

生物技术和生物工程专业规划教材

# 生物反应工程

Bioreaction Engineering

岑沛霖 关怡新 林建平 编著



高等教育出版社  
Higher Education Press

## 内容提要

本书对酶与细胞参与的生物反应的速率及相关问题进行了充分的讨论,并始终结合生物催化剂的特点。本书力图反映生物反应工程是生物科学、化学和工程科学的交叉学科的特点,在建立描述生物反应速率的数学模型时,尽可能地结合生物学和化学原理,使学生能将这三方面的知识融会贯通。

本书可作为大学生物工程本科专业学生的专业基础课教材。

## 图书在版编目(CIP)数据

生物反应工程/岑沛霖,关怡新,林建平编著. —北京:高等教育出版社,2005.9  
ISBN 7-04-017577-0

I. 生... II. ①岑... ②关... ③林... III. 生物工程:化学反应工程—高等学校—教材 IV. Q81

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2005)第 093067 号

策划编辑 王 莉 责任编辑 应丽贞 封面设计 张 楠 责任绘图 尹 莉  
版式设计 胡志萍 责任校对 杨雪莲 责任印制 宋克学

---

出版发行 高等教育出版社

社 址 北京市西城区德外大街 4 号

邮政编码 100011

总 机 010-58581000

购书热线 010-58581118

免费咨询 800-810-0598

网 址 <http://www.hep.edu.cn>

<http://www.hep.com.cn>

经 销 北京蓝色畅想图书发行有限公司

印 刷 北京晨光印刷厂

网上订购 <http://www.landaco.com>

<http://www.landaco.com.cn>

开 本 787×1092 1/16

印 张 22.25

字 数 540 000

版 次 2005 年 9 月第 1 版

印 次 2005 年 9 月第 1 次印刷

定 价 30.10 元

---

本书如有缺页、倒页、脱页等质量问题,请在所购图书销售部门联系调换。

版权所有 侵权必究

物料号 17577-00

# 前 言

生物反应工程是研究以细胞或细胞的一部分(如酶)作为催化剂的反应过程及其动力学的一门交叉学科,对生物工程和技术的发展具有十分重要的意义,是大学生物工程本科专业必修的专业基础课之一。

无论是一般意义的化学反应还是生物反应,最重要的问题是研究反应的速率、反应产物的产率及影响反应速率和转化率的各种因素,本书对生物反应的速率及有关问题进行了充分的讨论。生物反应又有着自己的特点,特别是细胞参与的生物反应过程,细胞自身在不断地经历着分裂—生长—死亡的循环,并进而影响着营养物质代谢和产物合成,因此本书在研究反应速率时始终结合生物催化剂的特点进行讨论。本书的特点是力图反映生物反应工程是生物学、化学和工程科学的交叉学科的特点,在建立描述生物反应速率的数学模型时,尽可能地结合生物学和化学原理,使学生能将这三方面的知识融会贯通。

本书的第一章是绪论,主要介绍生物反应工程的发展历史、生物反应工程的研究领域及其应用。第二及第三章详细地阐述了游离及固定化酶催化反应动力学及酶催化的应用。第四及第五章介绍了细胞的基本知识,重点阐述了细胞的生长和代谢调控、细胞代谢的计量关系及能量代谢,是学习细胞培养工程的基础。第六至第八章主要研究细胞生长、营养物质消耗及产物合成的动力学、传质对细胞生长和代谢的影响及生物反应器的设计和放大等内容。由于生物技术的飞速发展,基因重组细胞和动植物细胞已经越来越广泛地用于生物技术产品的生产,因此在第九至十一章将对这些领域进行必要的讨论。

本书的第一及第九至第十一章由岑沛霖编著(引用了徐志南及孟琴的部分工作),第二至第五章由关怡新编著,第六至第八章由林建平编著。

由于编著者的水平有限,书中内容难免有错误之处,我们诚恳地希望使用本书的老师与同学批评指正。

编著者

2005年7月

## 郑重声明

高等教育出版社依法对本书享有专有出版权。任何未经许可的复制、销售行为均违反《中华人民共和国著作权法》，其行为人将承担相应的民事责任和行政责任，构成犯罪的，将被依法追究刑事责任。为了维护市场秩序，保护读者的合法权益，避免读者误用盗版书造成不良后果，我社将配合行政执法部门和司法机关对违法犯罪的单位和个人给予严厉打击。社会各界人士如发现上述侵权行为，希望及时举报，本社将奖励举报有功人员。

**反盗版举报电话：**(010) 58581897/58581896/58581879

**传 真：**(010) 82086060

**E - mail：**dd@hep.com.cn

**通信地址：**北京市西城区德外大街4号

高等教育出版社打击盗版办公室

**邮 编：**100011

**购书请拨打电话：**(010)64014089 64054601 64054588

# 目 录

<b>第一章 绪论</b> .....	1	<b>2.6 酶失活机理和酶失活动力学</b> .....	35
<b>1.1 生物反应工程的发展历史</b> .....	2	<b>2.7 多底物酶催化反应动力学</b> .....	37
<b>1.2 生物反应工程的范畴</b> .....	3	2.7.1 多底物反应的反应机理 .....	37
1.2.1 酶催化反应动力学 .....	3	2.7.2 多底物酶催化反应的稳态动力学 .....	38
1.2.2 高产细胞株的获得和保持 .....	4	<b>2.8 变构酶</b> .....	39
1.2.3 细胞生长和代谢产物合成动力学 .....	5	2.8.1 配基同蛋白质的结合 .....	40
1.2.4 传质对生物反应的影响 .....	6	2.8.2 Monod-Changeux-Wyman(MCW)	
1.2.5 生物反应器和操作模式 .....	6	模型 .....	42
<b>1.3 生物反应工程的应用</b> .....	7	2.8.3 Koshland-Némethy-Filmer(KNF)	
1.3.1 酶催化反应工程的应用 .....	7	模型 .....	44
1.3.2 细胞培养工程的应用 .....	7	<b>2.9 多相体系中的酶反应</b> .....	44
<b>1.4 生物反应工程的展望</b> .....	8	练习题 .....	47
<b>第二章 酶催化反应动力学</b> .....	10	<b>第三章 应用酶催化及酶催化反应器</b> .....	51
<b>2.1 酶的来源、分类、命名及特征</b> .....	10	<b>3.1 水解酶的应用</b> .....	51
<b>2.2 一种或两种底物反应时单酶催化</b>		3.1.1 淀粉和纤维素的水解 .....	52
动力学 .....	14	3.1.2 蛋白水解酶 .....	55
2.2.1 Michaelis-Menten 动力学 .....	15	3.1.3 酯酶及其应用 .....	57
2.2.2 Briggs-Haldane 对 Michaelis-		3.1.4 混合酶、果胶酶及其他水解酶的	
Menten 公式的改进 .....	16	应用 .....	57
2.2.3 King 和 Altman 的推导 .....	16	<b>3.2 酶的其他用途</b> .....	58
2.2.4 可逆反应动力学、双底物反应及辅		3.2.1 酶在医药中的应用 .....	58
因子活化 .....	18	3.2.2 酶在工业中的应用 .....	59
<b>2.3 基元反应速率常数的确定</b> .....	20	<b>3.3 酶催化在手性化合物拆分和合成</b>	
2.3.1 预稳态方法 .....	21	中的应用 .....	60
2.3.2 松弛方法 .....	22	3.3.1 手性化合物的拆分 .....	60
<b>2.4 酶催化反应的抑制</b> .....	23	3.3.2 手性合成 .....	62
2.4.1 底物的活化和抑制作用 .....	23	<b>3.4 酶的固定化</b> .....	64
2.4.2 可逆抑制 .....	24	3.4.1 包埋法 .....	65
2.4.3 不可逆抑制 .....	29	3.4.2 吸附法 .....	66
<b>2.5 影响酶活性的其他因素</b> .....	30	3.4.3 共价键法 .....	66
2.5.1 溶液 pH 对酶催化反应动力学的		3.4.4 共价交联法 .....	68
影响 .....	30	<b>3.5 固定化酶反应动力学</b> .....	69
2.5.2 温度对酶活性的影响 .....	32	3.5.1 固定化酶单一粒子的总反应速率 .....	70
2.5.3 其他影响酶活性的因素 .....	34	3.5.2 球形粒子内的扩散-反应方程 .....	72

3.5.3 同时存在膜扩散阻力和粒内传质 阻力时的有效因子 .....	78	5.4.1 Embden-Meyerhof-Parnes(EMP) 途径 .....	137
3.5.4 表面固定化酶的反应速率 .....	80	5.4.2 呼吸 .....	138
<b>3.6 固定化酶的活性和失活</b> .....	81	<b>5.5 光合作用</b> .....	139
3.6.1 固定化时真实酶活性保持率 .....	81	<b>5.6 生物合成</b> .....	140
3.6.2 固定化酶的失活速率 .....	82	5.6.1 小分子生物合成 .....	141
3.6.3 pH的影响 .....	83	5.6.2 大分子生物合成 .....	141
<b>3.7 酶反应器</b> .....	84	<b>5.7 跨膜传递</b> .....	142
3.7.1 酶反应器设计原则 .....	85	5.7.1 被动和促进扩散 .....	143
3.7.2 均相酶催化反应器 .....	86	5.7.2 主动传递 .....	144
3.7.3 非均相酶反应器 .....	88	<b>5.8 微生物的代谢产物</b> .....	145
<b>3.8 酶电极和蛋白质芯片</b> .....	93	5.8.1 初级代谢产物 .....	146
3.8.1 酶电极 .....	93	5.8.2 次级代谢产物 .....	147
3.8.2 蛋白质芯片 .....	97	<b>5.9 细胞增长和产物生成的计量 关系</b> .....	148
练习题 .....	99	5.9.1 细胞的元素衡算方程 .....	148
<b>第四章 细胞生物学基础</b> .....	102	5.9.2 细胞生长的得率系数 .....	151
<b>4.1 细胞的基本知识</b> .....	103	5.9.3 生长得率和代谢产物产率的理论 估计 .....	155
4.1.1 细胞的概念 .....	103	5.9.4 细胞生长的反应热及其产率系数 ..	156
4.1.2 微生物细胞的基本性质 .....	104	练习题 .....	159
4.1.3 微生物细胞的分类和应用 .....	107	<b>第六章 细胞生长动力学</b> .....	161
4.1.4 微生物细胞的结构和功能 .....	110	<b>6.1 细胞生长及其环境要求</b> .....	161
<b>4.2 细胞的增殖及调控</b> .....	112	6.1.1 细胞生长的特点 .....	161
4.2.1 细胞周期 .....	112	6.1.2 环境对细胞生长的影响 .....	162
4.2.2 细胞周期各时相的动态变化 .....	113	<b>6.2 细胞生长动力学模型的分类和 特点</b> .....	166
4.2.3 细胞周期的调控 .....	114	6.2.1 结构模型和非结构模型 .....	167
4.2.4 细胞的分化与凋亡 .....	115	6.2.2 分立模型与非分立模型 .....	168
练习题 .....	118	6.2.3 随机性模型和模糊模型 .....	168
<b>第五章 细胞代谢的计量关系和能学</b> .....	120	<b>6.3 非结构动力学模型</b> .....	168
<b>5.1 热力学基础</b> .....	120	6.3.1 Monod模型 .....	168
5.1.1 热力学概念 .....	120	6.3.2 其他非结构模型 .....	170
5.1.2 自由能 .....	124	6.3.3 多底物模型 .....	171
<b>5.2 代谢反应对:ATP和NAD</b> .....	126	6.3.4 细胞生长的底物抑制 .....	172
5.2.1 ATP-ADP对与其他高能化合物 ..	127	6.3.5 丝状微生物的生长模型 .....	173
5.2.2 $\text{NAD}^+$ -NADH对与氧化还原 反应 .....	129	<b>6.4 理想间歇培养中细胞生长、底物 消耗和产物生成动力学</b> .....	174
5.2.3 ATP和NAD的耦联 .....	131	6.4.1 间歇培养时细胞的生长周期 .....	174
<b>5.3 代谢的组织和调节</b> .....	132	6.4.2 细胞生长与底物消耗 .....	175
5.3.1 代谢的网络组织 .....	132		
5.3.2 代谢调节的类型 .....	133		
<b>5.4 碳源的分解代谢</b> .....	137		

6.4.3 维持能和内源代谢 .....	177	7.7.2 体积氧传递系数 .....	222
6.4.4 产物生成和产物抑制 .....	178	7.7.3 通气量 .....	223
6.4.5 考虑细胞死亡的间歇培养动力学 .....	179	7.7.4 放大时要考虑的其他因素 .....	223
<b>6.5 细胞连续培养过程动力学 .....</b>	<b>180</b>	7.7.5 生物反应器的缩小(scale-down) .....	224
6.5.1 连续搅拌罐反应器(CSTR) .....	180	<b>7.8 生物反应器的热量传递和加热</b>	
6.5.2 间歇反应器和恒化器细胞生产能力的比较 .....	183	灭菌 .....	224
6.5.3 内源代谢和维持能对恒化器动力学行为的影响 .....	184	7.8.1 热量传递 .....	224
6.5.4 恒化器中的产物生成动力学 .....	185	7.8.2 加热灭菌 .....	228
6.5.5 理想的平推流反应器(PFR) .....	186	<b>练习题 .....</b>	<b>230</b>
<b>6.6 流加培养 .....</b>	<b>187</b>	<b>第八章 生物反应器 .....</b>	<b>232</b>
<b>6.7 结构模型和分立模型初步 .....</b>	<b>190</b>	<b>8.1 生物反应器的分类和结构特点 .....</b>	<b>232</b>
6.7.1 最简单的结构模型——两室模型 .....	191	8.1.1 根据生物催化剂分类 .....	232
6.7.2 最简单的分立模型 .....	193	8.1.2 根据底物加入方式分类 .....	233
<b>练习题 .....</b>	<b>195</b>	8.1.3 根据流体流动或混合状况分类 .....	233
<b>第七章 生物反应器中的传递过程 .....</b>	<b>199</b>	8.1.4 根据反应器结构特征及动力输入方式分类 .....	234
<b>7.1 细胞反应体系中的气-液传质 .....</b>	<b>201</b>	<b>8.2 通气搅拌罐生物反应器设计与分析 .....</b>	<b>237</b>
7.1.1 气体在水中的溶解和传质 .....	202	8.2.1 通气搅拌罐的结构特征 .....	237
7.1.2 细胞代谢中的氧消耗速率 .....	207	8.2.2 机械搅拌系统 .....	239
<b>7.2 氧传递速率系数的测定 .....</b>	<b>208</b>	8.2.3 通气系统 .....	240
7.2.1 亚硫酸盐法测定 $k_La$ .....	208	8.2.4 温度控制系统 .....	240
7.2.2 溶氧电极法测定 $k_La$ .....	209	8.2.5 消泡系统 .....	241
<b>7.3 自由上升或下降气泡的传质 .....</b>	<b>211</b>	8.2.6 pH和溶氧测量与控制系统 .....	241
7.3.1 气泡和气泡簇的传质系数 .....	212	<b>8.3 鼓泡塔和气升式反应器设计和分析 .....</b>	<b>242</b>
7.3.2 气液界面面积与气含率的估算 .....	213	8.3.1 鼓泡塔反应器 .....	242
<b>7.4 强制对流传质 .....</b>	<b>215</b>	8.3.2 气升式生物反应器 .....	242
<b>7.5 通气搅拌罐中总括传质系数 <math>k_La</math> 和输入功率的估算 .....</b>	<b>216</b>	<b>8.4 固定化细胞生物反应器 .....</b>	<b>244</b>
7.5.1 通气搅拌罐中总括传质系数的估算 .....	216	8.4.1 固定床反应器 .....	244
7.5.2 通气搅拌罐中输入功率的估算 .....	217	8.4.2 涓流床生物反应器 .....	246
<b>7.6 其他影响 <math>k_La</math> 的因素 .....</b>	<b>219</b>	8.4.3 流化床反应器 .....	247
7.6.1 离子强度 .....	219	<b>8.5 非理想生物反应器的流动模型和微观混合特性 .....</b>	<b>248</b>
7.6.2 表面活性剂 .....	219	8.5.1 非理想生物反应器的流动模型 .....	248
7.6.3 细胞浓度 .....	220	8.5.2 非理想生物反应器的微观混合特性 .....	252
7.6.4 细胞培养过程中 $k_La$ 值的变化 .....	220	<b>练习题 .....</b>	<b>253</b>
7.6.5 细胞培养过程中氧传递的强化 .....	221	<b>第九章 基因重组细胞培养工程 .....</b>	<b>254</b>
<b>7.7 生物反应器的放大 .....</b>	<b>221</b>	<b>9.1 基因工程工具酶 .....</b>	<b>257</b>
7.7.1 单位体积的输入功率 .....	222		

9.1.1 限制性内切酶 .....	258	<b>9.9 代谢工程、DNA 重排和基因组</b>	
9.1.2 连接酶 .....	259	重排 .....	290
9.1.3 其他基因工程的工具酶 .....	259	9.9.1 代谢工程 .....	290
<b>9.2 宿主细胞选择</b> .....	260	9.9.2 DNA 重排和基因组重排 .....	291
<b>9.3 获得目的基因</b> .....	261	<b>9.10 基因工程的应用与发展前景</b> .....	291
9.3.1 PCR 法 .....	262	练习题 .....	293
9.3.2 获得原核生物目的基因 .....	263	<b>第十章 动物细胞培养工程</b> .....	295
9.3.3 真核生物目的基因的获得 .....	265	<b>10.1 哺乳动物细胞培养的特征</b> .....	295
<b>9.4 基因工程载体</b> .....	266	<b>10.2 建立哺乳动物细胞株</b> .....	297
9.4.1 用于原核生物宿主的载体 .....	266	10.2.1 组织细胞分离法 .....	297
9.4.2 用于真核生物宿主的载体 .....	269	10.2.2 杂交瘤细胞株的建立方法 .....	298
9.4.3 用于植物宿主的载体 .....	271	10.2.3 常用的哺乳动物细胞株 .....	299
9.4.4 用于动物宿主的载体 .....	273	<b>10.3 哺乳动物细胞培养基设计</b> .....	300
9.4.5 基因工程载体的设计 .....	273	10.3.1 哺乳动物细胞培养基的基本要求 .....	300
9.4.6 质粒设计对目的基因表达的影响 .....	275	10.3.2 无血清培养基设计 .....	301
9.4.7 目的基因的高效分泌型表达 .....	276	<b>10.4 哺乳动物细胞培养方法和</b>	
<b>9.5 目的基因与载体 DNA 的连接</b> .....	277	反应器 .....	302
9.5.1 黏性末端 DNA 片段的连接 .....	277	10.4.1 哺乳动物细胞的贴壁培养 .....	302
9.5.2 非互补黏性末端或平端 DNA 片段		10.4.2 贴壁生长哺乳动物细胞的微载体	
的连接 .....	277	培养技术 .....	303
<b>9.6 目的基因导入宿主细胞</b> .....	279	10.4.3 哺乳动物细胞的悬浮培养 .....	304
9.6.1 转化 .....	279	<b>10.5 哺乳动物细胞培养过程的传质</b>	
9.6.2 转导 .....	280	和反应动力学 .....	307
9.6.3 显微注射 .....	280	10.5.1 哺乳动物细胞培养过程的传质 .....	307
9.6.4 高压电穿孔法 .....	280	10.5.2 哺乳动物细胞培养过程的动力学 .....	307
9.6.5 多聚物介导法 .....	281	<b>10.6 哺乳动物细胞培养的产物</b> .....	308
9.6.6 粒子轰击法 .....	281	10.6.1 单克隆抗体 .....	309
<b>9.7 重组体的筛选</b> .....	281	10.6.2 免疫调节剂 .....	309
9.7.1 利用抗生素抗性基因筛选 .....	282	10.6.3 病毒疫苗 .....	309
9.7.2 营养缺陷互补法筛选 .....	282	10.6.4 生长激素 .....	309
9.7.3 核酸杂交法筛选 .....	283	10.6.5 酶 .....	310
9.7.4 通过免疫反应筛选 .....	283	<b>10.7 干细胞技术</b> .....	310
9.7.5 通过酶活性筛选 .....	283	10.7.1 干细胞分类 .....	310
<b>9.8 目的基因的高效表达</b> .....	284	10.7.2 干细胞的分离与培养 .....	311
9.8.1 宿主细胞培养基设计和培养条件		10.7.3 干细胞研究进展 .....	312
优化 .....	284	10.7.4 干细胞的应用前景和障碍 .....	314
9.8.2 利用细胞培养工程手段提高基因		<b>10.8 组织工程</b> .....	315
表达水平 .....	285	10.8.1 组织工程概述 .....	315
9.8.3 提高基因工程菌的质粒稳定性 .....	285	10.8.2 组织工程的构建 .....	316
9.8.4 重组菌的高密度培养 .....	287	10.8.3 组织工程的展望 .....	318
9.8.5 减少乙酸等抑制性副产物的形成 .....	288		



练习题 .....	319	11.4.2 利用植物细胞培养生产天然色素 ...	334
<b>第十一章 植物细胞培养工程</b> .....	321	<b>11.5 植物细胞培养的发展趋势</b> .....	335
<b>11.1 植物细胞培养的细胞生理特性</b> ...	321	11.5.1 建立和选择高产植物细胞系 .....	335
<b>11.2 植物细胞株的建立与培养</b> .....	323	11.5.2 植物组织化培养 .....	335
11.2.1 愈伤组织的诱导与培养 .....	323	11.5.3 固定化细胞技术 .....	336
11.2.2 植物细胞培养的基本条件 .....	324	11.5.4 产物促进释放技术 .....	336
<b>11.3 植物细胞培养的生物反应器和</b> <b>工艺</b> .....	326	11.5.5 产物合成与分离耦合过程 .....	336
11.3.1 植物细胞培养的生物反应器 .....	326	练习题 .....	336
11.3.2 植物细胞培养工艺 .....	329	<b>主要参考书目</b> .....	338
<b>11.4 植物细胞培养的应用</b> .....	331	<b>主要学术期刊</b> .....	339
11.4.1 利用植物细胞培养进行药物生产 ...	332	<b>索引</b> .....	341

# 第一章

## 绪 论

发展现代生物技术对国民经济和人们生活的重要性已经为各国的政治家、科学家、经济学家、企业家及普通百姓所认识。生物技术已经在事关人类健康、能源、资源及环境等重大问题上做出重要贡献并将在今后的岁月中发挥更大的作用。应该强调的是：几乎所有的通过生物技术获得的产物都需要通过这样或那样的生物反应过程才能获得，生物反应过程的效率对生物技术产物的商品化生产具有至关重要的意义。学习生物反应工程的目的就是：掌握生物反应的一般规律，为生物技术从实验室的研究成果尽快转化为商品化生产提供可靠的设计和服务。

顾名思义，生物反应工程是一门生物学、化学和工程学的交叉学科(图 1.1)，是一门专门研究将生物或生物的一部分(如酶、细胞或组织)作为催化剂参与反应过程的工程科学。生物反应工程具有化学反应工程的一般规律，例如，生物反应过程符合质量守恒和能量守恒，所有生物反应过程都由基元反应组成，反应速率符合质量作用定律，化学反应工程中关于均相和非均相催化反应的理论原则上都能够应用于生物反应工程。同时，生物反应工程又具有特殊性，例如，催化生物反应的催化剂是酶蛋白、细胞或组织，因此蛋白质、细胞或组织的性质对生物反应具有重要的影响。特别值得指出的是：当活细胞作为催化剂时，催化剂的数量和性质都是不断变化的；细胞代谢产物的合成往往需要通过一系列的酶催化反应才能完成，受到严格的

调节和控制，而且与细胞本身的生长紧密地结合在一起。因此，生物反应工程，特别是细胞参与

的生物反应工程，与传统的化学反应工程有着很大的差别。

经过一个多世纪的研究和实践，化学反应工程已经比较成熟，建立了比较完整的化学反应理论和数学模型，在反应器的设计和放大方面积累了丰富的经验。这主要得益于化学家和工程科学家的学科交叉和共同努力，他们具有共同的知识背景，有类似的思维方法、研究手段和共同语言，与应用有着密切的联系。因此从现代化学工业启动的时代开始，化学家与工程科学家就携手从事研究和开发，将一种又一种的化工新产品迅速地推向了市场，为世界经济的发展和人民生活水平的提高做出了重要的贡献。

与之相比，生物科学家与工程科学家之间的合作却不是那么理想。首先是两者的知识背景存在着很大的差别，生物学家的研究对象是活的生物体，他们需要具备关于生物体的所有知识，如生物的分类、结构、遗传、繁殖、生长、代谢等等。而工程科学家所习惯的是无生命的机器设备、管道、仪表及描述它们的各种数学模型等，两者缺乏共同语言。其次，两者的研究方法也存在着

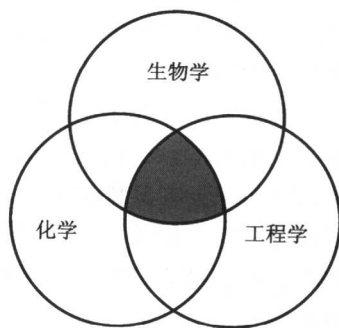


图 1.1 生物反应工程是生物学、化学和工程学的交叉学科

很大的不同,面对复杂的生物,生物学家需要有丰富的想像力,提出各种可能的假设,设计精细的实验方法去证明这些假设的可能性,不能产生任何误差,生物学的许多伟大发现都是通过这样的方法实现的。而工程科学家面对的都是实实在在的物体,他们关心的是提高性能和效率,有时,为了能够描述这些对象的规律,甚至不得不提出许多理想化的简化假设,理论和实际的一些误差往往是被允许的。此外,生物学家与工程科学家之间的合作历史也要短得多,只是在最近的半个多世纪中,两者合作的必要性才显得越来越重要,他们之间的磨合还需要一个过程。

学习生物反应工程就是要培养既有很强的生物学和化学的背景,又具有工程知识的学科交叉型的人才,使他们能在生物技术产业化的事业中发挥独特的作用。我们要强调的是加强生物科学的学习和研究方法的训练,使他们真正掌握和理解尽可能多的生物学知识和方法,能够参与到生物技术产品和过程开发的全过程,并在过程分析、设备和工艺设计及放大、生产管理等方面发挥积极的作用。

## 1.1 生物反应工程的发展历史

必须强调指出的是:青霉素发酵过程的研究和开发促进了对生物反应工程的研究和生物化工这一交叉学科的诞生,青霉素发酵的成功也证明了只有生物学家与工程科学家的紧密合作才能促使生物技术的工业化。

在青霉素工业化生产以前,大规模的液体深层发酵工业产物主要是酒精和丙酮/丁醇,它们都属于厌氧发酵,发酵设备只是一个空的密闭容器(酒精发酵是一个微需氧过程,甚至连密闭的都不需要),只要在其中加入经灭菌的培养基并接入相应的微生物菌种,发酵就会开始,整个过程除了温度需要控制外,几乎不需要其他调节和控制就能顺利进行。其他传统生物技术的应用几乎都在食品领域,一般都属于固体或半固体发酵。对这些发酵过程,似乎没有建立生物反应工程的迫切需要。

1928年9月英国医生 Fleming 发现了青霉素,这一伟大发现不但为人类与致病微生物的斗争提供了强有力的武器,而且在青霉素的工业化过程中逐步形成了生物化工这门新兴学科。

1938年,Flory 和 Chain 重复了 Fleming 的工作并在实验室生产了少量的青霉素样品,他们将样品用于一位垂死的败血病人身上,取得了令人惊奇的效果,但是由于样品数量太少而最终未能挽救病人的生命,这使他们深切地认识到,只有能够大规模地生产青霉素才能将这一伟大发现在用于治病救人中发挥应有的作用。由于第二次世界大战爆发,他们在英国已经无法继续青霉素的研究,就转移到了美国。他们说服了美国的医药公司研究开发大规模生产青霉素的技术并引起了美国政府的重视,美国战争生产局委任了 Elder 博士协调青霉素的研发,组织了一大批知名的制药公司、研究所和大学分三个方向进行研究开发:青霉素的化学合成、固体发酵和液体深层发酵。最后证明,只有液体深层发酵才是青霉素工业化生产的正确道路。

在青霉素液体深层发酵的研究开发过程中,科学家与工程师们遇到了前所未有的困难:青霉素发酵属于好氧发酵,当时还不具备大规模好氧发酵的技术和设备,甚至没有现成的培养基成分可供参考;青霉素发酵的菌种是青霉(*Penicillium sp.*),属于丝状真菌,对剪应力敏感;按当时的发酵水平,青霉素的产量很低,只有约 0.001 g/L,必须尽快提高青霉素的发酵水平,而青霉素属于次级代谢产物,对于如何提高微生物次级代谢产物产量,当时还缺乏足够的知识和有效的方

法;低浓度、不稳定的产物则为产物的分离纯化提出了很高的要求,等等。

经过生物学家和工程科学家几年的共同努力,终于使青霉素在 1945 年投入了工业化生产,形成了每年生产足够十万病人使用的青霉素。在这一过程中,他们所获得的成就包括:筛选得到了新的青霉素高产菌株——产黄青霉(*Penicillium chrysogenum*),创立了微生物诱变育种的理论和方法,提高了产黄青霉生产青霉素的能力;设计了适合产黄青霉生长和青霉素合成的液体培养基,进一步提高了青霉素的产量;选择了搅拌通气发酵罐作为生物反应器,详细考察了反应器设计与微生物生长和产物合成的关系,确定了无菌空气的制备方法和通气方式,通过比较各种搅拌桨对发酵罐中混合和传质的影响,确定了六叶平板桨为最合适的搅拌桨;研究了影响氧传递的各种因素,建立了氧传质系数、搅拌桨输入功率与通气速率之间的关系,为搅拌发酵罐的设计和放大提供了基础理论和方法;建立了基于 pH 切换的液液萃取方法从发酵液中分离提纯青霉素的工艺路线。显然,这些成就奠定了生物化工和生物反应工程学科的基础。

自青霉素发酵工业化以后,其他抗生素也相继实现了商品化生产,各种氨基酸、核苷酸、有机酸、酶制剂和其他液体深层发酵产物纷纷加入到了工业化生产名单。到了 20 世纪 80 年代,基因重组蛋白质和动植物细胞培养产物也开始商品化生产,生物技术产物的名单越来越长,应用领域越来越宽,生物反应工程的研究也日益完善,在生物技术产业化过程中正起着越来越重要的作用。

## 1.2 生物反应工程的范畴

### 1.2.1 酶催化反应动力学

对酶催化反应动力学的研究开始于 20 世纪初,早在 1902 年, Henri 就针对酶催化反应的特点提出了单底物酶催化反应动力学公式,他建立的数学模型虽然在形式上与 Michaelis 和 Menten 于 1913 年推导得到的公式一致,但只是一个经验公式。Michaelis 和 Menten 首先提出了单底物酶催化反应先形成酶-底物络合物的机理,并在适当的假设条件下(快速平衡假设和底物浓度大大高于酶浓度的假设)推导出了著名的 Michaelis-Menten 动力学公式,奠定了现代酶催化反应动力学的基础。Michaelis-Menten 动力学公式又称为饱和动力学,无论在形式上还是在推导方法上都借鉴了多相化学催化动力学的 Langmuir-Hinshelwood 公式。然后, Briggs 和 Haldane 提出了拟稳态假设,推导得到了与 Michaelis-Menten 动力学公式形式完全一致的公式。从此以后,快速平衡和拟稳态假设就成了推导更复杂的酶催化动力学公式的基本方法,用于各种抑制动力学、多底物催化动力学及变构酶催化反应动力学公式的推导。与此同时,对酶稳定性的研究导致了酶失活动力学公式的建立。

20 世纪 50 年代固定化酶的研究成功为酶的应用开辟了新的领域,同时也吸引了一批科学家开展了固定化酶催化动力学的研究,他们借用了化学反应工程中多相催化反应动力学的研究成果,将“有效因子(effectiveness factor)”的概念成功地移植到了固定化酶催化反应动力学中传质对反应速率的影响。

由于酶具有催化剂的所有特征,在酶催化反应动力学中采用了大量化学催化动力学的研究成果就可以理解了。当然,也不能完全照搬,还必须充分考虑到酶的蛋白质本质,例如,酶蛋白的

稳定性、变构性及对辅酶和辅因子的需求等。

### 1.2.2 高产细胞株的获得和保持

获得高产细胞株往往是生物技术产业化的关键。自然界有着十分丰富的微生物和动植物细胞资源,它们在代谢过程中会合成各种代谢中间产物和最终产物,其中某些产物具有十分重要的价值,是生物技术的目标产物,如药物、酶制剂、氨基酸、核苷酸、有机酸、溶剂等。但是在天然获得的细胞株中,由于细胞本身具有的调节和控制机理,使得这些产物的合成仅限于满足细胞生长和代谢的生理需要,除少数例外(如酵母发酵生产酒精及谷氨酸棒杆菌发酵生产谷氨酸等),目标产物的产量是很低的,无法满足商品化生产的需要。

微生物发酵高产菌株的选育已经有了较悠久的历史,积累了丰富的经验,形成了一套行之有效的筛选和诱变育种方法,包括采样点选择、筛选平板设计、诱变方法及诱变剂量确定等。这些方法的目的是改变微生物的遗传特点,使它们能大量积累目标产物。这些方法已经在抗生素产生菌的大规模选育中获得了成功。目前传统的诱变育种方法仍广泛用于高产菌株的选育,并正在向高通量筛选的方向发展,以提高筛选工作的效率。

由于微生物基因组学、蛋白质组学和代谢组学的研究进展,已经有越来越多的科学家将分子生物学的手段应用到高产菌株的构建中。只要知道了目标产物合成的代谢途径及影响产物合成的关键酶或调节基因,就可以通过克隆技术将有关基因进行克隆或敲除,从而大幅度提高目标产物的产量。代谢工程、基因重排、基因组重排等新技术在高产菌株选育中已经崭露头角,发挥了出色的作用。

动植物细胞株的获得要比微生物细胞更困难,直接从动植物组织得到的细胞株不具备高产目标产物的能力。一般而言,植物细胞可以采用与微生物细胞类似的方法进行选育,动物细胞则主要采用基因重组或杂交技术。

从工业化生产的角度考虑,高产细胞株应该具有以下性质:

- 1) 目标产物的产量应尽可能高。在同样培养成本的条件下,产量越高意味着生产成本越低,产品的竞争力就越强。
- 2) 细胞的生长速率快、培养周期短并有良好的流变性能,应该尽可能利用价格低廉、来源广泛的培养基,以降低培养成本。
- 3) 优先选择产物释放到细胞外的细胞株,可以降低产物积累对细胞生长的抑制作用,同时也将有利于产物的分离提纯。
- 4) 高产细胞株应具有良好的遗传稳定性,不容易退化或发生质粒丢失,有良好的抗噬菌体性能。
- 5) 选择安全、无毒的宿主细胞。

从以上这些要求看,许多问题都需要生物科学家和工程科学家的共同努力。特别要强调的是工程技术人员应该在高产菌株选育时就参加有关的工作,从工程角度对细胞株的筛选提出要求和建议,只有这样才能起到事半功倍的效果;同时,生物科学家也应该深入到工业化生产过程中,结合高产菌株的特点共同开展培养基和培养条件的优化,对保持高产菌株的遗传性能稳定提供指导,根据实践中发现的问题对菌种进行改进。只有通过两者的紧密合作,才能最大限度地发挥高产菌株的优势并不断提高目标产物的产量。

### 1.2.3 细胞生长和代谢产物合成动力学

细胞有着自己的生命循环。在适当的条件下,细胞经历着生长—繁殖—死亡的生命周期。在一个封闭体系(如间歇生物反应器)内,只要有足够的营养物质,细胞就会代谢营养物质,不断地合成细胞物质并释放出代谢产物,直至营养物质消耗殆尽或代谢副产物的积累抑制了细胞生长为止。因此如果将细胞看成是一种生物催化剂,那么催化剂的性质和数量都处于不断变化的动态过程中。细胞本身又是一个十分复杂的生物反应器,在活细胞内同时发生着成千上万个酶催化的化学反应,这些反应的速率和方向受到严格的调节和控制,而且与环境有着密切的联系。随着人类基因组计划和许多动植物与微生物基因组测序的完成,基因组学、蛋白质组学和代谢组学研究的迅速发展,已经对细胞生长和代谢的奥秘有了深入的了解,有可能建立起完整地描述细胞的代谢网络,分离提纯细胞中合成的酶并研究它们的酶学性质和酶催化反应速率,各种代谢中间产物的合成及消耗规律等等。但是,即使是最简单的细胞,如大肠杆菌,要建立完整的细胞生长和代谢模型,目前也不可能做到,而且也没有必要。细胞内反应的总结结果是细胞的生命循环及各种代谢产物的合成,从工业生物技术的角度考虑,更关心的是细胞和代谢的宏观变化规律及其与环境的相互作用。因此,目前所有的关于细胞生长和代谢产物合成动力学模型都或多或少属于黑箱模型。

在 20 世纪 40 年代以前,生物技术的品种类少、规模小,主要集中在传统的食品工业和几种厌氧发酵产品,对细胞生长和代谢产物合成动力学基本上属于空白,值得一提的只有 Verlhurst 于 1844 年提出,后又被 Peer 和 Reed 于 1920 年改进的描述细胞间歇培养的经验模型。1949 年,Monod 首先在恒化器中进行单细胞微生物的培养时观察到了比生长速率与底物浓度之间存在着与单分子吸附动力学和单底物酶催化动力学类似的饱和现象,提出了著名的 Monod 公式。Monod 公式的实质是将影响细胞生长速率的关键代谢途径中关键酶催化反应速率用于描述极其复杂的细胞生长速率。在 Monod 公式提出后,出现了许多与酶催化反应动力学类似的修正公式,如考虑产物抑制和底物抑制的各种细胞比生长速率公式等。与此同时,人们发现,用 Monod 公式也可以描述细胞在间歇培养时的规律。在间歇培养时,细胞量与培养时间往往呈现与逻辑曲线类似的形状,而 Monod 公式与物料恒算公式结合就能够获得逻辑曲线公式。这些最简单的黑箱模型至今仍广泛用于细胞生长、底物消耗及代谢产物合成动力学,被称为非结构、非分立(unstructured-nonsegregated)的动力学。

由于非结构、非分立的黑箱动力学模型过度简化了复杂的细胞生长和代谢过程,因此无法对许多实验现象进行解释。例如,在间歇培养时的指数生长阶段,细胞数目的增加与细胞体积的增加不成正比,由于细胞的快速分裂,细胞的个体体积却变得越来越小,显然 Monod 公式无法描述这种现象,而由 Williams 提出的两室结构模型就能很好地解决这个问题,以后又发展成更合理的三室及四室模型等。又如,为了描述酵母细胞好氧培养时细胞分裂、呼吸、和乙醇合成之间的复杂关系,必须在动力学模型中考虑能量代谢,这样就有必要建立更为详细的代谢模型。这些都属于结构模型(structured model)。

事实上,每个细胞个体都具有不同的性质,是独立的生物反应器,如果将细胞的个体性质差异也包括在动力学模型中,这样的模型就属于分立模型(segregated model)。

显然,细胞生长模型考虑的因素越多,模型就越接近真实情况,但是无论如何复杂,所建立的

模型仍将建立在许多简化假设的基础上,而随之带来的问题是模型越复杂,所包含的需要从实验数据确定的可调节参数也越多,使用起来就越不方便,模型也越专一,缺乏普遍意义。因此,一个好的细胞生长和代谢的动力学模型应采用尽可能少的可调节参数而且有尽可能广的使用范围。

#### 1.2.4 传质对生物反应的影响

在均相化学反应过程中,反应物和产物都存在于同一相中,特别是在混合良好的反应体系内,参与反应的各组分在反应器的每一点浓度都相同,根据质量作用定律,反应速率也处处相同,因此不需要考虑传质的问题,宏观反应速率就等于本征(intrinsic)反应速率。在水相中游离酶催化的均相反应就属于这一类型。

在其他生物反应过程中,如有机相酶催化反应、固定化酶催化反应及所有与细胞有关的生物反应,都属于多相催化的范畴,或多或少地存在着传质的影响。与化学反应工程类似,传质对反应的影响也可以分为三种类型:

传质速率大大高于化学反应速率——化学反应速率控制;

传质速率大大低于化学反应速率——传质速率控制;

传质速率与化学反应速率相当——需要同时考虑化学反应速率和传质速率。

显然,前两种类型比较简单,可以用均相化学反应理论或质量传递理论处理,第三种情况就比较复杂,特别是与细胞有关时传质对细胞生长和代谢的影响就更加复杂。一般而言,为了提高生物反应过程的效率,应该尽可能降低直至消除传质对生物反应的影响,这样就需要尽可能地强化传质。好氧细胞培养是最常见的过程,氧传递速率往往是最重要的传质问题。但是,强化氧传递却受到许多因素的限制,如氧在水溶液中的溶解度很小,影响了传质推动力;增加剪切力能够提高氧传质系数和相界面积,但将增加功耗,更重要的是细胞,特别是丝状菌和动植物细胞往往对剪切力十分敏感,等等。因此,在生物反应器的设计和放大时,传质与剪切力之间的平衡就成了影响细胞生长和代谢产物合成的关键问题。

#### 1.2.5 生物反应器和操作模式

用于酶催化反应的生物反应器与化学反应器类似,均相的游离酶催化一般采用搅拌罐式,操作方式一般为间歇式(分批式)。由于游离酶催化过程的酶回收利用较困难,仅适用于价格低廉、来源丰富的酶。固定化酶催化则以固定床反应器最为常用,也可以采用搅拌罐及流化床生物反应器,适合于连续操作。近年来,酶膜生物反应器的发展很快,已经实现了工业应用。描述酶催化反应器的理论和数学模型基本上都来源于化学反应工程,在化学反应工程中发展得比较成熟的理论都可以借鉴,如反应器的混合、微混合、停留时间分布、径向和轴向弥散等。当然,在酶催化反应器的选型、设计和操作中,必须充分考虑酶的蛋白质属性。

虽然搅拌罐仍然是工业上细胞培养生物反应器的主要形式,其他类型的生物反应器的应用正在逐步扩大,如气升式反应器、鼓泡式反应器、流化床反应器、膜生物反应器等。生物反应器是细胞进行生长和代谢的地方,因此反应器的设计应该满足细胞生长对环境的要求,如各种营养物质、温度、压力、pH、溶氧水平、剪切力等。生物反应器的放大是一个十分复杂的问题,虽然许多人对此进行了深入研究,也提出了一些具有指导意义的理论和原则,放大问题至今仍需要经验及逐级放大的数据,利用数学模型进行放大将要承担相当大的风险。

生物反应器的操作模式可以分为连续、间歇及介于两者之间的流加培养三类,其中后两类更适合于工业规模生产。选择操作模式的主要依据是细胞的遗传稳定性、底物或产物抑制、产物合成与细胞生长的关系、杂菌污染控制等因素。

## 1.3 生物反应工程的应用

### 1.3.1 酶催化反应工程的应用

酶作为生物催化剂具有高效、高专一性及反应条件温和等显著优点,已经广泛应用于工业、医药、食品和日常生活等各个领域(图 1.2 及图 1.3)。酶催化反应的规模相差悬殊,有些产物的产量高达千万吨,如淀粉水解生产葡萄糖及葡萄糖异构化生产高果糖浆;有些则只有数毫克甚至微克,如酶电极,但它们都遵循类似的动力学规律。酶催化反应的产物具有多样性,包括医药及医药中间体、大宗化学品及精细化学品、食品及食品添加剂等。

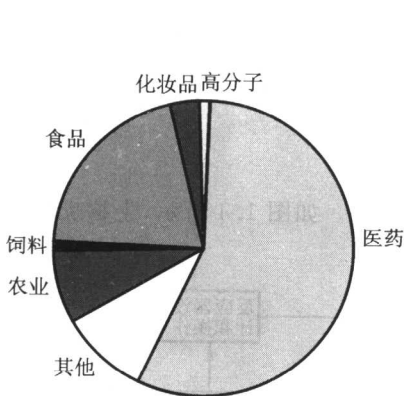


图 1.2 酶催化应用领域示意图

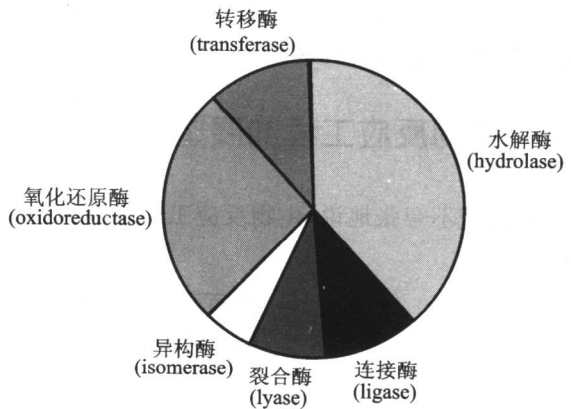


图 1.3 应用于酶催化反应的各类酶比例示意图

固定化酶技术已经日益成熟,有机相酶催化技术正在推广应用,酶在手性化合物合成和拆分中的特殊优越性得到了广泛的认同。蛋白质工程及 DNA 进化的研究成果将赋予酶新的性质和功能,基因重组技术为提高酶制剂的生产水平提供了有力的工具。基因组计划和对极端酶的研究为新的、具有特殊功能酶的发现开拓了光明的前景。酶催化应用领域的拓展也将为酶催化反应工程的发展提供广阔的舞台。

### 1.3.2 细胞培养工程的应用

细胞培养是获得生物技术产品的主要方式,即使是作为生物催化酶剂的酶,主要也是通过细胞培养获得的。目前,植物细胞培养获得的产物数量很少,规模也不大,只有紫草醌、紫杉醇等几种,主要原因是植物细胞培养的产物都是所培养细胞株的次级代谢产物,因此必须与种植植物中分离提取的方法竞争。动物细胞培养的产物都是具有高价值的蛋白质类医药或诊断试剂,由于



哺乳动物细胞培养获得的蛋白质能得到较好的翻译后修饰,具有较高的生物活性,因而产品具有很强的竞争力。

微生物细胞的多样性决定了产物的多样性。理论上说,各种微生物细胞培养过程中所有代谢中间产物和终产物都有可能成为细胞培养的目标产物,通过代谢工程等手段,还可改造微生物的代谢途径,使它们能够代谢非天然的底物,获得新的产物。目前微生物发酵所能获得的产物谱已经非常广,包括酶及其他蛋白质类、核酸及核苷酸类、酯类及多糖类、初级代谢产物(醇、有机酸、氨基酸等)及范围广泛的次级代谢产物(如抗生素、维生素、甾类化合物等)。这些产物在医药、能源、新材料、食品、轻工、农业及环境等领域起着十分重要的作用。

微生物培养所用的主要原料是农副产品,属于可再生的生物质资源,取之不尽、用之不竭,而且数量巨大,为微生物发酵产品的生产提供了丰富而且廉价的原料。随着世界范围内能源供应紧张的状况不断加剧,利用生物质资源通过微生物转化获得新的清洁能源和平台化合物已经引起了各国政府、学术界和企业界的重视,大规模发酵工业的兴建将对生物反应工程提出新的、更高的要求。

目前已经利用的微生物只占微生物世界很小的一部分,许多微生物及它们的代谢产物还有待于发现,特别是那些在极端条件下生长的微生物,将为新药发现、新生物催化剂研制及新的代谢产物生产创造新的机遇。

## 1.4 生物反应工程的展望

可以毫不夸张地说,生物反应工程是生物技术产业化的核心。如图 1.4 所示,生物反应工程

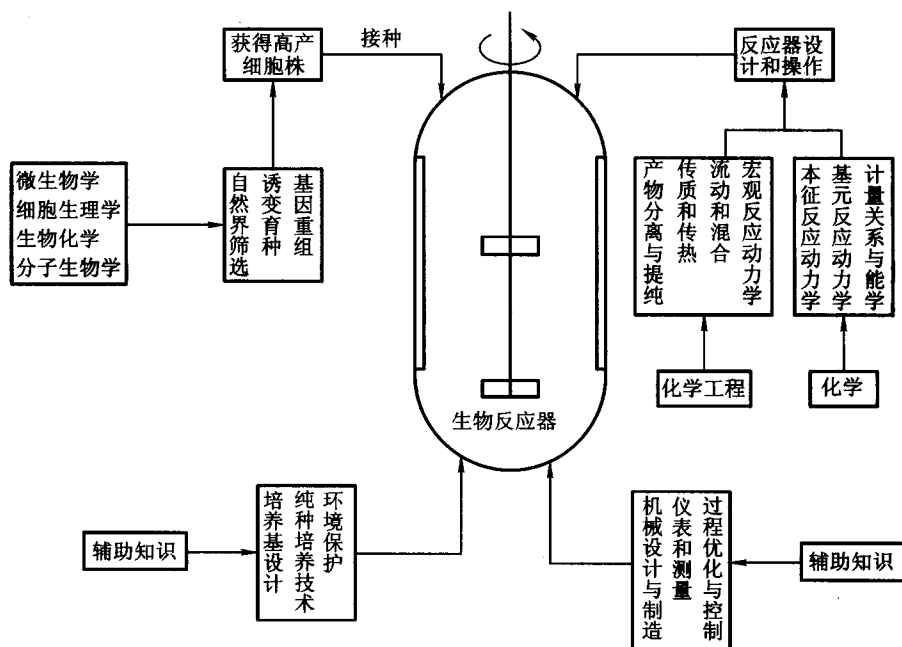


图 1.4 生物反应工程与相关学科的关系