

1. 微生物生长与调节

1.1. 微生物的生长

活细胞最基本的生命特征是生长和繁殖。对生长的定义，不同学科的学者有不同的见解。细胞生物学家关注单细胞的形态变化，特别是细胞的分裂方式；而生化学者对成千个与生长有关的酶反应动力学及代谢途径感兴趣，认为生长是所有化学成分有秩序地相互作用的结果。生物物理学者则认为，细胞是热力学不平衡的开放系统，与其周围环境进行物质与能量的交流，特别表现在熵的溢流上。生化工程师把生长看做是生物催化剂数量的增长，通常以质量和细胞数目的增长来表达细胞的生长。分化（differentiation）则是生物的细胞形态和功能向不同的方向发展，由一般变为特殊的现象。

为了控制菌体的生长，需要了解生长的方式，细胞分裂和调节的规律，测量微生物生长的各种办法，微生物生长繁殖的形式与工业生产的关系，环境变化对微生物生长的影响，在此基础上设计合理的培养基配方和工艺条件。许多迹象表明，微生物的分化和产孢子的过程与次级代谢产物的合成有某种联系。因此，研究微生物的生长分化规律无疑是发酵调控原理的一个重要组成部分。

1.1.1. 生长的形式

为了测量微生物的生长，需研究不同类别微生物的生长性质，确立其生长测定的若干原理。研究的对象将主要放在工业生产菌种上，着重研究其物理性质、复制的机制和生长的形式。

1.1.1.1. 细菌的生长

细菌属于原核生物。尽管其代谢方式各式各样，但都有相似的细胞结构和繁殖机制。根据革兰氏染色的结果不同，可分为革兰氏阳性和阴性细菌，前者的细胞壁的主要组成是含有 30 分子层的多糖胞壁质；后者的细胞壁主要是由单层的多糖胞壁质，以及脂多糖和脂蛋白组成。原核生物没有核膜和细胞器。

细菌是通过一分为二的裂殖过程繁殖的。新生的两个细胞具有相同的形态和组成，其细胞组分，蛋白、RNA 和基因组是一样的。细胞的分裂（图 1-1），是由细胞壁的向内生长启动的，最终形成一横断间隔，继而间隔分裂，形成两个相同的子细胞。每个子细胞均保留亲代细胞壁的一半。两种细菌的细胞壁合成方式不同：阳性菌是沿着中纬带；

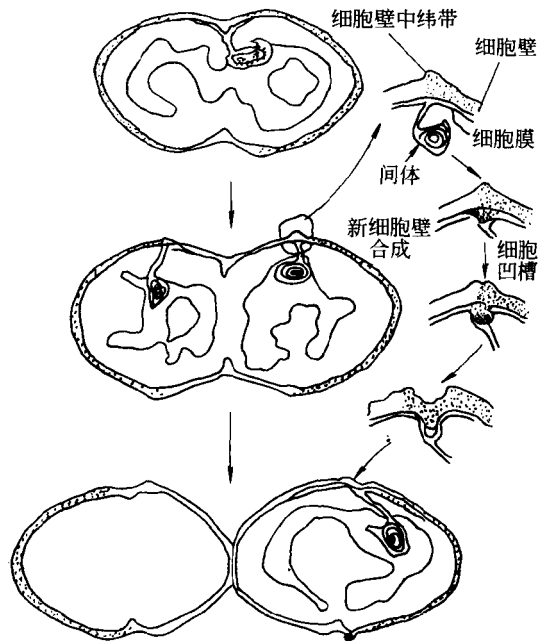


图 1-1 粪链球菌细胞壁生长模式

而阴性菌是沿着整个细胞壁，以居间共生方式合成的。

细菌的菌龄一般以培养时间表示，但实际上其真实菌龄应以繁殖的代数表示。细菌的个体很小，一般为 $1\mu\text{m}$ 左右。它们以单个、成双、呈链或簇状存在，有些带鞭毛，能运动，有些能形成芽孢。典型细菌的湿重为 $1.05 \sim 1.1\text{g}/\text{cm}^3$ ，单个细胞的干重约为 10^{-12}g ，其密度为 $1.25\text{g}/\text{cm}^3$ 。有些细菌（如大肠杆菌）的倍增时间在最佳生长条件下为 $15 \sim 20\text{min}$ ，在一般情况下为 $45 \sim 60\text{min}$ 。细菌的大小随生长速率而异（详见 1.4. 节），其在双碟上的菌落形态具有种的特异性。

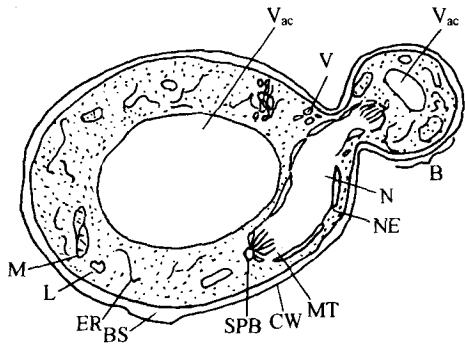


图 1-2 萌芽酵母形态示意图

B—萌发中的芽；BS—芽痕；CW—细胞壁；
ER—内质网；L—脂质球；M—线粒体；
MT—纺锤器微管；N—细胞核；NE—核外膜；
SPB—中心粒；V—泡囊；V_{ac}—液泡

1.1.1.2. 酵母的生长

酵母属于真核生物，它不形成分生孢子或气生菌丝。在其生长周期中部分时间以单细胞形式存在。其常见的生长方式是出芽繁殖，酵母细胞的体积起初逐渐增大，到一定程度便开始出芽。在芽成长期间母细胞加上子芽的体积维持几乎不变，芽长大的同时母细胞缩小（图 1-2）。在子细胞与母细胞间形成横隔后，子细胞脱离。新生的子细胞比其母细胞小些，生长速率快些，最终长成跟母细胞一样。子细胞脱离后在母细胞表面留下一个芽痕。按其出现的位置可将酵母芽殖方式分为两类：一类是两极性，母细胞轮番在其两端同一位置上萌芽；另一类是多极性的，母细胞萌芽每次出现在不同的位置上，如酿酒酵母。通过芽痕的数目有可能确定酵母的菌龄。如子细胞不

与母细胞脱离，便形成链状，称之为假菌丝（图 1-3）。酵母菌个体大小取决于其生长速率，其倍增时间愈短，细胞愈大。

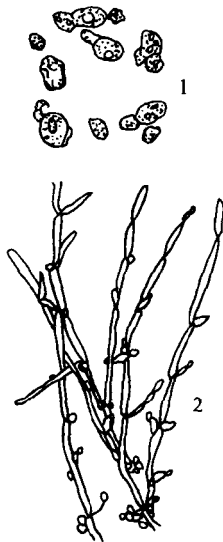


图 1-3 热带假丝酵母

1—营养体；2—假菌丝

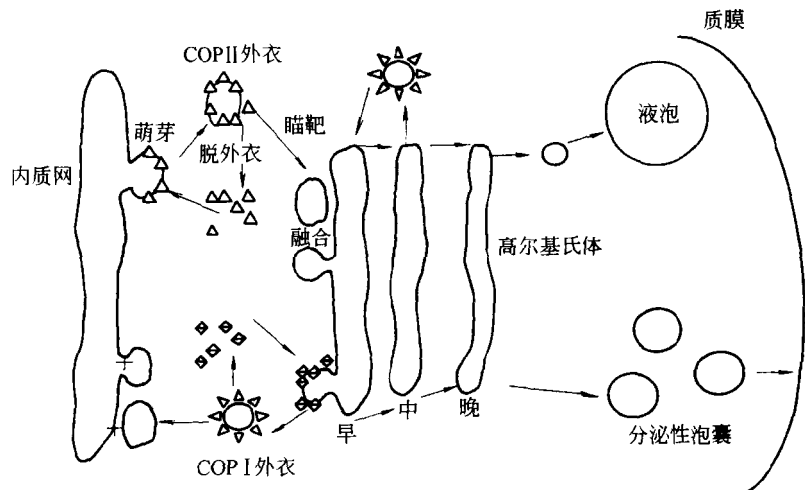


图 1-4 酵母的分泌途径

Yoda 等对酵母的泡囊运输与高尔基氏体作过一篇较全面的综述^[1]。酵母细胞构建了一种复杂的胞内膜系统，把细胞分隔成几个能就地进行高效生化反应的间室。它们也建立了输送适当材料到各间室的系统。泡囊运输是一种连接细胞中大多数主要细胞器的投递系统。高尔基氏体占据了内质网与核内体（endosome）/液泡、质膜之间的交通中心位置。投递是通过材料的成熟与分拣过程。他们通过研究高尔基氏体，鉴别了泡囊运输的每一种特性。现已能充分地从分子水平解释如何借货物的分拣、给体萌芽、拴接、入坞与融合到目标处来进行运输，以及泡囊的生成、消耗的循环（图 1-4）。

待分泌的蛋白从内质网被集中于罩上外衣的 COP II 泡囊，然后输送到早期高尔基氏体间室，在那里被修饰、分类和输送到其最终目的地。可溶性蛋白与膜蛋白通过其固有的固位机制维持其适当的定位作用。这类固位机制部分涉及蛋白-蛋白的相互作用与逆行输送到罩上外衣的 COPI 泡囊处。

1.1.1.3. 菌丝的生长

霉菌和放线菌均为丝状微生物。其生长方式是菌丝（hyphae）末梢伸长、分枝（图 1-5）和交错成网（图 1-6），称为菌丝体（mycelium）。一定长度的真菌菌丝，其横切面有间隔膜。真菌属真核生物，为多细胞，每个细胞含有多个细胞核和各种细胞器。细胞一旦形成后便保持其完整性，且与其相邻细胞的菌龄不同，越靠近末梢的菌丝，越年轻。放线菌、链霉菌和诺卡氏菌属均属于放线菌属，为原核生物，革兰氏染色呈阳性。它们无核膜和细胞器，其菌丝直径（约 $1\mu\text{m}$ ）比霉菌（ $2\sim 10\mu\text{m}$ ）细，易折断。许多真菌能形成孢子，称为分生孢子。

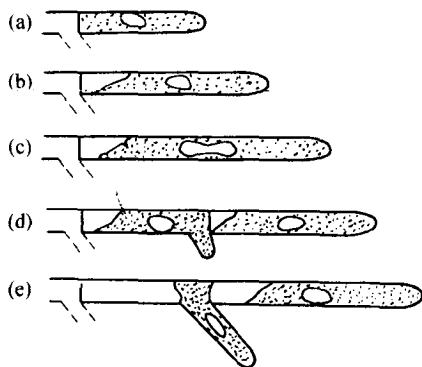


图 1-5 一种无孔间隔真菌的生长方式

- (a) 顶端细胞充满细胞质；(b) 顶端伸长；
(c) 核分裂；(d) 形成间隔；
(e) 细胞质流向新形成的分枝

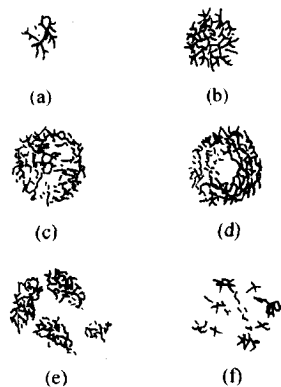


图 1-6 产黄青霉的菌团形成与解体变化过程

- (a)~(c) 菌丝生长成团；
(d)~(f) 菌丝球破裂自溶

图 1-6 显示产黄青霉菌丝团形成与解体过程的形态变化。菌团生长的密实程度受培养条件（如搅拌，供氧和温度）的影响，特别与碳源的性质有关。已知使产黄青霉生长过程中菌团变得密实的条件有：添加易利用的碳源（如葡萄糖）；搅拌加快；供氧改善。反之，用乳糖、搅拌缓慢或供氧跟不上，则菌团变得疏松。如溶氧低于某一临界值，菌丝则不成菌团，结果发酵液的粘度增加，搅拌效果差，溶氧更低，导致菌的生长和产物的合成受到严重的影响。因此，控制球状产黄青霉的生长状况成为青霉素高产的关键之一。

菌丝长度受遗传控制并与生长环境有关。在沉没培养时以分散的菌丝体或菌丝团（球）形式存在。环境对菌丝生长的形式有很大影响，如在深层培养时易受搅拌器的剪切作用，反

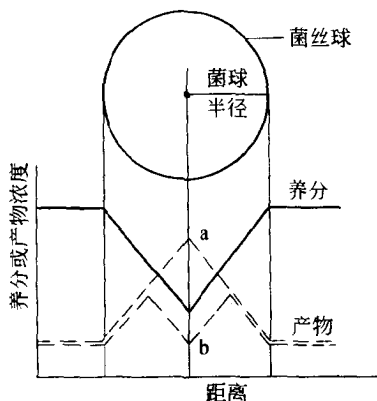


图 1-7 菌丝团中养分与产物浓度的分布

a—产物在菌丝球内合成；

b—菌丝球中心（此处的细胞缺氧或已失活）

体以相对恒定的倍增时间增殖。因此，细胞群体（数目 N ）经培养一代时间（ t_d ），便产生 $2N$ 个子细胞，再过一代便得 2^2N 个子细胞。这一进程可用指数系列表示：

$$2^0 N_0 \rightarrow 2^1 N_0 \rightarrow 2^2 N_0 \rightarrow 2^3 N_0 \rightarrow 2^4 N_0 \rightarrow 2^n N_0$$

式中 N_0 为初始群体数目； n 是经时间（ t ）的培养物倍增的次数。由此可得： $n = t/t_d$ 。

因此，在 n 次倍增后细胞的数目（ N_t ）与初始细胞数目的关系可用式（1-1）表达：

$$N_t = 2^{t/t_d} N_0 \quad (1-1)$$

以对数方式表示，得

$$\ln N_t - \ln N_0 = (t/t_d) \ln 2 = t(0.693/t_d)$$

故以细胞数目的对数与培养时间作曲线可得一直线，其斜率为 $0.693/t_d$ 。

另一种表示生长速率的方法是，假定在任何时间（ t ）与细胞数目的增长速率（ dN/dt ）正比于已经存在的总细胞数目，则得：

$$dN/dt = \mu N \quad (1-2)$$

式中 μ 为比生长速率， h^{-1} 。

式（1-2）经积分得：

$$\ln N_t - \ln N_0 = \mu t \quad \ln(N_t/N_0) = \mu t \quad N_t = N_0 \cdot e^{\mu t}$$

由此，可确立比生长速率与倍增时间之间的关系。对一倍增时间 $t = t_d$ ， $N_t = 2N_0$ 的培养物，

$$\ln(2N_0/N_0) = \mu \cdot t_d$$

$$\mu = \ln 2/t_d = 0.693/t_d \quad (1-3)$$

由于生物量的测定一般比细胞数目的测量要准确，基本的生长方程式通常用质量而不是数量来表达。常规表示菌浓和比生长速率分别用 x 和 μ 表示（ $\mu \approx dx/xdt$ ）。

比生长速率 μ 受环境条件很大的影响。在自然界生态系统中微生物的比生长速率的变化很大，而在实验室，可以控制培养物的比生长速率长时间不变。

1.1.1.5, 细菌群体的生长周期

将少量细菌接种到适当的培养基中，一般不会立即开始生长，存在一可变的停滞期（lagphase）。一旦生长开始便很快（常少于 10 次倍增时间）进入对数或指数生长期（logari-

过来，菌丝生长的形式亦会影响菌丝团内部的理化环境。菌丝团内细胞所处的环境与菌团外部或分散生长的细胞所处的不同（图 1-7），菌团内部的营养物质与代谢产物的分布是不均匀的。由于分解代谢和扩散阻力，越靠近菌团中心，养分浓度越低。菌团大而紧会因内部缺氧和养分而自溶。此外，菌团内部代谢产物的积累会使菌的生长处于不利的环境中。

1.1.1.4. 细胞群体的生长

细菌借二等分裂繁殖，但两个子细胞可能以不同的生长速率生长，其分裂也不一定同步。因此，在一正在生长的群体中存在范围广的不同世代时间（generation time），故群体的“倍增时间”（doubling time）这一术语通常是指测量的时间，而不是平均世代时间。尽管个体世代时间有不同，一般，只要外界环境无太大变化，细胞群体以相对恒定的倍增时间增殖。

thmic或 exponential phase)，停滞期的长短取决于接种量和种龄。随后，生长中止或达到一种动态的平衡，培养物便进入静止期（stationary phase），这以后细胞逐渐死亡和自溶。故细菌的生长周期一般可分为停滞期、指数生长期和静止期。下面再分期作更详细的讨论。

(1) 停滞期 刚接种后的培养物，如种子已进入静止期便需要有一段较长的适应时间，生长才能恢复，因在静止期细胞的化学成分曾发生显著的变化（后面还会详细介绍）。如种子仍处在指数生长期，停滞期一般会短得多。若细胞接种到和原来的成分大不相同的培养基中，即使原来生长旺盛的细胞，其停滞期也会延长。许多因素是通过阻碍细胞的适应和（或）生长过程来使停滞期延长的。尤其是小接种量的培养物比大接种量的培养物对这些因素更为敏感。例如，某些固氮菌在固定氮时对氧非常敏感。接种量小的培养物在新鲜氧饱和的培养基中无法固定氮而不能生长，而接种量大的培养物很快将培养基中的氧消耗到不至于阻碍氮的固定，故生长可以继续。同样，即使是异养菌，对 CO_2 也有一定的需求，一般分解代谢生成的 CO_2 完全能满足其自身的需求。然而，在接种量过小而前期又剧烈通气搅拌和 pH 小于 7 的情况下，需 CO_2 的反应受阻，从而影响生长。在这种情况下低浓度的 TCA 循环中间体，如延胡索酸、琥珀酸或苹果酸可能会“点燃”生长。

通常，从不太能满足需求的培养基移种到较能满足需求的培养基，其停滞期缩短；相反，如培养物从丰富培养基移种到贫乏的培养基，停滞期一般会延长。这是由于受丰富培养基组分阻遏的生物合成必需重新启动后生长才能恢复。但这种情况对自养菌不适用，因复合有机养分的存在会抑制其生长。

(2) 指数（对数）生长期 停滞期可看作是代谢调整阶段，不久便会进入细胞高分子组分的平衡合成（即生长）和繁殖阶段。如前所述，比生长速率受环境条件，特别是培养基的丰富程度，主要是碳和能源的影响。一般，异养菌在含复合有机成分，如氨基酸、嘌呤、嘧啶和维生素等的培养基中的生长比在简单的矿物盐培养基中要快。通常，在补充有机碳源，特别是葡萄糖的矿物盐培养基中的生长比其他碳源快些。

对兼性厌氧菌来说，有氧下的生长通常比无氧快些。这反映出在有氧条件下微生物合成 ATP 的效率更高。此外，生长在需要花费更多的能量来同化的基质中（如硝酸盐）比花费能量少的（如氮）通常要慢些。温度、pH、渗透压等对生长的影响（请参阅 1.1.3.1）。

(3) 静止期 一些必需养分随生长的进行而消失，终产物却以指数方式增长。待主要养分耗竭，生长也就中止。在含碳-能源有限的合成培养基中从指数生长期转到静止期是突然的，但对生长在复合培养基的培养物，其过渡时间较长，一些辅助的碳基质（主要是氨基酸）先后耗竭。“静止”并不是指所有的生化活动都停止，进入静止期常出现很大的代谢变化。对产芽孢的细菌，如枯草杆菌，某些养分的耗竭启动相继的形态变化，随后在母细胞内形成高度稳定的休眠芽孢。细胞在形成芽孢的过程中代谢不是静止的，而是顺序合成许多酶和新化合物。

在不形成芽孢的细菌中，当它们进入静止期时也会发生变化。DNA 再合成一段时间后细胞净重的增加停止，细胞分裂后的子细胞个体变小，其 RNA 含量低。在静止期合成许多蛋白质，包括胞外的酶。若生长受外源碳基质或可利用氮源缺少限制，便不能形成 RNA 与蛋白质合成所需的中间体。但是，饥饿单细胞通常能从非必需的 RNA 和蛋白质的水解中获得中间体。这是随饥饿的开始，胞内核酸酶和蛋白酶的作用所致。这种循环被称为周转（turnover），是一种能使细胞存活和适应环境改变的重要特性。

静止期的出现也不总是必需养分缺乏的缘故。生长通常伴随 pH 的改变，有时这一改变

也会抑制细胞的进一步合成。即使生长在中性糖中且产生唯一的分解代谢终产物 CO_2 ,也可能引起 pH 的显著移动。这可能是由于阳离子 (NH_4^+ 、 K^+ 和 Mg^{2+}) 与阴离子 (PO_4^{3-} 、 SO_4^{2-}) 的吸收比例失调。例如, 枯草杆菌可能含有占干物质 12%的氮和 5%的钾, 而细胞的磷和硫含量分别为 3.5%和 0.5% DCW (DCW——细胞干重)。因此, 被同化的 NH_4^+ 、 K^+ 与 PO_4^{3-} 、 SO_4^{2-} 的分子比为 7, 其电荷比为 2.5。在革兰氏阴性菌中也存在类似的不平衡, 尽管细胞钾和磷的需求低许多。细胞生长在葡萄糖为唯一的碳源中会使培养液的 pH 不断下降, 除非初始培养基加有强缓冲剂。相反, 生长在乙酸盐、乳酸盐或琥珀酸盐中会使 pH 升高。这是由于阴离子的消耗比阳离子多所致, 生长常由于 pH 的升高而停止。

1.1.2. 生长的测量

微生物的数量是微生物和其他生物过程很重要的过程状态变量。要了解生物反应系统中生物催化剂的效率就离不开此状态参数。生物的代谢活动与菌的生长直接相关, 为此, 需要获得单位细胞量的养分消耗与产物形成的信息。菌量是可利用的生物催化剂的一种简单度量, 它在生长速率与产物合成, 得率系数以及比速率和物料衡算方面是一关键的参数。菌量的测定对次级代谢物的生产尤为重要, 如所需产物为菌的代谢产物, 便存在菌的生长、菌体浓度的优化控制问题。如生产菌的浓度 (X) 低, 合成产物的数量 $P(= QX)$ 不会多, 菌生长过于旺盛, 如 $X \gg X_c$ (临界菌浓度) 则菌的比生产速率 Q (表征菌的生产能力) 降低, 产量 P 也不会高。故优化菌浓是工艺控制的一重要环节。对于菌体浓度, 通常单细胞生物以细胞的个数或重量, 菌丝体则以重量表示; 也有用细胞的某一代表性组分, 如核酸含量或代谢活动, 如呼吸的强弱来表示。在含有非细胞性固体的培养液中难以用直接方法测量细胞的数目和干重。据此, 有不少研究者在寻找一种能用于这种情况的准确有效的方法。这方面的进展, 将使发酵工艺控制技术跃上一个台阶。无论用什么方法, 在解释结果时应谨慎从事。在实际生产过程中可将菌浓的测量分为在线和离线两种。优化取样的时间很重要, 可节省精力, 和获得更多的与生长有关的信息。Singh 等对生物量测定作了较系统和全面的综述^[2]。

1.1.2.1. 细胞数目的测量

细胞数目的测量可采用以下几种方法, 表 1-1 列举了它们依据的原理、优缺点和适用范围。

表 1-1 各种细胞数目测量方法的比较

方 法	依 据 原 理	优 点	缺 点	适用范围
直接显微计数	用相差显微镜观察 Petroff-Hausser 载玻片 n 个格子典型值为 $n \geq 20$ 里的单位面积细胞数 A , 单位体积的总细胞数 N 可用式(1-4)表示 ^① , 式中 d 为载玻片的凹槽深度 ($d = 0.02\text{mm}$)	直接, 快速	难以区分活或死细胞 (除非事先用次甲基蓝染色, 能将染料氧化成无色的, 为活细胞)	适用于分散的单细胞悬液, 不能用于游动细胞、菌丝体或呈链状而不能分散的细胞
平板活菌计数	活细胞 ^② 在营养琼脂平板上能长成单个分散的菌落。其数量宜在 50 ~ 200 个范围。在测量厌氧菌时, 稀释液需先驱除氧, 可以添加无毒的还原剂, 移液和培养均需避开氧	较经济, 直观, 在含有非细胞性固体下, 经适当稀释后能测定	费时费力。 选择培养基要小心	适用于分散性很好的细胞或单孢子悬液

续表

方 法	依 据 原 理	优 点	缺 点	适用范围
载片培养计数	把待检样品置于铺有营养琼脂的载玻片上,经2~4代的繁殖,便可用显微镜找出微型菌落	用此法可缩短培养时间		
微孔过滤法	用一微孔(0.43~0.47 μm)过滤器(可用醋酸纤维多孔膜)过滤,收集有菌的滤片,置于合适的培养基上培养,直到菌落出现,用显微镜可定活菌数	此法可在短时间内测定菌的总数,且具有富集微生物的作用		适用于菌量稀少的液体样品
库尔特计数器	经稀释的培养物置于含有电解质溶液的容器内,里面有一细管,在管内外各安上一电极,以形成一电位差。抽真空使标准液体穿过小孔进入管内,当每一细胞通过小孔时电阻增加,电流下降,采用脉冲强度分析仪可测出细胞的总数和大小的分布	省时省力,每小时可自动处理40个样品,其效率是人工活菌计数法的50倍	小孔易被灰尘或细胞团堵塞	不含非细胞性固体的样品
流动式细胞光度计	是一种把细胞分析与分拣结合的仪器。样品在液流中被轴向地分开,当流动细胞遇到激光光束时,反射回的散射光可用于计数,如选择适当波长,细胞发出的荧光可用于分析细胞中的核酸、蛋白质和抗体等的含量	快速,高效。可计数、分析和收集大量细胞,每秒可达3000个	仪器昂贵,测定费用高,难以推广	可用于筛选大量基因工程菌和产生单克隆抗体的杂交瘤细胞
表荧光滤光技术	细胞染上荧光染料(吖啶橙),用一聚碳酸酯膜滤器收集细胞,最后用荧光显微镜计数	简单,迅速	重现性欠佳	不适用于聚结的细胞。需打散成单个独立的细胞后方能用
荧光-抗体技术	一般,此法是将细菌的细胞组分注射入试验动物内。经纯化的抗体使之带上适当的荧光标记。此抗体与微生物的抗原结合,便使它发荧光,可用表荧光显微镜检测发荧光细菌的数目	灵敏,可就地使用。具有种的特异性。可同时鉴别与测量	主要问题是抗体荧光的非特异吸收	此技术广泛用于细菌病理学、生态与环境学,对产生粘液的微生物系统不适用
微型-ELISA	给兔子服用细菌培养物的无细胞萃取液所得的抗血清被用于制备抗血清化合物。抗体与酶结合,用戊二醛将其交联	灵敏	较慢,死亡细胞的抗原也有反应	适合于大分子。用于硫酸还原细菌的计数
电子显微镜	采用投射式电子显微镜。样品经超速离心后直接置于电子显微镜网格下计数	操作简单,迅速	仪器昂贵	难于应用推广

$$\textcircled{1} N = \frac{\sum_{n=1}^N A_n}{nd} \quad (1.4)$$

这里的活性是指在特定培养基下的生长能力,有的培养基有利于生长,对正要死亡或突变的细胞,情况更是如此。

(1) 库尔特计数器 此装置的原理如图 1-8 所示,经稀释的培养物被置于含有电解质的容器内,里面放有一根管子,在管内与容器内各安上一电极,以形成一电位差。抽真空使预

先定量的液体穿过小孔进入管内，每一个细胞通过小孔时电阻增加，电流下降。电流下降的幅度与细胞体积成正比。采用一种脉冲强度分析仪，便可测出细胞的总数和细胞大小分布状况。有各种孔径的库尔特计数器，孔径为 $30\mu\text{m}$ 适用于测量细菌，但小孔易被灰尘堵塞。该仪器可计数到每秒 500 个细胞，测量一个样品仅需几秒，每小时可自动处理 40 个样品，效率是人工的 50 倍。

(2) 流动式细胞光度计 这是一种把细胞分析与分拣结合在一起的仪器（图 1-9）。

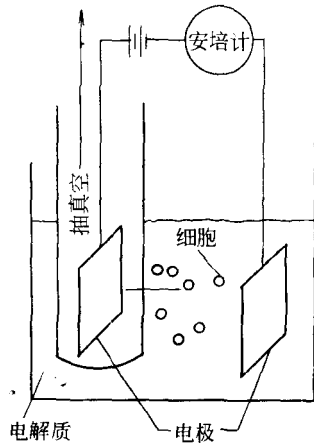


图 1-8 库尔特细胞计数器示意图

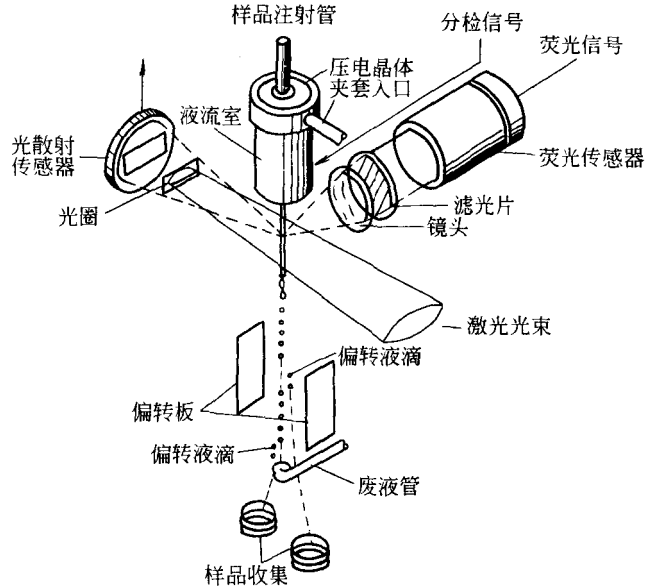


图 1-9 流动式细胞光度计示意图

培养物在液流中被稀释，细胞被轴向地分开，当流动细胞遇到激光光束时反射回的散射光可用于计数。如激光波长选择在会使细胞发出荧光的波段中，这种荧光能反映出细胞的若干特性，从而可以分析细胞中的核酸、染色蛋白质或荧光抗体等物质的含量。此仪器还具有收集特殊细胞群体的功能。细胞分拣是让含有所需细胞的液滴带上电荷进行的。通过细胞的荧光信号可辨别所需的细胞。当液滴经过带有电荷的偏转板装置时，所需的细胞液滴因带电荷而偏转向一收集器。用此装置可计数、分析和收集大量特殊细胞，每秒可达 3000 个。此技术的关键在于能否使所需细胞带上能检出荧光或光散射标记，在筛选大量基因工程菌和产生单克隆抗体的杂交瘤细胞方面日益显示其重要性。

Katsuragi 等对流动式细胞光度计的应用作了一篇较全面的综述^[3]，特别是在细胞分拣方面可用于测量细胞的组分、肽和核苷酸的序列、细胞功能与酶的活性。

1.1.2.2. 细胞量的测量

以细胞量来表征生长情况虽然有不足之处，但在工艺控制和工程上仍不失为一种切实可行的手段。在工艺控制上菌浓是一个重要的状态参数，菌浓的失控将严重影响产物的合成。然而，工业发酵多数用含大量难溶物的复合培养基，给菌量的测定带来很大的困难。由于菌浓对工艺控制的重要性，各国研究人员想了许多办法，尤其希望能在线获得有关生长方面的信息，便于加强工艺控制。在工程方面如不能确定研究对象在过程中的数量变化，就难以有针对性地设计更为先进高效的反应器。一些间接参数，如呼吸强度、比生长速率、生产强度（比生产速率）和比基质消耗速率均需知道菌浓才能求得。

菌浓的测量先要将菌体从发酵液中分离出来。一般采用离心或过滤方法。前者的缺点是洗涤不便，操作时间较长，离心过程中菌仍在活动，使菌量变化，细胞干燥后误差较大；后者所需的样品量少，易洗涤，时间短，但需防止细胞的流失，不适用于粘稠的样品。其他一些方法的优缺点以及适用范围见表 1-2。

表 1-2 测量菌浓的几种方法

方法	依据原理	优点	缺 点	注 意 事 项	适用范围
干重法 (DCW)	样品经过滤或离心、洗涤、烘干和称重求得	操作简便	误差较大,所得干重包含死亡或失活细胞	所取样品应具代表性;样品需先除泡沫;干燥到衡重,应避免温度过高,时间过长	只适用于可溶性液体培养基内生长的细胞。多用于丝状菌量的测定
比浊法	透过的光强度与菌浓成正比,一般在 600 ~ 700nm 内测量	简易,快速	线性关系受一定条件的限制。稀释或洗涤会干扰细胞的渗透压,从而改变折射率和浊度	样品的菌浓不能过高,否则光散射增加,误差增大。标准曲线只适用于个别的菌与一定的生长条件	对含大量非细胞性固体的培养液不适用
离心压缩细胞体积(PCV)法	样品置于一刻度离心管,离心后测量细胞等固形物所占百分比 ^①	简易,可行	只能表示相对菌浓;受菌形态变化、丝状或成团状的影响	培养液的渗透压会影响细胞的膨胀性,从而影响 PCV 测定值	适用于含非细胞性固体的发酵液菌量测定

如离心后细胞与非细胞固形物间有明显界限，可测量细胞所占体积，再取一定量的湿细胞，烘干、称重，计算其含水量，可求得较准确菌浓。例如，将 5.0ml 湿细胞烘干后，细胞干物质占湿菌的 20%，密度约为 1.0g/ml，则菌浓 = 压缩细胞体积/5 (g/L)。

成像分析法对于微生物的分类和菌量的估算是一种有用的手段。发酵液的样品用显微镜放大约 10 倍。图像通过一成像分析软件，用计算机进行处理，以求得菌的分类与计量。但这种方法仍需若干试探性调整，以调节其临界值和排除干扰。

Krairak 等采用成像分析来精确测量生产黄色色素的单孢菌属菌团的重量^[4]。其分析方法介绍如下：稀释培养液样品，借沉降作用分成菌丝体与菌团两个部分。将含菌团的双碟置于日光反射镜下。经校准后用 CCD 照相机 (Teleris2-KAF1400-3) 摄下整个样品的反射镜映像，照相机配有 Nikon 镜头 (AF Micro Nikkor 60 mm, 1:2.8)。影像用一计算机的共享图像加工与分析程序 NIH 进行分析。用一图形分辨率为 1024 × 1024 像素和 12 位的灰度值来记录图像。经遮蔽和校准目标与背景的分离后，通过应用一阈值可以获得一种二进制映像。经二进制映像分析后记录目标区域及最大灰度值与平均灰度值。按下式计算生物量与菌团部分的生物量。据报道^[5]，目标的灰度值代表其密度，可以回溯到一三维的形态结构。用 Lambert 与 Beer 定律模拟，计算生物量 (M)，如下：

$$M = A d c = \frac{A}{k} \lg(G_0/G)$$

式中 A 为目标面积，cm²；c 为浓度，mg/L；d 为三维扩展，cm；G₀ 为最大灰度值；G 为平均灰度值；k 为比例因子，(L/mg)/cm。

1.1.2.3. 菌浓的间接测量

当培养基中含有大于 20% 的难溶固体，或由于壁上生长，固定化，不完全混合，絮凝或形成菌团而使样品不具代表性，用直接方法不能满足测量目的或分析费用过高，难以进行

在线控制的情况下，可考虑测定生物催化剂的总活性来间接表征菌的生长状况，这比直接菌量的测量更有意思。在生理上，细胞与环境的相互作用，如养分的消耗、代谢产物的形成在一定条件下与生长有直接的联系，可作为间接菌量测量的信息来源。表 1-3 归纳了几种用于估算菌浓的间接方法。这些方法的成败取决于 细胞组分在胞内浓度应相当一致； 在定量萃取与分析方面应相当精确； 非细胞固体中是否也含有同样的组分，细胞中此组分的含量与细胞量的关联。表 1-4 列举了一些用间接方法测量细胞量的方法。

表 1-3 几种用于估算菌浓的间接方法

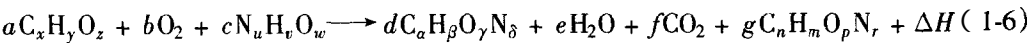
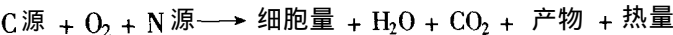
分析对象	分析与评价
细胞组分:	
核酸	荧光计、分光光度计;由于存在其他核苷酸与肽,在吸收光谱方面存在系统误差;取决于生理因素
蛋白质	繁复;取决于营养与生理因素;正确性可疑
细胞 C、PO ₄ ³⁻	不常用;存在取样误差;洗涤导致样品化合物的损失;菌浓估算偏低
多糖	在样品制备上易引起误差;可能存在副反应;难于校正
脂质	取决于生理状态,代谢活动;在细胞中的迅速周转
ATP	相当特异;取样和样品制备是决定性因素;可用于含有不溶物的培养物
代谢活动	与生长直接有关,对细胞中的生理变化敏感;有时估算结果会过高

表 1-4 分析对象（用于间接细胞量的测量）的测量方法

元素	分析对象	方 法
C	醇(例如,乙醇)	气相色谱、酶分析、流通注射分析(FIA)、透气膜传感器、高效液相色谱、红外光谱分析、质谱分析、核磁共振光谱分析
	糖(如葡萄糖)	酶分析、FIA、葡萄糖电极、高效液相色谱、厚膜传感器
	烷烃	气相色谱、高效液相色谱
N	氨	NH ₃ 电极、NH ₄ ⁺ 电极、化学分析、酶分析、质谱分析、化学分析、硝酸盐电极
	尿素	酶分析、FIA、生物传感器
O	O ₂	FIA、原电池型或极谱型氧电极、质谱仪、热磁氧分析仪
P	磷酸盐	化学分析、酶分析、FIA、高效液相色谱、核磁共振光谱分析
其他	氨基酸	生物传感器、化学分析、酶分析、高效液相色谱、氨基酸分析仪
	矿物盐	原子吸收、专一性离子电极

根据元素与质量平衡可用数学模型描述物质或能量的测量与细胞量的测量之间的关系。不少学者提出各种各样描述细胞生长的模型，其复杂程度各异。基于数学模型的细胞量测量方法有时也被称为“软件化传感器（software sensors）”。

利用化学计量法可归纳养分的消耗与细胞的生长和产物形成的关系，如式（1-6）所示：



式中 $a \sim g$ ——化学计量系数。

这一方法的可靠性取决于测定值与细胞量之间的相关系数是否恒定。从 C 和 N 的克分子量平衡可得：

$$\text{对 C 平衡: } ax - d\alpha - f - gn = 0 \tag{1-7a}$$

$$\text{对 N 平衡: } cu - d\delta - gr = 0 \tag{1-7b}$$

间接测量在各种生长条件下所需的生物信息只是生物的元素组成（图 1-10）。在这些数

值中即使很小的差异也会导致测量结果的很大的偏差。原则上一种元素平衡已足够计算菌浓。

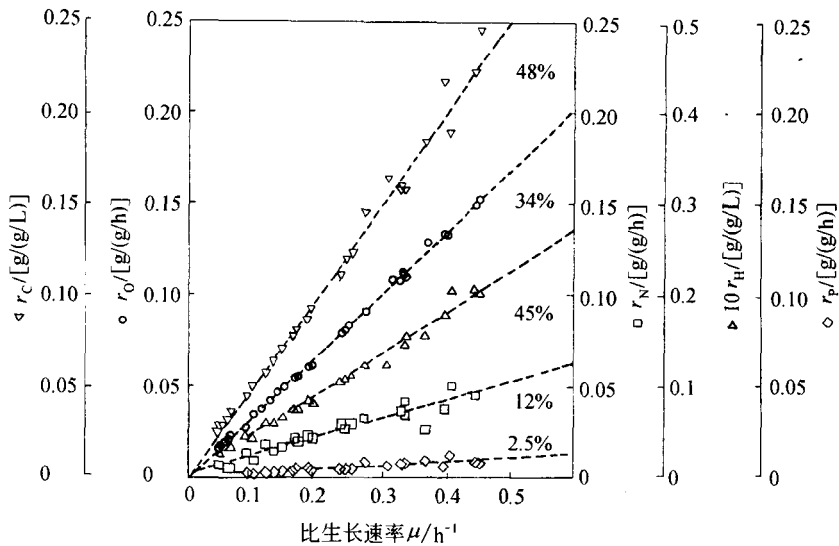


图 1-10 酵母菌属在不同生长条件下元素平衡的评估

养分和产物的基本通量之和是比生长速率的函数，其回归线的斜率是细胞（未知）基本组分的度量；

r_C 、 r_O 、 r_N 、 r_H 和 r_P 分别为 C、O、N、H 和 P 的比消耗速率

近年来，在线间接菌浓测量方面取得了一定的进展，绝大多数的基质或产物均不能用于在线测量最常用的办法是测量 NH_3 的浓度，这可以通过控制 pH 和在线测量尾气中的 O_2 和 CO_2 求得。由于测量的是总的更新速率，该法并不直接测量菌量，而是总的生长速率 μ_{XV} 。如果式 (1-5) 的得率系数完全已知，即使无法监测培养基中的一些成分，也可以建立起一种估算菌量的线性方程。

(1) 核酸 细胞的一些组分，如 DNA 与 RNA 的含量与菌量之间有一定的关联。核酸通常存在于所有活体细胞中，可作为菌量的度量。但此法不能区分细菌与真菌的菌量。核酸的测定方法相当精确，但也存在系统误差。细胞中的核苷酸与肽具有同样的颜色反应和吸收光谱，对核酸的测定有干扰作用。用于测量生长的这些参数需先进行生物标定，因细胞组分随时间变化，并取决于营养与生理因素。

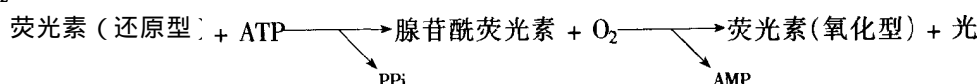
单个细胞的 DNA 随生长速率而变化。生长快的细胞由于具有较多的复制叉，DNA 含量较高。但按单位质量细胞计算的 DNA 含量变化较小。故 DNA 可用于表征生物量的变化。问题是细胞中一般只含 1%~3% 的 DNA，其测定易受 RNA（含量约为 7%~25%）干扰。测定 DNA 常用的方法有两种，即二苯胺法和溴化乙锭法。培养基中的不溶性非细胞蛋白对 DNA 分析无干扰。

(2) 蛋白质 一般蛋白质的含量，细菌为 60%~65%，酵母为 45%~55%，霉菌为 40%~50%。蛋白质含量通常随生长速率的变化不大，因而可作为细胞量的常规度量。细菌的大分子物质随生长速率变化，生长速率增加时，RNA 含量明显增加，蛋白质和 DNA 含量却略有下降（参阅 1.2.4.）。在过量碳源和氮限制下细胞中积累的物质，如糖原、脂肪、聚 β -羟基丁酸等可达细胞干重的 70%，使蛋白质含量相对减小。在长周期的霉菌发酵中老细胞形成空泡，导致蛋白质含量降低。尽管有这些限制，蛋白质含量仍然是表征生物量的有

效、简便而可行的方法。主要的应用限制是培养基成分中不能含有非细胞性和水不溶性的蛋白质。

测量蛋白质含量的方法常用双缩脲法、Lowry法和凯氏定氮法。双缩脲法简单，且测定的是肽键，重现性好，但灵敏度不高。Lowry法灵敏度高，但它测定的是其中的芳香族氨基酸。除非样品与用于标准曲线的蛋白组分相似，否则测定误差较大。凯氏定氮法测得值乘以6.25便是粗蛋白的量，但它受非蛋白氮的影响。尽管存在这些限制，此法还是有一定使用价值。此法曾应用于纤维素生物降解研究中的生物量的测定。在含有纤维素的情况下，可用NaOH溶液萃取真菌菌丝体蛋白，然后测蛋白含量以此来估算生物量（假定真菌菌丝体的蛋白含量为40%）。

(3) ATP 活细胞普遍含有ATP，其浓度与菌量成正比。有几种测定胞内ATP含量的快速方法，其中一种是利用萤火虫荧光素酶催化ATP与荧光素反应生成腺苷酰荧光素，后者被O₂氧化后发光，其反应如下：



每水解1分子ATP可得1光子，可用荧光光度计测量。

有一种简易快速ATP萃取方法，其要点是，样品在二甲亚砜中匀浆和快速离心，加入保存用的缓冲液（含甘氨酸0.75mmol/L，Mg-EDTA4.4mmol/L，pH7.5），在液氮中迅速冷冻，并保存在-18℃。在测量前将萃取液迅速解冻。粗荧光素酶用20mmol/L Tris缓冲液（pH7.8）配制，在一光度计测量管中进行分析。从反应中发射的光用分光光度计、液体闪烁计数器或照度计测量。样品中的ATP浓度可从标准ATP标定曲线中借内推法求得。萤火虫荧光素酶系统分析ATP的灵敏度约为10⁻⁴molATP（相当于10³个细菌），因ATP含量为4nmol/mg干菌，相当于平均6.4×10¹¹个细胞/g。

此法曾成功地用于生物增殖期间，估算生物量和检测食品的污染情况。胞内ATP浓度与真菌生长及纤维素消耗比率随时间的变化具有良好的线性关系。ATP测定的可能误差来源于取样和萃取，因ATP的分析受时间的约束。因此，ATP分析的关键在于取样后尽可能缩短分析时间。大肠杆菌的ATP库存量约为4.7~7.5μmol/g DCW。估计库存ATP每秒周转4~8次。取样期间ATP的合成与消耗失去平衡，迅速影响其库存量，从而导致细胞估算上较大的误差。尽管如此，一旦将操作标准化，快速取样，制样，还是能获得一致的结果。ATP分析方法的优点是非细胞性原料不含ATP。

(4) 代谢活动 CO₂的产生是另一种生长指标，特别适用于早期生长阶段。在对数生长期CO₂的释放在一定条件下与细胞量成正比。但培养条件的变化有时会影响菌量的测定，因pH即使是很小的变化也可能明显影响CO₂的释放量。监测CO₂的生成是跟踪生长活动的有效方法。最常用的是红外分析仪和质谱仪。这两种仪器均可连接多个发酵罐。计算CO₂释放速率需借助于式(1-8)，同时需要知道氧的吸收与气流速率：

$$CER = \frac{F_n}{V} \left(\frac{p_{c[out]}}{p - p_{c[out]} - p_{w[out]} - p_{o[out]}} - \frac{p_{c[in]}}{p - p_{c[in]} - p_{w[in]} - p_{o[in]}} \right) \quad (1-8)$$

式中 CER为CO₂释放速率，(mol/L)/min；F_n为N₂流速，mol/min；V为液体体积，L；p为总压力（与分压相同），Pa；p_{c[out]}为排气CO₂分压，Pa；p_{w[out]}为排气水蒸气分压，Pa；p_{o[out]}为排气O₂分压，Pa；p_{c[in]}为进气CO₂分压，Pa；p_{w[in]}为进气水蒸气分压，Pa；p_{o[in]}为进气O₂分压，Pa。

用 CO_2 生成速率监测生长，无需无菌取样便能精确测定排气中的 CO_2 含量。单位细胞量生成的 CO_2 取决于分解代谢途径及产能分解代谢与耗能合成代谢耦合的效率。对于许多好气或厌氧发酵，上述因素几乎不变。在产黄青霉生长期间 CO_2 生成速率是细胞生长的指标。 CO_2 是分解代谢的最终产物，它与 ATP 的生成有关。若每 mol ATP 所产生的细胞量是恒定的，且 ATP 以恒定速率合成，则 CO_2 的生成速率与细胞的生长成正比关系。确切的比例取决于 ATP 的产生途径，如在好气条件下则取决于末端氧化的电子传递效率。若生长与分解代谢未耦合（如静息细胞代谢），则这种相关性便不成立。

氧吸收的测量也可以作为细胞活性的度量。活菌的氧吸收速率相当稳定。所以，氧的吸收可与生物量关联，条件是未出现主要的生理变化，如对新能源的适应。有人发现，在不同碳源上生长的酵母，其氧吸收速率可作为代谢活动的指示。在好气培养中热的释放速率与氧细胞得率（形成单位细胞量的氧的吸收）的关联较好。

1.1.2.4. 生物量的在线测量

近年来，在实验室与工业规模的生物过程中优化控制方法有了长足的进步^[6]（表 1-5）。在使用现代技术来优化生物过程方面虽然遇到一些困难，但这些方法在实时分析，提高现有的工艺水平上还是显示出其明显的优势。

表 1-5 生物量的在线估算方法

方 法	评 论
微量热计	快速，基于热的释放，与菌浓及 O_2 的吸收相关，也适用于缓慢生长的细胞，如杂交瘤细胞及含不溶性基质的生物过程；活性受温度的影响
荧光	对 NAD(P)H、F350、F420 等特异，取决于细胞的生理状态
电容/电导/阻抗	电容/阻抗/电导；快速准确；信号取决于培养基成分与 pH；气泡干扰
自动化方法	敏感；受颗粒及气泡的干扰；存在参比问题
分光光度计	快速；具有选择性；存在标定问题；取决于细胞的成分与生理状态

在许多测量菌量的方法中理想的办法是直接监测生物反应器内的生物催化剂。这是控制工业发酵的现有重要参数之一。电子传感器能传代谢速率或生物量的低阻抗模拟或数字信号。但在使用这些现代技术时会遇到一些困难。

(1) 微量热法 发酵产生的热量同生长与产物形成有化学计量关系，可利用来间接估算生物量。在发酵过程中热的输入与输出具有式（1-9）的关系：

$$Q_{\text{acc}} = Q_f + Q_{\text{ag}} - Q_e - Q_s - Q_{\text{cond}} - Q_{\text{cool}} \quad (1-9)$$

式中 Q_{acc} 为热的积累；热的输入项 Q_f ， Q_{ag} 分别为发酵热和搅拌热；输出项 Q_e ， Q_s 分别为蒸发损失和空气中显热损失； Q_{cond} 为导热损失 $[= (T_0 - T_f) uA]$ ； Q_{cool} 为冷却系统的热损失 $(= WC_p \Delta T)$ 。

有两种方法可以从此式求得发酵热：

第一种是稳态热平衡法，在热的累积 $Q_{\text{acc}} = 0$ 时：

$$Q_f = Q_{\text{cond}} + Q_{\text{cool}} + Q_e + Q_s - Q_{\text{ag}} \quad (1-10)$$

代入各项的热等式得：

$$Q_f = WC_p \Delta T + (T_0 - T_f) uA + FC_p \text{air} \Delta T_{\text{air}} + F \Delta h - KN^n \quad (1-11)$$

式中 W 为冷却水流速； C_p 为冷却水比热容； ΔT 为冷却水的温差； u 为总的传热系数； A 为发酵罐的导热面积； T_0 和 T_f 为罐内与罐外温度； F 为气体流速； $C_p \text{air}$ 为空气热容量；

ΔT_{air} 为气体流经发酵罐的温差； H 为在温度 T_f 下空气中饱和水蒸气的含量； λ 为蒸发汽化热； K 为把搅拌热与 N (搅拌转速) 的 n 次关联起来的比例常数。

显热损失通常比 Q_f 小得多，可忽略。如用水将输入空气在 T_f 下饱和，则蒸发热也可忽略，也可用干湿球温度计测量进出口空气求得 Q_e 。搅拌热可用 KN^n 估算，其中 K 与 n 宜从经验中求得， n 值一般为 2~3。

第二种测量发酵热的方法是动态法。在式 (1-9) 的 $Q_{\text{cool}} = 0$ 时：

$$Q_f = Q_{\text{acc}} + Q_{\text{cond}} + Q_e + Q_s - Q_{\text{ag}} \quad (1-12)$$

$$Q_f = MC_p \Delta T / \Delta t + (T_0 - T_f) uA + FC_{p, \text{air}} \Delta T_{\text{air}} + FHL - KN^n \quad (1-13)$$

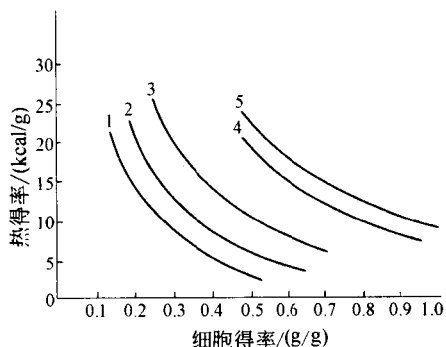


图 1-11 酵母细胞热得率与细胞得率的关系

1—葡萄糖；2—甲醇；3—乙醇；

4—十六烷；5—甲烷

关闭冷却水后，测量温度随时间的变化 ($\Delta T / \Delta t$)，按式 (1-13) 便可求得 Q_f 。以酿酒酵母为例，产热的速度与比生长速率成正比。每克细胞所产生的热量 $K = 4.4 \text{ kcal}^{\text{①}}$ 。其热得率 (每克细胞产生的热) 取决于基质利用效率 (g 细胞 / g 基质) 细胞得率随时间变化，热得率 K 也在变。从图 1-11 可见，当细胞得率处于同一值时 (如 0.5)，基质的氧化状态越低，热得率就越高，即甲烷 > 十六烷 > 乙醇 > 甲醇 > 葡萄糖。

新生霉素发酵前期 (0~38h) 热量的产生与菌的生长关系对应的很好。在生产期热量继续以 95 (cal/g) /h 的速率产生，而此时生物量的增长中止。

这相当于葡萄糖的比消耗速率为 $0.025 (\text{g/g})/\text{h}$ 。这是细菌和霉菌用于维持除生长以外的各种活动所需的能量消耗。热量的产生和葡萄糖的消耗均与抗生素的产生有关，每克葡萄糖的消耗相当于产生 20mg 新生霉素。因此，产生的热量对监测整个发酵的生长与产物形成有参考价值。

热量的产生也与耗氧速率相对应。用大肠杆菌 (葡萄糖为碳源)、假丝酵母、枯草杆菌、黑曲霉 (葡萄糖或糖蜜为碳源) 进行试验，所得关系式为：

$$Q_f = k_{O_2} Q_{O_2} \quad (1-14)$$

故只要知道 $Q_{O_2} [(\text{mmol/L})/\text{h}]$ 与产热 $Q_f [(\text{kcal/L})/\text{h}]$ 的相关系数 $k_{O_2} (= 0.124 \pm 0.003)$ 便可以从氧吸收数值求得发酵热。用 CO_2 生成速率也可推出类似的关系式：

$$Q_f = k_{\text{CO}_2} Q_{\text{CO}_2} \quad (1-15)$$

式中的相关系数 $k_{\text{CO}_2} (= 0.097 \pm 0.004)$ 。有人用 Ciba-Geigy 热流-量热计监测生物过程。当 *Kluyveromyces fragilis* 在好气条件下生长在乳糖合成培养基中时，热的产生与生物量成正比。生长条件的改变并不影响热与生物量的比值保持恒定，为 10.59 kJ/gDCW 。量热计也适用于测量缓慢生长的细胞，如杂交瘤细胞。

(2) 培养物荧光 测量培养物的荧光可以实时估算菌浓。荧光主要来自胞内 NADH 和 NADPH。有人曾用荧光传感器，如荧光检测系统 (Biochem Technology, Malvern 来测量生物量^[7]。这种方法的主要限制是 NADH 随生理状态而变。

① $1 \text{ cal} = 4.184 \text{ J}$ 。

(3) 电容、电导和阻抗 监测培养基电导率的变化可以获得有关生长的信息。培养基的离子浓度因微生物的代谢物而改变。电导率用于表征溶液的离子浓度，因而可以作为细胞群体的可靠度量。此法快捷，更为准确、灵敏，即使只有一个活的微生物也能测出来^[8]。用一种数字电导仪 PW09527 (Philips Co., England) 测量的电导率与植物细胞量在 10g/L 范围内成线性关系。

有一种耐蒸汽灭菌，可就地应用的电容探头可用于在线监测 20 ~ 2000L 发酵罐中的菌量^[9]。这种仪器的在线测量的电容与离线测量的 OD₆₂₀、DCW、菌落形成单位之间存在线性关联，可用于测量的最高菌浓：链霉菌 30g/L，酿酒酵母 106g/L，毕赤酵母 89g/L。搅拌转速及外源无线电频率对在线测量略有干扰。此法曾用于监测含固体基质的培养液中菌的生长^[10]和悬浮培养中的植物细胞^[11]。但这种监测器只能用于测量电导率低于 20mS 的培养基。其信号不仅取决于生物量，还受培养基的成分、pH 和气泡的影响。

在补料分批培养的色素生产中很难利用光密度准确测量细胞浓度，Krairak 等采用一种电容探头（胶体电解体探头 HP E5050A 型，Hewlett-Packard 公司）^[12]来在线监测发酵液的介电常数，将细胞介电常数（即发酵液与新鲜培养基的介电常数之差）与细胞量关联可得一直线；使用频率为 184KHz，100 周波数 (cycle)，总取样时间为 7min。

测量生长培养基中的阻抗变化可以得知微生物的生长活动。酵母的生长引起阻抗的增加，而细菌使之降低。利用这种差异可对啤酒酿造进行质量控制，还有一种阻抗计可用于监测啤酒是否受到杂菌的污染。有人曾在 FIA 系统中使用电化学方法在线监测大肠杆菌，发现此法快捷，且与经典的菌落形成单位测定方法有很好的对应关系^[13]。离子溶液的介电性质受细胞材料存在的影响。微生物细胞悬液的射电频率介电性质是悬液颗粒半径与体积分数的直接单调函数。它们随颗粒物、气泡和水溶液的性质而有显著的不同。在微生物过程中就地实时测量这些变量可以直接估算生物量^[14]。有一种基于此原理的仪器（Bugmeter 活细胞计数器，Aber Instrument Ltd., Aberystwyth），可用于在线测定。非细胞颗粒物对生物量的测定无明显干扰。此法的缺点是在稀溶液中的灵敏度低，且受浓培养基的电导率的严重干扰。

(4) 自动化方法 采用流通注射分析 (FIA) 法，用一 OD 传感器，作稳态吸收测量可获得可靠的信号，解决了在高浓度培养物的直接测量问题^[15]。有一种带不锈钢过滤筛板的自动过滤装置曾用来测量大量样品的菌浓。此法适用于真菌培养物，可测量样品通过过滤器后的滤液通量与滤饼的体积。用此法可测量 2 ~ 40g/L 的菌浓。用适当的描述性模型可以计算菌浓。用声共振密度计 (Paar DMA-55/DMA-60, Austria) 测量的密度在 0 ~ 5000D 单位范围内与光密度成线性关联（这需要有不含细胞的培养基的密度作对照）。此法曾成功地应用于哺乳动物细胞培养物，其测量高限达 6×10^7 个细胞 / ml。

(5) 光谱学 有一种近红外线光谱的短波可用来测量微生物的代谢状态^[16]。用它可以很快测量数百个光谱和菌浓。同样用于测量蛋白质的红外线光声光谱技术也可应用于间接测定不同培养物的菌浓。用 UV 共振拉曼光谱仪可以测定和鉴别细菌与细菌内孢子。吸收 UV 的细胞分类标记物可被选择性地激发，产生特征性的共振拉曼细菌指纹^[17]。这种指纹可作为快速鉴别的依据。从同一光谱，细胞壁组分的浓度可以间接地与生物量关联。但细胞组分随培养条件的变化以及细胞生长阶段的不同而改变，这使得光谱在鉴别上的应用复杂化。尽管如此，这是一种非常灵敏的方法，因小于 250nm 的蛋白荧光可以忽略。

1.1.3. 环境对生长的影响

环境因素会影响菌的生长和产物的合成。故有必要了解微生物代谢调节与环境之间的关

系。微生物与环境是相互影响的。微生物在生长和适应环境过程中会改变其所在的环境，有时是为了提高其竞争优势而这样做的。了解环境对微生物的生长是为了控制其生长，为提高产品的质和量服务。生长的好坏，菌量的多寡直接影响生产。控制生长可从物理或化学因素着手。

1.1.3.1. 物理环境

一些物理因素，如温度、搅拌、空气流量、超声波和膜过滤等对生长均有不同程度的影响。以下分别介绍。

(1) 温度 不同的微生物，其最适生长温度和耐受温度范围各异。如图 1-12 所示，嗜冷菌、嗜温菌、嗜热菌和嗜高温菌的最适生长温度分别为 18℃、37℃、55 和 85℃左右，其共同特点是菌在低于最适生长温度的温度范围内比在高温度范围内有更强的适应力；其生长温度跨度为 30 左右。

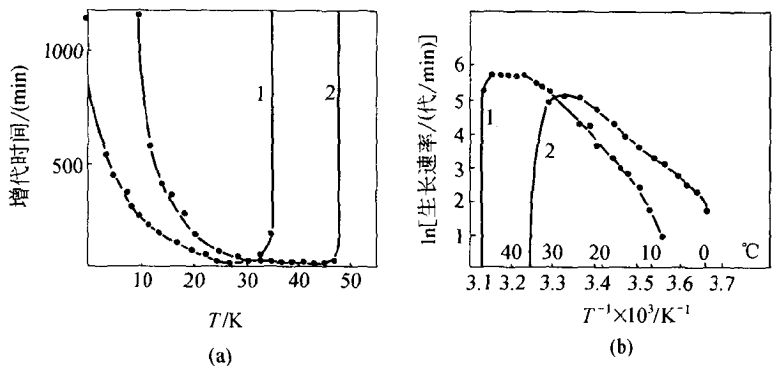


图 1-12 温度与生长速率的关系

(a) 温度对菌世代时间的影响；
(b) 生长速率(以代数 / min 表示)与绝对温度对数的曲线
1—嗜冷菌；2—嗜温菌

微生物的生长速率可用式 (1-16) 表示：

$$\frac{dx}{dt} = \mu x - \alpha x \quad (1-16)$$

式中 μ 为比生长速率； α 为比死亡速率。

一般，温度对比生长速率与比死亡速率的影响可用 Arrhenius 方程表示：

$$\mu = A e^{-E_a/RT} \quad (1-17a)$$

$$\alpha = A' e^{-E'_a/RT} \quad (1-18a)$$

式中 A 和 E_a 分别为 Arrhenius 常数和活化能； R 和 T 分别为通用气体常数和绝对温度。将以上两式两边同取对数得 [生长速率与 T^{-1} 对数曲线参见图 1-12(b)]：

$$\ln \mu = \ln A - E_a/RT \quad (1-17b)$$

$$\ln \alpha = \ln A' - E'_a/RT \quad (1-18b)$$

从图 1-12 (b) 可以看出，在高温或低温下温度与生长速率的关系偏离线性。在高温下会引起蛋白质的变性，并伴随酶的失活。不是所有细胞蛋白质都是热不稳定的，但只要一个关键酶被钝化，便会导致生长的停止。一种对生长必需的酶的改变会使生长对热变性比野生型更为敏感。因此，想通过一次突变来降低微生物的最高生长温度是可能的，但要提高最高

生长温度却绝非易事。

微生物典型活化能值在 50 ~ 70kJ/mol 。当温度高于最适生长温度，比生长速率开始迅速下降，见式 (1-17a)。这是由于微生物的死亡速率增大。微生物死亡的活化能 E'_a 为 300 ~ 380kJ/mol。高的死亡活化能说明，随着温度的升高，死亡速率的增加远大于低活化能的生长速率的增加。

温度影响细胞的各种代谢过程，生物大分子的组分，如 RNA 随温度上升比生长速率增大，细胞中的 RNA 和蛋白质的比例也随着增长。这说明为了支持高的生长速率，细胞需要增加 RNA 和蛋白质的合成。对于重组蛋白的生产，曾将温度从 30 提高到 42 来诱导产物蛋白的形成。

几乎所有微生物的脂质成分均随生长温度而变化。温度降低时细胞脂质的不饱和脂肪酸的含量增加。如表 1-6 所示，细菌的脂肪酸成分随温度而变化的特性是细菌对环境变化的响应。脂质的熔点与其脂肪酸的含量成正比。因膜的功能取决于膜中脂质组分的流动性，而后者又取决于脂肪酸的饱和程度。故微生物在低温下生长时必然会伴随脂肪酸不饱和程度的增加。

表 1-6 温度对大肠杆菌主要脂肪酸组分的影响

脂 肪 酸 品 种	脂肪酸含量/%		脂 肪 酸 品 种	脂肪酸含量/%	
	10℃下生长	43℃下生长		10℃下生长	43℃下生长
饱和脂肪酸:			不饱和脂肪酸:		
豆蔻酸(十四烷酸)	3.9	7.7	棕榈油酸(9-十六碳烯酸)	26.0	9.2
棕榈酸(十六烷酸)	18.2	48.0	十八碳烯酸	37.0	12.2

在过程优化中应了解温度对生长和生产的影响是不同的。如黄原胶的发酵前期的生长温度控制低一些 (27℃)，中后期控制在 32 可加速前期的生长和明显提高产胶量约 20% (表 1-7)。故此二目标函数必需分别单独优化^[18]。

表 1-7 温度对黄单孢菌生长和黄原胶生产的影响

温度 /℃	菌浓 /(g/L)	R_p /(g/L/h)	R_s /(g/L/h)	R_p' /(g/g/h)	R_s' /(g/g/h)	$Y_{p/s}$ /(g/g/h)	P_{yr} /%	发酵周期 /h
22	1.92	0.25	0.38	0.13	0.20	0.54	1.9	87.5
24	2.06	0.31	0.45	0.15	0.22	0.67	2.9	71.0
27	1.99	0.46	0.64	0.23	0.32	0.76	4.5	50.0
32	1.60	0.58	0.66	0.36	0.41	0.81	3.3	52.0
22 ~ 32	2.0	0.40	0.44	0.20	0.22	0.80	2.2	72.0
25 ~ 32	1.9	0.60	0.67	0.32	0.35	0.79	2.6	51.0
27 ~ 32 ^①	3.1	0.73	0.78	0.24	0.25	0.77	3.7	52.0
27 ~ 32 ^②	33	0.74	0.69	0.27	0.21	0.90	3.8	49.0
27 ~ 35 ^③	2.5	0.65 ^②	0.60 ^②	0.27 ^②	0.25 ^②	0.94 ^②	3.0	62.0 ^②

在培养 20h 后变温。

在培养 25h 后变温。

初始糖浓度高些，为 30g/L。

注： R_p 为黄原胶生产速率； R_s 为葡萄糖消耗速率； R_p' 为黄原胶比生产速率； R_s' 为比糖耗速率； $Y_{p/s}$ 为最终黄原胶得率。

从表 1-7 可见，在 24 以下黄原胶的形成显著滞后于生长，呈典型的次级代谢模式。在