


地方应用型本科教学内涵建设成果系列丛书

生物反应工程

主 编 姚璐晔

 南京大学出版社

地方应用型本科教学内涵建设成果系列丛书

生物反应工程

主 编 姚璐晔

 南京大学出版社

图书在版编目(CIP)数据

生物反应工程 / 姚璐晔主编. — 南京 : 南京大学出版社, 2016. 12

(地方应用型本科教学内涵建设成果系列丛书)

ISBN 978-7-305-17909-9

I. ①生… II. ①姚… III. ①化学工业—生物工程—高等学校—教材 IV. ①TQ033

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2016)第 281570 号

出版发行 南京大学出版社

社 址 南京市汉口路 22 号 邮 编 210093

出版人 金鑫荣

丛 书 名 地方应用型本科教学内涵建设成果系列丛书

书 名 生物反应工程

主 编 姚璐晔

责任编辑 江宏娟 编辑热线 025-83597243

照 排 南京南琳图文制作有限公司

印 刷 虎彩印艺股份有限公司

开 本 787×960 1/16 印张 11.5 字数 206 千

版 次 2016 年 12 月第 1 版 2016 年 12 月第 1 次印刷

ISBN 978-7-305-17909-9

定 价 28.00 元

网址: <http://www.njupco.com>

官方微博: <http://weibo.com/njupco>

官方微信号: njupress

销售咨询热线: (025) 83594756

* 版权所有, 侵权必究

* 凡购买南大版图书, 如有印装质量问题, 请与所购图书销售部门联系调换

前 言

生物技术有着很长的发展历史,但与生物过程、生物催化转化相关的知识体系却远未成熟。分子生物学与基因工程,特别是近年来组学技术的发展,极大地扩展和深化了以生物反应过程的定量分析与设计为基础的生物反应工程学科的知识体系。酶或细胞催化转化的机制、不同类型生物反应器和生物反应过程的分析与设计、细胞代谢网络的分析与调控等相关的新理论、新技术的不断出现,丰富和充实了生物反应工程的研究内容。生物反应工程在工业生物技术、医药生物技术、环境生物技术等生命科学研究与应用领域发挥着越来越重要的作用。

生物反应工程实质上是一门研究生物反应过程中带有共性的工程技术问题的学科。它既是现代生物工程学科的重要理论基础,也是现代生化工程研究的前沿领域之一。编著本书的目的之一就是为生物工程专业的学生在学习了生物化学、微生物学、物理化学和化工原理等课程的基础上,学习生物反应工程提供一部适用的教材或参考书。

生物反应工程的基本内容可分为生化反应过程动力学和生化反应器两个方面。生化反应过程动力学着重讨论了酶催化反应动力学与微生物反应过程的基本动力学规律,而生化反应器的设计与分析,则重点讨论了理想反应器。由于本书是针对工科背景学生学习所用,故添加了生物工程的工业应用内容,即培养基和空气的灭菌处理。

本书力图突出用数学的模型及公式表述生化反应的原理与过程的特点,因而对有关的基本理论与方法做了比较详细的讨论和介绍。在编写本书时,编者还力图做到把重点放在介绍主要概念及分析解决问题的方法上,对已在其他课程中讲授的内容本书不再重复。同时还附有例题和习题,以帮助读者理解和掌握有关概念与方法。

在本书的编写过程中,得到了很多同行的关心和帮助,在此向他们表示衷心的感谢!

由于作者水平有限,错误和不足之处在所难免,恳切希望读者予以批评指正。

编 者

2016年11月

目 录

第一章 绪 论	1
第二章 培养基灭菌 空气除菌	9
第一节 培养基灭菌	9
第二节 空气除菌	23
第三章 均相酶催化反应动力学	33
第一节 酶催化反应的基本特征	33
第二节 简单的酶催化反应动力学	37
第三节 有抑制的酶催化反应动力学	46
第四节 影响酶催化活性的因素	54
第五节 多底物酶催化机理	58
第四章 固定化酶	64
第一节 固定化酶概论	64
第二节 固定化酶的性质	65
第三节 固定化细胞	78
第四节 固定化酶、固定化细胞的应用	80
第五章 细胞反应过程动力学	95
第一节 化学计量学	95
第二节 细胞生长动力学概述	100
第三节 生长动力学的定量描述	105

生物反应工程

第四节	分批培养的动力学工程.....	117
第五节	分批发酵动力学.....	120
第六章	理想流动生物反应器.....	127
第一节	操作模型概论.....	127
第二节	间歇操作搅拌反应器.....	133
第三节	连续操作搅拌槽式反应器.....	141
第四节	带有细胞循环的单级 CSTR	149
第五节	连续活塞流反应器.....	152
第六节	补料分批操作反应过程模型.....	163
参考文献		174

第一章 绪 论

学习目的:

了解生物反应工程的定义、特点和发展史,明确学习生物反应工程课程的目的与关键点,掌握生物反应工程课程的主要内容与学习方法。

生物反应工程是一门将现代生物科学技术成果应用于大规模生产,以满足人类对能源、材料和化学品需求的技术。人们可以采用生物质原料来替代石油和天然气,或采用生物学工艺过程(如发酵或生物催化)来替代化学工艺过程,其最终目的是生产出性质与现有化学品相同的产品,或者是具有新性能的产品。能源的短缺、资源的匮乏、环境治理的需求,促使工业生物技术正在成为继医药生物技术和农业生物技术以后的生物技术发展的“第三次浪潮”。

1. 生物反应工程

生物反应工程是专业研究由生物催化剂参与反应过程的工程学科,又是一门以生物学、化学和工程学等多种学科为基础的交叉学科。

从生物反应过程开发所涉及的内容分析,生物反应工程的任务是以生物反应过程动力学为基础,将传递过程原理等化学工程学的原理和方法与生物反应过程的特点相结合,以进行生物反应过程的分析与开发、生物反应器的设计和放大。从生物反应过程开发的分析,生物反应工程的主要任务是将实验室的研究成果放大到工业规模反应装置上以进行工业化生产。

生物反应工程具有下列特点:① 由于采用生物催化剂,反应过程可在常温、常压下进行,且可运用 DNA 重组技术及原生质体融合等现代生物技术构建或改造生物催化剂而赋予生物反应过程以现实和潜在的活力,但生物催化剂易于失活、易受环境的影响和杂菌的污染,一般不能长时间使用。② 采用可再生资源作为主要原材料,过程中废物的危害性较小,但原料成分往往难以控制,给产品质量带来一定影响。③ 与化工生产相比,生产设备较为简单,能量消耗一般也较少,但由于过高的底物或产物浓度导致酶的活性被抑制或细胞不能耐受如此高的渗透压而失活,因此反应液中的底物(基质)浓度不能过高,这样会导致很

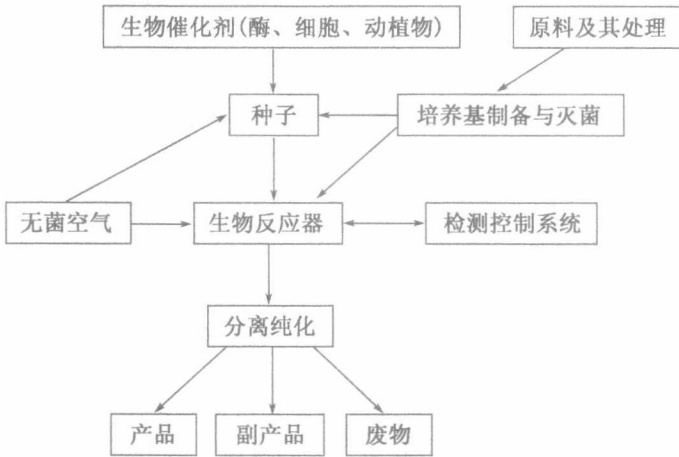


图 1-1 生物反应过程示意图

大的反应器体积且要求在无杂菌污染情况下进行操作。④ 酶反应过程的专一性强,转化率高,但成本较高;发酵过程成本低、应用广,但反应机制复杂,较难控制,反应液中杂质较多,给提取纯化带来困难。

2. 生物反应工程发展史

(1) 第一阶段:19 世纪后期 Hanson 在 Carlsberg 酿造厂发展了分离和繁殖单个酵母细胞以产生纯培养物的方法,并发展了复杂的生产种子培养物质的技术。但在当时,许多小型传统的麦芽酒酿厂仍然使用混合酵母培养物。

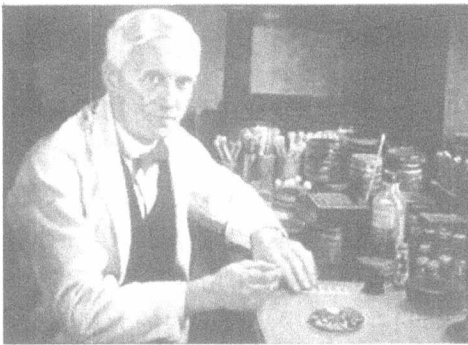
醋由酒曲生产,它在浅盘或混合装满的桶中由天然微生物菌群缓慢氧化而生成。人们对这一过程的认识促使了“发生器”的产生,“发生器”由一只充满惰性物质(如煤、木炭和不同种类木屑)的容器构成,在该容器的下方,醋滴落下来。这种醋发生器被认为是开发出的第一代“有氧”发酵罐。19 世纪后期到 20 世纪早期,培养基用巴斯德法灭菌,接种了 10%的优质醋可使培养基呈酸性,这样不仅可以抗污染,而且提供了一个良好的接种剂。到了 20 世纪初,发酵过程控制的概念在酿造行业和醋工业中慢慢地建立起来。

(2) 第二阶段:1900—1940 年期间 这个阶段主要的新产品是酵母细胞、甘油、柠檬酸、乳酸和丙酮-丁醇;这个时期最重要的进步是在面包酵母和有机溶剂发酵方面的发展。面包酵母的生产是一个好氧过程,人们认识到酵母细胞在富含麦芽汁的培养基中快速生长,导致培养基中氧的消耗;而氧的限制会使发酵过程以降低菌体生长为代价而产生酒精。通过控制碳源而不是氧气,即限制初

始麦芽汁浓度来控制细胞的生长就可以解决这一问题；随后在培养液中再添加少量麦芽汁即可控制之后的培养物生长过程，这就是补料-分批培养技术，该技术现广泛应用于发酵工业，以避免氧气限制情况的发生。

丙酮-丁醇发酵技术是 Weizmann 在第一次世界大战期间建立起来的第一个真正意义上的无菌发酵，即采用一个良好的接种物和适宜的无菌条件。丙酮-丁醇的发酵是个厌氧过程，早期容易被好氧细菌污染；一旦厌氧条件被建立，在发酵过程的后期又易被产酸的厌氧菌所污染。发酵所用的发酵罐采用垂直圆柱体形，用低碳钢造的半圆形盖子和底部，使其能在一定压力下进行蒸汽灭菌；各部分之间连接紧密，使污染杂菌的概率达到最小。

(3) 第三阶段：在战时应运而生 青霉素是抗生素的一种，从青霉菌培养液中提制的药物，是第一种能够治疗人类疾病的抗生素。青霉素的发现者是英国细菌学家亚历山大·弗莱明。1928年的一天，弗莱明在他的一间实验室里研究导致人体发热的葡萄球菌，由于盖子没有盖好，他发现培养细菌用的琼脂上附了一层青霉素，这是从楼上的一位研究青霉素的学者的窗口飘落进来的；让弗莱明感到惊讶的是，在青霉菌旁，葡萄球菌忽然不见了。这个偶然的发现吸引了他，他设法培养这种霉菌进行多次试验，证明青霉素可以在几小时内将葡萄球菌全部杀死。弗莱明据此发明了葡萄球菌的克星——青霉素。



Fleming's original plate:

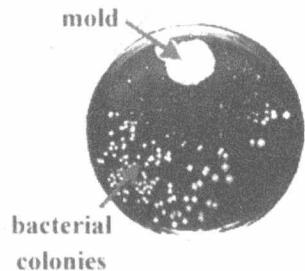


图 1-2 青霉素的发现

1935年，英国牛津大学生物化学家钱恩和物理学家弗罗里继续对弗莱明的发现进行研究。钱恩负责青霉菌的培养和青霉素的分离、提纯和强化，使其抗菌力提高了几千倍；弗罗里负责对动物观察试验。至此，青霉素的功效得到证明。

由于青霉素的发现和大量生产，拯救了千百万肺炎、脑膜炎、脓肿、败血病患者的生命，及时抢救了许多的伤病员。青霉素的发现，当时曾轰动世界，为了表

彰这一造福人类的贡献,弗莱明、钱恩、弗罗里于 1945 年共同获得诺贝尔医学和生理学奖。

青霉素生产是一个极易感染杂菌的好氧过程,为了保证青霉的良好生长,必须向培养青霉的营养液中输入灭过菌的空气,这在当时是件很困难的事情。直到 1942 年,青霉素的大规模生产才有可能;其中,最主要的是人们发明了上万吨的发酵罐,里面装有搅拌桨,能满足青霉素生产的需要,这样青霉素的产量得以显著提高。为青霉素的提取而发展起来的大规模提取方法,在当时也是一个主要进步。



图 1-3 早期青霉素的生产

(4) 第四阶段:20 世纪 60 年代早期 一些跨国企业生产微生物细胞作为饲料蛋白。微生物蛋白低廉的价格使得它的产量比其他发酵产品大得多,并且利用碳氢化合物作为潜在的碳源,而发酵过程中要求大量的氧气,这些需求促进了压力喷射和压力循环发酵罐的发展。从经济角度考虑,当时分批培养和补料-分批培养的方法在工业生产上应用普遍,但是通过添加新鲜培养基到发酵罐中,并从培养液中取出微生物的连续培养技术,只在一个很小范围内的大规模生产中得到应用。

在这一时期,一些工业化的发展过程逐渐成熟,其中发展最成熟的是英国帝国化学公司(Imperial Chemical Industries Ltd, ICI),它使用 $3\,000\text{ m}^3$ 的压力循环发酵罐进行连续生产。大容量的连续发酵罐能在超过 100 天的时间内进行连续生产,这就必须考虑无菌操作问题。高质量的发酵罐制造技术和添加培养基的连续灭菌技术解决了此类发酵罐的无菌操作问题。同时,使用计算机控制灭菌和循环操作,降低了人为造成差错的可能性。

(5) 第五阶段:起始于微生物的体外遗传操作技术,通常称做遗传工程。遗传工程不仅能在不相关的微生物之间转移基因,而且可以非常准确地改造微生物基因组,这样微生物细胞可以生产通常由高等生物细胞才能生产的有关化合物,这些由微生物细胞合成的高等生物细胞的产物可以为新的发酵工程打下基础,如胰岛素和干扰素的生产。这样微生物产品的产量可以通过使用遗传操作技术得到提高。基因操作方法对发酵工业产生重大变革,从而形成许多新的发酵工程。

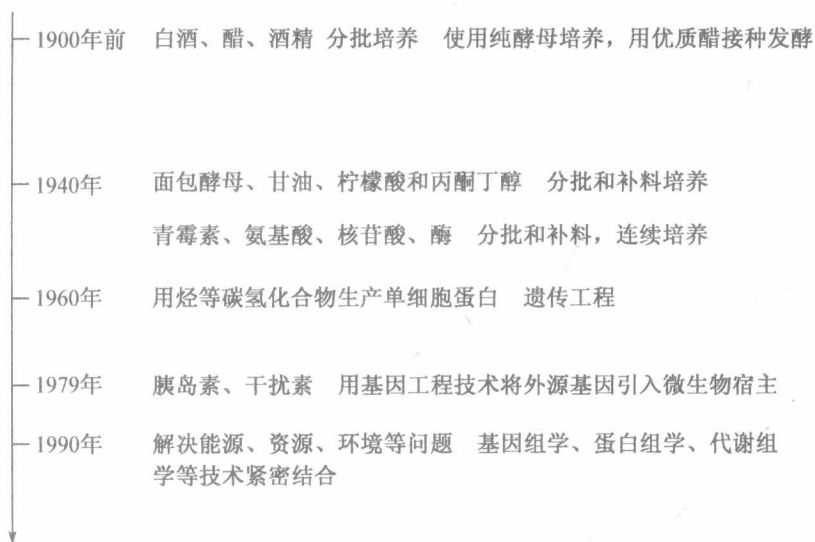


图 1-4 生物反应工程发展年鉴

3. 生物反应工程的研究进展

20 世纪 40 年代,由于解决了高效通气搅拌供养和大型反应器灭菌技术,使以青霉素为代表的微生物发酵工业进入了一个新的发展阶段,一门反映生物技术和化学工程的交叉学科——生物化学工程诞生并取得了快速发展。

随着生物技术的发展,又利用数学、化学反应工程的原理与方法进行生物反应过程的研究,使反应过程的操作控制更加合理,新型生物反应器不断出现,这些都促使生物反应工程这一新分支从生物化学工程领域中产生。

1971 年,英国的阿特金森(B. Atkinson)首先提出生化反应工程这一术语,并在 1974 年出版了《生化反应器》一书;1975 年,日本学者合叶修一出版了《生物化学工程——反应动力学》;1979 年,日本学者山根恒夫编著了《生物反应工

程》；1985年，德国学者许盖尔特(Schügerl)出版了《生物反应工程》专著；1993年，日本学者川濑义矩出版了《生物反应工程基础》；1994年，丹麦学者尼尔森(Nielsen)等编著了《生物反应工程原理》一书。与此同时，我国的学者也编著了有关书籍。

近年来，基因工程、代谢工程和蛋白质工程的快速发展为高产细胞株和新型生物催化剂的获得提供了先进的技术；新型生物反应器的开发和先进控制技术的发展为提高生物催化反应的效率创造了良好的技术基础。例如，利用DNA重组技术提供微生物细胞生产有用物质的能力和质粒复制与表达动力学模型的研究；超临界状态下生物反应过程的研究；双液相生物反应过程的研究；界面微生物生长模型的研究等。这些研究成果，为建立更丰富的生物反应工程理论和方法创造了条件。

4. 本书的内容与体系

为了突出生物反应工程的重点内容，本书主要包括生物反应动力学与生物反应器两大部分。

(1) 生物反应动力学

生物反应动力学是研究生物反应过程速率及其影响因素的科学，它是生物反应工程学的理论基础之一。由于生物反应过程的复杂性，也为生物反应动力学的描述带来了复杂性。本书试对生物反应动力学模型在分子水平、细胞及其群体水平、颗粒水平和反应器水平四个层次进行描述与表达。上述四个层次的动力学模型中，前两个层次的动力学模型，仅反映生物反应本身内在的动力学规律，称为微观反应动力学；后两个层次的动力学模型中，都包括了传递因素对生物反应速率的影响，称为宏观反应动力学。对生物反应工程，更应重视后者。

对酶(均相)催化反应，反应动力学可在分子水平上进行描述，根据其反应机理可推导建立模型方程。

对单细胞反应，其动力学模型可分为以下三类：

第一类为结构模型，该模型考虑了胞内组成的变化和代谢网络，反映了胞内反应过程的部分本质和机理，称之为机理模型，但该类模型涉及过多的模型方程和参数，应用尚有一定困难。

第二类为“黑箱”模型，它是完全建立在生物反应过程的状态变量(如细胞浓度与生长速率、底物和产物浓度之比等)与操作变量(如温度、pH、加料速率和通气量等)相关实验数据基础上的模型。它没有考虑过程的机理，模型也不具有明确的物理意义，是一种纯粹“黑箱”性质的经验模型。最常见的“黑箱”经验模型

为基于状态变量与操作变量之间的数据回归模型。该类模型仅限于在所描述的范围范围内使用。

第三类为介于上述两类模型之间的非结构模型。它是把生物反应过程的理论定量与经验公式结合起来,采用若干状态方程来表示生物反应过程的特征,而动力学参数则根据细胞种类和反应体系的不同可选用不同的模型加以描述。例如,用 Monod 方程描述细胞没有考虑参与生物反应过程的所有反应网络,所反映的仅仅是过程的表现动力学特征,所考虑的状态变量和模型参数也有限,所建模型比较简单,模型参数也有其明确的物理意义。

上述有关细胞反应动力学的三类模型中,第一类为体现反应机理的动力学模型;第二类为根据实验数据进行数学模拟的经验动力学模型;第三类为依据相类似的反应机理和实验数据相结合的方法而建立的半理论半经验的动力学模型,此类动力学又称形式动力学。它是目前生物反应工程中常用的一种动力学模型。

若为固定化生物催化剂反应过程,则所建立的动力学模型中要考虑传质速率对生物催化反应过程速率的影响。它是在固定化生物催化剂颗粒的水平上进行的动力学描述,该类模型不仅包括生物催化本身的反应速率,也包括了传质速率的影响。

(2) 生物反应器

生物反应器是生物反应过程的核心设备,要求它能为进行各种生物反应过程提供良好的反应环境和条件。由于生物反应的多样性和反应过程的复杂性,生物反应器的型式虽多种多样,但仍不能适应生物反应过程的多种需要,其生产效率不高。为了掌握生物反应器的基本特性和设计放大,有必要对生物反应器的操作模型、传递与混合特性和设计与放大等方面进行分析讨论。

生物反应器的操作模型,是描述生物反应在不同操作方式、不同典型反应中的反应动力学模型,它既是生物反应过程动力学在反应器水平上的延伸,也是生物反应器的设计基础。若将某一生物反应过程分别放在分批式、半分批式和连续式操作的不同结构型式的反应器中进行反应,则该反应过程会表现出不同的动力学特性和反应结果,即生物反应过程在反应器水平上所表达的不同动力学,它是表示生物反应器内生物反应与物理现象之间相互作用的动力学模型。

生物反应器的传递与混合特性,则主要描述了反应液的流变性、剪切特性、氧的传递和混合等物理特性对生物反应过程的影响,这有助于了解生物反应器内影响生物反应过程因素的多样性和复杂性;为正确选择反应器型式、操作方式和进行反应器设计与放大提供了理论依据。

生物反应器的设计是一个复杂的系统工程,包括根据生物催化反应过程的特点和工艺要求而选择反应器的型式、结构和操作方式;根据有关衡算式和反应过程动力学以确定完成规定生产任务时所需反应器体积和几何尺寸等。本书则主要讨论了各类工业生物反应器的流动模型。

本章小结

生物反应工程在生物技术产业化过程中起着重要的作用。通过对生物反应动力学和生物反应器的研究,了解生物过程变化的机制,指导生物过程的设计。在生命科学飞速发展的今天,该学科不仅应用于工程设计,还与基础科学(如系统生物学等)交叉融合,促进了生命科学的发展。

复习题

1. 什么是生物反应工程?
2. 生物反应工程研究的主要研究对象和研究内容是什么?
3. 简述生物反应器的类型及其特点。

第二章 培养基灭菌 空气除菌

学习目的:

理解生物反应工程中常用灭菌技术的重要性和常用的灭菌技术;掌握分批灭菌、连续灭菌的特点及空气除菌的流程;熟知微生物的热死灭动力学。

绝大多数发酵过程需要在无杂菌条件下进行,因此培养基的灭菌必须合理地设计,使之既能达到所需要的无菌程度,又能保证培养基中有效成分的破坏在允许范围之内。培养基的灭菌系指杀灭培养基中有生活能力的细菌营养体及其孢子,或除去培养基中的细菌营养体及其孢子。工业规模上的液体培养基灭菌,杀灭杂菌比除去杂菌更为常用,其中热灭菌法最为简便、有效和经济。培养基灭菌程度的要求因所服务的发酵系统而异。实际上,绝对的无菌不但难以做到,也是不必要的。

微生物发酵分为好氧发酵和厌氧发酵两大类,绝大多数工艺微生物发酵都是好氧发酵。无菌空气是好氧微生物的氧源,获得大量的无菌空气供给好氧发酵微生物是生物反应工程中极为重要的课题,所以空气除菌是发酵工业的一个重要环节。

第一节 培养基灭菌

对于液体培养基的热灭菌,工程上所需解决的课题是:将培养基中的杂菌总数(N_0)杀灭到可以接受的总数(N),需要多高的温度、多长的时间最为合理?这取决于杂菌孢子的热死灭动力学、反应器的型式和操作方法,还取决于培养基中有效成分受热破坏的可接受范围。

1. 巴氏消毒法

消毒是指杀死病原微生物,但不一定能杀死细菌芽胞的方法。巴氏消毒法也称为低温消毒法、冷杀菌法,是一种利用较低温度既可杀死病菌又能保持物品

中营养物质风味不变的消毒法。

巴氏消毒法的产生来源于巴斯德解决啤酒变酸的问题。当时,法国酿酒业面临着一个令人头疼的问题,那就是啤酒在酿出后会变酸,根本无法饮用,而且这种变酸现象还时常发生。巴斯德受人邀请去研究这个问题。经过观察,他发现使啤酒变酸的罪魁祸首是乳酸杆菌。营养丰富的啤酒简直就是乳酸杆菌的生长天堂。采取简单的煮沸方法可以杀死乳酸杆菌,但啤酒就煮坏了。巴斯德尝试使用不同的温度来杀死乳酸杆菌,且又不破坏啤酒本身。最后,巴斯德的研究结果是:以 50~60 °C 的温度加热啤酒半小时,就可以杀死啤酒中的乳酸杆菌,而不必煮沸。这一方法挽救了法国的酿酒业。

目前通用的巴氏消毒法主要有两种:一种是将牛奶加热到 62~65 °C,保持 30 分钟。采用这一方法,可杀死牛奶中各种生长型致病菌,灭菌效率可达 97.3%~99.9%,经消毒后残留的只是部分嗜热菌、耐热性菌以及芽孢等,但这些细菌多数是乳酸菌,乳酸菌不但对人无害反而有益健康。第二种方法是将牛奶加热到 75~90 °C,保温 15~16 秒,其杀菌时间更短,工作效率更高。但杀菌的基本原则是,能将病原菌杀死即可,温度太高反而会有较多的营养损失。



巴斯德

图 2-1 法国微生物学家、化学家、近代微生物学的奠基人

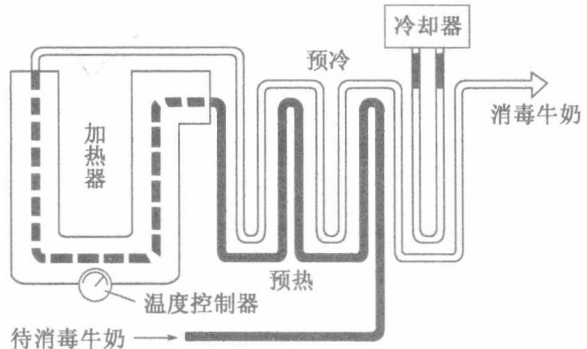


图 2-2 高温瞬间巴氏消毒法的操作流程图

2. 化学灭菌法

化学灭菌法是指用化学药品直接作用于微生物而将其杀死的方法。对微生物具有杀死作用的化学药品称为杀菌剂,可分为气体杀菌剂和液体杀菌剂。杀菌剂仅对微生物繁殖体有效,不能杀死芽孢。化学杀菌剂的杀灭效果主要取决