

氧气在生物发酵工程中的应用



一、溶解氧对发酵的影响

在发酵过程中，影响耗氧的因素有以下几方面：

- (1)培养基的成分和菌浓显著影响耗氧培养液营养丰富，菌体生长快，耗氧量大；菌浓高，耗氧量大；发酵过程补料或补糖，微生物对氧的摄取量随之增大。
- (2)菌龄影响耗氧呼吸旺盛时，耗氧量大。发酵后期菌体处于衰老状态，耗氧量自然减弱。
- (3)发酵条件影响耗氧在最适条件下发酵，耗氧量大。

发酵过程中，排除有毒代谢产物如二氧化碳、挥发性的有机酸和过量的氨，也有利于提高菌体的摄氧量。

在 25°C, 0.10MPa 下, 空气中的氧在水中的溶解度为 0.25mmol / L, 在发酵液中的溶解度只有 0.22mmol / L, 而发酵液中的大量微生物耗氧迅速(耗氧速率大于 25~100mmol / L·h)。因此, 供氧对于好氧微生物来说是非常重要的。在好氧发酵中, 微生物对氧有一个最低要求, 满足微生物呼吸的最低氧浓度叫临界溶氧浓度 (criticalvalueofdissolvedoxygenconcentration), 用 c 临界表示。在 c 临界以下, 微生物的呼吸速率随溶解氧浓度降低而显著下降。一般好氧微生物 c 临界很低, 约为 0.003~0.05mmol / L, 需氧量一般为 25~100mmol / (L·h)。其 c 临界大约是氧饱和溶解度的 1%~25%

当不存在其他限制性基质时, 溶氧高于 c 临界, 细胞的比耗氧速率保持恒定; 如果溶氧低于 c 临界, 细胞的比耗氧速率就会大大下降, 细胞处于半厌氧状态, 代谢活动受到阻碍。培养液中维持微生物呼吸和代谢所需的氧保持供氧与耗氧的平衡, 才能满足微生物对氧的利用。液体中的微生物只能利用溶解氧, 气液界面处的微生物还能利用气相中的氧, 故强化气液界面也将有利于供氧。

溶氧是好氧发酵控制最重要的参数之一。由于氧在水中的溶解度很小, 在发酵液中的溶解度更小, 因此, 需要不断调整通风和搅拌, 才能满足不同发酵过程对氧的需求。溶氧的大小对菌体生长和产物的形成及产量都会产生不同的影响。如谷氨酸发酵, 供氧不足时, 谷氨酸积累就会明显降低, 产生大量乳酸和琥珀酸。又如薛氏丙酸菌发酵生产维生素 B12 中, 维生素 B12 的组成部分咕啉醇酰胺(cobinamide, 又称 B 因子)的生物合成前期的两种主要酶就受到氧的阻遏, 限制氧的供给, 才能积累大量的 B 因子, B 因子又在供氧的条件下才转变成维生素 B12, 因而采用厌氧和供氧相结合的方法, 有利于维生素 B12 的合成。在天冬酰胺酶的发酵中, 前期是好氧培养, 而后期转为厌氧培养, 酶的活力就能大为提高。掌握好转变时机颇为重要。据实验研究, 当溶氧下降到 45% 时, 就从好氧培养转为厌氧培养, 酶的活力可提高 6 倍, 这就说明利用控制溶氧来控制发酵的重要性。对抗生素发酵来说, 氧的供给就更为重要。如金霉素发酵, 在生长期短时间停止通风, 就可能影响菌体在生产期的糖代谢途径, 由 HMP 途径转向 EMP 途径, 使金霉素产量减少。金霉素 C6 上的氧还直接来源于溶氧, 所以, 溶氧对菌体代谢和产物合成都有影响。

综上所述, 好氧发酵并不是溶氧愈大愈好。溶氧高虽然有利于菌体生长和产物合成, 但溶氧太大有时反而抑制产物的形成。因为, 为避免发酵处于限氧条件下, 需要考查每一种发酵产物的 c 临界和最适溶氧浓度(optimaloxygenconcentration), 并使发酵过程保持在最适溶氧浓度。最适溶氧浓度的大小与菌体和产物合成代谢的特性有关, 这是由实验来确定的。据报道, 次级代谢的青霉素发酵的 c 临界为 5%~10% 之间, 低于此值就会给青霉素合成带来损失, 时间愈长, 损失愈大。而初级代谢的氨基酸发酵, 需氧量的大小与氨基酸的合成途径密切相关。根据发酵需氧要求不同可分为三类(见图 7-4): 第一类有谷氨酸、谷氨酰胺、精氨酸和脯氨酸等谷氨酸系氨基酸, 它们在菌体呼吸充足的条件下, 产量才最大, 如果供氧不足, 氨基酸合成就会受到强烈的抑制, 大量积累乳酸和琥珀酸; 第二类, 包括异亮氨酸、赖氨酸、苏氨酸和天冬氨酸, 即天冬氨酸系氨基酸, 供氧充足可得最高产量, 但供氧受限, 产量受影响并不明显; 第三类, 有亮氨酸、缬氨酸和苯丙氨酸, 仅在供氧受限、细胞呼吸受抑制时, 才能获得大量的氨基酸, 如果供氧充足, 产物形成反而受到抑制。

氨基酸合成的需氧程度产生上述差别的原因，是由它们的生物合成途径不同所引起的，不同的代谢途径产生不同数量的 NAD(P)H，当然再氧化所需要的溶氧量也不同。第一类氨基酸是经过乙醛酸循环和磷酸烯醇式丙酮酸羧化系统两个途径形成的，产生的 NADH 量最多。因此 NADH 氧化再生的需氧量为最多，供氧愈多，合成氨基酸当然亦愈顺利。第二类的合成途径是产生 NADH 的乙醛酸循环或消耗 NADH 的磷酸烯醇式丙酮酸羧化系统，产生的 NADH 量不多，因而与供氧量关系不明显。第三类，如苯丙氨酸的合成，并不经过 TCA 循环，NADH 产量很少，过量供氧，反而起到抑制作用。肌苷发酵也有类似的结果。由此可知，供氧大小是与产物的生物合成途径有关。

在抗生素发酵过程中，菌体的生长阶段和产物的生成阶段都有一个临界溶氧浓度，分别为 c'_l 临界和 c''_l 临界。两者的关系有：① c'_l 临界 \approx c''_l 临界；② c'_l 临界 $>$ c''_l 临界；③ c'_l 临界 $<$ c''_l 临界。

目前，发酵工业中，氧的利用率(oxygenutilizationrate)还很低，只有 40%~60% 抗生素发酵工业更低，只有 2%~8% 好氧微生物的生长和代谢活动都需要消耗氧气，它们只有在氧分子存在的情况下才能完成生物氧化作用。因此，供氧对于好氧微生物是必不可少的。

二、供氧与微生物呼吸代谢的关系

好氧微生物生长和代谢均需要氧气，因此供氧必须满足微生物在不同阶段的需要。由于各种好氧微生物所含的氧化酶系(如过氧化氢酶、细胞色素氧化酶、黄素脱氢酶、多酚氧化酶等)的种类和数量不同，在不同的环境条件下，各种不同的微生物的吸氧量或呼吸强度是不同的。

微生物的吸氧量常用呼吸强度和耗氧速率两种方法来表示。呼吸强度又称氧比消耗速率，是指单位质量的干菌体在单位时间内所吸取的氧量，以表示，单位为 $\text{mmolO}_2 / (\text{g 干菌体} \cdot \text{h})$ 。耗氧速率又称摄氧率，是指单位体积培养液在单位时间内的吸氧量，以 r 表示，单位为 $\text{mmolO}_2 / (\text{L} \cdot \text{h})$ 。呼吸强度可以表示微生物的相对吸氧量，但是，当培养液中有固体成分存在时，测定起来有困难，这时可用耗氧速率来表示。微生物在发酵过程中的耗氧速率取决于微生物的呼吸强度和单位体积菌体浓度。

在发酵生产中，供氧的多少应根据不同的菌种、发酵条件和发酵阶段等具体情况决定。例如谷氨酸发酵在菌体生长期，希望糖的消耗最大限度地用于合成菌体，而在谷氨酸生产期，则希望糖的消耗最大限度地用于合成谷氨酸。因此，在菌体生长期，供氧必须满足菌体呼吸的需氧量，若菌体的需氧量得不到满足，则菌体呼吸受到抑制，从而抑制菌体生长，引起乳酸等副产物的积累，菌体收率降低。但是供氧并非越大越好，当供氧满足菌体需要，菌体的生长速率达最大值，如果再提高供氧，不但不能促进菌体生长，造成能源浪费，而且高氧水平会抑制菌体生长，且高氧水平下生长的菌体不能有效地产生谷氨酸。

与菌体的生长期相比，谷氨酸生产期需要大量的氧。谷氨酸的发酵在细胞最大呼吸强度时，谷氨酸产量最大。因此，在谷氨酸生产期要求充分供氧，以满足细胞最大呼吸强度的需氧量。在条件适当时，谷氨酸生产菌将 60% 以上的糖转化为谷氨酸。

Spire Doc.

Free version converting word documents to PDF files, you can only get the first 3 page of PDF file.

Upgrade to Commercial Edition of Spire.Doc <<http://www.e-iceblue.com/Introduce/word-for-net-introduce.html>>.