

微生物发酵技术

燕平梅 著

中国农业科学技术出版社

微生物发酵技术

燕平梅 著

中国农业科学技术出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

微生物发酵技术/燕平梅著. —北京: 中国农业科学技术出版社, 2010. 9

ISBN 978 - 7 - 5116 - 0141 - 4

I. ①微… II. ①燕… III. ①微生物 - 发酵 - 工艺
IV. ①TQ920. 6

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2010) 第 060960 号

责任编辑 李 华

责任校对 贾晓红

出 版 者 中国农业科学技术出版社

北京市中关村南大街 12 号 邮编: 100081

电 话 (010) 82106631 (编辑室) (010) 82109704 (发行部)

(010) 82109703 (读者服务部)

传 真 (010) 82106636

网 址 [http://www. castp. cn](http://www.castp.cn)

经 销 者 新华书店北京发行所

印 刷 者 北京富泰印刷有限责任公司

开 本 850 mm × 1 168 mm 1/32

印 张 8. 875

字 数 230 千字

版 次 2010 年 9 月第 1 版 2010 年 9 月第 1 次印刷

定 价 22. 00 元

———— 版权所有 · 翻印必究 ————

前 言

微生物发酵技术以现代发酵技术为核心，利用微生物的代谢活动过程，经生物转化而大规模地制造各种工业发酵产品，已经形成了一个品种繁多、门类齐全的独立工业体系，在国民经济中占有重要地位。其产品覆盖医药、轻工、化工、食品、农业、能源和环保等诸多行业，给人类带来了巨大的经济效益和社会效益，是主导生物工程发展的前沿学科，具有完善的工程体系和很强的应用性。基因重组工程和细胞工程获得的新品种，必须通过微生物发酵技术才能使生物的优良遗传性状通过微生物的大量繁殖得到高效表达，分离所需的产物，使之获得产品，经济效益才能体现出生物工程的优越性。可见基因工程和细胞工程离开发酵过程就无法最终体现出它的新的生命力。至于酶工程，目前多数具有工业化意义的酶基本上都是微生物发酵获得的。离开发酵过程，酶工程将成为无本之木，因此，酶工程与微生物发酵技术有着十分密切的依赖关系。所以，应该说，微生物发酵技术是生物工程的核心，是现代微生物技术实验成果产业化的关键技术，无论传统发酵产品，如抗生素、氨基酸等，还是现代基因工程产品，如疫苗、人体蛋白质等，都需要通过发酵技术进行生产。微生物发酵技术更具有连接生物技术上下游的纽带作用，成为生物技术的核心技术，其学科地位显而易见。构建微生物发酵技术体系的框架是由多学科组成的，包括微生物学、生物化学、分子生物学、遗传学、生物化学、电子信息学、设备学和极为重要的市场营销学等。同时，微生物发酵技术的发展反过来为其他生命学科提供了桥梁和载体，促进了这些学科的发展与进步。微生物

发酵技术是生物工程的重要组成部分，同时也是现代生物学研究的重要技术工具。

微生物发酵技术是生物技术的基础和重要组成部分，是生物技术产业化的重要环节。《微生物发酵技术》一书主要包括发酵菌种的筛选方法、优良发酵菌种的育种方法、发酵菌种保藏技术、发酵培养基配制方法、种子的扩大培养技术、发酵产物代谢控制理论和方法、发酵条件的调节方法、发酵培养基和空气的灭菌技术，并对发酵下游加工过程技术进行了技术原理和技术方法的阐述。在本书的编写过程中，一方面注意保持技术的系统性和完整性，另一方面强调了技术的先进性，引入了微生物发酵技术的最新研究技术和方法。在内容选择上，力求基本理论可靠、论述准确，信息量大，尽可能包括微生物技术的最新进展和研究成果。

本书对从事医药、食品、酶制剂、有机酸、溶剂等微生物的发酵生产，以及其他生物技术和环境保护等领域的生产、研究和开发的科技人员具有一定的参考价值。也为从事生物新产品和新工艺的研究与开发奠定了应有的理论基础和技术方法。

燕平梅

2010. 2

目 录

第一章 微生物发酵技术概论	(1)
第一节 微生物发酵技术的定义和发展简史	(1)
第二节 微生物发酵技术的特点和范围	(5)
第三节 微生物发酵技术的组成	(9)
第四节 微生物发酵技术的应用和发展趋势	(11)
本章小结	(20)
第二章 发酵微生物的筛选	(21)
第一节 微生物的特性及工业微生物的要求	(21)
第二节 已工业化产品发酵菌的介绍	(25)
第三节 自然界中目的微生物的分离	(36)
本章小结	(51)
第三章 优良发酵菌种选育技术	(53)
第一节 自然选育技术	(55)
第二节 诱变育种技术	(56)
第三节 原生质体育种技术	(68)
第四节 基因育种技术	(77)
本章小结	(85)
第四章 发酵菌种保藏技术	(87)
第一节 斜面保藏法和穿刺保藏法	(88)
第二节 干燥保藏法	(89)
第三节 真空冷冻干燥保藏法	(90)
第四节 液氮保藏法	(91)
第五节 悬液保藏法	(92)

第六节 低温保藏法	(92)
第七节 常见菌的保存方法	(93)
本章小结	(95)
第五章 微生物发酵的调节原理和控制	(96)
第一节 微生物的代谢类型和自我调节	(97)
第二节 酶活性调节	(99)
第三节 酶合成的调节	(101)
第四节 微生物代谢途径调节的形式	(110)
第五节 代谢的人工控制	(118)
第六节 次级代谢与次级代谢调节	(123)
本章小结	(127)
第六章 发酵培养基	(128)
第一节 培养基的类型及功能	(128)
第二节 培养基的营养成分及来源	(133)
第三节 培养基的配制	(141)
第四节 淀粉类原料的处理	(145)
第五节 糖蜜原料的处理	(148)
本章小结	(150)
第七章 发酵种子的制备	(151)
第一节 种子扩大培养的目的与要求	(151)
第二节 工业发酵种子的制备	(153)
第三节 种子质量的控制	(157)
本章小结	(163)
第八章 培养基灭菌及空气除菌	(164)
第一节 培养基的灭菌	(164)
第二节 空气除菌	(184)
本章小结	(186)

第九章 发酵过程的控制	(187)
第一节 发酵过程工艺控制的目的和研究方法	(188)
第二节 温度变化及其控制	(191)
第三节 发酵过程的 pH 值控制	(195)
第四节 氧的供需及对发酵的影响	(198)
第五节 二氧化碳对发酵的影响及控制	(214)
第六节 发酵过程泡沫的控制	(217)
第七节 发酵染菌的检测和防治	(222)
第八节 基质浓度对发酵的影响及补料控制	(232)
第九节 发酵终点的判断	(234)
本章小结	(235)
第十章 微生物发酵下游技术	(237)
第一节 微生物发酵下游技术的特点和一般过程	(237)
第二节 发酵液的预处理和过滤	(240)
第三节 发酵产品的提取与精制	(247)
第四节 成品加工	(262)
本章小结	(267)
参考文献	(269)

第一章 微生物发酵技术概论

第一节 微生物发酵技术的定义和发展简史

一、微生物发酵技术定义

微生物发酵技术是渗透有工程学的微生物学。是利用微生物的特定性状，通过现代化工程技术产生有用物质或直接应用于工业化生产，以把粮食、能源、化学制品、环境控制等全球性课题联系起来的一种技术体系。发酵（Fermentation）一词最初来源于拉丁语，是“沸腾”（Fervere）的派生词，它描述酵母菌作用于果汁或麦芽汁产生气泡的现象，或者是指酒的产生过程。“沸腾”现象是由于浸出液中糖在缺氧条件下降解而产生二氧化碳所引起的。生物化学上发酵是生物在无氧条件下分解各种有机物质产生能量的一种方式。如葡萄糖在无氧条件下被微生物利用产生酒精并放出二氧化碳，同时获得能量；丙酮酸被还原为乳酸而获得能量等。工业意义上的发酵泛指利用微生物的某种特定功能，通过现代工程技术手段生产人们所需的产品或达到某些特定目的的过程。它包括厌氧培养的生产过程，如酒精、乳酸、丙酮-丁醇等，以及通气（有氧）培养的生产过程，如抗生素、氨基酸、酶制剂等的生产。产品既有微生物细胞代谢产物，也包括菌体细胞（如单细胞蛋白）、酶等。

现代微生物发酵技术所利用的活细胞，除传统的微生物外，还有两类生物细胞形态：一是通过基因工程构建的微生物称为

微生物发酵技术

“工程菌”，利用这些微生物可以生产人类所需要的产品，其中不乏自然界尚未发现的新型“生物工程产品”；二是利用某些源于动物、植物细胞或工程细胞来生产的用原来从生物很难获得或含量很少的有用产物。因此微生物发酵技术是将传统发酵技术与DNA重组、细胞融合、分子修饰和改造等新技术结合并发展起来的现代发酵技术。

现代微生物发酵技术是在传统微生物发酵基础上建立和发展起来的。但是现代微生物发酵技术有其显著特点：强化了上游的基础研究，渗入了现代生物技术，如基因工程、细胞融合、分子育种等现代生物技术，所构建的“工程种子”用于发酵工业，可产生传统发酵工业不能生产的产品，并提高了发酵工业的经济效益和社会效益；现代微生物发酵技术工艺流程后处理工序自动化程度逐步提高，应用现代计算机优化各个生产单元，使整个生产过程高效化；现代微生物发酵技术生产规模的扩大，所生产的产品量大且质高；上、中、下游各个环节的衔接和配套更趋于合理和有效；现代微生物发酵技术工业化生产后，一般不造成环境污染。现代微生物发酵技术与传统微生物发酵技术的这些差别，必然使其给人类社会作出更大贡献。

二、微生物发酵技术发展史

1. 发酵现象的早期认识

人类很早就学会了主动利用微生物来为自己的生产和生活服务。数千年前，我国古代先民既利用自然存在的微生物酿酒，制作酱油、醋、奶酪、面包、馒头和豆腐乳等发酵食品，在当时相当长的时期里，人们根本就不知道微生物的存在，但人们已经巧妙地利用微生物制造食品。显微镜诞生200年后，人们一直在进行着各种各样的微小生物的观察，但并没有把微生物的活动和发酵联系起来。直到1857年巴斯德通过巴氏瓶（鹅颈瓶）实验观

观察到加热的肉汁不发酵，不加热时则产生发酵，认识到发酵现象是由微生物活动引起的。之后巴斯德又通过其他一系列实验证明了酒精发酵、乳酸发酵、丁酸发酵是由不同的微生物作用所引起的。自此，建立了发酵的生命理论，证明发酵是由于微生物作用的结果。发酵的生命理论建立以后，还有一个未能解决的问题，那就是微生物是如何起作用的，即发酵的本质是什么？例如糖分子分解的真正原因是什么？早在 1858 年，Morits Traube 曾设想发酵是由于酵母细胞含有一种物质叫做酵素的缘故。1894 年，埃米尔·菲舍尔在合成碳水化合物时得到启发，即酵母对培养基中糖的分解利用，可用分解糖的酵素物质来解释，但都没有得到实验证明。1897 年毕希纳发现磨碎的酵母仍使糖发酵形成酒精。他把酵母汁中含有的有发酵能力的物质，叫做酒化酶。人们真正认识到发酵的本质就是由微生物的生命活动所产生的酶的生物催化作用所致。

2. 微生物发酵技术的发展史

(1) 传统微生物发酵技术：从史前到 19 世纪末，在微生物的性质尚未被人们所认识时，人类已经利用自然接种方法进行发酵制品的生产。主要产品有酒、酒精、醋、酵母、干酪、酸乳等。当时实际上还谈不上发酵工业，而仅仅是家庭式或作坊式的手工业生产。多数产品为厌氧发酵，非纯种培养，凭经验传授技术和产品质量不稳定是这个阶段的特点。

(2) 纯培养技术的建立：1900—1940 年间，由巴斯德 (Pasteur) 和柯赫 (Koch) 建立了微生物分离纯化和纯培养技术，人类才开始了人为地控制微生物的发酵进程，从而使发酵的生产技术得到巨大的改良，提高了产品的稳定性，这对发酵工业起了巨大的推动作用。由于采用纯种培养与无菌操作技术，包括灭菌和使用密闭式发酵罐，使发酵过程避免了杂菌污染，使生产规模扩大了，产品质量提高了，从而建立了真正的发酵工业并逐

渐成为化学工业的一部分。因此，可以认为，纯培养技术的建立是发酵技术发展的第一个转折时期。

(3) 深层培养技术：20 世纪 40 年代初，随着青霉素的发现（1928 年弗莱明发现青霉素，1965 年获诺贝尔医学生理学奖），抗生素发酵工业逐渐兴起。由于青霉素产生菌是需氧型的，当时只能采用表面培养法生产，因此大规模生产存在很多困难。微生物学家就在厌氧发酵技术的基础上，成功地引进了通气搅拌和一整套无菌技术，建立了深层通气发酵技术。它大大促进了发酵工业的发展，使有机酸、酶、维生素、激素等都可以用发酵法大规模生产，并且逐渐形成和建立起生物工程学科，与此同时也有力地促进了甾体转化、微生物酶与氨基酸发酵工业的迅速发展。通气搅拌发酵技术的建立是发酵工业发展史上的第二个转折点。

20 世纪 60 年代，随着生物化学、微生物生理学和遗传学的深入发展，科学家在深入研究微生物代谢途径和氨基酸生物合成的基础上，通过对微生物进行人工诱变，得到适合于生产某种产品的突变类型，再在人工控制的条件下培养，即利用调控代谢的手段进行微生物菌种选育和控制发酵条件，从而大量生产出人们所需要的产品。例如，根据氨基酸生物合成途径用遗传育种方法进行微生物人工诱变，选育出某些营养缺陷型菌株或抗代谢产物结构类似物的菌株，在控制营养条件的情况下发酵生产，大量积累人们预期的氨基酸。1957 年，日本用微生物生产谷氨酸成功，如今 20 种氨基酸都可用发酵法生产。氨基酸发酵工业的发展，是建立在代谢控制发酵新技术的基础上的。目前，代谢控制发酵技术已用于核苷酸、有机酸和部分抗生素等的生产中。

(4) 现代微生物发酵技术：20 世纪 80 年代以后，由于 DNA 体外重组技术的建立，使发酵工业进入了一个崭新的阶段，即以基因工程为中心的生物工程时代，新产品层出不穷。基因工程是采用酶学的方法，将不同来源的 DNA 进行体外重组，再把重组

DNA 设法转入受体细胞内表达，并进行繁殖和遗传。这样人们就能够根据自己的意愿将微生物以外的基因构件导入微生物细胞内，从而达到定向地改变生物形状和功能创造“新”的物种，使发酵工业能够生产出自然界生物所不能合成的产物，大大地丰富了发酵工业的范围，使发酵工业发生了革命性的变化。主要产品有胰岛素、干扰素等。

利用基因工程生产的第一个有用物质是 1977 年美国试制成功的“激素释放抑制因子”，它是由 14 个氨基酸残基组成的多肽激素，可以抑制脑垂体激素的分泌。原来由羊脑垂体中提取，用 50 万只羊脑只能提取 5mg 的产品，用基因工程菌生产，只要 10L 的基因工程菌培养液就可得到同样量的产品。胰岛素是治疗糖尿病的良好药，原来由猪胰脏中提取，生产 100g 胰岛素用 720kg 的猪胰，而 1978 年美国采用基因工程菌生产，由 2 000L 基因工程菌培养液即可提取等量的胰岛素。通过比较这些数字，可以明显地感受到现代发酵工业的巨大威力和诱人前景。

第二节 微生物发酵技术的特点和范围

一、微生物发酵技术的特点

微生物发酵技术与化学工程有许多不同的特点，总结如下：

1. 生产原料广泛

发酵所用的原料通常以淀粉质、糖蜜或其他农副产品为主，只要加入少量的有机和无机氮源就可进行反应。此外，可以利用废水和废物等作为发酵的原料进行生物资源的改造和更新。

2. 生产主体是微生物

微生物菌种是进行发酵的根本因素，可以通过筛选、诱变或基因工程手段获得高产优良的菌株。发酵对杂菌污染的防治至关

重要，除了必须对设备进行严格灭菌和空气过滤外，反应必须在无菌条件下进行，维持无菌条件是发酵成败的关键。

3. 生产反应条件温和，易控制

发酵过程一般来说都是在常温常压下进行的生物化学反应，反应安全，要求条件简单。

4. 产物单一，纯度高

发酵过程是通过生物体的自动调节方式完成的，反应的专一性强，因而可以得到较为单一的代谢产物。微生物能够专一性地和高度选择地对某些复杂的化合物进行特定部位的转化反应，也可以产生比较复杂的高分子化合物。

5. 投资少，效益好

工业发酵与其他工业相比，投资少，见效快，并可以取得较显著的经济效益。

二、微生物发酵技术的范围

1. 以微生物菌体细胞为产品的发酵工业

如供制备面包用的酵母；作为人类或动物的食物的微生物细胞（单细胞蛋白）；作为生物防治的苏云金芽孢杆菌以及各种人、畜疾病防治用的疫苗等。细胞物质的发酵生产特点是细胞的生长与产物的积累呈平行关系，生长速率最大时期也是产物合成速率最高阶段，生长稳定期细胞物质浓度最大，同时也是产量最高的收获时期。

2. 以微生物酶为产品的发酵工业

目前工业化生产的酶主要是各种水解酶类，如淀粉水解酶、蛋白水解酶、乳糖酶、青霉素酰化酶等，而非水解酶类除葡萄糖异构酶、葡萄糖氧化酶等少数酶已工业化生产外，多数非水解酶类尚未工业化生产。酶的生产受到微生物本身调控体系的严格控制，为改进酶的生产能力可以改变微生物自身控制体系控制，如

在培养基中加入诱导物和采用菌株的诱变和筛选技术，以消除反馈阻遏作用。

3. 以微生物代谢产物为产品的发酵工业

以微生物代谢产物为产品的发酵工业是发酵工业中数量最多、产量最大，也是最重要的部分，包括初级代谢产物、中间代谢产物和次级代谢产物，如氨基酸、核苷酸、多糖、乙醇、丙酮、甘油、有机酸等称为初级代谢产物或中间代谢产物。各种次级代谢产物都是在微生物生长缓慢或停止生长时期即稳定期所产生的，由中间代谢产物和初级代谢产物通过次级代谢合成，如各种抗生素、生物碱、生长促进剂等。

4. 生物转化或修饰化合物的发酵工业

生物转化是指利用生物细胞对一些化合物某一特定部位（基因）的作用，使它转变成结构相类似但具有更大经济价值的化合物。生物转化的最终产物并不是由于营养物质经微生物细胞代谢后产生的，而是由微生物细胞的酶或酶系对底物某一特定部位进行化学反应而形成的。生物转化可以理解为，将一个化合物经过发酵改造其化学结构。在这里微生物细胞的作用仅仅相当于一种特殊的化学催化剂引起特定部位的反应。转化发酵过程的奇特之处是先产生大量菌体，然后催化单一反应。最简单的生物转化例子是微生物细胞将乙醇氧化形成乙酸，但是发酵工业中最重要的生物转化是甾体的转化，如将甾体化合物的 11 位进行氧化转化为可的松等。转化反应包括脱氢、氧化、羟基化、还原、脱羧、氨基化、缩合、脱氨化、磷酸化、同分异构作用等。

5. 微生物特殊机能的利用

(1) 利用微生物净化环境；(2) 利用微生物保持生态平衡；(3) 利用微生物探矿、冶金、石油脱硫等；(4) 利用微生物基因工程菌株生产动、植物细胞产品。

三、微生物发酵的类型

根据发酵工业的特点和范围，可以将发酵分成若干类型：

1. 按发酵原料分类有淀粉质发酵、石油发酵、废水发酵等类型。

2. 按发酵培养基的物理性状分类有固态发酵、半固态发酵和液态发酵。液体发酵是指将营养物质溶于（或悬于）液体灭菌后进行培养，液体发酵是目前最普遍采用的方法。制曲是固体发酵的一种，是利用麸皮、米糠或木屑并加入必需营养物质，灭菌后接种培养。由于这些物质疏松便于通气，因此在一定温度、湿度下需氧微生物能良好的生长并产生代谢产物。如果将固体培养基铺成薄层（2~3cm）装盘进行培养，则称为浅盘发酵；如果将固体培养基堆成厚层（30cm）并在培养期间不断通入空气，则称厚层通风制曲。

3. 按发酵工艺流程分类有分批式（间歇式）发酵、连续式发酵和流加式发酵等类型。

4. 按发酵过程中对氧的不同需求分类有厌氧发酵和需氧发酵两大类型。厌氧发酵的特点是整个发酵过程不需要通入空气，是在密闭条件下进行的，发酵设备比较简单。需氧发酵的特点是在发酵过程中需不断供给氧气（或空气），以满足微生物呼吸代谢。需氧发酵的方法有通气、通气搅拌和表层培养等几种。

5. 按发酵形式分类有传统工艺发酵和现代工业发酵两种类型。前者大多是固态发酵，后者大多采用液态深层（需氧）发酵。

6. 按发酵产物分类有酒类发酵、氨基酸发酵、有机酸发酵、抗生素发酵、维生素发酵等类型。

第三节 微生物发酵技术的组成

一、微生物发酵技术的组成

习惯上微生物发酵技术由上游技术、发酵和下游技术组成。上游技术包括微生物菌种的选育；微生物发酵技术主要包括培养基制备、扩培技术、发酵原料的选择及预处理、灭菌技术、接种技术、最佳工艺条件的选择和控制在下游技术包括发酵产物的分离提取。

二、微生物发酵的步骤

(1) 微生物菌种的选育及扩培技术；(2) 用作培养菌种及扩大生产的发酵培养基的配制及发酵原料的选择；(3) 培养基、发酵罐以及辅助设备的消毒灭菌（灭菌技术）；(4) 将已培养好的有活性的纯菌株以一定量转接到发酵罐中（接种技术）；(5) 将接种到发酵罐中的菌株控制在最适条件下生长并形成代谢产物（最佳工艺条件的选择和控制在下游技术）；(6) 将产物提取并进行精制，以得到合格的产品（发酵产物的分离提取）。

菌种的选育：要想通过微生物发酵技术获得在种类、产量和质量等方面符合人们要求的产品，首先要有性状优良的菌种。最初，人们是从自然界寻找所需要的菌种，但用这种方法得到的菌种，产量一般都比较低，不能满足工业上的需要。20 世纪 40 年代，微生物学家开始用人工诱变的方法育种，就是用紫外线、激光、化学诱变剂等处理菌种，使菌种产生突变，再从中筛选出符合要求的优良菌种，如能合成高丝氨酸脱氢酶的黄色短杆菌就是用这种方法获得的。这种育种方法已在氨基酸、核苷酸、某些抗生素等的发酵生产中获得成功。例如，在 1943 年刚开始生产青