

327

7A460
R26

生物化工产品生产工艺 技术及应用

任凌波 章思规 任晓蕾 主编

化学工业出版社
· 北 京 ·

(京)新登字 039 号

图书在版编目(CIP)数据

生物化工产品生产工艺技术及应用/任凌波,章思规,任晓蕾主编.
—北京:化学工业出版社,2001.6
ISBN 7-5025-3105-X

I. 生… II. ①任…②章…③任 III. 生物化学-化工产品-生产工艺
-应用 IV. TQ072

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2000) 第 87246 号

生物化工产品生产工艺技术及应用

任凌波 章思规 任晓蕾 主编

责任编辑:徐蔓

责任校对:陈静

封面设计:蒋艳君

*

化学工业出版社出版发行

(北京市朝阳区惠新里3号 邮政编码 100029)

发行电话:(010) 64918013

<http://www.cip.com.cn>

*

新华书店北京发行所经销

北京市燕山印刷厂印刷

三河市东柳装订厂装订

开本 850×1168 毫米 1/32 印张 19 $\frac{3}{4}$ 字数 582 千字

2001 年 6 月第 1 版 2001 年 6 月北京第 1 次印刷

印数:1—4000

ISBN 7-5025-3105-X/TQ·1339

定 价:40.00 元

版权所有 违者必究

该书如有缺页、倒页、脱页者,本社发行部负责退换

前 言

生物工程学、信息科学和材料科学被认为是当今世界的三大前沿科学技术。早期的生物技术主要包括生物资源的加工和发酵；后来又发展了酶反应技术。这时基本上还停留在对生物体进行宏观的和某些功能进行利用，因此其生产效率和应用领域受到一定的限制。70年代以来，随着微生物学、生物化学、遗传学、细胞学和分子生物学以及现代实验技术、电子技术、计算机技术的发展和运用，极大地发展了生物技术，在传统的生物技术基础上形成了具有强大生命力的现代生物工程技术。现代生物技术主要包括基因重组技术、细胞融合技术、细胞大量培养技术和生物反应技术等四个方面。现代生物技术是以遗传工程（包括基因重组、细胞融合）为基础，以微生物工程（包括酶工程、生物化学工程）为核心的，从细胞和分子水平上定量地对生物体及其功能进行改造和利用，有效地制造有用产品的工业技术。

在21世纪，生物技术的作用将更加突出。美国科学家预言，美国的第二个硅谷将不是半导体产业，而是潜力巨大、正在兴起的生物技术。从现代生物技术突飞猛进的发展及其对医药、保健、环境、农业、能源等方面的重大作用来看，21世纪无疑将是生物技术的时代。

生物化工是生物技术的重要分支。与传统化学工业相比，生物化工有以下几个突出特点：① 主要以可再生资源作主要原料；② 反应条件温和，多为常温、常压，能耗低，选择性好，效率高；③ 环境污染较少；④ 投资较少；⑤ 能生产目前不能生产或还不为人知的性能优异的化合物，并能开发生产新品种。

近年来，生物化工在生物技术中的地位正在上升，生物技术正在从传统医药、农业向生物化工方面逐渐转移。国外生化反应器已进入新一代研究开发阶段，其突破将实现大批量生物技术生产石化二次产品，其影响将难以估计。不久的将来，将有20%的化工产品由生物技术来生产。可以断言，21世纪生物化工将是最大的化工产业。

在世纪之初，编者编写此书的目的是力图为在生物化工战线作实

际技术工作的同志深入浅出地阐明生物化工产品生产工艺技术及应用。本书第一篇为基础篇,着重阐述生物化工理论及工业生产技术;第二篇为产品及应用篇,按医药及医药中间体、食品添加剂、饲料添加剂、生物农药、基本有机化工原料、农林业产品加工等应用领域分类阐述该工艺技术在 300 余种化工产品的生产及应用,以期对从事生物化工战线实际技术工作的同志能有所帮助。并可供从事生物化工专业及相关专业学习的大学生参考。

本书第一篇第一章、第四章、第六章由任凌波、王惠普编写,第二章、第三章由董凌虹、傅家相编写,第五章由唐桂梅编写,第七、八、九章由任晓蕾、王韬、齐凌峰、王爱国编写;第二篇由章思规、杨文栋、杭吉民、陈钟秀、任凌波、王忠臣、关守田、徐卫、吴秀琴、谢家录、李东辉、刘丽、魏学艳、孙新民、曾明利等同志共同编写,全书由任凌波整理、编纂。司景利、邸玉福协助本书编写。

本书在编写过程中得到了化工出版社及有关单位的领导和许多同志的支持和帮助,在此特向他们致以衷心的感谢!

由于时间匆忙和水平有限,不确切和错误之处,敬请批评指正。

编者

2001 年 1 月

第一篇 基 础 篇

生物化学工程，简称生化工程，是应用化学工程的原理和方法将生物工程的实验室成果进行工业开发的学科。它既可视作化学工程的一个分支，又可认为是生物工程的一个组成部分。

生物工程按其性质讲，是应用生物学、化学和工程学的原理及生物催化剂的作用将物料转化为产品或从事社会服务的科学技术。广义的生物工程一般不直接涉及化学反应，而狭义的生物工程却涉及化学反应，并采用了生物催化剂。

生物化工由于可利用动物、植物、微生物等再生资源及工、农业的废弃物，还可为耗能高、污染严重的化学工业寻求技术改造的新途径。当今世界上面临的能源、食品、疾病、环境等重大问题，都是生物化工大显身手的场所。生物化工为现代化学工业的发展开拓了一条新的希望之路，在一定程度上可以说，生物化工是 21 世纪最有发展前途的一个化学工业部门。

本篇试图论述用化学、物理、生物化学的原理和方法，以动物、植物、微生物等生物资源为原料，制取或提取医药、制药中间体、食品添加剂、饲料添加剂、香料、氨基酸、有机酸、基本有机化工原料等重要生物化工产品的生产工艺技术，以为论述其应用打下理论基础。

第一章 生物化工产品生产工艺 技术的基本内容

生化工程是为生物反应过程服务的，对此过程进行详细剖析，可以发现，其中带有共性的技术问题是很多的。

一、原材料的物理和化学预处理

包括选择合适的原料、原料的预处理、原料的粉碎处理、物理方法处理、生化及化学方法处理等。

二、培养基的配制和灭菌

按照所用的培养基，培养过程可以分成固体培养和液体培养两种形式。按照操作方式，培养过程有分批、连续和半连续等操作方式。灭菌有培养基的间歇灭菌、连续灭菌和空气除菌等。

三、提供和制备高产优质和足够数量的生物催化剂

由常规选育或经现代生物工程方法获得的菌株、细胞系或从中提取的酶，必要时须进行固定化。同时应考虑大规模种子培养或固定化生物催化剂的制备问题及如何将其在无菌情况下接入生物反应器中等问题。

四、生物反应过程

生物反应器是整个生物反应过程的关键设备，它是为特定的细胞或酶提供适宜的增殖或进行特定生化反应环境的设备，它的结构、操作方式和操作条件与产品的质量、转化率和能耗有着密切的关系。在生物反应器中存在着气-液-固三相的混合、传质和传热问题，不少发酵液还呈现非牛顿型的流变学特性，因此存在大量化学工程的问题。生物反应器中的每一个细胞都可以被看成一个微型反应器（它存在着与外界环境的物质和能量交换以及物质的分解与合成），要使每一个细胞都处于同一最佳环境下才能够使整个生物反应器维持最佳状态。生物反应器中的混合、传质和传热问题是非常重要的。生物反应器的设计和放大并不完全是化学工程问题，必须弄清楚目标产物的生化反应特征，如细胞的生理特性、繁殖规律、代谢途径、产品形成条件、细胞

受机械剪切的影响等。培养过程中氧和基质的供需、细胞的生长动力学、发酵动力学、酶反应动力学、培养液的流变学、生物反应器的放大等一系列带有共性的工程技术也由此而产生出来。

相当一部分重要的生物反应过程是好气过程，生化工程还必须解决大量无菌空气的供应问题，包括空气压缩、预处理、无菌过滤等。

生物反应过程受温度、pH 值、溶解氧等环境条件的影响很明显，由于受生物催化剂的不稳定性和过程操作的无菌要求，过程一般是分批操作的，各种反应参数随时间变化，对生物反应过程的参数检测和控制就显得非常重要。反应过程的无菌要求增添了在线检测的困难和传感器耐受蒸汽灭菌的要求。由于生物反应过程参数为时间的函数，控制策略只能建立在过程模型化（指简单反应过程）或专家系统（指复杂反应过程）的基础上利用计算机在线数据检测、数据处理和参数控制。这些也属于生物化学工程的研究范围。

五、生化产品的提取和精制

生化产品在反应液中的浓度是很低微的，最高的乙醇只有 10% 左右，氨基酸不超过 8%，抗生素不超过 5%，酶制剂不超过 1%，一些基因工程和杂交瘤产品则更低，如胰岛素一般不超过 0.01%，单克隆抗体一般不超过 0.0001%，这些产品从反应液中提取出来是很困难的。反应液中生化产品与杂质常具有相似的结构，分离是相当困难的。一些具有生物活性的产品对温度、酸碱度、日光都很敏感，一些作为药物、制药中间体、食品添加剂和饲料添加剂的生化产品对纯度、水分、有害物质含量、无菌或洁净程度都有严格的要求。

一些典型的化工单元操作，如液-固分离、液-液萃取、吸附、蒸馏、蒸发、沉淀、结晶、干燥等都常用于生化产品的提取和精制，但所用的设备应满足高效、快速、低温、洁净（或无菌）的要求，如低温（或冷冻）高速（或超速）离心机、连续离心萃取机，离心薄膜浓缩机、冷冻干燥机等。有些用于分离精细化工产品的手段和装置也常用于生化产品的提取和精制，如离子交换、凝胶过滤、色层分离（采用常规或带有配基的亲分离介质）、电泳、超滤、反渗透、电渗析、双水相萃取、超临界萃取等。当产品包含在细胞内，可根据情况采用溶剂进行液-固萃取或将细胞用研磨、超声、高压匀浆或冻融等方法进行破壁，然后在去除细胞残片后再用处理胞外产物的类似办法进行提取精制。

第二章 原材料的选择及物理化学预处理

一、选择合适的原料

在制备和提取某种生化产品时，首先要选取原料。根据生化产品的多年生产实践，按以下原则选择原料比较合适。(1) 来源丰富且易得；(2) 有效成分含量高而且新鲜；(3) 制备和提取工艺简单易行；(4) 成本比较低；(5) 经济效益好。生产中很难选到一种十分完美的原料，选料时必须全面分析，综合考虑，抓住主要矛盾决定取舍。

对于不同性质的原材料。植物要注意季节性；在微生物生长期，酶和核酸含量较高，可获得高产量；动物的生理状态不同亦有差异，如胸腺只有小牛才有，成年牛胸腺就已退化。因此，各种生物体和同一生物体不同组织细胞，含有的生化产品的多少和分布情况是不同的。要总结和积累好的生产经验，选择最佳原材料。

二、原料的预处理

采集到的原材料，生产之前通常必须进行预处理。动物脏器及组织先要剔除结缔组织、脂肪组织等各种非活性部分，植物种子先要去壳除脂，微生物要进行菌体和发酵液的分离等操作。总之，凡不能及时投入生产的原料，都要进行预加工，防止在存放过程中变质，同时也便于分离纯化，有利于贮存和运输。

生产中常用冷冻法处理原料。一般将新采集的原料在 -20°C 冷库中保存，这样可抑制酶和微生物的作用，降低化学反应速度。有些原料经速冻，细胞内形成微小冰晶，破坏细胞结构，使细胞膜容易破坏，有利于细胞内物质的提取。另外经冷冻的原料，还有利于机械粉碎。在某些情况下，原料也可预先用有机溶剂除去水分（动物脏器和组织一般含60%的水分），可降低水分至10%以下，延长保存时间。使用有机溶剂时，注意不要破坏有效成分，常用有机溶剂为丙酮和乙醇等。经丙酮处理的原料，能脱水脱脂，制成丙酮干燥粉，可减少酶的变性失活，蛋白质与脂结合的部分化学键打开，促使某些酶很容易释放到溶液中去，有利于有效成分的分离提取。某些原料收集时必须特定的

pH 值、温度及环境下保存，方可保持有效成分不被降解，保持其生物活性。有的原料必须事先经过处理，如从猪脑垂体前叶提取 FSH 和 LH，脑垂体必须采集后投入丙酮中浸泡，达到破坏酶和脱水脱脂的目的，有利于原料的贮存和下一步工序的进行。微生物菌体或发酵液，经热处理后，适宜工艺连续进行。否则，也可冷冻和灭菌后贮存。

三、原料的粉碎处理

生化产品在制备和提取以前，须将大块原料粉碎或绞碎成适当粒度，或将细胞破碎，使细胞内生物活性物质充分释放到溶液中，才有利于制取。不同的生物体或同一生物体不同的组织，破碎的难易程度就不同，其破碎的方法也不完全相同。动物脏器组织，常用绞肉机粉碎或使小块成肉糜；植物肉质组织可以磨碎；许多具有坚韧细胞壁的微生物，常用自溶、冷热交替、加砂研磨、超声波、加压处理等破碎方法。如果提取的有效成分，是体液（如血液等）或细菌胞外某些多肽激素、酶等，其细胞就不用破碎。

目前粉碎原料主要采用以下几种方法。

（一）机械破碎

如果制备生化产品用的原料少，可采用高速组织捣碎机、匀浆器、研钵、研船等。所需的原料多，生产规模大，常用的粉碎设备有电磨机、球磨机、万能粉碎机、绞肉机、刨胰机、击碎机等。

动物脏器组织常采用绞肉机粉碎，在冰冻状态下绞碎效果更好。欲达到细胞破碎程度，则采用匀浆机。规模较大的生产单位破碎胰脏时则采用刨胰机，将冷冻的胰脏切成薄片进行提取，可大幅度提高胰岛素的提取收率。刨胰机也可用于其他动物脏器组织的破碎处理。

（二）物理方法

实际生产中，通常用各种物理方法破碎动物、植物和微生物的组织细胞，主要有以下几种方法。

（1）反复冷冻融化：把准备破碎的动物脏器组织原料在冷库中冷至 $-20\sim-15^{\circ}\text{C}$ ，使原料凝固，然后在室温下缓慢溶解，如此反复进行，大部分动物性组织的细胞及细胞内的颗粒即可破碎。

（2）冷热交替处理：从细菌或病毒中提取蛋白质及核酸时，可将原料投入沸水中，在 90°C 左右的温度下保持数分钟，然后立即置于冷浴中，使之迅速冷却，这样反复交替，可使绝大部分细胞被破坏。

(3) 超声波处理：经常采用超声波处理方法来破碎细菌的细胞壁。处理的效果与原料的浓度、使用频率有关。在基因工程生产人胰岛素过程中，用大肠杆菌提取人胰岛素原，用10~200mg 菌体浓度，在1 kHz至10kHz 频率下处理10~15min，对其他细菌，则视具体情况而定。一定要在操作过程中注意避免溶液中存在气泡。因酶和核酸对超声波比较敏感，要慎重使用，防止产品降解。

(4) 高压均质处理：当加气压或水压，达21~35MPa 时，可使90%以上细胞被压碎。这种方法常用在微生物酶制剂的工业制备及基因工程生产中。

(三) 生化及化学方法

(1) 自溶法。选取新鲜的生物原材料，在一定的pH值和适当温度下，利用组织细胞中自身的酶将细胞破坏，使细胞内含物释放出来。自溶的温度，动物材料应控制在0~4℃，微生物材料则应在室温条件下进行。自溶时，需加少量的防腐剂，如甲苯、氯仿等，以防止外界细菌的污染。自溶法时间长，不易控制，所以制备和提取核酸、蛋白质时很少采用。

(2) 溶菌酶处理。溶菌酶是专一水解细胞壁的一种酶。如用噬菌体感染大肠杆菌细胞制造DNA时，采用pH值为8.0的0.1mol/L 三羟甲基氨基甲烷(Tris)-0.01mol/L 乙二胺四乙酸(EDTA)制成每毫升含二亿个细胞的悬液，然后加入100μg~1mg的溶菌酶，在37℃下保温10min，细菌胞壁即被水解。处理微生物常用溶菌酶，对蜗牛霉、纤维素霉及植物细胞等也可用溶菌酶处理。

(3) 表面活性剂处理。表面活性剂分子中兼有亲脂性和亲水性基团，可降低水的表面张力，具有乳化、分散、增溶作用。在生产中常用十二烷基磺酸钠(SDS)、氯化二烷基吡啶和去氧胆酸钠，处理原料和分离纯化产品。

生产中还可通过改变细胞膜的通透性，改变蛋白质与脂质的结合。还多采用真空干燥和丙酮处理制成丙酮粉的方法。必须注意，不论使用什么方法破坏细胞，都要在一定的稀盐溶液或缓冲液中进行，同时还要加入保护剂，防止生化物质变性、降解和破坏。

第三章 工业用微生物及其培养方法

微生物是人们不能用肉眼见到的微小的生物体，它广泛地存在于我们的周围，和我们的生活有密切的联系；微生物在人们所从事的发酵工业生产中，也扮演着极重要的角色。微生物摄取了原料中的养分，通过体内的特定酶系，经过复杂的生物化学反应——代谢作用，把原料转变为人们需要的产品，如各种酒类、抗生素、氨基酸、有机物、维生素等。从生物化学的观点看，微生物是一种生物催化剂载体，它能促使生物物质转化的进行。微生物细胞又与反应工程中的反应器很类似，原料中的养分（反应物）透过微生物的细胞壁和细胞膜，进入微生物体内，然后再经由微生物体内酶系的催化作用，把反应物转化为生物化学产品。微生物在人们从事的发酵工业生产中起着催化剂和反应器双重重要作用。本章将对工业常用微生物及其培养方法，作一扼要的论述。

一、最常用的工业微生物

（一）细菌

（1）醋杆菌属（*Acetobacter*）的醋化醋杆菌（*Acetobacter aceti*）、弱氧化醋杆菌（*Acetobacter suboxydans*）等是不生孢子的需氧菌。醋化醋杆菌可将酒精转变为醋酸、弱氧化醋杆菌可将山梨糖醇转为山梨糖。

（2）乳杆菌属（*Lactobacillus*）的德氏乳杆菌（*Lactobacillus delbriekii*）可由糖生产乳糖。链球菌属（*Streptococcus*）、片球菌属（*Pediococcus*）、串珠菌属（*Leuconostoc*）等亦属重要的乳酸菌。它们是革兰氏阳性、不运动、兼性需氧菌。乳酸为多种酿造食品的成分，乳酸菌和食品工业有着很密切的关系。

（3）芽孢杆菌属（*Bacillus*）是一群需氧性有孢子的杆状细菌。枯草杆菌（*Bacillus subtilis*）是本属中最主要的菌种，它可以生产 α -淀粉酶，经过人工诱变后可以获得各种营养缺陷型变异株，用来生产肌苷、鸟苷等核苷。

（4）梭菌属（*Clostridium*），形成梭形孢子的厌氧菌，存于土壤中。

丙酮丁醇梭菌 (*Clostridium acetobutylium*) 可生产丙酮、丁醇, 为工业发酵的重要菌种。

(5) 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 及产气气杆菌 (*Aerobacter aerogenes*) 为革兰氏阴性、无孢子的杆菌, 在动物肠中形成细菌群。如食品中有此细菌存在, 则此食品有污染动物排泄物的可能, 因此它成为了公共卫生上的重要指标。近些年来, 利用大肠杆菌作为基因克隆的受体是比较普遍的。

(二) 放线菌

链霉菌属 (*Streptomyces*) 自 1942 年 Waksman 发现灰色链霉菌 (*Streptomyces griseus*) 产生链霉素以来, 发现许多链霉菌能产生抗生素, 例如: 金霉素链霉菌 (*S. aureofaciens*) (金霉素)、委内瑞拉链霉菌 (*S. venezuelae*) (氯霉素)、卡那霉素链霉菌 (*S. kanamycetieus*) (卡那霉素)、红霉素链霉菌 (*S. erytnreus*) (红霉素)、轮枝链霉菌 (*S. verticillus*) 等。

许多链霉菌可以生产葡萄糖异构酶, 例如米苏里游动放线菌 (*Actinoplanes missouriensis*) 是很好的葡萄糖异构酶产生菌。

抗生素产生菌除链霉菌外尚有地中海诺卡氏菌 (*Nocardia mediterranei*) 可生产利福霉素等。

(三) 霉菌

工业上最常用的霉菌以曲菌属及青霉属为主, 根霉属、红曲霉属等也较常用。

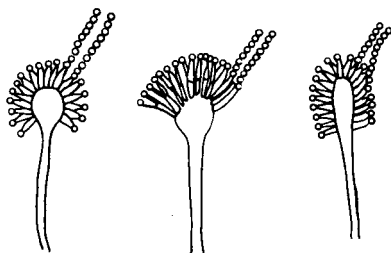


图 1.3-1 曲霉属

1. 曲霉属 (图 1.3-1)

高峰淀粉酶 (Taka-diastase), 是由米曲酶 (*Aspergillus oryzae*) 产生的。是酿造酱油的主要菌种。

黑曲霉 (*A. niger*) 可以产生酸性蛋白酶、蛋白酶, 它的变异株可以产生柠檬酸、葡萄糖酸、草

酸等。

黑曲霉及其变异株可以生产糖化酶, 为酿酒及酒精制造厂所广泛采用, 是工业发酵极重要的菌种。

2. 青霉属 (图 1.3-2)

橘子及其他食品常发现绿色斑点, 这就是青霉的污染。1929 年英国人 Fleming 首先发现青霉菌可以产生青霉素, 因此, 如点青霉 (*Penicillium notatum*), 产黄青霉 (*P. chrysogenum*) 等青霉菌也就闻名于世。

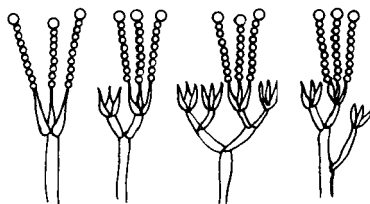


图 1.3-2 青霉属

此外, 橘青霉 (*P. citrinum*) 可产生核酸酶 P_1 (即 5'-磷酸二酯酶) 用于降解核糖核酸为四个单核苷酸。在核酸工业生产上是很重要的菌种。娄地青霉 (*P. roqueforti*) 及沙门柏干酪青霉 (*P. camemberti*) 在干酪成熟时产生一种特殊香气。

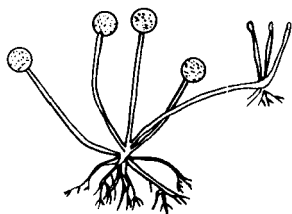


图 1.3-3 根霉属

3. 根霉属 (图 1.3-3)

德氏根霉 (*Rhizopus delemar*) 生产糖化霉, 米根霉 (*R. oryzae*)、小麦曲根霉用以生产乳酸等。

4. 红曲霉属 (*Monascus*)

它是一群红色以至紫色菌丝的霉菌, 可由我国南方红曲中分离得到。例如: 紫红曲霉 (*M. purpureus*) 等可以

用来生产食用红色色素。

(四) 酵母

工业上最常用的酵母是酵母属 (*Saccharomyces*) 和假丝酵母属 (*Candida*)。

1. 酵母属

最常用的是酿酒酵母 (*S. cerevisiae*), 用于酿造啤酒, 酒类及酒精。酿酒酵母有许多菌株, 例如, 台湾酵母 396 适用于糖蜜发酵, 而德国 Rasse I、II、M 等适用于一般酒精发酵。

2. 裂殖酵母属 (*Schizosaccharomyces*)

它广泛分布于热带地方。由非洲本地人饮用的粟酒中分离出的粟酒裂殖酵母 (*S. pombe*), 发酵适宜温度为 37°C, 可发酵糊精及菌粉。

3. 假丝酵母属

产朊假丝酵母 (*C. utilis*) 可用于生产饲料酵母。解脂假丝酵母 (*C. lipolytica*)、热带假丝酵母 (*C. tropicalis*) 可由烃类发酵生产饲料酵母。

4. 毕赤酵母属 (*Pichia*)、汉逊酵母属 (*Hansenula*)

这两属酵母均是产膜酵母，可在液面形成白膜，使液体浑浊，消耗酒精，形成酯类，广布于自然界，是使酿造物变败的有害菌。

二、微生物培养法

微生物的培养法依其种类而略有不同，现简略介绍培养基的组成、培养设备与培养条件。

(一) 培养基的组成

培养基一般由碳源、氮源、无机盐、微量生长因子等组成。

碳源一般为蔗糖、葡萄糖等。工业用碳源为淀粉水解液、糖蜜等。干薯粉、甲醇、乙醇、石油、醋酸等均可作碳源。

氮源有硫酸铵、尿素、豆饼水解液等。

无机盐有磷酸二氢钾、磷酸氢二钾、七水硫酸镁等。

微量生长因子，有生物素、硫胺素等，玉米浆是最常用的微量生长因子。

实验用培养基中细菌用培养基以肉汤为最常见，有时在肉汤中添加酵母膏与蛋白胨。

酵母与霉菌用培养基以曲汁或麦芽汁为最常用。将米曲添加适当水后，在 55°C 下糖化 2h，经过滤，滤液稀释至糖度为 10°，备用。麦芽汁的制法相同。

蔡氏培养基 (Czapek-Dox) 常用于培养霉菌，该培养基由下列成分组成：蔗糖 20~30g、硝酸钠 3g、磷酸氢钾 1g、氯化钾 0.5g、七水硫酸镁 0.5g、硫酸亚铁 0.01g、蒸馏水 1L。

工业生产用培养基配方对微生物发酵有很大关系。例如，当谷氨酸发酵时，最关键的问题是亚适量生物素的供给。在使用淀粉水解液为原料时，必须供给适量尿素及亚适量的生物素，否则发酵无法进行。又如，由甘蔗糖蜜生产酒精时，因糖蜜中缺氧，必须添加硫酸铵或尿素，酒精发酵方能进行。用甘蔗糖蜜生产柠檬酸时，因糖蜜中含铁过多，必须预处理，或在发酵时添加适量的黄血盐以抵消铁的破坏作用。

（二）培养方法及设备概述

培养方法按培养基类型分,培养过程可分为固体培养和液体培养,按操作方式可分为分批培养、连续培养和半连续培养,按需不需要氧气可分为需氧培养和厌氧培养两大类,需氧培养按所用的设备又可分为浅盘培养、厚层通风培养和液体通风深层培养三种。

浅盘培养:该法既适用于固体培养也适用于液体培养。其方法是将固体或液体培养基盛于木制或不锈钢制成的浅盘内,接种菌种,在保温室内进行培养。

厚层通风培养:此法用于固体培养。所用设备是在水面建筑大型水泥槽,槽的底部有多孔板,板上放置固体培养基,接种后,将空气由多孔板下通入培养基内。此法与浅盘培养相比,培养量大,并节省劳动力。国内酱油厂大多采用此法生产酱油。

液体通风深层培养:简称深层培养法,为最先进的方法。我国液体曲、抗生素、柠檬酸等的生产就是采用此法。

厌氧培养:又称静止培养。酒精发酵、丙酮丁醇发酵均不需氧气。因此可用一般的发酵槽进行发酵,但没有通气设备。真正的厌氧培养则必须把氧气抽去或吸去。抽出法可用真空泵抽去空气。吸去法可用焦栲酚(pyrogallol),例如:将试管棉花塞由管口下压至管的上半部速将焦栲酚注于棉花上,赶快用橡皮塞塞好,倒置,保温培养。或在培养基的上面注上一层石蜡油。近来,厌氧培养器(例如加拿大的BBL Gas Pak 150的厌氧培养器)采用由水发生氢气的方法,此氢气与氧气反应,遂形成真空。

大规模发酵生产从试管开始放大一直到几千升、几万升的培养罐(发酵槽),采用逐步扩大法。例如,将酵母斜面培养移植至含5ml曲汁的试管中,30℃培养24h后,移植于含500ml的巴士瓶(或烧瓶)内,30℃下培养48h,再移植至含10L曲汁卡瓦罐(或一般培养罐)中,30℃下培养48h,即可移植至500L的种子罐,作为工业发酵的种醪,再进行大规模发酵。

（三）培养条件

培养基糖浓度:一般为含葡萄糖10%,如需更高浓度可用流加法,使葡萄糖浓度提高至15%以上。

温度:一般为30~33℃,高于33℃应进行冷却。冷却方法或在罐

内设立冷却水蛇管，或在罐外喷水。

pH 值：对各种微生物来说，最适宜的 pH 值各不相同，酵母菌最适宜 pH 值为 4~6.0，细菌约在 6~7.5，有些在 pH 值 4 或 pH 值 9 才能生长。霉菌生长最适宜 pH 值，例如，使用黑曲霉生产柠檬酸时，最适宜 pH 值为 2，生产草酸时，最适宜 pH 值为 7。

氧气：微生物有需氧菌、厌氧菌及兼性厌氧菌三种。酵母菌的生长需要足够的氧气，但当它产生酒精时，则无需氧气。丙酮丁醇发酵也无需氧气，但不必在绝对无氧下进行发酵。至于厌氧菌，例如热纤梭菌 (*Clostridium thermocellum*) 的生长与发酵必须用厌气培养器进行发酵。好氧菌的培养必须供给适量的氧气。因此测定培养基的溶解氧成为从事生物化学工程者的一个重大课题。

氮源：使用硫酸铵时，残留硫酸根使培养基变为酸性，必须以碳酸钙为中和剂，这就容易引起染菌。如使用的菌含有脲酶，则以尿素为氮源较为适宜，一般常用尿素流加法，使培养液维持恒定的 pH 值，同时又可供氮源。如条件许可，直接使用氨气，更为方便。

微量因子：主要指维生素，它是生物体生长不可缺少的一种或数种极微量的有机物质；但微生物在生长时，自身往往又缺乏合成这种有机物的能力，因此必须由外界提供。与微生物关系较大的维生素，主要是 B 族维生素。这些维生素是微生物体内各种酶活性基团的组成部分，没有它们，酶就缺乏活力。例如，乳酸菌生长时必须要有泛酸（一种 B 族维生素）。钴胺素 (B_{12}) 是参与微生物体内重排反应的有机物质，大多数细菌都不能缺少它。维生素数量虽然极微，但它对生物体的正常生长却关系重大。然而，在很多天然的碳源与氮源中，均含有为数众多的维生素。所以配制培养基时，一般不需另外加入。

第四章 工业用微生物培养过程动力学

工业上，一些微生物培养过程是为了得到细胞，如酵母、单细胞蛋白；有时是为了除去某些物质，如废水的生化处理；有时是利用细胞的某种酶来催化特定的反应，如甾体化合物的生物氧化；更多的则是为了获得细胞的各种代谢产物，如氨基酸、抗生素、酶、有机酸、溶剂、疫苗以及各种生物活性物质等。在这些培养过程中，发生着极其复杂的生化反应。工业用微生物培养过程动力学就是研究细胞的生长繁殖、基质的消耗以及产物的生成等规律的科学。研究培养过程动力学，有助于人们对生物反应的了解，以制定最佳的控制策略来提高过程的经济效益。

培养过程有分批、连续和半连续等操作方式。分批培养是指培养基灭菌、接种后，维持适当的条件，在培养过程中不再补充培养基这样一种操作方式。进行连续培养时，则不断将新鲜培养基加到生物反应器中，同时不断取出培养物。半连续培养介于二者之间，培养时不断补充培养基，但不同时取出培养物，而在培养结束时或中途取出全部或部分培养物。这些操作可用于液体培养，也可用于固体培养。

一、细胞浓度的测量

如果培养过程的目的是生产细胞，培养液中的细胞浓度就是产物浓度。如果培养过程的目的是生产细胞的代谢产物或除去液体中的某些物质，细胞浓度就是生物催化剂的浓度。因此细胞浓度在培养过程中是一个十分重要的参数。下面就简介细胞浓度的测定方法。

(一) 直接测定法

(1) 细胞干重法。通常是把一定体积的培养液离心，收集细胞，洗涤，干燥，进行称重。此方法不适用于含有其他不溶性物质的培养液。如果培养液中除细胞外，只含作为 pH 值缓冲剂的碳酸钙，可用酸将碳酸钙溶解。如培养液中还含有其他不溶性物质，则不能用此法测定。

(2) 显微计数器。对于单细胞生物体，可以利用显微镜和血球计数器测定单位体积培养液中的细胞个数。这种方法不适用于多细胞或