

叶勤 编著

发酵过程原理



Chemical Industry Press



化学工业出版社

现代生物技术与医药科技出版中心

发酵过程原理

叶 勤 编著



化学工业出版社
现代生物技术与医药科技出版中心

· 北 京 ·

(京) 新登字 039 号

图书在版编目 (CIP) 数据

发酵过程原理/叶勤编著. —北京: 化学工业出版社,
2005. 4
ISBN 7-5025-6916-2

I. 发… II. 叶… III. 发酵-理论 IV. TQ920.1

中国版本图书馆CIP数据核字 (2005) 第 035107 号

发酵过程原理

叶 勤 编著

责任编辑: 郎红旗 孟 嘉 李 丽

责任校对: 李 林

封面设计: 关 飞

*

化 学 工 业 出 版 社
现代生物技术与医药科技出版中心 出版发行

(北京市朝阳区惠新里 3 号 邮政编码 100029)

发行电话: (010) 64982530

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

*

新华书店北京发行所经销

北京永鑫印刷有限责任公司印刷

三河市前程装订厂装订

开本 720mm×1000mm 1/16 印张 16 $\frac{1}{4}$ 字数 304 千字

2005 年 6 月第 1 版 2005 年 6 月北京第 1 次印刷

ISBN 7-5025-6916-2

定 价: 30.00 元

版权所有 违者必究

该书如有缺页、倒页、脱页者, 本社发行部负责退换

前 言

发酵是一项古老的技术，我们的祖先很早就掌握了酿酒、制醋、发面等发酵方法，不过由于对发酵机理缺乏了解，发酵技术的进展非常缓慢。20世纪40年代青霉素发酵的产业化，极大地推动了发酵工业的发展，并催生了生化工程学科，给发酵过程的研究和优化奠定了基础。20世纪70年代以来分子生物学和基因操作技术的发展，为对微生物代谢进行改造、利用微生物生产各种有用代谢物、合成高价值的药用蛋白和酶创造了条件。

发酵的生产水平主要决定于生产菌株的特性、发酵的工艺条件和发酵罐的性能。对于给定的菌株，采用适当的发酵工艺，给微生物提供良好的生活环境，可以充分发挥菌种的生产性能，提高发酵的生产水平，而采用性能优良的发罐并对发酵过程进行有效的控制，是发酵工艺实施的保证。

发酵工艺的建立应以对发酵过程的研究为基础。为适应对发酵过程进行研究的需要，本书介绍了发酵过程的物料平衡和动力学分析的方法，影响发酵过程（包括基因工程菌发酵）的因素，以及发酵过程优化和放大的方法及一些实例，适于生物化工、发酵过程等专业的研究生和从事发酵的科研和技术人员阅读。

本书在编写中引用了一些知名期刊发表的资料，得到美国化学会（American Chemistry Society）及美国化学工程师学会（American Institute of Chemical Engineers）、美国微生物学会（American Society for Microbiology）、日本生物工程学会（The Society for Biotechnology, Japan）、纽约科学院（New York Academy of Sciences）、英国化工学会（Society of Chemical Industry）以及Springer-Verlag、Kluwer Scientific、Wiley、Elsivier、Humana等出版社的许可和支持，在此一并致谢。

本书的编写得到上海市重点学科基金的部分资助。

叶 勤

于华东理工大学

生物反应器工程国家重点实验室

2005年1月

目 录

第1章 绪论	1
1.1 发酵的产品	1
1.1.1 菌体	1
1.1.2 代谢产物	3
1.2 发酵的流程	4
1.3 发酵过程的研究	6
1.4 发酵过程的检测	8
1.5 发酵过程研究的发展方向	9
参考文献	11
第2章 发酵过程中能量和物质平衡	13
2.1 生长过程涉及的能量代谢	13
2.1.1 生物反应的自由能变化	13
2.1.2 化能自养微生物的生长	15
2.1.3 异养微生物的生长	16
2.1.3.1 在复合培养基中的生长	16
2.1.3.2 在基本培养基中的生长	17
2.2 菌体生长的得率	18
2.2.1 以底物消耗为基准的菌体得率	18
2.2.2 以可利用电子数为基准的菌体得率	20
2.2.3 以异化代谢能量为基准的菌体得率	20
2.2.3.1 复合培养基	20
2.2.3.2 基本培养基	21
2.2.4 以总有效能量为基准的菌体得率	22
2.2.5 以ATP为基准的菌体得率	23
2.3 比速率	25
2.4 物料平衡	26
2.4.1 培养过程的化学计量关系	26

2.4.2	碳平衡	29
2.4.3	电子当量平衡	29
2.4.4	氧平衡	30
2.5	生长的动力学	31
2.5.1	碳源利用	31
2.5.1.1	基本培养基	31
2.5.1.2	复合培养基	33
2.5.2	ATP生成	33
2.5.3	呼吸与生长	34
2.6	热量平衡	34
	参考文献	37

第3章 发酵的操作方式 38

3.1	分批培养	38
3.1.1	菌体的生长	39
3.1.1.1	延迟期	39
3.1.1.2	指数生长期	42
3.1.1.3	减速期	42
3.1.1.4	静止期	43
3.1.1.5	衰亡期	44
3.1.2	底物的消耗	45
3.1.3	产物的生成	45
3.2	连续培养	46
3.2.1	单级连续培养	46
3.2.2	多级连续培养	51
3.2.3	菌体循环利用	53
3.2.4	连续培养的应用	56
3.2.4.1	菌体的生产	56
3.2.4.2	代谢产物的生产	57
3.2.4.3	发酵动力学研究	59
3.2.4.4	细胞生理特性的研究	61
3.2.4.5	培养基的改进	63
3.2.4.6	菌种的筛选和富集	64
3.2.4.7	微生物遗传稳定性的研究	66
3.3	补料分批培养	66

3.3.1	恒速流加	67
3.3.2	指数流加	71
3.3.3	限制性底物浓度线性增加	71
3.3.4	反复补料分批培养	74
3.4	培养与分离的耦合	75
3.4.1	透析与培养的耦合	75
3.4.1.1	连续培养-连续透析	76
3.4.1.2	分批培养-分批透析	79
3.4.1.3	分批培养-连续透析	79
3.4.1.4	透析培养实例	80
3.4.2	过滤和培养耦合	83
	参考文献	84

第4章 培养条件对发酵的影响 87

4.1	培养基	87
4.1.1	碳源	88
4.1.2	氮源	90
4.1.3	其他成分	97
4.1.3.1	磷	97
4.1.3.2	前体	99
4.1.3.3	维生素	99
4.1.4	无机盐	101
4.2	温度	103
4.3	pH	106
4.4	通气与搅拌	108
4.4.1	氧的供应	108
4.4.2	二氧化碳的排出	115
4.4.3	摇瓶培养中的供氧	117
4.5	代谢产物	119
4.6	补料或流加	120
4.6.1	开环控制	120
4.6.2	闭环控制	121
4.7	其他	124
4.7.1	种子培养	124
4.7.2	菌体形态	125

4.7.3	渗透压	126
4.7.4	产物的稳定性	126
4.7.5	灭菌	128
4.7.6	细胞间的相互作用	131
	参考文献	132
第5章	基因工程菌的发酵	137
5.1	基因工程菌的稳定性	137
5.1.1	培养条件的影响	138
5.1.1.1	培养基	138
5.1.1.2	比生长速率	141
5.1.1.3	外源基因的表达	142
5.1.1.4	其他培养条件	145
5.1.2	发酵过程中群体组成的变化	148
5.2	影响外源基因表达水平的因素	153
5.2.1	培养基	153
5.2.2	比生长速率	156
5.2.3	培养条件	159
5.2.3.1	溶氧	159
5.2.3.2	温度	161
5.2.3.3	pH	164
5.2.4	外源基因表达的诱导强度	166
5.2.5	代谢副产物的影响	167
5.3	基因工程菌的高密度发酵	167
5.3.1	高密度发酵	168
5.3.2	代谢副产物生成的防止	170
5.3.2.1	限制碳源的供应	170
5.3.2.2	碳源种类的选择	172
5.3.2.3	微量元素的补充	172
5.3.3	基因工程菌高密度发酵实例	173
5.3.3.1	α 干扰素发酵	173
5.3.3.2	中性蛋白酶发酵	175
5.3.3.3	血管生长抑制素发酵	176
	参考文献	179

第6章 发酵过程的优化与放大	183
6.1 培养基	183
6.1.1 限制性底物	184
6.1.2 连续培养优化培养基	184
6.1.3 多因素优化法	188
6.1.3.1 正交法	188
6.1.3.2 均匀分布法	189
6.1.3.3 响应面法	190
6.2 发酵过程的操作与控制	191
6.2.1 通气和搅拌	191
6.2.2 补料	193
6.2.2.1 根据模型流加	193
6.2.2.2 碳源的限制性流加	196
6.2.2.3 周期补料	199
6.2.2.4 带放	199
6.3 发酵过程的优化	201
6.3.1 发酵动力学模型	201
6.3.1.1 干扰素发酵	202
6.3.1.2 青霉素发酵	202
6.3.1.3 头孢菌素发酵	204
6.3.2 人工神经网络	210
6.3.3 细胞的代谢流分布	214
6.4 发酵中变量的相关性研究	220
6.5 发酵过程的放大	227
6.5.1 传统方法	227
6.5.2 混合的影响	230
6.5.3 生产菌株的稳定性	235
6.5.4 培养基灭菌的影响	236
6.5.5 放大中操作及工艺的调整	236
6.5.5.1 密比霉素发酵放大	237
6.5.5.2 pneumocandin 发酵	238
6.5.5.3 bialaphos 发酵	239
6.5.5.4 ML-236B 发酵	240
6.5.6 大型发酵罐中发酵过程的模拟	242
参考文献	245

第 1 章

绪 论

发酵是微生物在一定的培养环境中生长并形成代谢产物的过程。原本发酵只是指微生物在厌氧条件下,将有机物不完全氧化为一些代谢产物而获取能量进行生长的过程,不过现在把微生物的好气培养也归入发酵。随着人类对微生物认识的加深,微生物资源的开发日益深入,发酵工业提供了越来越丰富的产品,为人们生活质量的提高作出了重大贡献。

几千年前,现代人的祖先已经掌握酿酒、发面、制醋等技术,经过一代一代的作业者逐渐加以改良,改善了人类的生活。不过,由于根本不了解的发酵机理,发酵技术的进步受到很大的限制。18世纪微生物的发现,大大促进了发酵业的发展。20世纪40年代由微生物学家和化学工程师的通力合作实现了青霉素的产业化^[1],极大地推动了现代发酵工业的发展,并促使生化工程这一学科的诞生。近年来,分子生物学和基因重组技术的发展为利用微生物生产异源蛋白和构建高产菌种创造了条件,给发酵工业带来了新的发展机遇。

1.1 发酵的产品

1.1.1 菌体

发酵产品的种类繁多,包括微生物菌体和微生物的代谢产物。19世纪已有生产酵母菌体的工业发酵过程,并采用通气和补料的技术。活性酵母菌用于发面,干酵母也用作提供营养和帮助消化的药物。20世纪70年代出现了微生物单细胞蛋白生产,将一些微生物作为食品或饲料,近年来如螺旋藻等光自养微生物的大规模培养也有很大的发展,藻体细胞用于营养保健或提取有关细胞成分(如类胡萝卜素等)。

一些微生物的菌体也用作生物转化的催化剂,涉及的反应较简单,转化率也较高。这样的反应若采用化学方法进行,反应步骤多、反应条件剧烈、得率低、立体选择性差,而采用特定的微生物可大大减少反应步骤,提高反应效率。例如从孕甾酮化学合成可的松需要30多步反应,若采用微生物反应只要3步。工业

发酵过程原理

上微生物转化用于甾体化合物的脱氢（图 1-1）、 11α 羟化、 11β 羟化、 16α 羟化、 19 羟化等，反肉桂酸氨化生成苯丙氨酸（图 1-2），山梨醇氧化为山梨糖、山梨糖再转化为古龙酸（合成维生素 C 的中间体，图 1-3）等。利用诺卡菌（*Nocardia*）或棒杆菌（*Corynebacterium*）可将环氧琥珀酸水解为 L-(+) 酒石酸，立体选择性非常高，转化率几乎达到理论值。

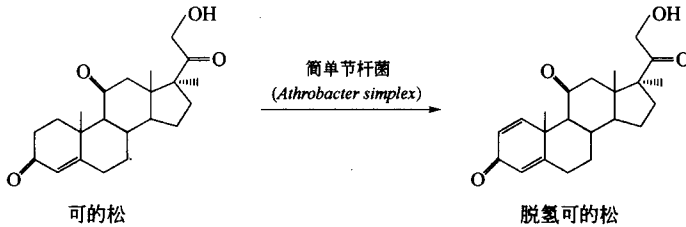


图 1-1 可的松脱氢生成氢化可的松

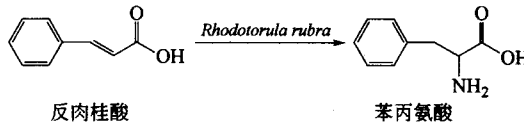


图 1-2 反肉桂酸氨化生成苯丙氨酸

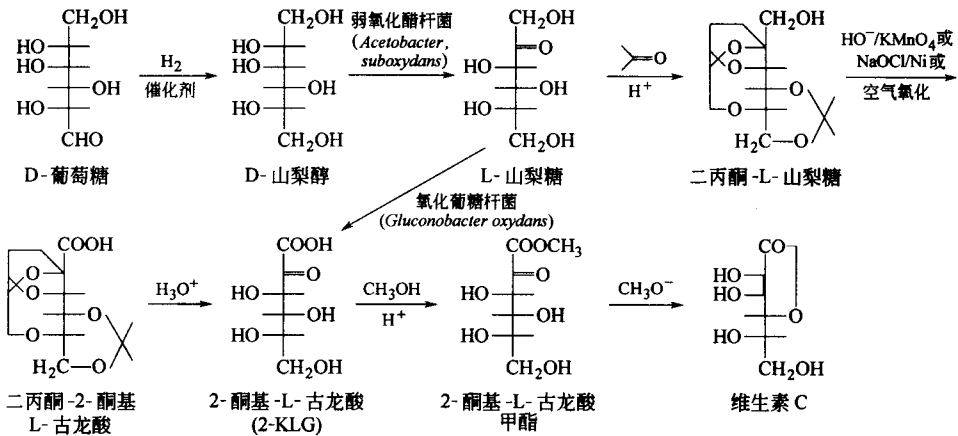


图 1-3 维生素 C 的合成路线

一些微生物的菌体可用作农药，如苏云金杆菌（*Bacillus thuringiensis*）芽孢的伴孢晶体对鳞翅目害虫有非常好的防治作用。此外，利用微生物可去除废水中污染的有机物、氮和磷，降解有害化合物（如 4-氯苯）等，虽然并没有提供具体的产品，但通过微生物的代谢活动消耗废水中的有机物或其他污染物，净化污水，保护人类的生存环境，其意义是非常深远的。

1.1.2 代谢产物

微生物的代谢产物构成了发酵的主要产品，种类繁多，包括初级代谢产物、次级代谢产物和大分子产物等，见表 1-1。初级代谢产物 (primary metabolite) 是指与微生物生长直接相关的中间代谢物，它们都是小分子化合物。次级代谢产物 (secondary metabolite) 或次生代谢物 (idiolite) 为与生长无关的特殊代谢物，一般分子量都不大。大分子产物包括酶、多糖、蛋白和可降解生物聚合物等。

表 1-1 发酵生产的微生物代谢产物

类别	产 品
初级代谢产物	
溶剂	乙醇,丙酮,丁醇等
有机酸	乙酸,柠檬酸,乳酸,衣康酸,丙酮酸等
氨基酸	谷氨酸,赖氨酸,苯丙氨酸,异亮氨酸,缬氨酸等
维生素	维生素 B ₂ , 维生素 B ₁₂ , 生物素等
核苷和核苷酸	肌苷,鸟苷,鸟苷酸,肌苷酸等
多元醇	甘油,1,3-丙二醇等
次级代谢产物	
抗生素	青霉素,链霉素,红霉素,头孢菌素,泰乐菌素,万古霉素等
免疫抑制剂	环孢菌素 A,雷帕霉素(riparmycin)等
降胆固醇药物	Lovastatin,Pravastatin 等
驱虫剂、杀虫剂	阿维菌素,依维菌素,多拉菌素等
植物生长调节剂	赤霉素
抗肿瘤药物	紫杉醇,多柔比星,道诺红菌素,丝裂霉素,平阳霉素等
大分子产物	
酶	α -淀粉酶,糖化酶,蛋白酶,脂肪酶,植酸酶,青霉素 G 酰化酶,各种基因工程用酶等
多糖	黄原胶,吉兰胶等
可降解生物聚合物	聚羟基丁酸(PHB),聚羟基烷酸(PHA)等
重组蛋白	胰岛素,干扰素,白细胞介素,乙型肝炎表面抗原等

利用微生物生产一些化学结构复杂、难以通过化学方法合成的化合物具有非常大的优势，如成本低廉、减少反应步骤、立体选择性好、反应条件温和、环境污染少等。Demain 指出，微生物发酵有许多优点：因具有很大的比表面积，微生物能快速摄取营养，支持高的代谢和生物合成速率；能进行的反应数量巨大；能适应从自然环境到摇瓶和发酵罐的不同环境，能利用廉价原材料生产有价值的产品；易进行遗传操作改进其生产能力；能进行特殊的手性化合物的合成^[2]。发酵工业提供了各种难以通过化学合成的具有复杂结构的化合物，许多发酵产品实际上已成为大宗化工产品，如柠檬酸、酒石酸、乳酸等有机酸，乙醇，甘油，谷氨酸、赖氨酸等氨基酸，青霉素以及多种酶制剂等。随着地球上石油等不可再生资源的消耗，利用可再生资源生产化工产品具有越来越重要的意义。如美国 2000 年生产的乙醇有 92% 是发酵法生产的，其中 90% 用于燃料，5% 用于工业，5% 用于饮料^[3]。

1.2 发酵的流程

根据发酵所用培养基的状态，发酵可分为固体发酵和液体发酵。固体发酵的培养基中自由水含量较低，常采用农副产品为原料，能量消耗少，成本低，一些产品的发酵可远远高于液体发酵的水平，但过程的控制、杂菌污染的避免等相对困难。固体发酵多用于初级代谢产物和酶等的生产，但也有很多关于次级代谢产物和生物活性物质生产的研究^[4,5]。固体发酵的反应器包括无强制通气的浅盘反应器、强制通气不搅拌的填充床反应器、强制通气间歇搅拌或连续搅拌的填充床反应器、间歇或连续搅拌转鼓反应器等^[6]。液体发酵中，微生物通常悬浮在培养基中（沉没发酵），好气发酵过程可通过通气和搅拌等操作供氧并驱散二氧化碳，由于发酵液的混合较均匀，发酵过程容易控制，杂菌污染也较易避免，发酵热的移走也较易实施，发酵罐的规模可达到非常大的程度。现在工业发酵多采用液体发酵的方式，发酵罐的规模可达几百立方米。液体发酵的反应器主要是机械搅拌式，也有采用气升式反应器的，其原理是利用通气产生的密度差引起液体的对流。和机械搅拌式反应器相比，其剪切作用小，能耗低，运行时产生的噪声小，维护简单，是一种具有发展潜力的反应器。

为了使高产菌株在发酵罐中很快进入目标产品的生产，通常先要将保存的菌种经斜面活化接入摇瓶培养，经多级种子罐扩大培养，最后接入发酵罐进行发酵生产，其流程见图 1-4。一些产孢子的菌株，可将制备的孢子悬液直接接入种子罐中，进行扩大培养。

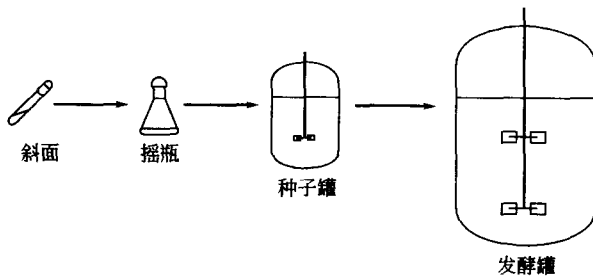


图 1-4 发酵流程图

好气发酵的发酵罐通常采用具有较大高径比（2：1~3：1）的带有机机械搅拌的罐体，为了实现较好的混合，在一根搅拌轴上通常需安装几个搅拌桨。Rush-ton 涡轮搅拌桨、弯叶涡轮搅拌桨和箭叶搅拌桨是传统的搅拌桨形式，近年来倾向采用大盘面比的轴向流搅拌桨，或与涡轮桨共用，以提高搅拌效果。搅拌轴可从罐顶穿出，也可从罐底穿出，穿出的部位采用机械密封装置，通有加压无菌润

滑剂的双端面机械密封可实现可靠的密封。发酵罐内还安装数块垂直挡板，以消除旋涡，提高混合效果。发酵罐底部设有空气管导入空气，其形式可为一开口管，也可做成环形的分布器。此外，发酵罐须配有排气、接种、取样、补料、调节 pH 的酸碱、消泡剂、放料等管道，发酵罐和各管道的阀门配置应便于任一部分均可单独灭菌。与发酵液接触的阀门对纯培养的实现有直接影响，多采用隔膜阀和球阀。特别是前者，因物料不与阀杆等部件接触，不会因此造成杂菌污染。对于药物、食品等生产，管道、发酵罐和阀门的连接也有特殊的要求，应便于清洗，没有死角。由于发酵是放热反应，发酵中需不断将发酵热移走，小型发酵罐可采用夹套，大型发酵罐则需采用内置蛇管。为了对发酵过程进行监控，发酵罐还装有各种传感器，对如温度、pH 值、溶氧、空气流量、尾气氧和二氧化碳、罐压、发酵液体积（或重量）等进行测量。

从摇瓶种子培养一直到发酵生产，各级培养都需要保持纯种培养的状态，避免杂菌污染。因此，所用的培养基、发酵罐，以及所有加入发酵罐的物料和所用管道，均需经灭菌后使用。实施严格的无菌操作是发酵与一般的化工过程最明显的差别。除了空气和一些热敏性物料溶液采用过滤除菌，培养基等物料和发酵罐等设备均采用高压饱和蒸汽灭菌。培养基的灭菌有两种方式：一种是分批灭菌，即将配制好的培养基放在发酵罐中，通入蒸汽，使培养基温度逐渐升高到一定的温度（通常为 120~125℃），保温 15~30min，然后降温并通入无菌空气保持压力待用；另一种是连续灭菌，先将发酵罐空罐灭菌并通入无菌空气维持一定压力，然后将配制好的培养基用泵送入连续灭菌的加热设备，使培养基的温度迅速升到 130~150℃，加热后的培养基进入保温设备维持 4~15min 后，通过冷却设备降温进入已灭菌的发酵罐。分批灭菌不需额外的灭菌设备，但灭菌时蒸汽消耗的流量变化大，培养基的升温 and 降温时间长，培养基中的热敏性物料较易降解。连续灭菌时培养基升温快，灭菌温度高而时间短，因此热敏性物料的降解少，灭菌时蒸汽的负荷也比较均匀，采用适当的换热器还可利用未灭菌的培养基冷却已灭菌的培养基，节约冷却水和加热蒸汽的使用。不过，由于培养基在保温设备中的流动并不能呈活塞流，正确设计保温设备^[7]以保证培养基能有效地灭菌又避免过热是非常重要的。由于用饱和蒸汽灭菌时，部分蒸汽形成冷凝水留在培养基中，所以培养基配制时应适当提高浓度，使灭菌后的浓度适于发酵。

发酵罐应密封没有泄漏，在发酵过程中维持一定的罐压，接种、取样和补料等操作前都应先将所需使用的管道灭菌，利用两个设备间的压力差将物料转移。发酵过程中应定期进行发酵液的无菌取样，对发酵液进行无菌试验，一旦发现发生杂菌污染，应立即采取措施，尽可能避免损失。好气发酵需要大量无菌空气，过去采用棉、玻璃纤维等制作的深层过滤器，除菌效果不很可靠，目前工厂中已普遍采用绝对过滤器，因其孔隙小于微生物，因此能可靠地截留空气中的微生物。

发酵过程原理

物，从而为纯种发酵提供了可靠的保证。在发酵过程中，需要维持一定的培养条件，如温度、通气、搅拌、pH 值、溶氧和营养物质浓度等，给所培养的微生物提供适宜的环境，从而提高发酵的效率。

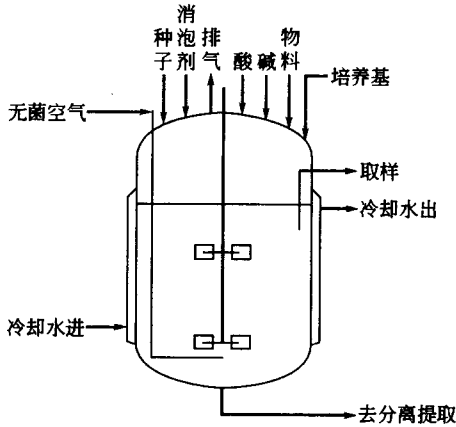


图 1-5 发酵罐的物料流

为了维持一定的 pH 值需要加碱时，可加入氨水或通入氨气，既可调节 pH 值，又可作为氮源使用。发酵中由于微生物的代谢，往往会产生大量泡沫，如不加控制，不但影响通气，而且会导致大量泡沫从排气管道逸出（逃液）而造成损失，也容易引起杂菌污染。可以在发酵罐中安装机械消泡装置，或者通过调整空气流量和罐压来消除泡沫，而添加油脂或合成消泡剂是最有效的消泡手段。图 1-5 显示了发酵罐的物料流。

1.3 发酵过程的研究

发酵过程产物的生产水平取决于所用的菌种的生产能力、发酵的工艺条件和发酵罐的操作性能。对于给定的菌株，通过建立适当的发酵工艺，给微生物提供良好的环境，可以充分发挥所用菌株的生产能力，提高发酵的水平。发酵过程的工艺控制，则有赖于发酵罐的操作性能和过程控制。例如青霉素发酵，现在的生产水平已超过 50g/L，比原先提高了 4000 倍以上^[8]，取得这样的成果依靠菌种选育、发酵工艺改进和发酵罐操作与性能的改进。表 1-2 比较了 1950 年和 2000 年在青霉素发酵中技术上的一些差异^[9]。

表 1-2 50 年间青霉素发酵技术的差异

项 目	1950 年	2000 年
碳源	乳糖	葡萄糖/蔗糖
操作方式	分批发酵	补料分批发酵
培养基灭菌	分批灭菌	连续灭菌
空气过滤	深层过滤	膜过滤
补料	无	多种物料
发酵周期	120h	120~200h
发酵罐体积	40~80m ³	80~240m ³
效价测定	生物法	HPLC
过程控制	仅控制温度	计算机
效价	0.5~1.0g/L	>40g/L

注：经特许可由 Appl Microbiol Biotechnol, 61: 385~392 复制，Springer 版权 (2003)。

获得一个生产菌株后,需要确定发酵的工艺条件,如种子的培养、温度、培养基、pH、通气、补料等。例如,在早期青霉素发酵中采用乳糖为碳源,若以易利用的葡萄糖为碳源则菌体生长旺盛,但严重影响青霉素生成。发酵中通过缓慢补加葡萄糖可有效避免碳源代谢物阻遏^[10],从而替代了乳糖的使用。在进行发酵的工艺研究时,通常采用“单次单变量”的方法,即改变某一个条件并维持其他培养条件不变,比较发酵的效果。这种方法工作量大,也没有考虑一些条件间的交互作用,所以近年来很多研究采用了实验设计和统计学的方法,如正交设计、均匀设计、响应面法等,收到很好的效果。

发酵的本质是化学反应,伴随着菌体的生长,营养物质浓度和代谢产物浓度相应发生变化,这些变化间存在一定的关系。从物料平衡、能量平衡^[11]和反应动力学^[12]的角度研究发酵过程的特点和规律,是发酵过程优化的重要手段。在发酵过程中,产物的合成与微生物的生长速率往往有密切的关系。一些初级代谢产物的发酵中,菌体生长速率常与产物合成速率有相关性,而次级代谢产物的合成则一般与菌体的生长不相关。如许多抗生素发酵显示两个阶段,即生长阶段和生产阶段。在生长阶段中,菌体生长速率高,但抗生素合成速率很低或不合成抗生素,随着菌体生长速率的下降,抗生素大量合成,进入生产阶段,因此在这两个阶段中,发酵条件的控制是不同的。

另一方面,微生物在代谢产物合成中受到自身的调节。研究有关产物的合成途径以及代谢的调节,对于高产菌种的选育和发酵过程的控制有重要的指导作用。例如氨基酸的合成受到微生物自身严密的调控,通常不会过量生产,通过对微生物氨基酸合成调控的研究,选育出能积累各种氨基酸的突变菌株。随着基因工程技术的发展和普及,基因操作越来越多地应用于构建高产菌株。关于微生物代谢调控的知识,也有助于建立合理的发酵工艺,提高发酵生产水平。

数学模型能够帮助人们加深对生物过程的认识^[13]。在对发酵过程的研究中,研究人员很早就关注菌体生长、底物消耗和产物生成速率的定量规律。由于微生物代谢的复杂性和计算机能力的限制,菌体内部的代谢反应通常作为黑箱处理。尽管如此,仍然还有许多研究致力于微生物宏观代谢特性与细胞水平的代谢规律的关联。例如,1974年井上一郎等^[14]根据物料平衡的原理研究了酵母菌在连续培养中用于菌体生长、二氧化碳生成和乙醇生产的葡萄糖消耗分配;1976年Verhoff等^[15]根据柠檬酸发酵涉及的代谢反应的化学计量关系,分析了柠檬酸和草酸可能的合成途径;1984年Papoutsakis根据丁酸菌发酵的代谢反应和化学计量关系,对文献报道的不同丁酸发酵数据进行了计算^[16];Domach等^[17]根据化学计量关系考虑了菌体大分子结构物质的前体化合物合成,从而对大肠杆菌在基本培养基中的生长进行模拟;1993年Vallino等^[18]采用包括34个代谢反应和37个代谢物的化学计量关系,计算了包括菌体生长的谷氨酸棒杆菌发酵生产赖

发酵过程原理

氨酸的代谢流分布。这些以细胞为反应器的研究，对提高细胞的生物反应效率、重建细胞代谢网络等研究具有指导意义。

1.4 发酵过程的检测

早期对发酵过程的控制比较简单，如表 1-2 所示，1950 年青霉素发酵中仅对温度进行控制。为了了解发酵过程的规律，越来越多的能经受蒸汽灭菌的传感器被用于发酵罐，许多在线检测的变量被用于控制。例如可经受蒸汽灭菌的复合 pH 电极已普遍用于在线检测发酵中 pH 的变化，并反馈控制酸碱加入以自动维持恒定的发酵液 pH。在采用复合培养基的发酵中，将碳源溶液作为酸，通过 pH 控制可自动将碳源不断补入发酵罐中，并维持碳源限制的状态，此即恒 pH (pH-stat) 的补料控制方式。溶氧电极的使用，可反映发酵过程中微生物耗氧的变化规律，为通气搅拌操作提供了直接的依据，而且可利用来控制碳源物质的自动流加 (恒溶氧补料)。表 1-3 显示了发酵过程中一些变量的在线检测方法。

表 1-3 发酵过程中一些变量的检测方法

对 象	检 测 方 法
温度	铂电极
空气流量	质量流量计
发酵液体积	应变片,压力差
pH	复合电极
溶氧	极谱型或原电池型
尾气氧	热磁分析,质谱
尾气 CO ₂	红外分析,质谱
甲醇	半导体化学气体传感器
乙醇、乙酸、乙醛等	气相色谱
多种化合物	液相色谱
葡萄糖、蔗糖	流动注射分析(FIA)
糖、氨、无机盐等	傅里叶变换衰减全反射红外光谱
菌体	电容法
胡萝卜素	拉曼光谱
维生素、辅因子等	荧光

发酵液中底物和产物的检测对于发酵过程的研究和控制具有重要的意义，但由于在线检测的传感器要求较高，如须能承受蒸汽灭菌，专一性强，信号漂移小，能在线进行标定等，因而缺乏有效的方法。从发酵罐顶部的气相采取样气可进行气相色谱分析，或将发酵液通过过滤系统，得到的无细胞清液可用于气相色谱、液相色谱或流动注射分析 (FIA)，从而进行多种化合物的检测^[19]。利用衰减全反射原理制作的钻石传感器，可直接采集发酵液中红外线吸收物质的红外光谱信息，根据欲测物质的红外光谱特性，通过计算机相关软件处理，即可获得相