

MODERN
MICROBIAL FERMENTATION
AND TECHNOLOGY

现代微生物发酵 及技术教程

罗大珍 林稚兰 主编



北京大学出版社
PEKING UNIVERSITY PRESS

现代微生物发酵及技术教程

主 编 罗大珍 林稚兰

编 委 (按姓氏笔画为序)

朱厚础 陈洪章 罗大珍

林稚兰 陶增鑫 高年发

夏焕章 韩贵安 管作武



北京大学出版社
PEKING UNIVERSITY PRESS

内 容 简 介

本书的主要特点是突出了发酵技术的共性,并且紧密联系生产实践。共分十四章,包括菌种的选育和保藏,微生物的代谢调控理论,发酵工程学基础,发酵产物的提取和纯化,酶及细胞固定化,基因工程育种,氨基酸、核苷酸、有机酸、抗生素、生理活性物质及酶制剂的发酵,发酵工业废弃物的生物处理等。由于本学科的实践性强,所以在阐明理论的同时,还将有关实验编入,供选择使用。

本书可作为综合性大学及师范院校的生物工程专业、环境工程专业、制药工程专业的本科生、研究生使用,也可供研究机构、工厂等科技人员参考。

图书在版编目(CIP)数据

现代微生物发酵及技术教程/罗大珍,林稚兰主编. —北京:北京大学出版社,2006.9

ISBN 7-301-09922-3

I. 现… II. ①罗… ②林… III. 发酵学:微生物学—高等学校—教材 IV. TQ920.1

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2005)第 125633 号

书 名: 现代微生物发酵及技术教程

著作责任者: 罗大珍 林稚兰 主编

责任编辑: 郑月娥

标准书号: ISBN 7-301-09922-3/Q·0108

出版发行: 北京大学出版社

地 址: 北京市海淀区成府路 205 号 100871

网 址: <http://www.pup.cn>

电 话: 邮购部 62752015 发行部 62750672 编辑部 62752038 出版部 62754962

电子邮箱: zye@pup.pku.edu.cn

印刷者: 北京大学印刷厂

经 销 者: 新华书店

787 mm×1092 mm 16 开本 23.25 印张 580 千字

2006 年 9 月第 1 版 2006 年 9 月第 1 次印刷

定 价: 39.00 元

未经许可,不得以任何方式复制或抄袭本书之部分或全部内容。

版权所有,侵权必究

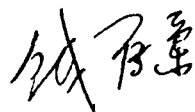
举报电话:010-62752024 电子邮箱:fd@pup.pku.edu.cn

序

从远古人类不自觉地利用微生物发酵制作酒、醋,到有意识地选择特种微生物利用其代谢产物并进行工业化生产,特别是到了上世纪 40 年代抗生素生产的出现,将微生物发酵的规模从作坊扩大到工厂,从手工操作发展为机械化生产,形成了一项规模巨大、新兴的微生物工业。随着微生物学、分子生物学、遗传学、生物化学,以及现代生物技术,特别是基因工程、细胞工程等领域的飞速发展和应用,加上与工程有关的学科如化学工程、机械制造、计算机等多学科的相互渗透,微生物发酵的产品真可说是日新月异,应用的范围不断扩大,以现代微生物发酵工程为基础建立起来的崭新的微生物工业必将在本世纪为人类生活和健康水平的提高、为世界经济和社会的发展,以及为科学和文化事业的进步,发挥不可限量的作用。

这本书的编者是由跨科研及院校单位组成的。他们将自己多年积累的教学经验和在本学科各个领域所取得的丰硕成果,根据这门课程的要求精心设计,组织筛选。使教材内容丰富,既具基础性,也对学科的当前现状、研究前沿以及发展趋势有所体现。由于本学科的实践性很强,在介绍重点产品的发酵实例时,注意到理论与实践的结合,其中不少是编者个人的经验之谈。最近半个多世纪以来,因基因工程和现代科学技术迅猛发展的影响,微生物发酵这门科学被赋予了更多更新的内容。

任何发酵产品都是以实验室的研究成果为基础,逐步扩大为中试,最后达到生产规模的水平。因此本书所附的实验部分针对学科的特性,选择了若干具代表性的微生物发酵内容,其中包括基础性的操作技术、发酵过程中常用的检测方法和现代生物技术,可使学生在接触生产实际以前具有更好的动手操作和解决问题的能力,对那些想开发某种新产品的科研或技术人员也能有所启发及帮助。



2006 年 1 月

前 言

现代发酵工程是在传统发酵的基础上与 DNA 重组、细胞融合等新技术紧密结合而发展起来的现代生物技术。在这个领域里,新菌种、新技术、新工艺、新产品不断涌现,它具有高速拓展的势头,以崭新的面貌展现在世人面前,吸引着人们去研究、开发。

编写本书的主导思想是向学生和读者较全面地介绍国内外现代发酵工程的基本原理、方法和最新进展。主要特点是突出发酵技术的共性,并且紧密联系生产实践,不仅阐述了理论和应用,还介绍了目前国内外现代发酵工业重点产品生产的新工艺、应用现状和研究进展。本书共分 14 章,内容包括:菌种的选育和保藏,微生物的代谢调控理论,发酵工程学基础,发酵产物的提取和纯化,酶及细胞固定化,基因工程育种,氨基酸、核苷酸、有机酸、抗生素、生理活性物质、酶制剂等的发酵,发酵工业废弃物的生物处理等。由于本学科的实践性强,所以在阐明理论的同时还将有关实验编入,供选择使用。

本书适用于理工科院校生物工程专业、制药工程专业和环境工程专业的本科生和研究生,也可供有关专业的大专生和从事工业微生物发酵生产和研究工作的人员参考。本书内容较多,超出规定的学时数要求。教师可根据实际情况选择使用,有些内容可供学生拓宽知识面和自学之用。

参加本书编写工作的都是长期工作在相关学科第一线的专家。编写的分工为:北京大学生命科学学院罗大珍(第 1,2,6 章,第 4 章 1,5~7 节,第 10 章 4,5 节)和林稚兰(第 3,9 章)、中国军事医学科学院基础所朱厚础(第 5 章及第 7 章 5 节)、沈阳药科大学夏焕章(第 7 章 1~4 节)、天津科技大学生物工程系高年发(第 8 章,第 4 章 1~4,8~9 节,第 10 章 1~3 节)、北京大学医学部药学院管作武(第 11 章)、华北制药厂韩贵安(第 11 章)、中国科学院微生物研究所陶增鑫(第 12 章)、中国科学院过程工程研究所陈洪章(第 13,14 章)。参加本书编写的还有青年教师中国科学院过程工程研究所徐建、北京大学生命科学学院洪龙。由罗大珍、林稚兰主编。

本书由钱存柔、孙万儒教授审阅,提出了许多宝贵的意见和建议,在此表示衷心的感谢。本书出版过程中,北京大学出版社郑月娥等编辑为本书的出版付出了大量心血,北京大学出版社王营新提供部分绘图帮助,在此,一并表示深切的谢意。

发酵工程涉及面广而精深。随着高科技的迅猛发展,新技术不断涌现,很难完整地把国内外有关的先进技术反映出来,兼之限于主编的水平有限,肯定存在错误和不足之处,敬请同行和读者批评指正。

编 者

2006 年 2 月

目 录

1 绪论	(1)
1.1 现代微生物发酵的研究内容和特点	(1)
1.1.1 发酵及发酵微生物	(1)
1.1.2 现代微生物发酵工程研究的内容	(2)
1.1.3 微生物发酵的特点	(2)
1.1.4 微生物发酵工程在生物技术产业中的地位	(2)
1.2 微生物发酵工程的发展简史	(3)
1.2.1 天然发酵阶段	(4)
1.2.2 纯培养技术的建立	(4)
1.2.3 深层培养(通气搅拌)技术的建立	(5)
1.2.4 代谢控制发酵技术的建立	(5)
1.2.5 发酵原料的改变	(5)
1.2.6 基因工程引入发酵	(5)
1.3 现代微生物发酵工程的应用	(6)
1.3.1 营养丰富的发酵食品日益增多	(6)
1.3.2 医药和保健食品蓬勃发展	(6)
1.3.3 减缓资源、能源危机	(7)
1.3.4 深入广泛地改善环境	(7)
复习和思考题	(8)
2 微生物的菌种选育和保藏	(9)
2.1 微生物发酵的关键因素——菌种	(9)
2.1.1 现代发酵工程中常用的微生物菌种及其代谢产物	(9)
2.1.2 发酵工业对微生物菌种的要求	(12)
2.1.3 从自然界选种	(12)
2.1.4 从生产中选种	(17)
2.2 微生物选育种	(17)
2.2.1 诱变育种	(18)
2.2.2 变异菌的筛选方案	(24)
2.3 杂交育种	(28)
2.3.1 细菌的杂交育种	(28)
2.3.2 真菌的杂交育种	(30)
2.4 原生质体融合育种	(32)
2.4.1 亲株的选择	(32)
2.4.2 原生质体制备	(33)
2.4.3 原生质体再生	(33)

2.4.4	原生质体融合	(34)
2.4.5	融合子的检出与鉴定	(34)
2.4.6	原生质体再生率和融合率计算	(35)
2.4.7	原生质体电融合技术	(35)
2.5	菌种退化、复壮和保藏	(35)
2.5.1	菌种的退化现象与复壮	(36)
2.5.2	菌种的保藏	(37)
2.5.3	国内外主要的菌种保藏机构	(40)
	复习和思考题	(40)
3	微生物发酵的代谢调节与控制	(41)
3.1	糖、醇、有机酸发酵的代谢调控	(41)
3.1.1	葡萄糖的分解代谢	(41)
3.1.2	厌氧发酵机制	(47)
3.1.3	好氧发酵机制	(50)
3.1.4	糖分解代谢中的调节	(53)
3.2	氨基酸发酵的代谢调控	(56)
3.2.1	氨基酸的生物合成	(56)
3.2.2	氨基酸发酵机制	(60)
3.3	抗生素发酵的代谢调控	(63)
3.3.1	次级代谢产物生物合成的主要途径	(64)
3.3.2	抗生素发酵调控机制	(65)
3.3.3	抗生素生物合成途径的遗传控制	(69)
	复习和思考题	(70)
4	微生物发酵工程概述	(71)
4.1	微生物发酵类型	(71)
4.1.1	按微生物对氧的要求分类	(71)
4.1.2	按微生物发酵采用的培养基状态分类	(71)
4.1.3	发酵的一般工艺过程	(72)
4.2	原料的选择及处理	(73)
4.2.1	选择合适的原料	(73)
4.2.2	淀粉水解糖的制备	(73)
4.2.3	糖蜜预处理	(78)
4.3	灭菌与空气净化工程	(79)
4.3.1	培养基湿热灭菌方法及设备	(79)
4.3.2	空气净化及设备	(82)
4.4	微生物发酵(反应)动力学	(85)
4.4.1	微生物发酵(反应)动力学数学模型建立的原则	(85)
4.4.2	微生物发酵(反应)动力学数学模型	(86)
4.5	菌种的培养	(91)

4.5.1 菌种扩大培养	(91)
4.5.2 发酵阶段的条件控制	(92)
4.6 发酵过程的分析检验	(96)
4.6.1 生物学检验	(97)
4.6.2 生化检验	(97)
4.6.3 杂菌和噬菌体的污染、防治与挽救	(98)
4.7 发酵培养方法	(100)
4.7.1 分批发酵	(101)
4.7.2 连续发酵	(102)
4.7.3 补料分批发酵	(103)
4.7.4 混菌发酵	(104)
4.8 发酵设备	(104)
4.8.1 微生物发酵设备类型及发展趋势	(104)
4.8.2 通风固态发酵设备	(105)
4.8.3 通风发酵设备	(106)
4.8.4 厌氧发酵设备	(111)
4.9 计算机在发酵过程中的应用	(111)
复习和思考题	(112)
5 发酵产物的分离纯化	(113)
5.1 下游加工过程概述	(113)
5.1.1 下游加工过程的重要性	(113)
5.1.2 下游加工过程的特点	(113)
5.1.3 下游加工过程的一般流程	(113)
5.2 发酵液的预处理与固-液分离	(114)
5.2.1 发酵液的预处理	(114)
5.2.2 发酵液的相对纯化	(115)
5.2.3 固-液分离过程及设备简介	(115)
5.2.4 微生物细胞的破碎	(117)
5.3 发酵产物的初分离	(119)
5.3.1 沉淀法	(119)
5.3.2 萃取法	(121)
5.3.3 膜分离法	(126)
5.3.4 吸附法	(128)
5.3.5 离子交换法	(129)
5.4 发酵产物的纯化	(131)
5.4.1 液相层析法	(132)
5.4.2 结晶法	(136)
5.5 产物的干燥	(138)
5.5.1 喷雾干燥	(138)

5.5.2	气流干燥	(138)
5.5.3	沸腾干燥	(139)
5.5.4	冷冻干燥	(139)
复习和思考题		(140)
6	固定化酶及细胞	(141)
6.1	固定化酶的制备	(141)
6.1.1	固定化酶的定义	(141)
6.1.2	载体的选择	(141)
6.1.3	固定化酶的制备方法	(142)
6.1.4	固定化酶反应器	(145)
6.2	固定化细胞的制备	(146)
6.2.1	固定化细胞的制备方法	(146)
6.2.2	固定化细胞的类型及生理状态	(148)
6.2.3	固定化细胞的特性	(148)
6.2.4	固定化细胞的优缺点	(150)
6.2.5	固定化酶和细胞的应用	(150)
复习和思考题		(152)
7	基因工程与微生物工程菌的构建	(153)
7.1	基因工程菌的构建简介	(153)
7.1.1	基因工程的概述	(153)
7.1.2	目的基因的获取	(153)
7.1.3	表达载体的构建与筛选	(155)
7.1.4	基因重组	(157)
7.1.5	原核细胞的转化、重组体的筛选与鉴定	(158)
7.2	基因工程菌的不稳定性及其对策	(160)
7.2.1	质粒的不稳定性	(160)
7.2.2	提高质粒稳定性的方法	(160)
7.2.3	重组工程菌的培养	(161)
7.3	高密度培养	(165)
7.3.1	高密度培养的定义	(165)
7.3.2	影响高密度培养的因素	(165)
7.3.3	如何达到高密度培养	(167)
7.4	基因工程在生产生物小分子中的应用	(169)
7.4.1	生产维生素	(169)
7.4.2	生产氨基酸	(169)
7.4.3	生产抗生素	(171)
7.5	基因工程在生产生物大分子中的应用	(174)
7.5.1	生产黄原胶	(174)
7.5.2	生产合成橡胶	(175)

7.5.3 生产生物可降解塑料	(176)
复习和思考题	(177)
8 氨基酸发酵	(178)
8.1 概述	(178)
8.1.1 氨基酸生产方法	(178)
8.1.2 氨基酸的应用	(178)
8.2 氨基酸发酵菌种选育及发酵调控	(179)
8.2.1 用于氨基酸发酵的微生物	(179)
8.2.2 氨基酸产生菌的选育	(180)
8.2.3 氨基酸发酵调控	(183)
8.2.4 氨基酸的提取和精制	(185)
8.3 谷氨酸发酵	(185)
8.3.1 谷氨酸生产概述	(185)
8.3.2 谷氨酸发酵的微生物	(185)
8.3.3 糖质原料谷氨酸发酵	(187)
8.3.4 谷氨酸的提取和精制(味精制造)	(193)
8.4 赖氨酸发酵	(196)
8.4.1 赖氨酸生产概述	(196)
8.4.2 赖氨酸发酵的微生物	(199)
8.4.3 糖质原料赖氨酸发酵	(200)
8.4.4 赖氨酸的提取和精制	(203)
复习和思考题	(204)
9 核苷、核苷酸类物质发酵	(206)
9.1 概述	(206)
9.2 核苷酸类物质产生菌的分离和选育	(207)
9.2.1 核苷酸类物质产生菌的分离	(207)
9.2.2 核苷酸类物质产生菌的选育	(207)
9.2.3 利用基因工程技术构建核苷、核苷酸工程菌株	(208)
9.3 发酵法生产核苷、核苷酸	(208)
9.3.1 肌苷及肌苷酸发酵	(208)
9.3.2 鸟苷及鸟苷酸发酵	(215)
9.3.3 腺苷、腺苷酸和其他核苷酸类似物发酵	(219)
复习和思考题	(220)
10 有机酸发酵	(221)
10.1 概述	(221)
10.2 柠檬酸发酵	(221)
10.2.1 柠檬酸发酵的微生物	(222)
10.2.2 柠檬酸发酵工艺及控制条件	(223)
10.2.3 柠檬酸的提取和精制	(224)

10.3	乳酸发酵	(227)
10.3.1	乳酸发酵的微生物	(228)
10.3.2	乳酸发酵机制、工艺及控制条件	(229)
10.3.3	乳酸的提取和精制	(235)
10.4	苹果酸发酵	(237)
10.4.1	苹果酸发酵的微生物	(238)
10.4.2	苹果酸发酵工艺及控制条件	(238)
10.4.3	苹果酸的提取和精制	(240)
10.5	曲酸发酵	(241)
10.5.1	曲酸发酵的微生物	(242)
10.5.2	曲酸发酵工艺及控制条件	(242)
10.5.3	曲酸的提取	(243)
	复习和思考题	(244)
11	抗生素发酵	(245)
11.1	概述	(245)
11.1.1	主要天然抗生素的微生物来源	(246)
11.1.2	抗生素的分类	(246)
11.1.3	抗生素产生菌选育	(247)
11.1.4	常用抗生素的生产方法	(249)
11.2	青霉素发酵生产	(249)
11.2.1	青霉素产生菌	(249)
11.2.2	青霉素分子结构	(249)
11.2.3	青霉素的作用机制、抗菌谱及稳定性	(250)
11.2.4	青霉素发酵工艺流程及发酵控制	(251)
11.2.5	青霉素提取	(252)
11.2.6	青霉素的精制	(254)
11.2.7	溶媒回收	(255)
11.3	半合成抗生素	(255)
11.3.1	半合成青霉素	(256)
11.3.2	头孢菌素	(259)
11.3.3	非典型 β -内酰胺类抗生素	(262)
11.3.4	半合成大环内酯类抗生素	(265)
11.3.5	四环素类抗生素	(266)
11.3.6	氨基糖苷类抗生素	(268)
11.3.7	多黏菌素类抗生素	(270)
	复习和思考题	(271)
12	生理活性物质的发酵	(272)
12.1	发酵法生产维生素	(272)
12.1.1	维生素B ₂ (核黄素)发酵	(273)

12.1.2	维生素 B ₁₂ (钴胺素)发酵	(275)
12.1.3	维生素 C(L-抗坏血酸)发酵	(278)
12.1.4	维生素 A 原(β -胡萝卜素)的生物合成	(282)
12.1.5	维生素 H(生物素)的生物合成	(285)
12.2	辅酶类生产	(285)
12.2.1	辅酶 A(CoA)	(285)
12.2.2	烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD)	(287)
12.2.3	黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD)	(288)
12.3	甾体激素的微生物转化	(288)
12.3.1	甾体激素的分子结构和生理功能	(288)
12.3.2	微生物转化的特点和类型	(289)
12.3.3	微生物转化的生产方式	(290)
12.3.4	微生物转化生产甾体激素的工艺要点	(290)
	复习和思考题	(291)
13	酶制剂的发酵	(293)
13.1	概述	(293)
13.1.1	微生物酶生产简史	(293)
13.1.2	我国酶制剂研究及待改进的问题	(293)
13.2	主要酶的应用	(294)
13.3	酶制剂的生产技术	(295)
13.3.1	α -淀粉酶的生产	(297)
13.3.2	脂肪酶的生产	(298)
13.3.3	蛋白酶的生产	(298)
13.3.4	纤维素酶的生产	(299)
13.4	酶的提纯与精制	(302)
13.4.1	细胞破碎	(302)
13.4.2	絮凝技术	(303)
13.4.3	稳定剂的添加	(304)
	复习和思考题	(304)
14	安全生产与发酵工业废料的再生和净化	(305)
14.1	环境污染与微生物	(305)
14.1.1	生物安全	(305)
14.1.2	水质污染与微生物净化	(306)
14.2	发酵工业废料的再生	(310)
14.2.1	发酵工业废水、糟、渣的处理与利用	(310)
14.2.2	沼气发酵	(312)
14.2.3	利用藻类处理废水	(316)
14.2.4	利用发酵工业废水生产单细胞蛋白	(318)
	复习和思考题	(319)

实验一	利用碱法分离纸浆废液中的微生物·····	(320)
实验二	化学、物理因素复合诱变育种·····	(324)
实验三	黑曲霉发酵生产柠檬酸·····	(327)
实验四	多黏菌素 E 发酵及管碟法测定生物效价·····	(330)
实验五	噬菌体污染的检查 and 鉴定·····	(335)
实验六	纤维素酶固态发酵实验·····	(340)
实验七	酵母菌单倍体原生质体融合·····	(342)
实验八	酿酒酵母细胞固定化与酒精发酵·····	(346)
实验九	工程菌大肠杆菌的高密度发酵及主要生化指标检测·····	(350)
主要参考文献	·····	(353)

1 绪 论

祖先的发酵与酿造技术,是人类利用微生物的开始。但是他们并不知道发酵的主角——微生物的存在,因此几乎几千年来发酵现象一直充满着神秘的色彩。随着人类文明的发展、科学技术的不断进步,发酵技术在近几个世纪得到了迅速的发展,尤其是 20 世纪 70 年代的重组 DNA 技术为标志的现代生物技术的诞生,人们可以操纵细胞遗传机制,使之为人需要服务,这就从根本上扩大了生物系统的运用范围。利用现代生物技术不仅能生产新型食品、药物、饲料添加剂,还能生产特殊化学品,如烷烃发酵生产二元酸,生产可降解的高分子化合物、萜烯类化合物,氨基酸及有机酸等的转化,而这是传统发酵技术及化学合成难以做到的。在解决人类面临的粮食、能源、环境等重大问题上必然会发挥积极作用。现代生物技术的出现,推动了发酵工程的发展,使发酵工程展现出越来越诱人的前景,吸引着人们去关注。

现代微生物发酵是利用微生物生长和代谢活动生产各种有用物质的现代工业,由于它以培养微生物或用经 DNA 重组技术改造过的微生物生产产品,使生物技术服务于国民经济,所以习惯上也称之为现代发酵工业或发酵工程,是微生物学与工程学相结合的科学。

1.1 现代微生物发酵的研究内容和特点

1.1.1 发酵及发酵微生物

发酵(fermentation)一词来自拉丁语“fervere”即“发泡”现象。这种现象是由果汁、麦芽汁或谷类发酵果酒、啤酒、黄酒时产生的二氧化碳气泡引起的。由于当时对微生物缺乏认识,发酵本质长时间没有被揭示,直到 19 世纪中叶巴斯德(Louis Pasteur)经过长期研究,认为发酵是微生物作用的结果。他宣告发酵是酵母菌在进行“无氧呼吸”,酒精发酵过程是在厌氧条件下向菌体提供能量,并且经过原料的分解,得到的产物是酒精和二氧化碳。这一解释与在酒精、乳酸、乙酸、丙酸等厌氧条件下发酵的情况完全适合。随着生物技术的发展,在丙酮-丁醇、抗生素、酶制剂、氨基酸、核苷酸等发酵中,人们发现有的是厌氧的,有的是好氧的;有的有发泡现象,有的却无发泡现象。因此,发酵即“发泡”或“无氧呼吸作用”的定义是不完整的。

生物化学家和工业微生物学家对发酵有不同的看法。从生物化学的角度来说,发酵是指有机物能同时作为电子供体和最终电子受体并能产生能量的过程,其中有机物(代谢中间体)起着氢供体和氧受体两方面的作用;从发酵工程的角度来看,发酵是指利用微生物进行生长和代谢活动,并通过现代化工技术,进行微生物代谢活动形成各种有用产品的过程,包括有氧和无氧呼吸的发酵。随着重组 DNA 技术、原生质体融合技术的发展,人们可构建许多有特殊性能的非纯天然存在的新型细胞(微生物、动物或植物细胞)、酶(可以是游离的或固定化的),并通过发酵的方法生产有用产物。本书重点讨论利用微生物进行的发酵。

微生物发酵是利用微生物细胞进行的。凡利用基质(通常是指多糖分解而得到的单糖,其中葡萄糖是发酵中常用的)生产微生物菌体或其代谢产物的细胞形态的原核微生物(如细菌、放线菌)和真核微生物(如酵母菌、霉菌等)均称为发酵微生物。这些微生物与发酵工程密切相关。

1.1.2 现代微生物发酵工程研究的内容

现代微生物发酵工程是将传统的发酵技术和基因工程、细胞融合工程、酶工程等新技术结合起来的生物技术,并通过现代化工技术生产传统发酵不能生产的产品。它重点研究微生物的生命及其代谢途径,以及优化控制微生物代谢的规律、方法和应用。

微生物发酵是十分复杂的生化反应过程,大致可以分为以下几个组成部分:①菌种的选育及扩大;②最经济地利用环境中的营养物,按照微生物需要确定种子培养基和发酵培养基的配方;③培养基和发酵罐、辅助设备的灭菌;④发酵罐中微生物在最优条件下产物的大规模生产;⑤发酵产物的提取和纯化;⑥发酵工业废液及废料的处理、再生和生产环境的净化等。以上是现代微生物发酵工程研究的主要内容。

1.1.3 微生物发酵的特点

(1) 发酵的催化作用都在细胞内进行 微生物发酵是微生物细胞中各种酶的生物催化作用,这是与化工生产所不同的。发酵的中间步骤大都在细胞内进行,因此副产品少,可减少环境污染。

(2) 很大的比表面积(表面积/体积比) 微生物细胞非常小,并由此而产生很大的比表面积,因而营养物质能够迅速转移到细胞内,以维持细胞有高的代谢速度,例如酵母菌合成蛋白质的速度比豆科植物高几个数量级。这样高的微生物合成速率,使某些微生物菌体能在15~20 min内增长1倍。

(3) 原料来源广,且价格低廉 微生物生长所需要的主要原料为碳源。可从农副产品(淀粉、纤维素等)、工业废水、糖蜜或者二氧化碳(如光能自养菌及藻类等)中获取,也可利用石油、醇类、醋酸及其他再生能源等。这些原料来源广,产量大,而且价格低廉,符合可持续发展战略的要求。利用微生物发酵得到的目的产物成本低,在市场上具有很强的竞争力。

(4) 反应条件温和,生产过程安全 化学反应需要高温、高压等条件,这些都需要耗费较多的能源。微生物发酵过程是在生物体内利用酶的催化作用下进行的,因此生产过程所控制的温度、pH、压力等条件都与细胞内进行的生化反应相似,反应条件十分温和,生产过程十分安全,而且能量利用率高,生物转化反应专一性强,产品的转化率高。

(5) 设备“多能性”,代谢途径多样化 微生物工程设备投资小,且具有“多能性”。不同的微生物发酵产品可用同一种设备或稍加改造,就可进行生产。而且微生物种类繁多,代谢途径多样化,发酵工业已为人类提供了种类繁多的产品。同时利用微生物代谢产物还可发现新化合物的巨大宝库,可以不断地从微生物代谢产物中分离出新的对人类生活和工农业生产有重要意义的新产品。微生物多样性和它们对环境的适应性,也使得它们在环境工程中得到广泛应用,并有着十分广阔的开发领域。

(6) 具有易变异性 微生物本身具有易变异性,人类可以利用基因工程,物理、化学诱变等方法,改变微生物的遗传性质,调节和控制代谢途径,得到原来不能生产的产品,也可不断为提高目标产物的生产水平或生产新的产物提供广阔的前景。

由于微生物发酵本身具有化工生产无可比拟的特点,加上生物技术的不断进步,使发酵工程潜力无穷,涉及范围越来越广。

1.1.4 微生物发酵工程在生物技术产业中的地位

生物技术被列为当今六大高科技(生物技术、信息技术、新材料技术、新能源技术、海洋技

术和空间技术)之一,它包括基因工程、细胞工程、酶工程、发酵工程和生化工程。习惯上也称之为生物工程。从发展上讲这也正标志着生物科学的不同领域和分支开始进入合流阶段。

微生物发酵工程虽然是生物工程的一个分支,却是生物工程产业化的重要环节,例如构建了一个新的菌种,要扩大培养用于生产,必须通过发酵才能实现;植物和动物细胞的产业化也离不开发酵;此外,各种酶制剂的生产、微生物代谢产物的获取也都是发酵的成果。可以说绝大多数生物技术的产业化都需要通过发酵的环节来实现。从这个意义上来说,发酵技术是生物技术产业化的基础。发酵工程又受到新技术和可更新能源的促进,增加了新的内容和手段。

1.2 微生物发酵工程的发展简史

远在有文字记载的历史以前,人类对发酵就已有所应用,但对其本质却长时间没有认识,而始终将它当做神秘莫测的东西。形成发酵工业只有近百年的历史,回顾整个发展进程,大致可以划分为以下几个主要阶段,见表 1.2.1。

表 1.2.1 微生物发酵工程发展简史

年份	科学的发展	发酵技术	发酵工业
		天然发酵	酒类、酱及酱油、干酪等
		↓	
1675	Leeuwenhoek 显微镜发明	纯培养	酵母、酒精、丙酮、丁醇、淀粉酶等
1857	Pasteur 证明发酵由于微生物的作用	↓	
1897	Büchner 证明发酵是酶的作用	↓	
1905	Koch 应用固体培养基分离培养微生物	↓	
1929	Fleming 青霉素的发现	深层培养	抗生素、维生素、有机酸、酶制剂等
1938	Florey, Chain 青霉素的大量生产	↓	
1950	生物化学的发展 木下祝郎谷氨酸发酵技术开始	发酵的代谢调节	氨基酸发酵,核酸发酵
1952	生物化学、酶化学的发展推动 Peterson, Murray 采用微生物进行甾体类药物的转化技术	↓	
1960	原料的改变 石油微生物的研究与应用 微生物消除环境污染	发酵原料的转换	单细胞蛋白及其他利用正烷烃的石油化工产品的发酵生产
1970	分子生物学发展 细胞融合 基因扩增 重组 DNA 技术	应用范围的扩大	污水处理、能源开发、细菌冶金等
		↓	
		遗传工程及生命科学的高度发展	利用工程菌生产干扰素、胰岛素、生长素、激素等
1980	美国最高法院 Diamond 和 Chakrabarty 专利案做出裁定,认为经基因工程操作的微生物可获专利	↓	
		工程菌的发酵制药等工业得到发展	基因工程菌可获专利
1990	微生物学与分子生物学紧密结合,计算机在发酵工艺的应用逐渐推广	↓	
		发酵工程迅速发展	微生物新资源、新代谢产物、新疫苗、抗肿瘤、抗艾滋病等药物都在研究中

1.2.1 天然发酵阶段

我国是世界文明发源最早的国家之一,在长期生产实践中,对利用微生物有悠久的历史,积累了丰富的经验。利用微生物进行谷物酿酒的历史至少可追溯到 4000 年前的龙山文化时期,从龙山文化遗址出土的陶器中有不少饮酒的工具。公元前 14 世纪《书经》一书里有“若作酒醴,尔惟曲蘖”的记载,意思是要酿造酒类,必须用曲蘖。曲是由谷物发霉而成的,蘖就是发芽的谷物。说明那时已用曲与蘖酿酒。此外,在《周礼》中已有利用微生物酿制酱油、醋等食品的记载。哥伦布发现美洲新大陆时,曾发现当地印第安人已在饮用由玉米酿制的烧酒。由于受到科学发展的限制,对这种“发酵”本质的了解直到 19 世纪末仍属一知半解。长期以来处于手工业操作和自然发酵落后状态,生产经常被杂菌污染所困扰。我们祖先并不知道微生物与发酵的关系,产品质量不稳定。将这一时期称为天然发酵时期。

1.2.2 纯培养技术的建立

大约在 300 年以前,安东尼·列文虎克(Antony van Leeuwenhoek)发明了显微镜,可放大 50~300 倍。人们利用显微镜看到了大量的微小生物,敲开了微生物的大门。这引起许多学者的兴趣,纷纷开展研究,但持续 200 年间一直处在对这些小生命的观察中,对这类小生命与发酵的关系仍没有认识。19 世纪欧洲产业革命,要求用科学技术解决生产问题。法国科学家路易斯·巴斯德(Louis Pasteur)研究证明了酒精发酵是由于酵母菌的作用,指出发酵现象是微小生命体进行化学反应的结果。其后,他又研究了乳酸发酵、葡萄酒发酵、食醋酿造等,明确了这些不同类型的发酵是由不同形态类群的微生物引起的。这时微生物才从形态描述阶段进入到生理研究阶段,促进了微生物工业的发展。在这期间,酒的生产 and 养蚕业在国民经济中占有重要地位。当时酒酸败、蚕得病的问题造成资本主义复兴时期经济的巨大损失。巴斯德证明了酒精发酵是由于酵母菌的作用,葡萄酒的酸败是由于酵母菌以外的另一种醋酸菌的污染造成的二次发酵引起的,并发明低温消毒法,挽救了法国葡萄酒酿造业,使之免受酸败的损失。巴斯德消毒法(Pasteurization)一直沿用至今,酒类等饮料的消毒大多均采用此法。巴斯德被誉为“发酵的奠基人”。

19 世纪初,德国的罗伯特·柯赫(Robert Koch)等,首先应用固体培养基分离培养出炭疽芽孢杆菌(*Bacillus anthracis*)、结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)、霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)等病原细菌,建立了一套研究微生物纯培养的技术方法,如细菌分离、培养、接种、染色等。19 世纪中叶丹麦的汉逊(Hansen)建立了啤酒酵母的纯培养方法。巴斯德、柯赫的工作为微生物发酵奠定了坚实的科学基础,开创了人为控制微生物发酵进程的时代。通过上述原理的应用,发酵管理技术得到巨大的改进,酒类、酱油等的变质现象大大减少。发酵技术的进步始终和社会需求相关。第一次世界大战中,德国需求大量甘油用于制造炸药,从而使甘油发酵工业化。英国需要大量的优质丙酮,制造无烟火药的硝化纤维,促进了丙酮-丁醇发酵的发明。后来,又采用灭菌操作,发明了简便的密闭式发酵罐。此时的发酵产品有乳酸、酒精、面包酵母、丙酮、丁醇等厌氧产品和柠檬酸、淀粉酶、蛋白酶等好氧发酵产品。发酵工业逐渐加入到近代化学工业的行列,这是发酵史上第一个转折点。