

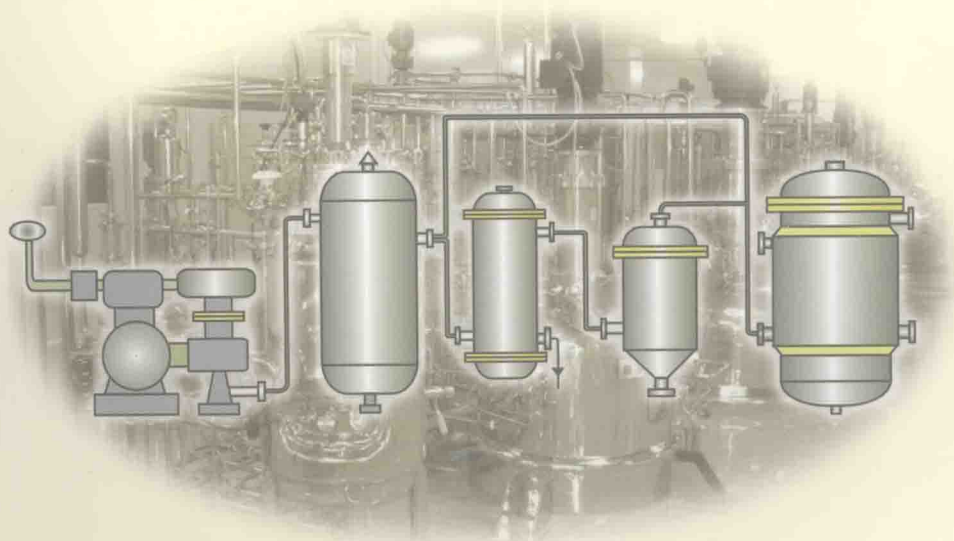
全国普通高等院校
生命科学类“十二五”规划教材



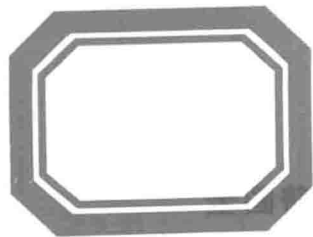
发酵工艺原理与技术

李学如 涂俊铭 主编

*Theory and technology of fermentation
process*



华中科技大学出版社
<http://www.hustp.com>



通高等院校生命科学类“十二五”规划教材

发酵工艺原理与技术

主 编 李学如 涂俊铭

副主编 邓开野 刘 霞 晏 磊

王端好 陶 静 葛立军

编 委 (以姓氏笔画为序)

王端好 湖北工程学院

邓开野 仲恺农业工程学院

石海英 聊城大学

刘 霞 延安大学

李学如 西南交通大学

宋金柱 哈尔滨工业大学

晏 磊 黑龙江八一农垦大学

徐 伟 聊城大学

涂俊铭 湖北师范学院

陶 静 郑州轻工业学院

陶兴无 武汉轻工大学

医药大学

华中科技大学出版社

中国·武汉

内 容 简 介

本书是全国普通高等院校生命科学类“十二五”规划教材。

本书系统介绍了发酵工艺基础理论与技术,以发酵产品工业化生产流程为主线,紧密联系生产实践,突出了系统性、科学性、实践性,兼顾前沿性。全书共分13章,内容主要包括绪论、发酵工业菌种选育、发酵工业培养基、发酵工业灭菌与除菌、发酵种子的制备、发酵机制及发酵动力学、发酵过程控制、发酵过程检测与自控、发酵过程的实验室研究与放大、基因工程菌发酵、发酵行业清洁生产与环境保护、发酵经济学等。本书最后一章介绍典型发酵产品啤酒、抗生素、有机酸、氨基酸、维生素、酶制剂等生产工艺案例,加深读者对发酵工艺原理及应用技术的理解。

本书可作为综合性大学、工科院校、农林院校、师范院校的生物工程及生物技术专业的教材,也可作为生物制药、食品科学与工程、生物科学等专业的教学参考书,同时也可供相关领域的研究和生产专业人员参考。

图书在版编目(CIP)数据

发酵工艺原理与技术/李学如,涂俊铭主编. —武汉:华中科技大学出版社,2014.5

ISBN 978-7-5609-9709-4

I. ①发… II. ①李… ②涂… III. ①发酵-生产工艺-高等学校-教材 IV. ①TQ920.6

中国版本图书馆CIP数据核字(2014)第101450号

发酵工艺原理与技术

李学如 涂俊铭 主编

策划编辑:罗 伟

责任编辑:罗 伟

封面设计:刘 卉

责任校对:邹 东

责任监印:周治超

出版发行:华中科技大学出版社(中国·武汉)

武昌喻家山 邮编:430074 电话:(027)81321915

录 排:华中科技大学惠友文印中心

印 刷:华中理工大学印刷厂

开 本:787mm×1092mm 1/16

印 张:21.5

字 数:561千字

版 次:2014年8月第1版第1次印刷

定 价:48.00元



华中出版

本书若有印装质量问题,请向出版社营销中心调换
全国免费服务热线:400-6679-118 竭诚为您服务
版权所有 侵权必究

全国普通高等院校生命科学类“十二五”规划教材

编委会



主任委员

余龙江 华中科技大学教授,生命科学与技术学院副院长,2006—2012 教育部高等学校生物科学与工程教学指导委员会生物工程与生物技术专业教学指导分委员会委员,2013—2017 教育部高等学校生物技术、生物工程类专业教学指导委员会委员

副主任委员(排名不分先后)

胡永红 南京工业大学教授,南京工业大学研究生院副院长

李 钰 哈尔滨工业大学教授,生命科学与技术学院院长

任国栋 河北大学教授,2006—2012 教育部高等学校生物科学与工程教学指导委员会生物化学基础课程教学指导分委员会委员,河北大学学术委员会副主任

王宜磊 菏泽学院教授,2013—2017 教育部高等学校大学生物学课程教学指导委员会委员

杨艳燕 湖北大学教授,2006—2012 教育部高等学校生物科学与工程教学指导委员会生物科学专业教学指导分委员会委员

曾小龙 广东第二师范学院教授,副校长,学校教学指导委员会主任

张士瑾 中国海洋大学教授,2006—2012 教育部高等学校生物科学与工程教学指导委员会生物科学专业教学指导分委员会委员

委员(排名不分先后)

陈爱葵	胡仁火	李学如	刘宗柱	施文正	王元秀	张 峰
程水明	胡位荣	李云玲	陆 胤	石海英	王 云	张 恒
仇雪梅	贾建波	李忠芳	罗 充	舒坤贤	韦鹏霄	张建新
崔韶晖	金松恒	梁士楚	马 宏	宋运贤	卫亚红	张丽霞
段永红	李 峰	刘长海	马金友	孙志宏	吴春红	张 龙
范永山	李朝霞	刘德立	马三梅	涂俊铭	肖厚荣	张美玲
方 俊	李充璧	刘凤珠	马 尧	王端好	徐敬明	张彦文
方尚玲	李 华	刘 虹	马正海	王金亭	薛胜平	郑永良
耿丽晶	李景蕻	刘建福	毛露甜	王伟东	闫春财	周 浓
郭晓农	李 梅	刘 杰	聂呈荣	王秀丽	杨广笑	朱宝长
韩曜平	李 宁	刘静雯	彭明春	王永飞	于丽杰	朱长俊
侯典云	李先文	刘仁荣	屈长青	王有武	余晓丽	朱德艳
侯义龙	李晓莉	刘忠虎	邵 晨	王玉江	咎丽霞	宗宪春

全国普通高等院校生命科学类“十二五”规划教材

组编院校

(排名不分先后)

北京理工大学	华中科技大学	云南大学
广西大学	华中师范大学	西北农林科技大学
广州大学	暨南大学	中央民族大学
哈尔滨工业大学	首都师范大学	郑州大学
华东师范大学	南京工业大学	新疆大学
重庆邮电大学	湖北大学	青岛科技大学
滨州学院	湖北第二师范学院	青岛农业大学
河南师范大学	湖北工程学院	青岛农业大学海都学院
嘉兴学院	湖北工业大学	山西农业大学
武汉轻工大学	湖北科技学院	陕西科技大学
长春工业大学	湖北师范学院	陕西理工学院
长治学院	湖南农业大学	上海海洋大学
常熟理工学院	湖南文理学院	塔里木大学
大连大学	华侨大学	唐山师范学院
大连工业大学	华中科技大学武昌分校	天津师范大学
大连海洋大学	淮北师范大学	天津医科大学
大连民族学院	淮阴工学院	西北民族大学
大庆师范学院	黄冈师范学院	西南交通大学
佛山科学技术学院	惠州学院	新乡医学院
阜阳师范学院	吉林农业科技学院	信阳师范学院
广东第二师范学院	集美大学	延安大学
广东石油化工学院	济南大学	盐城工学院
广西师范大学	佳木斯大学	云南农业大学
贵州师范大学	江汉大学文理学院	肇庆学院
哈尔滨师范大学	江苏大学	浙江农林大学
合肥学院	江西科技师范大学	浙江师范大学
河北大学	荆楚理工学院	浙江树人大学
河北经贸大学	军事经济学院	浙江中医药大学
河北科技大学	辽东学院	郑州轻工业学院
河南科技大学	辽宁医学院	中国海洋大学
河南科技学院	聊城大学	中南民族大学
河南农业大学	聊城大学东昌学院	重庆工商大学
菏泽学院	牡丹江师范学院	重庆三峡学院
贺州学院	内蒙古民族大学	重庆文理学院
黑龙江八一农垦大学	仲恺农业工程学院	

前 言

生物技术是当今国际科技发展的主要动力之一,生物产业对于解决人类面临的人口、健康、粮食、能源、环保等主要问题具有重大战略意义。发酵工程作为生物工程的重要组成部分和生物技术产业化的重要技术基础,广泛应用于医药、轻工、化工、能源、环保、农业等国民经济各个领域,被认为是有效利用中国丰富生物资源、提高农副产品附加值、缓解环境压力、维护生态平衡、提高中国相关产业竞争力的关键技术之一,因此,学习、研究和发展现代发酵工程理论与技术具有重要意义。

本书以发酵工业产品产业化生产流程,安排各章节,在系统介绍发酵工艺原理的同时,紧密联系生产实际,强调发酵工程技术的应用。在教材整体布局上,除对传统发酵工艺各个单元进行系统介绍外,对现代发酵工程技术(如基因工程菌发酵)、发酵过程的实验室研究与放大和发酵产品生产工艺实例等安排了专门章节;每章最后是本章总结与展望、思考题。这样的安排有利于学生全面掌握发酵工程相关知识和了解发酵工程学科发展。通过本书的学习,能使学生全面掌握发酵工艺的原理与应用,熟悉发酵工业的发展方向,为学生今后从事与发酵工业相关的生产、研究与开发打下良好的理论与技术基础。

全书共分13章,第1章由李学如编写,第2章由邓开野编写,第3章由徐伟编写,第4章由刘霞编写,第5章由晏磊编写,第6章由葛立军编写,第7章7.1、7.2、7.3节由涂俊铭编写,第7章其余部分由王端好编写,第8章由陶兴无编写,第9章由陶静编写,第10章由宋金柱编写,第11章由石海英编写,第12章由涂俊铭编写,第13章由李学如、葛立军和陶静共同完成,全书由李学如负责审稿,涂俊铭协助统稿。

本书在编写过程中,编者参考了大量的国内外相关教材和文献资料,引用了其中的重要结论和相关图表,在此向这些前辈和同行们表示衷心的感谢。本书还得到了华中科技大学出版社的大力支持与帮助,在此一并表示感谢。

生物技术的发展日新月异,发展迅猛,由于编者水平和经验所限,书中难免存在不妥之处,恳请读者批评指正。

编者

2014年8月

目 录

第 1 章 绪论 /1

- 1.1 发酵与发酵工程概述 /1
- 1.2 发酵工业发展简史 /2
- 1.3 发酵工业的特点 /5
- 1.4 发酵工业类型与范围 /6
- 1.5 发酵工艺的培养方法与过程 /12
- 1.6 发酵工业发展趋势 /15

第 2 章 发酵工业菌种选育 /19

- 2.1 发酵工业主要微生物 /19
- 2.2 发酵工业菌种的分离与筛选 /25
- 2.3 发酵工业菌种选育 /34
- 2.4 工业生产菌种的衰退与复壮 /56
- 2.5 发酵工业菌种的保藏 /57

第 3 章 发酵工业培养基 /63

- 3.1 发酵工业培养基的一般要求 /63
- 3.2 发酵工业培养基的种类 /64
- 3.3 发酵工业培养基的成分及来源 /66
- 3.4 淀粉质原料可发酵性糖的制备 /76
- 3.5 发酵工业培养基的设计与优化 /81

第 4 章 发酵工业灭菌与除菌 /92

- 4.1 灭菌的基本原理 /92
- 4.2 发酵培养基及设备灭菌 /97
- 4.3 空气除菌 /104
- 4.4 发酵染菌的处理及防治 /113

第 5 章 发酵种子的制备 /123

- 5.1 种子扩大培养概述 /123
- 5.2 发酵工业种子的制备 /125
- 5.3 种子质量的控制 /128

5.4 种子异常分析 /131

第6章 发酵机制及发酵动力学 /134

6.1 微生物的代谢产物 /134

6.2 微生物代谢调节 /138

6.3 微生物发酵动力学 /154

第7章 发酵过程控制 /171

7.1 发酵过程控制的主要参数 /171

7.2 发酵过程参数检测方法 /174

7.3 发酵基质对发酵的影响及其控制 /176

7.4 温度对发酵的影响及其控制 /178

7.5 pH 值对发酵的影响及其控制 /181

7.6 氧对发酵的影响及其控制 /184

7.7 通风与搅拌对发酵的影响及其控制 /195

7.8 二氧化碳对发酵的影响及其控制 /195

7.9 泡沫对发酵的影响及其控制 /197

7.10 发酵终点的判断 /199

第8章 发酵过程检测与自控 /202

8.1 发酵过程检测 /202

8.2 发酵过程变量的间接估计 /209

8.3 发酵过程的自动控制 /212

8.4 生物传感器 /218

第9章 发酵过程的实验室研究与放大 /226

9.1 发酵过程研究 /226

9.2 实验室研究 /226

9.3 微生物摇瓶与发酵罐培养的差异 /237

9.4 发酵规模改变对发酵参数的影响 /239

9.5 发酵工艺规模放大 /240

第10章 基因工程菌发酵 /250

10.1 概述 /250

10.2 基因工程菌发酵动力学 /251

10.3 基因工程菌的高密度发酵及控制 /252

10.4 基因工程菌不稳定性及对策 /254

10.5 基因工程菌发酵后处理技术 /255

第 11 章 发酵行业清洁生产与环境保护 /259

- 11.1 清洁生产的概念及主要内容 /259
- 11.2 发酵工程在环境保护中的应用 /264

第 12 章 发酵经济学 /276

- 12.1 概述 /276
- 12.2 发酵产品生产成本的控制 /277
- 12.3 发酵过程的经济学评价 /284

第 13 章 发酵产品生产工艺实例 /288

- 13.1 啤酒生产工艺 /288
- 13.2 抗生素生产工艺 /296
- 13.3 有机酸生产工艺 /303
- 13.4 氨基酸发酵生产工艺 /313
- 13.5 维生素发酵生产工艺 /322
- 13.6 酶制剂生产工艺 /326

生物技术是当今国际科技发展的主要动力之一,生物产业对于解决人类面临的人口、健康、粮食、能源、环保等主要问题具有重大战略意义。发酵工程作为生物技术的重要组成部分和生物技术产业化的重要技术基础,广泛应用于医药、轻工、化工、能源、环保、农业等国民经济各个领域,被认为是有效利用中国丰富生物资源、提高农副产品附加值、缓解环境压力、维护生态平衡、提高中国相关产业竞争力的关键技术之一,因此,学习、研究和发展现代发酵工程的理论和技术具有重要意义。

1.1 发酵与发酵工程概述

1.1.1 发酵的概念

人类利用微生物的发酵作用进行酿酒,制酱、醋、酸乳、干酪、泡菜和腐乳等已有几千年的历史,但人们真正了解发酵的本质却是近 200 多年的事。英语 fermentation(发酵)一词是从拉丁语 ferver(沸腾,或译为发泡)派生而来,原指酵母菌作用于麦芽汁或果汁后产生碳酸气泡,引起液体翻动的现象。

19 世纪中期,法国微生物学家 Pasteur 在研究酒精发酵的生理学意义时指出:“发酵是酵母菌在无氧状态下的呼吸过程”,是“生物体获得能量的一种形式”。随后,他进一步指出,所有的发酵都是微生物作用的结果,而不同的微生物可引起不同的发酵。

生物化学家通过对多种微生物的厌氧、需氧发酵的生理学研究表明:厌氧发酵是微生物体内产生能量的氧化还原反应,同时也是形成多种代谢产物的生物化学过程。需氧发酵时,微生物体内进行了厌氧发酵和需氧呼吸两种生化代谢过程,其氧化还原反应需要分子氧的参与,同时产生了一系列的代谢产物。此时发酵被理解为“微生物细胞为获取生长和生存所需能量而进行的氧化还原反应”。

此后,随着对微生物研究的深入,发酵形式多样化的出现,新的发酵产品不断涌现,除有机酸外,氨基酸、抗生素、核苷酸、酶制剂、维生素、多糖、色素、生物农药、植物生长促进剂、免疫抑制与促进剂、单细胞蛋白、生物碱等发酵产品相继问世。为此,工业微生物学家把凡是通过微生物的生长和代谢活动,产生和积累人们所需产物(微生物本身和/或代谢产物)的一切微生物培养过程统称为发酵。

20 世纪 70 年代以后,细胞融合和基因工程技术的建立,发酵工程进入了新的历史阶段。发酵工程培养加工的对象,除天然微生物菌种和传统诱变育种获得的变异菌株外,还包括细胞

融合菌、基因工程菌以及动植物细胞株。发酵工程成为了一个由多学科交叉融合而形成的技术和应用性较强的开放性学科,它更强调利用基因工程、细胞工程、蛋白质工程等现代生物技术手段改造过的微生物来生产对人类有用产品的过程。因此,有人建议把发酵的定义扩展到凡是利用生物细胞(含动物、植物和微生物细胞),在合适的条件下,制得产物的所有过程。可见,人类对于发酵这一概念的认识始终是处于不断发展和完善的过程中。

1.1.2 发酵工业与发酵工程

发酵工业是利用微生物的生长和代谢活动生产各种有用物质的工业,在国民经济工业中,发酵工业占有十分重要的地位。

发酵工程是利用微生物的生长繁殖和代谢活动来大量生产人们所需产品过程的理论和工程技术体系,是研究发酵工业生产中各单元操作的工艺和设备的一门学科。发酵工程的工艺单元主要包括:微生物菌种选育与保藏,培养基及其灭菌,空气净化除菌与发酵设备的灭菌,菌种的扩大培养,发酵过程中参数的控制、检测与分析,发酵产物分离与纯化,废水、废物、废气的处理等。发酵工业生产的主要设备包括:物料输送设备、物料处理(蒸煮、糖化和连消)设备、物料加热与冷却设备、气体净化设备、发酵设备、检测与分析仪器、产品分离与纯化设备等。

1.2 发酵工业发展简史

人类利用微生物自然发酵作用,进行酿酒、制酱、制醋、制酸乳等已有几千年的历史,从远古时代开始的自然发酵到目前的基因工程时代,发酵工程技术这门具有悠久历史又富有现代科学与工程科学技术,经历了不同的发展阶段,每个时期标志性的新技术的出现极大地推动了发酵工程技术的发展。

1.2.1 天然发酵时期

人类将微生物的代谢产物作为食品和医药,已有几千年的历史了。早在公元前 6000 年,古巴比伦人就开始采用发酵的方法酿造啤酒;公元前 4000—前 3000 年,古埃及人已熟悉了酒、醋、面包的发酵制作方法;约在公元前 2000 年,古希腊人和古罗马人已会利用葡萄酿造葡萄酒;公元前 2500 年古巴比伦人开始制作酸奶;公元前 1700 年古西班牙人曾用类似目前细菌浸取铜矿的方法获取铜。

我国传统发酵的历史同样悠久,用黏高粱造酒始于第一个奴隶制朝代——夏代的初期(迄今约 4000 年),在距今 4200~4000 年前的龙山文化时期已有酒器出现;在 3500 多年前的商代,开始了用人畜的粪便、秸秆、杂草等沤制堆肥;在 3000 多年前的商代后期,人们发现用发了霉的豆腐可以治外伤;在 2000 多年前的汉武帝时代,开始有了葡萄酒;白酒的起源,当在元朝以前。当然,那时人们并不知道微生物与发酵的关系,发酵过程很难人为控制,生产只能凭经验,口传心授,所以被称为天然发酵时期。

1.2.2 近代发酵技术的建立

人类对发酵现象本质的认知是近 200 多年的事。1675 年荷兰人 Leeuwenhock 发明了能

够放大 300 倍的显微镜,并首次用自制显微镜观察到并描述了细菌的形状,为研究微生物提供了有利的工具。19 世纪 50 年代,法国科学家 Pasteur 用实验证明发酵是微生物活动的结果,为后来的微生物纯培养奠定了理论基础。19 世纪末德国的 Koch 发明了固体培养基,建立了微生物纯培养技术,为有效地控制不同类型微生物以及获取不同代谢产物奠定了基础,开创了人为控制发酵过程的时代,对发酵工业的建立起了关键的作用。与此同时,丹麦植物学家 Hansen 成功地分离了单个酵母细胞,并发明了啤酒酵母的纯粹培养方法,率先在啤酒厂实现了大规模工业化生产,标志着人类从自然发酵到纯粹培养人工控制发酵的转折。此外,德国 Buchner 用无细胞酵母菌压榨汁中的“酒化酶”(zymase)对葡萄糖进行酒精发酵成功,证明酒精发酵是由微生物产生的酶催化所发生的一系列生化反应的结果,从而阐明了微生物发酵的化学反应本质,同时也表明存在于任何生物体内酶的重要价值。这些研究成果为后来的发酵工艺研究和发酵机制的探讨奠定了坚实基础。这一时期的典型发酵产品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,如酵母、酒精、丙酮、丁醇、甘油、有机酸、淀粉酶等。一般认为微生物纯培养技术的建立为近代发酵技术的开始,是发酵工业发展的第一个转折。

1.2.3 通气搅拌深层发酵技术的建立与发展

深层发酵技术的建立被称为发酵工程的第一次飞跃。1928 年,英国细菌学家 Fleming 发现了点青霉(*Penicillium notatum*)代谢产物青霉素能够抑制葡萄球菌。当时 Fleming 的成果并没有引起人们的重视,直到第二次世界大战对抗细菌感染药物的极大需求,促使人们重新研究了青霉素。英国病理学家 Florey 和生物化学家 Chain 精制分离出青霉素,并确认对伤口的感染疗效比当时的磺胺药更好。早期的青霉素生产采用表面发酵培养方法,产量很低、占地面积大且劳动强度高。为了满足战时的需要,增加青霉素的产量,需改变原来的生产方法。在英国、美国等国的一批工程技术人员共同努力,特别是化学工程师的参与下,最终研制出带有通气和搅拌装置、适用于纯种深层培养的发酵罐,同时成功地解决了大量培养基和生产设备的灭菌以及大量无菌空气的制备等问题,在提取精制中采用了离心萃取机、冷冻干燥器等新型高效化工设备,极大地扩大了发酵生产规模,使产品质量和收率得到了明显提高。

青霉素治疗感染性疾病的神奇疗效和链霉素用于结核病的治疗取得了令人震惊的效果,激发了世界各国微生物学家、化学家及相关学者从土壤微生物代谢产物中寻找抗生素的研究热情。自 Fleming 发现青霉素和 1943 年美国科学家 Waksman 发现链霉素之后,1948 年 Dugger 发现第一个可供口服的抗生素品种——金霉素;1949 年 Finlay 发现了土霉素;1952 年 McGuire 发现第一个有临床应用价值的红霉素;1953 年 Doothe 发现了四环素;1957 年日本科学家梅泽滨夫发现了对耐药菌有效的卡那霉素;同年 Sens 发现了第一个安莎类抗生素利福霉素,对其分子结构进行化学改造获得了利福平等一系列衍生物,成为治疗肺结核、麻风病的有效药物。1957 年以后相继发现了柱晶白霉素、麦迪霉素、螺旋霉素等大环内酯类抗生素,都在临床上取得了很好的效果。1963 年 Weinstein 发现了毒性较低的庆大霉素;1967 年美国礼来公司发现了对铜绿假单胞菌作用强且毒性低的妥布霉素。20 世纪 60 年代以来,人们又开发出抗肿瘤抗生素如丝裂霉素、柔红霉素、博来霉素,抗病毒抗生素如阿糖腺苷、他利霉素(偏端霉素 A)。农牧业上用的抗虫抗生素如盐霉素、莫能菌素、阿维菌素等和抗菌抗生素有春雷霉素、有效霉素、井冈霉素、安普霉素等。

抗生素工业的兴起促进了大型发酵设备的研制,为发酵工程的发展提供了关键的设备,也为后来许多微生物发酵产品,如酶制剂、维生素、有机酸、氨基酸等相关微生物代谢产物的发酵

生产奠定了基础。

这一时期新产品、新技术、新设备不断出现,微生物技术的应用范围也日益扩大,是近代发酵工业的鼎盛时期。

1.2.4 人工诱变育种与代谢控制发酵时期

随着生物化学、微生物生理学以及遗传学等学科的深入发展,对微生物代谢途径和氨基酸生物合成的研究不断加深,人类开始利用代谢调控的手段进行微生物菌种选育和发酵条件控制,促进了 20 世纪 60 年代氨基酸、核苷酸等微生物发酵工业的建立。1955 年,日本微生物学者木下祝郎首先利用自然界存在的谷氨酸棒状杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)生物素缺陷型菌株发酵生产谷氨酸获得成功。至今至少已有 22 种氨基酸的生产与微生物发酵相关,其中 18 种可直接通过发酵生产,4 种采用酶法转化。微生物发酵生产氨基酸是根据氨基酸生物合成途径,采用遗传育种方法进行微生物的人工诱变,选育出某些营养缺陷株或抗代谢类似物菌株,在控制营养条件的情况下进行发酵培养,积累大量人们所预期的氨基酸。

氨基酸发酵是以代谢调控为基础的发酵技术,发酵已由原来利用野生缺陷型菌株的发酵向高度人为控制的发酵转变,由依赖于微生物分解代谢的发酵向依赖于生物合成代谢的发酵,即向代谢产物大量积累的发酵转变。在育种方面,将微生物遗传学的理论与育种实践密切结合,改变以往从大量菌株中盲目地挑选高产菌株的方式,而是先研究目的产物的生物合成途径、遗传控制及代谢调节机制,然后进行菌株的定向选育,因此,可以说代谢控制发酵工程技术的建立,是发酵技术发展的第三个转折时期。

与此同时,该时期发酵罐的容量和形式也发展到前所未有的规模,例如生产单细胞蛋白用发酵罐最高达 300 m³,发展了高压喷射式、强制循环式等多种形式的发酵罐,并逐步运用计算机及自动控制技术进行灭菌和发酵过程的 pH、温度、溶解氧等发酵参数的控制,使发酵生产朝连续化、自动化方向前进了一大步。

1.2.5 现代生物技术与发酵工程

20 世纪 70 年代以来现代生物技术迅速发展,使发酵工程经历了前所未有的变革。发酵工程在微生物育种、生物合成和调控机制、微生物资源的开发等方面都取得了长足的发展。例如在生产菌种的选育方面,随着人们对微生物代谢途径、调控机制更深入的了解,运用分子遗传学、生物化学的基本原理,依据产物的分子结构、已知的生物合成途径、调控机制等设计的菌种筛选与传统的诱变方法结合起来,大大提高了育种工作的效率,获得了令人满意的育种效果。如美国礼来公司与牛津大学合作采用反向遗传学技术构建了头孢菌素 C 基因工程菌,使头孢菌素 C 产量提高了 15%,已应用于大生产。俄罗斯和德国科学工作者根据维生素 B₂(核黄素)合成遗传学研究结果构建出的芽孢杆菌基因工程菌株,维生素 B₂产量达 15 g/L 以上。将透明颤菌的血红蛋白基因克隆到放线菌内,既可促进有氧代谢和菌体生长,又可促进抗生素的生物合成。

利用 DNA 重组技术构建基因工程菌,不但可以改造原有微生物生产的发酵产品,大幅度提高产品的发酵水平,而且可将外源基因导入微生物细胞,生产原有微生物所不能生产的产品。自 20 世纪 80 年代以来,经美国食品和药品管理局(FDA)批准上市的生物技术药物已有 160 多种,其中包括各种疫苗、单克隆抗体、免疫调节剂、激素、医疗用酶、各种人体活性蛋白和

多肽等,它们大多数是自然微生物所不能生产的,以酵母菌、大肠杆菌等微生物为表达载体,经发酵培养生产的。使工业微生物所生产的产物超出了原有微生物的范围,大大丰富了发酵工业的内容。

1.3 发酵工业的特点

发酵工业是利用微生物所具有的生物加工与转化能力,将廉价的发酵原料转变为各种高附加值产品的产业。其主要特点体现在以下几个方面。

1.3.1 原料的多样性与可再生性

发酵工业采用较廉价的可再生生物原料(如淀粉、糖蜜、玉米浆或其他农副产品等)生产较高价值的产品。有时甚至可利用一些废物作为发酵原料,变废为宝,实现环保和发酵生产的双层效益。同时,所用原料只要不含有毒物,一般无精制的必要,微生物本身能有选择性地摄取所需物质。

1.3.2 菌种来源的广泛性

发酵工业所利用的微生物,可以是有目的地从自然界中筛选获得,也可通过基因工程方法构建的基因工程菌。另外,微生物的基因组相对较小,调控系统相对简单,进行基因操作比动、植物要容易得多,因此,可通过物理和化学诱变、细胞融合和基因重组等育种技术,改良菌种,在不增加设备投资的条件下,利用原有的生产设备使生产能力大大提高。例如最初微生物生产青霉素的发酵效价只有 40 U/mL 左右,经过人们不断提高菌株的产率和改进发酵工艺与设备,目前发酵水平已达 80 000 U/mL 以上,产率提高了 2 000 多倍。

1.3.3 发酵过程的无菌性

微生物发酵生产全过程,在无菌状态下运转是非常重要的。生产过程所需的设备、培养基和空气都需进行严格的无菌处理;在操作上需防止杂菌污染,一旦杂菌入侵就有可能导致发酵生产的失败,遭受重大损失。

1.3.4 生化反应的温和性与专一性

作为生物化学反应,大多数微生物的生长繁殖和代谢产物生成都是在常温常压下进行,因此没有爆炸之类的危险,各种生产设备一般不必考虑防爆问题。同时,微生物适宜的 pH 接近中性,减轻了对设备的腐蚀性和对环境的影响。此外,微生物能利用自身特有的某些酶,高度选择性地对复杂化合物的特定部位进行氧化、还原、官能团导入等转化反应,从而获得某些具有重大经济价值的物质。

1.3.5 反应过程的自动调节性

由于微生物反应过程以生命体的自动调节方式进行,数十个生化反应过程能通过单一微

生物的代谢活动来完成,发酵产物在单一发酵设备中一次合成。因此,与其他工业相比,相对投资较少,见效较快,具有经济和效能的统一性。

1.4 发酵工业类型与范围

1.4.1 发酵工业类型

微生物发酵产品种类繁多,但根据发酵产品与微生物生长代谢的关系,可将工业发酵分为微生物菌体发酵、微生物代谢产物发酵、微生物转化发酵和基因工程菌发酵四种类型。

1. 微生物菌体发酵

这是以具有多种用途的微生物菌体细胞为目标产物的发酵工业。可分成两类:一类是活性微生物制剂,如活性干酵母、乳酸菌菌剂、微生物杀菌剂、微生态菌剂、微生物增产菌剂等;另一类是富含一种或多种有用物质的微生物制品,如医用、食用、饲料用酵母(含多种有用物质),富集酵母(含某种微量元素或维生素),药用真菌(含一种或多种有用物质)等。由于目标产物是整个微生物细胞,因此生产过程的控制要点是合成尽量多的菌体。对于第一类菌体的发酵,还应控制收获时期菌体的生理状态,以便在其后的加工过程中获得较高的活细胞率;对于第二类菌体的发酵,则应使收获时菌体细胞积累尽量多的有用物质。

2. 微生物代谢产物发酵

微生物的代谢产物构成了发酵的主要产品,这些代谢产物按其在生命活动中的功能不同分为初级代谢产物和次级代谢产物。

(1) 微生物初级代谢产物 包括各种有机酸、氨基酸、蛋白质、酶、核苷酸、核酸、脂类、糖及醇类等。这些代谢产物大都在微生物对数生长期产生,大都为细胞生长和繁殖所必需的物质。多数初级代谢产物具有重要应用价值,可供商业开发。但自然界存在的野生型菌株所产生的初级代谢产物一般只够满足自身生长需要。因此,工业微生物学家将通过改良菌种性能和改善发酵条件来提高产率,以满足工业生产的需求。

(2) 微生物次级代谢产物 包括抗生素、色素、生物碱、植物生长素等。各种次级代谢产物都是在微生物进入缓慢生长或停止生长时期即稳定期所产生的。这些次级代谢产物在微生物生长和繁殖中的功能多数尚不明确,但对人类却是十分有用的。从现有的研究报道看,次级代谢产物的产生菌一般是产芽孢的细菌、放线菌和丝状真菌。其中放线菌中的链霉菌属产生的次级代谢产物种类最多;丝状真菌中不完全菌纲、担子菌纲是产生次级代谢产物最多的真菌种类。近年来还从稀有放线菌和某些产芽孢细菌中发现了许多次级代谢产物的产生菌。从海洋微生物中也发现了不少具有生物活性的次级代谢产物。从稀有放线菌和海洋微生物中寻找具有特异生物功能且结构新颖的次级代谢产物已成为当前研究的热点。

3. 微生物转化发酵

微生物转化就是利用微生物代谢过程中的某一种酶或酶系将一种化合物(该化合物不是微生物所能利用的培养基质)转化成含有特殊功能基团产物的生物化学反应。微生物转化反应通常包括脱氢、氧化、羟化、缩合、还原、脱羧、氨化、酰化、脱氨、磷酸化或异构作用等。微生物转化过程与化学催化过程相比,具有催化专一性强、效率高、条件温和等优越性,现已广泛用于激素、维生素、抗生素和生物碱以及手性药物合成等多种药物的生产中。例如单纯化学

方法在天然甾体母核 C-11 位上导入一个氧原子改造成乙酸可的松需要 37 步反应,收率为十万分之二,但用黑根霉进行生物转化,一步就能在 C-11 位上导入一个羟基,使原来的合成步骤减少到 11 步,收率达 90%。在微生物转化的应用过程中,往往采用固定化微生物细胞或酶,以提高转化效率,简化操作并多次反复使用。

4. 基因工程菌发酵

自 20 世纪 70 年代基因工程诞生以来,最先应用基因工程技术且目前仍是最活跃的研究领域是医药领域。第一个基因工程菌发酵生产的药物是 1977 年美国试制成功的,即可以抑制脑垂体激素分泌的“激素释放抑制因子”。该药物原来从羊脑垂体中提取,50 万只羊脑只能提取 5 mg 的产品,而采用基因工程菌发酵生产,10 L 的基因工程菌培养液就可得到同样量的产品。基因工程菌的发酵工艺与传统的抗生素等的发酵不同,需要对影响目的基因表达的各种因素及时进行分析和优化,如培养基的组成不仅影响工程菌的生长速率,而且还影响重组质粒的稳定性和外源基因的高效表达。培养温度对工程菌的高效表达有显著调控作用,影响基因的复制、转录、翻译或与小分子调节因子的结合,培养温度的高低还会影响蛋白质的活性和包含体的形成。在不同的发酵条件下,工程菌的代谢途径可能发生变化,因而对产物的分离纯化工艺造成影响。详细的基因工程菌发酵参见本书相关章节。

1.4.2 发酵工业的范围

虽然人类数千年前就开始了微生物的应用,但直到 200 多年前,微生物的应用仅限于酿酒与食品工业。随着近代发酵工业的建立与发展,特别是在基因工程、细胞工程、蛋白质工程等现代生物技术的支持下,发酵工业的应用领域逐渐扩展到医药、轻工、农业、化工、能源、环境保护和冶金等各个行业。据估计,全球发酵产品的市场有 120 亿~130 亿美元,其中抗生素占 46%,氨基酸占 16.3%,有机酸占 13.2%,酶制剂占 10%,其他发酵产品占 14.5%。而且随着石油资源的日益紧张,化石能源和以石油为主要原料的化工产品逐渐会被以发酵工程技术为核心的生物能源和生物化工产品所替代。因此,发酵产品种类和应用范围还会不断地扩大。目前发酵工业生产产品数千种,根据发酵产品性质与发酵工业应用范围的关系大致将其归纳为下列 13 类。

1. 酿酒

人们利用微生物酿酒已有数千年的历史,酿酒是人类利用微生物最早的领域,目前其商品产量和产值在微生物工业中占有重要地位,据报道,2011 年中国饮料酒的产量达 6 269.7 万千升。

根据发酵后产品后续工艺的不同,可将饮料酒分为发酵酒和蒸馏酒两大类。前者包括葡萄酒、啤酒、果酒、黄酒和青酒等。后者按生产工艺的不同分为三类:①用曲作糖化和发酵剂,以淀粉质原料,采用双边发酵技术制酒。中国的各类白酒和日本的烧酒,均采用这一工艺酿造。②以麦芽为糖化剂,然后加入发酵剂,采用单边发酵技术制酒。自古以来西方各国主要采用这一方法制酒,此类酒也用淀粉质原料酿造,威士忌、俄德克、金酒等都属这一类酒。③以糖质为原料,仅加入发酵剂即可将糖酿造成酒,此类酒也是采用单边发酵技术酿造的,如以果类为原料酿制的各种白兰地,以甘蔗为原料酿制的老姆酒等。

2. 发酵食品

食品工业是微生物技术最早开发应用的领域,至今发酵食品的产量和产值仍居发酵工业的前列,据报道,由发酵工程贡献的产品占食品工业总销售额的 15% 以上。传统发酵食品最

初起源于食品保藏,是保证食品安全性最古老的手段之一。后来,发酵技术经过不断的演变、分化,已成为一种独特的食品加工方法,用于满足人们对不同风味、口感,乃至营养、生理功能的要求。近年来,国内外学者发现某些传统发酵食品具有特殊的营养生理功能,使世界各地传统发酵食品的研究迎来新的热潮。

根据发酵食品在人们膳食结构中的作用,可将其分为:发酵主食品,如面包、馒头、包子、发面饼等;发酵副食品,如火腿、发酵香肠、豆腐乳、泡菜、咸菜等;发酵调味品,如酱、酱油、豆豉、食醋、酵母自溶物等以及发酵乳制品(如奶酒、干酪、酸奶等)。

3. 有机酸

饮料酒在有氧条件下自然放置可制成醋,牛乳酸败可制成酸奶,是人类在知道乙酸和乳酸与微生物的关系之前就学会生产和利用有机酸(乙酸和乳酸)的例子。而有机酸工业,则是随近代发酵技术的建立而逐渐形成的。目前,采用发酵法生产的有机酸主要有丙酸、丙酮酸、乙酸、乳酸、丁酸、富马酸、琥珀酸、延胡索酸、苹果酸、酒石酸、衣康酸、阿康酸、粘康酸、 α -酮戊二酸、柠檬酸、异柠檬酸、葡萄糖酸、曲酸等。

4. 抗生素

抗生素是目前最大的一类治疗药物,已发现的抗生素有 6 000 余种,其中绝大多数是由微生物产生的,已工业化生产、广泛应用的有 100 余种,包括抗菌抗生素、抗原虫抗生素、抗真菌抗生素和抗肿瘤抗生素 4 大类。目前中国抗生素总产量合计 14.7 万吨,其中 2.47 万吨用于出口。全世界 75% 的青霉素盐,80% 的头孢菌素类抗生素,90% 的链霉素类抗生素产于中国。

此外,杀稻瘟菌素、灭瘟素 S、春日霉素、庆丰霉素等发酵生产的农用抗生素可用于防治作物病害。

5. 氨基酸

氨基酸是构成蛋白质的基本化合物,也是营养学中极为重要的物质。自 1955 年日本人木下祝郎成功地用发酵法获得谷氨酸以来,现在几乎所有的氨基酸均可用发酵法生产。目前,我国已能工业化生产的氨基酸品种有谷氨酸、赖氨酸、蛋氨酸、苏氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、缬氨酸、脯氨酸、天冬氨酸、胱氨酸、精氨酸、苯丙氨酸等。2010 年,我国氨基酸工业总产量超过 300 万吨,其中大宗氨基酸产品谷氨酸及其盐产量达 220 万吨,占世界总产量的 70% 以上,居世界第一。目前我国氨基酸形成产业规模以上的生产厂家已达近百家,总产量超过 300 万吨,我国已成为氨基酸产品的“世界工厂”。

6. 酶制剂

酶是由生物体活细胞产生的生物催化剂,可用动物、植物或微生物来生产,但工业酶制剂主要是通过微生物发酵生产。目前通过发酵生产的酶制剂已达百种以上,广泛用于医药、食品、酿造、日化、制革、纺织、饲料、化工等行业。如生产淀粉水解葡萄糖用到的淀粉酶和糖化酶,用于澄清果汁、精炼植物纤维的果胶酶和纤维素酶,在皮革加工、饲料添加剂等方面用途广泛的蛋白酶,拆分 DL-氨基酸的氨基酸酰化酶。

酶制剂按用途不同可分为工业用酶制剂和医药用酶制剂两大类。工业用酶制剂主要有糖化酶、 α -淀粉酶、普鲁兰酶、异淀粉酶、异构酶、半乳糖酶、纤维素酶、蛋白酶、果胶酶、脂肪酶、凝乳酶、氨基酸化酶、甘露聚糖酶、过氧化氢酶等。医药用酶制剂主要有蛋白酶、胃蛋白酶、胰蛋白酶、核酸酶、脂肪酶、尿激酶、链激酶、天冬酰胺酶、超氧化物歧化酶、溶菌酶、血溶栓酶等。前者一般不需纯制品,而后者要求的纯度较高,其价格是前者的数千倍至数百万倍。此外,越来越多的在医疗上作为诊断试剂或分析试剂用的特殊酶制剂,大都通过发酵生产获得。