



普通高等教育“十一五”国家级规划教材

发酵工程

■ 刘冬 张学仁 主编
闫丽霞 张磊 主审



高等教育出版社
Higher Education Press



普通高等教育“十一五”国家级规划教材

发 酵 工 程

刘冬 张学仁 主 编
闫丽霞 张 磊 主 审



高等教育出版社
Higher Education Press

内 容 提 要

本书是普通高等教育“十一五”国家级规划教材。

本书以发酵技术人员的职业岗位为导向,重点阐述发酵工艺过程中各典型单元操作的基本原理、重要设备和基本操作技术,突出实践性和实用性。主要内容包括:工业发酵菌种选育,工业发酵培养基,工业发酵灭菌,种子扩大培养,发酵罐及其附属设备,发酵工艺控制,发酵工程在现代生物技术中的应用,发酵工程应用实例,发酵工业与环境保护,发酵成本的构成及控制,发酵工程实训。

本书适应于应用型、技能型人才培养。可作为生物技术、生物制药、食品类专业及相关专业的教学用书,也可作为从事食品、发酵、生物技术工作人员的参考书。

图书在版编目(CIP)数据

发酵工程/刘冬,张学仁主编. —北京:高等教育出版社,2007.4

ISBN 978-7-04-021230-3

I. 发... II. ①刘...②张... III. 发酵工程-高等学校-教材 IV. TQ92

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2007)第 036383 号

策划编辑 张庆波 责任编辑 张晓晶 封面设计 张楠 责任绘图 吴文信
版式设计 马静如 责任校对 杨雪莲 责任印制 尤静

出版发行 高等教育出版社
社 址 北京市西城区德外大街4号
邮政编码 100011
总 机 010-58581000

经 销 蓝色畅想图书发行有限公司
印 刷 北京四季青印刷厂

开 本 787×1092 1/16
印 张 15
字 数 360 000

购书热线 010-58581118
免费咨询 800-810-0598
网 址 <http://www.hep.edu.cn>
<http://www.hep.com.cn>
网上订购 <http://www.landrac.com>
<http://www.landrac.com.cn>
畅想教育 <http://www.widedu.com>

版 次 2007年4月第1版
印 次 2007年4月第1次印刷
定 价 19.10元

本书如有缺页、倒页、脱页等质量问题,请到所购图书销售部门联系调换。

版权所有 侵权必究

物料号 21230-00

前 言

生物技术主要内容包括基因工程、细胞工程、酶工程、蛋白质工程和发酵工程。其中发酵工程处于生物技术的中心地位,因为绝大多数的生物技术目标都是通过发酵工程来实现的。发酵工程课程也是高职高专生物技术类专业的必修主干课。本教材在编写过程中,突出高职教育的特点,根据发酵工程职业岗位(群)对技术操作人员知识和能力的要求,理论以能满足实践需要为度,突现技术的实践性和实用性。

本教材以典型的发酵工艺流程为主线,系统介绍了工艺过程的基本原理、操作技术和重要设备,同时也反映了现代发酵工程的一些最新应用成果。为便于学习,每一章都列出知识目标、能力目标和思考题。书后还精选了17个涵盖发酵工艺过程各重要操作环节、重要设备和操作技术的实训项目,供各学校根据自身条件选用。

本书由深圳职业技术学院刘冬和天津生物工程职业技术学院张学仁主编,广东轻工职业技术学院邓毛程副主编。张学仁编写第一、五、九、十一章和实训一、二、十三,刘冬编写第七、八章和实训三、五、六、七、十二、十五、十六,邓毛程编写第二、六章和实训四、九、十一、十四、十七,广东轻工职业技术学院张远平编写第十章,信阳农业高等专科学校张继英编写第三、四章和实训八、十。

全书由刘冬统稿,张学仁和邓毛程协助。天津华立达生物工程有限公司总工程师张磊博士和天津生物工程职业技术学院副院长闫丽霞教授主审。

本书在编写过程中,得到了深圳职业技术学院应用化学与生物技术学院李世敏教授的大力支持和帮助,在此表示衷心感谢。

由于发酵工程发展迅速,编者水平有限,内容难免有错漏之处,敬请批评指正。

编者

2007年1月

目 录

第一章 绪论	1	第五节 溶解氧浓度对发酵的影响及控制	94
第一节 发酵工程的典型工艺流程	2	第六节 pH对发酵的影响及控制	99
第二节 发酵工程的特点	3	第七节 温度对发酵的影响及控制	102
第三节 发酵工程的应用范围	4	第八节 CO₂对发酵的影响及控制	104
第四节 发酵工程发展简史	7	第九节 泡沫对发酵的影响及控制	106
第五节 发酵工程的发展趋势	9	第十节 染菌对发酵的影响及防治	108
第二章 工业发酵菌种选育	11	第十一节 发酵终点的判断	112
第一节 工业发酵生产菌种	11	第十二节 发酵工艺的放大	113
第二节 生产菌种的选育	15	第十三节 发酵过程的自动控制	115
第三节 工业发酵生产菌种的保藏	26	第八章 发酵工程在现代生物技术中的应用	118
第三章 工业发酵培养基	30	第一节 基因工程菌发酵	118
第一节 工业发酵培养基的成分	30	第二节 动、植物细胞大规模培养	129
第二节 工业发酵培养基的类型和配方设计	35	第九章 发酵工程应用实例	148
第三节 影响培养基质量的因素	38	第一节 抗生素生产工艺	148
第四节 原料转换的意义	40	第二节 氨基酸生产工艺	150
第四章 工业发酵灭菌	42	第三节 酶制剂生产工艺	152
第一节 灭菌的方法	42	第四节 维生素生产工艺	154
第二节 培养基和发酵设备的湿热灭菌	47	第五节 基因工程药物发酵工艺	155
第三节 空气除菌	51	第六节 微生物转化工艺	157
第五章 种子扩大培养	59	第七节 酒精发酵工艺	158
第一节 种子制备工艺	59	第十章 发酵工业与环境保护	161
第二节 影响种子质量的因素	62	第一节 发酵工业三废的处理原理	161
第六章 发酵罐及其附属设备	67	第二节 发酵工业三废的处理技术	167
第一节 需氧发酵罐	67	第十一章 发酵成本的构成及控制	178
第二节 嫌气发酵罐	78	第一节 发酵成本的构成	178
第三节 表面培养设备	81	第二节 影响发酵成本的因素	178
第四节 发酵设备的清洗和检修	83	第三节 发酵过程的经济学评价	182
第五节 发酵罐选型注意事项	84	第十二章 发酵工程实训	185
第七章 发酵工艺控制	86	实训一 实训安全须知	185
第一节 工业发酵的主要类型	86	实训二 发酵工程实训常用设备	186
第二节 工业发酵过程的主要控制参数	89	实训三 啤酒酵母生产菌种的复壮	188
第三节 菌体浓度对发酵的影响及控制	92	实训四 应用紫外线诱变筛选耐高糖的	
第四节 基质浓度对发酵的影响及控制	93		

	谷氨酸高产菌株	190		工艺及控制	212
实训五	应用化学因素诱变选育腺嘌呤		实训十二	灵芝多糖液体深层发酵工艺 ...	216
	营养缺陷型菌株	192	实训十三	青霉素发酵及效价测定法	218
实训六	酵母菌原生质体融合育种	194	实训十四	酵母菌的固定化细胞发酵	
实训七	<i>E. coli</i> BL21(pGEX-4T-2)			技术	220
	工程菌的构建	197	实训十五	工程菌 <i>E. coli</i> BL21(pGEX-	
实训八	微生物菌种的保藏	202		4T-2)发酵工艺控制	223
实训九	发酵罐的使用与维护	204	实训十六	西洋参细胞大规模培养工艺 ...	224
实训十	用比浊法测定大肠杆菌的生长		实训十七	废水处理	226
	曲线	211		主要参考文献	229
实训十一	活性干面包酵母的发酵生产				

绪 论

► 知识目标

- 了解发酵工程在食品、医药、农业等领域中的应用。
- 了解发酵工程发展的重要历史阶段及特点。
- 了解发酵工程的发展趋势。
- 理解发酵工程的主要特点。
- 掌握发酵工程的典型工艺过程及主要内容。

► 能力目标

- 利用本章所学知识制定本课程的学习计划。

人类利用微生物的代谢产物作为食品和医药,已有几千年的历史了。但那时人们并不知道微生物与发酵的关系。到了 20 世纪初,由于建立了微生物的纯种培养技术,才开创了人为控制发酵过程的时期。

20 世纪是生命科学迅速发展的时期,青霉素的发现以及深层培养技术的应用推动了抗生素工业乃至整个发酵工业的快速发展,如氨基酸、酶制剂、维生素、有机酸、多糖和单细胞蛋白等,还有生物转化、酶反应产品等。20 世纪 50 年代,DNA 双螺旋结构模型的建立,奠定了分子生物学的基础。以此为突破口,生命科学进入了分子生物学的新时代。

到了 20 世纪的最后 20 年,生命科学发展速度更加令人瞩目。传统的发酵技术与现代生物工程中的基因工程、细胞工程、蛋白质工程以及酶工程相结合,使发酵工业进入到发酵工程阶段。发酵技术已成为工业生物技术的核心,在社会经济中发挥着越来越重要的作用。

进入 21 世纪,生物制药在全世界都有很大发展,特别是现代生物技术的介入,使生物制药工业的发展呈现一派生机。目前开发的生物工程药物已达 300 多种,其中一半用于治疗癌症,开始显示出疗效好、副作用低的特点。

我国“重组药物”的研究也取得了很大进展,国内首创的 α -1b 干扰素已形成大规模生产;重组白细胞介素 2(IL-2)研制成功并投入生产;有促进人增高、促进脂肪代谢作用的重组人生长素已经研制成功;人肝细胞生成素是治疗重症肝炎的一种高效基因重组药物,现已进入中试水平;重组链激酶是治疗急性心肌梗死的特效药,已占世界治疗此类疾病的药用酶市场的 1/2 左右。用基因工程技术构建成“工程大肠杆菌”,在 10 L 发酵罐生产“重组链激酶”,酶纯度已达 98% 以上,比活性为 90 000~100 000 U/mg,已形成批量生产能力。其他重组药物,如工程乙肝疫苗等都已进入商品化阶段。可以设想,现代生物技术的出现,正在成为推动世界新技术革命的重要力量,其产业化发展必将对未来的人类社会、经济发展和生活方式产生越来越大的影响。

第一节 发酵工程的典型工艺流程

Fermentation(发酵)这个英文术语最初是由拉丁语 *ferver* 即“发泡”派生而来的,是指酵母作用于果汁或发芽的谷物时进行酒精发酵产生 CO_2 的现象。生物化学把“微生物在无氧时的代谢过程”称为发酵,而在工业发酵中,人们把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,或其代谢产物的过程统称为发酵。

发酵工程,是利用“生物细胞”的特定功能,通过现代工程技术手段(主要是发酵罐或生物反应器的自动化、高效化、功能多样化和大型化)生产各种特定的有用物质,或者把微生物直接用于某些工业化生产的一种生物技术体系。这里的“生物细胞”包括微生物细胞和动物、植物细胞及其固定化细胞。因此,发酵工程是渗透有工程学的微生物学,是发酵技术的工程化。其典型工艺流程如图 1-1 所示。

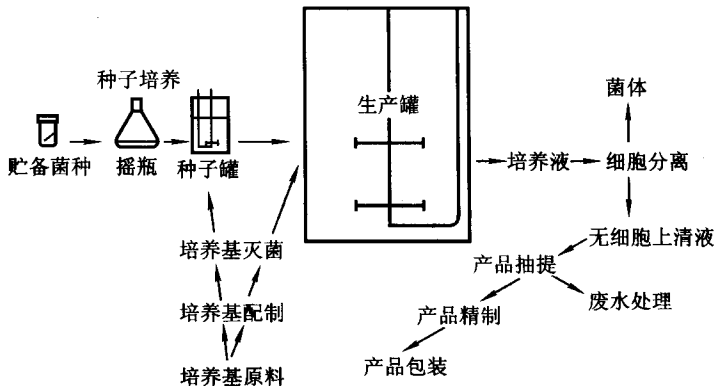


图 1-1 发酵工程的典型工艺流程示意图

(参考熊宗贵. 发酵工艺原理, 2000)

具体说来,发酵工艺过程的主要内容包括: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。

根据微生物在培养过程中对氧的需要情况,发酵可分为厌氧发酵和需氧发酵两大类型。

1. 厌氧发酵

微生物的厌氧发酵,是指微生物在不通空气的条件下进行发酵,如生产乙醇(酒精)、丙酮丁醇、乳酸、甘油和甲烷等。这种发酵一般在密闭的发酵罐中进行。严格的厌氧发酵应采用真空泵抽去或吸去发酵罐中的氧气而形成真空环境。

2. 需氧发酵

需氧(好氧)发酵的生长环境必须供给空气,以维持一定量的溶解氧水平,使菌体迅速生长和发酵。需氧发酵又分为表面培养和深层培养两大类型的培养方法。

(1) 表面培养法 表面培养法是将菌种接到灭过菌的培养基上,在一定的温度下培养的方法。该法具有简单易行、投资少、适合于小型生产的特点。在某些产品的发酵生产中,采用此法。

生产也可以取得比较好的效果,如农用抗生素——赤霉素的生产。采用稳定的生产菌株,以麦麸为培养基利用表面培养法进行固体发酵,其糖的转化率和产物产量都优于深层培养法。结合目前表面培养设备的不断改进,表面培养法还是有很大潜力的。

(2) 深层培养法 深层培养法是微生物细胞在液体深层培养基中进行厌氧或需氧发酵的纯种培养方法。深层培养法的工艺过程包括菌种制备、种子培养、发酵和提取精制等下游处理。

发酵工程从投入原料到最后发酵产品获得的整个过程是一个完整的生产体系。为了保证实验室和中间实验所取得的成果尽快扩大到工业化生产和维持正常运转,以达到最佳状态并获得优质发酵产品,必须研究发酵生产整个过程中的工艺和设备以及操作人员素质等一系列问题。

第二节 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,多为农副产品,其中以碳源为主,只加入少量有机和无机氮源,不含有毒物质。

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 容易进行复杂的高分子化合物的生产,如酶、化学活性体等。

④ 能够高度选择性地对复杂化合物在特定部位的反应,如甾体化合物的氧化、还原等。

⑤ 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。

⑥ 发酵过程是纯种培养过程。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,否则,会引起重大的损失。

⑦ 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。

⑧ 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。

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。

第三节 发酵工程的应用范围

发酵工程是生物工程中最应用最广泛的,它是利用生物细胞的生长及其代谢活动生产各种有用物质的现代工业。发酵工程的产品可分为以下六大类:

- (1) 微生物菌体细胞 如酵母菌、食用菌、微生物农药的生产。
- (2) 微生物酶类 如各种酶种、酶制剂和各种曲类的生产。
- (3) 微生物代谢产物 如初级代谢产物氨基酸、有机酸、有机溶剂、核苷酸、蛋白质、核酸和维生素等,次级代谢产物抗生素、生物碱和植物激素的生产等。
- (4) 微生物的转化产物 利用微生物代谢过程中的某一种酶或酶系将一种化合物转化成含有特殊功能基团产物的生物化学反应。如将甘油转化为二羟基丙酮,将葡萄糖转化为葡萄糖酸,将山梨醇转化为 L-山梨糖等。特别是甾体激素的转化受到了广泛的重视。
- (5) 工程菌发酵产物 20 世纪 70 年代兴起的基因工程和细胞工程,取得了飞跃的发展。通过基因工程和细胞工程创造出许许多多的具有特殊功能的“工程菌”,用发酵技术可以生产出更多更好的产品,发挥更大的经济效益。
- (6) 动物、植物细胞大规模培养的产物 如利用木瓜细胞大规模培养生产木瓜蛋白酶,利用植物细胞培养技术生产天然食用色素等。

发酵工程在以下五大行业得到广泛应用:

1. 发酵工程在食品工业上的应用

食品工业是世界上最大的工业之一,也是微生物技术最先开发应用的领域。例如以糖类物质为主要原料酿造葡萄酒、白酒、黄酒和啤酒,以牛奶为原料生产奶酒、奶酪、酸奶等发酵乳制品,以淀粉类物质为主要原料生产谷氨酸、赖氨酸等,以豆类和谷物为原料生产酱油、醋、腐乳和泡菜等,以及用各种原料生产单细胞蛋白等。

近年来,发酵工程应用于食品生产和开发,促进了食品工业的飞速发展,主要体现在四个方面:一是对食品资源的改造与改良;二是将农副原材料加工成商品,如酒类、调味品等发酵产品;三是对产品进行二次开发,形成新的产品,如许多食品添加剂等;四是对传统食品加工工艺进行改造,降低能耗,提高产率,改善食品品质等。

酒类生产是发酵工程中利用微生物获得最早的产品之一,目前市场上供人饮用的酒可分为酿造酒、蒸馏酒和配制酒三类。其中,蒸馏酒是指利用谷类、糖类等原料,经过酵母菌发酵后,蒸馏得到无色、透明的液体,再经陈酿、调制成为透明的酒精含量大于 30%(体积分数)的酒精型饮料。我国的白酒是世界六大蒸馏酒之一,产品种类繁多,质量独具风格,深受消费者的喜爱和国际市场的好评。

柠檬酸主要存在于柠檬、柑橘等果实中,它是食品、医药、化工等领域应用最广泛的有机酸之一。柠檬酸的发酵已经实现了深层发酵的大规模生产,就目前市场占有率而言,它占酸味剂市场的 70%左右,我国产量居世界首位。

氨基酸是构成蛋白质的基本单位,是人体及动物的重要营养物质。氨基酸的制造是从1820年水解蛋白质开始的,1956年用微生物直接发酵糖类生产谷氨酸研究成功,1964年我国利用发酵法生产谷氨酸进行大规模生产。发酵法生产谷氨酸被认为是现代发酵工业的重大突破,是氨基酸生产方法的重大革新。该成就大大推动了其他氨基酸发酵研究和生产的发展,形成了用发酵法制造氨基酸的新型发酵工业。目前,我国利用发酵法生产的谷氨酸钠(味精)产量居世界首位,赖氨酸的产量也居世界前列。

乳酸是食品工业的重要酸味剂、防腐剂,将乳酸制成饮料,可用于降低血压。中国乳酸发酵产业发展较快,年产量已达3万~4万吨。近年来,日本大力发展乳酸菌发酵乳酸工业,并以此为原料生产可降解生物塑料,用于手术缝线、人造骨和人造皮肤等。

2. 发酵工程在医药卫生中的应用

发酵工程可以从各方面改进医药的生产,开发新的产品,提高人类的医疗水平。所以,在医药卫生领域,发酵工程应用最广泛,发展最迅速,潜力最大。现已从自然界中发现和分离了4300多种抗生素,并通过化学结构改造,共制备了30000余种半合成抗生素。目前世界各国实际生产和应用于医疗的抗生素有120多种,连同各种半合成抗生素衍生物及盐类约350种。其中包括抗细菌的抗生素,有杆菌肽、头孢菌素、四环素、链霉素、麦迪霉素和螺旋霉素等;抗真菌的抗生素,有灰黄霉素、制霉菌素等;抗肿瘤抗生素,有博来霉素、丝裂霉素和光神霉素等。此外,还有氨基酸、维生素和干扰素等产品。

维生素是六大生命要素之一,为整个生命活动所必需。维生素A具有抗“三C”保健功能之称,即抗癌、抗心血管疾病和抗白内障。维生素C和维生素E均系抗氧化剂。维生素C可阻止、破坏自由基形成,还具有激活免疫系统细胞的活力,刺激机体产生干扰素以抵御外来感染因子等作用;维生素E可产生抗体增强机体免疫力,长期服用维生素E有益于抗衰老和防治前列腺癌及痴呆症等。作为维生素A的前体物质 β -胡萝卜素以及维生素C和维生素E都可以通过微生物发酵获得。维生素C的发酵采用大小菌混合培养的方法实现了维生素C二步发酵生产的目标。为了进一步提高维生素C的产率,应用细胞固定化技术大大提高了维生素C的收率,最高可达到80%以上,而且发酵周期缩短了1/3。据报道,我国一家公司引进一种基因工程菌生产维生素B₂已形成工业化生产,生产规模由年产120t提高到400t,生产成本降低42.8%,发酵周期缩短了一半,发酵单位成倍增长,效价为8000mg/mL以上。

甾体激素类药物对人体起着非常重要的调节作用。甾体激素可分为肾上腺皮质激素、性激素和蛋白同化激素三大类。这些天然的甾体激素,有的可以进行人工合成,有的可利用微生物学或其他方法对已有的化合物进行结构改造而获得生物活性更强的新化合物供临床使用。微生物转化甾体化合物的反应类型,至今已发现的有氧化反应、还原反应、水解反应、酰化反应、异构化反应、卤化反应和A环开环反应等。

在中药现代化中,发酵工程也取得了很大的进展,如用植物细胞反应器工厂化生产紫杉醇、银杏内酯、高蒿素、紫草宁和麻黄素等,用动物细胞反应器还可以生产单克隆抗体、干扰素、生长激素、生长因子和酶等药物。

3. 发酵工程在化工、能源产品中的应用

利用微生物可以生产乙醇、甘油、丙酮丁醇等化工原料和一些表面活性剂,还可以生产乙酸(醋酸)、乳酸、丁酸、苹果酸及水杨酸等有机酸和右旋糖酐等多糖。现在,生物化工已被列为国家

化工领域发展的重点,特别是发展有绿色能源之称的生物质能,一是气态生物能如沼气、氢气等,研制具有广泛应用潜力的新型燃料电池;二是利用农业废弃物生产液态生物能,如甲醇、乙醇等。这样既可以开发无污染的新能源,又可保护生态环境。我国在利用废弃有机物发酵生产沼气方面做出了重大贡献,一些发展中国家把我国誉为“沼气之乡”。据有关部门统计,全国有大型沼气池1 000多座,发酵总容积超过30万 m^3 ,年产沼气逾10亿 m^3 。乙醇纳入能源系统是最理想的再生洁净能源,实验证明,用乙醇作燃料,可使二氧化碳的排放量减少90%,有助于减轻温室效应。在我国,每年有5亿~6亿t农作物秸秆,可利用它制取2亿~3亿t乙醇,潜力非常大。据报道,基因工程用于乙醇生产取得了重大突破,将运动发酵单胞菌的关键酶基因同时转入大肠杆菌中,可实现糖化和发酵同时进行的目的。

能源和环境是可持续发展的重要主题,在可再生和洁净的氢能中,生物物质制氢、储氢具有广阔前景;经基因改良的油料作物,可以生产重要的化工原料。此外,重组微生物的生物降解污染物技术将成为环保的支柱性产业,现已发现多种微生物对土壤、水和空气中的多种污染物具有生物降解作用。在精细化工产品的生产过程中,由于生物催化过程简单、成本低、效益高,使生物技术成为该领域的一支主力军,为化工企业带来了丰厚的经济效益。

4. 发酵工程在农业上的应用

由于DNA重组技术打破了生物物种间远缘杂交的不亲和性,使其应用范围更加广泛。在农业上除直接用于改造植物基因,以获得高产、稳产、优良转基因农作物外,还用于构建抗病虫害农作物及用于防治农作物病虫害的微生物,进行生物防治。在生物防治中,已知苏云金杆菌BT杀虫剂可杀死150多种鳞翅目毛虫,广泛用于谷物、果树、蔬菜、玉米、烟草及森林多种植物的虫害防治中。近年来,科学家对其DNA进行重组,再转化到假单胞菌体细胞内,实现了高效表达,基因工程菌经发酵培养后使菌体灭活,作为杀虫剂获得成功。

近年来,我国科研人员已将水稻、大麦、小麦、棉花、大豆、番茄、白莲和青椒等30余种植物种子通过搭载式卫星或高空气球进行了太空育种,取得了理想的效果。一些微生物经太空育种处理后也获得了新的进展,据报道,一种金针菇经返回式卫星搭载后,比对照菌提前7~10d出菇,增产15%;黑曲霉T101经太空旅行15d后,产生较大变异,选育出糖化酶活力比对照高20%~30%的变异株,这样可大幅度提高黑曲霉的糖化酶活力。实验结果证明,该菌生长速度加快,产酶旺盛期比对照提前12~24h。空间农业和空间育种技术尽管处于起步探索阶段,但是已经展现出其未来的发展前景,该项目的发展将会成为未来农业生产实现新飞跃的巨大动力。培育优质、高产、高效及多抗的农作物新品种是我国农业可持续发展的关键。菌种选育在提高作物产量、增加品种、改善栽培条件和遗传学研究方面发挥了重大作用。

利用发酵工程生产出来的抗生素在农业中有广泛的用途。由于抗生素具有内吸杀菌的特点,所以当抗生素用于防治植物病虫害时,使防病方法从体外保护进入内吸治疗,是植物病理学的一大发展。如灰黄霉素、放线菌酮等许多抗生素,能防治植物的真菌病和细菌病,其中大多属于内吸杀菌剂。目前,用抗生素防治水稻病害,如稻瘟病、纹枯病和白叶枯病等方面取得了很大成绩。用灭瘟素防治稻瘟病以替代汞、砷等化学农药,用春雷霉素、庆丰霉素防治稻瘟病,用有效霉素防治水稻纹枯病,用灭胞素防治水稻白叶枯病等。抗生素比有机合成农药喷洒浓度低而疗效高,并且容易被土壤微生物分解,不致污染环境,对食物的污染危险小,不会在人体内积累,很有发展前途。

5. 发酵工程在环境保护中的应用

人类对环境资源的过度利用,严重地破坏了地球的生态环境,如何处理、分解已经存在并继续产生的垃圾和存在于大气、土壤、水体中的有毒物质,是人类面临的严峻挑战。利用发酵工程治理环境污染,具有效率高、成本低、不存在二次污染等特点,受到了人们的广泛关注。特别是生物垃圾又是制造许多有重要经济价值产品的原料,在当今世界人口膨胀、食品和能源资源不足的情况下,对资源的充分再利用就显得意义更加重大。

利用微生物可以消除废水、废气、废渣对环境的污染。对有毒废弃物的微生物处理技术主要包括厌氧发酵法和需氧发酵法。前者利用专性厌氧微生物,如梭菌、拟杆菌和丁酸弧菌等;兼性厌氧菌,如大肠埃希氏菌(大肠杆菌)、芽孢杆菌等用于沼气、肥料和饲料的发酵。后者还可以在在有氧条件下,利用某些产生菌胶的细菌和某些原虫的混合物处理工业和生活污水和废气。

第四节 发酵工程发展简史

1. 传统发酵工程——经验发酵技术时期

人类利用微生物的代谢产物作为食品和医药,已有几千年的历史了。酿酒是人类最早通过实践所掌握的生物技术之一。大约在公元前 6000 年,就有人开始用大麦芽酿造啤酒。公元前 2000 年,人类已经会用葡萄酿造葡萄酒。我国在公元前 221 年就会制酱、酿醋和豆腐乳,其后还有制备酱油、泡菜、奶酒、干酪及面团发酵、粪便和秸秆沤制等历史。这些产品都是数千年来凭借人类的智慧和经验,在没有亲眼见到微生物的情况下巧妙地利用微生物所获得的产品。那时人们不知道发酵和微生物的关系,当然也就不会人为地控制发酵过程,生产只能凭经验,属于天然发酵时期。

2. 第一代发酵工程——纯培养发酵技术时期

1680 年荷兰人安东尼·列文虎克制成了显微镜,使人们第一次用肉眼看到了微生物。19 世纪中叶,法国生物学家巴斯德用实验证明了酒精发酵是由活酵母引起,发酵现象是由微生物进行的化学反应。同时证明,不同的微生物在发酵过程中具有不同的生化反应。19 世纪末,德国的布赫纳用磨碎的酵母细胞制成酵母汁,加入大量蔗糖后也发现有乙醇(酒精)形成,从而进一步说明磨碎的酵母细胞同样能使糖液发酵成酒精,并将此具有发酵能力的物质称为酒化酶。至此,发酵现象的真相才真正被人们了解。随后,柯赫发明了固体培养基,得到了微生物的纯培养物,由此建立了单种微生物的分离和纯培养技术。在纯种培养技术建立之前,对微生物的利用还是天然发酵时期,使用的微生物往往是混合菌种,而后则是靠人类的智慧控制微生物的生态系统,才把单一的微生物菌种用于各种发酵工业,在产品防腐和稳定质量等方面起到了重要作用。从 19 世纪末到 20 世纪 30 年代之间这段时期的产品有面包酵母、甘油、乙醇、丙酮、丁醇、乳酸、柠檬酸、淀粉酶和蛋白酶等,主要是一些厌氧发酵和表面固体发酵产生的初级代谢产物。在这个时期值得提出的是在丙酮丁醇发酵生产中,为防止杂菌的侵入,建造了用低碳钢制造的圆柱形发酵罐,并采用加压蒸汽灭菌和无菌接种技术,为丙酮丁醇发酵解决了染菌问题,同时也为 20 世纪 40 年代需氧发酵的成功奠定了基础。

3. 近代发酵工程——深层培养发酵技术时期

1928年,英国细菌学家弗莱明发现了能抑制葡萄球菌生长的点青霉,其产物称为青霉素。这一发现在当时并没有引起人们的高度重视。到了20世纪40年代,第二次世界大战爆发,对抗感染药物的极大需求促使人们重新研究了青霉素。由于青霉素生产是需氧发酵,很容易受到杂菌污染,所以就借鉴了丙酮丁醇发酵的经验,成功地建立起深层通气培养法和一整套培养技术,其中包括向发酵罐内通入大量的无菌空气、通过搅拌器将无菌空气打成细泡并均匀分布、培养基的灭菌和无菌接种等,使培养过程中的温度、pH、通气量和营养物的供给等都得到了控制。这些技术为以后的微生物工业提供了新的概念和模式,成为当代微生物工业兴旺发达的开端。青霉素发酵从最初的表面培养发展成为深层培养,并不断改善培养条件。为了提高菌种的生产能力,同时开展了改良菌种的技术并获得很大成功。其间,青霉素的提取工艺也取得了迅速进展。经过半个世纪多的努力,目前青霉素的发酵水平、提取收率和质量有了大幅度的提高,从而推动了抗生素工业乃至整个发酵工业的快速发展,这是发酵工业的一个里程碑。1944年,瓦克斯曼发现了由链霉菌产生的链霉素,用于治疗结核杆菌引起的感染有特效。这个发现使人们对从土壤中寻找放线菌产生的新型抗生素充满了信心。此后陆续发现了抗革兰氏阴性、抗革兰氏阳性、抗病毒的广谱抗生素如氯霉素、金霉素和土霉素,抗真菌的制霉菌素,对青霉素耐药菌有一定疗效的红霉素以及抗肿瘤抗生素丝裂霉素C等。自1929年至1959年的30年间,从土壤中分离得到的能用于医疗的抗生素就有30多种。

4. 现代发酵工程——定向育种发酵时期

20世纪50年代是一个近代发酵工业的鼎盛时代,新产品、新技术、新工艺和新材料不断出现,生产规模和应用范围不断扩大。氨基酸发酵工业、酶制剂工业和有机酸工业获得了突出的发展,这时期的产品较多,有抗生素、氨基酸、核苷酸、酶制剂、有机酸、多糖、单细胞蛋白和维生素等,还有生物转化、酶转化的产品等。20世纪60年代初期,许多国家在开发微生物菌体作为饲料蛋白的研究中,促使发酵工业取得了许多进展。在此以前,所用的发酵罐是规模较小的机械发酵罐,由于微生物菌体蛋白的售价很低,需要扩大生产规模来降低成本,于是开发出了氧传递率高的加压喷射发酵罐和加压循环发酵罐,以更换传氧效率低的机械搅拌罐。为进一步提高经济效益,还开发出了连续培养技术。

20世纪中叶,DNA结构的发现使发酵工业进入了分子水平。DNA重组技术和原生质体融合技术可以生产出诸如胰岛素、生长激素、干扰素、乙肝疫苗、血凝因子和促红细胞生成素等。这些现代生物技术产品价值很大,社会效益巨大,是方兴未艾的高新技术产业。哺乳动物的活性蛋白基因在微生物细胞中也已经得到克隆和表达,这些都是现代发酵工程的重要进展。发酵工业现已扩展到动物和植物细胞的培养领域中,使过去只能从动植物中提取的一些产品,现在也能成为发酵产品。同时,发酵工艺及其程序控制的研究也得到了迅速发展,利用计算机控制发酵、固定化细胞连续发酵等都为发酵工业带来了重大变化,固定化细胞发酵已用于厌氧发酵的酒精工业生产中,取得了很好的效果,新的生物反应器和传感器的开发和使用在发酵工艺的控制中占有相当重要的位置,促进了生产水平的提高。因此,现在的发酵工程已经不是单纯的天然微生物的发酵,而是包括天然微生物、人工组建的工程菌和动、植物细胞等生物细胞的培养,形成了新型的发酵。

第五节 发酵工程的发展趋势

从世界范围的发展情况看,生物技术已成为发达国家科技竞争的热点。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;将发酵与提取相偶合是当今的一个热门课题,例如将萃取与发酵相偶合的萃取发酵;超临界 CO_2 萃取发酵以及膜过滤与发酵相偶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。

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获得商业化的产品。因此,发酵工程是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。生物技术的产生和发展涉及许多学科,随着遗传学、微生物学、细胞生物学、动物学、植物学、生物化学、分子生物学、化学与化学工程学、量子生物学、应用物理学、电子学及计算机科学等基础和学科及技术的发展,发酵工程必将发生新的变化并为人类创造出更大的经济效益。

思 考 题

1. 发酵工程的应用范围有哪些方面？
2. 发酵工程的特点是什么？
3. 液体深层培养法发酵包括哪几个过程？
4. 发酵工程的发展趋势是什么？

► 知识目标

- 了解工业发酵常见微生物及其代谢产物。
- 了解各种菌种保藏原理以及主要菌种保藏机构。
- 理解次级代谢产物与初级代谢产物的关系。
- 理解工业发酵对生产菌种的要求及菌种来源。
- 掌握自然选育、诱变育种的操作要点。
- 掌握菌种保藏中常用方法的操作要点。

► 能力目标

- 能利用自然选育技术对生产菌种进行纯种分离或复壮。
- 能利用诱变育种技术对生产菌种进行紫外线诱变或化学诱变选育。
- 能对生产菌种进行合理保藏。

工业发酵生产水平的高低取决于生产菌种、发酵工艺和后提取工艺三个因素,其中拥有良好生产菌种是前提。从自然界分离到的菌种,往往生产能力低下而不能满足工业发酵的需要。因为在正常生理条件下,微生物依靠自身代谢调节系统,趋向于快速生长和繁殖,而发酵工业则需要微生物积累大量的代谢产物。为此,必须通过育种技术和控制培养条件打破菌的正常代谢,使之按照人们要求的代谢方向积累目的产物。除了提高产量,菌种选育还能提高产品质量、改善加工工艺和开发新产品。在科学研究中,通过菌种选育还可以了解菌种的遗传学性质。因此,在生产 and 科研中,菌种选育都具有重要意义。

第一节 工业发酵生产菌种

自然界微生物资源非常丰富,目前已经初步研究的不超过自然界的微生物总数的 10%。微生物的代谢产物达数千种,而进行大规模工业生产的也仅为 100 多种。在工业发酵工程中,经常用到的生产菌种是细菌、放线菌、酵母菌和霉菌。

一、工业发酵微生物及其代谢产物

(一) 微生物代谢产物的类型

1. 初级代谢产物