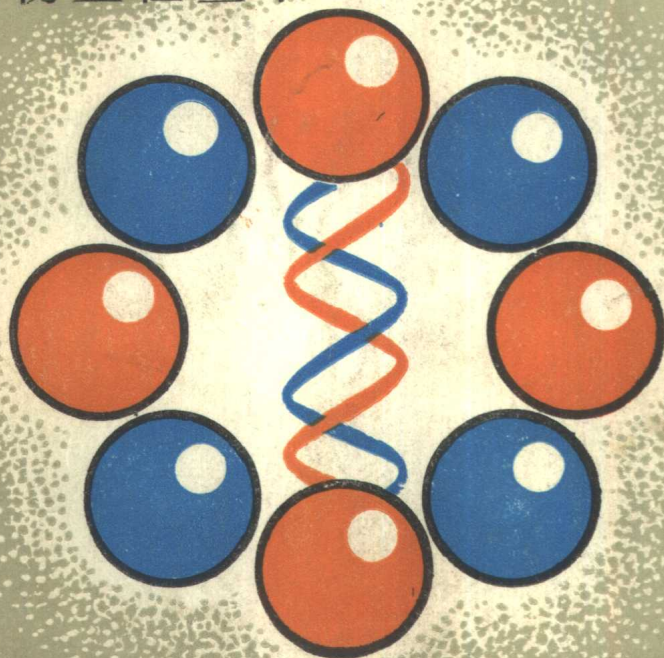


生物工程丛书



微生物工程

陈驹声 王大琛 赵大健 陈乃用 胡复眉 编著

化学工业出版社

生 物 工 程 丛 书

微 生 物 工 程

陈驹声 王大琛 赵大健 编著
陈乃用 胡复眉

化 学 工 业 出 版 社

内 容 简 介

本书系《生物工程丛书》之一。书中首先回顾了国内外微生物工程的发展简史，叙述关于工业微生物的必需知识和最新育种技术；然后分章介绍传统酿造产品、酒精、单细胞蛋白、酶制剂、有机酸、氨基酸、核酸及抗生素等，最后一章介绍了丙酮、丁醇、甘油和甜味剂的发酵技术，利用微生物浸矿、除草、脱硫、开采石油和净化环境的技术等。本书取材以适合我国国情为主，可与陈驹声先生所著的《近代工业微生物学》并读。

本书第三章第二节由陈乃用同志编写，第四章由胡复眉同志编写，第八章由王大琛同志编写，第十四章第一节由赵大健同志编写，其余各章均由陈驹声先生编写。

本书承王福源、赵慕钧、朱关平、毛蕙英、张琼、陈徽贻诸同志协助校阅，最后由焦瑞身同志审定全稿。

生 物 工 程 丛 书 微 生 物 工 程

陈驹声 王大琛 赵大健 编著
陈乃用 胡复眉

责任编辑：张智德
封面设计：季王芳

化学工业出版社出版

（北京和平里七区十号楼）

化学工业出版社印刷厂印刷
新华书店北京发行所发行

开本787×1092¹/₃₂ 印张 11¹/₄ 字数257千字 印数1—3,670

1987年12月北京第1版1987年12月北京第1次印刷

统一书号15063·4022 定价2.30元

《生物工程丛书》编辑委员会

主任 焦瑞身 (中国科学院上海植物生理研究所)

委员 (按姓氏笔划排列)

李载平 (中国科学院上海生物化学研究所)

李致勋 (复旦大学遗传学研究所)

陈驹声 (上海科技大学生物工程系)

俞俊棠 (华东化工学院生化工程研究所)

熊振平 (上海医药工业研究所)

前 言

当前，以生物工程（生物技术）、微电子、新材料、新能源、海洋工程和空间技术等为主要内容的新技术革命浪潮、正在以万钧之势席卷世界各国，迅猛发展。在新技术革命中，生物工程又是各国优先发展的领域，它不仅在近期内能提供新的产业，且为解决人类社会所面临的许多重大问题，如人口和食物，能源和资源，环境和保健等问题发挥重要作用，展示美好的前景。

生物工程的发展将对各国的经济发展带来重大的影响。例如经济发达国家，正在致力于可再生能源（生物物质）利用，企图代替石油进口，这将减少对石油能源的依赖。又如各国利用固定化菌体或固定化酶大规模生产高果糖浆代替蔗糖，使世界市场糖的价格大幅度下降。再如巴西，开展以酒精代替石油的十年计划，到目前为止，全国汽车所需燃料的43%已使用酒精，而且，由于发酵法制酒精这项生物工程的发展，为巴西创造了500万人新就业机会。显然，对巴西人民生活和国家经济发展起到引人注目的作用。

我国从“六五”计划期间就把生物工程作为重点发展的新技术之一，而且在许多方面已经取得可喜的进展；“七五”计划的规模更加宏大。随着各项计划的落实，生物工程将在医药、农业、工业、食品等方面开拓新的领域，创造巨大的社会效益和经济效益，为国民经济开辟新的原料途径，甚至导致新的产业结构。例如应用农副产品，生物物质代替矿产资源等。我国幅员广大，具有丰富的生物资源，这是发展生物工程基本

条件之一。毫无疑问生物工程的发展将为我国十亿人民的物质生活和四化建设大业发挥巨大作用。

为了我国生物工程的发展，以具有一定科技知识的读者为主要对象，出版一套全面介绍生物工程的丛书是十分必要的。

《生物工程丛书》的目的就是配合这一需要，介绍当代国内外生物工程几个活跃领域的情况；既深入浅出地介绍基础知识和近期的应用，也展示今后的发展方向。当代生物工程一般分为微生物工程、酶工程、细胞工程和基因工程，本丛书均有专册分别予以介绍。为了使读者概括了解当代生物工程的内容，专有一册《生物工程概论》以飨读者。

再者，生物工程是一个知识和技术密集的技术科学，它的基础学科是微生物学，生物化学，遗传学以及生化工程等。因此，我们又邀请有经验的专家编写了《微生物学》，《生物化学》和《生化工程》，作为学习生物工程的基础，希望对读者了解生物工程各个方面是有益的。

本丛书是编辑部邀请国内活跃在生物工程各个领域的专家编写，他们或从事科研，或进行实际生产，都是在百忙之中进行写作，大家的共同愿望是希望这套丛书对有志于从事生物工程工作的读者有所裨益，为我国生物工程的发展出一份力。

焦瑞身

一九八六年

目 录

第一章 绪论——微生物工程发展简史	1
第一节 国外微生物工程的发展概况	1
第二节 基因工程菌的产品	4
一、发酵新产品	4
二、发酵老产品	5
第三节 国内微生物工程的发展概况	6
一、黄酒与白酒	8
二、啤酒	8
三、葡萄酒	9
四、酱油和醋	9
五、酵母	10
六、酒精	10
七、酶制剂	10
八、柠檬酸	11
九、抗生素及其他生理活性物质	11
十、味精	11
十一、核酸产品	12
十二、生物新技术在微生物工程中的应用	12
参考文献	13
第二章 工业用微生物	14
第一节 最常用的工业微生物	14
一、细菌	14
二、放线菌	15
三、霉菌	15

四、酵母	17
第二节 微生物培养法	18
一、培养基的组成	18
二、培养方法及设备	19
三、培养条件	20
参考文献	21
第三章 微生物的选育	23
第一节 原生质体融合法	23
一、概说	23
二、实例	27
第二节 DNA体外重组技术	33
一、载体和宿主系统	34
二、DNA分子的切割与连接	52
三、基因的分离	60
四、重组体的选择和鉴定	62
五、克隆DNA的表达	65
参考文献	68
第四章 菌种保藏	71
第一节 定期移植保藏法(传代培养保藏法)	71
第二节 矿油封藏法(液体石蜡保藏法)	72
第三节 砂土保藏法	74
第四节 冷冻真空干燥保藏法	75
第五节 液态氮超低温保藏法	79
参考文献	83
第五章 发酵产物的提炼	85
第一节 离心分离法	85
第二节 过滤法	85
第三节 盐析法	86
第四节 有机溶剂沉淀法	87

第五节 沉淀法	87
第六节 吸附法	88
第七节 萃取法	89
第八节 喷雾干燥法	89
参考文献	90
第六章 中国传统酿造	91
第一节 黄酒	91
第二节 白酒(烧酒)	92
一、白酒的起源	92
二、制曲	93
三、小曲酒	95
四、大曲酒	97
五、名酒香气奥密的初步揭露	101
第三节 酿造调味品	103
一、酱油	103
二、酱	106
三、豉	107
四、醋	108
五、豆腐乳	110
第四节 葡萄酒与啤酒	111
一、葡萄酒	111
二、啤酒	113
参考文献	114
第七章 乙醇发酵	115
第一节 由糖蜜发酵生产乙醇	115
一、一般的糖蜜发酵法	116
二、酵母再循环法	117
第二节 由淀粉质原料发酵生产乙醇	119
一、曲法	119

二、阿明诺法及阿明诺混合法	125
三、使用未蒸煮淀粉质原料生产乙醇	128
四、以高效能细菌代替酵母发酵制乙醇	130
五、使用固定化细胞连续生产乙醇	133
第三节 利用纤维素和半纤维素发酵生产乙醇	137
一、纤维素和半纤维素的来源	137
二、由纤维素原料发酵生产乙醇	137
三、由半纤维素原料发酵生产乙醇	141
第四节 发酵法制乙醇的新技术	145
参考文献	146
第八章 单细胞蛋白 (SCP)	150
第一节 概论	150
第二节 从正烷烃和石油化工产品生产SCP	152
一、概说	152
二、从甲醇生产SCP	154
第三节 从可再生资源生产SCP	158
一、从糖质生产SCP	160
二、从淀粉质生产SCP	166
三、从木质纤维素生产SCP	167
四、从发酵废液生产SCP	176
参考文献	179
第九章 酶制剂工业	183
第一节 概论	183
第二节 淀粉酶	187
第三节 蛋白酶	191
第四节 葡萄糖异构酶	194
第五节 其他酶制剂	195
第六节 酶活性测定法	199
第七节 酶的提炼	201
第八节 固定化酶	201

第九节 固定化细胞	203
参考文献	205
第十章 有机酸发酵	206
第一节 柠檬酸发酵	207
一、国内外柠檬酸发酵技术的进展	207
二、柠檬酸发酵机理	208
三、国外柠檬酸的生产方法	211
四、国内柠檬酸的生产方法	213
五、应用固体发酵法由薯渣制造柠檬酸	215
六、展望	215
第二节 乳酸发酵	216
一、乳酸及乳酸菌	217
二、乳酸生产	218
三、乳酸提炼法	221
第三节 其他有机酸发酵	223
一、醋酸发酵	223
二、葡萄糖酸发酵	223
三、5-酮基葡萄糖酸发酵	225
四、2-酮基葡萄糖酸发酵	226
五、D-异抗坏血酸发酵	226
六、曲酸发酵	227
七、延胡索酸发酵	228
八、苹果酸发酵	229
九、琥珀酸发酵	229
十、 α -酮戊二酸发酵	230
十一、衣康酸发酵	231
十二、酒石酸发酵	232
十三、脂肪酸发酵	232
十四、水杨酸发酵	233
十五、长链二羧酸发酵	234

参考文献	236
第十一章 氨基酸发酵	238
第一节 概论	238
一、氨基酸的生产情况	238
二、氨基酸的用途	239
第二节 氨基酸的制造方法	241
一、抽提法	241
二、合成法	242
三、发酵法	242
四、酶法	259
五、添加前体法	262
六、体内基因重组法	263
七、体外基因重组法	267
参考文献	273
第十二章 核酸类物质发酵	276
第一节 概论	276
第二节 核酸的组份	277
第三节 核苷及核苷酸生产法	280
一、核糖核酸的酶解及分离方法	280
二、发酵法	285
参考文献	293
第十三章 抗生素及其他生理活性物质	294
第一节 抗生素概说	294
一、主要抗生素	295
二、抗生素的分类	296
三、抗生素产生菌的选育	300
四、抗生素产生菌的发酵法	302
五、抗生素产生菌的代谢与调节	304
第二节 半合成抗生素	305
一、半合成青霉素	306

二、半合成头孢霉素	311
第三节 其他生理活性物质	314
一、甾体激素	314
二、维生素	318
三、赤霉素	319
四、酶抑制剂	320
五、杀虫剂	321
参考文献	321
第十四章 其他发酵技术	323
第一节 微生物多糖类	323
一、概说	323
二、主要的多糖——黄原胶	325
第二节 利用微生物开采石油	333
第三节 丙酮丁醇发酵	334
第四节 甘油发酵	334
第五节 甜味剂发酵生产	337
一、甜味肽	337
二、高果糖浆	338
第六节 微生物浸矿	338
第七节 微生物除草剂	340
第八节 微生物脱硫	340
第九节 利用微生物净化环境技术	341
一、好氧处理法	341
二、厌氧处理法（沼气）	345
参考文献	348

第一章 绪 论

微生物工程发展简史

第一节 国外微生物工程的发展概况

在国外，啤酒及葡萄酒的酿造虽有很久历史，但当时人们对于自然界存在有微生物一无所知，直至1680年荷兰人Anthony Leewenhoch (1632~1723年) 发明显微镜(放大倍数为180倍)，在人类历史上第一次可由肉眼通过显微镜看到微生物。但当时“自然发生说”盛极一时，他的发现并没有受到应有重视，1857年Louis pasteur (1822~1895) 证明发酵是由于微生物的作用，1897年Edward Buchner (1860~1917年) 又进一步证明酶对发酵的作用，为微生物工程奠定了牢固的基础。

十九世纪初期德国人Robert Koch (1843~1910年) 首先应用固体培养基分离微生物。荷兰人Emil Christion Hansen (1842~1909年) 研究啤酒发酵的酵母，并创造了单细胞的纯种培养法。

当时所用的固体培养基是由明胶制成的。Koch的学生Hesse的妻子建议改用琼脂，此为使用琼脂培养基的起源。以后Petri又创造了一种培养皿叫做Petri dish，供平板培养之用，一直沿用至今。

1881年Jargensen采用Hansen方法选择优良酵母菌株于啤酒发酵。同年Avery首先利用乳酸菌生产乳酸。

1894年日本高峰利用米曲霉制造高峰淀粉酶 (Taka-diastase)。1923年德国Boiden等利用枯草杆菌生产细菌淀粉酶。

1879年Marquardt应用Pasteur的理论 (即通气有利于酵母的繁殖, 而不利酒精的生成), 首先使用通气法生产酵母。

1910年英国采用的丙酮丁醇梭菌 (*Clostridium acetobutylicum*) 生产丙酮、丁醇。

1917年Currie使用浅盘发酵法由糖生产柠檬酸。

1938年May等成功采用浅盘和深层培养法生产葡萄糖酸。

由此观之, 在本世纪内国外微生物工业已日趋繁荣。

1929年英国Fleming发现青霉素, 为微生物工业开辟了新的纪元。由于英美科学家的努力, 创立了深层液体通气培养法 (简称深层培养法), 此为微生物培养技术的一次大革命。

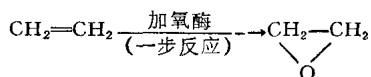
随着生物化学的进展, 人们对发酵机理及代谢调节作了深入的研究。继1955年谷氨酸 (发酵法) 首先在日本投产后, 其他如赖氨酸、苏氨酸等十余种氨基酸, 先后采用营养缺陷型及类似物抗性的变异菌株进行生产。在六十年代, 继氨基酸之后, 又建立了核酸及其有关物质的发酵工业, 微生物工业呈现一派欣欣向荣的景象。

同时为减少粮食作为发酵原料的消耗, 开展了以石油为碳源的发酵研究, 并取得显著成绩。英国石油公司于1964年首先使用石油生产饲料酵母, 并用微生物进行石油脱蜡。这些以石油为碳源的微生物发酵, 不但可以生产以粮食为碳源的发酵产品 (如柠檬酸、谷氨酸等), 且能生产以粮食为碳源所不能生产的发酵产品 (如水杨酸、长链二羧酸等)。

在酶工程方面, 千畑一郎首先在工业上应用固定化氨基酰化酶拆分DL-氨基酸。1973年他又进一步成功地应用固定化细

胞连续生产L-天门冬氨酸，此技术在微生物工业方面是继深层培养法之后的又一次大革新。

石油化工产品目前多用化学合成法生产，这种方法常要求高压、高温，且污染严重。近来利用生物合成法代替化学合成法进展很快，例如，氧化烯烃本以石油原料合成而成的，现在研究以酶法代替化学合成法。酶法生产氧化烯烃主要依赖三种酶：吡喃糖-2-氧化酶、卤过氧化氢和环氧化酶。环氧乙烷过去用化学法合成，现可用微生物加氧酶制备：



脂肪酸本来是采用高压（50大气压力）、高温（250℃）由脂肪分解而成。最近日本采用固定化脂肪酶在常压常温下，把脂肪分解为脂肪酸和甘油，生产费用减低一半。

L-酒石酸本是以马来酸为原料通过化学合成法制成，但产物为DL-型，而将DL-型进行光学拆分是不经济的。现日本德山曹达公司改用酶法生产L-酒石酸，年产量达4,000吨。

丙烯酰胺可用作纸增强剂、水处理剂，还用于石油二次开采等。日本日东化学工业公司采用固定化微生物反应器，由原料（丙烯腈）在常压常温下进行反应，转化率达100%，为世界上初次尝试。

近来发酵法生产酒精的技术又有进步，成本下降，过去以乙烯生产酒精，近有以酒精生产乙烯的趋势。

由上所述，部分化学产品的生产改用生物合成法生产，不但可能的，而且是必然的趋势。

微生物在消除环境污染与能源开发方面也作出了很大贡献，除活性污泥法处理污水和厌氧发酵法生产沼气外，近来更利用基因工程技术选育一种超级菌可以处理含有各种烃类的石

油污水。

第二节 基因工程菌的产品

关于微生物育种方面，过去采用人工诱变法，例如青霉素产生菌的青霉素效价单位在半个世纪时间里，已提高了一万倍。但人工诱变法毕竟是盲目的，不是定向的，工作量既大，效果亦差。七十年代发展的原生质体融合法，效果较好。自从体外DNA重组技术在微生物育种方面得到实用后，就有可能按照预定的意向选育菌种来生产所需要的产物。这类菌种可称为“基因工程菌”或简称“工程菌”。

利用基因工程菌不仅可以生产用一般微生物所不能生产的产品，即所谓发酵新产品，而且可改进一般微生物本来能够生产的发酵产品，即所谓发酵老产品。兹分别简介如下。

一、发 酵 新 产 品

用基因菌生产的第一个有用物质，是1977年美国试制成功的“生长激素释放抑制因子”。它是由十四单元氨基酸组成的多肽激素，可以抑制脑垂体激素的分泌，原由羊脑垂体中提取，用50万头羊脑只能提取5mg的产品。用基因工程菌生产时，只要用10L的基因菌培养液就可得同量产品。

胰岛素是治疗糖尿病的良好药。原来由猪胰中提取，生产100g胰岛素需用720kg的猪胰。1978年美国采用基因工程菌生产，由2000L基因菌培养液中即可提取同量（100g）的胰岛素，这多么惊人啊！

其他如干扰素、乙型肝炎疫苗、人的生长激素、牛的生长激素等，也可用基因工程菌生产（参见表1-1）。