



## 日本发酵工程进展点滴

1986年11月中旬在大阪召开了日本发酵工程学会年会。会议在微生物、动植物细胞培养、生物化学工程、酶工程、酿造、发酵生产、微生物代谢和生理、酶、废水处理等九个方面报告了研究成果，会上共发表了581篇报告，笔者参加了这次会议，受视野所限，这里仅简介日本近年来在发酵工程等方面的进展。

### (一) 过滤培养技术的开发

过滤培养是一种连续培养方法，但它利用微孔过滤材料将菌体留在系统内。故能实现不流失菌体的情况下除去代谢产物，同时营养物因基质流加而得到补充。所以它的对数生长期维持时间长，获得的菌体浓度及单位体积的产率很高。已有报道用过滤培养法可生产高浓度乳酸菌（培养时间比分批法延长一倍，而活菌数增加了37倍）、维生素 $B_{12}$ 和乙醇等。将过滤培养系统用于连续生产乳酸的生化反应器，对此系统进行最优化控制的研究也有报道。

在培养具有 $\beta$ -半乳糖酶的遗传基因的基因重组菌时，在分批培养初期加入色氨酸以抑制色氨酸启动基因的转录，待菌体增殖到一定程度后，开始过滤培养，随着色氨酸被过滤除去，半乳糖酶的活性迅速上升，最后菌体浓度达60g/L，生成了相当于菌体全蛋白10%的酶。

随着近年来膜分离技术和微孔陶瓷技术的飞跃发展，这一新培养方法今后可能会应用于发酵工业（请参阅本期评论）。

### (二) 动植物细胞的大量培养

培养动物细胞可以获得贵重的医药品和临床诊断用药品。动物细胞分泌有用物质的量极少，因而就必须大量培养。植物细胞的培养可应用于育种、生产种苗和有用物质。同样只有大量培养才有经济效益。由于动植物细胞比微生物细胞脆弱得多，需要独特的培养方法。

动物细胞高密度培养的供氧方法、氨和乳酸对动物细胞消耗氧速率的影响、铵离子浓度对动物细胞高密度培养的影响、动物细胞的连续培养、固定化动物细胞的培养、动物细胞的水平转动培养装置、剪应力对植物细胞液体培养的影响、固定化植物细胞的培养等方面的研究成果均有报道。

### (三) 固定化细胞的应用

1. 用固定化酵母连续酿造啤酒：其最大特点是在发酵系统内可保持高浓度酵母，能缩短发酵时间，且可减少发酵液因除去菌体造成的损失。但啤酒中有强烈的杂味感，为了解决香味上存在的问题，开发了啤酒连续酿造的新方法。即在将麦汁加入固定化酵母反应器之前，先进行通气搅拌发酵，减少发酵液中残存的产生杂味感的氨基酸的浓度。然后将此发酵液打入固定化酵母反应器，在厌氧条件下发酵以抑制酵母的增殖，进一步降低其他产生异味的物质浓度。结果原来需要7—9天的前发酵约在一天内可以完成。酿成的啤酒在香味上没有问题。

2. 用混合固定化霉菌和酵母菌从淀粉生产乙醇; 实验发现, 象酵母菌这样的兼性厌氧菌与好氧菌组合, 很难形成产率高的混合固定体系。因为酵母菌在好气条件下比在厌气条件下增殖更快。且其比呼吸速度与霉菌几乎相同。与霉菌混合固定化后进行培养, 酵母菌的生长压倒霉菌占据优势, 很容易从固定化细胞内漏出。为了抑制酵母菌增殖, 减低了培养基中氮源的浓度, 使得霉菌菌丝首先覆盖固定化细胞颗粒的表面, 防止了酵母菌的漏出, 人为地使两种菌分别在表层和内部“分居”。如此酵母则主要进行厌氧代谢, 从而改善了乙醇的产率。

#### (四) 脂肪酶的研究开发

利用微生物脂肪酶在常温常压下分解脂肪生产脂肪酸和甘油, 以取代高温高压的化学裂解法, 不仅可节省设备投资, 亦可节省能源。利用脂肪水解的逆反应, 可实行脂基交换, 将油脂性质改良, 或合成价值很高的酯。近几年来日本研究脂肪酶的报告逐年增加。研究方向为: 固定化脂肪酶分解油脂、脂肪酶反应器、油脂的酯基交换、酯的合成等。

在水解酶中, 脂肪酶与淀粉酶、蛋白酶一起被称为三大消化酶之一。然而对脂肪酶的应用研究却大大落后于蛋白酶和淀粉酶。由于脂肪是自然界最丰富的有机资源之一, 对脂肪酶的应用研究和开发有着重要的经济意义。今后的发展值得注意。

#### (五) 传感器在发酵过程检测中的应用

目前控制发酵过程最主要的困难仍然是缺乏必要的检测手段。这方面的新进展有:

1. 菌体浓度的连续测定: 利用新开发的 SSB-50 型浊度计 (电气化学仪器株式会社) 成功地连续测定了面包酵母、大

肠杆菌、动物培养细胞的浓度, 其浊度与菌体 (细胞) 浓度有很好的相关关系。这种浊度计的探头浸入培养液中, 用一个活塞定期将培养液抽入测定池, 待气泡上浮逸去后, 池底部的光路打开, 测定池内培养液的透射光和散射光以决定其浊度。由浊度与浓度的标准曲线可得到菌体浓度。将此浊度计与计算机相联, 根据菌体浊度和收率控制葡萄糖的流加量, 进行了酵母的半分批发酵试验。

2. 发酵液中葡萄糖浓度的自动连续测定和控制: 这种测定装置的核心是固定化葡萄糖氧化酶电极和自动稀释系统。用一个小型微孔陶瓷过滤器连续过滤发酵液, 除去菌体的滤液被送入分析装置。分析结果送入计算机。计算机根据计算结果控制新鲜基质流加泵的开启, 以控制残糖浓度在低水平。用酵母菌进行了发酵试验, 在对数生长期, 葡萄糖的浓度也能控制在 0.3g/L 左右。

3. 荧光测定法估计菌体浓度: 含有悬油物 (如淀粉、纤维素) 的发酵液以及霉菌的发酵液无法用光密度表示菌体浓度, 往往也难以用菌体干重来表示。发现菌体萃取物在 290nm 荧光激发波长、340nm 处的荧光强度与干燥菌体量有直线关系。这一荧光强度来自菌体蛋白, 受其他物质干扰甚小。以大肠杆菌、酵母和霉菌为例的实验证明了这一结论。

#### (六) 发酵罐的放大问题

根据过去的放大理论, 从实验室小罐得到的结果不一定能在大罐上再现。为了找到历来放大方法的症结, 开发新的放大方法, 进行了以下基础性的研究工作: 设计一个 3L 小型特殊发酵罐, 它能模拟高度为 10m 的塔型发酵罐内部压力和溶解气体的分布。试验了此模拟罐所存在的不均一因素, 特别是溶氧浓度对细胞的影响。利

用代谢活性(产乙醇能力和增殖能力)及细胞形态对氧的供应十分敏感的运动发酵单胞菌(*Zymomonasmobilis*)作为模型菌。发现细胞的代谢活性和形态因罐容的大小不同而不同。这种罐内不均一因素对细胞生理的影响是传统放大方法所没有考虑到的。

### (七) 发酵动力学和过程控制

由于发酵过程及其控制的复杂性和重要性,这方面的研究始于60年代,至今仍远未完善。

1. 赖氨酸的发酵动力学:研究了谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)的发酵动力学,发现保持低葡萄糖浓度可提高菌体收率;保持低亮氨酸浓度可提高赖氨酸的比生产速率。要使赖氨酸产量最大,必须对这二者的浓度加以控制。

2. 硫链丝菌肽的发酵控制:为了生产高浓度抗生素硫链丝菌肽,对放线菌 *Streptomyces laurentii* 的半分批发酵进行了研究。发现pH必须控制在6.0—6.2范围内。当pH降至6.0时添加氨水,而当pH达6.2时流加葡萄糖、玉米浆和脱脂大豆粉的混合培养基溶液,同时控制糖浓度不超过5g/L,溶解氧水平在3—5ppm,结果抗生素浓度比原先的方法提高了近10倍。

3. 酒生产的计算机管理:关于日本酒生产过程的控制和管理的研究是这次大会获奖项目。这是将酒生产的复杂过程用数学模型描述,然后进行计算机模拟的试验。在验证了模型的可靠性以后,应用适应控制理论对生产过程进行计算机自动控制。

4. 链霉素发酵最适搅拌条件的研究:利用能定量处理模糊问题的Fuzzy理论,研究了链霉素发酵的最适搅拌条件问

题,得到了可节约12.5%搅拌耗电力的结果。

5. 推定和控制难以在线测定的发酵参数:对谷氨酸半分批培养的多次实验数据进行分析,发现培养前期的氨耗量与菌体浓度、培养后期的氨耗量与谷氨酸产量之间有明显的相关关系。利用回归分析法得到这些关系式的系数,作成了用在线能测定的参数推定在线难以测定的参数的程序。

运用上法对酵母菌半批发酵中比增殖速度成功地进行了推算和定值控制。

(北京市营养源研究所 汪恩浩)

### 到1996年欧洲工业酶市场将翻一番

根据Frost & Sullivan公司最近发表的题为“欧洲工业酶工艺及市场发展”的调研报告,在近十年内,西欧工业酶的销售量要翻一番,这是以1986年工业酶预期销售额约达1.6亿美元为基准的。

报道指出,西欧工业酶销售量的增加,是通过承认新产品应用、引进生物技术以及不断修正酶生产和应用的法规等来达到的。报道指出,仅有16种左右的酶作为主要的工业催化剂,但却占整个市场销售额的90%,限制酶应用的主要因素是成本问题。

这份报道从使用酶的工业和产品类型来预测市场动向。并强调指出,洗涤剂用酶趋向于继续增长,食品工业用酶也会呈现上升趋势。但是,越来越严格的安全卫生法规会影响需求的增长。预期,在纺织、造纸、制革和废弃物处理等应用中,这些工业酶的销售量不变或有所下降。未来的十年中,临床诊断酶将增长最快。

产品年增长幅度:碳水化合物水解酶类为2~3%,蛋白酶,尤其是用于洗涤剂的蛋白酶为10~15%。

报告声称,只有30家公司在工业中起

重要作用,其中5到6家公司占统治地位。其中丹麦生产的酶就占欧洲总酶量的一半。主要是由世界头号供应厂商——Novo工业公司提供的。

荷兰占有欧洲工业酶市场的20%,主要生产厂商是Gist-Brocades公司。

毛仁焕摘自“*Process Biochemistry*”,  
21(4), ProBioTech II, 1986.

### 世界上最大的单克隆抗体生产厂

Celltech公司最近宣称,该公司将拥有世界上最大的单克隆抗体生产设备。该公司投资5百万英镑计划建造4万4千平方米的建筑物,以保持在生产规模哺乳动物细胞培养中处于领先地位。此设备是按满足单克隆抗体和其他细胞培养产物的需求而设计的。

新设备包括7千平方米的发酵车间,先装配两套1000L发酵罐和其他几套较小装置,并正在计划装建一个10000L的发酵罐。

全套设备是由联合王国有限公司所属的Austin公司设计建造的。

### 洗脱速度快240倍的液相层析凝胶

英国Dynospheres制备出一种新型快速洗脱的层析用凝胶,从而使液相层析成为工业化生产和纯化用的大有前景的方法。使用这种新型凝胶作某种分析层析,可从琼脂糖凝胶(DEAE型)的洗脱需7小时,缩短到不到100秒,洗脱速度加快240倍。这种凝胶为大小均匀的球形聚合物颗粒,直径为10 $\mu$ m,标准偏差仅3%。

这种凝胶颗粒有很高的机械强度,即使在高压下也不会压缩变形。大小均匀的球状,又没有会使层析柱堵塞的细末,从而使装成的柱能保持高洗脱流速。

### 大规模哺乳动物细胞培养装置

APV国际有限公司已推出Cytair装置。此套装置是专为大规模哺乳动物细胞培养设计的。

Cytair装置有助于克服目前以细胞培养过程放大到制出大量供临床试验和供应市场所需产品过程中,许多生产公司所面临的障碍。

在Celltech公司已投入运转的装置和细胞培养制造单克隆抗体基础上发展的Cytair装置减少了用户的放大问题。

Cytair装置是APV国际有限公司和Celltech公司经三年合作开发的产品,可提供的主发酵罐容量为100或1000L。现在这两家公司已达成协议,把Cytair装置推向市场。

哺乳动物细胞体外培养已成为单克隆抗体和许多重组体蛋白质的较好的生产途径。

采用精密的以APV的ACCOS微处理机控制系统为主的自动化过程控制,会使发酵放大和产量最优化。

### 解决混合难题的新型搅拌叶轮

英国EKato公司的“Intermig”叶轮是一种多级干扰流混合器,它特别适用于生物工艺、湿法冶金及海底工程。

因为输入的动力均匀地遍布全容积,又因为此种叶轮的直径比大,因而即使在最不适宜的条件下仍可解决悬浮、乳化、分散和热传递等特别棘手的难题。

在实际使用中已显出此种搅拌要比传统混合系统好,可节能4/5,而混合效果不变。

徐家立摘自“*Process Biochemistry*”,

21(3), ProBioTech II, V, XIII, 1986.