**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：

⑴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。

⑵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。

⑶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℃，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，才能获得最大量的氨基酸，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’临界和c’’临界。两者的关系有：①c’临界≈c’’临界；②c’临界>c’’临界③c’临界<c’’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mmolO2／(g干菌体·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mmolO2／(L·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。

三、发酵过程溶氧的变化

在发酵过程中，在已有设备和正常发酵条件下，每种产物发酵的溶氧变化都有自己的规律。如图7-5和图7-6，在谷氨酸和红霉素发酵的前期，产生菌大量繁殖，需氧量不断增加。此时的需氧量超过供氧量，使溶氧明显下降，出现一个低峰，产生菌的摄氧率同时出现一个高峰。发酵液中的菌浓也不断上升，对谷氨酸发酵来说，菌体仍在生长繁殖，抗生素发酵的菌浓也出现一个高峰。黏度一般在这个时期也会出现一高峰阶段。这都说明产生菌正处在对数期。过了生长阶段，需氧量有所减少，溶氧经过一段时间的平稳阶段(如谷氨酸发酵)或随之上升(如抗生素发酵)后，就开始形成产物，溶氧也不断上升。谷氨酸发酵的溶氧低峰约在6～20h，而抗生素的都在10～70h，低峰出现的时间和低峰溶氧随菌种、工艺条件和设备供氧能力不同而异。

发酵中后期，对于分批发酵来说，溶氧变化比较小。进入稳定期，因为菌体己繁殖到一定浓度，呼吸强度变化也不大，如不补加基质，发酵液的摄氧率变化也不大，供氧能力仍保持不变，溶氧变化也不大。但当外界进行补料(包括碳源、前体、消泡剂)，则溶氧就会发生改变，变化的大小和持续时间的长短，则随补料时的菌龄、补入物质的种类和剂量不同而不同。如补加糖后，发酵液的摄氧率就会增加，引起溶氧下降，经过一段时间后又逐步回升；如继续补糖，甚至降至c临界以下，而成为生产的限制因素。在生产后期，由于菌体衰老，呼吸强度减弱，溶氧也会逐步上升，一旦菌体自溶，溶氧更会明显上升。

在发酵过程中，有时出现溶氧明显降低或明显升高的异常变化，常见的是溶氧下降。造成异常变化的原因有两方面：耗氧或供氧出现了异常因素或发生了障碍。据已有资料报道，引起溶氧异常下降，可能有下列几种原因：①污染好气性杂菌，大量的溶氧被消耗掉，可能使溶氧在较短时间内下降到零附近，如果杂菌本身耗氧能力不强，溶氧变化就可能不明显；②菌体代谢发生异常现象，需氧要求增加，使溶氧下降；③某些设备或工艺控制发生故障或变化，也可能引起溶氧下降，如搅拌功率消耗变小或搅拌速度变慢，影响供氧能力，使溶氧降低。又如消泡剂因自动加油器失灵或人为加量太多，也会引起溶氧迅速下降。其他影响供氧的工艺操作，如停止搅拌、闷罐(罐排气阀封闭)等，都会使溶氧发生异常变化。

引起溶氧异常升高的原因，在供氧条件没有发生变化的情况下，主要是耗氧出现改变，如菌体代谢出现异常，耗氧能力下降，使溶氧上升。特别是污染烈性噬菌体，影响最为明显，产生菌尚未裂解前，呼吸已受到抑制，溶氧有可能上升，直到菌体破裂后，完全失去呼吸能力，溶氧就直线上升。

由上可知，从发酵液中的溶氧变化，就可以了解微生物生长代谢是否正常，工艺控制是否合理，设备供氧能力是否充足等问题，帮助我们查找发酵不正常的原因和控制好发酵生产。

四、溶氧浓度控制

㈠氧的传递方程式

液相体积氧传递系数KLα代表氧由气相至液相传递的难易程度，它与发酵过程控制、放大和反应器设计密切相关。当发酵液中溶氧浓度保持稳定，即发酵过程中的氧传递量与氧消耗量达到平衡时。

当微生物的耗氧速率r不变，同时液相饱和溶氧浓度c\*不变，KLα愈大，液相实际溶氧浓度cL愈高，故可用KLα的变化来衡量发酵罐的通气效率。

㈡溶氧浓度控制

发酵液的溶氧浓度，是由供氧和需氧两方面所决定的。也就是说，当发酵的供氧量大于需氧量，溶氧就上升，直到饱和；反之就下降。因此要控制好发酵液中的溶氧，需从这两方面着手。

在供氧方面，主要是设法提高氧传递的推动力和液相体积氧传递系数KLɑ值。结合生产实际，在可能的条件下，采取适当的措施来提高溶氧，如调节搅拌转速或通气速率来控制供氧。但供氧量的大小还必须与需氧量相协调，也就是说，要有适当的工艺条件来控制需氧量，使产生菌的生长和产物生成对氧的需求量不超过设备的需求量不超过设备的供氧能力，使产生菌发挥出最大的生产能力。这对生产实际具有重要的意义。

发酵液的需氧量，受菌浓、基质的种类和浓度以及培养条件等因素的影响，其中以菌浓的影响最为明显。发酵液的摄氧速率OUR是随菌浓增加而按比例增加，但传氧速率OTR是随菌浓的对数关系减少，因此可以控制菌的比生长速率比临界比生长速率（菌株维持具有较高产物合成酶活性的“壮年”细胞占优势都必须满足一个最低比生长速率，低于它，老龄细胞将逐渐占优势，致使产物合成能力下降。这一最低比生长速率就叫临界比生长速率，以μ临表示）略高一点的水平，达到最适菌浓[即c(X)临]，菌体的生产率最高。这是控制最适溶氧浓度的重要方法。最适菌浓既能保证产物的比生产速率维持在最大值，又不会使需氧大于供氧。控制最适的菌浓可以通过控制基质的浓度来实现。如青霉素发酵，就是通过控制补加葡萄糖的速率达到最适菌浓。现已利用敏感型的溶氧电极传感器来控制青霉素发酵，利用溶氧的变化来自动控制补糖速率，间接控制供氧速率和pH值，实现菌体生长、溶氧和pH值三位一体的控制体系。

除控制补料速度外，在工业上，还可采用调节温度(降低培养温度可提高溶氧浓度)、液化培养基、中间补水、添加表面活性剂等工艺措施，来改善溶氧水平。