变,后者则是通过酶分子本身化学组成上的改变来引起酶活性的变化。

1.2.2.1 变构调节理论

变构调节理论是在变构酶的基础上提出的。这类蛋白质可以随着条件的变化,改变其分子的空间构型。

(1) 变构酶和变构调节作用 有些酶分子除了具有活性中心(结合部位和催化部位)外,还存在一个特殊的调控部位,即变构中心。变构中心虽然不是酶活性中心的组成部分,但它可以与某些化合物(称为变构剂)发生非共价结合,引起酶分子构象的改变,对酶起到激活或抑制的作用。这类酶通常称为变构酶,由于变构剂与变构中心的结合而引起酶活性改变的现象则称为变构调节作用。

目前已知的变构酶均为寡聚酶,含两个或两个以上的亚基,一般分子量较大,而且具有复杂的空间结构。大多数由变构酶催化的反应不遵守米氏方程,由变构剂所引起的抑制作用也不服从典型的竞争性或非竞争性抑制作用的数量关系。

按照变构剂的作用性质,可以分为两类:

① 激活变构剂 变构剂与酶分子结合后,酶的构象发生了变化,这种新的构象有利于底物分子与酶的结合,使酶促反应速率提高。

② 抑制变构剂 变构剂与酶分子结合所引起的酶的构象变化不利于与底物的结合,表现出一不定期程度的抑制作用。

实验发现,在变构酶的两个(或两个以上)亚基中,一个亚基可与底物结合,起催化作用,称为催化亚基;另一个亚基可与变构剂结合,对反应起调节作用,称为调节亚基。变构剂与酶的变构中心的结合是可逆的,当变构剂的浓度降低时,变构剂与酶的结合随即解离。

变构调节具有重要的生理意义,在许多酶促反应中,底物或反应产物本身就是变构剂,因此,通过反应过程中底物或产物的浓度变化,可以自动调控酶促反应的进程。通过变构调节可以使细胞内的代谢反应速率与细胞的生理活动统一起来,使细胞内发生的各种合成反应、分解反应、能量转换过程等协同一致地进行。

(2) 酶的反馈调节机制——变构调节 反馈调节是指酶促反应过程中底物或产物对反应进程的影响。

在生物代谢过程中,许多代谢途径的起始物、中间产物或终产物对反应途径中的某一步反应(通常是第一步反应)表现出调控作用,称为反馈调节作用。由于许多催化生物代谢的酶或酶系都具有变构酶的特性,因此,反馈调节的化学本质是酶的变构调节。在反馈调节中,反应的起始物、中间产物或终产物都可以起变构剂的作用。

反馈调节可分为正作用和负作用两种:

① 正反馈作用 反应的起始物、中间物或终产物能够起激活变构剂作用,使酶促反应速率加快,称为正反馈调节作用。在代谢反应中有很多正反馈作用的例子。

例如,在糖原合成中,6-磷酸葡萄糖是糖原合成酶的变构激活剂,可以促进糖原的合成。

二磷酸果糖对磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶的激活作用也是正反馈作用。

② 负反馈作用 反应的中间产物或终产物对酶起变构抑制作用,使酶促反应速率降低。这种作用称为负反馈调节作用。负反馈作用在代谢过程中更为普遍。

例一:在葡萄糖的磷酸化反应中,产物 6-磷酸葡萄糖浓度增高时,反应速率显著降低。这不仅与质量作用效应有关,主要原因是 6-磷酸葡萄糖对己糖激酶有变构抑制作用。

例二:细菌中由苏氨酸合成异亮氨酸包括五步反应。第一步反应是苏氨酸在苏氨酸脱氨酶作用下脱氨形成 α -酮丁酸,这个反应可以被终产物异亮氨酸变构抑制。所以当产物异亮氨酸浓度增加时,反应速率减慢,甚至停止。

1.2.2.2 酶合成的调节

微生物酶合成的调节方式,目前已发现的有 2 种,即酶合成的诱导和酶合成的阻遏。

(1) 酶合成的诱导 酶可分为组成酶和诱导酶。组成酶为细胞所固有的酶,在相应的基因控制下合成,不依赖底物或底物类似物而存在,如分解葡萄糖的 EMP 途径中有关酶类;诱导酶是细胞在外来底物或底物类似物诱导下合成的,如 β -半乳糖苷酶和青霉素酶等。诱导降解酶合成的物质称为诱导物(inducer),它常是酶的底物,如诱导 β -半乳糖苷酶或青霉素酶合成的乳糖或青霉素;但在色氨酸分解代谢中酶的分解产物(如犬尿氨酸)也会诱导酶合成。此外,诱导物也可以是难以代谢的底物类似物,如乳糖的结构类似物硫代甲基半乳糖苷(TMG)和异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG),以及苄基青霉素的结构类似物 2,6-二甲氧基苄基青霉素等。大多数分解代谢酶类是诱导合成的。

诱导有协同诱导与顺序诱导两种。诱导物同时或几乎同时诱导几种酶的合成称为协同诱导,如乳糖诱导大肠杆菌同时合成 β -半乳糖苷透性酶、 β -半乳糖苷酶和半乳糖苷转乙酰酶等与分解乳糖有关的酶。协同诱导使细胞迅速分解底物。顺序诱导是先后诱导合成分解底物的酶和分解其后各中间代谢产物的酶。例如,在由色氨酸降解成为儿茶酚的途径中,犬尿氨酸先协同诱导出色氨酸加氧酶、甲酰胺酶和犬尿氨酸酶,将色氨酸分解成邻氨基苯甲酸,后者再诱导出邻氨基苯甲酸双氧酶,催化邻氨基苯甲酸生成儿茶酚。顺序诱导对底物的转化速度较慢。

诱导酶是微生物需要它们时才产生的酶类,所以诱导的意义在于它为微生物提供了一种只在需要时才合成酶以避免浪费能量与原料的调控手段。

(2) 酶合成的阻遏 酶合成的阻遏主要有终产物阻遏和分解代谢产物阻遏。

① 终产物阻遏 催化某一特异产物合成的酶,在培养基中有该产物存在的情况下常常是不合成的,即受阻遏的。这种由于终产物的过量积累而导致的生物合成

途径中酶合成的阻遏称为终产物阻遏，它常常发生在氨基酸、嘌呤和嘧啶等这些重要结构元件生物合成的时候。在正常情况下，当微生物细胞中的氨基酸、嘌呤和嘧啶过量时，与这些物质合成有关的许多酶就停止合成。例如过量的精氨酸阻遏了参与生物合成精氨酸的许多酶的合成。终产物阻遏在代谢调节中的意义是显而易见的。它有效地保证了微生物细胞内氨基酸等重要物质维持在适当浓度，不会把有限的能量和养料用于合成那些暂时不需要的酶。微生物通过终产物阻遏与一种调节酶活力的反馈抑制（后文将要讨论）的完美配合，有效地调节着氨基酸等重要物质的生物合成。

② 分解代谢产物阻遏 大肠杆菌在含有能分解的两种底物（如葡萄糖和乳糖）的培养基中生长时，首先分解利用其中的一种底物（葡萄糖），而不分解另一种底物（乳糖）。这是因为葡萄糖的分解代谢产物阻遏了分解利用乳糖的有关酶合成的结果。生长在含葡萄糖和山梨醇或葡萄糖和乙酸的培养基中也有类似的情况。由于葡萄糖常对分解利用其他底物的有关酶的合成有阻遏作用，所以分解代谢产物阻遏又称葡萄糖效应（glucose effect）。分解代谢产物阻遏导致所谓“二次生长”，即先是利用葡萄糖生长，待葡萄糖耗尽后，再利用另一种底物生长，两次生长中间隔着一个短暂的停滞期。这是因为葡萄糖耗尽后，它的分解代谢产物阻遏作用解除，经过一个短暂的适应期， β -半乳糖苷酶等分解利用乳糖的酶被诱导合成，这时细菌便利用乳糖进行第二次生长。葡萄糖对氨基酸的分解利用也有类似的阻遏作用。

（3）酶合成调节的机制 诱导和阻遏都可以用 Francois Jacob 和 Jacques Monod^[3]提出的操纵子（operon）理论来解释。这里以最典型和研究得最清楚的乳糖操纵子和色氨酸操纵子来阐明。

① 主要术语

a. 操纵子 是指由启动基因（或称启动子）、操纵基因和结构基因组成的一个完整的基因表达单位，其功能是转录 mRNA。操纵子是受调节基因调控的。启动基因是 RNA 聚合酶识别、结合并起始 mRNA 转录的一段 DNA 碱基序列。操纵基因是位于启动基因和结构基因之间的碱基序列，能与阻遏蛋白（一种调节蛋白）相结合。如操纵基因上结合有阻遏蛋白，转录就受阻；如操纵基因上没有阻遏蛋白结合着，转录便顺利进行，所以操纵基因就像一个“开关”似的操纵着 mRNA 的转录。结构基因是操纵子中编码酶蛋白的碱基序列。

b. 诱导物与辅阻遏物 诱导物是起始酶诱导合成的物质，如乳糖。阻遏酶产生的物质称为辅阻遏物，如氨基酸和核苷酸等。诱导物和辅阻遏物常被总称为效应物。

c. 调节蛋白 调节蛋白是由调节基因编码产生的一种变构蛋白，有两个结合位点，一个与操纵基因结合，另一个与效应物结合。调节蛋白与诱导物结合后因变构而失去活性；但是与辅阻遏物结合变构后却变得有活性。

调节蛋白可分为两种，其一称为阻遏蛋白，它能在没有诱导物时与操纵基因相结合；另一种称为阻遏蛋白原，它只能在辅阻遏物存在时才能与操纵基因相结合。

② 诱导、阻遏机制

a. 乳糖操纵子的诱导机制 *Escherichia coli* 乳糖操纵子 (lac) 由 lac 启动基因、lac 操纵基因和 3 个结构基因所组成。乳糖操纵子是负调节的代表。在缺乏乳糖等诱导物时，其调节蛋白（即 lac 阻遏蛋白）一直结合在操纵基因上，抑制着结构基因进行转录。当有诱导物乳糖存在时，乳糖与 lac 阻遏蛋白相结合，后者发生构象变化，结果降低了 lac 阻遏蛋白与操纵基因间的亲和力，使它不能继续结合在操纵子上。其操纵子的“开关”被打开，转录和转译顺利进行。当诱导物耗尽后，lac 阻遏蛋白再次与操纵基因相结合，这时转录的“开关”被关闭，酶就无法合成，同时，细胞内已转录好的 mRNA 也迅速地被核酸内切酶所水解，所以细胞内酶的量急剧下降。如果通过诱变方法使之发生 lac 阻遏蛋白缺陷突变，就可获得解除调节，即在没有诱导物时也能合成 β -半乳糖苷诱导酶的突变株。

lac 操纵子还受到另一种调节即正调节的控制。这就是当第二种调节蛋白 CRP (cAMP 受体蛋白) 或 CAP (降解物激活蛋白) 直接与启动基因结合时，RNA 多聚酶才能连接到 DNA 链上而开始转录。CRP 与 cAMP 的相互作用，会提高 CRP 与启动基因的亲和性。葡萄糖会抑制 cAMP 的形成，从而阻遏了 lac 操纵子的转录。

b. 色氨酸操纵子的末端产物阻遏机制 色氨酸操纵子的阻遏是对合成代谢酶类进行正调节的例子。在合成代谢中，催化氨基酸等小分子末端产物合成的酶应随时存在于细胞内，因此，在细胞内这些酶的合成应经常处于消阻遏状态；相反，在分解代谢中的 β -半乳糖苷酶等则经常处于阻遏状态。

E. coli 色氨酸操纵子也是由启动基因、操纵基因和结构基因 3 部分组成的。启动基因位于操纵子的开始处；结构基因上有 5 个基因，分别编码“分支酸→邻氨基苯甲酸→磷酸核糖邻氨基苯甲酸→羧苯氨基脱氧核糖磷酸→吡啶甘油磷酸→色氨酸”途径中的 5 种酶。其调节基因 (*trpR*) 远离操纵基因，编码一种称为阻遏蛋白原的调节蛋白。

在没有末端产物色氨酸的情况下，阻遏蛋白原处于无活性状态，因此操纵基因的“开关”是打开的，这时结构基因的转录和转译可正常进行，参与色氨酸合成的酶大量合成；反之，当有色氨酸存在时，阻遏蛋白原可与辅阻遏物色氨酸结合成一个有活性的完全阻遏蛋白，它与操纵基因相结合，使转录的“开关”关闭，从而无法进行结构基因的转录和转译。

1.2.2.3 分支生物合成途径的调节

微生物代谢途径调节中，直链式或不分支代谢途径调节比较简单，是通过末端产物浓度变化，对该生物合成途径中的关键酶进行反馈调节。例如，大肠杆菌的精