



普通高等教育“十二五”规划教材

微生物发酵工艺学原理

韩德权 王 莘 主 编

赵 辉 孙玉梅 副主编

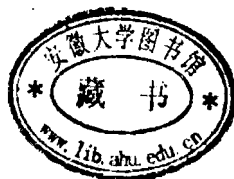



化学工业出版社

普通高等教育“十二五”规划教材

微生物发酵工艺学原理

韩德权 王 莘 主 编
赵 辉 孙玉梅 副主编



 化学工业出版社

· 北京 ·

本书共十章,系统论述了利用微生物发酵的基本工艺学知识,包括微生物发酵代谢控制的基本原理与方法、工业微生物育种与种子制备、工业生产用培养基、发酵工程中的灭菌操作、发酵设备简介、发酵过程优化和工艺控制、通气和搅拌、发酵产物的常用提取分离方法、发酵产品生产简介等。内容紧紧围绕微生物发酵工艺主线,各章既相互联系又有一定的独立性,简洁、实用,克服了以往一些教材大而全、不便于学生自学的弊端。通过本书的学习,可系统掌握微生物发酵生产的基本原理和技术,为从事发酵行业 and 进行发酵新工艺的开发研究打下良好的基础。

本书可作为理工科生物工程、生物技术、食品、生物制药、生物化工及相关专业的教科书,也可供从事生物产业的相关技术人员及相关专业的研究生参考。

图书在版编目 (CIP) 数据

微生物发酵工艺学原理/韩德权,王莘主编. —北京:
化学工业出版社, 2013. 3
普通高等教育“十二五”规划教材
ISBN 978-7-122-16603-6

I. ①微… II. ①韩…②王… III. ①发酵学-微生物学-高等学校-教材 IV. ①TQ920.1

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2013) 第 038987 号

责任编辑: 赵玉清
责任校对: 宋夏

文字编辑: 张春娥
装帧设计: 尹琳琳

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: 大厂聚鑫印刷有限责任公司

787mm×1092mm 1/16 印张 16 字数 416 千字 2013 年 5 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

主 编 韩德权 王 莘

副主编 赵 辉 孙玉梅

编 者 (以姓氏笔画为序)

王 莘 (吉林农业大学)

孙玉梅 (大连工业大学)

李冲伟 (黑龙江大学)

赵 辉 (黑龙江大学)

姜 云 (吉林农业大学)

贾树彪 (黑龙江大学)

董 浩 (吉林农业大学)

韩德权 (黑龙江大学)

前 言

微生物发酵工艺学原理是凝练微生物发酵产品生产过程中的基本原理、基本方法、科学分析和优化生产工艺与实践的综合应用科学，是生物工程的重要组成部分。生物产业是 21 世纪发达国家优先发展的支柱产业。2007 年 4 月 8 日，国家发改委颁布了《生物产业发展“十一五”规划》，首次将生物产业作为国民经济的战略性产业进行了总体部署，对我国生物工程技术的发展起到了积极的推动作用。2012 年国家发改委又推出了《生物产业“十二五”规划》，预计到 2015 年，全国生物产业产值将超过 4 万亿元，2020 年将达到 10 万亿元以上。而生物产业中的生物医药、生物能源、生物环保、生物制造等绝大部分都是以微生物发酵技术为手段。目前，很多微生物发酵技术成果被广泛应用于工农业生产和医药卫生等各个领域。另外，对于一些环境污染的治理和新的活性物质的开发，采用微生物发酵方法是最简捷而有效的方法之一。因此可以说，微生物发酵技术是一门 21 世纪最具发展潜力的理论与应用的学科。

近年来，随着我国生物人才需求的不断扩大，许多高校相继开设了生物工程、生物制药、食品生物技术、生物化工或与之相近的专业。微生物发酵工艺学原理是这些专业的主干课程，食品工程等其他一些专业也都融入了大量的发酵工程技术的内容，甚至一些管理学科也把微生物发酵技术设为选修课。但现有的发酵技术教材还相对较少，有的篇幅较大，缺乏针对性；有的是缺乏新的发酵技术内容和实用性，学生学习掌握起来比较困难。鉴于这种情况，我们组织有关高校从事微生物发酵工艺教学的教师编写了这本《微生物发酵工艺学原理》，使学生能更好地掌握微生物发酵工艺的基本理论和实践应用；克服类似教材的大而全、与其他课程交叉重复太多的弊端，力求简洁明了，便于自学，为生物工程类学生毕业后从事生物制药、食品发酵及相关生物产业工作打下坚实基础。

参加本书编写的教师都有多年从事生产实践和教学科研的经历，有着丰富的理论基础和实践经验。本书内容特别注重理论与实践的结合，并吸纳了现代生物工程的有关理论和应用实例，既可以作为一般理工科院校的教材，也可供从事生物产业的技术人员研发参考。

本书共十章，第一、二章由韩德权编写；第四、八章由王莘、姜云、董浩编写；第三、六章由赵辉编写；第七、九章由孙玉梅编写；第五章由李冲伟、韩德权编写；第十章由贾树彪、韩德权编写。全书由韩德权统稿，由贾树彪教授主审。

本书在编写过程中得到了黑龙江大学、吉林农业大学、大连工业大学等有关单位的领导和部门的大力支持，本教材为黑龙江大学十二五重点支持计划项目，在此一并表示衷心的感谢。

鉴于作者水平有限和时间仓促，书中存在的错误和不当之处，衷心欢迎广大读者给予批评指正。

编者

2012 年 11 月 20 日

目 录

第一章 绪论 1	一、菌种保藏概述 50
第一节 微生物发酵的基本概念 1	二、世界主要菌物菌种保藏机构 50
一、微生物发酵的含义 1	三、工业微生物菌种的保藏方法 51
二、微生物工业发酵的基本过程及产物类型 2	四、菌种退化的防止 53
第二节 微生物发酵技术的发展历史 4	第三节 工业微生物育种 53
一、对发酵本质的认识过程 4	一、诱变育种的筛选方法及策略 53
二、微生物发酵技术发展的不同阶段 5	二、微生物诱变育种 54
第三节 微生物发酵的产品种类 6	三、原生质体融合育种 57
第四节 微生物发酵的特征与发酵方式 9	四、基因工程育种 58
一、微生物发酵的特征 9	第四节 生产用种子制备 59
二、微生物发酵方式 9	一、基本概念 59
第五节 我国微生物发酵工业的现状和今后发展趋向 10	二、菌种扩大培养的目的及作为种子的准则 60
一、我国微生物发酵工业的现状 10	三、种子的制备过程 60
二、我国微生物发酵工业的发展趋势 13	四、种子质量的控制 63
思考题 14	五、种子染菌的原因以及预防 65
第二章 发酵代谢调控的基本原理与方法 15	思考题 67
第一节 概述 15	第四章 工业生产用培养基 68
第二节 微生物细胞的代谢调节机制 16	第一节 概述 68
一、微生物初级代谢产物调节机制 16	一、培养基的组成 68
二、微生物细胞的次级代谢调节机制 21	二、培养基质量的影响因素 70
第三节 微生物发酵代谢控制的基本方法 26	三、常见问题及其处理手段 73
一、遗传学方法 26	第二节 培养基的成分 74
二、生物化学方法 29	一、碳源物质 74
第四节 微生物发酵动力学 31	二、氮源物质 76
一、微生物发酵动力学分类 31	三、生长因子 79
二、发酵方法 32	四、无机盐及微量元素 79
三、分批培养发酵动力学 33	五、前体 81
四、连续培养 40	六、促进剂和抑制剂 82
思考题 44	七、水分 83
第三章 工业微生物的育种与种子制备 45	第三节 培养基的种类与选择 85
第一节 生产用微生物的分离 45	一、培养基的种类 85
一、生物样品的采集 45	二、培养基的设计 89
二、样品中微生物的富集培养 46	三、淀粉水解糖的制备 99
三、分离纯化 47	思考题 100
四、利用菌体性质进行初步筛选 49	第五章 发酵工程中的灭菌操作 101
第二节 工业微生物的保藏 50	第一节 灭菌常见方法 101
	一、化学灭菌 101
	二、射线灭菌 103
	三、干热灭菌 103
	四、湿热灭菌 103

五、过滤除菌	104	三、溶解氧浓度的控制	151
第二节 培养基与发酵设备的灭菌	104	第六节 CO ₂ 对发酵的影响及其控制	152
一、湿热灭菌的基本原理	104	一、CO ₂ 对发酵的影响	152
二、培养基的灭菌	108	二、CO ₂ 浓度的控制	153
三、发酵设备的灭菌	112	三、发酵罐内氧气和二氧化碳分压的 测量	154
第三节 空气的除菌	112	第七节 泡沫对发酵的影响及其控制	154
一、发酵使用的净化空气标准	113	一、泡沫的形成及其对发酵的影响	154
二、空气净化化的方法	113	二、泡沫的消除	155
三、过滤除菌的介质材料	116	第八节 菌体浓度对发酵的影响及其 控制	155
四、空气净化的一般工艺流程	118	一、菌体浓度对发酵的影响	155
五、几种较典型空气净化流程介绍	120	二、菌体浓度的控制	156
六、无菌空气的检查	123	三、菌体浓度的检测	156
思考题	124	第九节 基质浓度对发酵的影响及其 控制	157
第六章 发酵设备简介	125	一、基质浓度对发酵的影响	157
第一节 机械搅拌通风发酵罐的结构	125	二、碳源对发酵的影响及控制	158
一、罐体	125	三、氮源的种类和浓度的影响和控制	159
二、搅拌器和挡板	126	四、磷酸盐浓度的影响和控制	160
三、空气分布器	127	五、补料控制	160
四、消泡装置	128	六、发酵罐基质(葡萄糖等)浓度的 在线测量	161
第二节 机械搅拌通风发酵罐的基本 参数	130	第十节 其他化学因子在线分析技术	162
第三节 其他各种微生物发酵设备	130	一、HPLC 在线测量物质浓度	162
一、塔型发酵罐	130	二、引流分析与控制	163
二、气升式发酵罐	131	第十一节 发酵终点的判断	164
三、自吸式发酵罐	133	一、经济因素	164
四、通风固相发酵设备	135	二、产品质量因素	165
五、厌氧发酵设备	136	三、特殊因素	165
思考题	138	思考题	165
第七章 发酵过程优化和工艺控制	139	第八章 通气和搅拌	166
第一节 概述	139	第一节 概述	166
第二节 发酵参数的测定和生物传感器	141	第二节 发酵工程对氧的要求	167
一、发酵参数的测定	141	一、微生物需氧量与呼吸代谢的关系	167
二、对用于发酵过程检测的传感器 要求	142	二、微生物的临界溶解氧浓度	168
三、生物传感器的类型和结构原理	142	三、比生长速率、比耗氧速率与氧浓度 的关系	169
第三节 温度对发酵的影响及其控制	145	第三节 氧的供给	170
一、温度对发酵的影响	145	一、氧的溶解特性与影响微生物需氧 因素	170
二、影响发酵温度变化的因素	145	二、传氧速率方程	174
三、温度的控制	146	第四节 K _L a 的测定	176
第四节 pH 值对发酵的影响及其控制	147	一、亚硫酸盐氧化法	176
一、pH 值对发酵的影响	147	二、极谱法	178
二、发酵过程 pH 值的变化	147	三、溶氧电极法	178
三、发酵 pH 值的确定和控制	148		
第五节 溶解氧对发酵的影响及其控制	149		
一、溶解氧对发酵的影响	149		
二、发酵过程中溶解氧的变化	150		

第五节 发酵罐及各种因子对 K_{La} 的影响	180	七、其他方法	209
一、搅拌	180	第七节 吸附分离技术	210
二、空气流速	183	一、吸附的类型	210
三、空气分布管形式和发酵罐结构	184	二、常用吸附剂	211
四、氧分压	185	第八节 萃取分离技术	211
五、罐内醪液高度	187	一、溶剂萃取	212
六、罐容	187	二、双水相萃取	213
七、发酵醪液性质	188	三、超临界流体萃取	214
八、温度	189	第九节 结晶分离技术	215
九、有机物质和表面活性剂	190	一、结晶的基本过程	215
十、离子强度	190	二、影响结晶过程的因素	216
十一、氧载体	190	第十节 干燥	216
思考题	191	思考题	222
第九章 发酵产物的常用提取分离方法	192	第十章 发酵产品生产简介	223
第一节 概述	192	第一节 氨基酸发酵	223
一、提取与精制过程的一般工艺流程	192	一、概述	223
二、发酵产物提取精制工艺设计原则	193	二、谷氨酸发酵	224
第二节 发酵液的初步分离	193	三、赖氨酸发酵	226
一、改善发酵液的过滤特性	194	第二节 有机酸发酵	227
二、去除发酵液中的杂蛋白	195	一、概述	227
三、去除发酵液中的高价无机离子	196	二、柠檬酸发酵	228
第三节 沉淀技术	196	三、乳酸发酵	229
一、盐析法	196	第三节 核苷类物质发酵	231
二、有机溶剂沉淀法	198	一、鸟苷和肌苷发酵的机理	232
三、等电点沉淀法	199	二、鸟苷发酵	232
四、选择性变性沉淀	200	三、肌苷发酵	232
五、生成盐类复合物的沉淀	200	第四节 抗生素发酵	233
六、亲和沉淀	201	一、抗生素的分类	233
第四节 过滤与膜分离技术	202	二、青霉素的结构和性质	233
一、一般过滤设备的选择	202	三、青霉素发酵	234
二、膜分离技术	202	第五节 酒精发酵	236
第五节 离心分离技术	204	一、酒精发酵机理	236
一、离心分离因数和沉降速度	204	二、发酵法生产酒精及其工艺流程	237
二、离心机的选择	205	第六节 其他产品发酵	237
第六节 菌体的破碎	206	一、酶制剂	237
一、珠磨法	207	二、甾体激素的微生物转化发酵	239
二、高速匀浆法	207	三、微生物多糖发酵	241
三、超声破碎法	208	四、甘油发酵	242
四、酶溶法	208	五、丙酮-丁醇发酵	243
五、化学渗透法	209	六、维生素发酵	244
六、微波加热法	209	思考题	245
		参考文献	246

第一章 绪 论

利用微生物发酵生产各种适合人类社会需要的物质和产品是生物产业的重要内容之一，现代微生物发酵工艺学的内容随着科学技术的发展而不断地充实和丰富，包括微生物菌种的选育、培养基的优化、发酵条件的控制、产物的提取纯化和精制等。学习微生物发酵工艺学原理，对掌握具体的食品或药物等利用现代发酵技术生产具有重要的现实意义。

第一节 微生物发酵的基本概念

一、微生物发酵的含义

1. 传统意义上的微生物发酵

发酵 (fermentation) 一词最早由拉丁语发泡 boil 而来，表达的是酵母作用于果汁或麦汁而产生的一种现象。即，传统意义上的微生物发酵是用来描述酵母菌作用于果汁或麦芽汁产生气泡的现象，或者是指酒的生产过程。

2. 生化和生理学意义的微生物发酵

随着人们对酵母利用果汁产生酒精现象的不断研究和生物化学的进展，在机理上对微生物发酵有了新的认识，从生化和生理学意义上讲，认为微生物发酵是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，或者更严格地说，发酵是以有机物作为电子受体的氧化还原产能反应。除酵母发酵产生乙醇外，其他很多发酵都有类似的氧化还原过程。

糖的好氧代谢是利用 NAD 或 NADP 的氧化还原，通过细胞色素系统最终将电子传递给氧。而厌氧代谢则是 NADH 或 NADPH 直接与各种代谢中间体形成氧化还原体系。酵母作用于果汁或麦汁时，NADH 和丙酮酸形成氧化还原体系，由丙酮酸生成乙醇的同时，NADH 被氧化成 NAD。由丙酮酸的还原可得到多种最终产物。如图 1-1 所示，为自丙酮酸

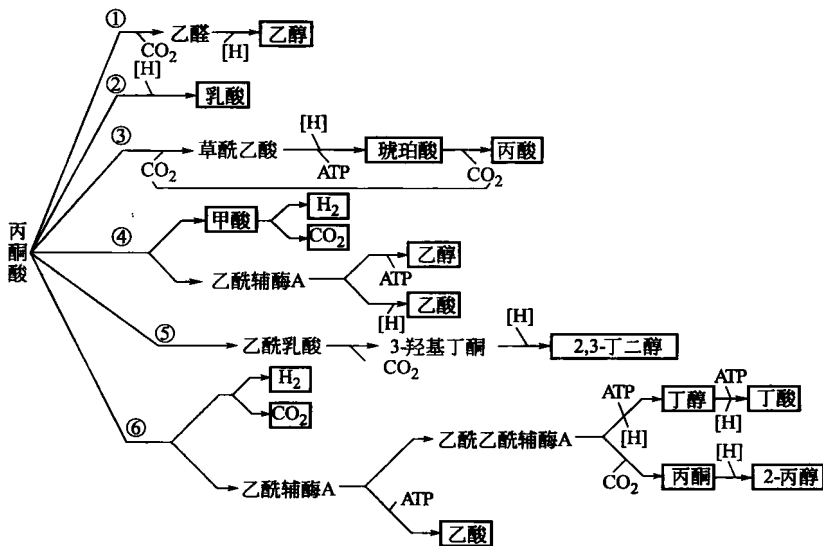


图 1-1 自丙酮酸开始的一些发酵产物 (方框内的是最终发酵产物)

开始的一些发酵产物。不同种类的微生物代谢产物不同，因此，从生物化学角度，更严格地说，发酵是有机化合物成为电子的供体或受体，通过其氧化还原反应而产生生化能量的过程。

3. 工业上的微生物发酵

随着工业微生物应用技术的进步和发展，在工业领域，把所有通过微生物培养而获得目的物的过程也统称为微生物发酵。即工业上的微生物发酵是泛指通过微生物的生长培养和化学变化，大量生产细胞本身和积累专门的代谢产物的反应过程。如青霉素发酵、谷氨酸发酵等即为利用培养相应的微生物来大量生产目的物青霉素和谷氨酸的过程。而利用酵母的作用由果汁或麦汁生产酒精可以说是把微生物生产物工业化的最初的发酵工业。

二、微生物工业发酵的基本过程及产物类型

1. 微生物工业发酵的基本过程

微生物工业发酵的基本过程如图 1-2 所示，主要包括如下内容：

- ① 用作培养菌种及扩大生产的发酵罐的培养基的配制；
- ② 培养基、发酵罐以及辅助设备的消毒灭菌；
- ③ 将已培养好的有活性的纯菌株以一定量转接到发酵罐中；
- ④ 将接种到发酵罐中的菌株控制在最适条件下生长并形成代谢产物；
- ⑤ 将产物抽提并进行精制，以得到合格的产品；
- ⑥ 回收或处理发酵过程中产生的废物和废水。

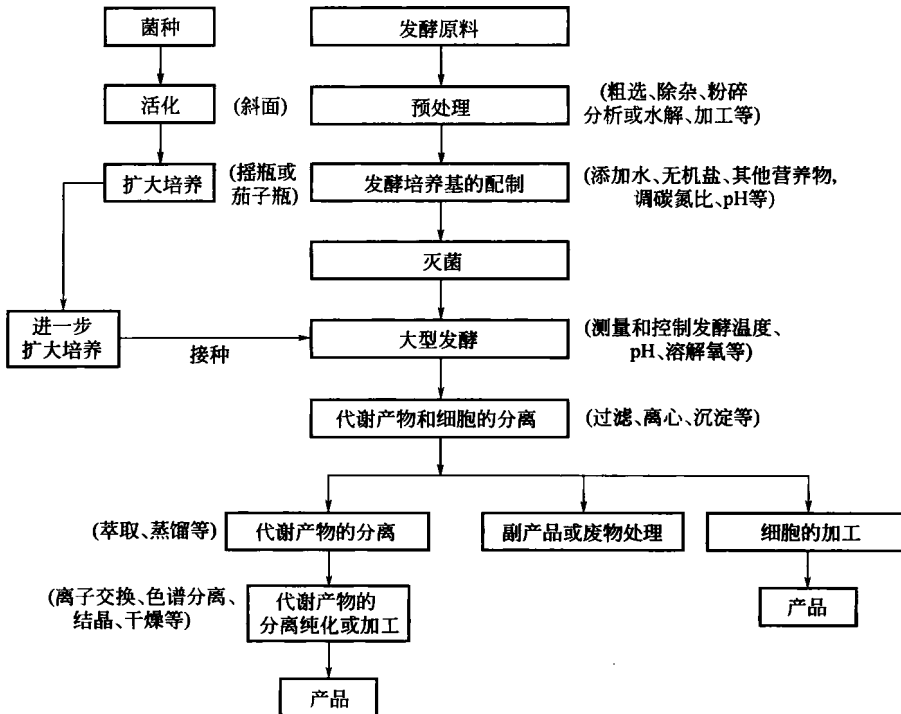


图 1-2 微生物工业发酵生产的基本过程

2. 微生物发酵产物的类型

微生物发酵在工业上可分为菌体作为目的产物、微生物产生的酶作为目的产物、微生物代谢产物作为目的产物和将添加的化学物质通过微生物进行化学改变或修饰后作为目的产物

四个主要类型。

(1) 微生物菌体发酵 目前工业上的菌体生产主要有面包酵母的生产、以食用蛋白为目的的菌体生产 (SCP)、食药用真菌和微生物菌体生物防治剂等。

面包酵母从 20 世纪初开始就能生产了。据资料记载, 在第一次世界大战期间, 德国就对酵母的食用问题进行了开发研究。但直到 20 世纪 60 年代以饲料或食用蛋白为目的的 SCP 才开始大量生产。近年来, 由于 SCP 开发的需要, 世界上的很多公司采用不同的碳源相继开发了大型连续发酵设备, 面包酵母生产蓬勃发展。

食药用真菌生产在我国具有悠久的历史, 如香菇类、木耳类、茯苓、灵芝、依赖虫蛹而生存的冬虫夏草和与天麻共生的密环菌等。这些食药用真菌都可以通过发酵手段进行生产。我国已经分离出虫草头孢菌, 并用于工业化生产冬虫夏草产品。所得菌丝体内含有的氨基酸、微量元素等与天然虫草相同。另外, 我国已利用自吸式发酵罐来培养灵芝, 为药用真菌的发酵生产开辟了新途径。

微生物菌体生物防治剂如苏云金杆菌、蜡状芽孢杆菌和侧孢芽孢杆菌等, 其细胞中的伴孢晶体可毒杀双翅目和鳞翅目害虫。丝状真菌白僵菌和绿僵菌可防治松毛虫等。所以, 有些微生物的剂型产品可制成新型的微生物杀虫剂, 如苏云金杆菌杀虫剂已经普遍用于生产实践, 效果良好。相对于 SCP 而言, 微生物杀虫剂的发酵是新的以菌体为目的物的发酵。

(2) 微生物酶发酵 酶可从植物、动物、微生物等中工业化生产出来。最早人们是从动植物中提取酶, 如从动物胰脏和植物麦芽中提取淀粉酶, 从动物胃膜和植物菠萝中提取蛋白酶等。但从可应用发酵技术进行大规模生产这一点看, 发酵法的微生物酶生产比其他方法更有利。而且与动植物相比, 通过改变微生物的性状而增加产率更容易。微生物酶主要被用在食品工业和医药工业及其与之相关的工业中。酶的生产受到微生物的严格调控。为了提高酶的生产能力, 必须改善这些调控体系。在这些调控体系中, 有酶的诱导和酶的反馈抑制等。通过向培养基中添加诱导因子或使菌种变异而改善调控体系, 可使菌体的产酶能力大幅提高。

目前, 工业上使用的酶大都来自微生物发酵。我国酶制剂以 α -淀粉酶、蛋白酶、糖化酶为主, 多用于食品和轻工业中, 如将微生物生产的淀粉酶和糖化酶用于淀粉的糖化, 以及将氨基酰化酶用于拆分 DL-氨基酸等。在医药生产和医疗检测方面, 酶的应用也很广。如用青霉素酰化酶催化合成 δ -氨基青霉烷酸用于半合成青霉素的中间体, 用胆固醇氧化酶检查血清中胆固醇的含量, 以及用葡萄糖氧化酶检查血中葡萄糖的含量等。

(3) 微生物的代谢产物发酵 微生物的代谢产物分为初级代谢产物和次级代谢产物。在微生物的生长发育过程中, 分为延滞期、对数期、平衡期和死亡期。在对数生长期产生的代谢产物如氨基酸、核酸、蛋白质、脂质、碳水化合物等对菌体的生长繁殖是必需的物质。这些产物称为初级代谢产物; 很多初级代谢产物都具有相当的经济价值, 被工业化大规模生产。由于在野生菌株中初级代谢产物只是菌体生长繁殖所必需的量, 不能产生过多。因此, 工业上为了使产物能更有效地蓄积, 采用诱变等方法使菌株变异来进行改良或调整培养条件等, 在得到更多的产物方面下工夫。

在菌体生长的平衡期, 有时一些菌体能合成在生长期中不能合成的, 与菌的本质代谢不直接相关的物质, 这些物质称为次级代谢产物, 如抗生素、生物碱、细菌毒素、植物生长因子等。形成次级代谢产物的菌体生长时期叫生产期。这样的次级代谢产物在连续发酵时, 要在低稀释率, 即菌的生长非常慢, 甚至几乎可认为在不生长的培养条件下才易生成。另外, 在自然环境下, 微生物生长速度比较低, 由此可以想到, 在自然界中, 微生物在平衡期会产

生比对数期更复杂、种类更多的代谢产物。

(4) 微生物转化发酵 微生物可以通过酶的作用,把某些化合物转化成结构相似但更具经济价值的物质。这种转化一般是通过脱氢、氧化、羟基化、脱水、缩合、脱羧、氨基化、脱氨、异构化等的酶促反应。由微生物进行的这些反应相对于化学合成法而言,优点是不使用特殊的化学药品,不使用容易发生污染的重金属催化剂,且在相对较低的温度下就可进行反应。把酒精转换为醋酸的醋的制造就是利用微生物转换反应的代表。近年来,更高附加值的化学品也通过各种微生物反应生产了出来,如甾醇、抗生素、前列腺素等都可通过微生物化学的转换及修饰法产生。为了提高反应的效率,用这些微生物化学的转换及修饰法时,一般高浓度的菌体是必要的。因此,把菌体或从菌体提取分离到的酶固定在担体上,确保有其高密度的生物酶而进行这样的反应,即固定化细胞或固定化酶,是其很重要的发展方向。

第二节 微生物发酵技术的发展历史

微生物发酵生产具有悠久的历史。早在公元前二三千年甚至六七千年以前,我国人民就已经利用微生物进行曲蘖酿酒,公元前3世纪古巴比伦居民就用谷物酿造啤酒,3000年前,中国已经有用长霉的豆腐治疗皮肤病的记载,这可能是人类最早使用青霉素的实例(但当时不知)。其他应用较早较多的主要是面包、干酪、醋等。但是,作为微生物发酵工业发展起来却仅仅是近百年的时间,经历了对发酵本质的认识和从经验到理论实践的曲折过程。

一、对发酵本质的认识过程

1. 自然发生学说

在古时科学很不发达的情况下,认为生命是自然发生的。古希腊伟大的哲学家亚里士多德在当时就认为鱼、蛙、虫等都是污泥生成的,也就是说是自然发生的,这种自然发生说直到中世纪仍被人们所公认。

对于自然发生说首先提出异议的是意大利物理学家弗朗西斯科·雷迪,并在1688年以简单的生蛆实验加以证明。弗朗西斯科·雷迪用一张网布盖在肉罐的罐口,发现由于苍蝇在网布上产卵,肉块生蛆,这说明生命非自然发生。但其结果未被人们所接受。在1745年,英国牧师尼达姆(Needham)以实验证明了自然发生说,他把肉汁放在敞开的瓶中煮沸,然后放置一段时间,发现肉汤仍会腐败。他认为既然通过煮沸已经杀死了肉汁中的卵,肉汁理应不会腐败,事实上却腐败了,这证明生命是自然发生的。时隔两年后的1747年,史派兰珊尼(Spallanzani)驳斥了尼达姆的实验结果,说尼达姆试验瓶内的肉汁之所以发生腐败,其原因是进入瓶中的空气未过火(杀菌)。1836年,佛兰兹·苏尔茨(Franz Schuze)用试验反驳了自然发生说,支持了史派兰珊尼的观点。他将空气通过硫酸,再通入已经煮沸并冷却的肉汁中,经过很长时间,其肉汁没有出现腐败现象;而空气不通过硫酸直接通入已经煮沸并冷却的肉汁中则发生腐败现象。所以,他认为,空气中存在使肉汁腐败的东西(微生物)。1839年,施旺(Schwann)进一步证明了史派兰珊尼说法的正确性。他将空气预先加热,然后通入煮沸并冷却的肉汁中,经过很长时间,肉汁也不发生腐败,而实验完将盛有煮沸并冷却的肉汁瓶口开放,不久肉汁就出现了腐败。这个实验为现代消毒工作奠定了基础。1853年,施罗德(Schroder)和杜施(Dusch)使用棉花为介质的空气过滤器,做相同的肉汁实验,也得到了与施旺相同的结果。这是现代空气过滤的基础。

上述一系列实验虽然充分反驳了自然发生说，但反对者仍然坚持说空气中含有某种物质，可使无生命的肉汁变成生物，并促进物质的变化。认为空气加热后，某些物质被破坏，这样就不适于生命的自然发生。无论空气经过加热还是用硫酸或棉花过滤，空气中的某些物质都会失去或破坏，因而使肉汁丧失腐败并生成生物的能力。

2. 微生物作用学说与验证

法国微生物学家巴斯德（Pasteur）为了充分研究肉汁腐败现象与空气的关系，经过探索研究，发明了一种特殊的巴氏瓶，这种巴氏瓶是把一般烧瓶的头拉伸成“S”状毛细管，空气可通过其进入瓶内，但由于弯管和重力的作用，空气中的微生物较难进入瓶内。因此，在不对空气进行任何处理的情况下，巴氏瓶内煮沸并冷却的肉汁经过很长时间仍然不腐败。而反对者说肉汁既然经过加热，就不适于生物的发生。巴斯德除去“S”状瓶头，则肉汁很快就腐败了。通过巴斯德的实验，有力地证明了肉汁腐败是微生物作用的结果，且肉汁中的微生物不是自然发生的，而是来源于空气中，使自然发生说被彻底否定。1857年，巴斯德以实验证明，培养基中的微生物必须经加热并有一定的加热时间和温度才能杀灭，并且经过加热灭菌的培养基仍然适用于微生物的繁殖。这不但为发酵的生命本质提供了实验依据，也为培养基灭菌提供了技术和理论支持。巴斯德在当年发现了能进行乳酸发酵的细菌，对醋酸发酵和丁酸发酵进行了研究。他发现在无氧条件下，细菌发酵可以产生丁酸。巴斯德进一步把微生物发酵分为好氧发酵和厌氧发酵两种，并证实了各种发酵如酒精、乳酸等的发酵都是由不同微生物作用的结果，建立了发酵的生命理论。

3. 酶催化学说

巴斯德的发酵生命理论建立后，人们很快又注意到另一个问题，那就是微生物如何作用肉汁导致其腐败？即发酵的本质是什么？1858年，莫里兹·特劳博（Moritz Traube）（1826—1894）设想发酵是由于酵母细胞含有叫做酵素的物质所引起，但无法证明；1894年，埃米尔·费舍尔（Emil Fischer）（1852—1919）在合成碳水化合物时受到启发，提出酵母对糖的分解利用，可用其含有糖的分解酵素解释，遗憾的是也没有得到实验验证。1897年，德国化学家毕希纳（Buchner）（1860—1917）在前人的基础上继续研究。他发现把酵母的细胞壁磨碎，得到的酵母汁液也可使糖发酵。他把酵母汁液中含有的有发酵能力的物质叫酒化酶（酵素，enzyme）。由此得出：酵母可以产生酶，酶即使离开酵母体，仍可发酵。这就是近代酶学的基础。人们从此才真正认识到发酵的本质是微生物生命活动所产生的酶的催化反应。

二、微生物发酵技术发展的不同阶段

1. 天然发酵阶段

从史前至19世纪末，在微生物的性质尚未被人们所认识时，人类已经利用自然接种方法进行发酵制品的生产。主要产品有酒、酒精、醋、啤酒、干酪、酸乳等。当时还谈不上发酵工业，仅仅是家庭或作坊式的手工业生产。多数产品为厌氧发酵，非纯种培养，凭经验传授技术和产品质量不稳定是这个阶段的特点。

2. 纯培养发酵技术阶段

1675年荷兰人列文虎克发明了显微镜，首次观察到大量活着的微生物（当时称微动物）之后，被现代誉为微生物学鼻祖、发酵学之父的巴斯德首次证明酒精发酵是酵母所引起的，认识到发酵现象是由微生物所引起的化学反应。自此，对发酵的生理学意义才有了认识。后来，微生物学发展史上的又一奠基人科赫（Koch）建立了微生物分离纯化和纯培养技术，人类才开始人为地控制微生物的发酵进程，从而使发酵的生产技术得到了巨大的改良，提高

了产品的稳定性。这对发酵工业起到了巨大的推动作用。

由于采用纯种培养与无菌操作技术,包括灭菌和使用密闭式发酵罐,使发酵过程避免了杂菌污染,使生产规模扩大,产品质量得到提高。特别是在第一次世界大战期间,由于战争的需要,使丙酮、丁醇和甘油等工业飞速发展,建立起了真正的发酵工业。

3. 通气搅拌发酵技术阶段

1928年,英国细菌学家弗莱明发现了能够抑制葡萄球菌的点青霉(*Penicillium notatum*),其点青霉的产物被称为青霉素。而当时弗莱明的研究成果并没有引起人们的重视。20世纪40年代初,第二次世界大战中对于抗细菌感染药物的极大需求,使人们重新研究了青霉素。经过多年的研究,在1945年大规模投入生产,使千百万生命免除了死亡的威胁。同时在发酵工业发展史上也开创了崭新的一页。由抗生素发酵开始发展起来的通气搅拌液体发酵技术是现代发酵工业最主要的生产方式,它使需氧菌的发酵生产从此走上了大规模工业化生产途径。与此同时,也有力地促进了菌体转化、微生物酶与氨基酸发酵工业的迅速发展。因而可以说通气搅拌发酵技术的建立是发酵工业发展上的一个转折点。

4. 人工诱变育种与代谢控制发酵技术阶段

随着生物化学、微生物生理学以及遗传学的深入发展,对微生物代谢途径和氨基酸生物合成的研究和了解的加深,人类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。1956年,日本首先成功地利用自然界存在的生理缺陷型菌株进行谷氨酸生产是以代谢调控为基础的新的发酵技术。它是根据氨基酸生物合成途径采用遗传育种方法进行微生物人工诱变。选育出某些营养缺陷株或抗代谢类似物的菌株在营养条件进行控制的情况下发酵生产使之大量积累人们预期的氨基酸。由于氨基酸发酵而开始的代谢控制发酵,使发酵工业进入了一个新阶段。随后,核苷酸、抗生素以及有机酸等也利用代谢调控技术进行发酵生产。

5. 利用基因工程技术进行发酵阶段

自20世纪70年代开始,由于DNA体外重组技术的建立,发酵技术又进入了一个崭新的阶段,这就是以基因工程技术为中心的生物工程时代。

基因工程是采用酶学的方法,将不同来源的DNA进行体外重组,再把重组DNA设法传入受体细胞内,并进行繁殖和遗传下去,这样人们就能够根据自己的意愿将微生物以外的基因构件导入微生物细胞体内,从而达到定向地改变生物性状与功能,创造新的“物种”,使发酵工业能够生产出自然界微生物所不能合成的产物,大大地丰富了发酵工业的范围,使发酵技术发生了革命性的变化。

第三节 微生物发酵的产品种类

人们利用发酵生产各种产品已达数千年。开始仅限于发酵食品与酿酒。随着近代微生物技术与生化技术的发展,微生物发酵技术应用领域逐渐扩大到医药、轻工、农业、化工、能源、环保及冶金等多个行业。特别是随着基因工程和细胞工程等现代生物技术的发展,人们通过细胞水平和分子水平改良或创建微生物新的菌种,使发酵的水平大幅度提高,发酵产品的种类和范围不断增加。目前,发酵产品根据其用途或性质的不同,常见的种类主要可归纳为以下十四类。

1. 微生物发酵食品

微生物发酵食品根据功能的不同,可分为发酵主食品、发酵副食品、发酵调味品和发酵乳制品等。发酵主食品,如面包、馒头、包子、发面饼等;发酵副食品,如火腿、发酵香

肠、豆腐乳、泡菜、咸菜等；发酵调味品，如酱、酱油、豆豉、食醋、酵母自溶物等；发酵乳制品，如马奶酒、干酪、酸奶等。发酵食品是人类较早利用微生物发酵的一个领域。天然食品经微生物（包括细菌、霉菌和酵母）适度发酵后，既有利于贮存，又可产生各种风味物质，使之更加适口。

2. 酒类产品

酒类是以含糖原料（果汁、甘蔗汁、蜂蜜等）和淀粉质原料（米、麦、高粱、玉米、红薯、马铃薯等）发酵而成，是先利用霉菌将淀粉转变为麦芽糖和葡萄糖等，然后再利用酵母进一步将其转化为酒精，同时，由于微生物酶的作用而产生各种风味物质。据估计，目前全世界每年饮料酒产量约在 2 亿吨，其产量之大和分布之广在发酵工业中均占首位。饮料酒分为非蒸馏酒和蒸馏酒两大类，非蒸馏酒包括葡萄酒、啤酒、果酒、黄酒和青酒等，蒸馏酒有白酒、白兰地、威士忌、朗姆酒等。

3. 酶制剂

1898 年，日本人高峰让吉从米曲霉中提取到高峰淀粉酶，这是利用微生物生产酶制剂产品的开端。目前，生物界已发现的酶有数千种，用微生物发酵法生产的酶有上百种。按照酶催化反应的类型，将其分为氧化还原酶、转移酶、水解酶、裂解酶、异构酶和连接酶（合成酶）六大类。而工业化生产的酶制剂，按用途不同分为工业用酶和医药用酶两大类，前者一般不需要纯制品，而后者要求的纯度较高，其价格是前者的数千倍至数百万倍。由微生物生产的工业用酶制剂主要有糖化酶、 α -淀粉酶、异淀粉酶、转化酶、异构酶、乳糖酶、纤维素酶、蛋白酶、果胶酶、脂肪酶、凝乳酶、氨基酰化酶、甘露聚糖酶、过氧化氢酶等，医药用酶主要有蛋白酶、胃蛋白酶、胰蛋白酶、核酸酶、脂肪酶、尿激酶、链激酶、天冬酰胺酶、超氧化物歧化酶、溶菌酶、植酸酶等。

4. 醇及有机溶剂

乙醇的工业化生产始于 19 世纪初，而丙酮、丁醇、异丙醇、甘油等的生产始于 20 世纪初，可用微生物发酵法生产的其他醇类和溶剂还有丁二醇、二羟丙酮、甘露糖醇、阿拉伯糖醇、木糖醇、赤藓糖醇等。目前全世界酒精年总产量约为 250 万吨，其中 60% 以上用于燃料酒精，其余用于饮料工业、化学工业和医药工业等。

5. 有机酸

醋酸和乳酸的生产和利用在人们认识微生物之前就开始了。饮料酒在有氧条件下自然放置可制成醋，牛乳酸败可制成酸奶。有机酸工业是随着近代发酵技术的建立而逐渐形成的。霉菌（特别是曲霉）和细菌都具有生产有机酸的能力，其生产方法可分为两类：一类是以碳水化合物和碳氢化合物为原料的中间代谢产物发酵；另一类是以糖、糖醇、醇、有机酸等为原料的生物转化发酵。目前，采用发酵法生产的有机酸主要有醋酸（乙酸）、丙酸、丙酮酸、乳酸、丁酸、琥珀酸、延胡索酸、苹果酸、酒石酸、衣康酸、 α -酮戊二酸、柠檬酸、异柠檬酸、葡萄糖酸、水杨酸等。

6. 氨基酸

氨基酸是构成蛋白质的基本化合物，也是营养学中极为重要的物质。1957 年日本人木下从自然界中分离得到谷氨酸棒杆菌并成功地用发酵法获得谷氨酸，自此，很多氨基酸被陆续发酵生产。目前全世界氨基酸的总产量约为 10 多万吨，其中产量最大的是谷氨酸（味精），其余的产量较少，主要有赖氨酸、精氨酸、蛋氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、天冬氨酸等。

7. 抗生素

抗生素是由微生物产生的具有生理活性的物质，属次级代谢产物。它不但可以抑制其他

微生物的生长与代谢，有的还可抑制癌细胞的生长，还具有抗血纤维蛋白溶酶（plasmin）作用。自从1928年弗莱明（A. Fleming）发现青霉素以来至今已发现的抗生素有6000余种，其中绝大多数来自于微生物，目前由微生物生产的医用和兽用抗生素已达上千种。此外，某些天然抗生素在长期的使用中，会诱使一些病原菌产生抗药性。为了解除抗药性，同时也为了扩大抗菌谱，采用半合成的方法，将天然抗生素的侧链去掉，再用化学法加上新的侧链。研究最多的是青霉素型（如甲氧苄青霉素、氨苄青霉素、羧苄青霉素等）和头孢菌素型（如头孢Ⅰ号、头孢Ⅱ号、头孢Ⅲ号、头孢Ⅳ号、头孢Ⅴ号、头孢Ⅵ号等）半合成抗生素，其他半合成抗生素有强力霉素、二甲胺四环素、四氢吡咯甲基四环素、乙酰螺旋霉素、丁胺卡那霉素、甲烯土霉素、去甲基金霉素、利福平、氯林肯霉素等。

8. 核酸类物质

核酸的单体是核苷酸，由含氮碱基（嘌呤或嘧啶）、戊糖（核糖或脱氧核糖）与磷酸三部分组成。核苷酸发酵始于20世纪60年代，最早的产品是鲜味剂肌苷酸（IMP）和鸟苷酸（GMP）。后来，相继发现许多核酸类物质如肌苷、腺苷、三磷酸腺苷（ATP）、烟酰胺腺苷二核苷酸（NAI），辅酶Ⅰ、黄素腺嘌呤二核苷酸（FAL）、单磷酸核苷（UMP）等具有特殊的疗效且用途正在日益扩大，从而促进了核酸类的生产。

9. 微生物菌体产品

微生物菌体产品是指发酵的最终产物是微生物本身。目前主要有如下几类：

① 活性乳酸菌制剂 用于改善人体肠道微生物生态区系，也可由各种乳酸菌制成的干剂用做直投型酸奶发酵剂。

② 饲用单细胞蛋白（SCP） 藻类、酵母、细菌、丝状真菌和放线菌等，作为饲料蛋白质，其粗蛋白含量高达40%~80%。

③ 食用和药用酵母 包括作为营养强化剂或添加剂使用的普通食用酵母，用于协助消化的普通药用酵母，以及具有特殊功效或治疗作用的富集酵母，如富锌酵母、富铁酵母、富铬酵母、富硒酵母和富含维生素酵母等。

④ 活性干酵母（ADY） 包括面包活性干酵母和各种酿酒活性干酵母。

⑤ 其他菌体产品 其他菌体产品有食用菌、药用真菌、某些工业用粗酶制剂（胞内酶）和生物防治剂等。

10. 生物农药及生物增产剂

① 生物除草剂 如环己酰胺、谷氨酰胺合成酶等。

② 防治植物病害微生物 如细菌（假单胞菌属、土壤杆菌属等）、放线菌（细黄链霉菌）、真菌（木霉）、各种弱病毒和农用抗生素（如杀稻瘟菌素、春日霉素、庆丰霉素）等。

③ 微生物杀虫剂 包括病毒杀虫剂，如核型多角体病毒、质型多角体病毒、颗粒体病毒、重组杆状病毒；细菌杀虫剂，如苏云金芽孢杆菌、重组苏云金芽孢杆菌；真菌杀虫剂，如虫霉菌杀虫剂、白僵菌杀虫剂；动物杀虫剂，如原生动物微孢子虫杀虫剂、新线虫杀虫剂、索线虫杀虫剂等。

④ 生物增产剂 有固氮菌、钾细菌、磷细菌、抗病害菌制剂等，为农业生产的辅助肥料及抗菌增产剂。

11. 生物能产品

如乙醇可替代石油作为可再生能源，目前世界上60%以上的乙醇用于汽油醇。甲烷是微生物利用有机废弃物厌氧发酵的产物。其他还有微生物产氢、微生物燃料电池、沼气等都是目前开发和生产的生物能源。

12. 转基因产品

可利用基因重组技术将动、植物细胞的基因转入微生物，通过微生物发酵生产动、植物细胞产品。常用的受体菌有大肠杆菌、枯草杆菌、啤酒酵母、毕赤酵母等。产品有胰岛素、生长激素、干扰素、疫苗、血纤维蛋白溶解剂、红细胞生成素、单克隆抗体等。

13. 生理活性物质

生理活性物质是指能促进或抑制某些生化反应，使生物维持其正常的生命活动的一类物质。如前所述的抗生素和某些核酸类物质（AMP、ATP、NAD等）都应归为生理活性物质，除此之外，其他生理活性物质还有维生素、激素、酶抑制剂、杀菌剂、杀虫剂和生物防腐剂等。

14. 其他

其他微生物发酵产品有多糖（如普鲁兰多糖、黄原胶等）、高果糖浆、甜味肽等。

第四节 微生物发酵的特征与发酵方式

一、微生物发酵的特征

微生物发酵和其他化学方法生产的最大区别在于它是生物体所进行的化学反应，其特点表现为以下几点：

（1）发酵所用的原料通常以淀粉、糖蜜或其他农副产品为主，只要加入少量的有机和无机氮源就可进行反应。可以利用废水和废物等作为发酵的原料进行生物资源的改造和更新。

（2）微生物菌种是进行发酵的根本因素，通过变异和菌种选育，可以获得高产的优良菌株并使生产设备得到充分利用，也可以因此而获得按常规方法难以生产的产品。

（3）微生物发酵过程一般来说都是在常温常压下进行的生物化学反应，反应安全，要求条件简单。

（4）微生物发酵对杂菌的污染的防治至关重要。反应必须在无菌条件下进行。

（5）由于微生物菌体本身所具有的反应机制，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、还原等化学转化反应，所以可以产生比较复杂的高分子化合物。

（6）微生物发酵过程是通过菌体的自动调节方式来完成的，反应的专一性强，因而可以得到相对较为单一的代谢产物。

（7）微生物发酵工业与其他工业相比，投资少，见效快，并可以取得较显著的经济效益。

（8）除直接利用微生物外，还可以用人工构建的遗传工程菌进行生产。

二、微生物发酵方式

微生物发酵生产过程中，根据不同的产品和微生物的生理特性及经济性的需要等，可采用不同的发酵方式，主要分为如下几种：

（1）根据微生物需氧或不需氧分为厌氧发酵和好氧发酵。

（2）根据培养基物理性状分为液态发酵和固态发酵。

（3）根据发酵位置是表面或深层分为表面发酵和深层发酵。

（4）根据发酵是间歇或连续进行分为分批发酵（图 1-3）和连续发酵（图 1-4）。

（5）根据菌种是否被固定分为游离发酵和固定化发酵。

（6）根据所用菌种是单一的或多菌种分为单一菌种发酵和混合菌种发酵。