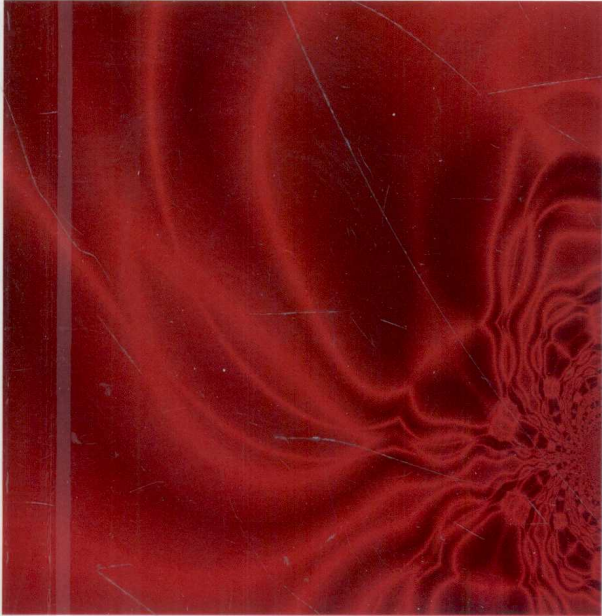




国家精品课程教材

生物工程
生物技术
系列

普通高等教育“十二五”规划教材



Fermentation Engineering: Principles and Techniques

陈坚 堵国成 主编

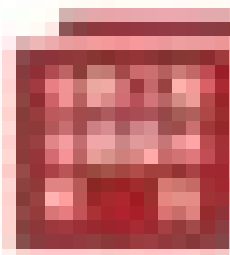
发酵工程 原理与技术



化学工业出版社



中国地质大学(北京)



教育部“十二五”普通高等教育

Fermentation
Engineering:

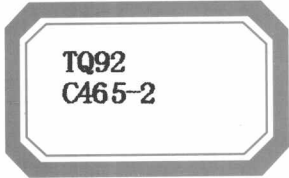
Principles and
Techniques

第二版 2012.11

发酵工程
原理与技术

© 2012.11

80



TQ92
C465-2



郑州大学 *040107795785*

国家精品课程教材

普通高等教育“十二五”规划教材

发酵工程原理与技术

陈 坚 堵国成 主编



TQ92
C465-2



化学工业出版社

· 北京 ·

本书共分为八章,第一章主要介绍了发酵工程的类型、特点、关键技术、现状以及发展趋势。第二章主要阐述了诱变育种技术、微生物生理学、基因工程与代谢工程以及系统生物学与合成生物学在工业微生物菌种选育方面的应用。第三、四章分别介绍了发酵培养基的制备原理与技术以及无菌空气的制备工艺及设备。第五章介绍了培养条件对发酵过程的影响、发酵动力学以及发酵罐设备。第六章介绍了常见的发酵过程优化技术,包括微生物培养环境优化、基于动力学模型的优化、分阶段优化技术、基因工程菌的优化等,并在此基础上介绍了发酵过程的一般放大原理和方法。第七章阐明了发酵过程检测与控制、发酵染菌及其防治技术以及发酵过程计算机接口技术在发酵工程中的应用。第八章主要阐述了发酵下游加工过程中发酵液预处理及发酵产物提取与精制的原理和技术。

本书可作为综合性大学和理工类院校生物工程专业及相关专业的本科生和研究生的教材,可供从事发酵工程、生物化工和生化工程等相关领域的科研人员和教学工作者参考。

图书在版编目(CIP)数据

发酵工程原理与技术/陈坚,堵国成主编. —北京:
化学工业出版社, 2012. 3

国家精品课程教材 普通高等教育“十二五”规划
教材

ISBN 978-7-122-13297-0

I. 发… II. ①陈…②堵… III. 发酵工程-高等
学校-教材 IV. TQ92

中国版本图书馆CIP数据核字(2012)第008472号

责任编辑:赵玉清

文字编辑:周 侗

责任校对:宋 夏

装帧设计:尹琳琳

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20½ 字数537千字 2012年5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: 38.00 元

版权所有 违者必究

前 言

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。发酵工程作为现代生物技术产业化的支撑技术体系与分子生物学、微生物基因组学、蛋白质组学、生物信息学、系统生物学、生物催化工程和人工智能控制学等多种前沿学科密切交融,上述学科的发展拓宽了发酵工程学的研究领域,发酵工程成为解决人类面临的能源、资源和环境等持续性发展课题的关键技术。

发酵工业在我国国民经济中占有较高的比重,量大面广,直接关系到国计民生。我国具有国际上工业发酵产业中的所有主要产业,就其规模而言,某些产业(如谷氨酸、柠檬酸、维生素C等)在世界上占有举足轻重的地位,但是,技术水平与发达国家相比有较大差距,主要体现在生产菌种水平较低,发酵工艺、分离精制方法和生产装置落后,致使我国某些发酵产品的原料和能源消耗大,生产成本低,污染严重。中国是一个发酵大国,但还不是发酵强国。加强发酵工程技术研究,从菌种的高通量筛选、原料的高效利用、发酵过程的全局优化与控制、目标产品的高效提取以及代谢废物的分流处理与综合利用等层面进行系统研究,对进一步提升我国的发酵工程技术水平具有重要的意义,也是作者撰写此书的内在原动力。

作者撰写此书,一方面得益于作者所工作的学院为国家发酵工程重点学科点,从1952年起开始积累的在发酵工程领域的教学和科研经验,是作者从学生时代到留校工作一直能够生存和生长的学术土壤,作者承担的本科生课程“发酵工程原理与技术”2008年获批为国家级精品课程,所领导的团队获“发酵工程课程国家级教学团队”称号;另一方面受助于作者所在研究室许多年轻的博士和硕士,他们和作者一起完成了多项省部级科研项目,包括863重点项目、国家杰出青年基金项目、国家自然科学基金重点项目等,而正是这些科研项目为本书提供了实践性强的解说案例。

本教材理论体系全面,紧紧围绕发酵工程上、中、下游技术而展开。内容包括微生物的筛选育种、发酵原料的预处理、无菌空气的制备、发酵过程动力学、发酵过程优化与控制、发酵过程的放大原理与技术、发酵产物的提取与精制等。

与国内外同类教材相比,本书突出微生物发酵工程案例的介绍与分析,针对案例背景及问题的提出,对存在问题、解决问题的思路、目标的实现等内容进行展开,注重分析和启示,不拘泥于具体的操作方法及技术参数,引导学生全面而灵活地掌握发酵工程的基础理论和实用技术。作为国家级精品课程教材,本书不仅配套出版发酵工程实验课程教材,同时,理论课程课件也可以供使用本教材的单位免费参考使用。因此,本书不仅具有较强的理论指导意义,同时亦具有很强的实践价值。

本书编写分工如下:第一章,张东旭、陈坚;第二章,周景文、吴敬;第三、四章,张梁、石贵阳;第五章,张娟、堵国成;第六章,刘龙、陈坚;第七章,刘龙、史仲平;第八章,张建华、毛忠贵。作者特别感谢中国工程院院士、江南大学生物工程学院伦世仪教授的鼓励和指导,感谢所在研究室的博士、硕士研究生给予的帮助,感谢化学工业出版社的大力支持。

本书是一本适合生物工程专业本科生使用的教材,也适用于发酵工程、生物化工和生化工程等相关专业的研究生和科研人员参考。

尽管作者力图在本书中注重结合理论性和实践性、突出系统性和科学性、体现前沿性和创新性,但限于作者的学术功底、研究经验和写作能力,书中存有的疏漏和不妥之处,承蒙赐教,不胜感激!

编 者

2012年1月

目 录

第一章 绪论	1	五、高通量筛选技术	33
第一节 发酵工程发展史和相关学科	1	第四节 微生物原生质体育种与基因组改组 育种	34
一、发酵工程的定义	1	一、概述	34
二、发酵工程发展史及相关学科	1	二、微生物原生质体再生育种	35
第二节 发酵工程类型与发酵过程特点	4	三、微生物原生质体诱变育种	37
一、发酵工程类型	4	四、微生物原生质体转化育种	38
二、发酵过程特点	5	五、微生物原生质体融合育种	38
第三节 发酵工艺过程和关键技术	5	六、基因组改组育种	40
一、发酵工艺过程	5	第五节 发酵微生物的基因工程与代谢工程 育种	42
二、发酵工程关键技术	6	一、概述	42
第四节 发酵工业产品和现状	7	二、发酵微生物的基因工程育种	42
一、发酵工业产品	7	三、代谢工程育种	45
二、发酵工业现状	7	四、基因工程菌的发酵特性	47
第五节 发酵工程发展趋势	8	五、基因工程菌的安全性	49
一、技术领域的扩展趋势	10	第六节 工业微生物的系统生物学与合成生 物学	49
二、应用领域的扩展趋势	11	一、概述	49
第二章 微生物菌种制备原理与技术	13	二、组学技术及其在发酵工程中的应用	50
第一节 发酵工业微生物菌种	13	三、系统生物学技术和基于系统生物学的 菌种改造	53
一、概述	13	四、合成生物学及其在发酵工程中的 应用	53
二、发酵工业常用微生物种类	13	第三章 发酵培养基的制备与灭菌	56
三、发酵工业微生物的基本要求	16	第一节 发酵工业原料	56
四、菌种的制备原理与方法	16	一、发酵工业原料的种类及其组成	56
五、适应性进化	18	二、发酵工业原料的选择原则	62
六、菌种的保藏	19	三、生物合成的前体物质、抑制剂、 促进剂	63
第二节 发酵微生物生理学	21	四、原料预处理的的目的	64
一、概述	21	五、原料预处理的方法	65
二、微生物的遗传与繁殖	21	第二节 发酵培养基的设计	67
三、底物的吸收与转运	22	一、发酵培养基设计的目的	67
四、微生物的代谢与调控	23	二、发酵培养基设计的基本原则	69
五、底物、中间产物、终产物与其他胁迫 条件下的响应和耐受	25	三、发酵培养基设计的方法	69
第三节 微生物诱变育种	27		
一、概述	27		
二、诱变技术	28		
三、诱变育种的筛选策略	31		
四、代谢控制育种	32		

四、发酵培养基的优化	70	一、反应器的分类	140
第三节 淀粉质原料的加工方法与设备	70	二、反应器的设计目标和原则	141
一、淀粉水解的理论基础	70	三、机械搅拌通风发酵罐	146
二、淀粉的液化方法与设备	71	四、气升式发酵罐	154
三、淀粉的糖化方法与设备	72	五、固态发酵罐	156
四、不同发酵产品对淀粉质原料处理的 要求	73	第六章 发酵过程优化与放大	158
第四节 纤维质原料的加工方法	75	第一节 概述	158
一、酸水解	75	一、发酵过程优化的基本特征	158
二、酶水解	77	二、发酵过程优化的主要内容及步骤	159
第五节 培养基及设备的灭菌	79	第二节 微生物培养环境的优化	161
一、培养基灭菌的目的、要求和方法	79	一、微生物的营养需求	161
二、湿热灭菌的理论基础	81	二、微生物的环境条件	167
三、培养基灭菌的工程设计	83	三、培养环境优化的正交试验和响应面优 化技术	168
第四章 无菌空气的制备	85	第三节 基于发酵过程动力学模型的优化 技术	175
第一节 无菌空气制备的概述	85	一、基于动力学模型的发酵过程优化的 基本特征	175
一、空气和无菌空气	85	二、基于动力学模型的发酵过程优化的 一般步骤	175
二、空气除菌的方法	86	第四节 分阶段发酵优化技术	175
第二节 空气介质过滤除菌的原理	87	一、分阶段优化技术的一般原理与 步骤	175
一、捕集效率	87	二、温度两阶段控制技术	175
二、空气过滤器除菌机制	88	三、pH 两阶段控制技术	178
三、对数穿透定律	91	四、溶氧两阶段控制技术	181
四、微滤	91	第五节 基因工程菌的发酵优化	182
第三节 介质过滤制备无菌空气的工艺和过 滤器	91	一、基因工程菌发酵过程存在的问题	183
一、介质过滤制备无菌空气的工艺流程	91	二、基因工程菌发酵过程优化研究	184
二、介质过滤的空气过滤器	93	三、高密度培养技术在基因工程菌发酵 过程优化中的应用	186
第五章 培养条件、操作方式与发酵罐 设计	97	第六节 发酵过程放大	188
第一节 培养条件对发酵过程的影响	97	一、发酵过程放大原理、原则与步骤	188
一、培养基	97	二、发酵过程放大方法	190
二、温度	100	三、基于计算流体力学的发酵过程放大 技术	191
三、pH	103	第七章 发酵过程监测与控制	205
四、供氧对发酵过程的影响	105	第一节 概述	205
五、代谢产物及其他	106	一、发酵过程控制特性	205
第二节 发酵动力学	112	二、发酵过程主要检测参数	205
一、发酵过程动力学分类	112	三、发酵过程常用传感器	207
二、发酵过程中的质量和能量平衡	119		
三、发酵过程动力学	125		
第三节 发酵罐设备	140		

第二节 发酵过程主要状态参数的监测与控制	207	三、分离过程的机理与分离操作	272
一、发酵过程中温度的检测与控制	207	四、发酵工业下游技术的一般工艺过程	272
二、发酵过程中 pH 的检测与控制	210	第二节 发酵液的预处理和固液分离	274
三、发酵过程中溶氧的检测与控制	214	一、发酵液的预处理目的和要求	274
四、发酵过程中泡沫的产生和消除	217	二、发酵液固液分离技术与设备	276
五、发酵过程中 CO ₂ 的浓度和呼吸商的检测	218	三、微生物细胞的破碎	283
六、发酵过程中细胞浓度、产物浓度和底物浓度的检测	220	第三节 沉淀技术	289
第三节 发酵过程先进的控制技术	225	一、沉淀的原理与目的	289
一、基于人工神经网络的发酵过程模式识别与控制	225	二、沉淀方法种类及要求	291
二、基于代谢网络模型的发酵过程在线控制	232	三、沉淀技术应用	296
第四节 发酵染菌及其防治技术	233	第四节 吸附技术	297
一、染菌对发酵的影响	234	一、吸附法的原理与目的	297
二、发酵染菌的分析	235	二、吸附法的优缺点	298
三、杂菌污染的途径和防治	237	三、吸附剂的基本要求和种类	298
四、故障诊断技术	240	四、吸附基本理论及影响吸附过程的因素	300
第五节 发酵过程的计算机接口技术	247	第五节 色谱技术	303
一、发酵过程的计算机控制原理	247	一、概述	303
二、发酵过程的计算机控制功能分析	249	二、色谱法基本原理	303
三、集散控制系统及接口技术	249	第六节 膜分离技术	309
第八章 发酵液预处理及发酵产物提取与精制	271	一、膜分离方法的分类	309
第一节 概论	271	二、表征膜性能的参数	311
一、下游加工过程在发酵工程中的地位	271	三、膜分离设备	313
二、发酵下游加工过程的特点	271	四、膜分离过程的操作特性和影响因素	316
		五、膜分离过程在发酵工业中的应用	317
		参考文献	320

第一章 绪 论

第一节 发酵工程发展史和相关学科

一、发酵工程的定义

发酵一词英文为“fermentation”，是从拉丁文“fevere”一词演变而来，原意为“翻腾”，描述的是酵母作用于果汁或麦芽浸出液出现气泡的现象，这种现象是由果汁或麦芽汁中含有的糖经酵母厌氧发酵产生的二氧化碳所引起。近代微生物学的奠基人之一、法国科学家路易·巴斯德（Louis Pasteur，1822—1895）在考察酒精发酵的意义后指出：所谓发酵是指酵母在无氧状态下的呼吸，是生物获取能量的一种方式。但后来发现，醋酸、柠檬酸等有机酸发酵都需要供给氧气，因此原来发酵的定义便不再适用，而发酵此时被统一理解为：“微生物细胞为获取生长和生存所需能量而进行的氧化还原反应。”此后，发酵形式不断多样化，新的发酵产品也不断涌现，如氨基酸、抗生素、核苷酸、酶制剂、单细胞蛋白等发酵产品。其中，很多发酵产品与微生物的能量代谢没有直接关系，因此，发酵的定义扩展为：“在合适的条件下，利用生物细胞（含动物、植物和微生物细胞）内特定的代谢途径转变外界底物，生成人类所需目标产物或菌体的过程。”20世纪70年代后，随着基因工程和细胞融合等生物技术的发展，发酵过程除利用天然菌株或变异菌株外，还可利用经人工改造获得的基因工程菌株以及细胞融合菌株等。同时，反应器设计和放大技术、计算机控制技术、新材料技术等各种新的工程技术也不断运用到发酵生产中。现代对发酵工程的定义为：采用现代工程技术手段，利用天然生物体或人工改造的生物体对原料进行加工，为人类生产有用的产品，或直接把生物体应用于工业生产过程。

二、发酵工程发展史及相关学科

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。发酵工业发展的过程可表示为5个阶段，如表1-1所示。

1. 自然发酵时期

在20世纪以前发酵工业的发展被认为是第一个阶段，当时的产品局限在饮用酒精和醋上。虽然啤酒是古代埃及人首先酿造的，但真正的第一次大规模酿酒是从18世纪早期开始的，当时有1500只有生产能力的木制酿酒用大桶开始投入使用。据报道，1757年温度计在酿造工业上开始使用，1801年原始的热交换器有了发展，这些都表明在这些早期的酿造中已有人开始尝试一些过程控制技术。到了19世纪中期，酵母在酒精发酵工业中的作用分别被Cagniard-Latour、Schwann和Kutzing所论证，但是最终是Pasteur使科学界信服了这些微生物在发酵过程中所发挥的必要性。在19世纪后期，Hansen在Carlsberg酿造厂开始了开创性工作，发展了分离和繁殖单个酵母细胞以产生纯培养物的方法，并发展了复杂的生产种子培养物质的技术。

醋最早是用酒曲生产的，它是在浅盘或部分装满的桶中，由天然微生物菌群缓慢氧化而生成。对于这个过程中空气的重要性的认识最终导致了“发生器”的产生，即由一只充满惰性物质（如煤、木炭和不同种类木屑）的容器构成，在该容器的下方，酒或啤酒滴落下来。

这种发生器被认为是第一代“有氧”发酵罐。19世纪后期到20世纪早期,培养基首先用巴斯德法灭菌,然后接种10%的优质醋。由于培养基呈酸性,这样不仅可以防止杂菌污染,而且提供了一个良好的接种剂。到了20世纪初,发酵过程控制的概念在酿造行业和醋工业中慢慢地建立起来。

表 1-1 发酵工业发展阶段的过程

发展阶段	主要产品	反应器	发酵过程控制特点	菌种选育
第一个阶段 (史前~1900年)	酒精、醋	生产能力达1500桶的木制容器	采用分批培养方式;使用温度计、比重计和热交换器;发酵过程无实质控制;无中试过程	由自然接种到使用纯培养物(Hansen),用优质醋接种发酵
第二个阶段 (1900~1940年)	面包酵母、甘油、柠檬酸和丙酮-丁醇	生产丙酮-丁醇能力达 2×10^5 L的铁制容器。用于面包酵母生产的空气喷雾器	采用分批和补料系统进行培养;利用pH电极以及温度计离线控制;利用机械搅拌;发酵过程无实质控制;无中试过程	利用筛选的野生型纯菌发酵;采用了无菌操作技术(Weizmann)以及纯培养技术(Robert Koch)
第三个阶段 (1940~1960年)	青霉素、链霉素、赤霉素、氨基酸、核苷酸以及酶	机械通气容器、无菌操作、真正的发酵罐	采用分批和补料分批以及连续培养系统;采用灭菌的pH电极和溶氧电极以及计算机化的循环控制在线监测发酵过程;普遍采用中试过程	利用人工诱变野生型菌株;采用有效的程序筛选正向突变菌株
第四个阶段 (1960~1979年)	用烃和其他储存物生产单细胞蛋白质(SCP)	在第三个阶段的基础上,开发出压力循环和压力喷射容器以克服气和热交换问题	采用连续培养+培养基再循环系统;使用计算机联用控制循环系统监测控制发酵过程;普遍采用中试过程	通过遗传工程技术调节微生物代谢途径,获得发酵工程菌株
第五个阶段 (1979年~至今)	通常微生物不产生的异质化合物,如胰岛素和干扰素	在第三个阶段和第四个阶段开发出来的大规模的生物反应器	采用分批、补料分批或连续补料方式;在第三个阶段和第四个阶段发展其他的控制手段和感应器;普遍采用中试过程	利用基因工程技术,在系统生物学以及合成生物学的指导下,定向改造微生物,获得优良的发酵工程菌株

2. 发酵工程的诞生

1900~1940年期间是发酵工业的第二个发展阶段,主要的新产品是酵母细胞、甘油、柠檬酸、乳酸和丙酮-丁醇。其中,面包酵母和有机溶剂的发酵是这个时期最重要的进展。面包酵母的生产是一个好氧过程,人们很快认识到酵母细胞在富含麦芽汁培养基中的快速生长使得培养基中溶氧被迅速消耗,而溶氧的不足诱导了乙醇的产生以及减缓了菌体生长,最终导致面包酵母的减产。后来,人们逐渐认识到通过控制碳源而不是氧气,即限制初始麦芽汁浓度来控制细胞的生长就可以解决这一问题。此后人们在培养过程中通过向培养液中不断添加少量麦芽汁来控制随后培养物的生长过程,而这就是所谓的补料分批培养技术。目前,该技术已广泛应用于发酵工业,以避免氧气限制情况的发生。此外,人们还通过使用蒸汽灭菌的管路向培养物中通入空气,以改善早期酵母培养物的供氧状况。

丙酮-丁醇发酵技术是由Weizmann在第一次世界大战期间建立起来的第一个真正意义上的单菌发酵。厌氧丙酮-丁醇发酵在早期容易被好氧细菌污染,而在发酵过程的后期即使在厌氧条件下也往往被产酸厌氧菌所污染。Weizmann等人通过改进接种材料以及接菌条件,大大降低了丙酮-丁醇发酵的染菌概率。至今,其所用的过程仍然能够很好地重现。为了降低染菌概率,丙酮-丁醇发酵生产所用的发酵罐均采用垂直圆柱体形,采用低碳钢造的

半圆形盖子和底部，各部分之间连接得很严密，使其能在一定压力下进行蒸汽灭菌。随着丙酮-丁醇发酵体积的增大，针对如何在 200m³ 的发酵罐上进行接种操作时保持无菌状态的问题，无菌接种技术的发展被提上了议事日程。而通过发酵生产这些有机溶剂发展起来的无菌操作技术是发酵技术的一个主要进步，它为在 20 世纪 40 年代成功引进无菌好氧培养过程铺平了道路。

发酵工程学科的诞生是以微生物纯培养技术的出现为标志。此时的发酵工程是将传统自然发酵同微生物学、生物化学及化学和化学工程相联系的，以实现发酵产品的优质高效的工业化生产为目的的学科。

3. 通气搅拌液体深层发酵的建立

发酵工业发展的第三个阶段是在第二次世界大战时应运而生的。1939 年因第二次世界大战的全面爆发，战场上急需能替代磺胺类的药物，能更加安全有效地治疗外伤炎症及其继发性传染病。这使得青霉素成为首选药物，其需求量剧增。传统的青霉素生产采用表面培养法，即利用湿麦麸作为培养基，以大量的扁瓶作为发酵容器进行青霉素的生物合成。通过此法生产的青霉素产量低、耗时耗力，因此急需新的发酵生产线来生产青霉素。随后，工程技术人员将化学工业上的机械搅拌技术引入到带无菌通气装置的发酵罐中，并且引入了当时新型的逆流离心萃取机作为发酵液滤液主要提取的手段，以减少青霉素在 pH 剧变时的破坏。这是近代发酵工程技术上的一个巨大飞跃，该技术使得好氧菌的发酵生产走上了大规模工业化生产途径。在青霉素实现了大规模工业化生产的同时，上游研究人员则从发霉的甜瓜中筛选到了一株适用于液体培养的产黄青霉 (*Penicillium chrysogenum*) 菌株，使得青霉素的效价提高了几百倍。同时研究人员还发现以玉米浆（生产玉米淀粉的副产品）和乳糖（生产干酪时的副产品）为主的培养基可以使青霉素的发酵效价再提高约 10 倍。不久，辉瑞药厂就建立起了一座具有 14 个约 26m³ (7000gal.) 的发酵罐的车间生产青霉素，并获得了成功。通气搅拌液体深层发酵技术一直沿用至今，是发酵工程的第二个历史转折点。

由于微生物大量纯培养的过程中引入了先进的工程技术，使得继青霉素之后的许多其他抗生素（如链霉素、短杆菌肽、金霉素、新霉素等）也迅速出现。同时，生化工程技术的发展对其他发酵工业产品的问世起到了极大的促进作用，其中包括维生素、赤霉素、氨基酸、酶和类固醇等的生产。

4. 大规模连续发酵以及代谢调控发酵技术的建立

发酵工业进程中的第四个阶段开始的标志是在 20 世纪 60 年代早期，一些跨国企业开始研究生产微生物细胞作为饲料蛋白。当时，最大的机械搅拌发酵罐的体积只有 80~150m³。由于微生物蛋白价格低廉，为了降低发酵成本，除了考虑利用廉价的碳氢化合物作为潜在的碳源外，其产量要比其他高附加值的发酵产品大得多。同时，发酵过程中要求大量的氧气，这些需求促进了压力喷射和压力循环发酵罐的发展，相反减少了对机械搅拌的要求。从经济角度考虑，这个极具潜力的发酵过程的另一个特点是连续培养。当时，发展最成熟的是英国帝国化学公司 (ICI)，它使用 3000m³ 的压力循环发酵罐进行连续生产。大容量的连续发酵罐能在超过 100 天的时间里进行连续生产。而无菌操作技术的要求促进了高质量的发酵罐制造技术和流加培养基的连续灭菌技术的开发。同时，使用计算机控制灭菌和循环操作，降低了人为造成差错的可能性。这种连续化、自动化大规模发酵技术的建立成为发酵工程学科建立的重要的标志之一。

此外，科学家以遗传学和生物化学为基础，通过研究代谢产物的生物合成途径和代谢调节机制，通过选择适宜的技术路线，实现了人为地控制目的代谢产物的大量合成，扩展了产品类别。

5. 现代发酵工程时期

发酵工业发展进程的第五个阶段起始于微生物的体外遗传操作技术，通常称为基因工程（或者 DNA 重组技术）。基因工程不仅实现了不同种属微生物之间的基因转移，而且通过基因工程，人类可以非常精确地改造微生物基因组，从而赋予微生物细胞生产通常只有高等生物细胞才能合成的有关化合物的能力，而这些具备合成全新化合物能力的微生物细胞的获得为新的发酵工艺打下了基础，比如胰岛素和干扰素的生产。基因工程在微生物细胞改造中的应用不仅扩大了具有商业化潜力的微生物产品的范围，而且提高了新产品以及传统微生物产品的产量。基因工程的发展及广泛应用引起了发酵工业的重大变革，许多新的发酵产品的发酵过程得以形成。然而，不能忽略的是这些新的遗传操作技术的应用归根结底依赖于从酵母、溶剂发酵以及抗生素发酵等过程中演变而来的大规模的细胞连续培养技术。通过 DNA 重组技术的改造，工程菌的发酵生产能力和发酵产品的范围（如干扰素、白介素、促红细胞生成素、集落刺激因子等）不断扩大，这使得人类获得更多的治疗疑难杂症的药物，同时也为发酵工业的发展提供了新的经济增长点。在基因工程促使发酵工程进入新的历史转折期的同时，反应器、反应动力学以及发酵过程控制等也随之获得了巨大的发展。

现代发酵工程是以基因工程的诞生为标志，以微生物工程为核心内容，通过研究并改善微生物的生理生化特性及代谢特征以服务于人类，更好地保持生态平衡及可持续发展为目的，更加紧密地同数学、生物化学、分子生物学、基因工程、代谢工程、生化工程学、物理化学、反应动力学以及计算机科学等前沿及工具学科相结合的系统科学体系。

第二节 发酵工程类型与发酵过程特点

一、发酵工程类型

根据发酵工程产品的生产方式和规模的不同可以对发酵工程进行分类。根据对通气（氧气）的需求不同可分为好氧发酵和厌氧发酵；根据培养介质的性状不同可分为固态发酵和液态发酵；根据发酵菌种的不同可分为纯菌发酵和混菌发酵；根据发酵规模的不同可分为研究规模发酵、中试规模发酵以及生产规模发酵。

1. 好氧/厌氧

好氧发酵：也叫通风发酵，指需要通风提供氧气的发酵过程。

厌氧发酵：指不需要通风提供氧气的发酵过程，一般厌氧发酵过程需要密闭容器。

2. 固体/液体

固态发酵：指微生物接种于固态培养介质的发酵过程。

液态发酵：指微生物接种于液态培养介质的发酵过程。

3. 纯菌/混菌

纯菌发酵：指接种纯种微生物进行培养的发酵过程，大多数发酵过程采用纯种培养。

混菌发酵：指接种多种微生物进行培养的发酵过程，少数发酵过程采用混菌发酵，如白酒酿造和维生素 C 发酵等。

4. 研究/中试/生产

研究规模发酵：指在实验室小试规模上进行的发酵过程，一般反应器容积在 10~100L。

中试规模发酵：指介于实验室小试和工业规模生产之间的中试规模上进行的发酵过程，一般反应器容积在 100~3000L。

生产规模发酵：指在工业生产的规模上进行的发酵过程，一般反应器容积在 3000L

以上。

二、发酵过程特点

1. 发酵过程的反应条件温和

与化学工业生产相比，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，要求条件也比较简单。

2. 发酵过程的周期短，不受气候、场地制约

与动、植物提取相比较，发酵过程周期短且不受场地面积和气候条件的制约。发酵时间一般几天或几周，远远低于动物、植物的生长周期。发酵过程在反应器中可人为地控制规模和环境条件，而动物和植物的培养过程往往受场地面积和气候条件等外界因素的制约。

3. 发酵过程多是利用生物质为原料

发酵生产所用的原料主要以农副产品及其加工产品为主，这些生物质原料具有可再生的优点。发酵所用的原料通常包括淀粉、糖蜜、玉米浆、酵母膏以及牛肉膏等。

4. 发酵过程的生物特性

发酵过程是自发的生物过程，只要提供合适的营养和环境条件，微生物接种后，发酵过程就可以自发进行。发酵过程中的反应以生命体的自动调节方式进行，通过生物代谢网络生产化学合成过程难以合成的结构复杂的物质。发酵过程中细胞始终处于动态变化中，其变化受环境影响也对环境产生影响。从接种开始，发酵罐中细胞的数量、营养物质浓度、溶氧及 pH 等始终处于变化中，各个阶段环境条件微小的差异都可能导致发酵过程的变化。

第三节 发酵工艺过程和关键技术

一、发酵工艺过程

对于任何发酵类型（除一些转化过程外），一个确定的发酵过程由 6 个部分组成：①菌种以及确定的种子培养基和发酵培养基的组成；②培养基、发酵罐和辅助设备的灭菌；③大规模的有活性、纯种的种子培养物的生产；④发酵罐中微生物最优的生长条件下产物的大规模生产；⑤产物的提取、纯化；⑥发酵废液的处理。它们的相互关系如图 1-1 所示。因此，有必要不断进行研究以逐步提高整个发酵过程的效率。如在一个发酵过程建立之前，生产菌株必须分离出来，通过改造使其合成目标产物，并且其产量应具有经济价值；应确定微生物在培养上的需求，并设计相应的设备；同时必须确定产品的分离提取方法。此外，整个研究计划也应包括在发酵过程中不断地优化微生物菌种、培养基和提取方法。

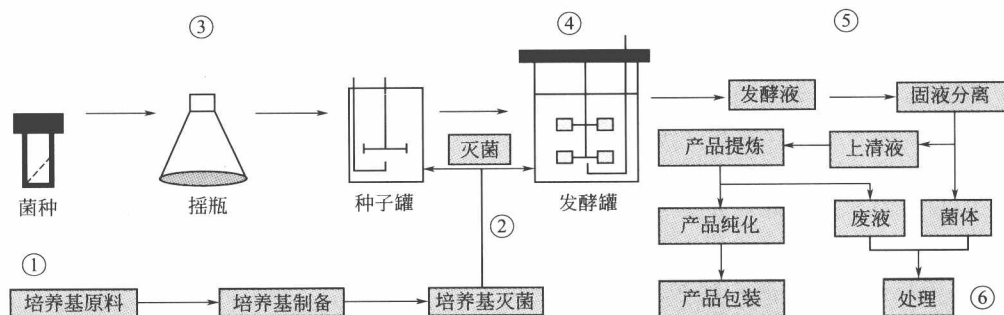


图 1-1 典型发酵过程的示意图

二、发酵工程关键技术

1. 菌种选育技术

菌种选育是按照生产的要求,以微生物遗传变异理论为依据,采用人工方法使菌种发生变异,再用各种筛选方法筛选出符合要求的菌种。菌种选育的目的包括改善菌种的基本特性,以提高产量、改进质量、降低成本、改革工艺、方便管理及综合利用。选育菌种的基本方法包括自然选育、抗噬菌体选育、诱变选育、代谢工程育种、基因定向育种、基因组改组等一系列方法。

在发酵工程建立初期和近代发酵工程阶段,发酵工程主要以野生的微生物为发酵主体。在现代发酵工程阶段,优良的菌种选育方法依然是发酵工程上游工程中的重要环节,其一是利用新型的筛选机制和筛选鉴定指标,继续从自然界中获得优良的出发菌株;其二是利用基因工程、细胞工程技术,结合分子生物学手段,采用代谢工程、代谢调控学、组学、系统生物学等原理,重新构建所需的基因工程菌或对已有的出发菌株进行基因改造,来获得能够生产所需发酵产品的优良菌株。

2. 纯种培养技术(灭菌技术)

发酵工业一般是采用特定微生物菌株进行纯种培养,从而达到生产所需产品的目的。因此,发酵过程要在没有杂菌污染的条件下进行。微生物无菌培养直接关系到生产过程的成败。无菌问题解决不好,轻则导致所需要产品数量的减少、质量下降以及后处理困难;重则会使全部培养液变质,导致成吨的培养基报废,造成经济上的严重损失,这一点对大规模的生产过程更为突出。为了保证培养过程的正常进行,防止染菌的发生,对大部分微生物的培养,包括实验室操作和工业生产,均需要进行严格的灭菌。发酵过程的灭菌范围包括:培养基、发酵设备和发酵过程提供的空气。

3. 发酵过程优化技术

发酵过程优化包括从微生物细胞层面到宏观微生物生化反应层面的优化,使细胞的生理调节、细胞环境、反应器特性、工艺操作条件与反应器控制之间复杂的相互作用尽可能简化,并对这些条件和相互关系进行优化,使之最适于特定发酵过程进行的系统优化方法。这种优化主要涉及四个方面的研究内容,第一是细胞生长过程的研究;第二是微生物反应的化学计量;第三是生物反应动力学;第四是生物反应器工程。

4. 发酵过程放大技术

为达到将实验室成果向工业规模推广和过渡的目的,一般都要经过中试规模的工艺优化研究。为了克服这些困难,特别对一些规模比较大的发酵产品,要采取逐级放大的方法。发酵过程放大的方法包括:发酵罐几何相似放大、供氧能力相似放大、菌体代谢相似放大、培养条件相似放大、数学模型模拟与预测放大等。

5. 发酵工程下游分离纯化技术

发酵产物的下游分离纯化是指将发酵目标产物进行提取、浓缩、纯化和成品化等过程。发酵产物分离纯化的重要性主要体现在生物产物的特殊性、复杂性和对产品的严格要求上,导致分离纯化成本占整个发酵产物生产成本的很大比例。发酵工程下游分离纯化过程,其费用通常占生产成本的50%~70%,有的甚至高达90%,往往成为实施生化过程替代化学过程生产的制约因素。因此,设计合理的提取与精制过程来提高产品质量和降低生产成本才能够真正实现发酵产品的商业化大规模生产。

6. 发酵过程自动监测、控制技术

某种意义上说,发酵过程的成败完全取决于能否维持一个生长受控的和对生产良好的环境。达到此目的最有效的方法是通过直接测量各种参数变化和对生物过程进行调节。将数

学、化工原理、电子计算机技术和自动控制装置等应用到发酵过程，进行生物技术参数的测量、生物过程的建模和控制，可对工业发酵过程进行高效的控制管理并提高生产效率。

第四节 发酵工业产品和现状

一、发酵工业产品

发酵工业产品涉及食品、化工、医药等诸多行业，与人类日常生活密切相关。酒类、奶酪、酱油和食醋等传统食品，是古老的发酵工业产品。现代发酵产品中，最早实现工业化生产的是 20 世纪 20 年代的酒精、甘油和丙酮等厌氧发酵产品。20 世纪 20 年代末，随着青霉素的发现，抗生素发酵工业逐渐兴起。由于成功地引进了通气搅拌和一整套无菌操作技术，深层通气发酵技术得以建立。它大大促进了发酵工业的发展，使有机酸、维生素、激素等产品都可以用发酵法大规模生产。1957 年，日本利用微生物生产谷氨酸获得成功。科学家在深入研究微生物代谢途径的基础上，通过对微生物进行人工诱变，先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，最终实现大量生产人们所需要的物质。后来，代谢控制发酵技术促进了核苷酸、有机酸和部分抗生素产品的工业化生产。

进入 21 世纪，随着生物技术的进步和发展，越来越多的产品可以通过生物发酵来进行生产。现代发酵工业产品向各个领域扩散，已涵盖食品、化工、能源、酶制剂、医药、材料等很多领域。例如，传统的酒、调味品酿造如今已实现工业规模的生产；各种新的能源（如燃料乙醇等）、药品（如抗体、抗生素等）、材料（如聚乳酸等）通过工业发酵可以实现大规模的生产，以满足人类生产、生活的需要。

二、发酵工业现状

发酵工程是工业生物技术的主要部分。由于国家需求和社会发展，主要目标已从生活资料的生产转向资源、能源和环境问题的解决。发酵工程的技术内涵，已经从主要的工业应用技术，发展为紧密依靠生物学、工程学基础研究的工程技术。发酵工业与其他学科的交叉，已经从产品生产过程拓展到关键的技术、方法学。

发酵工业是生物技术产品实现大规模生产的基础和必要条件，发达国家发酵工业发展较早，工业规模和技术水平较高。目前，全球生物技术产品市场份额以美国为主，日本、欧洲紧随其后。

美国是现代发酵工程技术发展较早的国家，生物技术产业已具有一定的规模，无论是在研究水平和投资强度，还是在产业规模和市场份额上，美国均领先于世界。美国拥有世界上约一半的生物技术公司和一半的生物技术专利。

欧盟是美国发酵工程产业发展的主要竞争对手。英国、德国、法国、瑞典及荷兰 5 大生物技术国家其生物技术产业的规模及财力趋于增强，生物技术公司日趋成熟和稳定。经过多年的努力，日本已经跻身生物技术强国之列，日本的生物技术及产业发展居于全球前列。据安永公司统计，2005 年日本生物技术产业的科技文献和专利申请量分别居全球第 4 位和第 2 位，显示日本在生物技术领域的科学基础已经居于较为领先的地位。通过政府的政策扶持和企业界的努力，日本的生物产业市场呈逐年增长态势。

经过多年努力，中国发酵工业产品不断增长，不仅丰富了人民的生活，而且使我国的发酵工业在国际上具有了举足轻重的地位。中国已经成为发酵工业大国，并创造了多个“世界第一”（表 1-2）。2010 年全国发酵产业产品总量 1683 万吨左右，产值 1850 多亿元，主要产品出口额约 26.3 亿美元。我国发酵产业已经形成了具有科学研究、生产设计、设备制造等

完整的工业体系。“十一五”期间，行业的技术水平不断提高，原材料消耗大幅降低，技术装备日益先进，先进的管理理念和管理方法已在行业中广泛应用，与国际接轨的各种认证已经普遍采用。近年来，发酵产业在节能减排等方面做了大量工作，“十一五”期间，各行业积极开展资源综合利用，高新技术和传统工艺相结合，将各种组分充分回收和利用，做到物尽其用，在提高附加值的同时，减轻和消除对环境的污染。

表 1-2 我国位居世界第一的发酵产品

产 品	年产量/万吨	产 品	年产量/万吨
酱油(2010)	595.7	维生素 C(2010)	13
啤酒(2010)	4483	柠檬酸(2010)	98
食用菌(2010)	2200	赖氨酸(2010)	56
淀粉糖(2010)	922.8	抗生素(青霉素为例)(2009)	5.6
味精(2010)	215.6		

我国已是发酵工业大国，但不是发酵强国。与发达国家相比，我国的发酵产业技术水平仍存在一定差距，具体表现在以下几个方面。

① 工业生产菌种的技术水平仍然较差。2007 年我国的发酵酒精总产量已超过 508 万吨，产值 383 亿元。但我国在耐高温酿酒高活性干酵母及系列酶制剂的应用和发展方面明显落后于国际水平。大宗发酵产品如谷氨酸以及赖氨酸等生产菌株的转化率与国外相比仍然存在较大差距。

② 发酵工艺相对落后。例如在青霉素的发酵中，发达国家通过计算机智能化控制发酵过程，青霉素活力已超过 100000U/mL；而我国，由于发酵工艺相对落后，青霉素活力仍低于 80000U/mL。我国是世界第一的酱油生产大国，2008 年产量达 530 万吨，占世界一半以上。但由于仍然采用落后的发酵工艺，原料利用率低，使我国酱油生产呈现成本高、档次低的现状，难以适应激烈的国际竞争。

③ 产品科技含量低，产品浓度低、能耗高、污染大。我国是酶制剂使用大国，但酶制剂的销售额却只占全世界的 10%，产品的科技含量与国际水平相比较低。我国酶制剂工业至少还有 1 倍以上的提升空间，带动相关工业产值达上千亿元。在发酵提取产品过程中，产品浓度每提高 1%，所产生的废水量将降低 1%~5%，而能耗同时下降 10%~30%。例如在赖氨酸的发酵生产中，由于产品浓度较低，导致下游提取的能耗为国外的 2 倍以上。

④ 装备水平落后。目前，国外已普遍采用智能化的大型生物反应器（800~1200m³）。而我国发酵罐普遍较小（最大发酵罐 380m³），智能化水平低。生物反应器的规模越大，生产成本就越低。与国内相比，国外由于大型生物反应器的使用，每吨产品耗电减少了 35%。

第五节 发酵工程发展趋势

生物学和工程学是发酵工程发展的基础，而生物学和工程学相关领域的蓬勃发展，为现代发酵工程的发展进步奠定了基础。图 1-2 描绘了生物学科相关领域的发展与发酵产品的发展趋势。未来的生物学领域，基于各种组学和实验生物科学的进步，对细胞功能的认识将进一步深入，对细胞功能进行优化的方法将不断丰富，效果将不断提高，同时发酵产品以及相关发酵工艺将大大拓展。图 1-3 描绘了工程学知识和技术发展的趋势。未来工程学领域的研究，基于对细胞群体效应的解析，将向着过程的系统与集成优化方向发展。通过优化模块单元与系统组装来优化发酵过程，最终提高目标产品的产量。未来，系统生物学和合成生物学技术、发酵过程的细胞群体效应解析技术、发酵过程的复杂多相体系放大技术、基于多产物

联产目标的全局调控技术、发酵过程集成和系统优化技术等将成为未来发酵工程发展的主要技术平台。

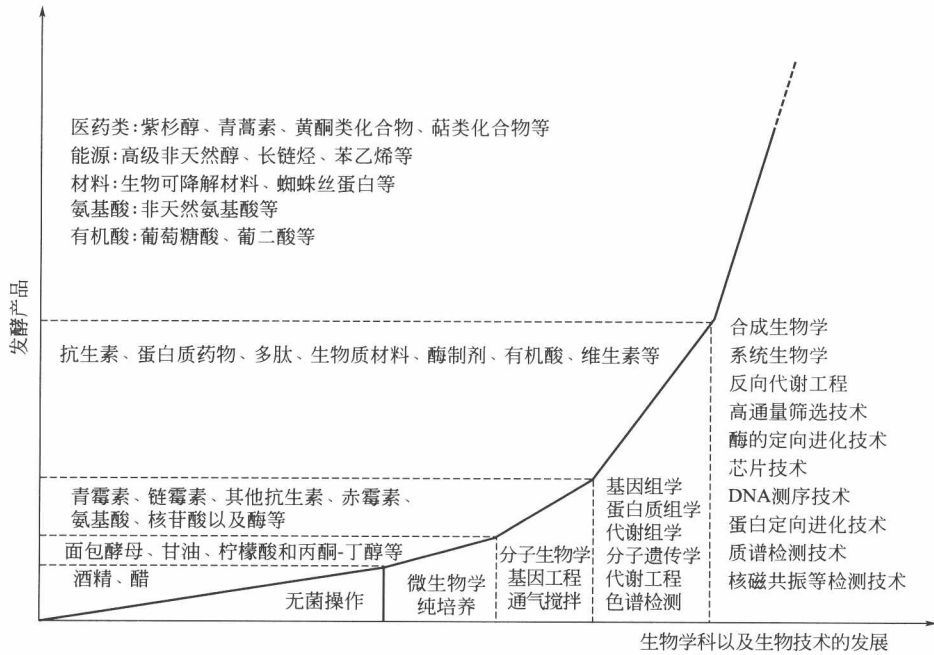


图 1-2 生物学科以及生物技术的发展与发酵产品的发展趋势

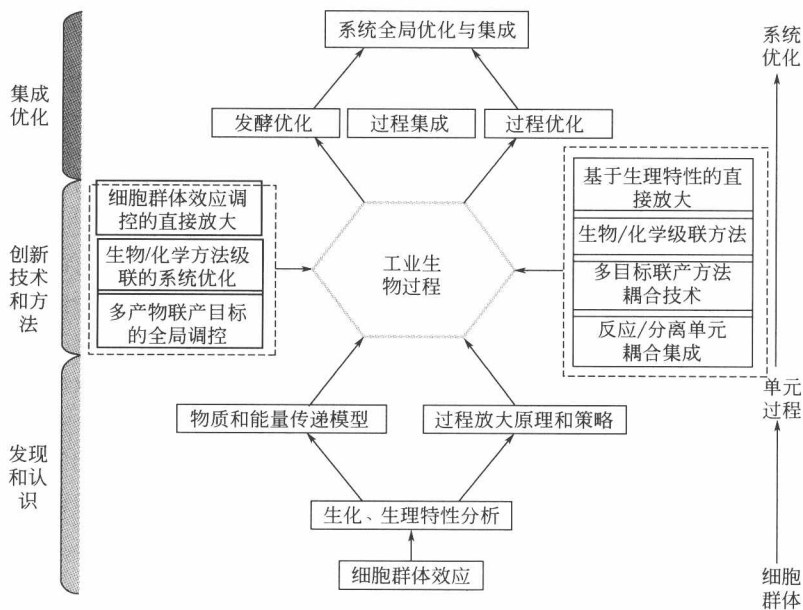


图 1-3 工程学知识和技术发展的趋势

产业方面，未来 10~20 年的时间，中国将逐步从发酵工业大国转变为发酵工业强国。发酵工业产品将更加集中于国内已形成较大规模、对国民经济产生重大影响的产品；已形成出口能力，能参与国际竞争的产品；受知识产权限制，长期依赖进口，急需技术突破的产