

生物工程
生物技术
系列

普通高等教育“十三五”规划教材



发酵工艺与设备

第二版

陶兴无 | 主编



化学工业出版社

普通高等教育“十三五”规划教材

发酵工艺与设备

(第二版)

陶兴无 主编



化学工业出版社

·北京·

发酵工程是现代生物技术农业、医药、化工、食品和环保等领域应用发展的关键。发酵工艺与设备是发酵工程的核心内容，将工艺和设备结合起来讲授，有利于学生能把发酵工艺理论及设备操作原理作为一个完整的知识体系进行学习。

本书以发酵生产共性工艺技术为主线，主要介绍的内容包括生产菌种的选育培养、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、发酵过程参数检测及控制以及发酵产物的分离提取。

本书适合高等院校生物、食品、医药、化工及相关专业的本科生使用，也可作为相关研究人员的参考用书。

发酵工艺与设备

图书在版编目(CIP)数据

发酵工艺与设备/陶兴无主编. —2版. —北京: 化学工业出版社, 2015.9

普通高等教育“十三五”规划教材

ISBN 978-7-122-24708-7

I. ①发… II. ①陶… III. ①发酵-生产工艺-高等学校-教材②发酵工业-工业设备-高等学校-教材 IV. ①TQ920.6

中国版本图书馆CIP数据核字(2015)第167744号

责任编辑: 魏巍 赵玉清
责任校对: 吴静

文字编辑: 焦欣渝
装帧设计: 关飞

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: 三河市宇新装订厂

787mm×1092mm 1/16 印张20½ 字数521千字 2015年10月北京第2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: 42.00 元

版权所有 违者必究

前 言

《发酵工艺与设备》自2011年出版发行以来，被许多高等院校选作生物、医药、食品、化工等专业发酵工程或发酵工艺学课程教材，受到广大师生和读者的欢迎，多次重印。这次再版根据反馈的意见和建议进行了全面修订。为了使读者对发酵工程有更加直观的认识，保留并修订了谷氨酸生产实例（分别安排在不同章的最后一节），主要修订情况如下。

1. 在第三章新增了“谷氨酸发酵设备及培养基灭菌”一节。

2. 将“发酵过程参数的检测及其控制”调整为第七章，新增了“谷氨酸发酵过程的自动控制”一节。

3. 将“发酵产物的分离提取”调整为第八章，新增了“谷氨酸发酵清洁生产”内容。

在内容编排上与第一版基本相同，以发酵生产共性工艺技术为主线，内容主要包括生产菌种的选育培养、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过程参数检测及控制，最后简要介绍发酵产物的分离提取。在修订时仍注重实用性，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。

本书修订工作主要由武汉轻工大学（原武汉工业学院）陶兴无完成。限于作者水平，在内容及编排方面存在的错误或欠妥之处，恳请批评指正。在本书编写过程中参考了大量文献，要特别感谢文献的作者及支持帮助本书修订出版的读者和同行们。

陶兴无

2015年5月于武汉

第一版前言

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 发酵技术的起源与发展	1
一、古代人类的酿酒活动与传统酿造工艺	2
二、微生物、酶的发现和纯培养发酵技术的建立	3
三、现代发酵工程技术的形成	5
四、代谢控制发酵和基因工程技术的产生与发展	7
第二节 发酵工程的内容及其特点	8
一、发酵工程的内容	8
二、发酵生产的类型	10
三、发酵工程的特点	11
第三节 发酵工程的应用领域	13
一、医药工业	13
二、食品工业	15
三、化学工业	15
四、农业	17
五、环境保护	17
六、冶金工业	18
第四节 发酵工程技术的发展趋势	18
一、采用基因工程技术改良菌种	19
二、推广大型节能高效的发酵装置及计算机自动控制	19
三、生物反应和产物分离偶联	19
四、微生物发酵技术应用于高等动植物细胞培养	20
五、固定化(细胞和酶)技术的应用	20
六、开发清洁生产工艺	21
思考题	22
参考文献	22
第二章 生产菌种的选育培养	23
第一节 微生物的代谢及调控	23
一、微生物的初级代谢与次级代谢	23
二、微生物代谢的调节及控制	25
第二节 生产菌种的选育方法	27
一、发酵工业中的常用微生物	27
二、新菌种的分离与筛选	29

三、菌种的改良及工程菌构建	33
第三节 微生物代谢控制育种的措施	34
一、营养缺陷型突变株	34
二、抗反馈控制突变株	36
三、其他类型突变株	38
第四节 菌种的扩大培养及保藏	39
一、菌种的扩大培养	39
二、菌种的衰退和复壮	41
三、菌种的保藏	44
四、国内外主要菌种保藏机构	47
第五节 发酵培养基的设计	50
一、培养基的类型	50
二、发酵培养基的组成	51
三、发酵培养基的优化	57
第六节 生产实例——谷氨酸生产菌种扩大培养及发酵培养基设计	58
一、谷氨酸生产菌种的来源及保藏	58
二、生产菌种的扩大培养	59
三、发酵培养基的组成	60
思考题	65
参考文献	65

第三章 灭菌与除菌工艺及设备

第一节 发酵生产中有害微生物的控制	66
一、发酵生产中的无菌概念	66
二、有害微生物的控制方法	67
第二节 培养基灭菌	69
一、湿热灭菌的操作原理	69
二、分批灭菌	72
三、连续灭菌	73
第三节 无菌空气制备	76
一、空气净化除菌的方法与原理	76
二、无菌空气的制备流程	78
三、空气预处理设备	81
四、空气过滤介质及过滤器	85
第四节 设备与管道的清洗与灭菌	88
一、常用清洗剂及清洗方法	89
二、设备及管路的灭菌	92
第五节 灭菌实例——谷氨酸发酵设备及培养基灭菌	97
一、灭菌前的准备工作	97
二、总(分)过滤器灭菌	98

三、种子罐和发酵罐空罐灭菌	98
四、培养基实罐灭菌	98
五、发酵培养基连续灭菌	99
思考题	99
参考文献	99
第四章 厌氧发酵工艺及设备	100
第一节 厌氧发酵产物的生物合成机制	100
一、糖酵解途径概念及其特点	100
二、酵母菌的酒精、甘油发酵	102
三、乳酸发酵	103
四、甲烷(沼气)发酵	106
第二节 白酒与酒精发酵	106
一、白酒固态发酵	107
二、酒精发酵	113
第三节 啤酒发酵	119
一、啤酒发酵产生的主要风味物质	120
二、传统啤酒发酵	121
三、现代大罐啤酒发酵	125
第四节 乳酸发酵	129
一、乳酸发酵工艺概述	130
二、大米和薯干粉发酵工艺	131
三、淀粉水解糖发酵工艺	132
四、玉米粉发酵工艺	134
五、蔗糖和糖蜜发酵工艺	134
六、葡萄糖的L-乳酸发酵工艺	136
七、细菌乳酸发酵工艺小结	136
八、原位产物分离乳酸发酵工艺简介	137
思考题	139
参考文献	139
第五章 好氧发酵工艺及设备	140
第一节 好氧发酵产物的合成机制	140
一、谷氨酸发酵机制	140
二、柠檬酸发酵机制	145
三、其他好氧发酵产物的合成	148
第二节 发酵过程的工艺控制	152
一、溶解氧对发酵的影响及其控制	153
二、二氧化碳和呼吸商对发酵的影响及其控制	156
三、温度对发酵的影响及其控制	158

四、pH 值对发酵的影响及其控制	160
五、菌体和基质浓度对发酵的影响及补料控制	163
六、发酵过程中的泡沫控制	169
七、发酵终点的确定	171
第三节 通风发酵设备	172
一、机械搅拌通风发酵罐	172
二、其他通风发酵罐简介	183
第四节 发酵染菌及防治	185
一、染菌的检查及原因分析	186
二、染菌对不同发酵过程的影响	187
三、染菌发生的不同时间对发酵的影响	187
四、发酵异常现象及原因分析	188
五、杂菌污染的预防	189
六、染菌的挽救和处理	190
七、噬菌体污染及其防治	190
第五节 好氧发酵工艺实例——谷氨酸发酵	191
一、谷氨酸生产菌的菌体形态特点	192
二、亚适量生物素流加糖发酵工艺	193
三、淀粉水解糖高生物素添加青霉素流加糖发酵工艺	194
四、甘蔗糖蜜添加青霉素流加糖发酵工艺	195
五、谷氨酸发酵异常现象及其处理	196
思考题	197
参考文献	198

第六章 发酵动力学

第一节 发酵过程的化学计量及动力学描述	200
一、细胞反应的元素衡算	200
二、细胞反应的得率系数	201
三、反应速率	202
四、反应速率与得率系数之间的关系	204
五、细胞反应系统的动力学描述	205
第二节 分批发酵	206
一、菌体生长动力学	206
二、基质消耗动力学	213
三、代谢产物生成动力学	216
四、分批发酵的产率	218
第三节 连续发酵	220
一、连续发酵的动力学方程	221
二、连续发酵的稳态操作条件	223
三、连续发酵的产率	225

四、连续发酵过程中的杂菌污染和菌种变异	226
五、多级连续发酵	228
六、连续培养的应用	229
第四节 补料分批发酵	230
一、补料分批发酵的特点	230
二、流加操作的数学模型	231
思考题	236
参考文献	236

第七章 发酵过程参数检测及控制 237

第一节 发酵过程参数检测概述	237
一、发酵过程参数的分类	237
二、发酵过程参数检测的特点	238
第二节 发酵检测控制系统的基本组成	239
一、测定元件	239
二、控制部分	240
三、执行元件	242
第三节 发酵过程的自动控制原理	243
一、反馈控制	243
二、前馈控制	243
三、自适应控制	244
第四节 发酵过程的计算机控制	244
一、发酵过程控制的计算机系统	245
二、发酵过程中计算机的控制方式	245
第五节 常用物理参数的检测与控制	246
一、温度	246
二、罐压	247
三、搅拌转速和功率	248
四、空气和料液流量	249
五、液位和泡沫	251
第六节 常见化学和生物参数的检测与控制	252
一、pH 值及溶解 CO_2 浓度	252
二、溶氧浓度及氧化还原电位	254
三、发酵罐排气(尾气)中 O_2 分压和 CO_2 分压	257
四、细胞浓度和发酵液成分	259
第七节 生产实例——谷氨酸发酵过程的自动控制	261
一、谷氨酸发酵工艺特征及其控制中存在的问题	262
二、谷氨酸发酵罐的主要控制系统	262
思考题	264
参考文献	264

第八章 发酵产物的分离提取	265
第一节 发酵产物分离的特点与过程设计	265
一、发酵产物分离的特点	265
二、常用的分离技术及机制	266
三、发酵产物分离的过程选择	267
第二节 细胞破碎	268
一、机械法	269
二、非机械法	270
第三节 沉淀与离心	271
一、沉淀	271
二、离心	272
第四节 过滤与膜分离	277
一、过滤	277
二、膜分离	281
第五节 萃取与色谱分离	286
一、萃取	286
二、色谱分离	289
第六节 离子交换与吸附	292
一、离子交换	292
二、吸附	294
第七节 蒸发、结晶与干燥	297
一、蒸发	297
二、结晶	301
三、干燥	304
第八节 发酵产物的分离实例——谷氨酸提取与味精制造	308
一、谷氨酸提取	308
二、味精制造	312
三、谷氨酸发酵清洁生产	315
思考题	318
参考文献	318

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。生物技术不完全是一门新兴学科, 它包括传统生物技术和现代生物技术两部分。传统生物技术是指旧有的制造酱、醋、面包、奶酪及其他食品的传统发酵工艺。现代生物技术则是指 20 世纪 70 年代末 80 年代初发展起来的, 以现代生物学研究成果为基础, 以基因工程为核心的新兴学科。当前所称的生物技术基本上都是指现代生物技术。现代生物技术包括基因工程 (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过程进行的。

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的现代发酵工程阶段。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 发酵技术的起源与发展

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 6 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，宜更酲之；不酲则酒味苦、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，我国古代关于发酵的基本概念产生比西方早很多年。

一、古代人类的酿酒活动与传统酿造工艺

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压成粉，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，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，无意中把做面包用的生面团长时间放在太阳下晒，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美味可口的淡黄色液体，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”。

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。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。因为水果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，粮食中的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，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。

中国人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，我国酿酒工艺采用的酒曲上所生长的

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结，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的淀粉和蛋白质转变成糖、氨基酸。麴也含有许多这样的酶，具有糖化作用，可以将麴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、腐乳等发酵食品的生产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。尽管以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。

二、微生物、酶的发展和纯培养发酵技术的建立

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、带徒弟，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，荷兰博物学家列文虎克发明了复式显微镜（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），从此结束了延续了 100 多年的争论。

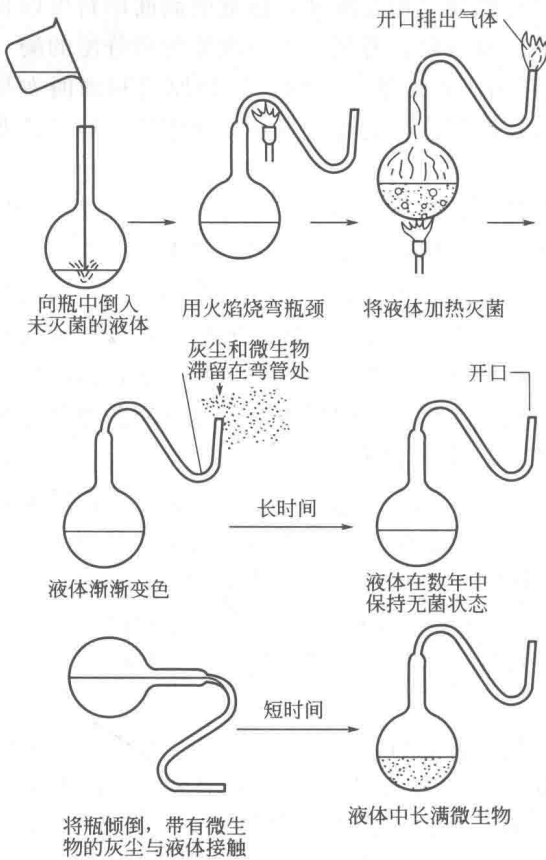


图 1-1 巴斯德否定自然发生论的曲颈瓶试验

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

为“发酵之父”。

1880 年，著名的德国医生科赫 (Koch, 1843—1910 年) 发现可以通过稀释把多种微生物分离开来，建立了单种微生物的分离和纯培养技术。建立了研究微生物的一系列方法，把早年在马铃薯块上的培养技术改为明胶平板 (1881 年) 和琼脂平板 (1882 年)。1897 年德国的毕希纳 (Eduard Buchner, 1860—1917 年) 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 CO₂ 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，并将此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。

第一次世界大战中，德国需求大量的甘油用于制造炸药，从而使甘油发酵工业化。英国需要大量优质的丙酮，制造无烟火药的硝化纤维，促进了丙酮-丁醇发酵的发明。从那时起，发酵技术又经历了几次重大的转折，不断地发展和完善。人们成功地掌握了微生物纯种培养技术。为此，人们设计了便于灭除其他杂菌的密闭式发酵罐以及其他灭菌设备，开始了乙醇、甘油、丙酮、丁醇、乳酸、柠檬酸、淀粉酶和蛋白酶等的微生物纯种发酵生产，与巴斯德时代以前的自然发酵是两个迥然不同的概念。此阶段以微生物的纯种培养技术为主要特征。但是，此时的发酵技术本身并无很大的进步，仍采用设备要求低的固体、浅盘液体发酵以及厌氧发酵，这是一些生产规模小、工艺简单、操作粗放的发酵方式，只能说是当代发酵

工程的雏形。

三、现代发酵工程技术的形成

在 19 世纪以前出现的发酵产品，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 值降低，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（1 桶相当于 110 升）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单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的重要性后，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，使细胞生长受到碳源的限制，而不受到缺氧的影响；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 开拓的丙酮丁醇发酵，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小到最低限度。

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。最初的青霉素发酵是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,包括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 5m^3 ,发酵效价为 $200\text{U}/\text{mL}$)。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,如大量无菌空气的制备技术、中间无菌取样技术、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。

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以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20世纪40年代的抗生素生产。这类发酵罐的灭菌,是通过高度标准化的发酵罐结构、料液的连续灭菌、利用电脑控制灭菌和操作周期而达到的,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、新设备和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