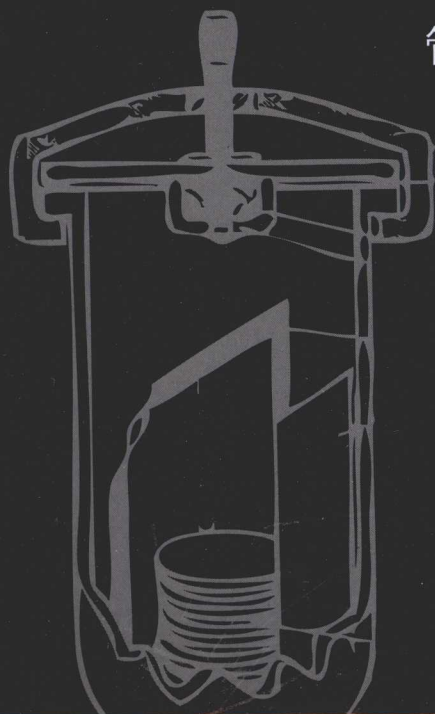




FAJIAO SHIYAN
JISHU YU FANGAN

发酵实验 技术与方案

管 斌 主编



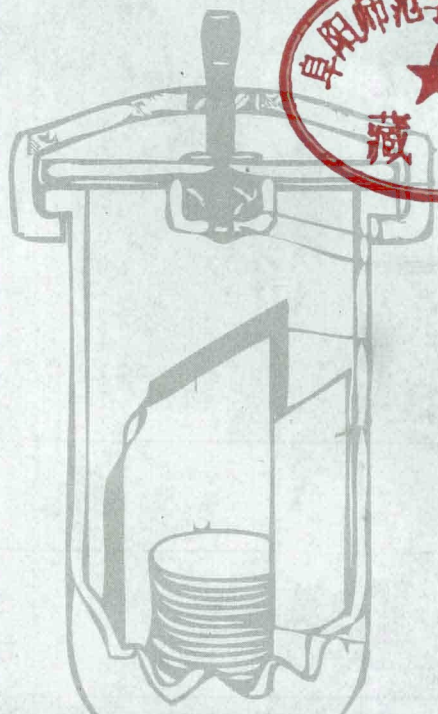
化学工业出版社

本书编写和出版过程中得到了中国海洋大学教材建设基金的资助

FAJIAO SHIYAN
JISHU YU FANGAN

发酵实验 技术与方案

管 斌 主编



化学工业出版社

· 北 京 ·

图书在版编目 (CIP) 数据

发酵实验技术与方案/管斌主编. —北京: 化学工业出版社, 2010. 6
ISBN 978-7-122-08382-1

I. 发… II. 管… III. 轻工业-发酵工程 IV. TS92

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2010) 第 075632 号

发酵实验技术与方案

管斌 主编

责任编辑: 傅四周 孟 嘉
责任校对: 周梦华

文字编辑: 张春娥
装帧设计: 周 遥

出版发行: 化学工业出版社(北京市东城区青年湖南街 13 号 邮政编码 100011)
印 装: 北京市兴顺印刷厂

787mm×1092mm 1/16 印张 13½ 字数 392 千字 2010 年 9 月北京第 1 版第 1 次印刷

购书咨询: 010-64518888(传真: 010-64519686) 售后服务: 010-64518899

网 址: <http://www.cip.com.cn>

凡购买本书, 如有缺损质量问题, 本社销售中心负责调换。

定 价: 35.00 元

版权所有 违者必究

编写人员名单

主 编：管 斌

主要参编人员：

孙中涛 孔 青 马美范
王兰芝 徐 莹 孙艳玲

前 言

发酵是通过微生物培养，在人为控制下，使某种特定代谢产物大量积累的工业生产过程。发酵工程是生物技术创新和产业化的平台。21 世纪是生命科学的世纪，发酵工程发展潜力巨大，已经成为世界各国研究和开发的战略重点，也是提升生物技术产业生产力水平、实现科学技术及其工业跨越式发展的最有前途和希望的领域之一。自 20 世纪 80 年代以来，世界上生物技术产业化的步伐明显加快，发酵工业及其技术发展迅速。我国也将生物技术产业作为高新技术之一（其核心是发酵工程），已把它作为促进传统产业升级改造、加快新兴产业形成以及生产力提升的动力和关键性技术。生物技术产业的发展，特别是发酵工业的发展，给人类社会的进步带来巨大的推动力。

近几年，发酵工业发展迅速，已经成为我国国民经济的支柱产业。发酵工业包括酿酒工业（白酒、啤酒、葡萄酒、黄酒等）、酿造工业（醋、酱油等）、发酵食品工业、新型发酵工业〔酶制剂工业、氨基酸工业（味精等）、有机酸工业（柠檬酸等）、生理活性物质发酵工业等〕、饲料工业（单细胞蛋白等）、饮料工业（发酵饮料等）、生物制药工业（抗生素等）、有机溶剂发酵工业（酒精、丙酮、丁醇等）、生物质能利用工业以及城市和工业生物污水处理工业等。发酵工业与百姓生活密切相关，其对工业发展的促进作用日益明显。发酵技术和手段的创新和进步在农副产品深加工技术和高值化技术中占有十分重要的地位。如燃料乙醇的出现使酒精发酵工厂生产大型化，它又为我国汽车工业提供了更多的可再生能源。再如生物污水处理系统在大中型城市工业污水和生活污水处理过程中的应用，可提高水的利用效率，也降低了污水的排放，有利于环境保护和生态平衡。学习和掌握发酵工程实验技术与方法，是从事发酵技术领域及其相关学科工程技术工作的前提。我们编写本书的着眼点，正是使生物工程专业教学适应当前发酵工业迅速发展的需要。

参加本书编写的是长期从事发酵工程和工业微生物教学和科研工作，富有经验的专家。本书以中国海洋大学生物工程专业开设“发酵工程实验”课程教案为基础，将“工业微生物”与“发酵工业过程”紧密联系起来，从发酵工程实验技术与方法角度出发，系统地描述了发酵工程实验原理、研究方法、检测手段以及工程技术的相互关系，把发酵工程实验原理、研究方法、检测手段、扩大工业发酵技术以及发酵工程技术有机地融合在一起。在编写上，力求反映这些研究领域最新进展和研究技术，为广大读者提供一本较系统的发酵工程实验技术与方法教材。本书可作为生物工程、生物化工、生物技术、生物制药、食品工程以及农副产品加工等专业的教材，也可作为从事发酵工业、生物化工工业、生物技术产业、生物制药以及食品工业等专业人员的参考书。

本书由管斌教授主编。书中第一章、第四章和第五章由管斌教授编写；第二章、第三章和第九章由孔青博士编写；第六章第三节和第八章由孙中涛副教授编写；第七章由马美范高级工程师编写；第十章由王兰芝副教授编写；第六章第一、二节由徐莹博士编写；附录部分由孙艳玲副教授编写。全书统稿由管斌和孙艳玲完成。本书在编写过程中得到了杜金华和王端明教授的支持和帮助。

本书还得到了中国海洋大学生物工程专业部分教师、山东农业大学部分教师以及山东轻工业学院生物工程专业部分教师的支持和帮助，他们对本书提出了许多宝贵意见。本书文字和图表的处理得到了孙艳玲、孔青等同志的协助。本书在编写过程中，得到了化学工业出版社的支持。在本书编写和出版过程中得到了中国海洋大学教材建设基金的资助。在此一并表示衷心感谢！

虽然编者做了大量的资料收集、整理和编写工作，但由于水平有限，不足之处在所难免，恳请广大读者阅后多提宝贵意见。

编者

2010 年 6 月于山东青岛

目 录

第一章 绪论	1
第一节 发酵工程定义及特点	1
一、发酵工程定义	1
二、微生物在发酵过程中的作用	1
三、发酵工业的特点	5
四、发酵过程的组成部分	5
第二节 发酵工程研究内容	7
一、微生物菌体发酵	7
二、微生物酶发酵	7
三、微生物代谢产物发酵	7
四、微生物的生物转化发酵	8
五、与色、香、味相关的发酵	8
六、利用微生物特殊机能进行发酵	8
第三节 发酵工程实验室的配置及基本条件	9
一、发酵工程实验室的基本条件	9
二、发酵工程实验室的配置	9
三、发酵过程的辅助设施	9
第二章 发酵工程实验方案的设计与实施	11
第一节 发酵工程实验特点与实验方案设计的原则	11
一、发酵工程实验方案设计意义	11
二、发酵工程实验的特点	11
三、发酵工程实验方案的设计原则	12
第二节 发酵工程实验方案的设计与评价	12
一、发酵工程实验方案的设计程序	12
二、发酵工程实验内容的确定	12
三、发酵工程实验方案的设计	13
四、发酵工程实验方案的评价	13
第三节 发酵工程实验方案的实施	14
一、实验方案的实施流程	14
二、实验设备与仪器的选择	14
三、实验装置的安装与调试	15
第四节 实验记录与实验报告的撰写	15
一、课前预习	15
二、实验记录	16
三、实验报告	16
第三章 发酵工程实验室安全与防护	17
第一节 发酵工程实验室规则	17
第二节 发酵工程实验室安全	18
一、用电安全	18

二、玻璃器皿的安全使用	19
三、化学试剂的安全使用	20
四、实验室的微生物安全	21
第四章 酶工程实验技术	22
第一节 酶发酵与调控技术	22
一、提高酶发酵活力的方法	22
二、酶发酵生产技术	23
第二节 酶反应动力学及酶活力测定	24
一、酶反应动力学	24
二、酶活力测定	25
第三节 酶的分离与纯化技术	27
一、酶分离纯化程序	27
二、酶的鉴定技术	28
第四节 酶固定化技术	29
第五节 酶工程实验	30
一、利用发酵方法制备蛋白酶实验	30
实验 4-1 蛋白酶活力测定	30
实验 4-2 利用微生物发酵产生蛋白酶及其发酵动力学	32
二、酶代谢调控实验	33
实验 4-3 半乳糖酶诱导合成	33
实验 4-4 无机磷酸对枯草杆菌碱性磷酸酶生物合成的阻遏作用	34
三、糖化酶发酵产酶实验	35
实验 4-5 糖化酶产酶的摇瓶实验	35
实验 4-6 糖化酶产酶的发酵罐实验	36
四、酶活力、酶蛋白浓度的测定	38
实验 4-7 蔗糖酶酶活力分析	38
实验 4-8 蛋白质浓度分析(福林-酚法)实验	40
五、蔗糖酶的制备	41
实验 4-9 酵母细胞破碎与蔗糖酶的抽提实验	41
实验 4-10 酵母蔗糖酶沉淀分离实验	42
实验 4-11 蔗糖酶离子交换色谱分离	43
实验 4-12 利用超滤膜分离蔗糖酶	45
五、酶反应动力学实验	47
实验 4-13 pH 对酶活力的影响	47
实验 4-14 温度对酶活力的影响	48
六、酶蛋白的凝胶电泳	49
实验 4-15 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法测定酶蛋白的相对分子质量	49
实验 4-16 聚丙烯酰胺等电聚焦电泳法测定酶蛋白的等电点	52
第五章 发酵工艺学实验技术	55
第一节 发酵培养基配制与灭菌技术	55
一、发酵培养基配制	55
二、灭菌技术	56
第二节 微生物保藏技术	59
一、微生物菌种保藏原则	59

二、保藏方法	59
三、菌种保藏机构	60
四、菌种退化与复壮	60
第三节 微生物细胞扩大培养	60
一、微生物接种	60
二、微生物细胞扩大培养	61
第四节 高密度细胞培养技术	63
一、异养微生物高密度培养	63
二、自养微生物高密度培养	65
第五节 好氧发酵技术	66
一、通气与搅拌	66
二、好氧生化反应器及其选择	68
三、微生物代谢类型及其控制	69
第六节 厌氧发酵技术	70
一、厌氧发酵	70
二、厌氧培养及条件控制	71
三、厌氧生化反应器及其选择	73
第七节 发酵工艺学实验	73
一、厌气发酵——酒精发酵	73
实验 5-1 米曲以及米曲汁的制备	73
实验 5-2 酒母扩大培养及酒精发酵	74
二、好气发酵——谷氨酸、柠檬酸发酵	76
实验 5-3 淀粉水解糖的制备	76
实验 5-4 黑曲霉发酵生产柠檬酸	78
实验 5-5 利用搅拌发酵罐发酵生产谷氨酸	80
三、细胞培养	82
实验 5-6 利用气升式反应器流加培养单细胞蛋白	82
实验 5-7 厌氧微生物培养	84
四、次级代谢产物发酵	85
实验 5-8 发酵法生产链霉素	85
实验 5-9 发酵法生产黄原胶	87
第六章 发酵食品实验技术	89
第一节 固态发酵概念及特点	89
一、固态发酵概念及特点	89
二、与色、香、味相关的发酵食品	90
第二节 酿造工程实验	90
一、酱油曲制备和酱油发酵	91
实验 6-1 酱油曲制备	91
实验 6-2 酱油的固态发酵	92
二、利用黑曲霉制备糖化曲	93
实验 6-3 种曲制备	93
实验 6-4 麸曲的制备	94
三、食醋的发酵	95
实验 6-5 食醋的发酵	95

第三节 发酵食品实验	96
一、葡萄酒酿造与品尝	96
实验 6-6 葡萄酒的酿造	96
实验 6-7 葡萄酒的品尝	98
二、啤酒生产与品尝	100
实验 6-8 麦芽制备	100
实验 6-9 糖化麦芽汁的制备	101
实验 6-10 啤酒发酵及检测	102
实验 6-11 啤酒的品尝	103
三、酸奶的制备	107
实验 6-12 酸奶的制备	107
第七章 发酵分析与检测方法	108
第一节 发酵试样的采集与处理	108
一、样品的采集	108
二、样品的制备	108
三、样品的预处理	109
第二节 发酵参数的化学检测技术	110
一、酸碱滴定法	111
二、氧化还原滴定法	111
三、配位滴定法	111
四、沉淀滴定法	111
第三节 发酵参数的光学检测技术	111
一、紫外-可见分光光度检测	112
二、旋光检测技术	113
第四节 发酵参数的色谱检测技术	113
一、色谱法概论	113
二、气相色谱法	114
三、高压液相色谱法	116
第五节 典型发酵物质的检测	117
一、碳水化合物的检测	117
二、蛋白质含量的检测	119
三、脂肪类的测定	120
四、矿物元素的测定	120
五、总酸的测定	120
六、酒精含量的测定	121
第六节 发酵分析实验	122
一、水分的测定	122
实验 7-1 水分含量的测定	122
二、还原糖的测定	123
实验 7-2 还原糖含量的测定	123
实验 7-3 麦芽糖化力的测定	124
三、氨基酸的测定	126
实验 7-4 氨基酸含量的分析(茚三酮比色法)	126
四、啤酒成分测定	127

实验 7-5 啤酒中双乙酰含量的测定	127
五、酸度的测定	128
实验 7-6 总酸度的测定	128
实验 7-7 电位滴定法测定啤酒的总酸度	129
六、味精成品纯度的测定	129
实验 7-8 味精成品纯度的测定 (高氯酸非水溶液滴定法)	129
七、HPLC 法测定糖分和有机酸	130
实验 7-9 葡萄酒中的糖分和有机酸的分析 (HPLC 法)	130
八、气相色谱法测定白酒中醇酯类组分	132
实验 7-10 白酒中醇酯类组分的分析	132
第八章 发酵过程实验技术	135
第一节 发酵过程参数的检测与传感器	135
一、发酵过程中直接参数的检测	135
二、发酵过程间接参数的测定	139
第二节 发酵动力学检测技术	139
一、分批培养动力学方程及参数检测	139
二、连续培养动力学方程及参数检测	141
三、分批补料培养动力学方程及参数检测	142
第三节 生化工程实验	143
实验 8-1 微生物菌体量的测定	143
实验 8-2 发酵液氧传递系数的测定	146
实验 8-3 利用酶电极测定发酵液葡萄糖浓度	148
实验 8-4 发酵液黏度的测定	150
实验 8-5 混合特性参数的测定	152
实验 8-6 酿酒酵母连续培养动力学模型构建实验	153
第九章 生物下游工程实验技术	156
第一节 发酵醪的特点以及对生物下游工程的要求	156
一、生物下游工程定义及发酵醪的特点	156
二、生物下游工程技术的要求	156
第二节 生物分离工程与装置	156
一、选择生物下游技术的依据以及生物下游过程的流程	156
二、发酵液预处理	157
三、细胞破碎及其分离	158
四、提取分离	159
五、精制分离	159
六、成品加工	160
七、一些典型发酵产品提取精制过程	160
第三节 生物下游工程实验	161
一、细胞破碎	161
实验 9-1 酵母细胞的破碎及破碎率的测定	161
二、蛋白质分离纯化	162
实验 9-2 发酵液中蛋白质的粗分级	162
实验 9-3 蛋白质的透析	163
实验 9-4 凝胶色谱法分离蛋白质	164
实验 9-5 蛋白质的真空浓缩	165

实验 9-6 蛋白质的冷冻干燥	166
实验 9-7 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离血清乳酸脱氢酶同工酶	167
三、氨基酸的分离	169
实验 9-8 离子交换色谱分离氨基酸	169
四、发酵产物的提取	171
实验 9-9 青霉素的萃取与萃取率的计算	171
实验 9-10 双水相萃取分离酿酒酵母中延胡索酸酶	172
五、酶的提取	173
实验 9-11 糖化酶后提取实验	173
第十章 生物环境工程实验技术	175
第一节 水质污染的评价及生物污水处理	175
一、衡量水质污染的指标	175
二、发酵工业生产排废情况	175
三、生物污水处理方法及选择	176
第二节 生物环境工程实验	177
一、水质污染程度的评价	177
实验 10-1 化学需氧量的测定（重铬酸钾法 COD_{Cr} ）	177
实验 10-2 BOD_5 的测定（稀释与接种法）	179
实验 10-3 水中溶解氧的测定（碘量法）	182
二、絮凝沉淀法	184
实验 10-4 絮凝法分离废水固形物	184
三、厌氧生物处理法	185
实验 10-5 发酵废液的厌氧发酵处理	185
四、利用污水培养菌体细胞法	186
实验 10-6 以富氮的罐头食品生产废水为基质培养螺旋藻	186
附录一 常用化学分析参数	189
附录二 常用化学试剂的配制	191
附录三 生化分离制备过程中硫酸铵溶液的配制方法	195
附录四 柱色谱常用参数	197
附录五 凝胶电泳标准蛋白质相对分子质量的参照物	198
附录六 发酵过程单元操作常用的物理参数	199
参考文献	202

第一章 绪论

第一节 发酵工程定义及特点

一、发酵工程定义

发酵 (fermentation) 一词是拉丁语“沸腾”(fervere) 的派生词。它描述酵母菌作用于果汁或麦芽汁时产生的沸腾现象。此是由于在缺氧条件下酵母菌利用糖生成的二氧化碳气泡所引起。

生物化学家和工业微生物学家对于发酵一词各自理解的含义不同。生物化学家认为, 发酵是有机化合物的分解代谢, 并产生能量的过程; 发酵是一个有机化合物能同时作为电子供体和电子最终受体的能量产生的过程, 又称为“狭义发酵”。而工业微生物学家给出广义的发酵定义为: 通过微生物培养, 经人为控制而使某种特定代谢产物大量积累的过程, 例如有氧发酵——柠檬酸发酵以及无氧发酵——酒精发酵等。

二、微生物在发酵过程中的作用

微生物 (microorganism, microbe) 是一些肉眼看不见的微小生物的总称。它们是一些个体微小(微米级, μm)、结构简单的低等生物, 包括属于原核生物的细菌、放线菌, 属于真核生物的酵母、霉菌、微藻类以及属于非细胞类的病毒(如噬菌体)。各类微生物的形态及生理特征如表 1-1 所示。

表 1-1 各类微生物的形态及生理特征

微生物种类	形态特征		生理特性	繁殖方式	生长环境
	菌落特征	个体特征			
细菌	湿润、光滑, 有光泽, 半透明或不透明, 乳白色, 菌体与培养基结合不紧, 易挑起	单细胞。有杆菌、球菌和弧菌。属原核生物。杆菌大小 $1\mu\text{m} \times 1.5\mu\text{m}$	一般习惯在中性或微碱性环境中生活。易被噬菌体感染	裂殖	pH 7.0~7.5, 30~37℃
放线菌	干燥、坚硬、有褶皱, 菌体与培养基结合紧, 不易挑起	菌丝无横隔, 菌丝宽与杆菌宽相似。属原核生物	生长较细菌、霉菌慢, 分布在有机质土壤中。习惯在中性或微碱性环境中生活。有些放线菌也易被噬菌体感染	孢子、菌丝断裂繁殖	pH 7.0~7.5, 25~35℃
酵母菌	菌落特征与细菌类似, 但比细菌菌落大	单细胞。圆或卵圆形。属真核生物。细胞直径 5~6 μm	容易在含糖基质中生长。能在偏酸环境中生长。好气生长, 厌氧发酵	芽殖	pH 5.0~6.0, 25~35℃
霉菌	棉絮状或绒毛状, 有各种颜色, 菌落大	菌丝有横隔或无横隔。属真核生物。菌丝宽度 5~6 μm	易在潮湿有机质上生长。能在偏酸环境中生长。好气生长、发酵	无性繁殖为分生孢子或子囊孢子。有性繁殖有条件	pH 4.0~6.0, 25~32℃
病毒	在琼脂培养基上不生长	无细胞结构	专性寄生	侵占寄主系统, 进行复制、繁殖	其生长与寄主有关

1. 微生物的特点

微生物具有个体微小、种类多、代谢力强、生长繁殖快、培养粗放、易变异、适应能力强, 以及分布广等特点。微生物与动物、植物相比, 最大的不同点就是个体微小。从比表面积角度来看,

微生物的比表面积大（比表面积=个体表面积/个体体积）。比表面积可表征生物体与其周围环境接触和交流机会的多少，单位体积吸收营养物质的多少，也可表示代谢强度高。例如，一个球菌的体积仅 $1\mu\text{m}^3$ 左右，但其比表面积却很大，这说明该球菌吸收营养物质能力很强。这也是微生物与动植物区别的关键所在。

2. 微生物在发酵过程中的作用

前已提及，发酵是通过微生物培养，经人为控制而使某种特定代谢产物大量积累的过程。可以说，微生物是发酵的发动机。要想提高发酵过程中底物转变成产物的能力和转化速率，就必须提高微生物代谢活力和微生物菌体浓度，进而提高发酵强度。有人把发酵工业称为微生物利用工业，发酵工程也称为微生物工程。

发酵工程是生物产业化的核心，通过工业微生物发酵过程，产生大量对人类有益的代谢产物，由此而获得巨大的经济效益、生态效益和社会效益。例如：发酵产生的乙醇可应用于酒精饮料以及作为汽车液体燃料；发酵产生的高蛋白菌体被称作单细胞蛋白，在饲料工业中占有极重要位置；发酵产生的抗生素在医治疾病方面发挥着难以替代的作用；醋、酱油是酿造工业主干，白酒、啤酒、葡萄酒、黄酒已经成为世界酒精饮料的主要酒种等。

微生物在生态效应和环境保护方面发挥了巨大作用。微生物占据食物链的主要环节，它们在生物污水处理中担当主要角色，在自然界物质循环中发挥着关键作用。微生物的生态效益正被人们日益重视，尤其在环境保护方面起着重要作用。

3. 微生物营养类型

微生物根据能量供给和碳源摄取方式不同，其营养类型可分为光能自养型（photo-autotroph）、光能异养型（photo-heterotroph）、化能自养型（chemo-autotroph）以及化能异养型（chemo-heterotroph）四种。微生物营养类型如表 1-2 所示。

表 1-2 微生物营养类型

微生物营养类型	碳 源	能 源	电子供体	例 子
光能自养型	CO ₂	光	H ₂ O, H ₂ S, S	微藻
光能异养型	有机物	光	有机物	不需硫紫色细菌
化能自养型	CO ₂	无机物	H ₂ , S, H ₂ S, NH ₃	氢细菌、硫细菌、脱氮细菌
化能异养型	有机物	有机物	有机物	大多数微生物, 如多数细菌、放线菌、酵母和霉菌

自养微生物是一类以 CO₂ 为唯一碳源，并以此合成微生物机体的有机化合物碳骨架的微生物类群。自养微生物特点是“自给自足，合成能力相对较强”，光合微生物是其主要类型，如光合细菌、微藻等。异养微生物是一类不能以 CO₂ 为唯一碳源，而必须从环境中摄取还原性物质作为碳源的微生物类群。异养微生物特点是“以有机物为培养基质，合成能力相对较弱，分解能力较强”，化能异养型微生物是其主要类型，如大多数微生物，包括多数细菌、放线菌、酵母和霉菌。

4. 微生物代谢与发酵

新陈代谢（metabolism）简称代谢，是指发生在活细胞中的各种分解代谢（catabolism）和合成代谢（anabolism）的总和，其分解代谢与合成代谢由能量代谢相互偶联。微生物代谢可分为：能量代谢、分解代谢（或称异化作用）和合成代谢（或称同化作用）。

(1) 葡萄糖分解代谢 糖类是微生物最主要的碳源和能源。葡萄糖分解代谢途径是化能异养微生物降解的关键有机化合物之一，也是获得能量的基本途径之一。葡萄糖、果糖是化能异养微生物的主要碳源和能源；戊糖经酶转化后可进入葡萄糖分解途径；其他糖则必须经降解或转化成葡萄糖、果糖后才能被降解。糖以外的其他有机化合物，包括醇、醛、酸、脂类、烃类和芳香族化合物等，也须经转化后才进入葡萄糖分解代谢途径。

葡萄糖分解过程可分成两个阶段。第一个阶段是从葡萄糖降解到丙酮酸的阶段。这个阶段主要有 EMP 途径、不完全的 HMP 途径、ED 途径、PK 途径和葡萄糖直接氧化五条途径，它们分别或

相互组合进行代谢，而存在于各种微生物细胞中。第二阶段是从丙酮酸开始的进一步降解。这一阶段的分解代谢因微生物和环境条件的不同而不同。

① EMP 途径，也称为糖酵解途径。在这条途径中，葡萄糖被转化为 1,6-二磷酸果糖后开始降解，因此又称为双磷酸己糖途径。这条途径是生物界共有的途径。其特点是，每消耗 1 分子葡萄糖净生成 2 分子 ATP，不能提供合成芳香族化合物、RNA 和 DNA 所需的前体物。该途径的关键点为：a. 葡萄糖磷酸化；b. 由 6-磷酸果糖转化为 1,6-二磷酸果糖，处于激活状态；c. 1,6-二磷酸果糖发生 β -裂解，得到 3-磷酸甘油酸和磷酸二羟丙酮；d. 3-磷酸甘油酸（底物）氧化磷酸化生成 1,3-二磷酸甘油酸，并伴随 1 分子 NADH 和 1 分子 ATP 生成。EMP 途径中有两个关键性酶，一个是磷酸果糖激酶，它是 EMP 途径中唯一不涉及其他途径的酶，并对葡萄糖分解代谢起调节作用的关键酶之一；另一个是二磷酸果糖醛缩酶。

② HMP 途径，也称为单磷酸己酸途径。它是戊糖循环运行方式之一。HMP 途径分为前阶段（氧化阶段）和后阶段（非氧化阶段）。在 HMP 途径中葡萄糖先被磷酸化，得到 6-磷酸葡萄糖，随后进行与 NADP 还原相耦合的氧化反应，得到 6-磷酸葡萄糖酸，然后进一步氧化脱羧，使 1 分子 NADP 还原，生成 5-磷酸核酮糖。HMP 途径所具有的两个重要生理功能是：a. 它能提供核酸和吡啶核苷酸等所需的戊糖，合成芳香族氨基酸和维生素所需的前体物；b. 它能提供生物合成反应所需的 NADPH+H⁺。在 HMP 途径的氧化阶段有两个特有的调节酶，它们是 6-磷酸葡萄糖脱氢酶和 6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶，并分布于细胞可溶性部分，可用来控制 HMP 途径的通量。在 HMP 途径的非氧化阶段特有的酶是转酮酶、转醛酶系统。此外，HMP 途径与化能自养菌和光合细菌的碳代谢也有密切关系。

③ ED 途径。ED 途径是由 Entner 和 Doudoroff 两人研究阐明的，所以称为 ED 途径。该途径与 HMP 途径相类似，6-磷酸葡萄糖首先脱氢产生 6-磷酸葡萄糖酸。接着在脱水酶和醛缩酶的作用下生成 2-酮-3-脱氧-6-磷酸葡萄糖酸（KDPG），随后由脱氧酮糖酸醛缩酶分解为 1 分子 3-磷酸甘油酸和 1 分子丙酮酸。其中 3-磷酸甘油酸由 EMP 途径的一些酶氧化为丙酮酸。ED 途径的特点是：a. 从单磷酸己酸 KDPG 开始裂解，是 HMP 途径以外的另一种单磷酸己酸途径；b. 可降解葡萄糖醛酸、果糖醛酸、甘露糖醛酸；c. 若细胞内同时存在 HMP 途径的转酮酶、转醛酶系统，则可参与嘌呤、嘧啶、芳香族氨基酸、组氨酸、维生素 K₃、CoQ 以及叶酸等的合成。ED 途径特有的酶是 KDPG 醛缩酶。

④ PK 途径。又称为磷酸酮解途径（phosphoketolase pathway）。该途径在葡萄糖磷酸化后，再将它氧化生成 6-磷酸葡萄糖酸，接着 6-磷酸葡萄糖酸进一步氧化脱羧生成磷酸戊糖，磷酸戊糖经磷酸酮解反应生成乙酰磷酸和磷酸丙糖。最后这些产物分别被转变生成乙醇和乳酸。PK 途径在厌氧条件下的乳杆菌中进行的是异型乳酸发酵。PK 途径特点是：a. 利用 PK 途径发酵的微生物缺少醛缩酶，它不能将磷酸己糖裂解为 2 个三碳糖；b. 分解 1 分子葡萄糖只产生 1 分子 ATP，相当于 EMP 途径的一半；c. 经过 PK 途径产生等量的乳酸、乙醇和 CO₂，这种类型的发酵常称为“异型乳酸发酵”。

⑤ 葡萄糖直接氧化途径。葡萄糖直接氧化途径是利用该途径代谢的微生物，使葡萄糖首先在特有的葡萄糖氧化酶的作用下，被 O₂ 氧化成葡萄糖酸内酯和葡萄糖酸，葡萄糖酸被 ATP 激酶激活（磷酸化）为 6-磷酸葡萄糖酸。后者即可进入不完全的 HMP 途径、ED 途径或其他途径继续降解为丙酮酸。许多真菌具有不需预先磷酸化作用而氧化葡萄糖的能力，这是因为它们具有葡萄糖氧化酶的缘故。黑曲霉、产黄青霉等以葡萄糖为底物，以 FAD 为辅基，催化葡萄糖氧化脱氢，生成葡萄糖酸内酯和 H₂O₂，H₂O₂ 又被触酶分解。

（2）呼吸与发酵 生物氧化（biological oxidation）是发生在活细胞内的一系列产能性氧化反应的总称。其特点是生物氧化是按照一定顺序进行的，由酶催化的逐级放能过程。对于化能营养型微生物来讲，可将生物氧化分为：有氧呼吸、无氧呼吸和发酵三种类型。

① 有氧呼吸。有氧呼吸（aerobic respiration）是以分子氧作为微生物能源化合物被氧化时所释放出电子的最终受体的生物氧化过程。化能异养型微生物的能源化合物为有机物，化能自养型微生物的能源化合物是还原性无机物，如 H₂、H₂S、NH₃、Fe²⁺、NO₂⁻ 等。在 O₂ 存在条件下能生长的

需氧微生物、兼性厌氧微生物进行有氧呼吸作用。化能异养型微生物进行有氧呼吸有两种形式，一种典型形式是呼吸底物氧化，不与分子氧的还原作用直接偶联，而是把自身氧化过程放出的电子经过呼吸链最后传递给 O_2 ；另一种非典型形式是呼吸底物脱下的电子借助黄素蛋白传递给 O_2 。

在 O_2 的存在下，化能异养型微生物经 EMP 途径、HMP 途径或 ED 途径，将葡萄糖降解为丙酮酸并生成 NADH 或 NADPH。丙酮酸脱羧生成乙酰辅酶 A，乙酰辅酶 A 注入三羧酸循环产生 CO_2 、NADH 和 ATP。三羧酸循环 (tricarboxylic acid cycle) 也称为 TCA 循环。每分子丙酮酸经 TCA 循环产生 3 分子 CO_2 、4 分子 NADH、1 分子 FADH 和 1 分子 ATP。

乙酰辅酶 A 可看作是 TCA 循环的初始底物，草酰乙酸可看作再生底物。当再生底物不足时，将影响 TCA 循环的正常代谢，进而影响乙酰辅酶 A 继续降解。因此，草酰乙酸动态含量涉及到提供草酰乙酸的 TCA 循环再生底物的回补，而 TCA 循环再生底物的回补主要来自 CO_2 固定和乙醛酸循环。乙酰辅酶 A 注入 TCA 循环，而乙酰辅酶 A 的另一个去向是借助 TCA 循环生成异柠檬酸，并由异柠檬酸裂合酶分解为乙醛酸和琥珀酸以及在苹果酸合成酶催化下由乙醛酸和乙酰辅酶 A 合成苹果酸。因为乙醛酸是这一循环中的二碳中间物，故称为乙醛酸循环 (glyoxylate cycle)。

② 无氧呼吸。无氧呼吸 (anaerobic respiration) 是以无机含氧化合物 (如 NO_3^- 、 NO_2^- 、 SO_4^{2-} 、 CO_2 甚至 CO) 作为电子最终受体，接受呼吸底物放出电子的过程。无氧呼吸是厌气微生物和兼性厌气微生物在无氧条件下进行呼吸作用。在无氧呼吸过程中，化能异养型微生物以有机物 (如葡萄糖等) 为呼吸底物或碳源；化能自养型微生物以还原性无机物 (如 H_2 、 H_2S 等) 作为呼吸底物，以 CO_2 为碳源。

根据呼吸链末端的最终电子受体的不同，可把无氧呼吸分为如下所示几种类型。

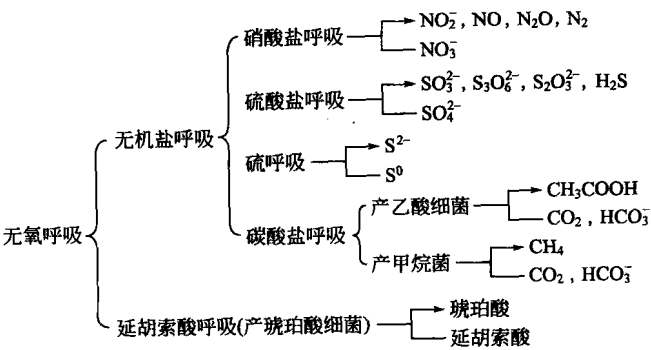


表 1-3 各种主要发酵类型

发酵类型	代谢途径	产物/葡萄糖	产能/葡萄糖	代表菌
酵母菌的酒精发酵	EMP 途径①	2 乙醇	2ATP	酵母菌
酵母菌的甘油发酵	EMP 途径(歧化反应)	甘油、0.5 乙酸和 0.5 乙醇	0	酵母菌(碱性和高渗透压)
细菌的酒精发酵	ED 途径	2 乙醇	ATP	运动发酵单胞菌
同型乳酸发酵	EMP 途径②	2 乳酸	2ATP	乳杆菌属、链球菌属
异型乳酸发酵	HMP 途径	乳酸和乙醇	ATP	异型乳酸杆菌
双歧发酵	PK 途径与 HMP 途径结合	乳酸和 1.5 乙酸	2.5 ATP	两歧双歧杆菌
丙酮丁醇发酵	EMP 途径⑥	0.5 丁醇、0.5 丙酮和 2H ₂	ATP	丙酮丁醇梭菌
丁酸发酵	EMP 途径⑥	丁酸和 2H ₂	3ATP	丁酸梭菌
混合酸发酵	EMP 途径④	少量的乙醇、乙酸、乳酸、甲酸和琥珀酸	—	埃希菌属、沙门菌属
丁二醇发酵	EMP 途径⑤(V. P 实验)	丁二醇和乙醇	—	肠杆菌属、欧文菌属
Sticklakt 反应	氨基酸氧化与氨基酸还原相偶联	乙酸和 NH ₃	ATP	能水解蛋白质的梭菌

注：代谢途径参见图 1-1。

③ 发酵。发酵 (fermentation) 是在无氧条件下, 以有机物作为电子最终受体, 接受呼吸底物放出电子的过程。发酵特点是: 发酵过程中的电子受体和电子供体都是有机物; 发酵过程产生的 ATP 是通过底物水平磷酸化来获得的。在厌氧条件下, 化能异养型微生物经 EMP 途径、HMP 途径、ED 途径或 PK 途径, 首先将葡萄糖降解为丙酮酸, 并生成 NADH。进一步代谢过程是由丙酮酸开始的发酵过程, 其代谢过程如图 1-1 所示。各种主要发酵类型如表 1-3 所示。

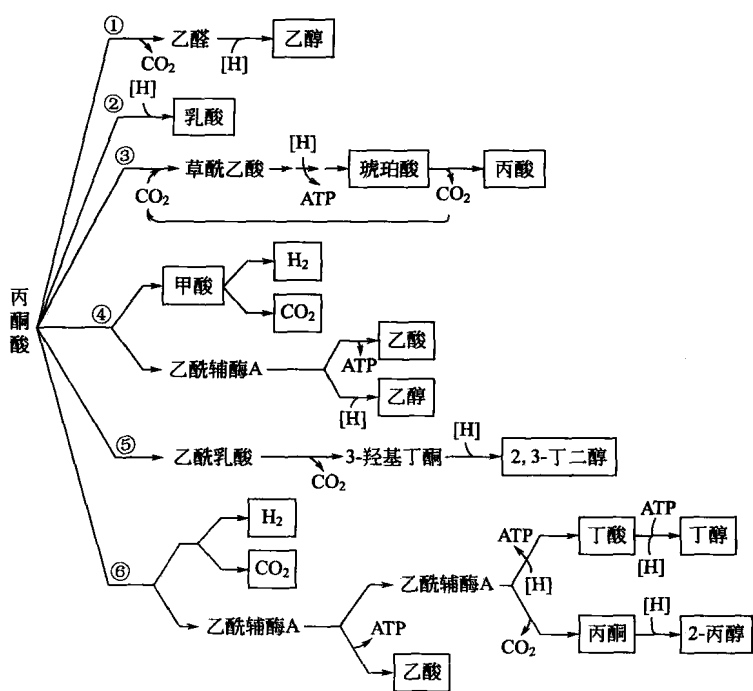


图 1-1 自丙酮酸开始的各种产物发酵

三、发酵工业的特点

- ① 发酵过程的动力来自工业微生物。发酵工业可以说是微生物利用工业。
- ② 新型发酵是代谢控制发酵, 即以酶法转化、氨基酸发酵为代表的代谢控制发酵技术。这项发酵工程技术目前已应用于核苷酸类物质、有机酸和一部分抗生素的发酵生产。近代分子生物学、分子遗传学研究的进展, 促进了该项工程技术以及工程理论的发展。
- ③ 与色、香、味、体相关的传统发酵往往与固态发酵、混合菌发酵以及低温发酵相互关联。
- ④ 发酵核心问题是: 发酵菌株的改良, 发酵过程的优化控制以及代谢产物分离精制。
- ⑤ 现代发酵工程处于现代生物技术的中心位置, 生物技术的目标是实现工业化生产, 只有通过发酵工程才能得以完成。
- ⑥ 发酵工业向着大型化、连续化、自动化方向发展。近代发酵工业发展速度较快, 发酵工厂呈现“综合型、股份制、大规模、现代化”的企业发展模式。发酵过程控制向着“自动化、连续化、计算机智能化”方向发展。

四、发酵过程的组成部分

1. 发酵过程的流程

典型的发酵过程如图 1-2 所示。发酵过程由原料预处理、种子扩大培养、发酵过程及控制、产物分离精制以及发酵废弃物的处理 5 个主要阶段组成。

(1) 发酵原料选择及其预处理阶段 主要包括原料选择、培养基配制、原料预处理、灭菌等。

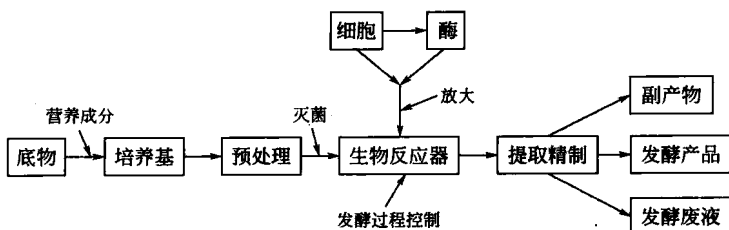


图 1-2 一般发酵过程示意图

发酵工业所用原料通常以糖质或淀粉质等碳水化合物为主，补加适当的营养成分，配制发酵用介质——培养基。这些培养基经原料预处理转变为可被微生物发酵的基质，再经灭菌送到发酵罐。

(2) 种子扩大培养阶段 主要包括发酵菌株分离纯化、保藏菌株活化、发酵种子扩大培养等。在微生物发酵过程中，首先应选择高产、稳产、培养粗放的生产菌种。发酵前必须经多级扩大培养，获得足够数量和达到一定质量要求的种子，以满足发酵生产的需要。

(3) 发酵过程及控制阶段 主要包括发酵罐（生物反应器）的选择、发酵条件优化以及发酵过程控制等。必须根据具体微生物的特性、代谢规律和产品特点，来选择合适的发酵设备和发酵条件。

(4) 产物分离精制阶段 主要包括利用物理、化学和生物学分离技术手段，除去杂质、提高目的产物浓度，使之达到最终产品的要求。这些产物的提取精制与化工分离精制单元操作过程类似，但又具有生物大分子（如酶、核酸、多糖等）、发酵小分子以及菌体等的生物学性质。

(5) 发酵废弃物的处理阶段 主要包括发酵废液的生物污水处理过程以及废物再生利用等。综合利用发酵液废弃物，发展高效、低能耗的废水处理技术，以实现发酵过程的清洁生产。

发酵过程的原料预处理、种子扩大培养、发酵过程及控制阶段构成生物上游工程（up stream process），产物分离精制阶段构成生物下游工程（down stream process）。发酵过程是由生物上游工程、生物下游工程和发酵废液的生物污水处理等阶段构成。

2. 发酵过程的特点

发酵过程可以说是以微生物活细胞作为生物催化剂的生物反应过程，这一过程具有以下特点：①采用微生物活细胞，发酵过程在常温常压下进行，但活细胞易失活、过程易受到环境影响以及杂菌的污染等；②发酵原料多为农副产品，属可再生资源；③与化工过程相比，生产设备较简单，能源消耗较少，发酵底物浓度较低，因而发酵罐体积很大；④由于酶（或细胞）的底物专一性强，底物转化率高，发酵过程成本较低，但活细胞和代谢机制较复杂，使得发酵过程较难控制；⑤发酵液杂质较多、目的产物浓度较低，分离纯化困难较大；⑥发酵过程伴随产物的形成，发酵废液量较大，实现发酵过程清洁化生产困难较大。

3. 发酵过程的典型例证

以啤酒生产过程为例，啤酒生产是以大麦和大米为原料，大麦经浸麦、发芽和焙烤，制备出麦芽。麦芽既是一种含有淀粉酶以及蛋白酶为主的糖化剂，又是一种含有麦芽香味成分的啤酒前体性

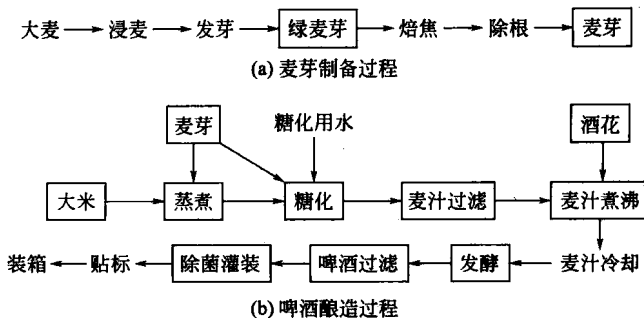


图 1-3 麦芽制备及啤酒酿造生产流程