

生物技术和生物工程专业规划教材

发酵工程实验指导

The Experimental Guide for Fermentation Engineering

主 编 吴根福

副主编 杨志坚



高等教育出版社
Higher Education Press

生物技术和生物工程专业规划教材

发酵工程实验指导

The Experimental Guide for Fermentation Engineering

主 编 吴根福

副主编 杨志坚

参编人员 (按姓氏笔画为序)

吴根福 吴雪昌 林小清 杨志坚

周顺洪 施曼玲 殷一雷



高等教育出版社
Higher Education Press

内容提要

本书为高等学校发酵工程实验教学用书。全书分为基础发酵实验和综合发酵实验两大部分。基础发酵实验以抗生素发酵为主线,内容包括发酵菌种的自然选育及诱变育种、菌种的复壮和保藏、培养基及培养条件的优化、发酵效价的测定、发酵污染的检测等,还编入了甜酒酿发酵、酸乳发酵、泡菜发酵等发酵小实验,适于常规教学体制下(每周3~6学时)的实验安排。综合发酵实验包括液体静置发酵(以啤酒发酵为代表)、液体通气搅拌发酵(以谷氨酸发酵为代表)和固体发酵(以红曲发酵为代表)3个系列共50个实验,涉及发酵培养基的配制和灭菌、菌种扩大培养、发酵分析、发酵过程控制和发酵产物的提取纯化等内容,适于集中式教学的实验安排。

本书适于高等院校和师范院校生物科学、生物技术、生物工程及食品科学等专业本科生和硕士生的学习使用,也可供其他有关科技人员查阅参考。

图书在版编目(CIP)数据

发酵工程实验指导/吴根福主编. -北京:高等教育出版社,2006.5

ISBN 7-04-018619-5

I. 发... II. 吴... III. 发酵工程-实验-高等学校-教材 IV. TQ92-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2006)第 021900 号

策划编辑	王 莉	责任编辑	田 军	封面设计	张 楠	责任绘图	朱 静
版式设计	王艳红	责任校对	康晓燕	责任印制	陈伟光		

出版发行 高等教育出版社
社 址 北京市西城区德外大街4号
邮政编码 100011
总 机 010-58581000

经 销 蓝色畅想图书发行有限公司
印 刷 北京市白帆印务有限公司

开 本 787×1092 1/16
印 张 12.5
字 数 300 000

购书热线 010-58581118
免费咨询 800-810-0598
网 址 <http://www.hep.edu.cn>
<http://www.hep.com.cn>
网上订购 <http://www.landracom.com>
<http://www.landracom.com.cn>
畅想教育 <http://www.widedu.com>

版 次 2006年5月第1版
印 次 2006年5月第1次印刷
定 价 16.00元

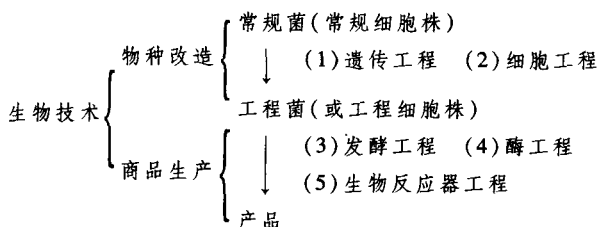
本书如有缺页、倒页、脱页等质量问题,请到所购图书销售部门联系调换。

版权所有 侵权必究

物料号 18619-00

前言

生命科学是当今发展最快、最活跃的学科,也是新世纪各高等学校重点发展的学科之一。发酵工程是利用生物,特别是微生物的特定性状和功能,通过现代化工程技术来生产有用物质或将生物直接用于工业化生产的技术体系,是建立在发酵工业基础上,与化学工程相结合而发展起来的一门学科,也是连接生命科学研究和应用的桥梁。在当今生物工程领域中起领头羊作用的基因工程和细胞工程,只是利用分子生物学的最新成就,操纵基因,定向地改造物种,要将它们转化成产品,还必须依靠发酵工程技术,对这些“工程菌”或“工程细胞株”进行大规模的培养,以生成大量有用代谢产物或发挥其独特的生理功能。因此发酵工程与诸如生物制药、生物农药、食品生产、环境净化、微生物冶金及生物能工业等领域都具有非常密切的关系,掌握发酵工程的基本理论,熟悉发酵工程的工艺流程及常用的实验技术,无论对今后有志于生物工程研究的同学,还是对希望在生产中大显身手的同学,都具有十分重要的意义。



在传统的教学体系中,理论学习往往占主导地位,实验教学只是为验证理论课的某些内容而设立的。因此无论是教学课时数、学分数,还是老师和学生的重视程度上,都没法与理论教学相比。而现代社会对学生动手能力和综合素质的要求越来越高,我们参照国外某些大学的做法,将发酵工程设定成一门以实验操作为主、理论讲解为辅的课程,通过课程的学习,要求学生掌握发酵工程的基本概念和理论,了解发酵工业的特点及发酵工程学的发展概况,更重要的是通过几种常见工业发酵产品的实验室中型发酵,熟悉发酵工业的整个过程,掌握有氧发酵和静置发酵,液体发酵和固体发酵等常规发酵方法及发酵产品的后处理技术。使学生的创造性、自主性、责任心得到锻炼,吃苦耐劳精神、团队协作精神得到培养,发现问题、分析问题、解决问题的能力得以提高。但是鉴于发酵工程的特殊性,即微生物的发酵周期比较长,实验需连续进行,在常规的教学过程中很难对这些实验进行合理的安排。

为了尽可能让同学们全面、直观地理解发酵工程的内涵,我们从1999年开始利用短学期(秋季学期开学前)集中10 d时间开设了发酵工程实验。我们选取了液体搅拌发酵(以谷氨酸发酵为代表)、液体静置发酵(以啤酒发酵为代表)和固体发酵(以红曲发酵为代表)3大系统性实验,提供一切可能的条件让同学们亲自发酵红曲、酿制啤酒、生产味精。经过5年将近15轮次的实践,同学们反映良好。为了总结和检验教学成果,在教育部高教司的支持下,我们于2004年9月

组织了全国高等院校生物技术实验教学交流会。与会教师在交流时提出在教材出版时应增加基础发酵实验,以利实行常规教学体制(无短学期)的学校选用。本教材就是在5年实践教学的基础上,吸收了高等院校同行的建议编写而成的。

本教材所选的实验内容具有广泛的代表性,适合各类大专院校及轻工技校使用。为了让同学们最大程度地了解发酵过程,我们选择了典型的静置发酵——啤酒发酵和典型的通气搅拌发酵——谷氨酸发酵作为实验的主要内容。这是因为①这两种发酵的发酵周期与课时较吻合;②这两种发酵的代谢基础已经在生物化学与微生物学中介绍过,有利于学生对各门课程的融会贯通;③这两种发酵的过程分析内容非常充实,能很好地锻炼学生的动手能力;④这两种发酵,特别是谷氨酸发酵,其内容涵盖了发酵控制、产物分离、纯化结晶等各个单元操作,有一定的系统性;⑤这两种发酵在发酵工业中占有重要地位,又与日常生活关系密切,同学们的兴趣比较高。鉴于固体发酵也是发酵的一种重要形式,我们还以红曲发酵为代表安排了一系列实验。

在实验设备的选择中,我们基本按中试规模来选购,如发酵罐为70 L机械搅拌式,尽量不采用自控罐,所有参数均由学生现场取样测定。在实际操作中,这样的设备组合表现出以下优点①整个实验分析样品较多,对学生原有的操作技能是一个巩固和提高;②学生接触到了与以往实验不同的设备、方法和规程,普遍比较感兴趣;③由于上一步的分析将指导其下一步的操作,有利于培养学生踏实、严谨的工作作风。

所选的这三大系列实验各有特点。啤酒发酵为分批发酵,以酵母菌作为发酵的主体,发酵温度相对较低,微生物的代谢作用比较缓慢,主发酵周期在6 d左右,同学们只需每天测定发酵的进展情况,根据进程适当调整发酵参数,而不需要在发酵过程中流加原料;红曲发酵是一种需氧固体发酵,以红曲霉作为发酵的主体,发酵温度30℃左右,在浅盘中进行,因此需要在接种后每天观察生长情况,适当补充水分并及时翻曲。这两大实验可以全部安排在白天进行。而谷氨酸发酵是补料分批发酵,以谷氨酸棒状杆菌作为发酵的主体,发酵温度为32~34℃,发酵周期36 h左右,由于在发酵过程中产生大量有机酸,pH会不断降低,因此要根据产酸情况适当流加氨水或尿素(既充当氮源,又能调节pH),并根据发酵的各项参数调整通风量、开闭冷却水等,实验必须连续进行(需要值夜班)。除了酵母、霉菌和细菌外,放线菌也是一类重要的工业微生物,但是,由于放线菌的发酵周期较长,又是有氧发酵,在实验室进行中试规模的实验不太现实,因此,我们只在基础发酵实验部分作了重点介绍。另外,酶制剂也是一类重要的发酵产品,而且,淀粉酶、蛋白酶产生菌株的筛选相对容易,也不需要特别的设备,适于普通轻工院校师生选用,所以在基础发酵实验中也作了详细的阐述。鉴于固定化细胞发酵和连续发酵在发酵工程发展过程中的重要意义,我们也编排了相应的实验。至于基因工程菌的发酵,因为已在《基因工程实验》中作了编排,这里也就不再重复了。

经过5年的实践,我们认为开设发酵工程实验对学生各方面能力的提高具有不少好处,主要表现为:

1. 有利于提高学生的综合实验能力

本实验集成度较高,牵涉到分析化学、有机化学、生物化学、微生物学、发酵工艺学及化学工程等学科的实验内容。如谷氨酸的发酵过程中,菌种的扩大培养是微生物学的内容,还原糖含量的测定是分析化学的内容,谷氨酸脱羧酶的制备是生物化学的内容,谷氨酸含量的测定是有机化学的内容,发酵控制则是发酵工艺学的内容,味精的脱色除铁、浓缩结晶则是化学工程的内容。

· II ·

将这么多学科的实验内容综合在一起,不仅可复习巩固原来已学过的知识,还可以极大地提高学生的综合实验能力。

2. 有利于培养学生的毅力及坚忍不拔的精神

发酵工程实验需连续工作 10 d,而且还需要值夜班;再加上发酵过程中生物反应的时间比较长,又容易受外界因素的干扰,如果没有足够的耐心与细心,常常会出现这样那样的失误。连续 10 d 的实验不仅是对体力的考验,更是对脑力的考验,在体力消耗较大的情况下,还要保持清醒的头脑,对发酵过程中出现的新问题、新情况进行及时的分析,并提出解决办法,确实是对毅力的锻炼。

3. 有利于培养学生的独立性和自主性

发酵工程实验是一门开放性的实验课程,特别是在发酵的过程控制中,在同一单位时间内,不同的组进行不同的实验,教师不可能总在身边,各项分析测定只能参照实验讲义自行摸索,独立操作。学生的座位也是不固定的,要随着测定项目的不同而移动,再加上三种发酵实验同时进行,在测定的时间上也有相当大的机动性,因此要求学生自主地进行操作,实验结束后自觉地整理好实验用品,搞好清洁卫生,否则下一组同学的实验就可能无法正常进行。另外,由于理论部分讲得相对较少,而发酵过程中又必须要有理论的指导,从而也促进了同学们的自学能力。

4. 有利于培养学生的责任心

由于实验分组进行,如果一个组测定的数据不佳,会影响到整个测定结果,给数据分析带来困难。特别是谷氨酸发酵过程中,如果 pH 测定错误,不该流加氮源时流加,或该添加时却不加,都会影响发酵的正常进行,严重时甚至倒罐。因为各大组之间存在着一定程度的竞争,同学们的自尊心又很强,谁也不愿意因为自己的失误而造成整个大组的实验失败,所以有利于责任心的培养。

5. 有利于培养学生的创造性

我们的实验是开放性实验,实验室也全天候开放,只要与实验有关的项目,鼓励学生进行创造性研究。如有的同学认为斐林试剂定糖法滴定终点较难掌握,实验结果影响因素较多,我们就鼓励他对此方法进行改进;又譬如在谷氨酸发酵结束后,为了初步了解发酵液中的谷氨酸产量,有的同学想出了快速调节发酵液 pH 至等电点并快速冷冻的方法,不仅确证了发酵液中有足量的谷氨酸,而且观察到了正常实验时没机会看到的 β -晶体。

6. 有利于培养学生的团队合作精神

我们提倡独立操作的精神,同时也强调分工合作的重要性。现代社会讲究良好的整体配合,一个人的力量越来越显得微不足道。特别是谷氨酸发酵过程中,几个组轮流值班,进行发酵指标的测定和发酵参数的调节,若在交接班过程中交代不清,可能造成不可弥补的损失。

7. 有利于培养同学之间团结友爱的精神

平时的实验多是小型实验,大家各做各的,而本次实验大家聚在一起,为了一个共同的目标,互相配合,互相关心。在安排值班时,尽可能把白班让给女同学及身体较差的同学,发酵罐空消、实消时蒸汽较烫,培养基配制、发酵结束后的放罐洗罐等工作又脏又累,同学们也都能争着干,从而培养了同学之间团结友爱的精神。

本课程建议 96 学时,有条件的学校可安排在短学期集中进行,全部实验在 10 d 内完成。3 大系列发酵实验穿插进行,在实验的间隙(如高压蒸汽灭菌时,谷氨酸的搅拌育晶过程,过滤时)

适当安排一些基础发酵实验或是发酵工程基本理论方面的专题讲座。采用常规体制的学校也可选取其中的部分实验进行教学,除了谷氨酸发酵外,其他实验都适合于每周1次的实验安排,详细建议请参考相关章节的介绍。

为了提高教学效率,建议将实验安排分时段详细地告诉同学们(见发酵工程实验时间安排表),让他们按这个时间表进行各项操作。因为发酵工程实验是一个连续的、开放性的大实验,3大发酵同时进行,因此下列几点必须引起同学们注意:

1. 要充分发挥主观能动性

由于实验时,一般2~3人一个小组,8~10人一个大组,各个实验要根据安排自觉进行。因此必须充分发挥主动性,自觉进行各项实验。

2. 不要乱拖实验器材

由于同时进行多个实验,需要比较多的实验器材,不能为了贪图自己的方便,把其他组的器材拖来就用,共用的小型仪器应放于固定的地方,不要随便搬动。

3. 注意清洁卫生

实验在一段时间内为轮班作业,值日学生可能因为上夜班而没来,同学们一定要及时清理垃圾,以免发酵污染。

本教材的谷氨酸发酵部分主要由杨志坚编写,其余部分主要由吴根福编写,全书由吴根福统稿。实验方法的选择上充分考虑了普通发酵实验室的设备条件,同时力求与国内先进的发酵企业相衔接。在教材编写过程中得到了高等教育出版社的大力支持,浙江大学生物技术系主任张铭教授提出许多宝贵的建议。康恩贝生物制药有限公司的周顺洪参与了抗生素部分实验的编写工作,金狮啤酒集团的殷一雷参与了啤酒发酵部分的编写工作,吴雪昌、林小清、施曼玲等同志也在统稿、校对、图片拍摄和绘制等工作中作出了许多宝贵贡献,在此一并致谢。由于编者水平有限,错误在所难免,恳请同行批评指正。

编者

2006.3

发酵工程实验时间安排

值日组

第一天:8.30 ~ 9.00 am	总体介绍。	
9.00 am ~ 5.00 pm	啤酒发酵介绍,协定法糖化实验,酵母培养基配制,灭菌。	1
5.00 ~ 5.30 pm	红曲发酵之浸米。	
第二天:8.30 ~ 9.15 am	啤酒酵母菌种扩大(一级菌种扩大):斜面 → 50 mL 三角瓶。	
9.15 ~ 12.00 am	谷氨酸、红曲发酵介绍。	2
1.30 ~ 5.00 pm	谷氨酸发酵之一、二级菌种培养基配制,灭菌;红曲发酵之豆芽汁培养基的配制,灭菌;红曲发酵之固体培养基配制(蒸饭,冷却)。	
5.00 ~ 5.30 pm	啤酒发酵之二级菌种扩大(500 mL 三角瓶)15 ~ 20 ℃ 培养。	
5.00 ~ 5.30 pm	将红曲液体种子接至固体培养基中;谷氨酸一级种子接种。	
第三天:8.30 am ~ 5.00 pm	啤酒发酵之麦芽粉碎、麦芽汁制备、煮沸、冷却。	
9.30 am ~ 5.30 pm	谷氨酸发酵之发酵管道熟悉,发酵罐的空消。	3
	从第三天至第七天,每天观察红曲的发酵情况,作好记录;每天根据发酵料的干湿,适量喷洒醋酸溶液或无菌水。	
5.00 ~ 5.30 pm	将啤酒酵母菌种接入发酵罐(若温度高,可推迟至第四天上午)。	
第四天:8.30 am ~ 2.30 pm	谷氨酸发酵之发酵培养基的配制,实消,并种,上罐。	
8.45 am ~ 5.30 pm	麦芽汁及啤酒发酵液的分析(各组轮流进行)。	4,5
2.30 ~ 12.00 pm	谷氨酸发酵之过程控制(各组轮流值班)。	
	别忘了红曲发酵的观察。	
第五天:0.00 am ~ 10.30 pm	谷氨酸发酵之过程控制(各组轮流值班)。	
8.30 am ~ 5.30 pm	啤酒发酵液的分析(每组每天各分析一个项目)。	6,7
	别忘了红曲发酵的观察。	
第六天:8.30 am ~ 5.30 pm	谷氨酸等电回收。	
	啤酒发酵液的分析。	8,9
	红曲发酵的观察,色价、淀粉酶活力、自由基清除活力的测定。	

第七天:8.30 am ~ 5.30 pm	谷氨酸的脱色,除杂,中和。 啤酒发酵液的分析。 红曲发酵的观察,色价、淀粉酶活力、自由基清除活力的测定。	10
-----------------------	--	----

第八天:8.30 ~ 12.30 am	谷氨酸钠(味精)的精制。
8.30 am ~ 4.00 pm	啤酒发酵液的分析;红曲米的分析,红色素分离纯化。
3.30 ~ 4.00 pm	红曲液体培养基(第二天配制)接种,培养(供下班同学用)。

• 3.30 ~ 4.00 pm	啤酒的后发酵。	
4.00 ~ 5.00 pm	大扫除。	全体同学

第九天 : 实验总结,写实验报告,复习迎考。

第十天:8.30 ~ 12.30 am	去工厂参观。
2.00 ~ 3.30 pm	考试,上交实验报告。
3.30 ~ 5.00 pm	啤酒的品尝,实验总结。

成绩考评:平时、考试、实验报告各占 1/3;

实验结束后各组整理好自己的物品,值日生请做好值日,保持实验室整洁。

郑重声明

高等教育出版社依法对本书享有专有出版权。任何未经许可的复制、销售行为均违反《中华人民共和国著作权法》，其行为人将承担相应的民事责任和行政责任，构成犯罪的，将被依法追究刑事责任。为了维护市场秩序，保护读者的合法权益，避免读者误用盗版书造成不良后果，我社将配合行政执法部门和司法机关对违法犯罪的单位和个人给予严厉打击。社会各界人士如发现上述侵权行为，希望及时举报，本社将奖励举报有功人员。

反盗版举报电话：(010) 58581897/58581896/58581879

传 真：(010) 82086060

E - mail：dd@hep.com.cn

通信地址：北京市西城区德外大街 4 号

高等教育出版社打击盗版办公室

邮 编：100011

购书请拨打电话：(010)58581118

目 录

发酵工程实验时间安排 I

绪论 1

一、发酵工程的定义 1

二、发酵工程的研究内容 2

三、发酵工程与化学工程的关系 2

四、当今发酵工程研究中的一些主要
难题 3

五、发酵工程的发展概况 3

六、发酵工业的特点及其范围 5

第一部分 基础发酵实验 7

实验 1-1 发酵菌种的自然选育 8

实验 1-2 稀有放线菌的选择性分离 10

实验 1-3 发酵菌株的初筛 16

实验 1-4 工业发酵菌种的复筛 18

实验 1-5 生长抑制物质活性的测定 20

实验 1-6 液化型淀粉酶活力的测定 23

实验 1-7 蛋白酶活力的测定 25

实验 1-8 发酵菌种的诱变选育 29

实验 1-9 发酵菌种的原生质体融合育种
..... 32

实验 1-10 发酵菌种的复壮和保藏 35

实验 1-11 生产菌株发酵条件的优化 37

实验 1-12 生长曲线和产物形成曲线的
测定 39

实验 1-13 发酵过程中糖的利用 41

实验 1-14 抗生素的分离纯化 43

实验 1-15 淀粉酶的初步纯化 44

实验 1-16 发酵污染的检测和判别 46

实验 1-17 噬菌体的检测和防治 49

实验 1-18 甜酒酿发酵 50

实验 1-19 酸乳的发酵 52

实验 1-20 泡菜的发酵及其观察 56

第二部分 液体通气搅拌发酵——

谷氨酸发酵系列实验 59

I. 系列实验目的 59

II. 谷氨酸发酵概述 59

一、谷氨酸发酵机制 59

二、谷氨酸发酵工艺简介 61

三、淀粉水解糖的制备 62

四、无菌空气的制备 63

五、菌种的分纯和扩培 65

六、谷氨酸发酵的工艺控制 66

七、发酵的中间分析和过程控制 66

八、谷氨酸的提取 68

九、味精的制备 68

III. 实验室谷氨酸发酵 70

实验 2-1 谷氨酸菌种的制备 71

实验 2-2 噬菌体的检测 74

实验 2-3 大肠杆菌(谷氨酸脱羧酶)酶粉
的制备 75

实验 2-4 发酵过程中还原糖的测定 76

实验 2-5 发酵过程中谷氨酸含量的测定
..... 77

实验 2-6 发酵罐的构造及空消 79

实验 2-7 谷氨酸的中糖发酵及控制 83

实验 2-8 谷氨酸高糖流加发酵及控制 89

实验 2-9 谷氨酸发酵液的除菌体 91

实验 2-10 谷氨酸的离子交换回收 92

实验 2-11 谷氨酸的等电回收及精制 93

实验 2-12 谷氨酸钠质量控制及分析 97

实验 2-13 离心喷雾干燥的使用 98

第三部分 液体静置发酵——啤酒

发酵系列实验 101

I. 系列实验目的 101

II. 啤酒发酵概述	101
一、啤酒发酵生理学	102
二、啤酒发酵的原料	103
三、麦汁制造	104
四、啤酒酵母的扩大培养	107
五、啤酒发酵工艺	108
六、啤酒过滤和包装	110
七、清洗	110
III. 实验室啤酒发酵	111
实验 3-1 协定法糖化试验	112
实验 3-2 啤酒酵母的纯种分离	115
实验 3-3 啤酒酵母的计数	116
实验 3-4 啤酒酵母的质量检查	118
实验 3-5 啤酒酵母的扩大培养	120
实验 3-6 小型啤酒酿造设备介绍及 发酵罐的消毒	122
实验 3-7 麦汁的制备	123
实验 3-8 糖度的测定	126
实验 3-9 啤酒主发酵	129
实验 3-10 总还原糖含量的测定 (斐林试剂法)	131
实验 3-11 α -氨基氮含量的测定	133
实验 3-12 酸度和 pH 的测定	135
实验 3-13 密度(比重)的测定	137
实验 3-14 酒精度的测定及原麦汁浓度 的计算	140
实验 3-15 双乙酰含量的测定	143
实验 3-16 色度的测定	145
实验 3-17 苦味质含量的测定	147
实验 3-18 二氧化碳含量的测定	149
实验 3-19 后发酵	150
实验 3-20 啤酒的卫生学指标检测(一) 发酵液中细菌总数的检测	151
实验 3-21 啤酒的卫生学指标检测(二)	

大肠菌群的检测	152
实验 3-22 啤酒质量品评	154
实验 3-23 固定化啤酒发酵	159
第四部分 固体发酵——红曲发酵	
系列实验	162
I. 系列实验目的	162
II. 红曲霉固体发酵概述	162
一、红曲霉的形态及分类	162
二、培养条件对菌体生长及红色素 形成的影响	163
三、红曲霉产生的代谢产物	164
四、红曲的制作	165
五、红曲霉及其代谢产物在食品 医药上的应用	165
III. 实验室红曲固体发酵	166
实验 4-1 红曲霉的分离纯化	168
实验 4-2 红曲霉细胞形态的观察	169
实验 4-3 红曲霉菌种扩大培养	171
实验 4-4 红曲液体菌种的制备	172
实验 4-5 红曲霉浅盘固体培养	173
实验 4-6 红曲霉厚层固体通风培养	175
实验 4-7 红曲代谢产物的浓缩	177
实验 4-8 红曲色素的分离纯化	179
实验 4-9 红曲色素色价的测定	181
实验 4-10 红曲组分抗氧化能力的定性 测定	181
实验 4-11 红曲粗提物的自由基清除活 性测定	182
实验 4-12 红曲发酵液中 Monacolin K 含量的测定	184
实验 4-13 红曲毒素的提取及其抑菌能 力的测定	185
实验 4-14 红曲淀粉酶活力的测定	186
主要参考文献	188

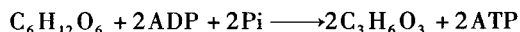
绪 论

一、发酵工程的定义

发酵工程(fermentation engineering)又称微生物工程(microbiological engineering)。要搞清什么是发酵工程,首先必须搞清什么是发酵(fermentation)。遗憾的是目前对发酵这一概念的引用非常混乱。发酵最初是指酵母作用于果汁或麦芽汁而产生气泡(foam)的现象,后来生物化学的研究者们从生物化学的角度对发酵下定义,微生物学的研究工作者从微生物学的角度来考虑这一概念,最为混乱的是一些工业部门,他们把发酵的概念进行了很大的扩展,甚至将一般的细胞机能都称为发酵。造成这一现象的原因主要是世界上某些国家重应用轻理论,那些将发酵现象作为直接目标进行研究的人们,几乎没有能量代谢方面的理论性知识,导致目前发酵这一概念具有三个层次的含义。

1. 生物化学角度

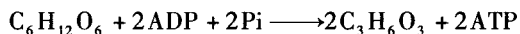
发酵是机体在无氧条件下获得能量的一种方式。如人体在剧烈运动时需要大量的能量,有氧呼吸不能满足需要,因此肌肉在缺氧的条件下将葡萄糖“发酵”为乳酸,同时产生 ATP。



在发酵过程中,被氧化的基质是有机物质,氧化还原反应中的最终电子受体也是有机物质,并且这种作为最终电子受体的有机物质通常是被氧化基质不完全氧化的中间产物,也就是说,基质在发酵过程中氧化不彻底,发酵的结果仍积累某些有机酸。

2. 微生物学角度

发酵是厌氧微生物或兼性厌氧微生物在无氧条件(或缺氧条件)下将代谢基质不彻底氧化,并大量积累某一(或几)种代谢产物的过程。如细菌的同型乳酸发酵。



从这一定义可见,它与从生物化学角度下的定义基本相同,但强调了两点:

- (1) 强调了发酵的主体是厌氧微生物或兼性厌氧微生物。
- (2) 强调了代谢产物的积累,而生物化学角度强调的是能量的产生。

3. 工业生产角度

发酵是指利用微生物生产某一有用产物的过程,更有人认为发酵是非寄生菌所展示的旺盛的代谢活动,即其有用性得到发展而旺盛化了的代谢活动。厌氧条件下利用酵母将糖类转化成酒精可称为发酵;有氧条件下将糖类转化为味精或抗生素也称为发酵;有氧条件下制备单细胞蛋白(single cell protein, SCP)获得整个菌体而不是某种代谢产物,可以算作发酵;废水处理的目

只是消耗废水中的营养物质,使水质达到一定的排放标准,并非为了得到某一有用产物,这种旺盛化的代谢活动也可称作发酵。所以从工业角度看,发酵主体除了厌氧微生物和兼性厌氧微生物外,还把好氧微生物包括在内。

发酵工程就是利用微生物的特定性状和功能,通过现代化工程技术来生产有用物质或将微生物直接用于工业化生产的一种技术体系,是建立在微生物发酵工业基础上,与化学工程相结合而发展起来的一门学科。简言之,就是研究发酵过程中微生物生命活动的规律及其相关工程技术的一门学科。

二、发酵工程的研究内容

发酵工程的研究内容包括发酵(fermentation)和提纯(purification)两部分。

1. 发酵部分(在狭义上也被称为发酵工程)

发酵部分包括菌种的特性与选育,培养基的配制、选择及灭菌理论,发酵醪的特性,发酵机制,发酵过程动力学,空气除菌,微生物对氧的吸收与利用,微生物的培养方式及自动化控制等。

2. 提纯部分(也称后处理)

提纯部分包括细胞破碎,分离,醪液输送,过滤除杂,离子交换电渗析,逆渗透,超滤,层析,沉淀分离,溶媒萃取,蒸发,结晶,蒸馏,干燥包装等单元操作及自动化控制。

三、发酵工程与化学工程的关系

发酵工程借鉴了许多化学工程的成就,但与化学工程也有一些明显的区别。主要表现为:

1. 一步生产

微生物发酵是由一系列极其复杂的生化反应组成的,反应所需的各种酶均包含在微生物细胞内。因此,它“吃的是草”产出的是“牛奶”;而用化学合成方法,要得到“牛奶”,则需要许多步骤才能完成。

2. 反应条件温和

因酶的最适反应条件是常温常压,而化学合成则需在剧烈的反应条件,如高温、高压、强酸、强碱以及催化剂的参与下才能进行。

3. 原料纯度要求低

常以农副产品(如薯干、麸皮等)作原料,来源丰富,价格低廉,而化学合成法的原料纯度要求高,较昂贵。

4. 设备通用

微生物发酵是纯种发酵,好氧发酵一般都用搅拌式发酵罐加空气过滤系统,厌氧发酵都用密封式发酵罐,而化学工程所需的设备各种各样,有的耐压,有的耐酸。

5. 对环境的污染相对较小

虽然发酵废水的生化需氧量(biochemical oxygen demand, BOD)和化学需氧量(chemical oxygen demand, COD)较高,但一般不含有毒物质,而化学合成法除强酸、强碱等剧烈条件外,常用重金属作催化剂,因此排出的废水毒性较大。

6. 反应液的流体力学性质不同

发酵醪既含固相(如淀粉,微生物菌体)颗粒、又含液相(如培养基)和气相(如氧气,二氧化

碳)物质,是一类非牛顿流体,不服从牛顿力学规律,其质量传递、动量传递等特性与化学工程中的牛顿流体有很大的不同。

四、当今发酵工程研究中的一些主要难题

1. 发酵和提纯过程的比拟放大

(实验室研究→中试→生产性试验)这一过程仍是目前新产品开发的必经之路。但通过前两个步骤获得的最佳工艺参数和操作条件,按简单的几何比例放大时往往不能取得理想的效果,究其原因主要是缺乏必要的模型放大理论。对这一规律的研究是一大难题。

2. 自动测控仪器的开发

自动化控制不但可节省劳动成本,提高劳动生产率,而且有助于对发酵机制的了解。目前温度、流量、溶解氧、压力和消泡等的自动化控制已经得到解决,而对产物浓度以及基质浓度的变化等的自动测控尚未得到令人满意的结果。

3. 发酵理论的完善

多年来由大量生产实践和科学实验总结出的一系列发酵机制、发酵动力学和连续发酵等理论促进了生产中许多实际问题的解决,但是在某些方面,如霉菌、放线菌等丝状菌的发酵,还没有完善的理论指导;连续发酵中菌种突变、污染等问题也未得到解决。

五、发酵工程的发展概况

发酵工程的发展大致经历了自然发酵期、奠基期和发展期三个阶段,现分别介绍如下:

1. 自然发酵期:只知其然而不知其所以然

我国劳动人民在距今约 8 000 ~ 4 500 年前就已发明了制曲酿酒工艺。从龙山文化时期的陶制酒器,可看出当时酿酒工艺已很发达,谷物酒已成为普遍的饮料了。埃及人也在 4 000 多年前学会了酿酒技术。制酱和醋的技术在春秋战国时期已被我国劳动人民掌握。

人类利用微生物发酵生产食品的历史虽然悠久,但不知道发酵是由微生物引起的,这一时期是在不自觉地利用空气中的微生物进行混合发酵,因此称为自然发酵期。

2. 奠基期:纯培养发酵技术的建立

1676 年列文虎克观察到微生物的存在,1857 年巴斯德发现发酵是由微生物引起的,而后科赫等又建立了纯培养技术,使得腐败现象大大减少,为发酵工业的发展奠定了基础。从此发酵可在人工控制下进行,使发酵效率大大提高。

3. 发展期:一系列新技术的建立

(1) 通气搅拌发酵工程技术的建立促进了好气性发酵的发展:1929 年英国细菌学家弗莱明(Fleming)发现青霉素后,人们对好气性发酵进行了深入的研究,先后发明了摇瓶培养和纤维过滤高效制备无菌空气等方法,并于 20 世纪 40 年代建立了通气搅拌发酵工程技术,并用这种技术进行了有机酸、酶制剂、维生素及激素等产品的开发和生产,使得发酵产物由分解代谢产物扩展到合成代谢产物,由初生代谢产物转向次生代谢产物。

(2) 人工诱变育种与代谢控制发酵工程技术的建立,使产量大幅度提高:随着微生物生理学和遗传学研究的不断进展,促进了代谢控制发酵技术的进步,从而可人为地控制发酵,使代谢朝有利于产品合成的方向进行。自 1956 年日本最先用发酵法生产谷氨酸获得成功以来,目前用

发酵代谢控制技术可生产出 20 种以上的氨基酸。

所谓代谢控制发酵工程技术,就是以微生物生理学和微生物遗传学为基础,对微生物进行诱变,筛选出某种产物大量积累的突变株,再在人工控制的条件下培养,选择性地生产出人们所需产品的一种技术手段。除氨基酸工业外,目前此项技术已应用于核苷酸类物质,有机酸和部分抗生素的发酵生产。

(3) 发酵的连续化、自动化工程技术的建立,使生产效率大大提高:随着数学、动力学、化学工程原理、电子计算机和自动控制等技术在发酵生产中的应用,发酵工业向大型化、连续化、自动化方向发展。新工艺、新设备层出不穷,如日本开发出塔式连续发酵设备;法国开发成功了 L-M 型单级连续发酵罐。最近设计出的实验型万能发酵罐,不但自动化程度高,而且发酵过程的一些基本参数如温度、pH、罐压、溶解氧(DO)、氧化还原电位、空气流量及 CO₂ 含量等可自动记录并自动控制,大大提高了生产效率。

(4) 生物合成和化学合成相结合,制造出更多的有用产品:与化学合成法相比,微生物发酵有许多优点,但也有一些缺点。如代谢产物的浓度较低,产物分离较困难,生产周期长等。

随着矿物的开发和石油化工的发展,一些低相对分子质量的化合物,如乙醇、丙醇、丁醇等用化学合成法更廉价更方便。因此,某些复杂化合物的生产可采用生物合成与化学合成相结合的办法。常有两种类型:

① 先用化学合成法合成一些廉价的前体,再用发酵法生产产品。如以石油等产品为原料用化学合成法制备醋酸,再以醋酸为原料,通过乙醛酸循环发酵生产柠檬酸、谷氨酸等。

② 先用发酵法生产出半成品,再用化学合成法合成产品。如维生素 C 的生产可先用发酵法生产山梨糖,再用化学合成法合成抗坏血酸。目前许多新型的抗生素即半合成抗生素也多用这种方法来进行生产。

4. 发展趋势

(1) 与微生物生态学相结合,研究传统酿造工业:我国的酿造业历史悠久,闻名于世。传统黄酒、白酒、酱油及醋等是用自然发酵法生产的,风味独特,用优势菌种机械化生产的产品远不能与传统酿造的产品相比。对这些传统发酵技术应该从微生物生态学的角度来研究风味的物质基础及来源,研究各种微生物之间及微生物与环境之间的相互关系,试图用现代新技术新方法生产出能与传统产品相比拟的产品。

(2) 与微生物生理学相结合,使所需产品在发酵液中富集:进一步研究发酵机制,利用代谢调控技术抑制不需要的副反应,激活关键酶,利用选择性培养基,限量补充培养基等,使所需的产品得到富集。同时开发新的生物资源,如利用纤维素作为基质来生产产品。

(3) 与微生物遗传学相结合,改良菌种,生产出更多更好的产品:用诱变育种、原生质体融合,甚至基因工程技术,改造改良菌种,构建一些超级菌株,生产出我们所需的产品,甚至新产品。

(4) 与化学工程技术结合,使生产向大型化连续化方向发展:发酵工厂不再是作坊式的,而是发展成为庞大的现代化企业。常用的发酵罐容量达 20 ~ 120 吨,也有多达 500 吨,甚至 2 000 吨的。

(5) 与计算机科学技术结合,使生产向自动化方向发展:由于生物检测探头的开发成功,电脑的普及,不少发酵工厂已实行了程序自动控制,大大提高了生产效率。

总之,发酵工程学与其他学科的融合,推动了发酵产业的发展。

六、发酵工业的特点及其范围

1. 发酵工业的特点

发酵工业,又称微生物工业,是指利用微生物及其酶系统来进行物质转换,生产各种发酵产品的工业,是在传统的酒、酱、醋等酿造技术的基础上发展起来的。从微生物工业的发展趋向,可以看出近代微生物工业有以下几个特点:

(1) 由生产糖分解的简单化合物转向复杂物质的生物合成,从自然发酵转向人工控制的突变型发酵、代谢控制发酵和遗传工程菌的发酵。

(2) 发酵法生产的工业产品越来越多。微生物发酵与化学合成相结合的工程技术的建立,使发酵产物通过化学修饰及化学结构改造,进一步生产出更多精细有用的物质,从而开拓了一个新的领域。

(3) 近代微生物工业向大型化、连续化和自动化方向发展。

(4) 随着微生物工业的发展壮大,能够作为发酵原料的自然资源日益短缺,迫切需要开发新的资源,利用石油、天然气、纤维素及几丁质作为发酵原料是发酵工业发展的一个方向。

2. 发酵工业的范围

发酵工业大致可分为下列 14 类。

- (1) 酿酒工业(白酒、黄酒、啤酒等)。
- (2) 食品工业(酱、酱油、食醋、腐乳、面包及酸乳等)。
- (3) 有机溶剂发酵工业(酒精、丙酮、丁醇等)。
- (4) 抗生素发酵工业(青霉素、四环素等)。
- (5) 有机酸发酵工业(柠檬酸、葡萄糖酸等)。
- (6) 酶制剂发酵工业(淀粉酶、蛋白酶等)。
- (7) 氨基酸发酵工业(谷氨酸、赖氨酸等)。
- (8) 核苷酸类物质发酵工业(肌苷酸、腺苷酸等)。
- (9) 维生素发酵工业(维生素 C、维生素 E 等)。
- (10) 生理活性物质发酵工业(激素、赤霉素等)。
- (11) 微生物菌体蛋白发酵工业(单细胞蛋白等)。
- (12) 微生物环境净化工业(废水处理等)。
- (13) 生物能工业(沼气、纤维素产酒精等)。
- (14) 微生物冶金工业(利用微生物探矿、冶金、石油脱硫等)。

3. 我国发酵工业发展概况

我国利用自然发酵来生产酱油、醋和白酒等酿造食品已有悠久的历史。但几千年来,墨守成规,改进不大。旧中国前只有几家外国人兴办的发酵工厂、几家旧法酿造作坊及少数酒精工厂。酒精工业以山东黄台薄酒精厂和上海的中国酒精厂最早建成。但中国酒精厂于 1937 年即被日本飞机炸毁。酱油生产方面一直沿用自然发酵法,直到 1930 年才由南京中央工业试验所分离出米曲霉进行纯种酿造,冲破了酱油生产受季节限制的框框。

新中国成立后,我国逐步建立了完整的发酵工业体系(酒精、抗生素、酶制剂、有机酸、核苷酸、维生素、微生物农药、食用药用真菌及精细化工等),各种发酵产品相继得到生产,传统的发