

第 26 篇 生物化工

主稿、编写人 沈忠耀 清华大学 教授

编写人 俞俊棠 华东理工大学 教授

欧阳藩 中科院化工冶金研究所 研究员

欧阳平凯 南京化工学院 教授

1 概论	26-3	2.3.4 细胞酶促生物转化作用	26-22
1.1 生化工程概况	26-3	2.4 细胞培养动力学	26-22
1.1.1 生化工程定义和发展	26-3	2.5 批式培养动力学	26-22
1.1.2 生化工程的任务和内容	26-3	2.5.1 批式培养细胞生长动力学	26-23
1.2 生物生产过程的特点	26-4	2.5.2 批式培养基消耗动力学	26-24
1.3 酶的概述	26-4	2.5.3 批式培养产物生成动力学	26-24
1.3.1 酶的分类和命名	26-4	2.5.4 批式细胞培养中的热效应	26-25
1.3.2 酶的组成	26-5	2.6 连续培养动力学	26-26
1.3.3 酶的作用机制和调节	26-5	2.7 补料批式培养过程动力学	26-27
1.3.4 酶的修饰	26-6	符号说明	26-28
1.3.5 重要工业用酶简介	26-7	参考文献	26-29
1.4 重要微生物和其他生物组织细胞	26-8	3 生物反应器	26-30
1.4.1 最常用的工业微生物	26-8	3.1 生物反应多相体系及其流动特性	26-30
1.4.2 植物组织细胞	26-8	3.1.1 生物颗粒及其特性	26-30
1.4.3 动物细胞培养	26-10	3.1.2 生物反应流体及其流动特性	26-30
1.5 微生物的培养	26-10	3.2 生物反应器中的传递现象	26-31
1.5.1 工业微生物培养基	26-10	3.2.1 生物反应器中的搅拌与混合	26-31
1.5.2 微生物生长和生产条件	26-12	3.2.2 生物反应器中的氧传递	26-33
1.5.3 微生物代谢调节	26-15	3.2.3 生物反应器中的液固相传质	26-34
参考文献	26-16	3.2.4 生物反应器中的热量传递	26-35
2 生物反应计量学和动力学	26-16	3.3 典型的生物反应器	26-35
2.1 生物反应计量学	26-16	3.3.1 机械搅拌罐	26-35
2.1.1 细胞的组成和计量表达式	26-16	3.3.2 气升式反应器和鼓泡式反应器	26-37
2.1.2 生物反应的计量表达式	26-16	3.3.3 液体喷射循环反应器	26-38
2.1.3 计量系数	26-17	3.3.4 流态化反应器	26-38
2.1.4 生物反应中的能量平衡	26-18	3.3.5 固定床生物反应器	26-39
2.2 生物反应动力学概述	26-18	3.3.6 动物细胞培养反应器	26-39
2.3 酶促反应动力学	26-19	3.3.7 植物细胞培养反应器	26-40
2.3.1 米氏方程	26-19	3.4 生物反应器的放大	26-40
2.3.2 反应动力学参数的获得	26-19	3.4.1 生物反应器放大方法	26-40
2.3.3 酶促反应中的抑制现象	26-21	3.4.2 机械搅拌罐的放大	26-40

参考文献	26-41	6.2.1 概述	26-68
4 细胞与酶固定化技术	26-41	6.2.2 酶传感器	26-68
4.1 细胞与酶固定化技术概述	26-41	6.2.3 微生物传感器	26-69
4.2 固定化方法	26-41	6.2.4 免疫传感器	26-70
4.2.1 吸附法	26-42	6.2.5 生物传感器的换能器	26-70
4.2.2 包埋法	26-43	6.2.6 生化过程培养液成分的在线检测	26-73
4.2.3 交联法	26-44	6.3 生化过程控制	26-74
4.2.4 化学共价法	26-44	6.3.1 引论	26-74
4.2.5 逆胶束酶反应系统	26-45	6.3.2 常规控制	26-74
4.2.6 絮凝法	26-46	6.3.3 高级控制	26-76
4.3 固定化技术在工业上的应用举例	26-46	参考文献	26-82
4.3.1 生产高果糖浆	26-46	7 生物分离技术	26-83
4.3.2 生产L-氨基酸	26-47	7.1 概述	26-83
4.3.3 在医学与分析化学上的应用	26-48	7.1.1 生物分离过程的特点	26-83
4.4 固定化反应器设计原理	26-49	7.1.2 生物分离过程的一般流程及单元操作	26-83
4.4.1 固定化细胞与酶的酶活收率	26-49	7.2 细胞及其他固形物的回收和去除	26-83
4.4.2 反应器中的流动	26-50	7.2.1 发酵液的预处理	26-83
4.4.3 基本动力学模型	26-51	7.2.2 凝聚和絮凝	26-83
4.4.4 设计的优化	26-53	7.2.3 过滤	26-85
4.5 固定化酶和细胞反应器	26-53	7.2.4 离心分离	26-85
4.5.1 制备固定化生物催化剂的装置	26-53	7.3 细胞破碎	26-86
4.5.2 固定化颗粒及形状	26-53	7.3.1 概述	26-86
4.5.3 填充床反应器	26-54	7.3.2 机械破碎	26-86
4.5.4 连续搅拌式反应器	26-54	7.3.3 非机械方法	26-87
4.5.5 膜式或管式反应器	26-55	7.4 生物物质的提取	26-88
4.5.6 流化床反应器	26-56	7.4.1 沉淀法	26-88
4.5.7 逆胶束萃取反应器	26-56	7.4.2 萃取	26-90
参考文献	26-56	7.4.3 离子交换及吸附	26-92
5 灭菌及安全防护技术	26-56	7.4.4 膜分离	26-93
5.1 灭菌的方法	26-57	7.5 生物物质的纯化	26-93
5.2 微生物的死亡规律	26-57	7.5.1 层析技术	26-94
5.3 培养基的加热灭菌	26-58	7.5.2 电泳分离技术	26-96
5.3.1 温度的影响	26-58	7.6 生物产品的后加工	26-97
5.3.2 分批灭菌	26-59	7.6.1 结晶	26-97
5.3.3 连续灭菌	26-60	7.6.2 干燥	26-98
5.4 空气除菌	26-60	参考文献	26-98
5.5 污染的防止	26-62	一般参考文献	26-99
5.5.1 纯种培养的保证	26-62	8 典型的生化过程	26-99
5.5.2 防止培养物污染环境	26-63	8.1 生化过程的分类	26-99
参考文献	26-64	8.2 有机溶剂类产品生产过程	26-99
6 生化过程检测与控制	26-64	8.2.1 乙醇	26-99
6.1 生化过程检测	26-64	8.2.2 丙酮丁醇	26-100
6.1.1 引论	26-64	8.3 有机酸类产品生产过程	26-100
6.1.2 生化过程参数分类	26-65	8.3.1 柠檬酸	26-100
6.1.3 几种主要的间接参数计算或测量方法	26-66	8.3.2 葡萄糖酸	26-102
6.2 生物传感器	26-68	8.4 氨基酸类产品生产过程	26-102

8.4.1	谷氨酸	26-102
8.4.2	赖氨酸	26-104
8.5	抗生素类产品生产过程	26-105
8.5.1	青霉素	26-105
8.5.2	链霉素	26-106
8.5.3	头孢菌素	26-107
8.6	酶制剂类产品生产过程	26-107
8.6.1	α -淀粉酶	26-107
8.6.2	葡萄糖异构酶	26-108
8.6.3	纤维素酶	26-109
8.7	维生素类产品生产过程	26-110
8.7.1	维生素 B ₂	26-110

8.7.2	维生素 B ₁₂	26-111
8.8	单细胞蛋白的生产过程	26-112
8.9	核酸类产品的生产过程	26-113
8.9.1	肌苷酸	26-113
8.9.2	辅酶 A	26-114
8.10	蛋白质、多肽类药物的生产过程	26-114
8.10.1	干扰素	26-114
8.10.2	胰岛素	26-115
8.11	其他	26-115
8.11.1	黄单胞菌多糖	26-116
8.11.2	右旋糖酐	26-116
参考文献		26-117

1 概 论

1.1 生化工程概况

1.1.1 生化工程定义和发展

生化工程是生物化学工程的简称,它是以生物技术从实验室规模扩大至生产规模为目的,以生物生产过程中带有共性的工程技术问题为核心的一门由生物科学与化学工程相结合的交叉学科。它既是生物技术的一个重要组成部分,又是化学工程的一个分支学科。

生化工程起始于本世纪 40 年代。在这之前,虽然原始生物技术产品早已出现,工业微生物学也已开始发展,但当时一些生物技术产品的生产过程较为简单,以厌氧发酵和非纯种培养为主,在生产设备上也比较简陋,以套用常规化工设备为主。40 年代初,因青霉素深层培养技术的开发和生产的需要,在—批科学家和工程师的通力合作下,一个崭新的采用深层培养工艺的青霉素生产线诞生了。它采用了新设计的带有机械搅拌和通入无菌空气的密闭式发酵罐(初期为 5m³),培养新选育出来的适合于液体培养的新菌种(发酵效价约 200u/ml),并用当时新颖的离心萃取机和冷冻干燥机进行提取和精制,使收率(约 75%)和纯度(约 60%)大幅度提高,5m³ 发酵罐每批即能生产 60% 的青霉素约 0.75kg。尽管与当今的生产技术相比,当时的生产水平还是相当低的,但是,青霉素生产新技术的成功,不但促进了生产力的提高,也孕育了生化工程这一交叉学科的形成。1947 年美国生产抗生素的工厂之一——默克(Merck)公司获得麦克劳-希尔(McGraw-Hill)化学工程成就奖。此后,生化工程的名称就一直沿用至今。

1.1.2 生化工程的任务和内容

(1) 生化工程的服务对象和生物生产过程

生化工程的主要服务对象是工业生物技术,而工业生物技术的核心是建立生物生产过程。

生物生产过程(Bioprocess)一般可用图 1-1 表示。

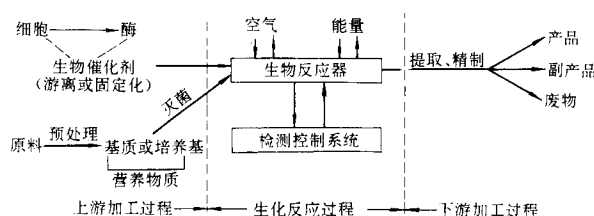


图 1-1 生物生产过程示意图

从图 1-1 看,生物生产过程可分为三个分过程。

(1.1) 上游加工过程(upstream processing) 包括原材料的预处理——物理、化学加工,培养基(即营养性基质,用于细胞生长和产物形成)或底物溶液(酶反应中的反应物)的配制和灭菌;生物催化剂制备——将细胞多次扩大培养,以作为“种子”接入发酵罐或制备足够量的固定化生物催化剂置于酶反应器中。

(1.2) 生化反应过程(biochemical reaction processing) 通过生物反应器(发酵罐或酶反应器)在一定条件下进行生化反应,以达到细胞增殖和产品形成或实现酶转化的目的。

(1.3) 下游加工过程(downstream processing) 也即生物分离(bioseparation)过程,其中常分固体物去除、提取(isolation)和精制加工(purification and polishing)等步骤。固体物去除主要是用过滤、微滤、离心等手段除去细胞或截留细胞,对胞内产物还应破碎细胞,再将细胞残片去除;提取的主要目的是使目标产物在溶液中浓缩,可采用盐析、萃取、吸附、离子交换等方法;精制的主要目的是去除杂质,并达到产品质量要求。在药品及食品生产中还应符合“产品优质规范”(Good Manu-

第 26 篇 生物化工

主稿、编写人 沈忠耀 清华大学 教授

编写人 俞俊棠 华东理工大学 教授

欧阳藩 中科院化工冶金研究所 研究员

欧阳平凯 南京化工学院 教授

1 概论	26-3	2.3.4 细胞酶促生物转化作用	26-22
1.1 生化工程概况	26-3	2.4 细胞培养动力学	26-22
1.1.1 生化工程定义和发展	26-3	2.5 批式培养动力学	26-22
1.1.2 生化工程的任务和内容	26-3	2.5.1 批式培养细胞生长动力学	26-23
1.2 生物生产过程的特点	26-4	2.5.2 批式培养基消耗动力学	26-24
1.3 酶的概述	26-4	2.5.3 批式培养产物生成动力学	26-24
1.3.1 酶的分类和命名	26-4	2.5.4 批式细胞培养中的热效应	26-25
1.3.2 酶的组成	26-5	2.6 连续培养动力学	26-26
1.3.3 酶的作用机制和调节	26-5	2.7 补料批式培养过程动力学	26-27
1.3.4 酶的修饰	26-6	符号说明	26-28
1.3.5 重要工业用酶简介	26-7	参考文献	26-29
1.4 重要微生物和其他生物组织细胞	26-8	3 生物反应器	26-30
1.4.1 最常用的工业微生物	26-8	3.1 生物反应多相体系及其流动特性	26-30
1.4.2 植物组织细胞	26-8	3.1.1 生物颗粒及其特性	26-30
1.4.3 动物细胞培养	26-10	3.1.2 生物反应流体及其流动特性	26-30
1.5 微生物的培养	26-10	3.2 生物反应器中的传递现象	26-31
1.5.1 工业微生物培养基	26-10	3.2.1 生物反应器中的搅拌与混合	26-31
1.5.2 微生物生长和生产条件	26-12	3.2.2 生物反应器中的氧传递	26-33
1.5.3 微生物代谢调节	26-15	3.2.3 生物反应器中的液固相传质	26-34
参考文献	26-16	3.2.4 生物反应器中的热量传递	26-35
2 生物反应计量学和动力学	26-16	3.3 典型的生物反应器	26-35
2.1 生物反应计量学	26-16	3.3.1 机械搅拌罐	26-35
2.1.1 细胞的组成和计量表达式	26-16	3.3.2 气升式反应器和鼓泡式反应器	26-37
2.1.2 生物反应的计量表达式	26-16	3.3.3 液体喷射循环反应器	26-38
2.1.3 计量系数	26-17	3.3.4 流态化反应器	26-38
2.1.4 生物反应中的能量平衡	26-18	3.3.5 固定床生物反应器	26-39
2.2 生物反应动力学概述	26-18	3.3.6 动物细胞培养反应器	26-39
2.3 酶促反应动力学	26-19	3.3.7 植物细胞培养反应器	26-40
2.3.1 米氏方程	26-19	3.4 生物反应器的放大	26-40
2.3.2 反应动力学参数的获得	26-19	3.4.1 生物反应器放大方法	26-40
2.3.3 酶促反应中的抑制现象	26-21	3.4.2 机械搅拌罐的放大	26-40

参考文献	26-41	6.2.1 概述	26-68
4 细胞与酶固定化技术	26-41	6.2.2 酶传感器	26-68
4.1 细胞与酶固定化技术概述	26-41	6.2.3 微生物传感器	26-69
4.2 固定化方法	26-41	6.2.4 免疫传感器	26-70
4.2.1 吸附法	26-42	6.2.5 生物传感器的换能器	26-70
4.2.2 包埋法	26-43	6.2.6 生化过程培养液成分的在线检测	26-73
4.2.3 交联法	26-44	6.3 生化过程控制	26-74
4.2.4 化学共价法	26-44	6.3.1 引论	26-74
4.2.5 逆胶束酶反应系统	26-45	6.3.2 常规控制	26-74
4.2.6 絮凝法	26-46	6.3.3 高级控制	26-76
4.3 固定化技术在工业上的应用举例	26-46	参考文献	26-82
4.3.1 生产高果糖浆	26-46	7 生物分离技术	26-83
4.3.2 生产L-氨基酸	26-47	7.1 概述	26-83
4.3.3 在医学与分析化学上的应用	26-48	7.1.1 生物分离过程的特点	26-83
4.4 固定化反应器设计原理	26-49	7.1.2 生物分离过程的一般流程及单元操作	26-83
4.4.1 固定化细胞与酶的酶活收率	26-49	7.2 细胞及其他固形物的回收和去除	26-83
4.4.2 反应器中的流动	26-50	7.2.1 发酵液的预处理	26-83
4.4.3 基本动力学模型	26-51	7.2.2 凝聚和絮凝	26-83
4.4.4 设计的优化	26-53	7.2.3 过滤	26-85
4.5 固定化酶和细胞反应器	26-53	7.2.4 离心分离	26-85
4.5.1 制备固定化生物催化剂的装置	26-53	7.3 细胞破碎	26-86
4.5.2 固定化颗粒及形状	26-53	7.3.1 概述	26-86
4.5.3 填充床反应器	26-54	7.3.2 机械破碎	26-86
4.5.4 连续搅拌式反应器	26-54	7.3.3 非机械方法	26-87
4.5.5 膜式或管式反应器	26-55	7.4 生物物质的提取	26-88
4.5.6 流化床反应器	26-56	7.4.1 沉淀法	26-88
4.5.7 逆胶束萃取反应器	26-56	7.4.2 萃取	26-90
参考文献	26-56	7.4.3 离子交换及吸附	26-92
5 灭菌及安全防护技术	26-56	7.4.4 膜分离	26-93
5.1 灭菌的方法	26-57	7.5 生物物质的纯化	26-93
5.2 微生物的死亡规律	26-57	7.5.1 层析技术	26-94
5.3 培养基的加热灭菌	26-58	7.5.2 电泳分离技术	26-96
5.3.1 温度的影响	26-58	7.6 生物产品的后加工	26-97
5.3.2 分批灭菌	26-59	7.6.1 结晶	26-97
5.3.3 连续灭菌	26-60	7.6.2 干燥	26-98
5.4 空气除菌	26-60	参考文献	26-98
5.5 污染的防止	26-62	一般参考文献	26-99
5.5.1 纯种培养的保证	26-62	8 典型的生化过程	26-99
5.5.2 防止培养物污染环境	26-63	8.1 生化过程的分类	26-99
参考文献	26-64	8.2 有机溶剂类产品生产过程	26-99
6 生化过程检测与控制	26-64	8.2.1 乙醇	26-99
6.1 生化过程检测	26-64	8.2.2 丙酮丁醇	26-100
6.1.1 引论	26-64	8.3 有机酸类产品生产过程	26-100
6.1.2 生化过程参数分类	26-65	8.3.1 柠檬酸	26-100
6.1.3 几种主要的间接参数计算或测量方法	26-66	8.3.2 葡萄糖酸	26-102
6.2 生物传感器	26-68	8.4 氨基酸类产品生产过程	26-102

8.4.1	谷氨酸	26-102
8.4.2	赖氨酸	26-104
8.5	抗生素类产品生产过程	26-105
8.5.1	青霉素	26-105
8.5.2	链霉素	26-106
8.5.3	头孢菌素	26-107
8.6	酶制剂类产品生产过程	26-107
8.6.1	α -淀粉酶	26-107
8.6.2	葡萄糖异构酶	26-108
8.6.3	纤维素酶	26-109
8.7	维生素类产品生产过程	26-110
8.7.1	维生素 B ₂	26-110

8.7.2	维生素 B ₁₂	26-111
8.8	单细胞蛋白的生产过程	26-112
8.9	核酸类产品的生产过程	26-113
8.9.1	肌苷酸	26-113
8.9.2	辅酶 A	26-114
8.10	蛋白质、多肽类药物的生产过程	26-114
8.10.1	干扰素	26-114
8.10.2	胰岛素	26-115
8.11	其他	26-115
8.11.1	黄单胞菌多糖	26-116
8.11.2	右旋糖酐	26-116
参考文献		26-117

1 概 论

1.1 生化工程概况

1.1.1 生化工程定义和发展

生化工程是生物化学工程的简称,它是以生物技术从实验室规模扩大至生产规模为目的,以生物生产过程中带有共性的工程技术问题为核心的一门由生物科学与化学工程相结合的交叉学科。它既是生物技术的一个重要组成部分,又是化学工程的一个分支学科。

生化工程起始于本世纪 40 年代。在这之前,虽然原始生物技术产品早已出现,工业微生物学也已开始发展,但当时一些生物技术产品的生产过程较为简单,以厌氧发酵和非纯种培养为主,在生产设备上也比较简陋,以套用常规化工设备为主。40 年代初,因青霉素深层培养技术的开发和生产的需要,在一批科学家和工程师的通力合作下,一个崭新的采用深层培养工艺的青霉素生产线诞生了。它采用了新设计的带有机械搅拌和通入无菌空气的密闭式发酵罐(初期为 5m³),培养新选育出来的适合于液体培养的新菌种(发酵效价约 200u/ml),并用当时新颖的离心萃取机和冷冻干燥机进行提取和精制,使收率(约 75%)和纯度(约 60%)大幅度提高,5m³ 发酵罐每批即能生产 60% 的青霉素约 0.75kg。尽管与当今的生产技术相比,当时的生产水平还是相当低的,但是,青霉素生产新技术的成功,不但促进了生产力的提高,也孕育了生化工程这一交叉学科的形成。1947 年美国生产抗生素的工厂之一——默克(Merck)公司获得麦克劳-希尔(McGraw-Hill)化学工程成就奖。此后,生化工程的名称就一直沿用至今。

1.1.2 生化工程的任务和内容

(1) 生化工程的服务对象和生物生产过程

生化工程的主要服务对象是工业生物技术,而工业生物技术的核心是建立生物生产过程。

生物生产过程(Bioprocess)一般可用图 1-1 表示。

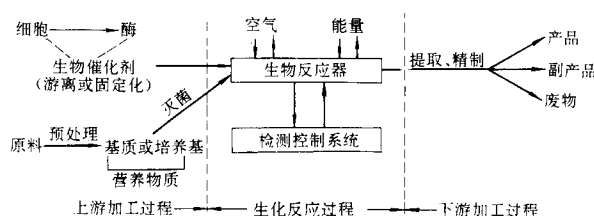


图 1-1 生物生产过程示意图

从图 1-1 看,生物生产过程可分为三个分过程。

(1.1) 上游加工过程(upstream processing) 包括原材料的预处理——物理、化学加工,培养基(即营养性基质,用于细胞生长和产物形成)或底物溶液(酶反应中的反应物)的配制和灭菌;生物催化剂制备——将细胞多次扩大培养,以作为“种子”接入发酵罐或制备足够量的固定化生物催化剂置于酶反应器中。

(1.2) 生化反应过程(biochemical reaction processing) 通过生物反应器(发酵罐或酶反应器)在一定条件下进行生化反应,以达到细胞增殖和产品形成或实现酶转化的目的。

(1.3) 下游加工过程(downstream processing) 也即生物分离(bioseparation)过程,其中常分固体物去除、提取(isolation)和精制加工(purification and polishing)等步骤。固体物去除主要是用过滤、微滤、离心等手段除去细胞或截留细胞,对胞内产物还应破碎细胞,再将细胞残片去除;提取的主要目的是使目标产物在溶液中浓缩,可采用盐析、萃取、吸附、离子交换等方法;精制的主要目的是去除杂质,并达到产品质量要求。在药品及食品生产中还应符合“产品优质规范”(Good Manu-

facturing Practice, GMP) 要求, 常用的是沉淀、结晶、色层分离、超滤、电泳等方法。

由于各种产品性质及采用的生物催化剂不同, 具体的生物生产过程也有较大的差异。

(2) 生化工程的内容

在生化工程发展初期, 带有共性的工程技术问题主要有大量培养基的灭菌和空气除菌的原理和方法, 微生物大规模培养发酵过程中操作和控制以及发酵罐保持纯种培养的技术, 好气发酵过程中需氧和供氧的研究, 发酵罐的设计、放大和制造技术, 副产物和产品的无菌分离技术等。

随着生产和生物技术的发展, 又逐步发展了多种微生物培养技术, 包括分批、补料分批 (fed batch)、半连续、连续、混种、灌注 (perfusion)、透析、固定化细胞等培养技术及其动力学研究; 重组菌、动植物细胞的培养技术及其动力学研究; 细胞代谢过程中的热力学和化学计量研究; 细胞的混合、传质、传热以及生化反应器及工程的研究; 发酵参数检测及过程控制的研究; 各种生物反应器的放大技术研究; 新型生化分离方法, 特别是针对蛋白质产品的分离方法及设备的研究等。

上述内容中有的已作为生化工程的派生分子学科出现, 如:

1) 生化反应工程 ①从微观角度研究酶动力学、发酵细胞生长、产物形成、基质消耗动力学, 即本征动力学; ②从宏观角度研究生化反应动力学, 即考虑到混合、传质、传热等因素对生化反应动力学所产生的影响; ③将反应器的混合、传质、传热等性能 (冷模试验) 与具体生物产品在反应器中的应用效果 (热模试验) 相结合, 研究反应器的结构、操作条件, 为生物生产过程的优化和反应器设计放大服务。

2) 生化分离工程 研究生化产物的特点, 适合各种生化产物提取和精制的原理、方法和设备, 生化过程的设计和优化, 生化工艺过程的经济分析和评价等。

3) 生化生产过程的检测和控制技术 包括传感器的研制、在线检测的方法、常规模拟控制仪表和计算机控制的理论和应用研究及生化过程的最优控制等。

4) 细胞培养工程 研究动植物细胞的培养技术及相应的生物反应器的研制和下游分离技术等内容。

1.2 生物生产过程的特点

(1) 由于采用生物催化剂, 反应过程在常温、常压下进行, 且可适用常规和现代选育或修饰方法改造生物催化剂, 而给生物生产过程赋以巨大的活力; 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, 常以分批操作生产为主。

(2) 以可再生资源 (renewable resources) 中的天然生物物质 (biomass) 为主要初始原料。来源丰富, 价

格低廉, 过程中的废物危害性较小。但原料成分常难以控制, 给生产过程和产品质量控制带来一定困难和影响。

(3) 与化学反应相比, 生产设备较为简单, 能量消耗一般较少; 但由于过高的基质 (底物) 浓度和产物浓度会使细胞耐受不了如此高的渗透压或导致酶反应的抑制, 因此反应液中的基质 (底物) 浓度不能太高, 导致反应器的体积庞大, 且要求在无杂菌污染情况下进行操作。

(4) 发酵过程的成本低、应用广, 但反应周期长且机理复杂, 较难控制。酶反应过程和专一性强, 转化率高, 但酶的成本较高。

(5) 生化反应的发酵液中成分复杂, 为多相、多组分体系。而产物的浓度低, 杂质的含量高, 这给分离、提取和纯化带来了很大困难。因此往往分离纯化的步骤多, 使收率降低, 生产成本增高。

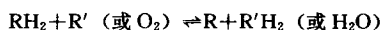
1.3 酶的概念

酶是由细胞所产生的具有催化活性的蛋白质, 是生物体中的生物催化剂。它参与生物体所有生命活动的化学反应, 包括体内外物质和能量的新陈代谢及交换, 生物体的生长、繁殖、衰亡和对不利条件的适应等。酶的作用具有高度专一性 (指一种酶仅能催化一种或一类特定的反应), 因此一个细胞有可能含有 1000 种以上的酶。酶的催化能力很强, 一个酶分子在一分钟内能催化数百至数百万个底物分子的转化。大部分酶位于细胞体内, 一部分则分泌至体外。酶在常温、常压、近于中性的水溶液中进行催化反应。温度过高、溶液酸性或碱性过大和某些金属离子会导致酶的失活。目前已被人们所了解的酶估计已超过 3000 种。

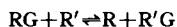
1.3.1 酶的分类和命名

国际生化联合会酶学委员会在 1961 年把酶分为六类:

第 I 类 氧化还原酶 (Oxidoreductases)



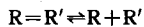
第 II 类 转移酶 (Transferases)



第 III 类 水解酶 (Hydrolases)



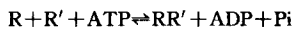
第 IV 类 裂解酶 (Lyases)



第 V 类 异构酶 (Isomerases)



第 VI 类 连接酶 (合成酶) (Ligases, Synthetases)



以上各类中, 又可分若干亚类或亚亚类。

酶学委员会还推荐了下列对酶的命名方法:

1) 习惯名称 一般以酶的底物命名 (字尾为 ase),

如乳糖酶 (lactase)、脲酶 (urease)。也有以底物和反应类型共同命名的,如葡萄糖氧化酶 (glucose oxidase)、乳酸脱氢酶 (lactic acid dehydrogenase)。还有部分则冠以酶的来源或作用特性,如枯草杆菌蛋白酶、胰蛋白酶、高温淀粉酶。

2) 系统名称 名称中同时列入底物 (如系双底物则同时列出,两者间隔以“:”号) 和作用类型名称,如醇:NAD⁺氧化还原酶、ATD; D—己糖—6 磷酸转移酶。

3) 分类编号 采用四位编号,分别为酶的类别、亚类、亚亚类和酶的序号,中间以“.”号隔开,头上冠以 EC 字样,如醇脱氢酶为 EC1.1.1.1、己糖激酶为 EC2.7.1.1。

由于酶的不稳定性及其制品的纯度各异,因此一般不以其质量和体积计量,而以酶的活性单位和比活力计量。酶的活性单位 (u) 的定义是每分钟对 1μmol 底物进行催化转化所需要的酶量。酶溶液浓度一般以 u/mL 表示。比活力是固态酶制剂纯度的计量值,以 u/(mg 蛋白质) 表示。酶的稳定性常以其半衰期表示,即在一定条件下溶液中酶或固态酶的活力或比活力降至原来标定值的 50% 所经历的时间。

1.3.2 酶的组成

(1) 酶蛋白

酶是具有空间结构的蛋白质,即不但必须具有一定氨基酸顺序 (一级结构),还在低聚蛋白中各多肽链的作用下折叠、扭曲、变形,在空间形成专一性的三维结构,否则不具活性。具有活性的酶都是球蛋白,即是被广泛折叠、结构紧密的多肽链,一般其氨基酸亲水基团在外表面,而疏水基团向内。酶蛋白有三种组成形式,即

1) 单体酶 指仅有一个活性部位的多肽链,分子量为 13000~35000,主要是水解酶。

2) 寡聚酶 由若干亚基结合组成,其亚基可相同或不同,亚基一般无活性,分子量为 35000 至数百万。

3) 多聚复合体 指多种酶进行连续反应的系统,前一反应的产物为后一产物的底物。

(2) 辅酶

仅有少量的酶是由单一的酶蛋白组成;大多的酶均为复合蛋白质,也称全酶,是由酶蛋白和非蛋白质部分所组成,即酶蛋白本身无催化活性,需要在辅助因子存在下才具有活性。辅助因子可以是无机离子,也可以是有机化合物,有的酶蛋白仅需其中一种,有的则两者均需要,它们都属于小分子化合物。

约有 25% 的酶含有紧密结合的金属离子,包括铜、铁、锌、镁、钙、钾、钠等,它们在维持酶的活性和完成催化中起重要作用。有机辅助因子可依其与酶蛋白的结合程度分为辅酶 (松散结合) 和辅基 (紧密结合),有时也把它们统称为辅酶。大多辅酶为核苷酸和维生素或它

们的衍生物。上述六类酶中,除水解酶和连接酶外在反应时均需特定的辅酶。常见辅酶见表 1-1。

表 1-1 常见辅酶及其参与的反应

辅 酶 名 称	常 用 符 号	转 移 基 团 或 反 应 类 型	相 应 维 生 素
与氧化还原酶结合的辅酶			
烟酰胺腺嘌呤二核苷酸	NAD ⁺	氢	维生素 PP
磷酸烟酰胺腺嘌呤二核苷酸	NADP ⁺	氢	维生素 PP
烟酰胺单核苷酸	NMN	氢	维生素 PP
黄素单核苷酸	FMN	氢	维生素 B ₂
黄素腺嘌呤二核苷酸	FAD	氢	维生素 B ₂
硫辛酸	LiP	氢、酰基	—
谷胱甘肽	GSH	氢	—
抗坏血酸	—	—	维生素 C
辅酶 Q	CoQ	氢	—
细胞色素 C 类	Cyt. C	电子	—
与转移酶结合的辅酶			
三磷酸腺苷	ATP	磷酸	—
二磷酸尿苷	UDP	糖、糖醛酸	—
二磷酸胞苷	CDP	磷酸胆碱	—
磷酸吡哆醛	PALP	氨基	维生素 B ₆
腺苷甲硫氨酸	—	甲基	—
四氢叶酸	THF	甲酰胺	叶酸
生物素	—	羧基	维生素 H
辅酶 A	CoA	乙酰基	泛酸
焦磷酸硫胺素	TPP	C ₂ 醛	维生素 B ₁
与裂合酶结合的辅酶			
磷酸吡哆醛	PALP	脱羧	维生素 B ₆
焦磷酸硫胺素	TPP	脱羧	维生素 B ₁
与异构酶结合的辅酶			
二磷酸尿苷	UDP	糖异构化	—
钴胺素辅酶	—	羧基取代	维生素 B ₁₂

1.3.3 酶的作用机制和调节

(1) 酶的作用机制

酶是通过其活性中心——通常是酶蛋白的氨基酸残基的侧链基团先与底物形成一个中间复合物,随后再分解成产物并释出酶。至于酶对底物的专一性可用“诱导契合”学说来说明,即当酶与底物接近时,酶受底物的诱导,使酶的构象发生有利于与底物复合的变化,并使酶活性中心的底物浓度增加,最后相互快速地契合。此外,还有“锁与钥匙”、“扭曲和过渡态”等学说。

与通常化学催化剂相似,酶所以能加速反应速率的原因是因为当酶与底物短暂复合时,能释放出复合能而使反应所需活化能降低。

(2) 酶的调节

生物体虽有可能产生上千种,但一般情况下仅有一定数量的酶是经常存在的,以合成最基本的蛋白质等物质和维持生命活动,这些酶称为组成酶;大多数的酶,特别分解代谢酶是为适应外界环境的需要才产生的,称为诱导酶,诱导酶是仅在其底物或底物类似物存在时才进行合成。此外细胞也不合成过量的酶,当一种酶已能满足需要时,就会自动停止合成,以节约体内氨基酸等物质和能量。因此,生物体具有酶蛋白合成调控和多酶系统自我调节的作用。

(2.1) 酶的诱导合成 雅可布和莫诺在1961年提出了酶的诱导合成模型。他们认为在染色体DNA中至少有四种基因对诱导酶的合成进行指导,它们是调节基因(R)——能合成阻遏蛋白,启动基因(P)——RNA聚合酶(能将DNA转录为mRNA,也称转录酶)的结合部位,操纵基因(O)——具有控制结构基因的功能,结构基因(S)——决定酶蛋白分子结构的基因。当无诱导物存在情况下,R产生的阻遏蛋白将与O相结合,阻止了P的移动,使其无法与O结合和使其将S中的DNA转录为mRNA,当然也不可能进一步通过转译进行酶蛋白的合成(见图1-2的上半部)。当存在诱导物(底物或其类似物)时,它将与R产生的阻遏蛋白相结合,RNA聚合酶即可移动而使S中的DNA转录为mRNA,并进一步合成酶蛋白(图1-2)的下部分。

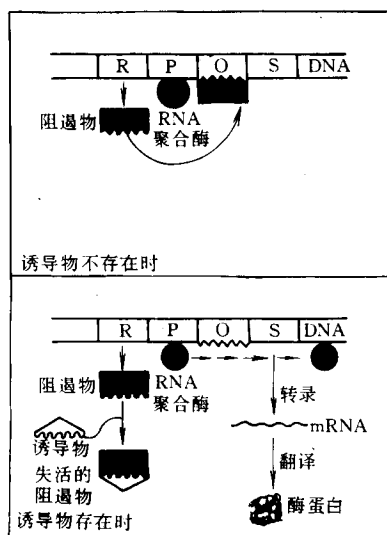


图1-2 酶合成的诱导示意图

R—调节基因; P—启动基因;
O—操纵基因; S—结构基因

工业用酶大多为诱导酶,因此在生产中可加入有关底物或其类似物以提高酶的转化能力。也可用诱变育种方法使调节基因失去产生阻遏物的能力,或使操纵基因失去与阻遏物结合的能力,以消除菌株对诱导物的依赖。

(2.2) 分解代谢物的调节 微生物在培养过程中,常先利用最容易利用的碳水化合物,通常是葡萄糖(当然也有例外),这是因为微生物在分解易被利用的碳源时所产生的分解代谢产物,会明显地阻遏其他碳源分解时所需要的诱导酶。这种现象常称为葡萄糖效应。进一步的研究表明,上述现象的产生是由于葡萄糖的分解代谢产物能影响细胞内环腺苷酸(C'AMP)的合成,而不易分解的碳源所需要的C'AMP量要比葡萄糖高得多。

(2.3) 反馈调节 反馈调节主要出现在多酶串联合成反应中,它包括两种形式,即反馈阻遏和反馈抑制。

①反馈阻遏 反馈阻遏与前面介绍的酶的诱导不同之处在于串联反应中第一个酶基因中的调节基因(R)所产生的阻遏蛋白不具活性,必须要经串联反应中的终产物或其类似物激活,并形成共遏物后才能作用于操纵基因(O)。因此在无终产物或其类似物时能进行正常合成反应,而在终产物存在时,合成反应将受到阻遏而产生调节作用。

②反馈抑制 反馈抑制主要发生在具有别构效应的调节酶的场合下,具有别构效应的酶称为别构酶。别构酶一般为寡聚酶,含有两个或两个以上的亚基,除具有与底物结合的活性中心部位外,还有能与效应物(常是串联反应的终产物)进行非共价结合的部位(别构部位,或称调节部位)。若终产物与合成途径中第一个酶的调节部位相结合后,会引起酶的构象以至酶的活性的相应变化,而对反应起着调节作用。

(2.4) 同工酶的调节 同工酶是指具有同一催化作用但分子结构以及产生反馈抑制或阻遏作用有所不同的酶类,一般具有两个或两个以上多肽链。若有三种氨基酸的合成均以同一氨基酸为出发原料,且催化原料氨基酸的第一个酶是三种同工酶,而三种同工酶对三种产物氨基酸的反馈抑制或阻遏作用各异的话,则可保证三种氨基酸合成的平衡。

1.3.4 酶的修饰

酶因其来源、性质各异,各有其最佳反应条件。来自动物和植物的酶的最适反应温度分别为35~40℃及40~50℃,大多数的酶超过60℃时将变性失活,温度升高后酶反应虽为之增快,但酶的失活也随之严重;大多数酶的最适反应pH为6~8,其中微生物和植物来源约为pH4.5~6.5,动物来源约为6.5~8.0。氢离子浓度与酶的构象和活性中心的离解状态关系密切,超过一定限度时酶也因此变性。反应过程中有无酶激活剂(如Ca⁺⁺,

Mg⁺⁺, Cl⁻和某些中等分子量的有机还原剂,具有蛋白质性质的大分子物质等)和抑制剂对反应速率也有密切关系。

为了提高酶的活性、改变其作用专一性或最适反应条件,增加其稳定性、消除其抗原性(指某些酶能在体内诱导产生抗体而失活)等目的而对酶进行修饰。用诱变选育、固定化酶等手段可在一定程度对酶的性能出现某些有益的改变,但酶的修饰一般是指在分子水平上用化学方法或分子生物学方法对酶进行改造。用分子生物学方法涉及蛋白质工程,目前较多的是采用化学修饰法。常用的化学修饰方法是将酶的侧链与一些具有生物相容性的大分子进行共价连接。这些大分子物质有右旋糖苷、聚乳糖、聚丙烯酸、人血清白蛋白、糖肽、肝素、戊二醛、聚乙二醇、聚乙烯吡咯烷酮、聚丙烯酸、聚顺丁烯二酸等。

1.3.5 重要工业用酶简介

除了上面介绍的 EC 酶分类法外,在日常应用中尚有一些习惯分类名称,现择一些常见的介绍于下:

- 氧化酶类 (Oxidases) ——将底物氧化并以氧为供体;
- 加氧酶类 (Oxygenases) ——将氧分子加入底物,并将—C—C—键裂开;
- 脱氢酶类 (Dehydrogenases) ——将底物羟化并以氧为供体;
- 氢化酶类 (Hydroxylases) ——从底物中将氢传递至另一非氧分子;
- 磷酸化酶 (Phosphorylases) ——将磷酸加入糖基或其他基团;
- 磷酸酯酶 (Phosphatases) ——磷酸酯的水解;
- 激酶 (Kinases) ——从三磷酸核苷中将磷酸根转移至底物;
- 变位酶 (Mutases) ——在同一分子中将磷酸根从一个部位转移至另一部位;
- 硫激酶 (Thiokinases) ——从羧酸底物中将 ATP 裂开形成硫醇羧酸酯 (RCOSR)。

重要工业用酶的简介见表 1-2。

表 1-2 重要工业用酶的来源和性质

名 称	主要的微生物来源	所催化的反应及其用途	最高使用温度℃	最适 pH 值
杆菌蛋白酶 (碱性蛋白酶)	杆菌 (以地衣杆菌为主)	蛋白质分解为肽、肽氨基酸;主要用于加入洗涤剂	80	8~11
真菌蛋白酶 (酸性蛋白酶)	曲霉及毛霉	蛋白质分解为肽、肽氨基酸;主要用于干酪、酱油等制造	60	4~6
细菌 α-淀粉酶 (淀粉 α-1,4-糊精酶)	杆菌 (以枯草杆菌为主)	切割淀粉直链及支链近分叉点近端的糖苷键使成为糊精及少量麦芽糖、葡萄糖;用于生产淀粉糖等	110	5~7
真菌 α-淀粉酶	曲霉	作用同上,主要用于食品工业	60	4~5
糖化酶 (葡糖淀粉酶或淀粉 α-1,4-葡糖苷酶)	曲霉、根霉	从淀粉末端顺序切糖苷键形成葡萄糖;用于淀粉糖、食品、酿造等	60	4~5
支链淀粉酶 (淀粉 α-1,6-糊精酶)	杆菌	作用于支链淀粉交叉点的 α-1,6-糖苷键而形成直链糊精;可加快糖化过程	60	6~7
葡糖异构酶	链霉菌、杆菌	将 D-葡萄糖 (醛糖) 异构为 D-果糖 (酮糖);用于生产果葡糖浆	90	6.5~8.5
果胶酶	曲霉	多聚半乳糖醛酸及其甲酯的水解;用于果汁的去果胶	50	4~5
纤维素酶	木霉	作用于纤维素 β-1,4-糖苷键形成纤维二糖和葡萄糖;用于食品工业	50	4~5
转化酶	酿酒酵母	将蔗糖分拆为葡萄糖和果糖;用于制造绵白糖	60	4.5
葡糖氧化酶	青霉	将葡萄糖氧化为葡萄糖酸;用于食品去氧	40	7
脂肪酶	曲霉、根霉、毛霉	用于脂肪酸酯水解;可用于洗涤剂 and 油脂工业	40	5~7

1.4 重要微生物和其他生物组织细胞

微生物在生物技术的发展中扮演重要的角色。有许多产物是由它们产生的。用微生物生产具有以下优点:所需原材料为粮食或其加工后的农副产品,如豆类的饼粉,玉米浆和糖蜜等,故来源丰富,价格便宜;其次是微生物酿造的饮料,在色香味等品质上都是其他化学方法无法代替的;又由于发酵可大规模,上百吨的大罐中进行生产,故成本较低。微生物和其他生物的产物大致可分为以下几类:

①细胞本身便是所需产物;②细胞所产生的酶;③细胞的代谢产物,又可分为初级或次级(生)化谢产物;④生物转化,即利用生物细胞进行某一步反应。

1.4.1 最常用的工业微生物

(1) 所需产物为细胞本身

微生物生物物质(Biomass)目前已工业生产的有两大类:一是用于面包工业和酿造业的酵母;二是作为动物饲料或人类食物的微生物细胞,称为单细胞蛋白(SCP)。

1) 面包酵母 它包括面包酵母和啤酒酵母株。酵母生长在很简单的培养基中,其成分如下:糖类、 $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 、 KH_2PO_4 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 以及微量元素Zn、Fe和Cu等,添加适量的糖蜜或玉米浆有利于酵母生长。在培养时氧的供给可以使糖氧化完全,基质转化率高。但酵母的生长受糖浓度的影响,高糖浓度或高比生长速率会产生Crabtree效应,转化率降低且有乙醇产生。故加糖速度应控制在几乎耗竭的水平。

2) 单细胞蛋白(SCP) 从60年代开始,就有许多公司研究用各种碳源来生产SCP的可行性,几乎无例外地,均用连续培养法来生产SCP。同分批法比较,连续培养的产率高,且菌种衰退也不明显。曾用乳清作为SCP生产的碳源,此生产过程还可清除乳酪工业中污染水源的废物,使它变成高品质的饲料。此外,也有用碳氢化物,石油副产品和有机废水等来生产SCP。菌体中的蛋白质含量随菌种及基质而异,一般占50~80%。且赖氨酸含量比大豆蛋白的高。故SCP的生产为解决人、畜食品中的蛋白质来源开辟了新的途径。

3) 活性乳酸杆菌 近年来由乳酸杆菌和牛奶发酵制成的酸奶是供人食用的可口饮料。这类菌在肠道菌群中占主导地位时可以帮助消化,吸收有用的养分和抑制有害的细菌。这类菌种的代表是保加利亚乳杆菌,用于制酸奶;干酪乳杆菌用于乳制品。最近流行的对人具有保健作用的双歧杆菌也属于乳杆菌。

(2) 微生物产生的酶

酶的来源可以是动、植物和微生物。但从后者来的酶具有许多优点。它可用发酵技术大规模生产,且微生物的产酶性能容易改进。大多数酶的应用与食品有关,且属于

水解酶类,其中最主要的是淀粉酶、糖化酶、葡萄糖异构酶和果胶酶等。除食品外还广泛用于纺织、制革、医药、日用化工和三废治理等方面。我国生产和应用的酶除上述外还有细菌产的中性和碱性蛋白酶、霉菌酸性、中性和碱性蛋白酶、葡萄糖氧化酶、脂肪酶、谷氨酸脱羧酶、青霉素酰化酶、链激酶、5'-磷酸二酯酶、天冬酰胺酶和超氧化物歧化酶等。下面分析介绍几种主要工业用酶:

1) 淀粉酶 这是水解淀粉的酶类总称,它包括许多种具有不同水解作用的酶,如 α -淀粉酶、 β -淀粉酶、葡萄糖淀粉酶(简称糖化酶)、异淀粉酶和环状糊精生成酶等。其中由枯草杆菌BF7688产生的 α -淀粉酶是我国产量最大、用途最广的一种液化型 α -淀粉酶,主要应用于面包制造业、减少面团的粘度,增加面包松软、在啤酒业中用于制麦芽浆;用于纺织物的纤维脱浆、制造麦芽糖糖浆和作为助消化药物等。

2) 蛋白酶 一般按蛋白酶作用的最适pH分为酸性、中性和碱性蛋白酶三类。由黑曲霉生产的酸性蛋白酶可用作消化药、消炎药、啤酒澄清剂和用于皮革业中脱毛,使生皮软化。有些蛋白酶还可用于面包业中改进面团组织,减少混和时间,增加面包体积,作洗涤剂,使肉柔嫩,做蛋白水解液等。

3) 葡萄糖氧化酶 由黑曲霉或青霉产生,前者为胞内酶,后者为胞外酶。由于它在葡萄糖转化为葡糖酸过程中耗 O_2 和生成 H_2O_2 ,因此,可利用它除去蛋粉的葡萄糖和用于调味品、果汁去氧;和溶菌酶搭配还能用于口腔抑菌;也有用于柠檬饮料等的萜烯的稳定剂。

4) 果胶酶 由真菌产生,主要用于咖啡豆发酵,制造浓缩咖啡;果汁澄清,制备蔬菜水解液等。

此外,有用转化酶来制造软糖;葡萄糖异构酶将玉米糖浆转化为含果糖的甜味产品;链激酶制成治疗青肿、炎症的注射剂。

(3) 微生物代谢产物

有些代谢产物对细胞生长是必需的,它们的合成与细胞生长基本上平行进行,这些产物称为初级代谢产物,例如乙醇、乙酸、乳酸、柠檬酸、谷氨酸、赖氨酸、核苷酸等。

有些微生物在生长稳定期(生产期)才开始合成某种次级代谢产物。次级代谢物的抗生素为代表,有 β -内酰胺族:青霉素、头孢菌素等;肽类抗生素:短杆菌肽S、杆菌肽等;氨基糖类:链霉素、卡那霉素;大环内酯类:红霉素、麦地霉素、螺旋霉素等;四环类:四环素、土霉素和金霉素等;多烯类:制霉菌素、杀假丝菌素。

1.4.2 植物组织细胞

整个或部分植株,单个植物细胞可以在含有矿物盐、生长因子、碳源和植物生长调节剂的人工培养基中生长,这样可以方便地操纵植物的生长和开发其商业用途。

(1) 组织培养

组织培养技术的特点为：①所有培养的植物组织必须维持严格无杂菌状态，仔细控制培养基组分及培养条件；②植物细胞生长比微生物慢许多，一般操纵和在控制其稳定性及变异上难度较大。现已能对多种植物作大规模快速无性繁殖。所得植株的质量和均匀性高于常规方法，有许多观赏、园艺、农艺和谷类植物可用这种方式作微繁殖。

(2) 植物细胞培养

近年来对用植物细胞培养法来大规模生产有用的植物及其代谢产物的兴趣不断提高。植物细胞培养的优点在于：①与气候、昆虫害等环境因素隔离；②生产系统明

确；③产品质量和产率一致；④繁殖大量的植物细胞只需很少的地方；⑤细胞群体均匀，易于产物提取。目前，这些研究绝大多数仍停留在实验室规模，由于植物细胞培养的成本很高，故此技术主要用于生产高价值和罕见、名贵的植物药物和香料。表 1-3 列举了植物细胞生产的次级代谢物。

曾报道过的由植物组织和细胞在体外生产的物质还有：抗白血病药物、苯甲酸、苯并吡喃酮、苯醌、查耳酮、联萘酮、呋喃色酮、呋喃香豆素。其他物质还有调味品、挥发油、香料、香水、食物、糖、多糖、甜味剂、有机酸、胶乳、乳化剂、脂质、肽、蛋白质、核酸及其衍生物、类胰岛素化合物、鸦片制剂、植物生长调节因子、杀虫剂等。

表 1-3 各种植物组织细胞生产的次级代谢物

次级代谢产物	植物细胞来源	产 率	用 途
1. 生物碱			
萝芙木碱	Catharanthus	264mg/L	血液循环疾病
小檗碱	Coptis japonica		
喜树碱	Camptotheca acuminata	$2.5 \times 10^{-4}\%$	因副作用停用
粗榧碱	Cephalotaxine	144μg/L	
三尖杉酯碱	Cephalotaxus harringtonia, 又称 Plumyew	11μg/L	抗肿瘤
脱氧三尖杉酯碱		25	
同型三尖杉酯碱		27	
异三尖杉酯碱		48	
尼古丁	Nicotiana rustica	0.25~0.58%	无工业意义
蛇根碱	Vinca rosea	162mg/L	
长春新碱	Vinca rosea	36mg/L	抗肿瘤
长春花碱	Vinca rosea		抗肿瘤
2. 色素			
β-花色素苷	Centrospermae		有希望取代人工色素
3. 类固醇			
异羟基洋地黄毒苷	Digitalis lanata	转化率 70%	强心药
4. 萜烯			
人参粗皂草苷	Panax ginsengcallus	21.2%	
5. 醌			
泛醌-10 又称辅酶 Q	N, tabacum	360μg/g	心脏病
蒽醌	Lithospermum erythrosizon	12%DCW	烧伤，皮肤病
6. 其他生理活性物质			
抗物质 C ₃₅ H ₈₀ O ₂ N ₁₀	Phytolacca americana	最低抑制浓度对枯草杆菌 5.8μg/mL	
抗植物病毒物质	P. americana	7.0μg/mL 抑制 90%TMV	
蛋白抑制剂	Scopola japonica	1.5mg/mL	炎症，胰腺炎
3,4-二羟苯丙氨酸	Mucunap		

1.4.3 动物细胞培养

哺乳动物细胞在体外繁殖的技术曾经几次变革。现可将哺乳动物细胞分为三个主要类型：①初生细胞；②从老的已建细胞系来的细胞；③来自二倍体细胞株的细胞。它广泛用于大规模生产人和兽用生物制品，如病毒疫苗、人-干扰素、胰岛素和激素等，见表 1-4。

表 1-4 由动物细胞生产的生物制品

生物制品类别	生物制品和产物
人用疫苗	小儿麻痹症、狂犬、乙肝表面抗原、脑炎
动物用疫苗	口蹄疫、猪霍乱、鸡新城疫、马脑炎
免疫调节剂	干扰素、白细胞介素-2、胸腺素
激素	绒毛膜促性腺激素、生长激素、促黄体激素
酶	尿激酶、胶原酶、天冬氨酸酰胺酶
单克隆抗体	

动物细胞对营养要求严格，除常规培养基成分外还需血清或血清代用品；对环境要求很高，特别是动物细胞对剪切应力非常敏感，通气时大气泡不能直接和细胞接触。另外，动物细胞生长缓慢，抵抗力极弱，故对反应器的严密性提出特殊要求。

动物细胞无细胞壁，附着在固体表面上生长。动物细胞培养时常用微载体作为支持物。作微载体的材料有聚苯乙烯、聚丙烯酰胺、交联葡聚糖、纤维素衍生物、几丁质和明胶等。一般使用的微载体为直径 100~200μm 的圆球形、表面光滑、带少量正电荷，这有利于细胞紧锚依于载体表面，其最大优点是使锚依细胞可以像细菌那样悬浮培养。微载体的使用大多数是一次性的。

动物细胞的领域当前致力于降低血清用量，研究无血清培养基；采用灌注系统连续培养动物细胞；提高细胞密度；改善供氧和环境监控系统；开发新微载体和其他固定化技术。

1.5 微生物的培养

微生物培养的基本条件必须有能满足其生长和产物合成所需的养分和适合的环境条件。

1.5.1 工业微生物培养基

微生物要有适当的养分才能生长和合成所需产物。不同微生物对养分有不同要求。对自养菌来说，其养分需求很简单，它们从一些无机物中吸取所需养分便能生长。而工业微生物绝大多数是异养菌。它们能消化有机物，从中获得合成生物高分子的单体和能量。所有微生物都需要水，碳源，氮源，矿物盐和微量元素；好气微生物还需

氧气，有的菌还需某些生长因素。

一种培养基是否合理对发酵生产影响很大，对培养基的配方必须予以优化，大规模发酵经常采用来源丰富和价廉质优的培养基，还应满足以下要求：①能获得最大的产率 (g/L/h) 和得率 (g 产物/g 基质)，最高产物浓度 (g/L/或 U/ml)，最大发酵指数 (kg 产物/m³ 罐容量/h 发酵周期) 和最少副产物。②原料来源丰富，价格便宜，加工方法简单，贮存质量稳定。③对发酵操作和下游处理过程，如提取、废物废水处理等不会带来重大影响。

另外，培养基的选择还要考虑菌种的性能，灭菌条件，生物反应器的型式，发酵过程中对 pH 值、溶解氧的影响和泡沫的形成及对菌的形态和传递特性的影响等等。

(1) 培养基的种类

培养基按其组成物质的纯度、状态和用途可分为三类：

按纯度可分为合成培养基和天然(复合)培养基。前者的化学成分明确、稳定，适用于菌种基本代谢和发酵过程中物质变化的研究工作；后者在工业生产中广泛应用。其特点是，来源丰富，价格低廉，一般无需添加微量元素或生长因素等，但成分复杂，若不控制原料质量，会影响生产的稳定性。

按状态可分为固态、凝胶态和液态培养基。固态培养基主要用于菌种培养、孢子制备和有子实体的真菌类，如香菇等的生产。常用麸皮、大米、木屑、禾糠和琼脂等。凝胶培养基主要用于鉴定菌种，观察细菌运动特性及噬菌体效价滴定等，在液态培养基中加入少量琼脂便可制得。液态培养基主要用于大规模生产，其中含 80~90% 的水，并含有可溶性及固体成分。

(2) 培养基的组成和各成分的作用

在考虑培养基组成时需先对细胞的组成有所了解。细胞的元素组成，不外有以下几种：碳、氮、氢、氧、磷、硫、钾、钠、钙、镁、铁和氧化物以及若干微量元素(如 Zn、Cu、Mn、Co、Mo、B 等)，见表 1-5。由表可见，培养基中至少含有以上成分才能满足微生物生长的需求。

从物料衡算式：

碳能源+氮源+矿物盐→菌体+产物+CO₂+H₂O+热

可大致计算生产一定量的菌体和产物所需的最低养分需求量。一般，求得的 P 和 K 量总是比实际用量少得多；而 Zn、Cu 的需要量则和实际加入的相近。有的微生物不能合成某种生长因子，如氨基酸、维生素或核苷酸，必须以纯化合物或复合物形式补充。以下分别介绍培养基各要素的作用和对生长、生产的影响。

1) 碳和能源 是指糖和多糖以及油脂等化合物。其分解代谢可为生长和产物合成提供碳架和生物能，如

表 1-5 各种微生物的元素组成 (%细胞干重)

微生物	C	N	P	S	K	Na	Ca	Mg
细菌	50~53	12~15	2.0~3.0	0.2~1.0	1.0~4.5	0.5~1.0	0.01~1.1	0.1~0.5
酵母	45~50	7.5~11	0.8~2.6	0.01~0.24	1.0~4.0	0.01~0.1	0.1~0.3	0.1~0.5
真菌	40~63	7~10	0.4~4.5	0.1~0.5	0.2~2.5	0.02~0.5	0.1~1.4	0.1~0.5

NADH₂、NADPH₂、ATP 等。在发酵中广泛采用玉米、谷物、薯类和土豆等,可以以全粉或淀粉形式加入。此外,各种双糖和单糖,如从甘蔗或甜菜制得的蔗糖;淀粉水解得到的葡萄糖,或用制糖时结晶母液浓缩的糖蜜;乳糖及乳清粉也可用作碳源。高品油除作为消沫用外,也可作为碳源,如玉米油、豆油、棉子油、蓖麻油、棕榈油和橄榄油等。此外,醇类、简单有机酸和烷烃等也可作为某些菌种的碳源。用这种碳源可简化随后的回收和纯化过程。如用正一烷烃来生产有机酸、氨基酸、酶、核酸和维生素等。

碳能源对产物合成的影响:高浓度的葡萄糖或高比生长速率会引起糖代谢的 Crabtree 效应,即在有氧存在下酵母会进行有氧发酵,产生乙醇。这说明正是碳源的代谢速率而不是碳源的化学性质影响着代谢的方向。易利用的糖在高浓度时也会影响次级代谢物的生产,如链霉素、放线菌素、青霉素、螺旋霉素和灰黄霉素等。现代发酵工业可用流加葡萄糖的方式来克服以上的影响。

2) 氮源 氮源的作用主要是提供合成氨基酸和碱基等所需的氮,可以以无机氮如 NH₄⁺ 盐的形式或氨基酸的形式提供。常用的无机氮有硫酸铵、硝酸钠等。这些无机氮源是生理酸性或碱性盐,如硫酸铵是生理酸性的,硝酸钠是生理碱性的。常用的有机氮和复合氮源,有尿素,氨基酸,蛋白胨,玉米浆,黄豆饼粉,花生饼粉,棉籽饼粉,蚕蛹粉,鱼粉,酵母膏等。

氮源对产物合成的影响:有的酶,如硝酸还原酶受 NH₃ 的阻遏。NH₄⁺ 会阻遏真菌对氨基酸的吸收,影响细菌对碱性和中性蛋白酶的合成。一般菌优先同化一种组分,直到耗竭为止。因此,使用氮源混合物时个别氮组分会影响代谢调节。抗生素的发酵对氮源较挑剔。如黄豆粉是多烯类抗生素发酵的好氮源。因其养分比较平衡,磷含量低,蛋白质水解缓慢。这种氮源有助于在生长期便打下高产的基础。玉米浆是青霉素的好氮源,因它含有青霉素侧链的前体——苯乙酰胺,且蛋白质的缓慢水解与菌对其分解产物的利用协调。氮源还能调节赤霉素中各组分的比例。对灰黄霉素生产来说,氮源的最适浓度随种子的质量和发酵罐的形式而变。故在培养基筛选时必须考虑上述因素。表 1-6 列出次级代谢物发酵常用的氮源。

有关玉米浆、棉籽饼粉等的氨基酸组成见表 1-7。

表 1-6 用于若干次级代谢产物发酵的氮源

产 物	主要氮源
青霉素	玉米浆
链霉素、新霉素、卡那霉素、庆大霉素	黄豆饼粉
四环类抗生素、杆菌肽	花生饼粉
螺旋霉素	鱼粉
力复霉素	棉籽饼粉

表 1-7 玉米浆、Pharmamedia (脱棉酚的棉籽粉) 的氨基酸组成

氨基酸	玉米浆	Pharmamedia	氨基酸	玉米浆	Pharmamedia
丙氨酸	25	3.8	赖氨酸		3.0
精氨酸	8	7.1	色氨酸		0.5
谷氨酸	8	3.5	天冬氨酸		7.5
亮氨酸	6	3.5	丝氨酸		17.4
脯氨酸	5	3.8	甘氨酸		3.7
异亮氨酸	3.5	2.9	酪氨酸		3.1
苏氨酸	3.5	2.9	组氨酸		2.2
缬氨酸	3.5	4.0	总固体	51	98
苯丙氨酸	2.0	4.9	游离还原糖	5.6	1.2
甲硫氨酸	1.0	1.6	水解还原糖	6.8	24.1
胱氨酸	1.0	1.4			

3) 矿物盐 许多培养基含有 Mg、P、K、S、Ca、Cl⁻ 等无机盐,其他如 Co、Cu、Fe、Mn、Mo 和 Zn 等微量元素也不可缺少,但在复合培养基中它们往往作为杂质存在,无需补充。配制合成培养基时需添加这些微量元素。其添加量:FeSO₄·4H₂O 0.01~0.1; MnSO₄·H₂O 0.01~0.1; ZnSO₄·8H₂O 0.1~1.0; CuSO₄·5H₂O 0.003~0.01; Na₂MoO₄·2H₂O 0.01~0.1。单个或多个矿物盐的浓度对某些品种发酵是很关键的。多数次级代谢产物发酵对无机 P 的耐受力在生产期比生长期低。高浓度的 P 会影响四环素、链霉素、力复霉素、多烯类抗生素、新生霉素、万古霉素、紫霉素、瑞斯托霉素、单霉素、

杆菌肽、麦角生物碱的生产。但双环霉素(bicyclomycin)要在较高P浓度下才能生产。Ca间接促进链霉素的生产。对含氯的抗生素,发酵时培养基需含有Cl⁻。

4) 维生素 许多天然碳源及氮源含有所需维生素,如缺少一种可考虑添加纯的。醋的生产需泛酸钙,谷氨酸生产需生物素,有的生产菌种需硫胺素等等。

5) 缓冲剂 pH的控制对生产很重要。可在基础培养基中加入。加入CaCO₃可使许多培养基缓冲在pH7.0左右。磷酸盐在培养基内也起缓冲作用。碳、氮源在培养基中的平衡也可作为调节pH的基础,因蛋白质、肽和氨基酸等对pH也有一定的缓冲作用。

6) 前体和代谢调节剂

①前体 是指加入的化合物能在生物合成过程中直接结合到产物分子中去,而其自身并无多大变化的物质,产物产量往往会因前体的加入而有较大的提高。例如在青霉素发酵生产中,最早用的前体是青霉素的侧链。这是从玉米浆能增加青霉素发酵单位中发现的。因它含有苯乙胺,为苄青霉素的前体。据此,发酵过程中控制前体加入量,并维持适当的浓度是青霉素生产的关键之一。表1-8列出某些发酵过程用到的前体。

表 1-8 若干发酵过程用到的前体

产 物	前 体	菌 种
青霉素 G	苯乙酸	产黄青霉
青霉素 V	苯氧乙酸	产黄青霉
金霉素	乙酸、Cl ⁻	金色链霉菌
红霉素	丙酸、丙醇	红霉素链霉菌
L-异亮氨酸	α -氨基丁酸	枯草杆菌
L-色氨酸	O-氨基苯甲酸	异常汉逊酵母
L-丝氨酸	甘氨酸	棒状杆菌
胡萝卜素	紫罗兰酮	藻状菌

②抑制剂 在发酵中加入某种抑制剂可形成特定产物或代谢中间体。用微生物进行甘油生产便是其中一例。如发酵液中加入硫酸氢钠会形成乙醛硫酸氢钠,因NADH₂不再重新还原乙醛,而还原磷酸二羟丙酮,生成3-磷酸甘油,再转化为甘油。若干抑制剂的应用见表1-9。大多数情况下抑制剂能提高产率和减少不需要的产物。如在四环素发酵期间加入溴化剂会抑制金霉素的产生。抑制剂也用于影响细胞壁的结构,增加代谢物的分泌。最典型的例子是谷氨酸生产中有时使用青霉素和表面活性剂以增加产量。

③诱导物 大多数工业用酶均是可诱导的。只有在

表 1-9 若干抑制剂在发酵中的应用

产 物	抑制剂	主要作用	菌 种
力复霉素 B	二乙基-巴比妥	抑制其他组分	地中海诺卡地菌
谷氨酸	青霉素	细胞壁渗透性	谷氨酸微球菌
金霉素	硫氰酸苄酯	抑制 EMP 途径	金色链霉菌
柠檬酸	碱金属/磷酸盐	阻遏草酸	黑曲霉
甘油	硫酸氢钠	阻遏乙醛形成	酿酒酵母
四环素	溴化物	阻遏金霉素形成	金色链霉菌

其周围存在诱导物或其结构类似物的情况下,诱导酶才会合成。如葡萄糖氧化酶在生物合成时需要诱导物——葡萄糖;蛋白酶的生产应在高浓蛋白质和适量糖浓度下进行,因糖常引起分解代谢物阻遏作用。在链霉素生产中加入酵母聚甘露糖(mannan)可诱导灰色链霉菌产生 α -甘露糖苷酶,后者能把甘露糖链霉素降解为链霉素,从而提高链霉素的发酵单位。表1-10列举需诱导物的酶生产的例子。

表 1-10 工业用酶生产时的诱导物

酶	诱 导 物	微 生 物
α -淀粉酶	淀粉、麦芽糖	黑曲霉
果胶酶	果胶	曲霉
蛋白酶	各种蛋白质	芽孢杆菌属
纤维素酶	纤维素	
青霉素酰化酶	苯乙酸	大肠杆菌

7) 消沫剂 可作为消沫剂的化合物有醇类、酯、脂肪酸及其衍生物、硅酮、磺酸酯,其他如聚丙二醇。

一般,工厂发酵多采用油脂作为消沫剂。它既可消沫又可作为碳源被菌体利用。油脂的分解代谢物还可作为抗生素的前体。油脂的消沫效率和持久性比某些化学消沫剂如硅酮低。一般,在发酵前期尽量少加或不加消沫剂。发酵过程加油过量,会剧烈降低氧的传质速率。油还会将细胞裹住,影响菌的呼吸,养分的吸收和代谢物的排泄。

1.5.2 微生物生长和生产条件

发酵过程中影响生产的因素很多,且各种因素间相互制约。一个好的菌种如果没有适当的培养基和发酵条件,其生产潜力便不能得到发挥。低产菌种和高产菌种对培养基、发酵条件有不同要求。要使菌种的生产性能得到充分表达,还必须对其产物生物合成机理,对菌的生长、代谢调节机制有所了解。这样才能对症下药,调节和优化各种参数,使之充分发挥高产菌种的生产潜力。下面介绍

影响发酵的各种因素和如何控制生长和生产条件。

(1) 菌量的控制

发酵产物是由菌体生产的。如果菌体本身是生产对象,发酵往往是成本的主要方面,发酵的目标当然追求高产率、得率和细胞浓度。若产物是细胞的代谢产物,如酶、氨基酸、有机酸或次级代谢物,则菌体有一最适浓度。从式(1-1)可见,发酵时不是菌浓越高,产量越大,因菌浓过高常会使比生产速率 q 下降,而达不到预期效果。

$$Q=q \cdot X \quad (1-1)$$

式中 Q 为体积产率(g产物/L/h); q 为比生产速率(g产物/g菌/h),代表菌的生产能力; X 为菌浓(g/L)。此外,发酵前期的比生长速率的控制也十分重要,前期比生长速率过高,如青霉素发酵中,虽然抗生素起步单位较高,但常后劲不足,菌易衰老,最终发酵单位仍不高。

据此,测定发酵过程中菌浓的变化很有必要。对液体培养基的单细胞培养可用比浊法、细胞计数器或平板活体计数法;对丝状菌可用干重法;对含不溶性固体的发酵液,菌浓测定迄今仍未有理想的办法,曾试过测定菌体中的总核酸或DNA含量来代表生长;用氧耗速率或 CO_2 释放速率与菌浓关联;由测定的糖含量,溶氧值,排气 O_2 和通气量,通过物料衡算也可估算菌体浓度。后一方法无需取样,能在线监控。

(2) 温度和发酵热的监控

微生物生长和发酵需在适当的温度下进行。不同品种发酵和同一品种发酵在不同发酵阶段都有其最适的温度。一般,产物合成的适合温度范围比生长的要窄。对生长来说,过高的培养温度虽然其生长速率高,但死亡速率也加快,养分、特别是氧易耗竭。究竟控制在怎样的温度范围内,主要取决于各种分解代谢和合成酶的需要以及培养基的成分是否易于消化。此外,有些产物对热敏感,如青霉素生产,在发酵过程中采用变温发酵,即前期温度高些,中期温度低些,放罐前再提高罐温,这样温控可比常温发酵时的发酵单位高。

在发酵过程中,菌体生长和养分分解代谢会产生热量,称为生物热或发酵热,可通过系统的热量平衡测定。

实测得知,抗生素发酵的最大发酵热为 $3 \sim 5 \times 10^3 \text{ kcal/M}^3/\text{h}$ 。从发酵热可大致估计发酵的剧烈程度。在生长期释放的发酵热与菌量有一定关系。如在新生霉素发酵前期(0~38h);热量的产生与菌的生长关系对应得很好。但在生产期,热量继续以 0.095 kcal/g/h 的速率产生,而此时菌体的增长却中止。热量的产生与葡萄糖的消耗,抗生素的合成相关,每克葡萄糖的消耗相当于20毫克新生霉素的产生。因此,发酵热也可用于监测菌的生长与产物的形成。

(3) 溶解氧浓度

在好气发酵过程中发酵液中溶解氧(DO)浓度的高

低对菌的生长和产物合成关系重大。如DO下降到最低允许值,称为临界氧浓度(DO_{crit})时,则生长和产物的形成将受到限制。因此,在发酵过程中必须满足菌对DO的要求,一般,维持DO不低于 $2 \times \text{DO}_{\text{crit}}$ 就足够了,过高的DO不仅浪费动力,且对某些产物的合成不利。因有不少酶的活性中心含-SH基,过高的DO会引起合成酶的钝化,使菌种生产能力过早衰退。

影响DO值的因素很多,可从氧的供需角度考虑。提高供氧水平可通过增加氧分压,提高通气量,搅拌转速和搅拌输入功率(P/V)以及减少培养液的粘度等手段达到。

一般,抗生素发酵需在过程中加糖、补料、通氨、补水、加前体或抑制剂,这会影响菌对氧的需求。一次加糖、补料或加油过量会使DO迅速下降。故加糖的次数、数量、方式和时机需根据DO水平和其他参数而定。在监控水平较高的条件下,根据生产和DO情况来流加养分比较合理,可取。

DO不仅是生产控制的重要参数,在发酵过程中DO的变化也可作为菌生长、生理和生化活动的表征。在供氧不变情况下,DO不断下滑,说明菌的呼吸旺盛,后期DO上升说明菌的代谢活力下降,并可能伴随菌的自溶。在没有人工干预下,DO突然下降或上升意味着发酵的不正常,有可能发生染菌,遭遇噬菌体侵袭或搅拌失灵、漏油等情况。因此,在生产罐中安装DO电极,无疑对工艺控制和生产技术管理大有帮助。

(4) pH值

pH是溶液中氢离子浓度的负对数。发酵过程中pH值是一重要参数。各品种发酵和不同发酵阶段均有其适合的pH值范围,使在此范围内与生长和产物合成有关的各种酶的活性较强。发酵过程中pH的变化是菌生理、代谢活动的结果。影响过程pH变化的因素很多。凡是导致有机酸等酸性物质的积累和碱性物质,如 NH_3 和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 等生理酸性盐中 NH_4^+ 的利用,又如葡萄糖等碳源的迅速转化,会产生许多酸性中间体,都会使发酵液的pH值下降。另外,凡是能产生碱性物质和消耗有机酸的均会导致pH值的上升。如乙酸钠等生理碱性物质的利用和菌体自溶,氨基酸的碳架被利用产生 NH_3 等等。

控制pH值的办法有多种,可在过程中加酸或加碱来调节,但这不是最好的方法。较好的办法是根据生产菌的特性,在基础培养基中通过碳源与氮源的平衡,生理酸性和生理碱性物质的搭配,加入适量缓冲物质,如磷酸盐或 CaCO_3 ,可有效控制pH的变化在一定的范围内。对长周期发酵,如抗生素,也可通过按生理需求加糖来控制。如青霉素发酵过程中当糖不足时,pH或DO会上升,这时流加适量糖水可以使pH或DO维持在适合范围内。链霉素、土霉素发酵过程常用通 NH_3 办法调节pH,同时

藉此补充氮源。

(5) 溶解 CO_2

发酵过程中糖的完全代谢会产生大量的 CO_2 ，而 CO_2 在水中的溶解度比 O_2 大许多。因此，在发酵生产过程中如不及时排出 CO_2 ，降低发酵液中溶解 CO_2 (DCO) 的浓度，则会给菌的生长和生产带来不利的影响。如发酵液中 DCO 浓度为 $1.6 \times 10^{-2} \text{mol}$ 时，会严重抑制酵母菌的生长。有人曾在 63m^3 的发酵罐内改变 p_{CO_2} 来改变四环素发酵液中的 DCO，结果表明， p_{CO_2} 为 $0.42 \times 10^5 \text{Pa}$ 时，四环素生物合成处于最佳状态。

CO_2 还会影响产黄青霉的形态，利用扫描电子显微镜，将产黄青霉接种到溶解 CO_2 浓度不同的培养基中发现，当 p_{CO_2} 为 $0 \sim 8\%$ 时，菌呈丝状； p_{CO_2} 达 $15 \sim 22\%$ 时则菌中膨胀，粗短的菌丝占优势； $p_{\text{CO}_2} = 0.8 \times 10^4 \text{Pa}$ 时，则出现球状或酵母状细胞，致使青霉素合成受阻，其比生产速率降低 40% 。在大规模发酵中 CO_2 的作用将成为突出问题。因发酵罐中 CO_2 分压是液体深度的函数。10 米高的罐中在 $1.01 \times 10^5 \text{Pa}$ 下操作，底部 p_{CO_2} 是顶部的两倍。

(6) 呼吸商与发酵的关系

所谓呼吸商，简称 RQ，是指发酵过程中 CO_2 的释放速率 (CER) 与氧的氧耗速率 (OUR) 之比。

$$RQ = \text{CER} / \text{OUR} \quad (1-2)$$

CER 和 OUR 可分别用式 1-3 和 1-4 求得：

$$\begin{aligned} \text{CER} &= Q_{\text{CO}_2} \cdot X \\ &= \frac{F_{\text{进}}}{V} \left[\frac{C_{\text{惰}} \cdot C_{\text{CO}_2\text{出}}}{1 - (C_{\text{O}_2\text{出}} + C_{\text{CO}_2\text{出}})} - C_{\text{CO}_2\text{进}} \right] f \end{aligned} \quad (1-3)$$

$$\begin{aligned} \text{OUR} &= Q_{\text{O}_2} \cdot X \\ &= \frac{F_{\text{进}}}{V} \left[C_{\text{O}_2\text{进}} - \frac{C_{\text{惰}} \cdot C_{\text{O}_2\text{出}}}{1 - (C_{\text{CO}_2\text{出}} + C_{\text{O}_2\text{出}})} \right] f \end{aligned} \quad (1-4)$$

式中 Q_{CO_2} 和 Q_{O_2} 分别为比二氧化碳释放速率 (molCO_2/g 菌/h) 和呼吸强度 (molO_2/g 菌/h)； X 为菌体干重 (g/L)； $F_{\text{进}}$ 为通气量 (mol/h)； V 为发酵液体积 (L)； $C_{\text{惰}}$ 、 $C_{\text{O}_2\text{进}}$ 和 $C_{\text{CO}_2\text{进}}$ 分别为进气中的惰性气体、 O_2 和 CO_2 浓度 ($\text{V/V}\%$)； $C_{\text{O}_2\text{出}}$ 、 $C_{\text{CO}_2\text{出}}$ 分别为尾气中 O_2 和 CO_2 浓度 ($\text{V/V}\%$)； f 为 $273 / (273 + t_{\text{进}}) \cdot P_{\text{进}}$ ； $t_{\text{进}}$ 为进气温度 $^{\circ}\text{C}$ ； $P_{\text{进}}$ 为进气绝对压力 ($\times 10^5 \text{Pa}$)。

从式 (1-3) 和 (1-4) 可见，利用红外分析仪和热磁氧分析仪或质谱仪测量进、出气体中 CO_2 和 O_2 含量，以及进气流量、温度、压强和发酵液体积便可测定不同发酵时间的 RQ 值。

RQ 可以反映菌的代谢情况。酵母发酵过程中，如 $RQ = 1$ ，表示糖代谢走有氧分解代谢途径，仅生成菌体，

无其他产物形成；如 $RQ > 1.1$ ，表示走酵解途径，生成乙醇；如 $RQ = 0.93$ ，生成柠檬酸； $RQ < 0.7$ 时，表示生成的乙醇又被当作基质利用。

在实际生产中测得的 RQ 值明显低于理论值，说明发酵过程中存在着不完全氧化的中间代谢物。在青霉素发酵中如同时加入两种碳源：葡萄糖和油，由于后者的不饱和性和还原性，使 RQ 值大大低于葡萄糖为唯一碳源时的 RQ 值。试验结果表明，RQ 值在 $0.5 \sim 0.7$ 范围，且随葡萄糖和加油量之比波比。如在发酵的菌体生长期降低葡萄糖和加油量之比 (C/O)，并维持加入总碳量不变，结果 CER 和 OUR 上升速度减慢，且菌体浓度增加也缓慢；反之，菌体浓度迅速增加，这说明油不利于菌体生长。藉此，油可用于控制生长以及用于菌体维持和产物合成所需的碳源。

(7) 补料控制

为了避免一次投料量太多而造成细胞长势过猛，并导致耗氧过多，引起分解代谢物阻遏效应，常采用中间补料法。补料法很讲究，要考虑补入哪些成分、配比、方式和时机。合理的补料延长产物合成期并提高产物浓度。

为了提高中间补料的效率，必须选择适当的反馈控制参数，以及了解这些参数对微生物代谢、生长、基质利用以及产物形成之间的关系。反馈控制补料的操作有间接和直接法。前者以 DO、pH、尾气中的 p_{CO_2} 以及代谢物质浓度等作为控制参数，后者是直接以限制性养分浓度作为参数，如碳源、氮源或 C—N 等方式。目前只有少数基质，如葡萄糖、甲醇、乙醇能在线测量。因此，直接法的使用受到限制。

有人做过研究，按菌的生理需要来补料比定时定量方式要好。反馈控制参数可用 pH 或 DO。在发酵后期利用 pH 值变化来控制加糖效果不好；若以 DO 参数为依据，则在整个发酵过程中均有效。补料的速率还取决于设备供氧能力，如图 1-3 所示，青霉素的补料速率和发酵单

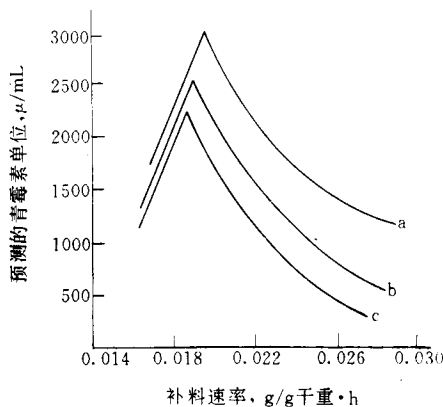


图 1-3 补料速率和 K_{La} 对青霉素发酵单位的影响
a— $K_{\text{La}} = 400 \text{h}^{-1}$ ；b— $K_{\text{La}} = 100 \text{h}^{-1}$ ；c— $K_{\text{La}} = 8 \text{h}^{-1}$