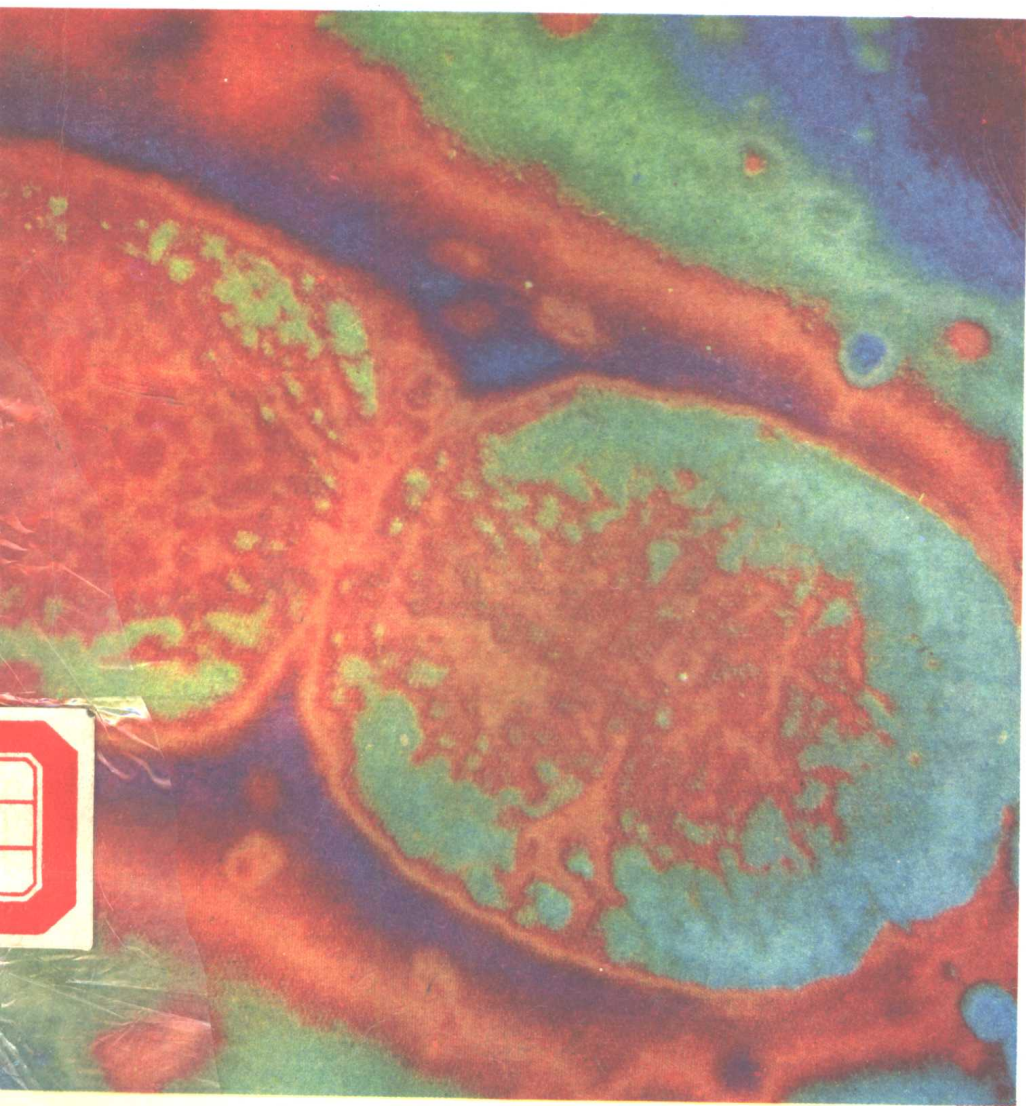


发酵生理学

李友荣 马辉文编著 · 湖南科学技术出版社



发 酵 生 理 学

李友荣 马辉文 编著

湖南科学技术出版社

发 酵 生 理 学

李友荣 马祥文 编著

责任编辑：刘奇玻

•

湖南科学技术出版社出版发行

(长沙市展览馆路8号)

湖南省新华书店经销 湖南省新华印刷二厂印刷

•

1989年11月第1版第1次印刷

开本：850×1168毫米 1/32 印张：13.875 字数：365,000

印数：1—2,300

ISBN 7—5357—0596—0

Q·16 定价：7.25元

地科89—32

前 言

以微生物的生命活动为基础的发酵工业正在为人类生产大量的抗生素、酶、氨基酸、维生素、蛋白质以及其他有用产物，它已经成为人类须臾不可缺少的重要工业部门。在发酵生产过程中，微生物处在比较特殊的生态环境中，它们的活动状况影响着整个发酵过程。为了提高发酵过程的生产效率和创立新的发酵过程，人们必须详细了解和掌握处在发酵条件下的微生物新陈代谢活动的规律，控制微生物生命活动的途径。为此，我们在多年教学中使用的“发酵生理学”和“工业微生物学”讲义的基础上，编写了这本《发酵生理学》。

在此书的编写过程中，湖南科学技术出版社的编辑刘奇琰同志为此书书稿的修改做了大量的工作并提了许多宝贵的建议。我们在此表示衷心的感谢。

本书可供高等院校生物系、医药制造系以及轻化工系有关专业的学生作为教材或教学参考书使用，也可供从事发酵工业生产和科学研究的人员作为参考书使用。由于我们的专业水平有限，书中如有错漏和不妥之处，我们诚恳地希望广大读者批评指正。

华东化工学院生化工程系 李友荣

武汉大学生物系 马辉文

1988年

目录

- 1 微生物的生长 1**
 - § 1.1 生长与分化 1
 - § 1.2 微生物生长的测定 13
 - § 1.3 微生物生长与环境的关系 33
 - § 1.4 微生物生长对营养的需求 48
 - § 1.5 微生物生长和分化的调节 53
- 2 微生物的基础代谢和生物能的转换 63**
 - § 2.1 能量偶合作用 63
 - § 2.2 营养物质和代谢产物的穿膜运输及其控制 74
 - § 2.3 光合作用和自养菌的 CO_2 固定作用 79
 - § 2.4 糖代谢 85
 - § 2.5 需氧代谢过程 91
 - § 2.6 厌氧代谢过程 93
 - § 2.7 糖代谢的调节 110
- 3 合成代谢 119**
 - § 3.1 无机碳、氮和硫的同化 120

§ 3.2	氨基酸的生物合成	126
§ 3.3	核苷酸的生物合成	138
§ 3.4	从乙酸合成脂类	142
§ 3.5	卟啉的合成	152
§ 3.6	糖磷酸酯与‘糖核苷酸’	153
§ 3.7	次级代谢产物特殊前体的生物合成	154
§ 3.8	分解代谢与合成代谢的关系	158
§ 3.9	生物大分子合成的原理	160
§ 3.10	DNA的复制	162
§ 3.11	RNA的生物合成——基因的转录	169
§ 3.12	蛋白质的生物合成	175
§ 3.13	多糖的合成	180
4	微生物代谢调节	189
§ 4.1	微生物代谢调节的生物化学基础	189
§ 4.2	微生物代谢的协调	200
5	次级代谢产物的生物合成及其代谢调节作用	236
§ 5.1	引论	236
§ 5.2	微生物次级代谢作用的调控	241
§ 5.3	以短链脂肪酸为前体的抗生素的生物合成	264
§ 5.4	多肽类抗生素的生物合成	287
§ 5.5	β -内酰胺类抗生素的生物合成	289
§ 5.6	氨基糖苷类抗生素的生物合成与代谢调节	299
§ 5.7	研究生物合成的方法	309
6	发酵动力学与发酵过程控制	314
§ 6.1	发酵动力学	314
§ 6.2	连续培养	322
§ 6.3	发酵参数的检测和控制	353
7	菌种选育与改良	366
§ 7.1	优良生产菌株应具有的特性	366

§ 7.2	优良菌株选育与改良的生理学基础	369
§ 7.3	菌株选育和改良的遗传学基础	372
§ 7.4	菌株选育工作方案	407
§ 7.5	突变菌株筛选技术	412
§ 7.6	突变菌株在发酵工业中的应用	423

微生物的生长

§1.1 生长与分化

在任何生物系统中，生长是生物的所有化学成分有秩序地增长，也是全部生理活动有秩序地相互作用的结果。分化则是使生物的细胞形态和功能因向不同的方向发展而由一般变为特殊的现象，是细胞中的遗传物质转录或转译逐渐受到限制的结果。研究生长可以了解微生物怎样分化、繁殖，在各种环境中怎样适应和保护自己。微生物生长，除了它对人类有害的一面，如致病菌对人的危害，还有其对人类有益的一面。当我们所要的是次级代谢产物时，便存在如何适当控制生产菌的生长问题。如果生产菌浓度 (x) 太低，合成产物的数量 ($Q = q \cdot x$) 不会多，菌生长过于旺盛，(如 $x \gg x_c$) 菌的生产能力 ($q =$ 比生产速率) 降低， Q 也不会高。因此，要获得最大产率必然需要确定一最佳菌体量的控制范围。

为了控制菌体生长,首先要寻求测量各种微生物生长的方法,特别是要寻求含有非细胞固体物质的菌体量测定的可行办法。其次,要了解微生物生长繁殖的方式与工业生产的关系;了解各种环境条件变化对生产菌生长的影响;并设计合理的发酵培养基配方和工艺条件。有许多迹象表明,微生物的分化、产孢子过程与次级代谢产物的生成有某种联系。因此研究微生物的生长分化的调节规律,无疑是发酵调控原理的一个重要组成部分。

一、微生物的生长形式

(一) 细菌生长

尽管细菌种类繁多,但是它们都具有一些很重要的共同特征。细菌通常以二等分分裂法繁殖,如图1.1所示,结果得到两个大小一样的子细胞。细胞生长时,个体增大,其基因组被复制,每个细胞的组分,如蛋白质、核酸等在这期间增加一倍。细胞分裂是由细胞壁的向内生长启动的,最终形成一横断间隔,继而间隔分裂,形成两个相同的子细胞。每个子细胞均保留亲代细胞壁的一半。革兰氏阳性和阴性细菌合成它们的新细胞壁的方式不同。阳性菌是沿着中纬带,而阴性菌是沿着整个细胞壁以居间并生方式合成新的细胞壁。当间隔壁不完全切断时就会导致多个细胞连结而呈链状。杆菌、球菌的细胞壁合成和子细胞之间隔的形成机制尚不完全清楚,但是它们都需要位点专一的启动过程、新细胞壁

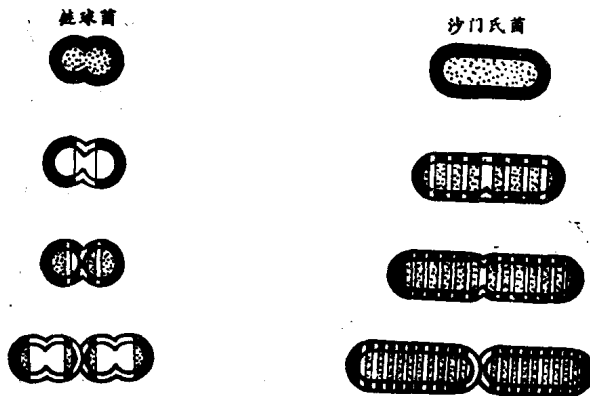


图1.1 新细胞壁成分插入的方式 阴影部分为老细胞壁的组分

成分的插入和各种与新壁合成有关的分解、合成酶的参与。细胞壁在前一次分裂周期中形成的细胞壁中纬带处开始合成，并在新生壁前沿继续合成；间体似乎在新细胞壁合成作用的启动方面和把DNA连接到细胞膜上起作用。

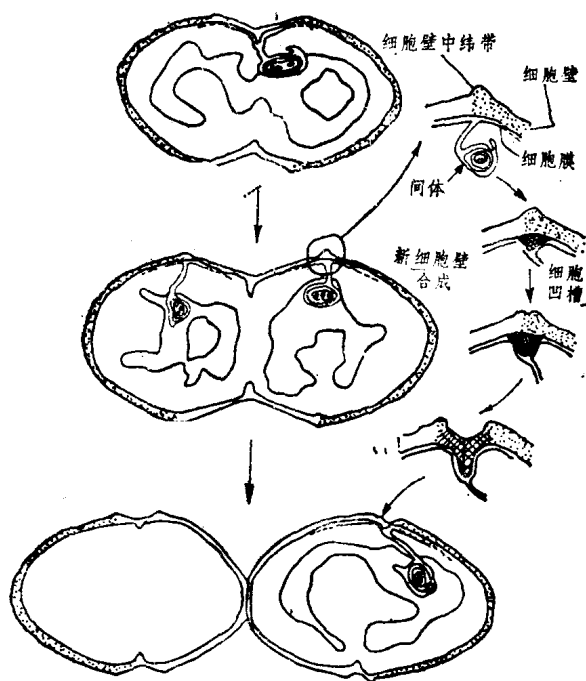


图1.2 粪链球菌细胞壁生长模型

所谓“年老”或“年轻”的培养物是指在培养容器内培养了多长时间。细胞的真正年龄应从前一次分裂算起。测定菌龄的办法之一是，根据细胞中某种对生长无影响的酶的浓度来确定。其方法是通过改变环境，阻碍细胞合成此酶，随着细胞继续分裂，现存的酶被成指数地稀释，从测得的此酶浓度的高低来判断菌龄。细菌在生长过程中数量倍增的时间（世代时间），随其种类不同而不同。某些细菌（如大肠杆菌）在最佳生长条件下为15—20分钟，但在一般情况下为45—60分钟。

(二) 酵母菌生长

酵母菌是真核生物，它不形成分生孢子或气生菌丝，在其生长繁殖周期中，至少部分时间以单细胞形式存在。最常见的细胞分裂方式是出芽繁殖。起初，酵母菌细胞的体积增大，到一定程度便停止扩增；接着，便开始出芽，在出芽期间母细胞加上子芽细胞的总体积保持不变，但是，在芽长大的同时母细胞缩小，如图1.3所示。

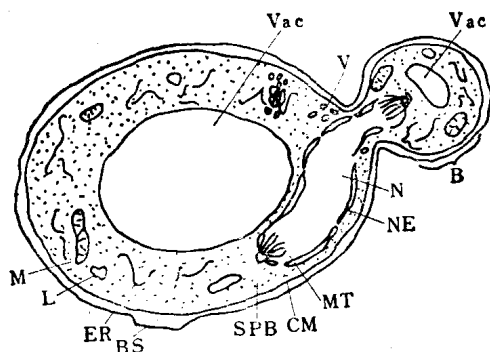


图1.3 萌芽酵母示意图

B, 萌发中的芽; BS, 芽痕; CW, 细胞壁; ER, 内质网; L, 脂质球; M, 线粒体; MT, 纺锤器微管; N, 核; NE, 核外膜; SPB, 中心粒; V, 泡囊; Vac, 液泡

在子细胞和母细胞之间形成横截细胞壁后，芽细胞脱离母细胞而单独生活。新生的子细胞比其母细胞要小一些，最后长成和母细胞一样大小。芽细胞脱离后在母细胞上留下一个可见的芽痕。按芽痕出现的位置，可把酵母芽殖的方式分为二类：一类是多极芽殖，母细胞每次长的芽不出现在同一位置上，如酿酒酵母；而另一类是两极芽殖，母细胞轮番在其两端同一位置上长芽。前一种方式有可能通过芽痕的数目来确定酵母菌的菌龄。而两极芽殖的细胞寿命则难以估算。如果子芽不与母细胞脱离，便形成链状细胞，称之为假菌丝（图1.4）。酵母细胞的大小取决于其生长速率，其倍增所需的时间愈短，细胞体积则愈大。

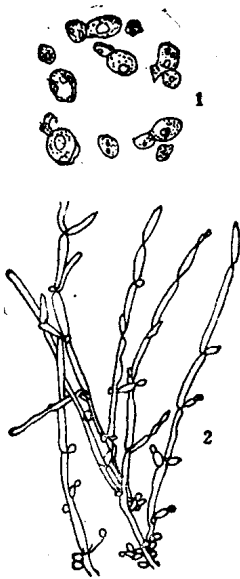


图1.4 热带假丝酵母
1.营养细胞 2.假菌丝

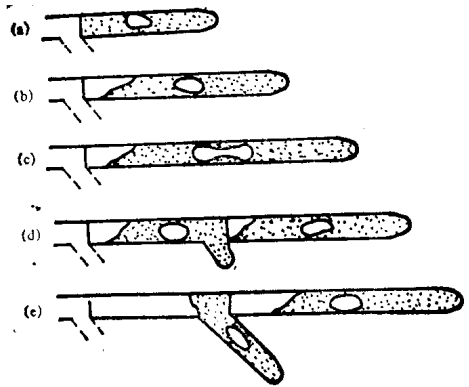


图1.5 一种无孔间隔真菌的分枝方式

(a) 顶端细胞充满细胞质；(b) 顶端伸长；(c) 核分裂；(d) 形成间隔，开始分枝；(e) 细胞质流向新形成的分枝

(三) 丝状微生物的生长

霉菌和放线菌是丝状微生物。其生长方式是菌丝末梢伸长和分枝（图1.5），交错成网状的菌丝称为菌丝体。真菌菌丝的横切面有间隔膜，是多细胞的，而且每个细胞中除含有多个细胞核外还含有各种细胞器。一旦细胞形成便保持其完整性，具有与其相邻细胞不同的菌龄。放线菌、链霉菌和诺卡氏菌均属于放线菌属，为原核生物，革兰氏染色呈阳性。它们缺乏核膜，其菌丝（约1微米）比霉菌（2—10微米）细，故更易折断。

菌丝的长度受遗传型控制，但也与生长环境有关。一般在深层培养时受搅拌器的剪切作用，往往容易形成短的分枝旺盛的菌丝体，或分散生长，或形成直径为0.1—10毫米的菌丝球。环境对处于深层培养下菌丝体生长的形式有很大的影响；反过来，菌丝体的生长形式亦会影响菌丝球内部的理化环境。菌丝球其内部细胞所处的环境与分散生长的细胞所处的环境不同。如图1.6所示，

在菌丝球内营养物质与代谢产物的分布是不均匀的。由于分解代谢和扩散阻力，越接近菌丝球中心，营养物质的浓度越低。菌丝球又大又紧，可能造成内部缺少营养和通气不良而自溶。另一方

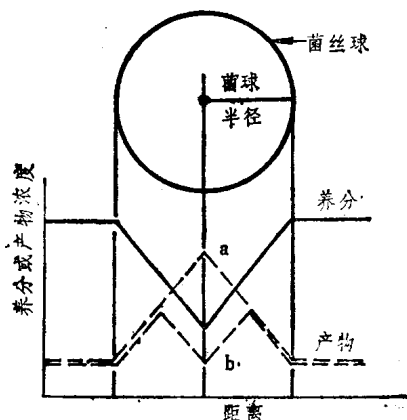


图1.6 菌丝球中养分与产物浓度的分布

- (a) 产物在菌丝球内合成；
(b) 菌丝球中心的细胞是死的或缺少营养的。

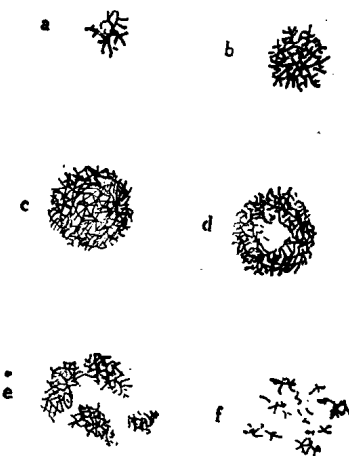


图1.7 产黄青霉各生长阶段的菌丝球形态

- (a—c) 菌丝生长成团, (d—f) 菌丝球破裂自溶

面，由于扩散的限制，菌丝球内部产物浓度比外部高，产物对菌的抑制会使菌丝体的生长处于更不利的环境之中。如图1.7所示，在发酵早期，菌丝球小，处于营养物质丰富的环境中，对生长影响不大。随后，菌丝球逐渐变大，变密实，菌丝球生长主要在球表面进行。菌丝球生长的密实程度受培养条件（如搅拌、供氧、温度）的影响，特别是与碳源的性质有关。产黄青霉菌丝球生长过程中，用葡萄糖作碳源时菌丝球较密实；用乳糖则菌丝球疏松；如果在培养基中加入麸皮粉，而麸皮粉含有过量淀粉时，则使菌丝球疏松；搅拌快时菌丝球密实，搅拌慢时菌丝球疏松；供氧好时菌丝球密实，供氧差时菌丝球疏松。如果溶氧低于某一临界值，菌丝则不形成球，其结果使培养液粘度增加，搅拌困难，溶氧浓度更加降低，致使菌丝体的生长和青霉素合成受到严重影

响。因此，控制产黄青霉菌丝球的生长状况，对于青霉素高产的获得至关重要。菌丝球生长控制适当可使培养液接近牛顿型流体，有利于供氧。而丝状菌发酵一般为非牛顿型流体，对供氧不利。

（四）不对称分裂

最典型的不对称分裂是柄细菌。它分裂形成形态各异的游动细胞和柄细胞（图1.8），游动细胞最后也会变成柄细胞。硅藻的分裂是另一种形式的不对称分裂。在分裂时，硅藻坚固的细胞壁每分裂一次便缩小一次。最后，子细胞小到一定程度便自行减数分裂，并形成复大孢子（Auxospore）。这些孢子发芽后，又恢复为正常的硅藻细胞。

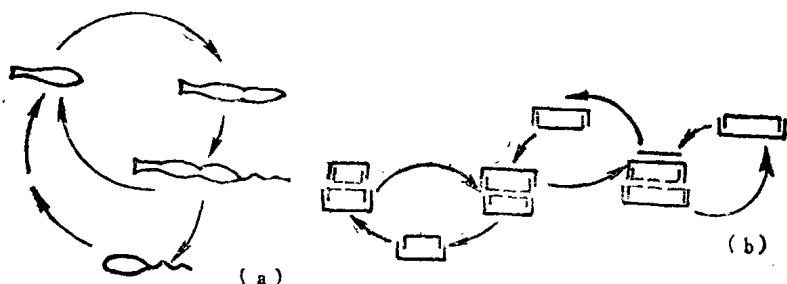


图1.8 不对称分裂生长方式 (a) 柄细胞，(b) 硅藻细胞。

（五）无定形裂殖

绒泡菌是一种真菌。在其生活循环中，为一非细胞状的原生质团，生长期增大而不分裂，形成一大的类似于变形虫的变形原质体，靠细胞质流动而移动。这些变形虫状的细胞质会随意分裂和融合。它们是多核的，其核也同步地分裂。

二、细胞的生长繁殖周期

研究细胞的生长繁殖周期是在细胞的群体生长的基础上进行的。群体生长是指细胞的数目或全部细胞物质的质量的增加。所谓细胞周期是母细胞分裂形成子细胞、子细胞再分裂的这两次细胞分裂活动的时间间隔。研究细胞周期将有助于我们建立发酵过程的动力学模型。

（一）同步培养

在微生物培养过程中的许多细胞是处在不同生长阶段。在这样一种由不同个体组成的非均态群体里，用传统的生化分析法测量得到的某些生理参数只是其群体的平均值，而不能代表个体细胞某一周期的特征。为了克服这一困难，已设计了一些巧妙的同步培养技术。其中一种常用的选择性同步法可以很快地收集处于同一生长阶段的细胞。该方法是将细胞附着在固体支持物上，当新生的子细胞形成时便把它们洗下来（图1.9），任何一刻离开支

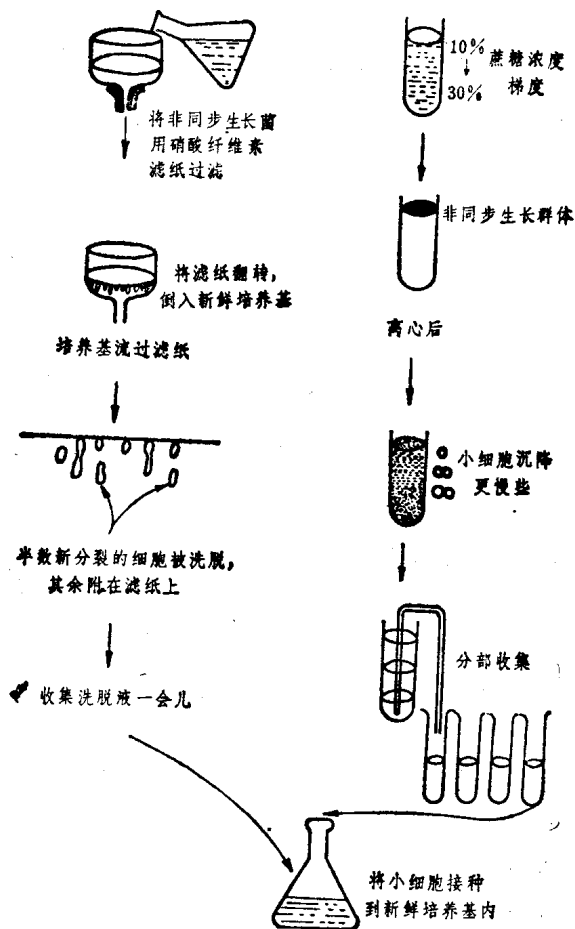


图1.9 获得同步培养物的方法

A为膜洗脱法，只适用于那些能附着在膜上的菌，B为区带离心法

持物的细胞便具有相同的菌龄，因而是同步的。另一种做法是将细胞悬浮液进行密度梯度离心，处在细胞周期不同阶段的细胞，因其大小和密度不同而被分开。这样，从某一密度带便可获得同质的群体，然后置于培养基中让其生长。若随后监测细胞数量随时间的变化状况，可望得到一种阶跃式的细胞数目增长的模式。如图1.10所示，至少在两个周期中细胞群体保持同步生长。同步培养技术为个体特性提供了有效的放大。仔细观察图1.10会发现，

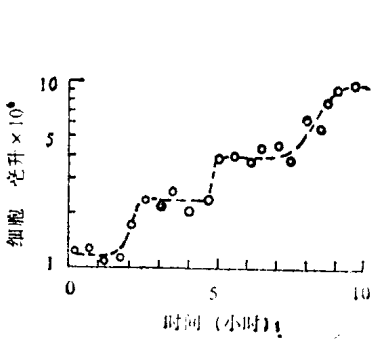


图1.10 酵母同步培养
细胞阶跃式增长，便于详尽研究细胞在不同生长阶段的许多生理特征。

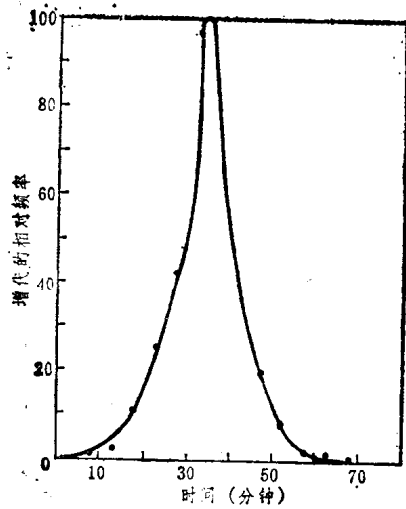


图1.11 产气气杆菌的群体细胞增代频率

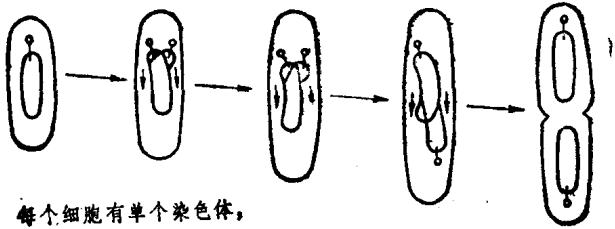
随着生长的继续，同步现象似乎逐渐消失，这时细胞数目的阶跃式增长模式让位于连续性生长模式。与此同时，细胞群体也失去其同质性。这种现象的出现是由于细胞生长和繁殖的随机性质而造成的。图1.11所提供的数据说明，任何单个细胞的周期不是一个确定的固定值。两个菌龄相同的子细胞可在不同的时间分裂，但由成亿细胞组成的群体的生活周期却是一个非常确定的数值。细胞群体的这种特性对于生物反应器的设计很有用。

(二) 大肠杆菌的细胞周期

即使是相当简单的细胞，在细胞周期内也需要进行相当复杂

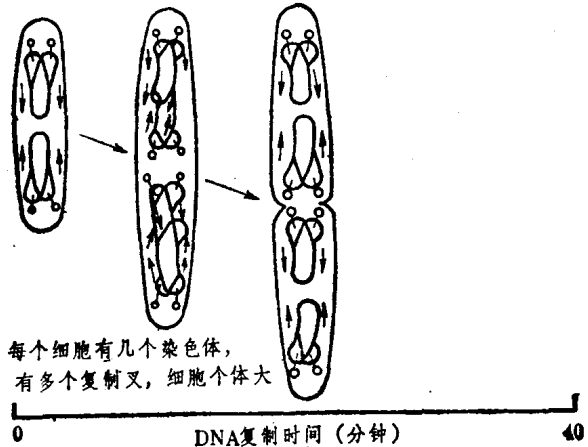
的细胞物质生物合成，并因环境变化而显示各种生长模式。大肠杆菌的核质体就是这种情况。它有一个环状核质体，其复制是从单一原点向两个方向进行的。生长缓慢的细菌(周期 ≥ 60 分钟)的染色体的复制始于母细胞分裂以后，而终止于下一次分裂前。如果环境条件有利于细胞更快的生长，则每个细胞可能会有一个以上的核质体，每个核质体体有几处复制又同时移动(图1.12)。因为在高生长速率下，整个核质体的复制仅从一处开始不能满足要求，故未等到前一轮核质体复制结束，后一轮的复制过程又在原点启动。细菌核质体复制完毕，它便分开到达细胞的两端，接着在细胞中纬带处形成间隔而分裂成为两个细胞。

低生长速率 (世代时间比DNA复制的时间长)



每个细胞有单个染色体，
细胞个体小，
只有单个复制原点O

高生长速率 (世代时间比DNA复制时间短)



每个细胞有几个染色体，
有多个复制叉，细胞个体大

图1.12 大肠杆菌DNA的复制