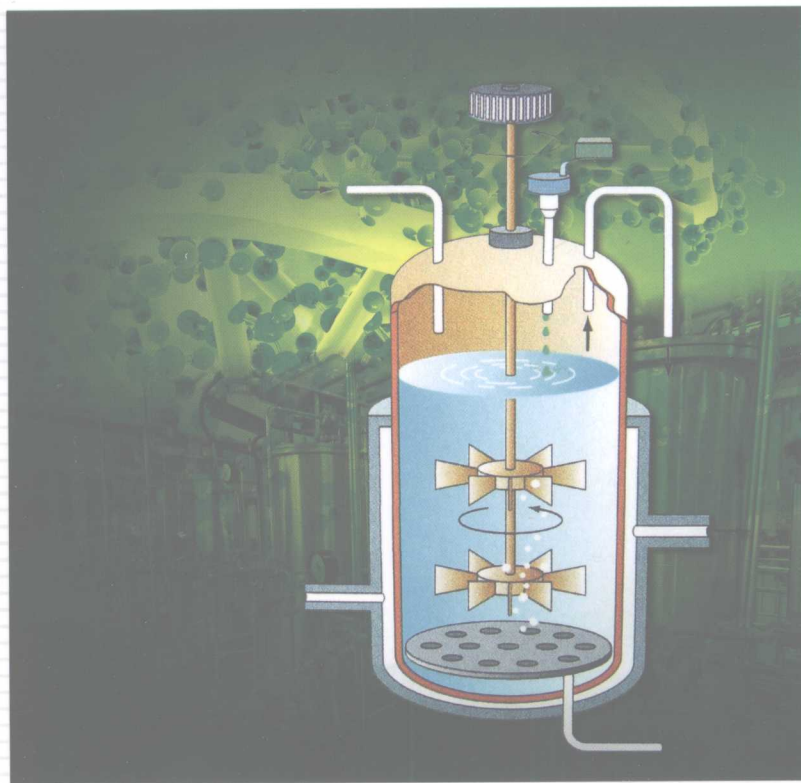


普通高等教育“十一五”规划教材

生物工程 生物技术系列

# 生物工艺学

邱树毅 主编



化学工业出版社

# 生物工艺学

1.1.1 绪论



普通高等教育“十一五”规划教材

# 生物工艺学

邱树毅 主 编

曹文涛 胡鹏刚 吴鑫颖 副主编



化学工业出版社

· 北京 ·

生物工艺学主要研究生物技术产品生产的工艺技术问题。本书以生物技术产品共性工艺技术为主线,探讨生物技术产品生产过程中的工艺技术问题。其内容包括工业微生物菌种选育、制备与保藏,工业培养基及其设计,生物工艺过程中的无菌技术,生物反应动力学,发酵过程原理,生物反应器及生物工艺过程放大,生物反应过程参数检测与控制,生物产品分离及纯化技术,生物产品工艺学及应用。

本书为贵州省“生物工艺学”精品课程配套教材,相关配套课件可以在化学工业出版社教学资源网([www.cipedu.com.cn](http://www.cipedu.com.cn))下载。

本书可作为生物工程、生物技术和生物科学专业的教学参考书,也可供从事生物技术产业的生产、科研、管理人员参考。

### 图书在版编目(CIP)数据

生物工艺学/邱树毅主编. —北京:化学工业出版社, 2009.4

普通高等教育“十一五”规划教材  
ISBN 978-7-122-04839-4

I. 生… II. 邱… III. 生物工程学-高等学校-教材 IV. Q81

中国版本图书馆CIP数据核字(2009)第022427号

---

责任编辑:赵玉清  
责任校对:蒋宇

文字编辑:周侗  
装帧设计:刘丽华

---

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)

印刷:北京永鑫印刷有限责任公司

装订:三河市万龙印装有限公司

787mm×1092mm 1/16 印张14 $\frac{1}{4}$  字数378千字 2009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:28.00元

版权所有 违者必究

# 前 言

生物技术产业是国家优先发展的高新技术产业之一。随着生物技术产业的快速发展，新的生物技术产品不断出现，其产品涵盖医药、食品、化工、轻工、农业、能源、环保等诸多行业和领域，为工农业生产、社会进步带来明显的影响和效益，给人类带来巨大的经济效益和社会效益。生物工艺学是研究生物技术产品生产的工艺技术问题的学科，也得到快速发展，相关的生物工艺学教材也应运而生。本课程为贵州省精品课程，课程建设成果已于2008年被评为贵州省教学成果一等奖，并由贵州省推荐申报国家级教学成果奖。本书是生物工艺学课程建设主要教学成果之一。

本教材在编写过程中，力求把握本学科领域前沿，并结合编者自身的科学研究，特别强调采用现代新技术改造和生产传统生物技术产品。本书以生物技术产品共性工艺技术为主线，探讨生物技术产品生产过程中的工艺技术问题。其内容包括工业微生物菌种选育、制备与保藏，工业培养基及其设计，生物工艺过程中的无菌技术，生物反应动力学，发酵过程原理，生物反应器及生物工艺过程放大，生物反应过程参数检测与控制，生物产品分离及纯化技术，生物产品工艺学及应用。

本书可作为生物工程、生物技术和生物科学专业的教学参考书，也可供医药、食品、化工、轻工、农业、能源、环境等专业的学生参考，同时可供从事生物技术产业的生产、科研、管理人员参考。

参加本书编写的有邱树毅教授、曹文涛副教授、胡鹏刚副教授和吴鑫颖副教授，均是长期从事生物工艺学教学和科研工作的教师，全书最后由邱树毅教授统稿，在本书编写过程中研究生周剑丽、牛晓娟、陈燕、张靖楠等参与了图表的绘制。由于时间紧迫，加之编者水平所限，书中难免有不妥之处，敬请读者批评指正。

编者

2009年1月

# 目 录

|                                       |    |
|---------------------------------------|----|
| <b>1 绪论</b> .....                     | 1  |
| 1.1 生物工艺学及其研究内容 .....                 | 1  |
| 1.1.1 生物工艺学定义 .....                   | 1  |
| 1.1.2 生物技术与相关学科的关系 .....              | 1  |
| 1.1.3 生物工艺学的特点 .....                  | 1  |
| 1.1.4 生物反应的一般过程 .....                 | 2  |
| 1.1.5 生物工艺学的研究内容 .....                | 3  |
| 1.2 生物技术发展简史 .....                    | 4  |
| 1.2.1 传统经验制造技术——天然发酵<br>阶段 .....      | 4  |
| 1.2.2 纯种培养技术的成功——初级代谢<br>产物生产阶段 ..... | 4  |
| 1.2.3 搅拌技术的成熟——好氧培养阶段 .....           | 4  |
| 1.2.4 基因重组技术的成熟——现代生物<br>技术阶段 .....   | 5  |
| 1.3 生物技术应用 .....                      | 5  |
| 1.3.1 农业 .....                        | 5  |
| 1.3.2 食品工业 .....                      | 6  |
| 1.3.3 医药工业 .....                      | 6  |
| 1.3.4 化学冶金工业 .....                    | 6  |
| 1.3.5 能源工业 .....                      | 7  |
| 1.3.6 环境保护 .....                      | 7  |
| <b>2 工业微生物菌种选育、制备与保藏</b> .....        | 8  |
| 2.1 工业生产常用微生物菌种及特性 .....              | 8  |
| 2.1.1 细菌 .....                        | 8  |
| 2.1.2 放线菌 .....                       | 9  |
| 2.1.3 酵母菌 .....                       | 10 |
| 2.1.4 霉菌 .....                        | 11 |
| 2.2 工业微生物菌种选育 .....                   | 13 |
| 2.2.1 自然育种 .....                      | 13 |
| 2.2.2 诱变育种 .....                      | 15 |
| 2.2.3 杂交育种 .....                      | 17 |
| 2.2.4 基因工程育种 .....                    | 20 |
| 2.3 工业微生物菌种制备 .....                   | 23 |
| 2.3.1 优良种子应具备的条件 .....                | 24 |
| 2.3.2 种子制备的过程 .....                   | 24 |
| 2.3.3 种子质量的控制 .....                   | 25 |
| 2.4 工业微生物菌种复壮与保藏 .....                | 29 |
| 2.4.1 工业微生物菌种复壮 .....                 | 29 |
| 2.4.2 工业微生物菌种保藏 .....                 | 30 |
| <b>3 工业培养基及其设计</b> .....              | 32 |
| 3.1 工业培养基的基本要求 .....                  | 32 |
| 3.2 工业培养基的成分及来源 .....                 | 32 |
| 3.2.1 碳源 .....                        | 32 |
| 3.2.2 能源 .....                        | 33 |
| 3.2.3 氮源 .....                        | 33 |
| 3.2.4 无机盐及微量元素 .....                  | 33 |
| 3.2.5 生长调节物质 .....                    | 34 |
| 3.2.6 水 .....                         | 35 |
| 3.3 培养基类型 .....                       | 35 |
| 3.3.1 制备培养基的基本原则 .....                | 35 |
| 3.3.2 培养基的种类及其应用 .....                | 37 |
| 3.4 培养基的设计原理与优化方法 .....               | 40 |
| 3.4.1 培养基的设计原理 .....                  | 40 |
| 3.4.2 培养基的优化方法 .....                  | 42 |
| <b>4 生物工艺过程中的无菌技术</b> .....           | 44 |
| 4.1 生物反应过程中无菌的要求 .....                | 44 |
| 4.2 工业常用无菌技术 .....                    | 44 |
| 4.2.1 干热灭菌 .....                      | 44 |
| 4.2.2 湿热灭菌 .....                      | 44 |
| 4.2.3 射线灭菌 .....                      | 45 |
| 4.2.4 化学药剂灭菌 .....                    | 45 |
| 4.2.5 过滤除菌 .....                      | 45 |
| 4.3 培养基灭菌 .....                       | 45 |
| 4.3.1 湿热灭菌原理 .....                    | 45 |
| 4.3.2 分批灭菌 .....                      | 49 |
| 4.3.3 连续灭菌 .....                      | 52 |
| 4.4 空气除菌 .....                        | 54 |
| 4.4.1 空气除菌方法 .....                    | 54 |
| 4.4.2 空气除菌流程 .....                    | 55 |

|          |                       |     |       |                   |
|----------|-----------------------|-----|-------|-------------------|
| 4.5      | 设备及管道灭菌               | 58  |       |                   |
| <b>5</b> | <b>生物反应动力学</b>        |     |       | 59                |
| 5.1      | 生物反应动力学概述             | 59  | 5.2.2 | 能量平衡              |
| 5.1.1    | 菌体生长速率                | 60  | 5.3   | 微生物发酵动力学          |
| 5.1.2    | 基质消耗速率                | 61  | 5.3.1 | 分批发酵              |
| 5.1.3    | 代谢产物的生成速率             | 62  | 5.3.2 | 连续发酵              |
| 5.2      | 生物反应过程的质量平衡和能量平衡      | 64  | 5.3.3 | 分批补料发酵            |
| 5.2.1    | 质量平衡                  | 64  |       |                   |
| <b>6</b> | <b>发酵过程原理</b>         |     |       | 75                |
| 6.1      | 发酵方式                  | 75  | 6.2.6 | 氧的供给              |
| 6.1.1    | 分批发酵                  | 75  | 6.2.7 | 二氧化碳和呼吸商          |
| 6.1.2    | 连续发酵                  | 77  | 6.2.8 | 基质浓度、补料对发酵的影响     |
| 6.1.3    | 分批补料发酵                | 78  | 6.2.9 | 泡沫的形成及其对发酵的影响     |
| 6.1.4    | 细胞的高密度发酵              | 78  | 6.3   | 杂菌及噬菌体感染          |
| 6.2      | 发酵过程的影响因素             | 80  | 6.3.1 | 杂菌感染对发酵的影响及其防治    |
| 6.2.1    | 种子质量                  | 80  | 6.3.2 | 噬菌体感染对发酵的影响及其防治   |
| 6.2.2    | 培养基                   | 81  | 6.4   | 发酵终点的判断           |
| 6.2.3    | 灭菌情况                  | 82  |       |                   |
| 6.2.4    | 温度                    | 83  |       |                   |
| 6.2.5    | pH                    | 85  |       |                   |
| <b>7</b> | <b>生物反应器及生物工艺过程放大</b> |     |       | 108               |
| 7.1      | 生物反应器                 | 108 | 7.2.2 | 摇瓶试验              |
| 7.1.1    | 生物反应器的分类              | 108 | 7.2.3 | 实验室研究和试验设计方法      |
| 7.1.2    | 深层液态反应器               | 109 | 7.3   | 生物工艺过程放大          |
| 7.1.3    | 固态发酵反应器               | 111 | 7.3.1 | 实验室摇瓶与发酵罐培养的差异    |
| 7.2      | 实验室试验研究               | 112 | 7.3.2 | 发酵罐规模改变的影响        |
| 7.2.1    | 实验室的生物反应器             | 112 | 7.3.3 | 生物工艺过程放大的方法       |
| <b>8</b> | <b>生物反应过程参数检测与控制</b>  |     |       | 120               |
| 8.1      | 生物反应过程参数              | 120 | 8.3.1 | 基本自动控制系统          |
| 8.2      | 生物反应过程参数检测            | 122 | 8.3.2 | 发酵自控系统的硬件结构       |
| 8.2.1    | 直接状态参数检测              | 124 | 8.3.3 | 先进控制理论在发酵过程控制中的应用 |
| 8.2.2    | 间接状态参数检测              | 124 |       |                   |
| 8.3      | 生物反应过程的自动控制           | 126 |       |                   |
| <b>9</b> | <b>生物产品分离及纯化技术</b>    |     |       | 132               |
| 9.1      | 概述                    | 132 | 9.3.2 | 发酵液的离心分离          |
| 9.1.1    | 生物分离过程的特点             | 132 | 9.4   | 微生物细胞的破碎与分离       |
| 9.1.2    | 生物物质分离的一般步骤           | 132 | 9.4.1 | 机械法               |
| 9.2      | 发酵液的预处理               | 133 | 9.4.2 | 非机械法              |
| 9.2.1    | 加热                    | 134 | 9.5   | 生物物质的分离与提取        |
| 9.2.2    | 凝聚和絮凝                 | 134 | 9.5.1 | 沉淀法               |
| 9.2.3    | 调节 pH                 | 135 | 9.5.2 | 吸附法               |
| 9.2.4    | 加入无机盐类                | 135 | 9.5.3 | 离子交换法             |
| 9.2.5    | 加入助滤剂                 | 135 | 9.5.4 | 萃取法               |
| 9.3      | 生物物质固-液分离技术           | 136 | 9.6   | 生物物质纯化与精制技术       |
| 9.3.1    | 发酵液的过滤分离              | 136 | 9.6.1 | 色谱分离              |

|                            |            |                            |     |
|----------------------------|------------|----------------------------|-----|
| 9.6.2 膜分离技术 .....          | 157        | 9.6.4 生物产品的干燥 .....        | 162 |
| 9.6.3 结晶技术 .....           | 160        |                            |     |
| <b>10 生物产品工艺学及应用 .....</b> | <b>165</b> |                            |     |
| 10.1 白酒生产工艺技术 .....        | 165        | 10.4 抗生素生产工艺技术 .....       | 199 |
| 10.1.1 白酒及其分类 .....        | 165        | 10.4.1 概述 .....            | 199 |
| 10.1.2 白酒生产主要原辅料 .....     | 166        | 10.4.2 抗生素生产工艺过程 .....     | 202 |
| 10.1.3 白酒生产中主要微生物 .....    | 167        | 10.5 生物质能源利用 .....         | 207 |
| 10.1.4 白酒生产工艺 .....        | 168        | 10.5.1 概述 .....            | 207 |
| 10.1.5 白酒生产中的新技术 .....     | 182        | 10.5.2 燃料乙醇 .....          | 210 |
| 10.2 啤酒生产工艺技术 .....        | 184        | 10.5.3 生物柴油 .....          | 210 |
| 10.2.1 概述 .....            | 184        | 10.6 废水处理 .....            | 211 |
| 10.2.2 啤酒生产原辅料 .....       | 184        | 10.6.1 概述 .....            | 211 |
| 10.2.3 啤酒生产工艺 .....        | 186        | 10.6.2 活性污泥法 .....         | 212 |
| 10.2.4 啤酒生产中的新技术 .....     | 192        | 10.6.3 好氧生物膜法 .....        | 215 |
| 10.3 有机酸生产工艺技术 .....       | 193        | 10.6.4 厌氧消化——甲烷发酵 .....    | 216 |
| 10.3.1 柠檬酸生产工艺 .....       | 193        | 10.6.5 光合细菌处理高浓度有机废水 ..... | 219 |
| 10.3.2 其他有机酸生产工艺 .....     | 195        |                            |     |
| <b>参考文献 .....</b>          | <b>220</b> |                            |     |



# 1 绪 论

## 1.1 生物工艺学及其研究内容

---

### 1.1.1 生物工艺学定义

生物工艺学，也称生物技术，是指以现代生命科学为基础，结合其他基础学科的科学原理，采用先进的过程技术手段，按照设计改造生物体或生物原料，为人类生产出所需要产品或达到某种目的的技术。

有关生物技术的定义有许多表述，国际经济合作及发展组织所提出的定义是：生物技术是应用自然科学及工程学的原理，依靠生物催化剂的作用将物料进行加工，以提供产品或社会服务的技术。欧洲生物技术联合会认为：生物技术是自然科学（包括分子生物学、生物化学、化学和物理学）和工程科学（化学反应工程学、电子学等）的综合应用，以便将生物体系细胞（微生物细胞和动植物细胞）及其组成物用于为社会提供其所需的商品和服务。国际纯粹与应用化学联合会对生物技术所做的定义是：生物技术是将生物化学、生物学、微生物学和化学工程应用于工业生产过程及环境保护的技术。

虽然对生物技术的定义不完全相同，但归纳起来有 3 个主要特征：是一门多学科，综合性的科学技术；反应过程中需要有生物催化剂（酶、细胞等）的参与；最终目的是建立工业生产过程或进行社会服务。

生物技术包括传统生物技术和现代生物技术。现代生物技术包括基因工程、细胞工程、酶工程、发酵工程。基因工程为核心，带动其他工程的发展，其他工程的发展又促使基因工程发展更迅速。通常将基因工程和细胞工程看作生物工程的上游处理技术，将发酵工程和酶工程看作生物工程的下游处理技术。基因工程、细胞工程和发酵工程中所需要的酶，往往通过酶工程来获得。

### 1.1.2 生物技术与相关学科的关系

生物技术是生物科学与工程有机结合而兴起的一门综合性科学技术。涉及分子生物学、细胞生物学、微生物学、生物化学、遗传学、免疫学、发育生物学、动物生理学、植物生理学、化学、化学工程、机械工程、计算机技术、信息学等。图 1-1 给出生物技术与相关学科的关系。

### 1.1.3 生物工艺学的特点

① 是一门综合性学科。它是生物学（包括生物化学、分子生物学、微生物学等）、化学、工程学（包括化学工程，机械工程等）等多学科的交叉与综合。

② 采用生物催化剂。生物催化剂是游离或固定化细胞或酶的总称，它们在生化反应过程中起核心作用，与化学催化剂相比，具有反应速率快、催化选择性高、反应条件温和的优

点，也具有易失活、稳定性差的不足。

③ 采用可再生资源为主要原料，因而原料来源丰富，价格低廉，过程中所产生废物的危害性小，但由于原料成分难以控制，会给产品质量带来一定的影响。

④ 与一般化工产品生产相比，其生产设备比较简单，能耗较低。但某些生化反应由于其特殊性质而使反应基质和产物的浓度均不能太高，因而反应器生产效率较低。反应液中初产物浓度低，对产物分离提纯困难。

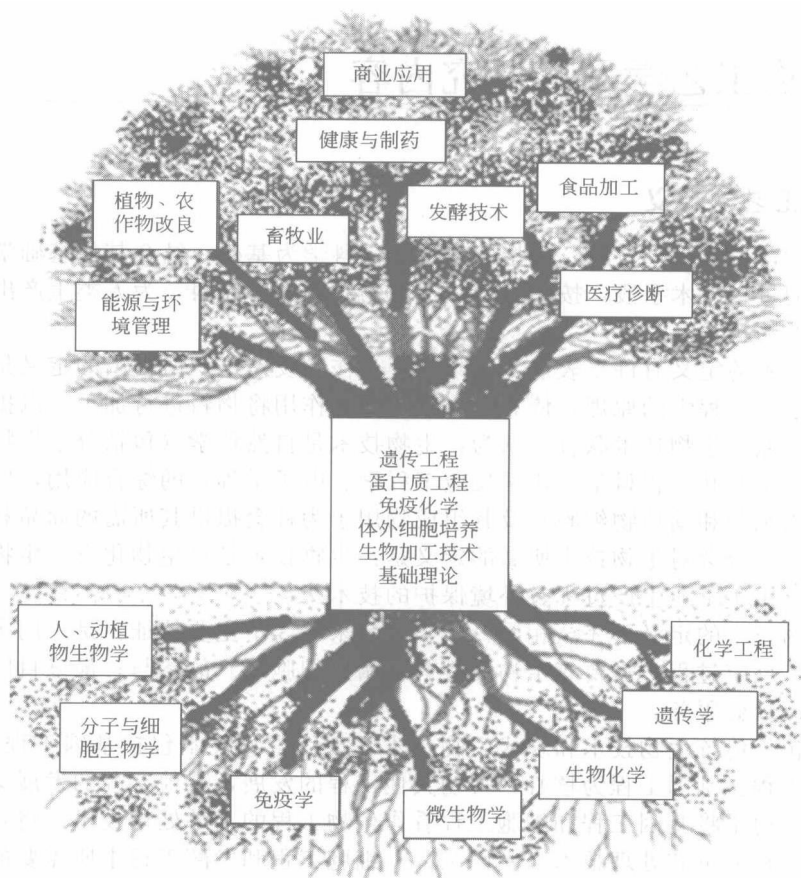


图 1-1 生物技术与相关学科的关系

#### 1.1.4 生物反应的一般过程

将生物技术的实验室成果经工艺及工程开发为可供工业生产的工艺过程，常称为生化反应过程，也称为生物反应过程。其实质是利用生物催化剂进行生物技术产品的生产过程。一般的生物反应过程可用图 1-2 所示的流程图表示。从该图可见，生物反应过程应由 4 个部分组成。

① 原料的预处理 包括原料的选择，必要的物理与化学方法加工，培养基的配制和灭菌等。

② 生物催化剂的制备 包括菌种的选择、接种和扩大培养，酶催化反应中酶的纯化、酶的固定化等。

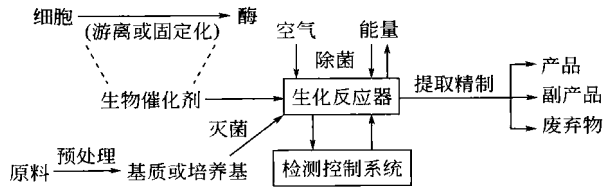


图 1-2 一般生物反应过程

③ 生化反应器及反应条件的选择与控制 生化反应器是进行生化反应的核心设备，它为细胞或酶提供适宜的反应环境，以达到细胞生长和进行反应的目的。反应器的结构、操作方式和操作条件对反应原料的转化率、生产的产品类型和产品的质量有着密切的关系。同时反应参数的检测与控制对生化反应过程的顺利进行也起着十分重要的作用。

④ 产物的分离纯化 其目的是用适当的方法和手段将含量甚少的目的产物从反应液中提取出来并加以精制以达到规定的质量要求。

整个生物反应过程以生化反应器为核心，而分别把反应前后称为上游加工和下游加工。

随着生物技术的发展，生物反应过程的种类和规模都在不断地扩大。目前已进行工业生产的主要有酶催化反应工程、细胞反应工程以及废水的生物处理过程。

酶催化反应过程是采用游离酶或固定化酶为催化剂时的反应过程。生物体中所进行的反应，几乎都是在酶的催化下进行的。工业生产中所用的酶，或是经提取分离得到的游离酶，或是固定于各种载体上的固定化酶。

细胞反应过程是采用活细胞为催化剂时的反应过程。这既包括一般的微生物发酵反应过程，也包括固定化细胞反应过程和动植物细胞培养过程。

废水的生物处理过程是利用微生物本身的分解能力和净化能力，除去废水中污浊物质的过程。废水生物处理过程与微生物细胞反应过程虽然都是利用微生物的反应过程，但与后者相比，废水的生物处理过程具有以下特点：是由细菌等菌类、原生动物、微小后生动物等各种微生物构成的混合培养系统；几乎全部采用连续操作；微生物所处的环境条件波动大；反应的目的是消除有害物质而不是生成代谢产物和微生物细胞本身。

工业上根据微生物是单一菌种或混合菌种，把生物反应过程分为两类。一类是采用单一纯种生产工艺生产的产品，包括酶制剂、抗生素、氨基酸、核苷酸、乙醇、有机酸生产等；另一类是采用混合菌种生产工艺生产的产品，包括发酵食品（乳酸、酱及酱油、白酒、发酵蔬菜等）、甲烷（或沼气）生产、废水处理等。

根据生产工艺的不同，可将生物反应过程分为如下类型。

① 以直接生成生物量为最终目标产品。如生产用于食品、医药的酵母及用于饲料的单细胞蛋白。

② 利用微生物从简单营养物质合成有用产品，包括初级代谢产物和次级代谢产物。如抗生素、酶制剂、氨基酸、核苷酸、有机酸、乙醇等产品。

③ 利用微生物从一些特异性前体物转化有用的目标产品。如甾体化合物、激素类产品。

④ 利用酶制剂或非生长细胞催化合成有用的目标产品。如用青霉素酰化酶生产 6-氨基青霉素烷酸，用葡萄糖异构酶生产果葡糖浆及高果糖浆。

⑤ 利用微生物生产能源或转化有害、有毒物质。如生活及工业污水的生物处理，甲烷、乙醇生产等。

### 1.1.5 生物工艺学的研究内容

生物工艺学主要研究生物反应过程中具有普遍意义的工艺技术问题。以探讨生物产品生

产过程中的共性为目的,从工艺角度阐明细胞生长和代谢产物与细胞的培养条件之间的相互关系,为生产过程的优化提供理论依据。其内容包括工业微生物菌种的选育、制备与保藏,工业培养基的制备及其设计,生物工艺过程中的无菌技术,生物反应动力学,发酵过程原理,生物反应器及生物工艺过程放大,生物工艺过程中的参数检测与控制,生物产品分离纯化技术,生物产品的工艺学等。

## 1.2 生物技术发展简史

### 1.2.1 传统经验制造技术——天然发酵阶段

虽说数千年前,人们已经开始利用微生物,但对微生物的存在却一无所知,只是凭着经验和经历在应用微生物,并积累了许多经验,同时也有许多发明和创造。酿制醋是人类最早掌握的发酵技术之一,此处还有酱油、酱、泡菜、奶、干酪、啤酒发酵、面包发酵、堆肥等技术。这个阶段的特点是:靠自然发酵,只知其然不知其所以然;历史悠久,可追溯到五六千年前的“仰韶文化时期”;工艺独特,以中国白酒为例,它是以前以谷物淀粉为原料,先经曲(微生物淀粉酶)水解得糖液后,再由酵母发酵成各类风味特殊的白酒,这种工艺流程是先后利用不同功能的微生物所进行的酿造过程,对于现代发酵工业的混合发酵和序列发酵均有借鉴性;经验丰富,十分强调对原料筛选、配比以及管理等,有一套严格规定。

### 1.2.2 纯种培养技术的成功——初级代谢产物生产阶段

这一阶段以了解微生物在发酵过程中的作用为标志。发酵过程处于非无菌操作状态,过程较为简单,对生产设备要求不高,规模一般不大,这一时期的产品属于初级代谢产物。

1676年,荷兰人列文虎克发明了显微镜,首次观察到微生物的存在。直到1857年,法国著名科学家巴斯德才首次证明酒精发酵是由酵母引起的,而酵母是活的细胞;另外他还指出,某些疾病是由微生物引起的。这些发现不仅在医学史上是一个转折点,而且也创立了微生物学。在巴斯德之后,德国人柯赫首先应用固体培养基分离微生物。1897年德国人布赫纳进一步发现了磨碎了的酵母仍能使糖生成酒精,并将此具有发酵能力的物质称为酶,进一步认清了发酵的本质。

由于上述科学成果的取得,从19世纪末到20世纪30年代,不少发酵工业产品陆续出现,开创了工业微生物的新世纪。这个时期出现的发酵产品有乙醇、醋酸、丙酮、丁醇、食用酵母、乳酸、柠檬酸等发酵产品。上述产品的特点是:大多数为厌氧发酵过程的产物;产物的化学结构简单,属于初级代谢产物;其生产通常是在敞开环境中经发酵而进行,控制杂菌污染是通过细心的操作而实现的;生产过程简单,生产设备相对要求不高,规模一般不大。

### 1.2.3 搅拌技术的成熟——好氧培养阶段

这一阶段的主要标志是抗生素工业的通风机械搅拌罐的应用。其发酵过程发生了重大改变,即形成了无菌状态,规模扩大,对生产设备的要求更高,过程日趋复杂,控制日显重要。

1928年英国人弗来明发现了青霉素,二战期间英美科学家开始对青霉素进行深入研究,并在美国Merck、Pfizer等制药公司及美国政府有关部门实验室的协助和支持下开始青霉素的全套工业化生产研究。1943年,采用通入无菌空气、液体深层培养发酵的方法生产青霉

素成功，使工业微生物发酵进入一个新的发展阶段，诞生了一门新兴学科——生化工程。至此，发酵工程在微生物学、生物化学和化学工程这三大学科基础上迅速形成一个完整的体系，促进了抗生素工业、酶制剂工业、有机酸工业和氨基酸工业的大力发展。

这一时期生物技术的特点是：产品类型多，不但有初级代谢产物，也出现了次级代谢产物，还有生物转化及酶反应等产品；技术要求高，主要是发酵过程在纯种和无菌条件下进行，大多属于好氧发酵，在发酵过程中通入无菌空气，作为药品和食品的发酵产品，质量要求更严格；规模巨大，从发酵罐看，通风机械搅拌罐容积可达 $500\text{m}^3$ ，生产单细胞蛋白的气升式发酵罐的容积已超过 $200\text{m}^3$ ；技术发展速度快，一方面，作为发酵工业提高产量和质量的关键——菌种，其性能获得了惊人的提高，另一方面，在产品品种的更新、新技术及新设备的应用等方面均达到前所未有的程度。可以说，这一阶段是常规发酵工业的全盛时期。

#### 1.2.4 基因重组技术的成熟——现代生物技术阶段

这一阶段的主要标志是遗传物质 DNA。Watson 和 Crick 提出的 DNA 双螺旋结构模型，开辟了分子生物学时代，为 DNA 重组技术奠定了基础。1953 年，Watson 和 Crick 发现了 DNA 双螺旋结构；1957 年 Crick 又提出了遗传信息传递的“中心法则”；1964 年 Marshall Nirenberg 和 Gobind Khorana 等破译了 64 个遗传密码；1973 年，Boyer 和 Cohen 实现了基因转移，为基因工程开启了通向现实的大门，从而使人们有可能在实验室中按人类的意志设计和重组新的生命体。

基因工程是按人的意志把外源（目标）基因（特定的 DNA 片段）在体外与载体 DNA（质粒、噬菌体等）嵌合后导入宿主细胞，使之形成能复制和表达外源基因的克隆（即无性繁殖或重组体），再通过重组体的培养而获得新需要的目标产品。

基因工程技术的出现为人们提供了一种全新的技术手段，使人们可以按照意愿切割 DNA，分离基因并重组后，导入其他生物活细胞，以改造农作物或畜牧品种；也可以导入细菌以产生大量的有用蛋白质或药物、疫苗；也可以导入人体内进行基因治疗。这是一项技术上的革命，带动了发酵工程、酶工程、细胞工程和蛋白质工程的发展，形成了具有划时代意义的现代生物技术。

## 1.3 生物技术应用

### 1.3.1 农业

农业与粮食生产是一个国家经济健康发展的基础，现代生物技术正被越来越多地应用于农业。基因工程正在引发农业革命，不断增加农作物的品种。通过转基因技术已培养出具有抗旱、抗除草剂、抗病毒、抗盐碱、抗病虫害等逆境特性及品质优良的作物新品系。涉及的作物种类包括马铃薯、油菜、烟草、玉米、水稻、番茄、甜菜、棉花、大豆等。

利用细胞工程技术对植物优良品种进行大量的快速无性繁殖的微繁殖技术已广泛地应用于花卉、果树、蔬菜、药用植物和农作物中，实现了商品化生产。植物细胞培养可用于生产具有商业价值的次生代谢产物。

化学肥料和化学农药促进了农业生产水平的大幅度提高，但也带来诸如环境污染、食品安全等问题。利用生物技术生产生物肥料、生物农药正引起生物技术专家越来越大的兴趣。

动物生物技术的发展促进了畜牧业的发展。利用转基因技术可以提高包括鱼在内的农畜肉的产量和品质，提高奶产量和质量，增加动物的抗病性。科学家们已经成功培育出转基因

羊、转基因兔、转基因猪、转基因鱼等多种动物新品种。此外，还可以低成本地生产出贵重药物或其他生物制品。生物技术还可用于农业快速分析和动物免疫疾病的快速诊断。

### 1.3.2 食品工业

食品生产遍及世界各地。在食品生产和加工中，生物技术有着悠久的历史，现代生物技术为快速提升食品的数量和品质提供了可能。发酵食品和饮料来自微生物或酶对农产品的转化作用。通过发酵过程，产品营养更高，消化更易，味道更好，产品更安全。在传统发酵食品领域，现代生物技术也得到了越来越多的开发和应用。例如，利用现代生物技术进行啤酒、葡萄酒等发酵食品的菌种选育和性能提高等；酸奶、奶酪等发酵乳制品及功能菌的利用与现代生物技术密切相关；蔬菜、豆类发酵食品及调味品是生物技术应用于食品的明显例子；利用生物技术生产甜味剂、生物色素、增稠剂、多糖、多肽等产品也已经进入市场；有机酸、氨基酸、维生素也用生物技术进行生产。

食品生物技术的另一应用是酶技术应用于食品加工。食品加工用酶已广泛应用于酿造、奶制品、焙烤、水果和蔬菜加工、淀粉糖生产等食品行业。此外，应用抗体检测系统以及DNA和RNA探针技术、免疫测定技术等生物技术方法，可以快速、准确地进行食品有害物的分析、检测，有利于食品安全。

### 1.3.3 医药工业

医药生物技术是生物技术领域中最活跃、产业发展最迅速、效益最显著的领域，其应用涉及新药开发、新诊断技术、预防措施及新的治疗技术。

传统药物主要有化学合成药物、动植物中提取的生化药物和天然药物、微生物发酵药物。化学合成药物的生产往往工艺复杂、条件苛刻，污染严重，药物毒副作用大；而动植物药物生产受资源限制，价格较昂贵。所以，利用生物技术方法生产药物具有相当的优势。

抗生素是人们最为熟悉的微生物发酵药物，主要用于治疗和预防传染性疾病。目前已分离出4000多种抗生素，但只有50余种被广泛应用。大多数抗生素由放线菌和霉菌生产，生物技术通过筛选新的抗生素、改良菌种特性、增大发酵得率、改进工艺、提高产品纯度等措施，在药物生产中达到新的目标。

利用生物技术生产单克隆抗体是医药生物技术的一个显著进展。单克隆抗体可用于医疗诊断、治疗肿瘤等，目前在这方面的商业价值超过100亿美元。利用生物技术生产重组疫苗可以达到安全、高效的目的，病毒性肝炎疫苗、肠道传染性疫苗、寄生虫疫苗、流行性出血热疫苗等已经上市或已进入临床试验。

利用基因工程可以生产贵重的新型生物药物。胰岛素、人类生长激素、干扰素、生长激素抑制素、促红细胞生成素、白细胞介素等生物药物已经投放市场。已有60多种重组蛋白质应用于治疗，另有200多种正在进一步研发，基因工程药物的产业前景十分光明。基因治疗、人类基因组计划等的实现，使人们能够深入认识许多困扰人类的重大疾病的发病机制。

利用生物转化合手性药物是近年来取得的重大进展，随着手性药物需求量的增大，人们在这一领域的研究也越来越多。

### 1.3.4 化学冶金工业

利用生物技术可生产许多重要的化学工业品。特别是可以生产出一些用化学方法难以生产或价值高的产品，进而可能改变化学工业的面貌。例如，用微生物技术生产乙醇、丙酮、甘油、可降解高分子材料聚乳酸、制造工程塑料、树脂、尼龙的重要原料长链二羧酸等。显然，越来越多的工业化学品可以用生物技术方法获得。化工行业的废弃物综合利用、清洁生

产等也需要生物技术。

地球上的矿物资源属不可再生资源，随着现代工业的发展，富矿、高品位矿不断减少，贫矿、次矿、矿渣、废矿等低品位的矿资源采用常规采矿技术已经难以提炼。细菌冶金将继续为现代工业提供一种更高效廉价的方法，以提炼越来越多的低品位矿中的金属。采用细菌冶金，可提炼包括金、银、铜、铀、锰、钼、锌、钴、钡等稀有金属，特别是黄金、铜、铀等的开采。

### 1.3.5 能源工业

能源紧张是当今世界各国面临的一大难题。石油等化石能源日益枯竭，寻找新的替代能源、可再生能源将是人类面临的一个重大课题。生物质能源是最有希望的新能源之一。能源生物技术是指用生物技术生产的生物能源如燃料乙醇、生物柴油等，以及能源开采、加工生产过程中使用的生物技术如微生物采油技术等。

用糖、淀粉及纤维素等可再生材料为原料生产燃料乙醇的工艺和技术是成熟和可行的。用微生物发酵法生产的乙醇作为燃料已经在巴西、美国和中国等国家投入应用。利用动植物油脂与低碳醇酯化反应得到的脂肪酸酯通常称为生物柴油，它可完全替代石化柴油作为燃料。生物柴油是清洁的可再生能源，与普通化石柴油比较更加环境友好，且对发动机有好处。目前欧洲、美国等国家正在大力发展生物柴油。利用各种有机废弃物如秸秆、鸡粪、猪粪等通过微生物发酵生产沼气是废物利用的重要手段之一。利用沼气能源已经在中国等许多国家取得显著成绩。

生物技术还可用来提高石油的开采率。目前石油的一次开采，仅能开采储量的30%。二次采油需加压，注水，也只能获得储量的20%。深层石油由于吸附在岩石空隙间，难以开采。使用黄原胶类聚合物，注入油井，挤出石油，利用微生物进行原位驱油，利用微生物分解蜡质降低石油黏度，增加流动性等生物技术方法可促进石油开采。

### 1.3.6 环境保护

人类活动及工业生产给环境带来废弃物，废弃物包括废水、废气和固体废弃物，以及有毒的化学品等。这些废弃物导致环境污染。一些工业产品利用生物技术方法来生产，不仅节约能源，还可以避免环境污染。通过微生物的处理，可以净化有毒化合物，降解石油污染，清除有毒气体和恶臭物质，综合利用废水、废渣，处理有毒金属等，达到净化环境、保护环境、废物利用并获得新产品的目的。利用生物技术，还可以对土壤污染等进行生物修复，对环境中的污染物进行检测和监测。

## 2 工业微生物菌种选育、制备与保藏

### 2.1 工业生产常用微生物菌种及特性

---

微生物在工业上的用途广泛，包括化工、医药、食品、石油勘探等方面。有的是直接利用微生物的菌体细胞，制备化工、食品和医药物质、科研试剂等，以及蛋白质、脂肪和糖类；有的是利用它的代谢产物，如酒精、甘油、味精、柠檬酸、氨基酸及抗生素等；还有的是利用它的酶制剂，用于加工某些产品。

目前，人们对微生物特性的认识还不是十分充分，微生物的代谢产物据统计已超过1300多种，而大规模工业生产的总计不超过100多种；微生物酶有上千种，而已在工业上利用的不过四五十种。可见微生物资源不仅十分丰富，而且可挖掘的潜力很大。现将发酵工业中常用的微生物菌种简单介绍如下。

#### 2.1.1 细菌

细菌属于真细菌纲 (Schizomycetes)，是单细胞，横分裂或二分裂繁殖。按形状分为球菌、杆菌、螺旋菌等。好氧的芽孢杆菌和厌氧的梭状芽孢杆菌形成的芽孢成休眠状态，与营养细胞相比，芽孢含水量少，代谢活动极低，具有密致的不易渗透的芽孢壁，所以芽孢对化学药品、干燥和高温等具有高度的抵抗力，给发酵工业原料和设备的灭菌、食品的防腐和灭菌等造成困难。

细菌还可以由革兰染色法区分为革兰阳性菌和革兰阴性菌两大类，这一性质和抗生素的疗效有密切关系。多数细菌有运动性，运动器官为鞭毛，鞭毛可单生、丛生或周生，鞭毛的着生状态决定其运动的特点，鞭毛的有无、数量、位置是分类上的重要依据。有些细菌在一定条件下，在其细胞壁外面分泌一层疏松透明的黏性物质，称为荚膜。荚膜可起保护细菌不易受侵蚀、贮藏水分、堆积废物及抵抗干燥的作用。目前广泛采用的细菌分类方法是《伯杰氏系统细菌学手册》。工业中常用的细菌如下。

##### 2.1.1.1 醋酸菌

这类菌在分类上属于不生芽孢、革兰阴性和好氧性，分两个菌群。一个菌群只将乙醇氧化生成醋酸，醋酸是最终产品，同时它能将葡萄糖氧化生成葡萄糖酸，一般称这类菌为醋单胞菌 (*Acetomonas*) 或葡萄糖杆菌 (*Gluconobacter*)。另一群醋酸菌不仅能将乙醇氧化为醋酸，而且能将产生的醋酸进一步氧化生成二氧化碳和水，这一类菌就叫醋酸杆菌。液化颗粒杆菌 (*Gluconobacter liquefaciens*) 由葡萄糖生成 2,5-二酮葡萄糖酸，弱氧化醋酸杆菌 (*A. suboxydans*) 由葡萄糖及各种糖醇生成对应的各种化合物。其中有用的是由 D-山梨醇生成 L-山梨糖，由 D-甘露醇生成 D-果糖，由甘油产生二羟丙酮的反应。

##### 2.1.1.2 假单胞菌

假单胞菌能发酵产生维生素 B<sub>12</sub>、丙氨酸、葡萄糖酸、色素、 $\alpha$ -酮基葡萄糖酸、果胶酶、一些抗生素及其他产品，也能进行类固醇（甾体）的转化，有些菌株可利用烃类生产单细胞



蛋白 (SCP)。

### 2.1.1.3 乳酸菌

乳酸菌是促使糖类生成乳酸的一类细菌。以链球菌 (*Streptococcus*)、四联球菌 (*Pediococcus*)、明串珠菌 (*Leuconostoc*)、乳杆菌 (*Lactobacillus*) 等属为重要, 都是革兰阳性、不运动及通性厌氧。分两个亚族: 链球菌亚属和乳杆菌亚属。

链球菌亚属 (*Streptococceae*), 其中有些菌种发酵结果只产生乳酸, 称为同型发酵; 另一些菌种除生成乳酸外还生成醋酸、乙醇及二氧化碳, 称为异型发酵。明串珠菌属 (*Leuconostoc*) 不仅能进行异型发酵, 还能生成黏性物质——多糖。此菌是制糖工业的一种有害菌, 常使糖汁黏稠而无法加工, 但它却是制药工业生产右旋糖酐、多糖和人造血浆的重要菌。

乳杆菌亚属 (*Lactobacilleae*), 其中的德氏乳杆菌 (*L. pastorianus*) 等菌株广泛用于乳制品工业和乳酸生产。

### 2.1.1.4 大肠杆菌

大肠杆菌以大肠埃希菌 (*Escherichia coli*)、产气气杆菌 (*Aerobacteraerogenes*) 等为代表。这类细菌的存在表明有动物排泄物污染的可能, 是食品卫生和公共卫生的重要指标。工业上利用大肠杆菌的谷氨酸脱羧酶, 可进行谷氨酸定量分析, 还可利用大肠杆菌制取天冬氨酸、苏氨酸和缬氨酸等。医药方面用大肠杆菌制造治疗白血症的天冬酰胺酶。大肠杆菌经常用作分子生物学的研究材料, 同时和病原菌有很密切的关系。

### 2.1.1.5 芽孢杆菌

芽孢杆菌是高产淀粉酶和蛋白酶的产生菌, 如枯草芽孢杆菌 BF 7658 是生产淀粉酶的主要菌种, 枯草芽孢杆菌 AS 1.398 是生产中性蛋白酶和制造日本独特风味食品纳豆的主要菌种。它们还可用来生产多肽类抗生素、氨基酸、维生素 B<sub>12</sub> 及 2,3-丁二醇、果胶酶等。

### 2.1.1.6 梭状芽孢杆菌

梭状芽孢杆菌是土壤中生芽孢的厌氧杆菌, 用来由淀粉或糖发酵生产丁二醇、丙酮、丁醇、乙醇、某些有机酸及核黄素等。人们还利用耐热梭状芽孢杆菌和热解糖梭菌从纤维素和半纤维素生产酒精。

### 2.1.1.7 谷氨酸棒杆菌

谷氨酸棒杆菌以葡萄糖为原料发酵生产氨基酸, 是谷氨酸和其他氨基酸的高产菌。如北京棒杆菌 AS 1.299 和钝齿棒杆菌 AS 1.542 等。

### 2.1.1.8 产氨短杆菌

它是氨基酸、核苷酸工业生产中常用的菌种, 也是酶法合成生产辅酶 A 的菌种。

### 2.1.1.9 甲烷产生菌

主要是甲烷杆菌 (*Methanobacterium*)、甲烷八叠球菌 (*Methanosarcina*)、甲烷球菌 (*Methanococcus*), 这些甲烷菌在有机废料甲烷发酵中起重要作用。

### 2.1.1.10 其他细菌

运动单胞菌被用来进行酒精发酵; 黄单胞杆菌可发酵生产维生素 B<sub>12</sub>; 微球菌能将碳水化合物转化成各种酸类; 甲烷同化菌可以用甲烷或甲醇作为碳源生产菌体蛋白。有些细菌在经过遗传工程技术处理后会产生干扰素、生长激素、疫苗、胰岛素等贵重药物, 对这些菌正在广泛深入的研究, 它们具有巨大的生产应用潜力。

## 2.1.2 放线菌

放线菌因菌落呈放射状而得名, 它具有生长良好的菌丝体, 分为基内菌丝和气生菌丝两种。基内菌丝紧贴培养基表面, 形成菌落, 并分泌黄、橙、红、蓝、绿、灰、褐等水溶性或