

Fermentation Technology and Equipment

普通高等教育“十二五”规划教材

发酵工艺与设备

陶兴无 主编



化学工业出版社

普通高等教育“十二五”规划教材

发酵工艺与设备

陶兴无 主编



化学工业出版社

· 北京 ·

图书在版编目 (CIP) 数据

发酵工艺与设备/陶兴无主编. —北京: 化学工业出版社,
2011.7

普通高等教育“十二五”规划教材

ISBN 978-7-122-11748-9

I. 发… II. 陶… III. ①发酵食品-生产工艺-教材②发酵
工业-工业设备-教材 IV. TS26

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2011) 第 130239 号

责任编辑: 刘 畅 赵玉清 洪 强

装帧设计: 史利平

责任校对: 王素芹

出版发行: 化学工业出版社 (北京市东城区青年湖南街 13 号 邮政编码 100011)

印 刷: 北京永鑫印刷有限责任公司

装 订: 三河市万龙印装有限公司

787mm×1092mm 1/16 印张 16 $\frac{3}{4}$ 字数 438 千字 2011 年 8 月北京第 1 版第 1 次印刷

购书咨询: 010-64518888 (传真: 010-64519686) 售后服务: 010-64518899

网 址: <http://www.cip.com.cn>

凡购买本书, 如有缺损质量问题, 本社销售中心负责调换。

定 价: 35.00 元

版权所有 违者必究

前 言

现代生物技术或生物工程的产物要实现工业化生产，都要借助于发酵工程技术。发酵工程涉及生物工业的许多领域，例如：抗生素工业、有机酸工业、酶制剂工业、氨基酸工业、生物制药和传统的酿酒业等。因此，《发酵工程》是生物工程、生物技术、食品和制药等相关专业学生的重要专业基础课或专业课，该课程的目的是使学生能将所学理论知识与工程实际衔接起来，从工程的角度去考虑技术问题，逐步实现由学生向工程师的转变。

《发酵工程》涉及的知识点很多，基本内容为发酵工艺与发酵设备。优异的产品性能离不开好的工艺，而较低的生产成本则离不开好的设备，工艺和设备是密不可分的。学生在学习某一单元工艺内容时，若不能及时地了解该单元所使用的相应设备及其操作原理，在一定程度上会造成“工艺”与“设备”知识脱节。对没有工厂经历和经验的在校学生来说，对一些设备的结构和工作原理的理解也存在较大困难。本书的特点是把发酵工艺与发酵设备两方面的内容结合起来，更具系统性和实用性。在内容编排上以发酵生产中共性工艺技术为主线，包括微生物菌种的选育及其培养、灭菌与除菌工艺及设备、厌氧发酵工艺及设备、好氧发酵工艺及设备、发酵动力学以及发酵产物的分离提取，最后还简要介绍了发酵过程参数检测及控制。每章在讲述“工艺”的同时，将所涉及设备的工作原理、构造以及生产实例贯穿在各个章节中一并介绍，突出完整的工艺设备流程，力求提供系统的发酵工业知识。在内容选取上注重实用性，删繁就简，尽量避免了过多的理论分析及复杂的数学运算，重点培养学生的实际应用能力。《发酵工程》是在学生完成了《生物化学》和《微生物学》等课程学习的基础上开设的，许多内容已包含于这些先修课程中，本书对部分内容仅作概述，以避免不必要的重复。

参加本书编写的人员（分工）如下：蚌埠学院任茂生（第二章第一、三、四节，第三章），湖北大学知行学院刘齐（第二章第五节），湖北工业大学汪江波和湖北工业大学工程技术学院阳飞（第四章第一～三节），蚌埠学院王娣（第五章第一、二、四节），湖北大学知行学院孙美玲（第五章第三节，第七章第一～六节），武汉工业学院陶兴无（其余各章节）。全书由陶兴无负责统稿，武汉工业学院李燕和樊永波等也做了部分工作。

在编写过程中，我们参阅了大量同行的资料和文献，在此表示衷心的感谢。

书中错误或欠妥之处，敬请读者批评指正。

陶兴无

2011年5月于武汉

目 录

第一章 绪论	1
第一节 发酵技术的起源	1
一、古代人类的酿酒活动	1
二、传统酿造工艺的出现	2
三、微生物及酶的发现揭示了发酵的 本质	3
四、发酵工业技术的形成	4
五、生化工程技术的诞生	5
六、代谢控制发酵和基因工程技术的 发展	6
第二节 发酵工程的内容及其特点	7
一、发酵工程的内容	7
二、发酵生产的类型	9
三、发酵工程的特点	10
第三节 发酵工程的应用领域	12
一、医药工业	13
二、食品工业	14
第二章 生产菌种的选育培养及发酵培养基设计	21
第一节 微生物的代谢及调控	21
一、微生物的初级代谢与次级代谢	21
二、微生物代谢的调节及控制	22
第二节 微生物代谢控制育种的措施	25
一、营养缺陷型突变株	25
二、代谢终产物的结构类似物抗性突 变株	26
三、其他类型突变株	28
第三节 生产菌种的选育方法	29
一、发酵工业中的常用微生物	29
二、新菌种的分离与筛选	30
三、菌种的改良及工程菌构建	31
第四节 菌种的扩大培养及保藏	32
一、菌种的扩大培养	32
二、菌种的衰退、复壮和保存	34
第五节 发酵培养基的设计	38
一、培养基的类型	38
二、发酵培养基的组成	39
三、发酵培养基的优化	41
第六节 生产实例——谷氨酸菌种培养	42
一、谷氨酸生产菌的特征	42
二、生产菌种的扩大培养	43
三、发酵培养基的组成	44
思考题	48
本章参考文献	48
第三章 灭菌与除菌工艺及设备	49
第一节 发酵生产中有害微生物的控制	49
一、发酵生产中的无菌概念	49
二、有害微生物的控制方法	50
第二节 培养基灭菌	52
一、湿热灭菌的操作原理	52
二、分批灭菌	55
三、连续灭菌	56
第三节 无菌空气制备	59
一、空气净化除菌的方法与原理	59
二、无菌空气的制备流程	60
三、空气预处理设备	64
四、空气过滤介质及过滤器	67
第四节 设备与管道的清洗与灭菌	71
一、常用清洗剂及清洗方法	72
二、设备及管路的灭菌	75
思考题	79
本章参考文献	80

第四章 厌氧发酵工艺及设备	81		
第一节 厌氧发酵产物的生物合成机制	81	第四节 乳酸发酵	107
一、糖酵解途径概念及其特点	81	一、乳酸发酵工艺概述	107
二、酵母菌的酒精、甘油发酵	83	二、大米和薯干粉发酵工艺	108
三、乳酸发酵	84	三、淀粉水解糖发酵工艺	110
四、甲烷(沼气)发酵	86	四、玉米粉发酵工艺	110
第二节 白酒与酒精发酵	87	五、蔗糖和糖蜜发酵工艺	111
一、白酒固态发酵	87	六、葡萄糖的L-乳酸发酵工艺	112
二、酒精发酵	93	七、原位产物分离乳酸发酵工艺简介	113
第三节 啤酒发酵	99	思考题	113
一、传统啤酒发酵	99	本章参考文献	114
二、现代大罐啤酒发酵	103		
第五章 好氧发酵工艺及设备	115		
第一节 好氧发酵产物的合成机制	115	三、染菌发生的不同时间对发酵的影响	149
一、发酵对氧的需求	115	四、发酵异常现象及原因分析	150
二、谷氨酸发酵机制	118	五、杂菌污染的预防	151
三、柠檬酸发酵机制	121	六、染菌的挽救和处理	152
四、其他好氧发酵产物的合成	124	七、噬菌体污染及其防治	153
第二节 发酵过程的工艺控制	129	第五节 好氧发酵工艺实例——谷氨酸	
一、温度对发酵的影响及其控制	129	发酵	153
二、pH对发酵的影响及其控制	131	一、谷氨酸生产菌的菌体形态特点	154
三、发酵过程中的补料控制	133	二、亚适量生物素流加糖发酵工艺	155
四、发酵过程中的泡沫控制	135	三、淀粉水解糖高生物素添加青霉素流	
五、发酵终点的确定	136	加糖发酵工艺	156
第三节 通风发酵设备	137	四、甘蔗糖蜜添加青霉素流加糖发酵	
一、机械搅拌通风发酵罐	137	工艺	157
二、其他通风发酵罐简介	145	五、谷氨酸发酵异常现象及其处理	158
第四节 发酵染菌及防治	148	思考题	159
一、染菌的检查及原因分析	148	本章参考文献	160
二、染菌对不同发酵过程的影响	149		
第六章 发酵动力学	161		
第一节 发酵过程的定量描述方法	162	三、连续发酵的产率	186
一、发酵过程的化学计量	162	四、连续发酵过程中的杂菌污染和菌种	
二、微生物细胞生长动力学模型	166	变异	187
第二节 分批发酵	171	五、多级连续发酵	189
一、菌体生长动力学	171	六、连续培养的应用	190
二、基质消耗动力学	175	第四节 补料分批发酵	190
三、代谢产物生成动力学	177	一、补料分批发酵的特点	191
四、分批发酵的产率	179	二、流加操作的数学模型	192
第三节 连续发酵	181	思考题	196
一、连续发酵的动力学方程	182	本章参考文献	196
二、连续发酵的稳态操作条件	184		
第七章 发酵产物的分离提取	197		
第一节 发酵产物分离的特点与过程设计	197	第二节 沉淀与离心	199
一、发酵产物分离的特点	197	一、沉淀	199
二、发酵产物分离的过程选择	199	二、离心	200

第三节 过滤与膜分离	205	一、蒸发	221
一、过滤	205	二、结晶	225
二、膜分离	209	三、干燥	228
第四节 萃取与色谱分离	212	第七节 发酵产物的分离实例——谷氨酸	
一、萃取	212	提取与味精制造	231
二、色谱分离	215	一、谷氨酸提取	232
第五节 离子交换与吸附	218	二、味精制造	235
一、离子交换	218	思考题	238
二、吸附	219	本章参考文献	238
第六节 蒸发、结晶与干燥	221		
第八章 发酵过程参数检测及控制	239		
第一节 发酵过程参数检测概述	239	一、温度	247
一、发酵过程参数的分类	239	二、罐压	248
二、发酵过程参数检测的特点	240	三、搅拌转速和功率	249
第二节 发酵检测控制系统的基本组成	240	四、空气和料液流量	250
一、测定元件	241	五、液位和泡沫	251
二、控制部分	242	第六节 常见化学和生物参数的检测与	
三、执行元件	243	控制	252
第三节 发酵过程的自动控制原理	244	一、pH 及溶解 CO ₂ 浓度	252
一、反馈控制	244	二、溶氧浓度及氧化还原电位	254
二、前馈控制	244	三、发酵罐排气(尾气)中 O ₂ 分压和	
三、自适应控制	245	CO ₂ 分压	257
第四节 发酵过程的计算机控制	246	四、细胞浓度和发酵液成分	259
一、发酵过程控制的计算机系统	246	思考题	261
二、发酵过程中计算机的控制方式	247	本章参考文献	261
第五节 常用物理参数的检测与控制	247		

第一章 绪 论

学习目标

1. 了解发酵工业和现代发酵工程技术的历史及其发展趋势。
2. 熟悉发酵工程的一般概念。
3. 理解发酵生产的基本过程和特点。
4. 了解本课程的性质、研究对象与任务。

生物技术 (biotechnology) 是利用生物系统、活生物体及其衍生物, 为特定用途而生产或改良产品或过程的技术。现代生物工程技术包括基因工程 (gene engineering)、细胞工程 (cell engineering)、酶工程 (enzyme engineering) 和发酵工程 (fermentation procedures)。发酵工程是生物技术产业化的重要环节, 绝大多数生物技术的目标都要通过发酵工程来实现。

发酵工程又称为微生物工程, 是利用微生物生长速度快、生长条件简单以及代谢过程特殊等特点, 在合适条件下通过现代化工程技术手段, 由微生物的某种特定功能生产出人类需要的产品。虽然现代发酵工程已扩展到培养细胞 (含动、植物细胞和微生物) 来制得产物的所有过程, 但已有的研究和应用成果显示, 用于发酵技术过程最有效、最稳定、最方便的形式是微生物细胞, 因此目前普遍采用的发酵技术都是围绕微生物进行的。

随着科学技术的进步, 发酵技术也有了很大的发展, 并且已经进入能够用基因工程的方法有目的地改造原有的微生物菌种, 使这些微生物为人类生产产品, 即现代发酵工程阶段。现代发酵工程已成为一个包括了微生物学、化学工程、基因工程、细胞工程、机械工程和计算机软硬件工程的一个多学科工程。发酵技术由两个核心部分组成: 第一部分是涉及获得特殊反应或过程所需的最良好的生物细胞——微生物菌种 (或酶); 第二部分则是选择最精良设备, 开发最优技术操作, 创造充分发挥微生物细胞 (或酶) 作用的最佳环境——发酵工艺与设备。

第一节 发酵技术的起源

英文中发酵 (fermentation) 一词是由拉丁语“发泡”, “沸涌” (ferver) 派生而来的, 指酵母作用于果汁或谷物, 进行酒精发酵时产生 CO_2 的现象。我国北魏时期 (公元六世纪) 贾思勰的《齐民要术》卷七“造神曲黍米酒方”中记载: “味足沸 (即发酵时起泡的现象)、定为熟。气味虽正, 沸未息者, 曲势未尽, 宜更蜡之; 不蜡则酒味苦、薄矣”, 这说明古代中国已建立了酿酒发酵的概念。而在西欧, 发酵的概念直至 1857 年始由法国人巴斯德实验确立。可见我国古代发酵的基本概念比西方早很多年。

一、古代人类的酿酒活动

在自然界中存在着大量的含糖野果, 在空气里、尘埃中和果皮上都附着有酵母菌。在适当的水分和温度等条件下, 酵母菌就有可能使果汁变成酒浆, 自然形成酒。最初的酒是含糖

物质在酵母菌的作用下自然形成的有机物。因此，酒是自然界的一种天然产物。人类不是发明了酒，仅仅是发现了酒。我国古代书籍中就有不少关于水果自然发酵成酒的记载。如宋代周密在《癸辛杂识》中曾记载山梨被人们贮藏在陶缸中后竟变成了清香扑鼻的梨酒。元代的元好问在《蒲桃酒赋》的序言中也记载道某山民因避难山中，堆积在缸中的蒲桃也变成了芳香醇美的葡萄酒。古代史籍中还有所谓“猿酒”的记载，当然这种猿酒并不是猿猴有意识酿造的酒，而是猿猴采集的水果自然发酵所生成的果酒。

早在1万多年前，西亚一带的古代民族就已种植小麦和大麦，那时是利用石板将谷物碾成粉，与水调和后在烧热的石板上烘烤，这就是面包的起源，但它还是未发酵的“死面”，也许叫做“烤饼”更为合适。大约在公元前3000年前后，古埃及人最先掌握了制作发酵面包的技术。最初的发酵方法可能是偶然发现的：和好的面团在温暖处放久了，受到空气中酵母菌的侵入，导致发酵、膨胀、变酸，再经烤制便得到了远比“烤饼”松软的一种新面食，这便是世界上最早的面包。关于啤酒的起源，相传是一个健忘的面包师，无意中把作面包用的生面团长时间的放在太阳下晒，生面团逐渐变成液体状态并开始发酵，由此发现了最早的啤酒酿制方法。还有一种说法：欧洲大陆上的农场主在收割之后，总是把麦子堆放在粮仓内，这些简陋的粮仓往往因屋顶漏水而使仓内的麦子受潮，麦子从而开始发芽并发酵，并因发酵产生了一些香美可口的淡黄色液体，这样最原始“啤酒”便问世了。

古代人制作酸奶和奶酒也是靠天然发酵。生活在保加利亚的色雷人过着游牧生活，他们身上常常背着灌满了羊奶的皮囊。由于外部的气温和人的体温等作用，皮囊中的羊奶常常变酸，而且变成渣状。当 they 要喝时，常把皮囊中的奶倒入煮过的奶中，煮过的奶也会变酸，这就是最早的酸奶。奶酒的生成是因为羊皮袋挂在马上，在马急行时，骑马人的脚不停地踢打在奶袋上，奶在袋子中运动，撞击变热加快了发酵，这样就使奶变成了“酒”。

可见，人类最早的酿酒活动，只是机械地简单重复大自然的自酿过程。

二、传统酿造工艺的出现

传统酿造工艺开始于人类见到微生物前的一段漫长的历史时期，大约在距今8000年前至公元1676年。人类有意识酿造的最原始的酒类品种应是果酒和乳酒。因为果实和动物的乳汁极易发酵成酒，所需的酿造技术较为简单。谷物酿酒要复杂很多，粮食中为碳水化合物不是糖而是淀粉，淀粉需要经淀粉酶分解为糖，然后由酵母的酒化酶将糖变成酒。中国的酒绝大多数是用酒曲酿造的。酒曲的起源已不可考，关于酒曲的最早文字可能就是周朝著作《书经·说命篇》中的“若作酒醴，尔惟曲蘖”。在原始社会时，谷物因保藏不当，受潮后会发霉或发芽，发霉或发芽的谷物就可以发酵成酒。这些发霉或发芽的谷物就是最原始的酒曲，同时也是发酵原料。因为发芽的谷物和发霉的谷物外观不同，作用也不同。发霉的谷物称为曲，发芽的谷物称为蘖。蘖的糖化力强而发酵力弱，而用于造醴。醴的酒味很淡，不为人所喜爱，所以渐渐就不用蘖做酒，而只利用其分解淀粉为糖的性质来做饴糖了。

中华民族虽然与曲蘖打了几千年的交道，知道酿酒一定要加入酒曲，但一直不知道曲蘖的本质所在。现代科学才解开其中的奥秘。从原理上看，我国酒曲上所生长的微生物主要是霉菌，有的霉菌菌丝很长，可以在原料上相互缠绕，松散的制曲原料可以自然形成块状。酒曲上的微生物种类很多，如细菌，酵母菌，霉菌，还有微生物所分泌的酶（淀粉酶、糖化酶和蛋白酶等），酶具有生物催化作用，可以加速将酿酒谷物原料和酒曲本身含有淀粉和蛋白质转变成糖、氨基酸。蘖也含有许多这样的酶，具有糖化作用，可以将蘖本身中的淀粉转变成糖分。

我国粮食酒中最早出现的黄酒是不经过蒸馏的，称为酿造酒。由于酿造酒乙醇浓度低，

若温度高则易继续氧化成醋酸，所以酿酒多在冬季。随后出现蒸馏酒，即中国白酒，这与蒸馏器有关。酒曲酿酒的发明对我国豆酱、酱油、食醋、豆豉、饴糖、腐乳等发酵食品也产生了积极的影响。在制曲技术发展的漫长过程中，分化出专用于酿醋、制酱和腌制食品的各类曲。谷物固体发酵酿醋是我国酿醋方法的特点。由于曲中微生物种类多，使醋中除醋酸外，还有像乳酸、葡萄糖酸等有机酸，因而醋的风味更好。酿醋在西方是以酒作原料进行醋酸发酵而成的。欧洲食醋绝大部分是果醋。果醋英语称之为 vinegar，其源于法语的 vinaigre，即 vin（葡萄酒）及 aigre（酸）的复合词。由此可以看出在古代果醋是由葡萄酒自然酸败而产生。制酱是利用曲中微生物产生的蛋白酶，把豆类、肉类等食品中大量含有的蛋白质分解成氨基酸等水解产物。酱油和酱的制造工艺是极其相近的。公元 1590 年的《本草纲目》最早描述酱油的制作方法：将煮过的豆子与大麦粉以 3:2 的比例混合后，压成饼，在房中放置至被黄色霉菌生长盖满以后，这种长霉的饼块或曲与盐和水相混合，在太阳下晒制，再经过挤压，出来的液体就称为酱油。

对霉菌的利用是中国人的一大发明创造。我国独创的以人工控制霉菌生长进行制曲的酿酒方法，与西方国家用麦芽、酵母酿酒技术相比，要复杂得多。19 世纪末法国人卡尔迈特从我国的酒药中分离出糖化力强的霉菌，应用在酒精生产上，号称“阿米诺法”，才突破了供生产酒精用的淀粉质原料非用麦芽不可的状况。日本微生物学家坂口谨一郎教授认为霉菌制曲甚至可与中国古代的四大发明相媲美。用淀粉质原料制曲，实际上就是分离和富集自然界中的黄曲霉和米曲霉等微生物。尽管当时的条件还看不到微生物的个体形态，但是通过微生物的群体形态已懂得了控制不同的制曲条件，可以获得不同的微生物，酿造不同的产品，也懂得了防止杂菌的污染。同时，制曲是一种利用固体培养物和保存微生物的有效方法。因为在干燥条件下，微生物处于休眠状态，活性容易保持不变。这些实践和理论不仅在当时是较为先进和科学的，时至今日仍有一定的实用价值。

由于没有对发酵的本质认识，这些传统酿造工艺的特点是纯经验性的，许多产品至今还在生产。

三、微生物及酶的发现揭示了发酵的本质

19 世纪前，人们对发酵的本质并不了解，但已经在利用自然发酵现象制成各种发酵产品，如酱油、米酒、面包、奶酪、啤酒、白酒等。菌种是天然的，而非纯种培养，凭经验传授技术，产品质量不稳定，常常受到杂菌的污染而使人们感到困惑。1676 年，荷兰博物学家安东·列文虎发明显微镜（放大倍数 270 倍），人类历史上第一次看到大量活的微生物。此后，这些微生物来自何处成了当时人们关心的问题。有些人认为是从没有生命的物质“自然发生”的，这就是古已有之的观点，叫做自然发生论。

1861 年，法国科学家路易·巴斯德（Pasteur, 1812~1895 年）以著名的曲颈瓶试验（图 1-1）证明发酵原理，指出发酵现象是微小生命体进行的化学反应，彻底推翻生命的自然发生说并建立胚种学说（germtheory），从此结束了绵延 100 多年的争论。

巴斯德这个简单但是具有说服力的著名实验，证实了微生物只能从微生物产生而不能自然地由没有生命的物质发生。这个科学论断的确立，为研究微生物奠定了基础。巴斯德认为，酿酒是发酵，是微生物在起作用；酒变质也是发酵，是另一类微生物在作祟，论证了酒和醋的酿造以及一些物质的腐败都是由一定种类的微生物引起的发酵过程，并不是发酵或腐败产生微生物。巴斯德关于发酵作用的研究，从 1857 年到 1876 年前后持续了 20 年，连续对当时的乳酸发酵、酒精发酵、葡萄酒酿造、食醋制造等各种发酵现象进行研究，明确了这些不同类型的发酵，是由形态上可以区别的各种特定的微生物所引起的。提出了防止酒变质

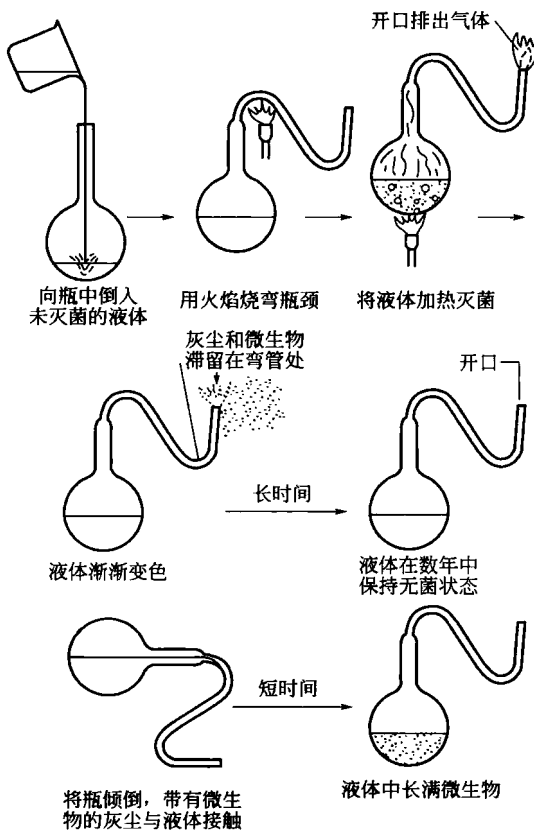


图 1-1 巴斯德否定自然发生论的曲颈瓶试验

的加热灭菌法，后被人称为巴斯德灭菌法。使用这一方法可使新生产的葡萄酒和啤酒长期保存。巴斯德的发现不仅对以前的发酵食品加工过程给以科学的解释，也为以后新的发酵过程的发现提供了理论基础，促进了生物学和工程学的结合。巴斯德也因此被人们誉之为“发酵之父”。

1897 年德国的毕希纳 (Eduard Buchner, 1860~1917) 用磨碎的酵母细胞制成酵母液，并过滤使其滤液不带细胞，加入蔗糖后，又发现有 CO_2 和乙醇形成，从而证明酒精的发酵过程是由酶催化的一系列化学反应，并将这种具有发酵能力的物质称为酒化酶 (zymase)。从此，发酵的真相才开始被人们了解，从而将微生物生命活动与酶化学结合起来。20 世纪以来，生物化学和生物物理学向微生物学渗透，再加上电子显微镜的发明和同位素示踪原子的应用，推动了微生物学向生物化学阶段的发展。

四、发酵工业技术的形成

在 19 世纪以前，出现的发酵产品有乳酸、酒精、面包酵母、丙酮丁醇、柠檬酸 (表面培养)、淀粉酶 (表面培养)、蛋白酶 (表面培养) 等。上述产品的特点是产物的化学结构比起原料来更为简单，属于初级代谢产物。由于这些产品的生产过程较为简单，所以对生产设备的要求不高。早期的发酵工业以厌氧发酵产品 (如丙酮丁醇) 居多，由于不大量供应氧气，染杂菌导致生产失败的机会较少，故而深层液体厌氧发酵早就具有相当大的规模。当时只有少数的好氧发酵产品采用了深层液体发酵生产法，如面包酵母，醋酸；前者因为酵母的比生长速率较高，后者因为醋酸的生成导致发酵液中 pH 降低，不易污染杂菌。

虽然在古埃及已经能酿造啤酒，但一直到 17 世纪才能在容量为 1500 桶 (一桶相当于 110L) 的木质大桶中进行第一次真正的大规模酿造。在英国麦酒酿造中并未运用纯种培养。确切地说，许多小型的传统麦酒酿造过程，至今仍在使用混合酵母。在这一时期，除了理论上对发酵的认识，在技术上也有了大的突破。Pasteur 揭示了酿造过程中酵母所遵循的规律。1881 年德国人科赫 (R. Koch) 和助手一起开发了一直沿用至今的以琼脂作凝固培养基的纯种微生物分离和纯培养技术，为大规模的发酵生产提供了可能。在 18 世纪后期，Hansen 在 Calsberg 酿造厂建立了酵母单细胞分离和繁殖系统，为发酵生产的微生物初始培养形成一套复杂的技术。

醋的生产，原先是在浅层容器中进行，或是在未充满啤酒的木桶中，将残留的酒经缓慢氧化而生产醋，并散发出一种天然香味。认识了空气在制醋过程中重要性后，终于发明了“发生器”。在发生器中，填充惰性物质 (如焦炭、煤和各种木刨花)，酒从上面缓慢滴下。可以将醋发生器视作第一个需氧发生器。在 18 世纪末到 19 世纪初，基础培养基是用巴氏灭

菌法处理，然后接种 10% 优质醋使呈酸性，可防治染菌污染。这样就成为一个良好的接种材料。

即使在早期的酿造中，也尝试对过程的控制。在 1757 年已应用温度计；在 1801 年就有了原始的热交换器。第一次世界大战时期建立了生产丙酮、丁醇和甘油的发酵工厂，加速了工业微生物学的发展，以易消毒的密闭发酵罐为代表，作为利用微生物进行大规模工业生产的开始。在 1900 年到 1940 年间，主要的新产品是酵母、甘油、柠檬酸、乳酸、丁醇和丙酮。其中面包酵母和有机溶剂的发酵有十分重大进展。面包酵母的生产是需氧过程。酵母在丰富养料中快速生长，使培养液中的氧耗尽。限制营养物的初始浓度，使细胞生长宁可受到碳源的限制，而不使受到缺氧的影响；然后在培养过程中加入少量养料。这个技术现在成为分批补料培养法；并且还将早期使用的向酵母培养液中通入空气的方法，改进为经由空气分布管进入培养液。巴斯德的曲颈瓶试验也使人们开始认识到无菌操作的重要。Weizmann 开拓的丁醇丙酮发酵，是第一个进行大规模工业生产的发酵过程，也是工业生产中首次采用大量纯培养技术，排除了培养体系中其他有害的微生物。发酵器是由低碳钢制成的具有半圆形的顶和底的圆桶。它可以在压力下进行蒸汽灭菌而使杂菌污染减少到最低限度。

20 世纪 40 年代，青霉素的生产是发酵工业技术形成的重要标志。1928 年英国细菌学家弗莱明 (Fleming) 发现了青霉素。但让人感到遗憾的是，当时青霉素培养液中所含的青霉素太少了。如果直接用它的培养液来治病，那一次就要注射几千甚至上万毫升，这在实际上无法办到。最初的青霉素发酵采用湿麦麸为主要培养基的固体发酵方式。1941 年，佛罗理着手进行沉浸培养法的研究开发。青霉素的生产是在需氧过程中进行，必须要有一种严格的、将不需要的微生物排除在生产体系之外的无菌操作技术，即从外界通入大量的空气而又不污染杂菌的培养技术。同时，还要想方设法从大量培养液中提取这种当时产量极低的较纯的青霉素。1943 年经过美英两国科学家和工程师的努力，终于制成了以玉米汁为培养基，在 24℃ 的温度下进行生产的设备。它包括用带有机械搅拌和通入无菌空气的密闭式发酵罐（初期的发酵罐体积为 5m³，发酵效价为 200U/mL）。与此同时，大规模回收青霉素的萃取过程，也是另一大进展。早期青霉素生产与丙酮丁醇发酵的不同点还在于青霉素生产能力极低，因而促进了菌株改良的进程，并对以后的工业起着重要的作用。

随着青霉素大规模生产技术的突破，上百种新的抗生素和其他次级代谢产物的发酵产品相继投产，同时也对初级代谢产物的生产方式有很大启示作用：原来采用固体发酵为主的有机酸和酶制剂生产逐渐改为液体发酵生产。作为生物技术核心的发酵技术已从昔日的以厌氧发酵为主的工艺跃入深层通风发酵为主的工艺。这种工艺不只是通气，而且还有与此相适应的成套工程技术，如：①大量无菌空气的制备技术；②中间无菌取样技术；③设备的设计技术等等。此后，发酵工业中广泛采用了深层培养法进行青霉素以及酶制剂、柠檬酸、维生素、甾体激素和其他抗生素的工业化生产。以通气搅拌的深层发酵通用发酵罐和抗杂菌污染的纯种培养为代表的发酵技术，奠定了现代发酵工程的基础。

五、生化工程技术的诞生

原始的手工作坊式的发酵制作凭借祖先传下来的技巧和经验生产发酵产品，体力劳动繁重，生产规模受到限制，难以实现工业化的生产。于是，人们借鉴化学工程技术，对发酵生产工艺进行了规范，用泵和管道等输送方式替代了肩挑手提的人力搬运，以机器生产代替了手工操作，把作坊式的发酵生产成功地推上了工业化生产的水平。

在 20 世纪 60 年代初期，许多跨国公司决定研究生产微生物细胞作为饲料蛋白质的来源，推动了发酵技术的进一步发展。由于微生物蛋白质的售价较低，所以比其他发酵产品的

生产规模要求更大些。机械搅拌发酵罐的最大容积,已经扩大到 150m^3 。由于发酵时对氧的需求量增加,不需要机械搅拌的高压喷射和强制循环的发酵罐应运而生。这种过程如果进行连续操作,则更为经济。连续发酵是向发酵罐中连续注入新鲜培养基,以促使微生物连续生长,并不断从中取出部分培养液。如ICI公司还在使用 3000m^3 规模连续强制循环发酵罐,超大型的连续发酵的操作周期可超过100天。其问题是染菌的危害性已大大超过1940年代的抗生素生产。这类发酵罐的灭菌,是通过下列手段而达到的:即高度标准化的发酵罐结构、料液的连续灭菌和利用电脑控制灭菌和操作周期,以最大限度地减少人工操作的差错。但连续发酵的应用范围极为有限,工业上普遍开始采用分批培养和分批补料培养法。

抗生素工业的兴起,使发酵工业在产品更新、新设备、新技术的应用上都达到了前所未有的水平。一门反映生物和化工相交叉的学科——生化工程也随之诞生,并取得了飞速发展。Hasting指出(1954年),生化工程要解决的十大问题是深层培养、通气、空气除菌、搅拌、结构材料、容器、冷却方式、设备及培养基除菌、过滤、公害。到20世纪60年代中期,生化工程的研究人员在发酵及与之相关的管路网络设计、操作中推行了无菌的概念,建立了无菌操作的一整套技术。1964年Aiba等人认为通气搅拌与放大是生化工程学科的核心,其中放大是生化工程的焦点。由于通气搅拌尤其是发酵罐的放大问题不仅仅与发酵罐的特性、液体的动态有关,而且与微生物的代谢反应紧密相连,因此,1973年Aiba等人进一步指出,在大规模研究方面,仅仅把重点放在无菌操作、通气搅拌等过程的物理现象解析和设备的开发上是不够的,应当进一步开展对微生物反应本质的研究。其后,生化工程的研究重点就逐步从对过程的物理特性研究过渡到对微生物反应进行定量研究上来。

发酵罐是整个生物反应过程的关键设备。它是为特定的细胞或酶提供适宜的生长环境或进行特定的生化反应的设备,它的结构、操作方式和操作条件与产品的质量、产量和能耗有着密切的关系。发酵罐存在着物料的混合与流动、传质与传热等化学工程问题;存在着氧和基质的供需和传递、发酵动力学、酶催化反应动力学、发酵液的流变学以及生物反应器的设计与放大等一系列带有共性的工程技术问题;同时还包括生物反应过程的参数检测和控制。有关这一加工过程的工程问题已发展成为生化工程的重要学科分支——生物反应工程。

发酵生产与化学工程的结合促成了发酵生产的第一次飞跃。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的学科。

六、代谢控制发酵和基因工程技术的发展

微生物的代谢产物很多,主要有乙醇、丙酮、乳酸、氨基酸、酶制剂、抗生素等,在这些产物中,乙醇、丙酮、乳酸等,微生物可以在特定的外部环境下生成,这类发酵我们称之为自然发酵。而有些产物诸如氨基酸、酶制剂等,正常的微生物不能在培养基中大量的合成与积累,需要通过化学的、物理的、生物的方法人为的改变菌株原来的代谢途径,使之能够分泌并积累特定的产物。早期青霉素发酵生产能力极低,因而促进了菌株改良的进程,但一直通过突变率很低的自然选择或诱变等非定向育种方法来筛选高产菌株。

1950年发现了大肠杆菌能分泌少量的丙氨酸、谷氨酸、天冬氨酸和苯丙氨酸,以及加入过量的铵盐可增加氨基酸积累量的现象。但是,微生物的细胞具有代谢自动调节系统,使氨基酸不能过量积累。如果要在培养基中大量积累氨基酸,就必须解除或突破微生物的代谢调节机制。从20世纪50年代中期起,由于对微生物代谢途径和调控研究的逐步深入,在发酵工业上找到了能突破微生物代谢调控以累积目的产物的手段——代谢控制发酵技术。所谓代谢控制发酵技术,即将微生物通过人工诱变,获得代谢发生改变的突变株,在控制条件

下,选择性地大量生产某种人们所需要的产品。氨基酸发酵就是人为控制这种机制所取得的重大成果。如从自然界中分离筛选野生菌株,控制其胞膜通透性,使之有利于分泌大量 L-谷氨酸,是获得 L-谷氨酸发酵微生物优良菌株的重要途径。其次通过对产 L-谷氨酸菌株的人工诱变,选育产氨基酸的各种突变株,是获得其他氨基酸发酵微生物优良菌株的有效方法。1956年,日本木下祝朗博士等从东京上野动物园鸟粪中分离筛选到谷氨酸产生菌,1957年日本协和发酵公司成功地进行谷氨酸发酵。这是整个氨基酸发酵的开始,继而迅速掀起了一股氨基酸发酵研究的热潮。此外,还可利用添加前体物和酶转化法生产氨基酸。现在,近 20 种氨基酸均可用微生物发酵法生产。

随后,代谢控制发酵技术被用于核苷酸、有机酸和抗生素的生产中。发酵由野生型发酵向高度人为控制的发酵转移;由依赖于微生物分解代谢的发酵转向依赖于生物合成的发酵,即向代谢产物大量积累的方向转移。代谢控制发酵理论的建立和应用为微生物工业发酵的理论和实践作出了重大贡献,也是未来微生物发酵工业研究和发展的方向。大多数的工业产品并不是微生物代谢的末端产物,而是微生物代谢的中间物质,要合成、积累这些物质,必须解除他们的代谢调控机制。

现代发酵工业技术的突破性发展,是以在体外完成微生物基因操作,即通常称为基因工程而开始的。1953年 Watson 和 Crick 提出的 DNA 双螺旋结构模型标志着现代分子生物学的诞生。1957年, A. 科恩伯格等成功地进行了 DNA 的体外组合和操纵。基因工程不仅能在不相关的生物间转移基因,而且还可以很精确地对一个生物的基因组进行交换。因而可以赋予微生物细胞具有生产较高等生物细胞所产生的化合物的能力。基因操作技术引起了发酵工业的革命,并出现大量新型发酵过程。近年来,原核微生物基因重组的研究不断获得进展,胰岛素已用基因转移的大肠杆菌发酵生产,干扰素也已开始用细菌生产。由此形成新型的发酵过程,使工业微生物所产生的化合物超出了原有微生物的范围。

发酵工程起源于家庭或作坊式的手工制作,后来借鉴于化学工程实现了工业化生产,最后又回到以微生物生命活动为中心,研究、设计和指导工业发酵生产(现代发酵工程),跨入生物工程的行列。

第二节 发酵工程的内容及其特点

发酵工程的基本内容和目标是借助于微生物进行产品开发或环境改造,解决的是生物技术产业化进程中的关键问题,涉及解决人类所面临的食物与营养、健康与环境、资源与能源等重大问题,为人类社会带来巨大经济和社会效益,被誉为工业生物技术的核心。“发酵”有“微生物生理学严格定义的发酵”和“工业发酵”之分。工业生产上通过“工业发酵”来加工或制作产品,其对应的加工或制作工艺被称为“发酵工艺”。为实现工业化生产,就必须解决实现这些工艺(发酵工艺)的工业生产环境、设备和过程控制的工程学的问题,因此,就有了“发酵工程”。微生物是发酵工程的灵魂。近年来,对于发酵工程的生物学属性的认识愈益明朗化,发酵工程正在走近科学。

一、发酵工程的内容

完整的发酵工程应该包括从投入原料到获得最终产品的整个过程。发酵工程就是要研究和解决这整个过程中的工艺和设备问题,将实验室和中试成果迅速扩大到工业化生产中去。发酵生产的基本工艺和设备流程一般为(图 1-2):

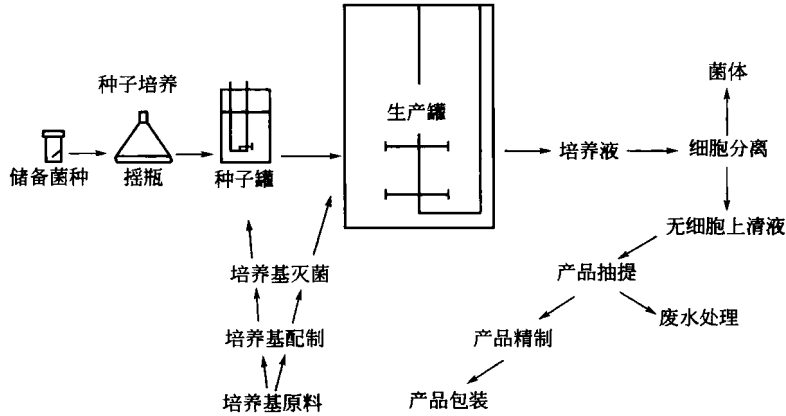


图 1-2 发酵基本过程示意图

从工程学的角度把发酵工业过程分为菌种、发酵和提炼（包括废水处理）等三个阶段，称为发酵工程的上游、中游和下游工程。

上游工程包括优良种株的选育，最适发酵条件（pH、温度、溶氧和营养组成）的确定，营养物的准备等。优良发酵生产菌的特点：①能在廉价原料制成的培养基上迅速生长。②培养条件易于控制。③生长速度快，产能高，发酵周期短。④菌种纯粹，抗噬菌体，非病原菌。人们一般通过化学突变、化学诱变或者紫外线照射来产生突变体，从而改良菌种、提高产量，传统的诱导突变和选择的方法在发酵生产中获得了较大的成功。多种抗生素的大量生产过程就是这种方法的成功例证。但是通过传统的方法提高产量的幅度是非常有限的，如果一个突变了菌株某一组分合成太多，那么其他一些代谢物的合成就会受到影响，因此这反过来又会影响微生物在大规模发酵过程中的生长。传统的诱变和选择的方法过程繁琐、耗时过长、费用极高，需要筛选和检测大量的克隆。另外，用传统的方法能提高微生物一种已有的遗传性质，并不能赋予这种微生物以其他遗传特性。总的来说传统的改良菌种的生物技术还仅仅局限在化学工程和微生物工程的领域内。随着 DNA 重组技术的出现和发展，这种情况发生了根本性的改变。同时，必须掌握菌株的生理生化特性和培养特性，解决大规模种子培养以及如何将其在无菌状态下接入发酵罐中等问题。上游加工中还包括原材料的物理和化学处理、培养基的配制和灭菌等问题，这里包括有物料破碎、混合和输送等多种化工单元操作以及热量传递、灭菌动力学和设备等有关工程问题。

中游工程主要指在最适发酵条件下，发酵罐中大量培养细胞和生产代谢产物的工艺技术。这里要有严格的无菌生长环境，包括发酵开始前采用高温高压对发酵原料和发酵罐以及各种连接管道进行灭菌的技术；在发酵过程中不断向发酵罐中通入干燥无菌空气的空气过滤技术；在发酵过程中根据细胞生长要求控制加料速度的计算机控制技术；还有种子培养和生产培养的不同的工艺技术。此外，根据不同的需要，发酵工艺上还分批发酵（即一次投料发酵）、补料分批发酵（即在一次投料发酵的基础上，流加一定量的营养，使细胞进一步的生长，或得到更多的代谢产物）和连续发酵（不断地流加营养，并不断地取出发酵液）。在进行任何大规模工业发酵前，必须在实验室规模的小发酵罐进行大量的实验，得到产物形成的动力学模型，并根据这个模型设计中试的发酵要求，最后从中试数据再设计更大规模生产的动力学模型。由于生物反应的复杂性，在从实验室到中试，从中试到大规模生产过程中会出现许多问题，这就是发酵工程工艺放大问题。发酵过程的优化是指最佳控制发酵过程的方案或发酵过程中主要控制的项目和方法。发酵过程优化的目的是：①条件和相互关系进行优

化；②复杂关系尽可能简化。

下游工程是对目的产物的提取与精制。这一过程是比较困难的。这是因为一方面生物反应液中的目的产物的浓度是很低微的。例如，浓度最高的乙醇仅为 10% 左右，氨基酸不超过 8%，抗生素不超过 5%，酶制剂不超过 1%，胰岛素不超过 0.01%，单克隆抗体不超过 0.0001%；另一方面因为反应液杂质常与目的产物有相似的结构，加上一些具有生物活性的产品对温度、酸碱度都十分敏感，一些作为药物或食品的产品对纯度、有害物质都有严格的要求。从发酵液中分离和纯化产品的技术：包括固液分离技术（离心分离，过滤分离，沉淀分离等工艺），细胞破壁技术（超声、高压剪切、渗透压、表面活性剂和溶壁酶等），蛋白质纯化技术（沉淀法、色谱分离法和超滤法等），最后还有产品的包装处理技术（真空干燥和冷冻干燥等）。虽然发酵工业生产以发酵为主，发酵的好坏是整个生产的关键，但后处理在发酵生产中也占有很重要的地位。往往有这样的情况：发酵产率很高，但因后处理操作和设备选用不当而大大降低了总得率。所以发酵过程的完成并不等于工作的结束。完整的发酵工程应该包括从投入原料到获得最终产品的整个过程。总之，下游加工过程步骤多，要求严，其生产费用往往占生产成本的一半以上。

二、发酵生产的类型

发酵工程涉及的生产部门有食品工业、农产品加工、酒精和饮料酒工业、氨基酸工业、有机酸工业、化学工业、医药工业、工农业下脚料的处理和增值、工业废水的处理和增值等。每种发酵至少同一种微生物相联系。目前已知具有生产价值的发酵类型有：

(1) 微生物菌体发酵。这是以获得具有多种用途的微生物菌体细胞为目的产品的发酵工业，包括单细胞的酵母和藻类、担子菌，生物防治的苏云金杆菌以及人、畜防治疾病用的疫苗等。其特点是细胞的生长与产物积累成平行关系，生长速率最大时期也是产物合成速率最高阶段，生长稳定期产量最高。

比较传统的菌体发酵工业，有用于面包制作的酵母发酵及用于人类食品或动物饲料的微生物菌体蛋白（单细胞蛋白）发酵两种类型。新的菌体发酵可用来生产一些药用真菌，如香菇类、依赖虫蛹而生存的冬虫夏草菌、与天麻共生的密环菌以及从多孔菌科的茯苓菌获得的名贵中药茯苓和担子菌的灵芝等。这些药用真菌可以通过发酵培养的手段来产生与天然产品具有同等疗效的产物。有的微生物菌体还可用作生物防治剂，如苏云金杆菌、蜡样芽孢杆菌和侧孢芽孢杆菌，其细胞中的伴孢晶体可毒杀鳞翅目、双翅目的害虫；丝状真菌的白僵菌、绿僵菌可防治松毛虫等。所以某些微生物的剂型产品，可制成新型的微生物杀虫剂，并用于农业生产中。因此菌体发酵工业还包括微生物杀虫剂的发酵。

(2) 微生物酶发酵。酶的特点是易于工业化生产，便于改善工艺提高产量。酶普遍存在于动物、植物和微生物中。最初，人们都是从动、植物组织中提取酶，但目前工业应用的酶大多来自微生物发酵，因为微生物具有种类多、产酶品种多、生产容易和成本低等特点。微生物酶制剂有广泛的用途，多用于食品工业和轻工业中，如微生物生产的淀粉酶和糖化酶用于生产葡萄糖，氨基酰化酶用于拆分 D、L-氨基酸等。酶也用于医药生产和医疗检测中，如青霉素酰化酶用来生产半合成青霉素所用的中间体 6-氨基青霉烷酸，胆固醇氧化酶用于检查血清中胆固醇的含量，葡萄糖氧化酶用于检查血中葡萄糖的含量等等。

微生物酶分为胞内酶和胞外酶，其生物合成特点是需要诱导作用，或遭受阻遏、抑制等调控作用的影响，在菌种选育、培养基配制以及发酵条件等方面需给予注意。

(3) 微生物代谢产物发酵。这是以微生物代谢产物作为产品的发酵生产。是发酵工业中

数量最多、产量最大，也是最重要的部分。微生物代谢产物的种类很多，一般分为初级代谢产物和次级代谢产物两种类型。

初级代谢分为三个阶段：①各类营养物质以不同的方式进入细胞。根据物质的性质不同，进入细胞的方式也是不同的，包括自由扩散、被动扩散和主动运输。②通过各自的途径被糖代谢、脂类代谢及蛋白类代谢等代谢成各种不同的中间产物。③中间产物通过合成反应形成细胞自身的物质，或通过分解反应释放能量和 CO_2 和 H_2O ；厌氧条件下生成乙醇、乙酸、乳酸。在菌体对数生长期所产生的产物，如氨基酸、核苷酸、蛋白质、核酸、糖类等，是菌体生长繁殖所必需的，这些产物叫做初级代谢产物。许多初级代谢产物在经济上具有相当的重要性，分别形成了各种不同的发酵工业。

在菌体对数生长期结束以后的生理过程中，某些微生物能够将中间代谢产物或初级代谢产物转化合成一些具有特定功能的产物，如抗生素、生物碱、细菌毒素、植物生长因子等。这些产物与菌体生长繁殖无明显关系，叫做次级代谢产物。次级代谢产物多为低分子量化合物，但其化学结构类型多种多样。其中抗生素不仅具有广泛的抗菌作用，而且还有抗病毒、抗癌和其他生理活性，因而得到了大力发展，已成为发酵工业的重要支柱。

(4) 微生物的转化发酵。微生物转化发酵是利用生物细胞对一些化合物某一特定部位(基团)的作用，使它转变成结构相类似但具有更高经济价值的化合物。最终产物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。

可进行的转化反应包括：脱氢反应、氧化反应、脱水反应、缩合反应、脱羧反应、氨化反应、脱氨反应和异构化反应等。最古老的生物转化，就是利用菌体将乙醇转化成乙酸的醋酸发酵。生物转化还可用于把异丙醇转化成丙醇；甘油转化成二羟基丙酮；葡萄糖转化成葡萄糖酸，进而转化成 2-酮基葡萄糖酸或 5-酮基葡萄糖酸；以及将山梨醇转变成 L-山梨糖等。此外，微生物转化发酵还包括甾类转化和抗生素的生物转化等等。

(5) 生物工程细胞的发酵。这是指利用生物工程技术所获得的细胞，如 DNA 重组的“工程菌”以及细胞融合所得的“杂交”细胞等进行培养的新型发酵，其产物多种多样。用基因工程菌生产的有胰岛素、干扰素、青霉素酰化酶等，用杂交瘤细胞生产的用于治疗 and 诊断的各种单克隆抗体等。

三、发酵工程的特点

发酵过程是由生长繁殖的微生物所引起的生物反应过程。利用微生物反应过程可以获得某种产物，也可以利用微生物来消除某些物质(废水、废物的处理)。它们都是活微生物的反应过程，因此，这一过程中的产物可以是过程的中间或终点时的代谢产物，也可以是有机的降解物或微生物自身的细胞。发酵工程的一般特点为：①生产所用的原料通常以淀粉、糖蜜等碳水化合物为主，辅料包括一定的有机或无机氮源和少量无机盐。②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，因而所需产品可在单一发酵设备中一次合成。③微生物能利用简单的物质合成复杂的高分子化合物。酶制剂、活性蛋白、活性肽和多糖等生物产品的生产是微生物工业最有发展前景的领域。④由于生命体特有的反应机制，微生物能高度选择性地在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。⑤微生物在自然界中分布很广，种类繁多。人们可有目的地从自然界中筛选有用的微生物菌种，并可通过物理和化学诱变、细胞融合和基因重组等育种技术获得高产菌株。从分子生物学的观点看，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。例如最初从微生物生产青霉素时，其产率不到 0.01%，经过人们的不断改造，今天已达 5%