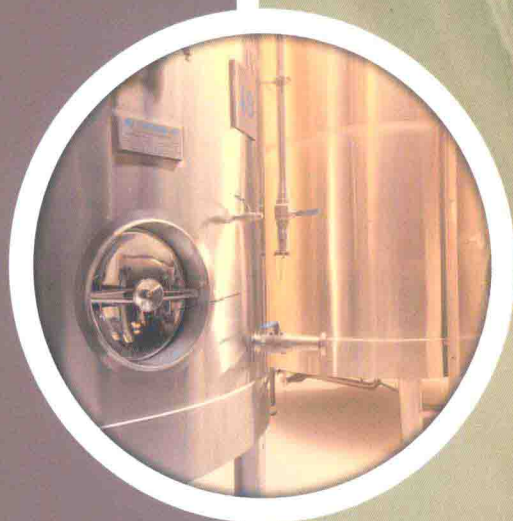


FAJIAO GONGCHENG  
YUANLI YU JISHU

# 发酵工程

## 原理与技术

陶永清 王素英 编著



中国水利水电出版社  
[www.waterpub.com.cn](http://www.waterpub.com.cn)

# 发酵工程

## 原理与技术

陶永清 王素英 编著



中国水利水电出版社  
[www.waterpub.com.cn](http://www.waterpub.com.cn)

## 内 容 提 要

本教材理论体系全面,紧紧围绕发酵工程上、中、下游技术而展开。全书内容包括绪论、微生物菌种的选育与保藏、工业发酵培养基、发酵工业灭菌技术、种子扩大培养技术、微生物发酵动力学、发酵工艺的控制、发酵产物的分离与精制、与发酵工程相关的生物技术、发酵工业清洁生产与环境保护等。

本书可作为综合性大学和理工类院校生物工程专业及相关专业本科生使用的教材,也可供发酵工程、生物化工和生化工程等相关领域的科研人员和教学工作者参考。

## 图书在版编目(CIP)数据

发酵工程原理与技术/陶永清,王素英编著.--北

京:中国水利水电出版社,2014.12

ISBN 978-7-5170-2789-8

I. ①发… II. ①陶… ②王… III. ①发酵工程—高等学校—教材 IV. ①TQ92

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2014)第 308690 号

策划编辑:杨庆川 责任编辑:陈洁 封面设计:崔蕾

书 名	发酵工程原理与技术
作 者	陶永清 王素英 编著
出版发行	中国水利水电出版社 (北京市海淀区玉渊潭南路 1 号 D 座 100038) 网址:www.waterpub.com.cn E-mail:mchannel@263.net(万水) sales@waterpub.com.cn
经 售	电话:(010)68367658(发行部)、82562819(万水) 北京科水图书销售中心(零售) 电话:(010)88383994、63202643、68545874 全国各地新华书店和相关出版物销售网点
排 版	北京鑫海胜蓝数码科技有限公司
印 刷	三河市天润建兴印务有限公司
规 格	184mm×260mm 16 开本 17.25 印张 420 千字
版 次	2015 年 5 月第 1 版 2015 年 5 月第 1 次印刷
印 数	0001—3000 册
定 价	62.00 元

凡购买我社图书,如有缺页、倒页、脱页的,本社发行部负责调换

版权所有·侵权必究

# 前 言

发酵工程是一个由多学科交叉、融合而形成的技术性和应用性较强的开放性学科。发酵工程作为现代生物技术产业化的支撑技术体系,与分子生物学、微生物基因组学、蛋白质组学、生物信息学、系统生物学、生物催化工程和人工智能控制学等多种前沿学科密切交融,上述学科的发展拓宽了发酵工程学的研究领域,发酵工程成为解决人类面临的能源、资源和环境等持续性发展课题的关键技术。

发酵工业在我国国民经济中占有较高的比重,量大面广,直接关系到国计民生。我国具有国际上工业发酵产业中的所有主要产业,就其规模而言,某些产业(如谷氨酸、柠檬酸、维生素C)在世界上占据着非常重要的地位,但是,技术水平与发达国家相比进步空间依然比较大,主要体现在生产菌种水平较低,发酵工艺、分离精制方法和生产装置不够先进,这些都导致我国某些发酵产品的原料和能源消耗大,生产成本低,污染严重。中国是一个发酵大国,但还不是发酵强国。加强发酵工程技术研究,从菌种的高通量筛选、原料的高效利用、发酵过程的全局优化与控制、目标产品的高效提取以及代谢废物的分流处理与综合利用等层面进行系统研究,对进一步提升我国的发酵工程技术水平具有重要意义,也是作者撰写此书的内在原动力。

本书在写作过程中,力求简明扼要、易教易学、图文并茂、版式活泼,并突出以下特色。①系统性:本书将理论与实践相结合,力求使读者对发酵工程原理与技术有一个概括性的掌握和了解,能够便捷地利用本书知识开展相关工作;②前沿性:本书将新理论、新技术、新方法融为一体,力求反映该学科的最新发展动态;③科学性:本书按照学习规律,循序渐进,对发酵工程技术进行了深入浅出、简明扼要的介绍;④实践性:本书技术可靠,与实践结合紧密,适用于教学、生产和科研。

本书共十章,内容包括绪论、微生物菌种的选育与保藏、工业发酵培养基、发酵工业灭菌技术、种子扩大培养技术、微生物发酵动力学、发酵工艺的控制、发酵产物的分离与精制、与发酵工程相关的生物技术、发酵工业清洁生产与环境保护等。

全书由陶永清、王素英撰写,具体分工如下:

第一章、第三章、第四章、第八章、第十章:陶永清(天津商业大学);

第二章、第五章至第七章、第九章:王素英(天津商业大学)。

本书的作者来自教学一线,他们长期从事着发酵工程的教学和相关科研工作,有着较为丰富的理论基础和实践经验。为了突出本书的学术性和应用价值,在撰写本书的过程中,参考了许多国内外相关的教材和文献资料,引用了其中部分重要的结论及相关的图表,在此向各位前辈及同行致以衷心的感谢。

由于作者学识和水平有限,加之时间仓促,书中难免存在不足之处,恳请广大读者给予批评指正。

作者

2014年9月

# 目 录

前言	1
<b>第一章 绪论</b>	<b>1</b>
第一节 发酵工程的概念	1
第二节 发酵工程的发展史	2
第三节 发酵工程的特点	4
第四节 发酵工程的产品类型	6
第五节 发酵工程的发展趋势	6
<b>第二章 微生物菌种的选育与保藏</b>	<b>9</b>
第一节 菌种的来源	9
第二节 发酵菌种的改良	16
第三节 菌种的保藏	36
<b>第三章 工业发酵培养基</b>	<b>39</b>
第一节 发酵培养基的基本要求	39
第二节 发酵培养基的成分	39
第三节 发酵培养基的分类	49
第四节 发酵培养基的设计与优化	51
<b>第四章 发酵工业灭菌技术</b>	<b>63</b>
第一节 常见的灭菌方法	63
第二节 培养基和设备灭菌	71
第三节 空气除菌	81
<b>第五章 种子扩大培养技术</b>	<b>97</b>
第一节 种子制备工艺	97
第二节 种子质量的控制措施	101

<b>第六章 微生物发酵动力学</b> .....	107
第一节 发酵过程动力学描述 .....	107
第二节 分批发酵动力学 .....	115
第三节 连续发酵动力学 .....	121
第四节 补料分批发酵动力学 .....	125
<b>第七章 发酵工艺的控制</b> .....	129
第一节 概述 .....	129
第二节 温度对发酵的影响及控制 .....	136
第三节 pH 对发酵的影响及控制 .....	139
第四节 溶解氧对发酵的影响及控制 .....	142
第五节 CO <sub>2</sub> 浓度对发酵的影响及控制 .....	146
第六节 泡沫对发酵的影响及控制 .....	148
第七节 补料对发酵的影响及控制 .....	154
第八节 染菌对发酵的影响及控制 .....	156
<b>第八章 发酵产物的分离与精制</b> .....	165
第一节 概述 .....	165
第二节 发酵液的预处理和固液分离 .....	169
第三节 沉淀法 .....	175
第四节 吸附法 .....	180
第五节 离子交换法 .....	184
第六节 萃取法 .....	187
第七节 膜分离技术 .....	196
第八节 色谱分离技术 .....	199
第九节 结晶 .....	214
第十节 干燥 .....	218
<b>第九章 与发酵工程相关的生物技术</b> .....	221
第一节 基因工程菌发酵 .....	221
第二节 动植物细胞大规模培养 .....	230

第十章 发酵工业清洁生产与环境保护 .....	250
第一节 清洁生产技术 .....	250
第二节 有机废水的微生物处理 .....	254
第三节 有机固体废弃物的微生物处理 .....	262
参考文献 .....	267

# 第一章 绪论

## 第一节 发酵工程的概念

### 一、发酵的定义

发酵(fermentation),有史以来就被人类所认识。发酵的英文术语最初来自拉丁语“fervere”(发泡、沸涌)这个单词。主要是用来描述酵母菌作用于果汁或发芽谷物,产生  $\text{CO}_2$  而鼓泡的现象。尽管人类很早就已经掌握了“发泡”现象,但对其本质却长时间缺乏认识,而始终把它当作神秘的东西。被称为微生物学之父的法国科学家巴斯德(Louis Pasteur)第一个探讨了酵母菌酒精发酵的生理意义,将发酵现象与微生物生命活动联系起来考虑,并指出发酵是酵母菌在无氧状态下的呼吸过程,即无氧呼吸,是生物获得能量的一种方式。也就是说,发酵是在厌氧条件下,原料经过酵母等生物细胞的作用,菌体获得能量,同时将原料分解为酒精和  $\text{CO}_2$  的过程。从目前来看,巴斯德的观点还是正确的,但也不是很全面,因为发酵对于不同的对象具有不同的意义。

现代生化和生理学意义上的发酵是指微生物在无氧条件下,分解各种有机物质产生能量的一种方式。对生物化学家来说,发酵是微生物在无氧时的代谢过程。而对工业微生物学家来说,发酵是指借助微生物在有氧或无氧条件下的生命活动,来制备微生物菌体本身或代谢产物的过程。严格地说,发酵是指以有机物作为电子受体的氧化还原产能反应。因此,从这个意义来说,并非所有的发酵过程都可看见起泡(翻涌状)的现象。“发酵”这个词语已经被习惯性地延伸到所有利用微生物生产产品的过程,而且现代发酵工程还包括了利用动植物细胞(指微生物细胞、动物细胞、植物细胞、微藻)在有氧或无氧条件下的生命活动来大量生产或积累生物细胞、酶类和代谢产物的过程统称为发酵。

### 二、发酵工程的概念

微生物是地球上分布最广、物种最丰富的生物种群,种类之多,至今仍然是个难以估计的未知数,包括无细胞结构不能独立生活的病毒、亚病毒和具有原核细胞结构的真细菌、古菌以及具有真核细胞结构的真菌、单细胞藻类、原生动物等。发酵工程,狭义上也称为微生物工程,是指在人为控制的条件下通过微生物的生命活动而获得人们所需物质的技术过程。现代意义上的发酵工程是指利用生物细胞的特定性状,通过现代工程技术手段,在反应器中生产各种特定有用物质,或者把生物细胞直接用于工业化生产的一种工程技术系统。它更强调利用经基因工程、细胞工程、蛋白质工程等现代生物技术手段改造过的微生物来生产对人类有用的产品的过程。发酵工程涉及微生物学、生物化学、化学工程技术、机械工程、计算机工程等基本原理和技术,并将它们有机地结合在一起,利用生物细胞进行规模化生产。人类对于发酵工程这一



概念的认识始终是处于不断发展和完善的过程中的。

发酵工程是生物加工与生物制造实现产业化的核心技术。发酵工程技术主要包括提供优质生产菌种的菌种技术、实现产品大规模生产的发酵技术和获得合格产品的分离纯化技术。其典型工艺流程如图 1-1 所示。

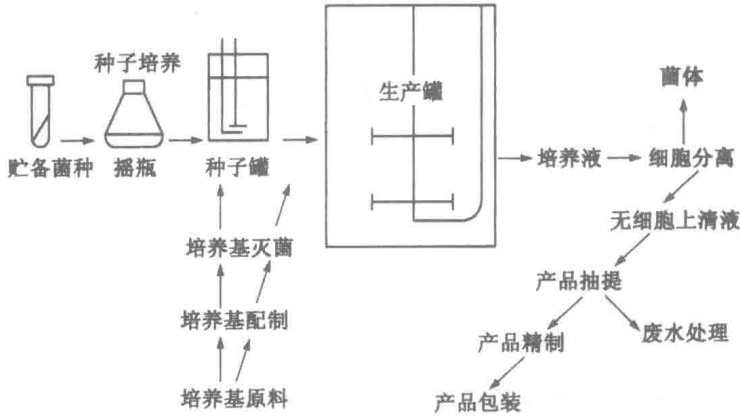


图 1-1 发酵工程的典型工艺流程图

从图中可以看出,发酵工程主要内容包括:发酵原料的选择及预处理,微生物菌种的选育及扩大培养,发酵设备选择及工艺条件控制,发酵产物的分离提取,废弃物的回收和利用等。

## 第二节 发酵工程的发展史

### 一、天然发酵阶段

早在公元前 6000 年,古巴比伦人就开始利用发酵的方法酿造啤酒;公元前 4000 年,埃及人就熟悉了酒、醋、面包的发酵制作方法,我国在距今 4200~4000 年前的龙山文化时期已有酒器出现,公元前 1000 多年前的殷商时期已有酿酒、制醋的文字记载。这些古老的发酵技术流传至今,属于这个时期的典型制品还有酱油、酸乳、泡菜、干酪和腐乳等。那时,人们并不知道这些现象是由微生物作用引起的,生产只能凭经验,因而很难人为控制发酵过程,产品质量不稳定。也正是由于长期对发酵的本质缺乏认识,导致发酵工程发展缓慢。

### 二、纯培养技术的建立

1680 年,荷兰人列文·虎克发明了显微镜,并发现了肉眼看不见的细菌、酵母等微生物。1857 年,法国著名生物学家巴斯德用巴氏瓶实验证明了酒精发酵是由活酵母引起的,从而将发酵过程与微生物的生命活动联系起来。1905 年,德国人柯赫首先发明了固体培养基,得到了细菌的纯培养物,由此奠定了微生物分离纯化和纯培养技术的基础,开创了人为控制发酵过程的时期,提高了产品的稳定性。由于采用纯种培养与无菌操作技术,再加上简单密封式发酵罐的发明以及发酵管理技术的改进,使发酵过程避免了杂菌的污染,从而扩大了生产规模,产品质量也得到了提高。这一时期典型的发酵产品有酵母、酒精、丙酮、丁醇、甘油、有机酸和酶制剂等。一般认为纯培养技术的建立是发酵工业发展的第一个转折。

### 三、通气搅拌液体发酵技术的建立

纯培养技术的出现扩大了发酵工程的生产规模,但同时也出现了大规模发酵过程供氧不足的难题,限制了发酵工业的进一步发展。以青霉素为例,青霉素合成需要大量的氧气。最初的生产方法是使用一个小容器,装入1~2cm厚的原料(液体培养基),青霉菌(*Penicillium*)在液体表面生长繁殖,分泌青霉素到液体内。由于液层薄,青霉菌很容易得到氧气,不必搅拌和通入空气,但是这种方法需要很多小容器和很大的培养室。后来人们想办法将小容器串联起来,使培养液在菌层下面流动进行更新。这些办法的目的都是要解决通气问题,但终因操作不便、产量不高和容易染杂菌而失败。迫于第二次世界大战对抗细菌感染药物的需要,1945年在无菌条件下深层发酵生产青霉素的通气搅拌藏体技术终于被成功应用到大规模的工业生产中,标志着好氧菌的发酵生产从此走上了大规模的工业化生产途径,开创了发酵工程史上崭新的一页。在此阶段,发酵技术发生了突飞猛进的变化,开发出了许多新产品的发酵工艺,包括其他抗生素、维生素、氨基酸、酶和类固醇等产品,有力地促进了发酵工业的迅速发展。因而,通气搅拌液体技术的建立被认为是发酵工业发展史上的第二个转折点。

### 四、代谢控制发酵技术

随着人们对微生物代谢途径了解的加深,人们开始利用调控代谢的手段进行微生物选种育种和控制发酵条件。代谢工程是利用重组DNA技术或其他技术,有目的地改变生物中已有的代谢网络和表达调控网络,以更好地理解细胞的代谢途径,并用于化学转化、能量转移及大分子装配过程。Bailey把代谢工程分为两类:①利用外源蛋白的活性实现菌株的改良;②重新分配代谢流。Nielsen将其分为七类:①合成异源代谢产物;②扩大底物利用范围;③生产非天然的新物质,如新型药物;④降解环境有害物质;⑤改善和提高微生物的某种性能;⑥阻断或降低副产物的合成;⑦提高代谢产物产率。虽然在植物、昆虫和动物细胞中也开始进行代谢工程研究,但微生物由于其代谢途径相对简单、遗传操作比较容易,因而仍是目前代谢工程的主要研究对象。1956年,日本首先成功地利用自然界存在的野生生物素缺陷型菌株进行谷氨酸的发酵生产。此后,赖氨酸、苏氨酸等一系列氨基酸都采用发酵法生产。这种以代谢调控为基础的新的发酵技术使发酵工业进入了一个新的阶段。随后,核苷酸、抗生素以及有机酸等产品也逐渐采用代谢调控技术进行生产。

微生物代谢工程是工业生物技术的核心技术之一。后基因组时代的代谢工程,是在系统生物学和功能基因组学的强力支撑下,通过对微生物代谢与调控网络的全面理解,将微生物作为细胞工厂生产有用物质或服务于人类社会的重要技术。代谢工程的应用遍及医药、化工、轻工、食品、农业、能源、环保等国民经济诸多领域,是生物技术产业化和规模化发展壮大的基础。目前,微生物代谢工程已进入一个借助于系统生物学、基因组学和功能基因组学技术平台、系统开展微生物代谢途径和基因表达调控网络研究的新阶段。

### 五、开拓发酵原料时期

传统的发酵原料主要是粮食、农副产品等糖质原料,随着饲料用酵母及其他单细胞蛋白的需要日益增多,急需开拓和寻找新的糖质原料。由于烃类化合物的纯度高、密度低、碳含量高、

能为微生物有效利用,以及从成本上可与其他基质竞争,因此石油化工副产物石蜡、甲烷等碳氢化合物被用来作为发酵原料,开始了所谓石油发酵时代,使发酵罐的容量、供氧能力、发酵过程控制都达到了前所未有的规模。由于石油资源日益枯竭,近年来利用秸秆、玉米芯等生物质作为原料生产酒精等燃料能源已经引起越来越多的国家在发展战略上的重视。目前限制乙醇作为燃料使用的主要障碍还是成本问题,因而构建能够利用可再生物质生产乙醇的工程菌仍是主要的努力方向。美国把纤维废料制取乙醇作为可再生能源战略的重要项目。美国能源部和诺维信公司合作,研究以玉米秸秆为原料的生物乙醇生产技术,目前,其关键技术纤维素酶有了突破性的进展,从玉米秸秆酶解生产 1 US gal) 燃料酒精的纤维素酶成本从 5 美元降至 50 美分。他们计划再经过两年努力,使每生产 1 US gal 燃料酒精的纤维素酶成本降至 10 美分,使纤维素酶不再是发展玉米秸秆水解生产燃料酒精的制约因素。

### 六、基因工程阶段

DNA 双螺旋结构发现之后,1973 年美国科学家 Herber Boyer 和 Stanley Cohen 首次对质粒进行了基因工程(genetic engineering)操作并成功转化了大肠杆菌,由此开拓了以基因工程为中心的生物工程时代。基因工程是指在基因水平上,采用与工程设计十分类似的方法,根据人们的意愿,主要是在体外进行基因切割、拼接和重新组合,再转入生物体内,生产出人们所期望的产物,或创造出具有新的遗传特征的生物类型,并使之稳定地遗传给后代。

基因工程不仅能够在不相关的微生物之间转移基因,而且可以非常精确地改造微生物的基因组,这样微生物细胞可以生产通常由高等生物细胞才能生产的有关化合物,如胰岛素、干扰素和乙肝疫苗。这样人们就能够根据自己的意愿将微生物以外的基因导入微生物细胞中,使发酵工业能够生产出自然界微生物所不能合成的产物,扩大了具有商业化潜力的微生物产品范围,并且为新的发酵工程打下基础,使发酵工业发生了革命性的变化并形成了许多新的发酵过程。

近年来,基因工程技术已开始由实验室走向工业生产。它不仅为我们提供了一种极为有效的菌种改良的技术和手段,也为攻克医学上的疑难杂症——癌症、遗传病及艾滋病的深入研究和最后的治愈提供了可能,还为农业的第三次革命提供了基础。现在由工程菌生产的珍稀药物,如胰岛素、干扰素、人生长激素、乙肝表面抗原等都已先后应用于临床,基因工程不仅保证了这些药物的来源,而且可使成本大大下降。另外,重组 DNA 技术和大规模培养技术的有机结合,使得原来无法大量获得的天然蛋白质能够规模生产。但研究也发现,工程菌在保存及发酵生产过程中表现出一定的不稳定性。因此,解决工程菌不稳定性问题成为基因工程这一高技术成果转化为生产力的关键之一。

## 第三节 发酵工程的特点

发酵工程是生物反应过程,其本质是利用生物催化剂生产生物产品的过程。发酵工程与化学工程联系非常密切,化学工程中的许多单元操作在发酵工程中得到广泛应用,但是,由于发酵工程是培养和处理活的生物体,所以还具有以下几个特点:

① 发酵工程使用的原料来源广泛,通常以淀粉、糖蜜等碳水化合物为主,多为农副产品,属

于生物质原料,规格不一、组成复杂,以碳源为主,只要不含毒物,一般不必进行精制,加入少量的有机和无机氮源就可进行反应。此外,还可利用碳氢化合物、废水和废物等作为原料进行发酵。可见,发酵工业对原料的要求较为粗放。

②发酵工程的反应过程比较温和,通常在常温、常压下进行。而且,反应过程是以生物体的自身调节方式进行,多个反应就像是一个反应一样,可在单一设备中进行,因此一种设备可有多种用途。

③由于生物体本身具有自动调节的反应机制,因此数十个反应过程能够像单一反应一样,在发酵罐的单一设备内就能很容易地完成。

④容易进行复杂的高分子化合物的生产,如酶、化学活性体等。

⑤发酵过程能够专一地和高度选择性地对某些较为复杂的化合物进行特定部位的氧化、还原、官能团导入等化学反应,可以产生化学工业难以合成或几乎不可能合成的复杂的化合物,并且反应的专一性强,可以得到较为单一的代谢产物。酶类的生产和光学活性体的有选择性生产是发酵工业最有特色的领域。

⑥生产产品的微生物菌体本身也可作为发酵产物。例如,富含蛋白质、酶、维生素的单细胞蛋白等。

⑦发酵过程是纯种培养过程,在操作上最需要防治的是杂菌的污染。生产中使用的设备、管道、截门和培养基都必须严格灭菌,通入的空气也应该是无菌空气。在操作中应特别注意严格防止染菌,尤其要防止噬菌体的侵入,一旦发生杂菌和噬菌体的污染,容易给发酵工业带来重大经济损失。

⑧微生物菌种是进行发酵的根本因素,菌种的性能是决定发酵工业生产水平最主要的因素。在不增加任何设备投资的情况下,通过菌种选育,改良菌种的生产性能来提高生产能力,可以达到事半功倍的效果。可通过自然选育、诱变、基因工程等菌种选育手段获得高产的优良生产菌株,生产按常规方法难以生产的产品,能够利用原有的生产设备提高生产的经济效益。

⑨在发酵生产中,还可以通过改进工艺技术和设备来提高产品的产量和质量。

⑩工业发酵与其他工业相比,投资少、见效快,并可以取得较显著的经济效益。

与传统发酵工程相比,现代发酵工程还具有以下几个特点:不完全依赖地球上的有限资源,而着眼于再生资源的利用,不受原料的限制;能解决传统技术或常规方法所不能解决的许多重大难题,并为能源、环境保护提供新的解决办法;可定向创造新品种、新物种,适应多方面的需要,造福于人类;除利用微生物外,还可以用动植物细胞和酶,也可以用人工构建的遗传工程菌进行反应;反应设备也不局限于常规的发酵罐,各种各样的生物反应器不断被研制出来,可实现自动化控制、连续化生产,使发酵工业的水平得到了很大的提高。

发酵工程也有一些问题需要引起重视:

①底物不可能完全转化为目的产物,而且会有很多副产物产生。如四环素发酵液中除了有四环素外,还会有金霉素、差向四环素、脱水四环素等副产物。这些副产物的存在,给提取和精制带来了一定的困难。

②由于发酵工程采用的是活细胞,其产物的生成率一方面受外界环境的影响,另一方面受细胞自身的影响,所以工艺控制比较困难,生产波动比较大。

③发酵工程需要的辅助设备多,如空气压缩机、空气净化系统、冷却水系统、灭菌用蒸汽系

统等。因此,动力费用比较高。

- ④发酵中,因为底物浓度不能过高,导致需要使用大体积的反应器。
- ⑤发酵废液中具有较高的 COD 和 BOD,排放前必须经过处理。

### 第四节 发酵工程的产品类型

无论采用何种发酵菌种及方式,其生产的发酵产物大致都可分为五类。

#### 一、微生物菌体

此类型是以培养微生物并收获细胞作为发酵产品。如用于面包制作的酵母发酵、单细胞蛋白(SCP)饲料添加剂、灵芝和虫草菌丝体的生产等。

#### 二、微生物代谢产物

微生物代谢产物称即将微生物生长代谢过程中的代谢产物作为发酵产品。代谢产物又可分为初级代谢产物(primary metabolism)和次级代谢产物(secondary metabolism)。初级代谢产物是指微生物在对数生长期产生、功能明确且必需的一类代谢产物,主要有氨基酸、核苷酸、蛋白质、核酸、脂类、碳水化合物等。次级代谢产物是以初级代谢的中间体为前体合成的、功能尚不明确、结构复杂的一类代谢产物,如抗生素、生物碱、毒素、激素、维生素等。

#### 三、微生物酶

微生物酶即通过微生物培养获得其产生的酶作为发酵产品,如淀粉酶、糖化酶、蛋白酶、脂肪酶等。目前已经在自然界中发现的酶共有 2500 多种,其中有经济价值的 60 余种,工业化生产的微生物酶制剂仅 20 种左右。

#### 四、微生物转化产物

它是利用微生物细胞将一种化合物转化成结构相关、更具经济价值的化合物。如利用菌体将乙醇转化成乙酸的发酵,利用微生物细胞将甾体、薯蓣皂甙转化成副肾上腺皮质激素、氢化可的松等。

#### 五、工程菌(细胞)发酵

这是指利用以生物技术方法所获得的“工程菌(细胞)”进行培养的新型发酵。其产物多种多样,如用基因工程菌生产的胰岛素、干扰素等,用杂交细胞生产的用于诊断和治疗的各种单克隆抗体等。

### 第五节 发酵工程的发展趋势

从世界范围的发展情况看,生物技术是当前迅速发展的学科产业,已成为发达国家科技竞争的热点。生物工程包括基因工程、细胞工程、酶工程、蛋白质工程和发酵工程。美国、日本和

欧洲主要发达国家和地区竞相开展了生物技术的研究和开发工作,许多国家建立了一系列的生物技术研究组织,制定了近期和中长期的发展规划,在政策和资金上给予大力支持。企业界也纷纷投入巨资进行生物技术的开发研究,取得了一系列的重大成果,从而使生物技术产业化得到迅速的发展。

从半合成抗生素的研究中可以看出,采用发酵与化学合成相结合的途径是优化产品生产的一个很好的方法。临床上的成效表明,利用半合成的方法改造抗生素的结构,研究它们的构效关系,有目的地去改变抗生素的性能是获得新抗生素的有效途径之一,尤其在高效、低毒的新抗生素难于发现的今天,更有其重要性;为了提高生产能力,将发酵工程与细胞固定化技术相结合,是发酵生产的一个趋向;将发酵工程与酶工程相结合,会起到更加有效的催化作用;将发酵与提取相耦合是当今的一个热门课题。例如,将萃取与发酵相耦合的萃取发酵;超临界 $\text{CO}_2$ 萃取发酵以及膜过滤与发酵相耦合的膜过滤发酵等都会在发酵过程中,把产物提取出来,避免反馈抑制作用,以提高产物的产量。

发酵工程是生物技术的重要内容之一,是生物细胞产物通向工业化的必经之路。在生物技术与现代化工程技术相结合的基础上发展起来的新型工程技术,不仅为传统发酵工业、传统医药工业的改造及新型的生物技术工业提供了高效的生物反应器、新型分离技术和介质以及现代的工程装备技术,还提供了生产设备单元化、工艺过程最优化、在线控制自动化、系统综合设计等工程概念与技术以及用于生物过程优化控制的基础理论。生物化工技术在生物技术产业化方面起着重要作用,使生物技术的应用范围更加广泛。微生物在高新技术研究中,发挥了极重要的作用,如为基因工程的研究提供的质粒、黏粒和病毒载体及限制性内切核酸酶、连接酶、磷酸酶、磷酸激酶,以及医学诊断和发酵过程检测用的生物传感器和用于微电子中的生物芯片等。

发酵工程的下游加工由多种化工单元操作组成。由于生物产品品种多,性质各异,故用到的单元操作很多,如沉淀、萃取、吸附、干燥、蒸馏、蒸发和结晶等传统的单元操作,以及新近发展起来的单元操作,如细胞破碎、膜过滤技术和色层分离等。一些新技术、新工艺、新材料、新设备的使用,大大提高了生物技术产品的产量和质量。

发酵工程发展至今,经历了半个多世纪,已形成一个产业,即发酵工程产业。当前发酵工程的应用已深入国计民生的方方面面,包括农业生产、轻化业、医药卫生、食品、环境保护、资源和能源开发等领域。随着生物工程技术的发展,发酵工程技术也在不断改进和提高,其应用领域也在不断拓宽,显示出了强大潜力。

我国发酵工程产业的发展除了要引进和消化吸收国外先进技术之外,更需要具有国际竞争力的专业人才及具有自主知识产权的高水平的生产菌种和发酵工艺、产品后处理工艺。具体发展目标和方向有以下几个方面:

①开发和利用微生物资源。首先是设计和开发更多的自动化、定向化、快速化的菌种筛选技术和模型,筛选更多的新型菌种和代谢产物;其次是利用基因工程等先进技术,进行菌种改良。

②改进和完善发酵工程技术。例如,为了提高生产能力,将发酵工程与固定化技术相结合是发酵生产的一个趋势。将发酵工程与酶工程相结合,会起到更加有效的催化作用。将发酵与提取相耦合是当今的一个热门课题。例如,将萃取与发酵相耦合的萃取发酵。超临界 $\text{CO}_2$

萃取发酵以及将膜过滤与发酵相耦合的膜过滤发酵等都会在发酵过程中把产物提取出来,避免反馈抑制作用,以提高产物的产量。生态发酵技术(混合培养工艺)不但可以提高发酵效率和产品数量、质量,甚至还可以获得新的发酵产品,它是一种不需要进行体外 DNA 重组也能获得类似效果的新型培养技术,它的意义并不逊色于基因工程,其前景也是十分广阔和诱人的。生态发酵技术的类型很多,主要有联合发酵、顺序发酵、共固定化细胞混合发酵、混合固定化细胞发酵等。

③研制和开发新型发酵设备。发酵设备正逐步向容积大型化、结构多样化、操作控制自动化的高效生物反应器方向发展。其目的在于节省能源、原材料和劳动力,降低发酵产品的生产成本。

④重视中、下游工程的研究。发酵工程的中、下游加工由多种化工单元操作组成。由于生物产品品种多,性质各异,故用到的单元操作很多,如沉淀、萃取、吸附、干燥、蒸馏、蒸发和结晶等传统的单元操作,以及细胞破碎、膜过滤和色谱分离等新近发展起来的单元操作。一些新技术、新工艺、新材料、新设备的使用,大大提高了生物技术产品的产量和质量。但对于高水平的后处理技术和设备的研究还有待加强,尤其是对有关基础理论和应用理论研究。例如,絮凝机理、离子交换的动力学和静力学理论、双水相萃取机理、超临界流体萃取原理等,都需要大批生物学家和化学家联合研究,协同作战。此外,对于新型分离介质,如超滤膜、均孔离子交换树脂、大网格吸附剂、无毒絮凝剂、亲和层析中的新型分离母体和配位体等,也应进一步深入研究。

生物工程的迅速发展提供了多种生物细胞,而这些生物细胞必须通过发酵才能转化为商业化的产品。因此,发酵工程是生物技术实现产业化及加快研究成果转化为现实生产力、获得经济效益的必不可少的手段。随着生物技术的快速发展,发酵工程必将发生新的变化,为人类创造出更大的经济效益。

## 第二章 微生物菌种的选育与保藏

### 第一节 菌种的来源

#### 一、工业发酵常见微生物种类

发酵工业上常见的微生物有细菌、酵母菌、霉菌和放线菌等类群。以下分别介绍。

##### (一)细菌

细菌是自然界中分布最广、数量最多、与人类关系最为密切的一类微生物,也是发酵工业上使用最多的一种单细胞生物。发酵工业上常用的细菌大多是杆菌,如枯草芽孢杆菌、醋酸杆菌、棒状杆菌、乳酸杆菌、梭状芽孢杆菌、大肠杆菌等。

##### (1)醋酸杆菌(*Acetobacter*)

在自然界中分布较广,如醋醪、水果、蔬菜表面都可以找到。它是重要的工业用菌之一,能氧化酒精为醋酸,发酵调味品食醋、葡萄糖及维生素 C 的生产就是利用醋酸杆菌。目前国内醋酸生产菌株以中科 1.41 和沪酿 1.01 为主。

##### (2)假单胞菌(*Pseudomonas*)

荧光假单胞菌 A46 是多年来国内 2-酮基-D-葡萄糖酸(2KGA)、发酵生产的主要工业用菌,其发酵周期短,产酸率高,对噬菌体 KS502 和 KS503 具有稳定的抗性。

##### (3)乳酸菌

乳酸菌是一种靠发酵碳水化合物以获取能量,并能生成大量乳酸的一类细菌的总称,已知的乳酸菌有 40 多种,分类上归属于乳酸菌科(*Lactobacillaceae*)的 4 个属,即乳杆菌属(*Lactobacillus*)、链球菌属(*Streptococcus*)、明串珠菌属(*Leuconostoc*)、片球菌属(*Pediococcus*)。

##### (4)大肠杆菌

工业上利用大肠杆菌的谷氨酸脱羧酶,进行谷氨酸定量分析。还可以利用大肠杆菌制取天冬氨酸、苏氨酸和缬氨酸等。医药方面用它制造治疗白血症的天冬酰胺酶。另外,在研究细菌遗传变异方面,以及构建基因工程菌时,大肠杆菌是理想的研究材料。

##### (5)枯草芽孢杆菌

枯草芽孢杆菌是一类好气性的芽孢杆菌,可用于生产淀粉酶、蛋白酶、某些氨基酸、肌苷、5'-核苷酸酶等。例如,枯草杆菌 BF7658 是生产淀粉酶的主要菌种,枯草杆菌 Asl. 398 是生产中性蛋白酶的主要菌种。

##### (二)酵母菌

酵母菌是工农业生产上极为重要的一类微生物,也是微生物遗传学研究中非常有价值的材料。除了广泛用于面包及酒精制造外,还应用在石油脱蜡、单细胞蛋白制造、酶制剂生产以



及糖化饲料、猪血饲料发酵等许多方面。此外,从酵母菌体中还可以提取如核糖核酸、细胞色素 C、凝血质及辅酶 A 等医药产品。

能产生子囊孢子并进行芽殖的酵母菌,属于有性繁殖的类型,这是鉴别酵母种属之间差别的一个重要特征。

按照洛德(Lgdder)的分类系统,酵母菌共分 39 属,372 种。发酵工业上常用的酵母菌除了酵母属(*Saccharomyces*)外,还有假丝酵母属、汉逊氏酵母属、毕赤氏酵母属及裂殖酵母属等。

### (1) 酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)

酿酒酵母属于酵母属,是酵母菌中最重要、应用最广泛的一类。酿酒酵母是与人类关系最密切的一种酵母,不仅因为传统上它用于制作面包和馒头等食品及酿酒,而且在现代分子和细胞生物学中用作真核模式生物,其作用相当于原核的模式生物大肠杆菌。

### (2) 异常汉逊氏酵母异常变种

异常汉逊氏酵母异常变种属于汉逊氏酵母属,异常汉逊氏酵母产生乙酸乙酯,故常在食品的风味中起一定作用。例如,无盐发酵酱油的增香,以薯干为原料酿造白酒时,经浸香和串香处理可酿造出味道更醇厚的酱油和白酒。该菌种氧化烃类能力强,可以煤油和甘油作碳源。培养液中它还能累积游离出 L-色氨酸。

### (3) 假丝酵母属(*Candida*)

假丝酵母属本属有的可用于生产酵母蛋白,供食用或饲料用,如产朊假丝酵母(*C. utilis*),其蛋白质及维生素 B 的含量均高于啤酒酵母,热带假丝酵母可氧化烃类,以石油为原料可生产酵母蛋白,也可利用工业废料。白色假丝酵母(*C. albicans*),医学上称白色念珠菌,可引起念珠菌病,为条件致病菌,常见于健康人的口腔及肠道中。

### (4) 毕赤氏酵母

毕赤氏酵母属于汉逊氏酵母属,这两个属的酵母都是产膜酵母,在液体表面形成白色的膜,使液体浑浊,常常是酒类饮料的污染菌,它们在饮料表面形成干而皱的菌蹼,是酒精发酵工业及酿造工业的有害菌。

## (三) 霉菌

霉菌与人类日常生活密切相关。除了用于传统的酿酒、制酱油外,近代广泛用于发酵工业和酶制剂工业。工业上常用的霉菌,有子囊菌纲的红曲霉、藻状菌纲的毛霉、根霉和犁头霉,以及半知菌纲的曲霉及青霉等。

### (1) 曲霉属(*Aspergillus*)

曲霉种类繁多、分布广泛,工业上利用曲霉生产各种酶制剂和有机酸。如米曲霉(*Asp. oryzae*)用于酿酒和 L-乳酸生产。制酱油用的酱油曲霉以及制造柠檬酸、草酸、葡萄糖酸和糖化酶、酸性蛋白酶、果胶酶、单宁酶等的黑曲霉(*Asp. niger*)。

### (2) 青霉属(*Penicillium*)

青霉属既是使果实腐败和实物变坏的有害菌,又是青霉素和葡萄糖酸的产生菌。

### (3) 根霉属(*Rhizopus*)

根霉属用于米酒、黄酒生产。此外,广泛用作淀粉糖化菌、有机酸发酵以及菌体转化等许多方面。