



GAODENG XUEXIAO ZHUANYE JIAOCAI

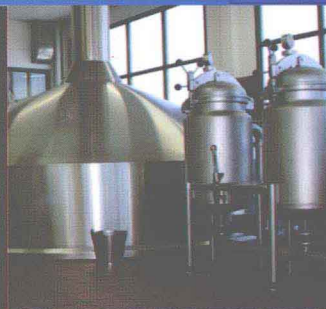
• 高等学校专业教材 •
北京市精品课程建设专用教材

[高校教材]

发酵工程

韩北忠 主 编
刘萍 殷丽君 副主编

FERMENTATION ENGINEERING

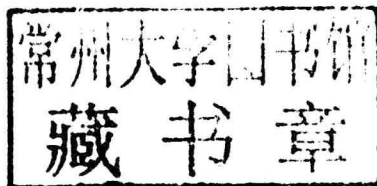


中国轻工业出版社

高等学校专业教材
北京市精品课程建设专用教材

发 酵 工 程

主 编 韩北忠
副主编 刘 萍 殷丽君
参 编 陈晶瑜 燕国梁



图书在版编目 (CIP) 数据

发酵工程/韩北忠主编. —北京: 中国轻工业出版社, 2013. 1

高等学校专业教材

ISBN 978-7-5019-8845-7

I. ①发… II. ①韩… III. ①发酵工程—高等学校—教材 IV. ①TQ92

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2012) 第 127533 号

责任编辑: 伊双双

策划编辑: 伊双双

责任终审: 唐是雯

封面设计: 锋尚制版

版式设计: 宋振全

责任校对: 吴大鹏

责任监印: 张可

出版发行: 中国轻工业出版社 (北京东长安街 6 号, 邮编: 100740)

印刷: 河北省高碑店市德裕顺印刷有限责任公司

经销: 各地新华书店

版次: 2013 年 1 月第 1 版第 1 次印刷

开本: 787 × 1092 1/16 印张: 18.75

字数: 427 千字

书号: ISBN 978-7-5019-8845-7

定价: 38.00 元

邮购电话: 010-65241695 传真: 65128352

发行电话: 010-85119835 85119793 传真: 85113293

网 址: <http://www.chlip.com.cn>

Email: club@chlip.com.cn

如发现图书残缺请直接与我社邮购联系调换

I01367J1X101ZBW

前 言

发酵工程是生物技术的核心,是利用微生物和有活性的离体酶的某些功能,为人类大规模生产有用的生物产品,或直接用微生物参与控制某些工业生产过程的技术。发酵工程技术历史悠久,在国民经济和人民生活方面发挥了巨大作用。随着生物技术的进步,发酵工程也得到进一步迅速发展,许多发酵工程技术成果正在越来越广泛地应用于工农业生产和医药卫生等各个领域,在人类可持续性发展的进程中,显示着巨大的优势。同时,现代发酵工程更加注重生物高技术医药产品、资源和能源产品、环境保护等领域。可以预见,随着基因工程、细胞工程以及酶工程等科技的飞速发展,作为工业生物技术核心的发酵工程,其发展将更迅速,内涵将更丰富,应用将更广阔,在社会经济中将发挥更重要的作用。

近年来,许多高校相继开设生物工程、生物制药、食品生物技术相关专业。发酵工程已经成为这些专业的重点骨干课程。目前,国内有关发酵工程的教材还相对较少,且已有教材比较侧重基础理论知识介绍,尤其缺乏对于发酵工程相关控制、工艺放大、发酵相关设备等工程知识的介绍,不适合综合性大学、工科院校以及农林院校相关学科的发酵工程教学。基于这种需求,我们在中国轻工业出版社的大力支持下,参阅国内外大量先进教材、专著和文献,在理论结合实际思想的指导下,编写了这本发酵工程教材。本教材编写旨在让学习者通过学习,不仅能够系统掌握发酵工程基本知识,而且侧重对发酵优化控制方法以及工艺操作放大过程的介绍,以便实际指导发酵生产,为提出新型生产工艺模式、开展现代生物工程的设计、研究、开发奠定基础。本教材也可供从事发酵工程工作的科技人员及相关人士参考。

本书共 11 章,编写分工为:第一章由韩北忠、燕国梁编写,第二章、第三章、第四章由刘萍编写,第五章、第六章由陈晶瑜编写,第七章、第八章、第九章由燕国梁编写,第十章由韩北忠编写,第十一章由殷丽君编写。

本教材的编写得到北京市精品课程建设计划的支持,还得到相关院校领导及有关部门的大力支持和关心。在编写过程中,我们参考了许多国内外相关的教材和文献资料,引用了一些重要的结论及相关图表,在此向各位前辈及同行致以衷心的感谢。中国轻工业出版社的领导和编辑对本书的出版做了大量辛勤细致的工作,在此谨致以衷心的感谢。

由于编者的水平有限,加之时间仓促,书中错误和不足之处在所难免。诚挚地希望专家和同行以及广大读者给予批评和指正。

编 者

2012 年 9 月于北京

目 录

第一章 发酵工程概述	1
第一节 发酵和发酵工程的概念	1
第二节 发酵工程发展简史	2
第三节 发酵工程的范围	4
第四节 发酵工程的特征和类型	7
第五节 发酵工程的意义和发展趋势	9
第二章 工业微生物菌种的选育与保藏	12
第一节 工业用微生物菌种概述	12
第二节 工业用微生物菌种的分离与筛选	14
第三节 工业用微生物菌种的育种	23
第四节 工业用微生物菌种的衰退与复壮	38
第五节 菌种的保藏	41
第三章 发酵原料的制备	45
第一节 淀粉质原料制备可发酵性糖技术	45
第二节 非淀粉质原料制备可发酵性糖技术	51
第四章 发酵工艺条件的优化	56
第一节 微生物培养基的组成及种类	56
第二节 培养条件对微生物发酵的影响	71
第三节 工业微生物菌种的培养	82
第五章 微生物代谢与发酵控制	88
第一节 微生物代谢	88
第二节 微生物代谢调节	101
第三节 代谢控制发酵	112
第六章 发酵工程动力学	122
第一节 分批发酵动力学	123
第二节 补料分批发酵动力学	130
第三节 连续发酵动力学	132
第七章 发酵工艺控制	135
第一节 灭菌的方法及其操作控制	135
第二节 发酵生产过程中的空气净化	149
第三节 发酵过程中氧的需求与供给	163

第八章 发酵生产的设备	174
第一节 厌氧发酵设备	174
第二节 通风发酵设备	178
第三节 发酵反应器的设计和自动控制	196
第九章 发酵工程工艺放大	213
第一节 种子培养及放大	213
第二节 发酵工艺的放大	219
第十章 固态发酵	239
第一节 固态发酵的历史	240
第二节 固态发酵概述	241
第三节 固态发酵系统描述	243
第四节 固态发酵过程中的物质传递	245
第五节 固态发酵的控制	247
第六节 固态发酵生物反应器	249
第七节 固态发酵的应用	251
第八节 固态发酵前景展望	252
第十一章 发酵产物的分离和精制	257
第一节 发酵产物分离和纯化原理及工艺流程	257
第二节 发酵液的预处理和固液分离	262
第三节 细胞破碎和固液分离	265
第四节 萃取	267
第五节 膜分离	274
第六节 离子交换	276
第七节 层析	279
第八节 结晶技术	282
第九节 干燥	284
参考文献	287

第一章 发酵工程概述

发酵工程是指采用现代工程技术手段，利用微生物的某些特定功能，为人类生产有用的产品，或直接把微生物应用于工业生产过程的一种新技术。发酵工程是生物工程的重要内容之一，也是生物工程的基础，其内容随着科学技术的发展而不断充实和丰富。

发酵工程的主要内容包括菌种的选育、培养基的配制、灭菌、扩大培养和接种、发酵条件的控制以及产品的分离提纯等。

第一节 发酵和发酵工程的概念

一、发酵的定义

发酵，有史以来就被人类所认识。英语中的发酵为“fermentation”，是由拉丁语“fervere”派生而来，意思是“翻涌”，主要是用来描述酵母菌作用于果汁或麦芽汁时因产生二氧化碳气体而鼓泡的现象。尽管人类很早就已经掌握了“翻涌”现象，但对其本质却长时间缺乏认识，而始终把它当作神秘的东西。

现代生化和生理学意义上的发酵是指微生物在无氧条件下，分解各种有机物质产生能量的一种方式，或者更严格地说，发酵是指以有机物作为电子受体的氧化还原产能反应。因此，从这个意义来说，并非所有的发酵过程都可看见起泡（翻涌状）的现象。然而，“发酵”这个词语已经被习惯性地延伸到所有利用微生物生产产品的过程，而且现代发酵工程还包括了利用动植物细胞生产产品的过程。

二、发酵工程的概念

微生物是地球上分布最广、物种最丰富的生物种群，种类之多，至今仍然是个难以估计的未知数，包括无细胞结构不能独立生活的病毒、亚病毒和具有原核细胞结构的真菌、古菌以及具有真核细胞结构的真菌、单细胞藻类、原生动物等。发酵工程，狭义上也称为微生物工程，是指在人为控制的条件下通过微生物的生命活动而获得人们所需物质的技术过程。现代意义上的发酵工程是一个由多学科交叉、融合而形成的技术性和应用性较强的开放性学科，它更强调利用经基因工程、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的产品的过程，而且现代发酵工程的含义还更广，不仅仅指利用微生物，还包括利用动植物细胞来生产产品的过程。可见，人类对于发酵工程这一概念的认识始终是处于不断发展和完善的过程中的。

第二节 发酵工程发展简史

人类利用微生物的发酵作用进行酿酒、制酱、制醋、制酸乳等已经有几千年的历史，发酵工业是一门既古老又年轻的科学，它的发展大致经历了如下几个阶段。

一、天然发酵阶段

早在公元前 6000 年，古巴比伦人就开始利用发酵的方法酿造啤酒；公元前 4000 年，埃及人就熟悉了酒、醋、面包的发酵制作方法，我国在距今 4200 ~ 4000 年前的龙山文化时期已有酒器出现，公元前 1000 多年前的殷商时期已有酿酒、制醋的文字记载。这些古老的发酵技术流传至今，属于这个时期的典型制品还有酱油、酸乳、泡菜、干酪和腐乳等。那时，人们并不知道这些现象是由微生物作用引起的，生产只能凭经验，因而很难人为控制发酵过程，产品质量不稳定。也正是由于长期对发酵的本质缺乏认识，导致发酵工程发展缓慢。

二、纯培养技术的建立

1680 年，荷兰人列文·虎克发明了显微镜，并发现了肉眼看不见的细菌、酵母等微生物。1857 年，法国著名生物学家巴斯德用巴氏瓶实验证明了酒精发酵是由活酵母引起的，从而将发酵过程与微生物的生命活动联系起来。1905 年，德国人柯赫首先发明了固体培养基，得到了细菌的纯培养物，由此奠定了微生物分离纯化和纯培养技术的基础，开创了人为控制发酵过程的时代，提高了产品的稳定性。由于采用纯种培养与无菌操作技术，再加上简单密封式发酵罐的发明以及发酵管理技术的改进，使发酵过程避免了杂菌的污染，从而扩大了生产规模，产品质量也得到了提高。这一时期典型的发酵产品有酵母、酒精、丙酮、丁醇、甘油、有机酸和酶制剂等。一般认为纯培养技术的建立是发酵工业发展的第一个转折。

三、通气搅拌液体发酵技术的建立

纯培养技术的出现扩大了发酵工程的生产规模，但同时也出现了大规模发酵过程供氧不足的难题，限制了发酵工业的进一步发展。以青霉素为例，青霉素合成需要大量的氧气。最初的生产方法是使用一个小容器，装入 1 ~ 2cm 厚的原料（液体培养基），青霉菌（*Penicillium*）在液体表面生长繁殖，分泌青霉素到液体内。由于液层薄，青霉菌很容易得到氧气，不必搅拌和通入空气，但是这种方法需要很多小容器和很大的培养室。后来人们想办法将小容器串联起来，使培养液在菌层下面流动进行更新。这些办法的目的都是要解决通气问题，但终因操作不便、产量不高和容易染杂菌而失败。迫于第二次世界大战对抗细菌感染药物的需要，1945 年在无菌条件下深层发酵生产青霉素的通气搅拌液体技术终于被成功应用到大规模的工业生产中，标志着好氧菌的发酵生产从此走上了大规模的工业化生产途径，开创了发酵工程史上崭新的一页。在此阶段，发酵技术发生了突飞猛进的变

化,开发出了许多新产品的发酵工艺,包括其他抗生素、维生素、氨基酸、酶和类固醇等产品,有力地促进了发酵工业的迅速发展。因而,通气搅拌液体技术的建立被认为是发酵工业发展史上的第二个转折点。

四、代谢控制发酵技术

随着人们对微生物代谢途径了解的加深,人们开始利用调控代谢的手段进行微生物选种育种和控制发酵条件。代谢工程是利用重组 DNA 技术或其他技术,有目的地改变生物中已有的代谢网络和表达调控网络,以更好地理解细胞的代谢途径,并用于化学转化、能量转移及大分子装配过程。Bailey 把代谢工程分为两类:①利用外源蛋白的活性实现菌株的改良;②重新分配代谢流。Nielsen 将其分为七类:①合成异源代谢产物;②扩大底物利用范围;③生产非天然的新物质,如新型药物;④降解环境有害物质;⑤改善和提高微生物的某种性能;⑥阻断或降低副产物的合成;⑦提高代谢产物产率。虽然在植物、昆虫和动物细胞中也开始进行代谢工程研究,但微生物由于其代谢途径相对简单、遗传操作比较容易,因而仍是目前代谢工程的主要研究对象。1956 年,日本首先成功地利用自然界存在的野生生物素缺陷型菌株进行谷氨酸的发酵生产。此后,赖氨酸、苏氨酸等一系列氨基酸都采用发酵法生产。这种以代谢调控为基础的新的发酵技术使发酵工业进入了一个新的阶段。随后,核苷酸、抗生素以及有机酸等产品也逐渐采用代谢调控技术进行生产。

微生物代谢工程是工业生物技术的核心技术之一。后基因组时代的代谢工程,是在系统生物学和功能基因组学的强力支撑下,通过对微生物代谢与调控网络的全面理解,将微生物作为细胞工厂生产有用物质或服务于人类社会的重要技术。代谢工程的应用遍及医药、化工、轻工、食品、农业、能源、环保等国民经济诸多领域,是生物技术产业化和规模化发展壮大基础。目前,微生物代谢工程已进入一个借助于系统生物学、基因组学和功能基因组学技术平台、系统开展微生物代谢途径和基因表达调控网络研究的新阶段。

五、开拓发酵原料时期

传统的发酵原料主要是粮食、农副产品等糖质原料,随着饲料用酵母及其他单细胞蛋白的需要日益增多,急需开拓和寻找新的糖质原料。由于烃类化合物的纯度高、密度低、碳含量高、能为微生物有效利用,以及从成本上可与其他基质竞争,因此石油化工副产物石蜡、甲烷等碳氢化合物被用来作为发酵原料,开始了所谓石油发酵时代,使发酵罐的容量、供氧能力、发酵过程控制都达到了前所未有的规模。由于石油资源日益枯竭,近年来利用秸秆、玉米芯等生物质作为原料生产酒精等燃料能源已经引起越来越多的国家在发展战略上的重视。目前限制乙醇作为燃料使用的主要障碍还是成本问题,因而构建能够利用可再生物质生产乙醇的工程菌仍是主要的努力方向。美国把纤维废料制取乙醇作为可再生能源战略的重要项目。美国能源部和诺维信公司合作,研究以玉米秸秆为原料的生物乙醇生产技术,目前,其关键技术纤维素酶有了突破性的进展,从玉米

秸秆酶解生产 1US gal^① 燃料酒精的纤维素酶成本从 5 美元降至 50 美分。他们计划再经过两年努力,使每生产 1US gal 燃料酒精的纤维素酶成本降至 10 美分,使纤维素酶不再是发展玉米秸秆水解生产燃料酒精的制约因素。

六、基因工程阶段

DNA 双螺旋结构发现之后,1973 年美国科学家 Herber Boyer 和 Stanley Cohen 首次对质粒进行了基因工程 (genetic engineering) 操作并成功转化了大肠杆菌,由此开拓了以基因工程为中心的生物工程时代。基因工程是指在基因水平上,采用与工程设计十分类似的方法,根据人们的意愿,主要是在体外进行基因切割、拼接和重新组合,再转入生物体内,生产出人们所期望的产物,或创造出具有新的遗传特征的生物类型,并使之稳定地遗传给后代。

基因工程不仅能够在不相关的微生物之间转移基因,而且可以非常精确地改造微生物的基因组,这样微生物细胞可以生产通常由高等生物细胞才能生产的有关化合物,如胰岛素、干扰素和乙肝疫苗。这样人们就能够根据自己的意愿将微生物以外的基因导入微生物细胞中,使发酵工业能够生产出自然界微生物所不能合成的产物,扩大了具有商业化潜力的微生物产品范围,并且为新的发酵工程打下基础,使发酵工业发生了革命性的变化并形成了许多新的发酵过程。

近年来,基因工程技术已开始由实验室走向工业生产。它不仅为我们提供了一种极为有效的菌种改良的技术和手段,也为攻克医学上的疑难杂症——癌症、遗传病及艾滋病的深入研究和最后的治愈提供了可能,还为农业的第三次革命提供了基础。现在由工程菌生产的珍稀药物,如胰岛素、干扰素、人生长激素、乙肝表面抗原等都已先后应用于临床,基因工程不仅保证了这些药物的来源,而且可使成本大大下降。另外,重组 DNA 技术和大规模培养技术的有机结合,使得原来无法大量获得的天然蛋白质能够规模生产。但研究也发现,工程菌在保存及发酵生产过程中表现出一定的不稳定性,因此,解决工程菌不稳定性问题成为基因工程这一高技术成果转化为生产力的关键之一。

第三节 发酵工程的范围

目前,现代发酵工程技术已深入到各个生产行业,如工业、农业、矿业、化工、医药、食品、能源和环境保护等。现代发酵工程技术已作为一种新兴的工业体系发展起来,在各个行业的知识和技术创新中发挥着越来越重要的作用。具有重要商业意义的微生物发酵过程主要包括以下五个方面。

^① 1US gal = 3.78541L。

一、以微生物细胞作为最终产品的发酵过程

这是以微生物菌体细胞为产品的发酵工业，例如，焙烤工业用的酵母、用于防治作物虫害的绿色农药苏云金芽孢杆菌（*Bacillus thuringiensis*）和人畜防治疾病用的疫苗。目前，单细胞蛋白（SCP）的生产规模已成为发酵工业之首；利用地衣芽孢杆菌（*Bacillus licheniformis*）无毒株可制成微生态制剂，这种活体生物药物可用于调节人体内部的微生物区系。

二、以微生物代谢产物为产品的发酵过程

微生物合成的代谢产物不下数千种。以微生物代谢产物为产品的发酵生产是发酵工业中数量最多、产量最大，也是最重要的部分，它们包括初级代谢产物、中间代谢产物和次级代谢产物。初级代谢是指普遍存在于生物中的代谢类型，是与生物生存有关的，涉及能量产生和能量消耗的代谢类型，在这个过程中的任何环节发生障碍都有可能导致生长停滞，甚至导致机体发生突变或死亡。初级代谢产物有单糖、核苷酸、脂肪酸、蛋白质、核酸、多糖和脂类等。利用发酵生产的初级代谢产物，具有重大的经济意义（表1-1）。

表 1-1 微生物的初级代谢产物及其在工业上的应用

初级代谢产物	应 用
乙醇	含酒精饮料中的活性成分与石油混合后，可作为汽车的燃料
柠檬酸	食品工业与化学工业中有多种用途
丙酮和丁醇	溶剂
谷氨酸	调味品
赖氨酸	食品添加剂
核苷酸	调味品
多糖	食品工业提高油类回收率
维生素	食品添加剂

最有经济价值的发酵过程一般是次级代谢产物的发酵。次级代谢是某些微生物为了避免代谢过程中某种代谢产物的累积造成的不利作用而产生的一类有利于生存的代谢类型，通常是在生长后期进行。通过次级代谢合成的产物称为次级代谢产物，如抗生素、吡咯、氨基糖衍生物、香豆素等，这些代谢产物并不是微生物生长所必需的，即使这些代谢的某个环节发生障碍也不会导致机体生长停止或死亡，仅仅是影响了机体合成次级代谢产物的能力（图1-1）。

三、以微生物代谢体系中的酶为产品的发酵过程

动物、植物和微生物细胞中都存在着各种酶，但是用微生物发酵的方法可以实现酶

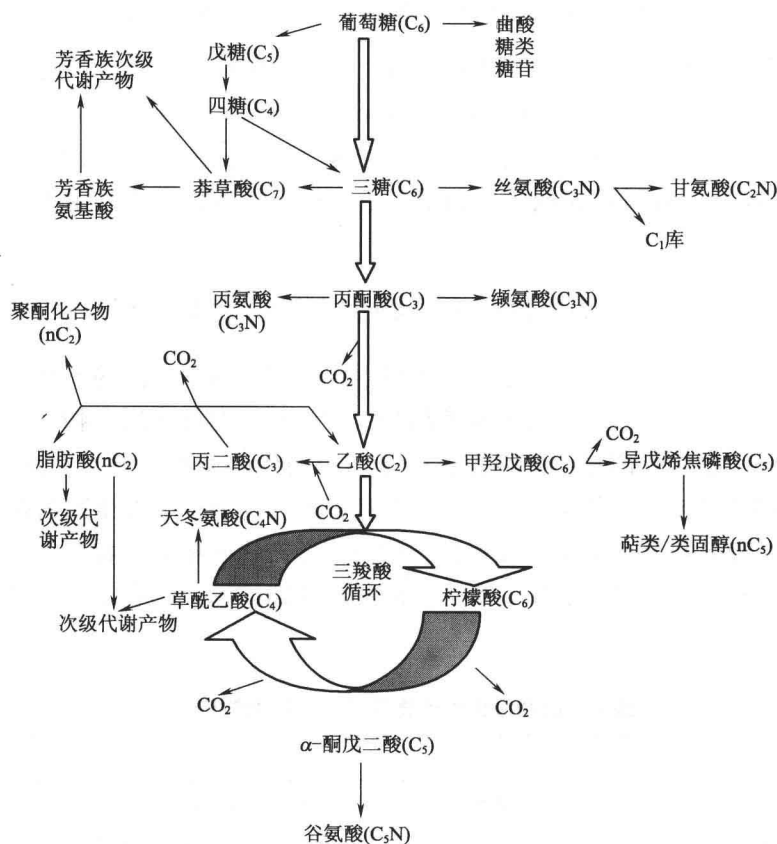


图 1-1 初级和次级代谢产物间的关系

初级代谢 次级代谢

的大规模生产，容易提高产量。酶的生产是受到微生物本身严格控制的，但是可以通过改变微生物的代谢途径或修饰相关的调控过程以提高酶的产量，所使用的方法有优化发酵培养基和发酵条件、添加产酶诱导剂或促进剂、选育高产菌株等。近半个世纪以来，微生物酶主要用于食品工业、洗涤剂生产、皮革加工、医药生产等方面。例如，广泛用于食品加工、纤维脱浆、葡萄糖生产的淀粉酶就是一种最常用的酶制剂，其他如可用于澄清果汁、精炼植物纤维的果胶酶，以及在皮革加工、饲料添加剂等方面用途广泛的蛋白酶等，都是在工业和医药上十分重要的酶制剂。此外，还有一些在医疗上作为诊断试剂或分析试剂用的特殊酶制剂也在深入研究和应用。

四、利用微生物对某种物质进行特定修饰或转化的发酵过程

可利用微生物细胞将一种化合物转化成另一种结构相关、更具经济价值的化合物，这些催化反应可能包括脱氢、氧化、脱水、缩合、脱碳和异构化等。生物转化的最终产物并不是经过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的某一特定部位进行化

学反应而形成的。在这里，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。微生物转化反应比用特定的化学试剂有更多的优点，包括反应条件温和、反应选择性高；不需要添加重金属催化剂；反应产物纯度高；反应底物简单便宜等。最简单的生物转化的例子是微生物细胞将乙醇转化成乙酸，即醋的生产过程。微生物转化可以生产更有价值的化合物，如利用生物转化过程生产甾体、手性药物、抗生素和前列腺素。例如，早在 1946 年可的松就已经能用化学合成法生产，但要经过 32 步反应。因为步骤多、效率低，250kg 左右脱氧胆酸才能生产不到 1g 可的松。经过研究后发现，关键的一步是要在分子结构的某一部位接上一个羟基，利用黑根霉（*Rhizopus nigricans*）可准确地完成这一反应（图 1-2），从而使 30 多步的化学反应简化为 3 步。

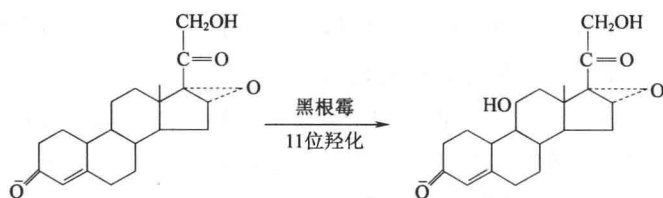


图 1-2 可的松合成过程中的羟基化反应

转化发酵过程的特别之处在于先产生大量菌体，然后催化单一反应。一些最新型的过程是将全细胞或其中有催化作用的酶固定在惰性载体上，具有催化作用的固定化细胞可以反复多次地使用。

五、微生物环境保护及其他

发酵工程不仅局限于发酵罐的形式，从环境保护的角度来看，一个湖泊、一条河流、一片垃圾场都可以是开展发酵工程的场所。利用微生物处理环境中的三废物质，主要是利用废物作为微生物发酵过程的营养物，以达到分解各种有毒有害物质实现无害化的目的。例如，可采用好氧发酵的方法直接降解废水中的氰、酚以及农药等有毒物质，还可利用微生物发酵去除或回收废水和废渣中的重金属离子；此外，利用造纸废水生产甾类激素、尼龙废水生产塑料原料、甘薯废渣生产四环素、味精废液生产单细胞蛋白，这样既能保护环境，又能获得新产品。在冶金工业中，还可利用微生物对某些金属氧化物的氧化还原反应，使矿藏中的金属溶出。

第四节 发酵工程的特征和类型

一、发酵工程的特征

发酵工程是利用微生物的生物化学反应制造或生产产品的过程，依靠生命体进行化学反应是其区别于其他化学工业的最大特征。发酵工程的一般特征如下。

(1) 发酵过程一般都是在适于生命活动的常温、常压条件下进行的生物化学反应，条件温和、反应安全。

(2) 发酵工业所用的原料通常以淀粉、糖蜜等碳水化合物为主，多数属于生物质原料，规格不一、组成复杂，只要不含毒物一般不必进行精制，加入少量的有机和无机氮源就可进行反应。此外，还可利用碳氢化合物、废水和废物等作为原料进行发酵。可见，发酵工业对原料的要求较为粗放。

(3) 由于生物体本身具有自动调节的反应机制，因此数十个反应过程能够像单一反应一样，在发酵罐的单一设备内就能很容易地完成。

(4) 发酵过程能够专一地和高度选择性地对某些较为复杂的化合物进行特定部位的氧化、还原、官能团导入等化学反应，可以产生化学工业难以合成或几乎不可能合成的复杂的化合物，并且反应的专一性强，可以得到较为单一的代谢产物。酶类的生产和光学活性体的有选择性生产是发酵工业最有特色的领域。

(5) 发酵工业在操作上最需要防治的是杂菌的污染。大多数发酵过程要求在无杂菌情况下进行，即必须进行设备的清洗、灭菌和空气过滤，而且对设备的密封性、取样检测都有特殊的要求。一旦发生杂菌和噬菌体的污染，容易给发酵工业带来重大经济损失。

(6) 微生物菌种是进行发酵的根本因素，菌种的性能是决定发酵工业生产水平最主要的因素。可通过自然选育、诱变、基因工程等菌种选育手段获得高产的优良生产菌株，生产按常规方法难以生产的产品，能够利用原有的生产设备提高生产经济效益。

(7) 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。

基于以上特点，工业发酵日益引起人们的重视。与传统发酵工程相比，现代发酵工程还具有以下几个特点：不完全依赖地球上的有限资源，而着眼于再生资源的利用，不受原料的限制；能解决传统技术或常规方法所不能解决的许多重大难题，并为能源、环境保护提供新的解决办法；可定向创造新品种、新物种，适应多方面的需要，造福于人类；除利用微生物外，还可以用动植物细胞和酶，也可以用人工构建的遗传工程菌进行反应；反应设备也不局限于常规的发酵罐，各种各样的生物反应器不断被研制出来，可实现自动化控制、连续化生产，使发酵工业的水平得到了很大的提高。

二、发酵工程的类型

最常见的发酵工程的分类方法是按照发酵产物来区分，如氨基酸发酵、有机酸发酵、抗生素发酵、酒精发酵和微生物发酵等。按照发酵工程中对氧气的不同需求区分也是最常见的分类方式，一般分为厌氧发酵和需氧发酵两大类型。厌氧发酵在整个发酵过程中无需供给空气，甚至需要充入氮气、二氧化碳等不活泼气体，而需氧发酵则必须在发酵过程中不断通入无菌空气。一般地，现代发酵工业中多数属于需氧发酵类型。

按照发酵的形式来区分，则有传统发酵和现代发酵两种类型，前者大多是固体发酵，而后者大多采用液体深层发酵。

按照发酵工艺的流程区分，可分为分批式、连续式和流加式等不同类型。

按照发酵原料来区分，还可分为糖类物质发酵、石油发酵以及废水发酵等类型。

第五节 发酵工程的意义和发展趋势

现代生物技术或生物工程主要由基因工程、细胞工程、酶工程和发酵工程四大工程组成。然而,基因工程、细胞工程和酶工程中的产物要实现工业化或者转化为生产,都需要借助于发酵工程的生产原理和技术。只有通过发酵工程,才能够使得由基因工程或细胞工程获得的具有某种所需性状的目的菌株实现工业化生产,最终达到基因克隆或细胞融合的目的,获得生产效益和经济效益。因此,发酵工程是整个生物技术的核心,是工业微生物实现实验室与工厂化生产的具体操作,是生物技术在生产实践中应用的原理及方法的一部分,是基因工程及酶工程等生物技术工业化的过程与方法。经过几十年的发展和实践,人们逐步认识到发酵是一个随着时间变化的、非线性的、多变量输入和输出的动态的生物学过程,按照化学工程的模式来处理发酵工业生产(特别是大规模生产)的问题,往往难以收到预期的效果。这就需要对发酵工程的属性进行重新的认识,高度重视细胞代谢流分布变化的有关现象,研究细胞代谢物质流与生物反应器物料流变化的相关性,重视细胞的生长变化,尽可能多地从生长变化中做出有实际价值的分析,进一步建立细胞生长变量与生物反应器的操作变量及环境变量三者之间的关系,更加有效地控制细胞的代谢流。

当前,能源结构、资源结构、环境状态将难以支撑人类社会进一步发展的目标,21世纪人类经济将从基于碳氢化合物的经济转变为基于碳水化合物的经济。在这场深刻的变革中,只有发酵工程才能将来源于太阳能的可再生的生物质资源转变为所需要的化工原料和能源,为人类所面临的环境、资源、人口、能源、粮食等危机和压力提供最有希望的解决途径,促进传统的粗放型经济增长方式走向资源节约型、环境友好型的经济增长方式。因此,这种能源结构和资源结构的转变直接关系到经济的可持续发展、社会的稳定和国家安全。据有关方面预测,未来将有20%~30%的化学工艺过程将会被发酵工程所取代,发酵工业将成为21世纪的重大化工产业。

发酵工业已经进入到一个新的阶段。近年来生物化工技术取得了许多重大的成果,如微生物法生产丙烯酰胺、脂肪酸、己二酸、壳聚糖、透明质酸、天冬氨酸等产品已达一定的工业规模;在能源方面,纤维素发酵连续制乙醇已开发成功;在农药方面,许多新型的生物农药不断问世;在环保方面,固定化酶处理氯化物已达实用化水平;在催化方面,生物催化合成手性化合物已成为化学品合成的支柱之一。此外,传统的发酵工业已由基因重组菌种取代或改良,由生物法生产高性能高分子、高性能液晶、高性能膜、生物可降解塑料等技术不断成熟,利用高效分离精制技术、超临界气体萃取技术和高效双水相分离技术开发高纯度生物化学品制造技术也不断完善。发酵在线检测技术和发酵控制手段的进一步发展,提供了更多的能够反映环境变化和细胞生长的重要信息,作为控制发酵过程的依据,这些都极大地促进了生物反应器工程的发展,如膜反应器就可以透析除去发酵液中的有害物质,实现微生物菌株的高密度发酵。

与此同时,出现了一些新的研究热点和方向,如反向代谢工程和生理工程。虽然代谢工程在改造某些微生物、提高其发酵性能中取得了很大的成功,但是早期的相当一部分改

造并没能取得预期的效果，最主要的原因是人们对大部分微生物的生理遗传背景、酶反应特性、代谢网络结构的了解还不是很透彻。与此同时，传统微生物发酵工业在几十年的发展过程中，已经获得了很多具有特殊生理性能的野生菌以及发酵能力显著提高的突变菌株。在此基础上，Jay Bailey 等在 1996 年首次提出反向代谢工程，这种策略的研究思路是在获得预期表型的基础上，“运用反向遗传策略”鉴定出相应的遗传基础，再将鉴定的遗传特性转移到工业菌株中，使其也具有同样的表型。1997 年，Jens Nielsen 在研究利用产黄青霉（*Penicillium chrysogenum*）生产青霉素时提出了“生理工程”的概念，最初的定义为：结合微生物生理和生物反应器工程的知识，在深入了解微生物代谢途径生理功能的基础上，通过分析微生物细胞的代谢流、代谢控制和建立反应动力学模型提高代谢产物的产量。李寅等人将生理工程的概念进一步扩大化和具体化：在利用代谢工程提高菌株合成代谢产物的基础上，更加重视微生物细胞的生理功能及其对环境的应答机制，通过分子生物学的方法提高细胞对环境，特别是对逆境胁迫的适应能力和代谢活性，最大限度地提高代谢产物的合成水平。从这一层意义上来说，生理工程更加重视发酵工业的实际情况，因为在工业发酵生产中，微生物细胞所面对的环境大多是逆境环境，如高糖、低氮和低 pH 等环境。只有当细胞很好地适应这种逆境环境后，才有可能通过改变的代谢途径获得高水平的目的产物。

微生物系统是一个具有高度自我调节的复杂系统。对这种系统一个基因的改变对整个系统性能的影响往往是有限的，而几个基因共同作用则可能产生较显著的影响。因此，要了解系统性能与基因的关系，就需要从总体上了解该系统的调节机制，并利用系统性能变化的数据进行建模。也就是说，需要在不同层次了解系统的调节机制。这就要求人们将基因组分析、功能研究、转录组学和蛋白质组学等研究手段结合起来，系统地了解微生物目的产物的合成过程。

基因组学是 Thomas 和 Roderick 于 1986 年提出来的，当时是指对基因组的作图、测序及分析。基因组学的研究内容包括两个部分：结构基因组学（structural genomics）和功能基因组学（functional genomics）。前者是对基因组分析的早期阶段，以建立生物的遗传、物理和转录图谱及其全序列测序为主；后者则是在前者的基础上系统地研究基因功能。自从 1995 年流感嗜血杆菌（*Haemophilus influenzae*）的基因组序列测定完成之后，目前已有 75 种（株）微生物的基因组完成测序，160 多种（株）微生物的基因组测序正在进行中。随着各种微生物基因组测序工作的不断完成和序列信息的积累，微生物基因组学研究的重点已由结构基因组学向功能基因组学转移。功能基因组学往往被称为后基因组学（postgenomics），它是利用结构基因组所提供的信息和产物，发展和应用新的实验手段，通过在基因组或系统水平上全面分析基因的功能，使得生物学研究从对单一基因或蛋白质的研究转向对多个基因或蛋白质同时进行系统的研究。研究内容包括基因功能发现、基因表达分析及突变检测。近年来，随着功能基因组学等生物技术的飞速发展，对传统的发酵工业产生了极大的冲击，它被广泛地用于工业微生物的改进、工业微生物翻译过程的解析以及建立新的工业微生物发酵过程中，极大地推动了工业微生物研究及产业的发展。

随着大量微生物全基因组序列测定的完成以及功能基因组学技术的快速发展,代谢工程已进入后基因组时代,这就需要从整体上认识微生物代谢网络,从基因、RNA、蛋白质、代谢物、代谢通量等多个层次系统地分析微生物代谢。显然,后基因组时代的代谢工程是一个庞大的系统工程,需要由系统生物学家领衔,微生物学家、分析化学家和分子生物学家等多学科背景的人员共同参与,从基础研究和应用开发方面共同努力。后基因组时代的代谢工程循环如图 1-3 所示。

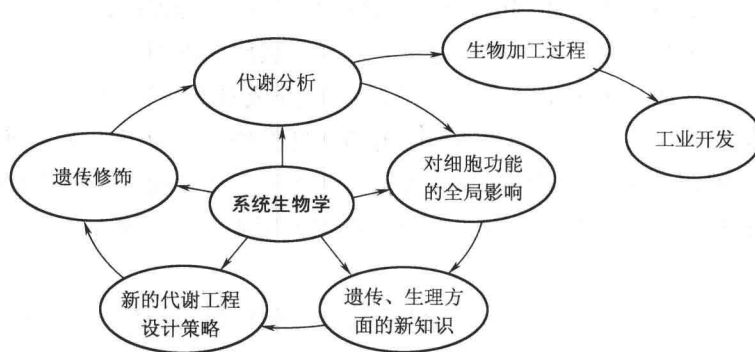


图 1-3 后基因组时代的代谢工程循环 (引自李寅,《生物代谢工程:绘制细胞工厂的蓝图》)

目前,我国发酵行业生产企业有 5000 多家,主要发酵产品的年产值高达 1300 亿元人民币,在国民经济中已经占有较高的比重,其中抗生素的总产值已占到我国医药行业总产值的 18% 左右。我国发酵工程相关产业已经取得长足发展,就其规模而言,某些产业(如谷氨酸、柠檬酸、维生素 C 等)在国际上占有举足轻重的位置。但就技术水平而言,与发达国家仍有较大差距,并且存在着许多亟待解决的问题,如发酵生产周期长、分离提纯技术落后、产品收率低、产品成本和单耗高、生产厂家经济效益不佳等,更重要的是对生物技术产业缺乏足够的认识,尤其是对发酵工程重视不够。发酵工程的工业化生产水平由三个要素决定,即生产菌种的性能、发酵及提纯工艺条件和生产设备。因此,利用遗传工程等先进技术人工选育和改良菌种、采用发酵技术进行高等动植物细胞培养、广泛应用固定化技术、开发和采用节能高效的大型发酵装置、发酵过程的自动控制以及开发简便高效的分离技术都将成为发酵工程主要的发展方向。今后发酵工程的研发主要涉及生物高技术医药产品、资源和能源产品、环境保护三个领域。可以预见,随着生物技术等科技的飞速发展,作为工业生物技术核心的发酵工程的发展将更迅速,内涵将更丰富,应用将更广阔,在社会经济中将发挥更重要的作用。