

21 世纪农业部高职高专规划教材

发 酵 工 程

周桃英 主编

生物类 食品类 制药类专业用

中 国 农 业 出 版 社

图书在版编目 (CIP) 数据

发酵工程 / 周桃英主编. —北京: 中国农业出版社,
2008. 2

21 世纪农业部高职高专规划教材

ISBN 978-7-109-12024-2

I. 发… II. 周… III. 发酵工程-高等学校: 技术学校-
教材 IV. TQ92

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2008) 第 012123 号

中国农业出版社出版

(北京市朝阳区农展馆北路 2 号)

(邮政编码 100026)

责任编辑 郑剑玲 李国忠

中国农业出版社印刷厂印刷 新华书店北京发行所发行

2008 年 3 月第 1 版 2008 年 3 月北京第 1 次印刷

开本: 720mm×960mm 1/16 印张: 20.5

字数: 361 千字

定价: 28.00 元

(凡本版图书出现印刷、装订错误, 请向出版社发行部调换)

前 言

发酵工业是既古老又年轻的工业，它的发展经历了漫长的岁月。以小作坊制酒、制醋等发展到现代化的工业生产，随着科学技术的发展，发酵工业不断得到发展和充实。现代发酵工业是以粮食和农副产品为主要原料的加工工业，主要包括味精、柠檬酸、淀粉糖、酵母、酶制剂等行业。发酵工业是我国新兴生物技术产业之一，尤其是近 10 年来，获得迅猛发展，我国每年消耗玉米、薯、粮 1 000 多万 t，生产发酵产品味精产量 65 万 t，柠檬酸 20 万 t，均居世界第一位；酶制剂 21 万 t，酵母 10 万 t，淀粉 380 万 t 及淀粉糖 60 万 t，年出口创汇 2 亿美元。

目前，由于受企业规模、治理技术、资金投入等因素限制，发酵工业中只有约 20% 规模较大企业进行了污染治理，多数企业没有采取彻底有效污染治理措施。发酵工业环境污染问题相当严重，据估算发酵工业年排放废水 6.7 亿 t，占全国总排放量的 3%。其中高浓度有机废水达 6 500 万 t，化学需氧量（COD）达 300 余万 t。年排废渣 300 余万 t。今后发酵工业环境治理任务相当艰巨，需通过提高粮食原料综合利用水平，加大行业结构调整力度，进一步集约化经营，同时淘汰浪费资源、治理无望的中小企业，使行业走上可持续发展道路。以低投入高产出运用高新发酵技术生产的产品发展前景是非常光明的。

本教材主要用于生物类、食品类、制药类等专业的教学。应用范围较广，教材中基础部分做到了尽量统一，专业部分可求同存异，

此为试读, 需要完整PDF请访问: www.ertongbook.com

不同的院校可以根据不同的专业各自取舍。为适应上述两方面的要求，在尽量压缩篇幅的情况下，内容也有所增多，尽可能满足不同类型院校和更多的专业以及人员层次的需要。

本教材的编写充分考虑到高职高专教育的特点，理论以必需、够用为度，以应用为宗旨，突出适应性、实用性、针对性，强调实践与应用、理论与实践相结合；深入浅出、通俗易懂，便于自学，力图做到讲、学、做统一协调；引入与本课程密切相关的新技术、新知识、新仪器、新设备，拓宽学生的思维与知识面；针对本课程实践教学的特点，按不同实验要求和生产应用的实际，编写本教材相应的实验技能训练指导、集中实践技能训练指导，加强学生动手能力与创新能力的培养；在每章的最后编写了复习思考题，便于学生自学和练习。

本教材实验的项目，可配合理论授课分散进行；实训的项目，应在教学计划中安排集中时间连续进行。

本教材编写分工为：周桃英编写绪论、第九章、实验和实训；刘红煜编写第三章、第七章和第十章；王洪波编写第四章、第六章、第八章和部分实验及实训；潘嫣丽编写第十一章和部分实训；武秀琴编写第一章、第二章和部分实验；张鲁嘉编写第五章和第十二章。

本教材由中国农业大学食品科学院博士研究生导师杨云波教授和华中农业大学食品科学系博士研究生导师张声华教授审定，在此谨致谢忱。

由于编者水平所限，难免有不足之处，祈请读者赐教指正。

编 者

2007年6月

目 录

前言

绪论	1
一、发酵工程发展的历史	1
二、发酵工程产业化发展	3
三、发酵工业展望及应用前景	5
第一章 发酵工业菌种的来源	6
第一节 发酵工业常用的微生物及其特性	6
一、发酵工业常用菌种的特性	6
二、发酵工业上常用的微生物	7
第二节 自然界中目的微生物的分离	11
一、采样	11
二、增殖培养	12
三、培养分离	13
四、筛选	13
五、毒性试验	14
第三节 菌种的选育和构建	14
一、常用的菌种选育方法	14
二、构建工程菌	21
三、菌种的筛选	23
四、菌种的退化与复壮	28
复习思考题	30
第二章 发酵培养基	31
第一节 培养基选择和配制的原则	31
一、培养基的类型和用途	31
二、培养基的配制原则	34

第二节 工业发酵培养基	37
一、工业上常用的碳源	38
二、工业上常用的氮源	39
三、无机盐	40
四、生长因子	41
五、前体物质和促进剂	42
第三节 发酵培养基的优化	46
一、理论转化率的计算	46
二、实验设计	47
三、培养基设计时应注意的其他问题	51
复习思考题	52
第三章 灭菌技术	53
第一节 灭菌	53
一、常用灭菌方法的基本原理	54
二、培养基的灭菌	56
三、空罐灭菌与发酵附属设备及管路的灭菌	62
第二节 空气除菌	63
一、空气的过滤除菌	63
二、发酵用空气的质量标准	66
三、空气除菌流程	67
第三节 无菌检查及发酵废气和废物的安全处理	69
一、无菌检查	70
二、发酵废气和废物的安全处理	70
复习思考题	71
第四章 种子的扩大培养	72
第一节 种子扩大培养的目的与要求	72
一、概述	72
二、发酵生产中对种子的要求	73
第二节 种子培养的条件	73
一、影响种子质量的因素及控制	73
二、种子异常分析	76
第三节 种子制备过程的技术概要	76

一、实验室种子制备	76
二、生产车间种子制备	77
第四节 种子的制备过程实例	78
一、谷氨酸发酵菌种扩大培养	78
二、啤酒酵母的扩大培养	79
复习思考题	80
第五章 发酵设备	81
第一节 通气式发酵设备	81
第二节 厌氧型发酵设备	90
第三节 固体发酵设备	92
复习思考题	94
第六章 工业发酵污染的防治	95
第一节 工业发酵染菌的危害	95
一、概述	95
二、不同染菌时间对发酵的影响	95
三、不同染菌途径对发酵的影响	96
四、染菌对产物提取和产品质量的影响	96
第二节 染菌的检查、原因分析和防治措施	97
一、染菌的检查	97
二、染菌的分析	99
三、发酵染菌防止	102
复习思考题	106
第七章 发酵产物的提取和精制	107
第一节 发酵液的预处理及菌体分离	108
一、离心过滤与菌体分离	109
二、发酵液的固-液分离	112
三、细胞的破碎与分离	114
第二节 发酵产物的提取	117
一、沉淀提取法	117
二、树脂法和吸附法	120
三、萃取法	124

四、蒸馏分离提取法	127
五、凝胶层析法	128
六、膜分离技术	129
第三节 发酵产物的精制	131
一、浓缩	131
二、结晶	132
三、成品干燥	133
复习思考题	134
第八章 糖嫌气性发酵产物积累机制	135
第一节 糖嫌气性发酵产物积累机制	135
一、糖酵解途径 (EMP 途径)	135
二、磷酸戊糖途径 (HMP 途径)	137
三、2-酮-3-脱氧-6-磷酸葡萄糖酸裂解途径 (ED 途径)	139
第二节 酒精发酵	140
一、乙醇的生成机制	140
二、巴斯德效应	141
三、酒精发酵中副产物的生产	141
复习思考题	143
第九章 柠檬酸发酵机制	144
第一节 柠檬酸生物合成途径	144
第二节 柠檬酸生物合成的代谢调节	146
一、切断支路代谢	146
二、解除反馈抑制或反馈阻遏	146
三、增加前体物质的合成	146
第三节 柠檬酸发酵生产	147
一、选育高产菌株	147
二、柠檬发酵工艺	147
三、柠檬酸提取工艺	149
复习思考题	152
第十章 抗生素的发酵生产	153
第一节 抗生素的概述	153

一、抗生素的定义	153
二、抗生素的发展简史	153
三、抗生素的分类	154
四、抗生素的用途	156
第二节 抗生素的生物合成	158
一、微生物代谢产物的类型	158
二、生物合成抗生素与初级代谢的关系	159
三、次级代谢产物生物合成的基本途径	161
第三节 抗生素生物合成的代谢调节机制	164
一、诱导调节	164
二、反馈调节	165
三、细胞膜透性的调节	165
四、对抗生素生物合成有重要影响的其他调节因素	165
五、微生物生长期和生产期的关系	166
第四节 抗生素生产工艺	167
一、抗生素的生产方法	167
二、微生物发酵法生产抗生素的工艺流程	167
第五节 抗生素生产实例	171
一、青霉素的理化性质	172
二、青霉素的发酵工艺及过程	173
复习思考题	178
第十一章 现代食品发酵工业	179
第一节 啤酒发酵生产	179
一、啤酒的种类	179
二、啤酒酿造的原料	180
三、啤酒酿造的基本工艺流程	182
第二节 白酒的发酵生产	194
一、白酒的分类	194
二、白酒生产中的原辅料及水的选择	196
三、白酒的生产技术	198
四、白酒的发展方向	212
第三节 酱油的发酵生产	213
一、酱油的种类	213

二、酱油的制造方法	214
三、酱油生产的原料	214
四、酱油生产所用的微生物	216
五、酱油生产的工艺流程	218
第四节 醋的发酵生产	227
一、食醋的种类	228
二、酿醋的原料	228
三、食醋酿造用微生物	228
四、常用酿醋的方法	229
复习思考题	235
第十二章 现代发酵新技术和新产品	236
第一节 动植物细胞的培养	236
一、动物细胞的特点	237
二、动物细胞的培养	237
三、植物细胞的培养	239
第二节 酶制剂的生产	242
一、酶制剂的生产方法	243
二、几种重要酶制剂产品的介绍	244
第三节 生物技术药物	248
一、蛋白质药物的生产方法	248
二、重组蛋白质药物产品介绍	249
第四节 生物高分子材料	252
一、生物高分子材料的介绍	253
二、代表性的生物高分子材料	254
复习思考题	256
实验实训	257
实验实训须知	257
实验一 接种、分离纯化和培养技术	258
实验二 微生物的诱变育种	264
实验三 培养基优化	267
实验四 工业染菌的检查	269
实验五 离子交换法提取抗生素	271

实验六 抗生素的结晶	272
实训一 抗药性突变株的分离	273
实训二 芽孢杆菌的筛选	275
实训三 黑曲霉的摇瓶实验	277
实训四 分批培养大肠杆菌	278
实训五 糖化曲的制作	282
实训六 糖化酶活力的测定	284
实训七 豆腐乳发酵	285
实训八 甜酒酿的制作	287
实训九 腌制品——泡菜制作	288
实训十 发酵法酿制食醋	290
实训十一 低盐固态发酵法酿造酱油	292
实训十二 葡萄酒制作	294
实训十三 小曲白酒的制作	295
实训十四 淡色啤酒酿制	297
实训十五 酿造酱油和食醋的感官品评	299
实训十六 葡萄酒的品评	302
实训十七 酒的品评	305
主要参考文献	311

绪 论

发酵现象几乎是伴随着地球生命的诞生而存在的。最初人们对发酵的认识来源于果汁或谷物类，它们在酿造过程中产生了气泡，被称之为发酵。对于许多人来说，发酵仅仅意味着生产酒精，至今人们常常以起泡现象作为直观发酵的指标。

(1) 从生物学观点来看，发酵是指有机化合物进行无氧代谢释放能量的过程。

(2) 巴斯德观点：把发酵扩展到利用培养微生物来获得产物的有氧化或厌氧氧化的任何过程，现在又扩展到培养生物细胞来制得产物的所有过程。

(3) 现代微生物学家观点：把借助微生物在有氧或无氧条件下的生命活动来制备微生物菌体本身，或其直接代谢产物或次级别代谢产物的过程统称为发酵。

一、发酵工程发展的历史

发酵工程起源很早，但它的蓬勃发展只有近几百年的历史，其发展大致经历为以下几个时期。

(一) 天然发酵时期

人们对发酵技术的认识起始于 19 世纪末，主要来自厌氧发酵，如利用酵母菌、乳酸菌生产酒精、乳酸和各种发酵食品。在这个时期人们对“发酵”的本质仍是一知半解，当时人们主要依靠经验进行家庭作坊式生产，生产中经常会被杂菌污染，因此这个时期称为天然发酵时期。主要的产品是食品，如各种饮料酒、酱、醋、腐乳、酸乳等。

(二) 纯种培养发酵时期

1680 年，荷兰博物学家安东·列文虎克 (Anthonie van Leeuwenhock) 制造了显微镜，证明了大量活的微生物的存在。1857 年巴斯德证明了酒精是由活的酵母发酵引起的，随之发明了著名的低温杀菌法，挽救了法国葡萄酒酿

造业，使其免受酸败之灾。巴斯德因此被称为“发酵之父”。1872年，布雷菲尔德（Brefeld）创建了霉菌纯粹培养方法，被称为近代细菌学之父。1897年毕希纳发现磨碎的酵母仍使糖发酵形成酒精，证明了任何生物都可以产生发酵物质。

“需求是发明之母”，第一次世界大战的爆发，德国需要大量用于制造炸药的硝化甘油，从而使甘油发酵工业化了。英国制造无烟炸药的硝化纤维需要大量的优质丙酮，促使 Weizman 发明了丙酮-丁醇发酵这种纯种培养技术，并实现了工业化。这是发酵工程第一个转折点，发酵由食品工业向非食品工业发展。

（三）通气搅拌发酵时期

1929年英国弗莱明（A. Fleming）发现青霉素，并确认青霉素对伤口感染有很好的治疗效果，1941年，美英两国合作对青霉素做了进一步的研究和开发。开始进行表面培养：1 L 扁瓶或锥形瓶，内装 200 ml 麦麸培养基产出青霉素 40 U/ml；1943年采用了沉浸培养，5 m³ 发酵液里能产生青霉素 200 U/ml；采用通气搅拌深层液体培养，现在 100~200 m³ 发酵液可以产生青霉素 5万~7万 U/ml。青霉素发酵生产需要氧气，通气搅拌液体深层发酵技术的建立使需氧菌的发酵生产走上了大规模工业化。青霉素发酵生产的成功，给人类医疗保健事业作出了巨大贡献。同时给发酵工程带来了第二个转折点，青霉素研发成功，推进了链霉素、金霉素、新霉素、红霉素等抗生素发酵工业迅猛发展。

（四）代谢控制发酵时期

1950—1960年，随着基础生物学即生物化学、酶化学、微生物遗传学等学科的飞速发展，再加上新型分析方法和分离方法的发展，1956年由日本木下祝郎发明谷氨酸发酵技术，从 DNA 分子水平上，微生物变异株通过代谢调节，控制微生物的代谢途径，进行最合理的代谢，积累大量有用的发酵产物。这种发酵技术在赖氨酸等一系列氨基酸以及核苷酸物质发酵生产中得到了广泛的应用，而且在抗生素等次级代谢产物的发酵中也得到了广泛的应用。它标志着发酵工程的第三个转折点的到来：切断支路代谢，酶的活力调控，酶的合成调控（反馈控制和反馈阻遏），解除菌体自身的反馈调节，突变株的应用，前体、终产物、副产物等。

（五）基因工程时期

1980年之后，随着细胞融合技术、基因操作技术等生物技术的发展，发

酵技术又取得了突飞猛进的发展。打破了生物种间障碍，能定向地制造出新的有用的微生物；增加微生物体内控制代谢产物产量的基因拷贝数，可以大幅度地提高目标产物的产量；将动物、植物或某些微生物特有产物的控制基因植入细胞中，快速经济地大量生产这些产物；将具有不同性能的多种质粒植入，使新菌株在清除污染或以非粮食物质为原料进行发酵生产或环境保护；人类基因组测序完成的后向功能基因组学转变——功能基因及其表达产物的获得等等。另外，微生物、动植物、藻类等细胞大规模培养，都表明了发酵工程进入了又一个新的时期——基因工程时期。

二、发酵工程产业化发展

目前，全球发酵产品的年销售额在 400 亿美元左右，并以每年 7%~8% 的速率增长。我国发酵行业生产企业有 5 000 多家，主要发酵产品的年产值高达 1 300 亿元。发酵工程技术给人类社会生产力的发展带来了巨大的潜力，涉及解决人类所面临的食品与营养、健康与环境、资源与能源等重大问题。随着人类社会经济的发展，能源结构、资源结构、环境状态已不能支撑现有发展模式。特别是随着煤、石油等能源的逐渐耗竭，以及环境保护的急需，如果没有基于科技进步的大力开发，能源和其他资源将难以支撑人类社会进一步发展的目标。传统的粗放型经济增长方式必定走到尽头，必须走资源节约型、环境友好型的道路。只有工业微生物才能将来源于太阳能的可再生资源碳水化合物转变为现代社会所需要的化工原料和能源。这种能源结构和其他资源结构的转变直接关系到我国经济的可持续发展、社会的稳定和国家安全。

发酵工业的各类产品已广泛应用于轻工、医药、食品、畜牧、能源、环境等领域中。发酵工程的优点是：原料来源丰富、经济、产物专一、废弃物对环境的污染小或容易处理，因此在医药工业、食品工业、农业、冶金工业、环境保护等方面得到了快速的发展。在一些发达国家，发酵工业的总产值占到国民生产总值的 5% 左右。我国也在 20 世纪 80 年代以后，大力发展了发酵工业。

1. 在食品工业上的应用

(1) 通过发酵工程使一些传统的发酵产品，如啤酒、果酒、食醋等，在产量和质量上得到明显的提高。

(2) 通过发酵工程生产食品添加剂（表 0-1），改善了食品的品质及色、香、味。

表 0-1 常用的几类食品添加剂

添加剂	举 例
酸味剂	L-苹果酸、柠檬酸、乳酸
鲜味剂	肌苷酸、谷氨酸
色 素	β -胡萝卜素、红曲素
甜味剂	高果糖浆、甜菜糖

例如，用发酵方法制得的 L-苹果酸是国际食品界公认的安全型酸味剂，广泛用于果酱、果汁、饮料、罐头、糖果、人造奶油等的生产中。

(3) 发酵工程有望为解决人类的粮食短缺问题开辟一条新的途径。

微生物含有丰富的蛋白质，如细菌的蛋白质含量占细胞干重的 60%~80%，酵母菌占 45%~65%，而且它们的生长繁殖速度很快。因此，许多国家利用淀粉或纤维素的水解液、制糖工业的废液、石化产品等为原料，通过发酵获得大量的微生物菌体，这种生物菌体就叫做单细胞蛋白。20 世纪 80 年代中期，全世界生产的单细胞蛋白已达 2×10^6 t。用酵母菌等生产的单细胞蛋白可作为食品添加剂，甚至制成“人造肉”供人们直接食用。最近国外市场上出现的一种真菌蛋白食品，就是以其高蛋白、低脂肪的特点受到了消费者的欢迎。单细胞蛋白用做饲料，能使家畜、家禽增重快，产奶或产蛋量显著提高。

2. 在医药工业上的应用 发酵工程已广泛应用于医药工业，很多抗生素、维生素、动物激素、药用氨基酸、核苷酸等都可通过发酵工程得到，其中，抗生素的生产占主要地位。20 世纪 80 年代，世界各地的抗生素年产量达 2.5×10^4 t，产值超过 40 亿美元。目前，常用的抗生素已达一百多种，如青霉素类、头孢菌素类、红霉素类和四环素类。

有些药物，如人生长激素、胰岛素，过去主要是靠从生物体器官、组织、细胞或尿液中提取。发酵工程使这些药物的生产量大大提高，已可满足普通人的需要。

随着基因工程和发酵工程的结合应用，人们可以大批量生产人生长激素、重组乙肝疫苗、某些种类的单克隆抗体、白细胞介素-2、抗血友病因子、生长激素释放抑制因子等重要的药物。例如，生长激素释放抑制因子是一种人脑激素，能够抑制生长激素的不适宜分泌，用于治疗肢端肥大症。最初，生产生长激素释放抑制因子的方法是从羊脑中提取，50 万个羊脑才能提取 5 mg，远远不能满足需要。而利用整合了生长激素释放抑制因子基因的工程菌进行发酵生产，7.5 L 培养液就能得到 5 mg 的生长激素释放抑制因子，而价格只有原来的几分之一。

三、发酵工业展望及应用前景

随着生物技术的发展，发酵工程的应用领域也在不断扩大。从细胞生长繁殖、代谢的角度而言，利用发酵工程技术所进行的大规模植物细胞培养，将用于生产一些昂贵的药品；而动物细胞培养所生产的一些蛋白质和多肽类产品将作为医用激素及抗癌与抗艾滋病的新药物。

发酵原料的更换也使发酵工程发生重大的变革。以后，由于木质纤维素原料的大量应用，发酵工程将大规模生产通用化学品以及能源。这样，发酵工程变得对人类更为重要。目前还在逐步应用的化工原料前体发酵技术，已使发酵工程成为生产某些化学品的不可替代的手段，诸如色氨酸的前体发酵、长链脂肪烃（13,14 正烷烃）发酵等，将使人类大规模应用色氨酸和长链二元酸成为可能。

发酵工程技术在今后 10 年内的重点发展方向为：基因工程及细胞杂交技术在微生物育种上的应用，将使发酵所用菌种达到前所未有的水平；生物反应器技术及生物分离技术的相应进步将揭示发酵工业放大的某些神秘特征；由于物理微生物数据库、发酵动力学、发酵传递力学的发展，将使人们能够清楚地描述与使用微生物的适当环境和有关的生物学行为，从而能最佳地、理性化地进行工业发酵设计与生产。

第一章 发酵工业菌种的来源

【本章学习的目的和要求】

1. 理解发酵工业常用的微生物及其特性。
2. 掌握菌种选育的方法。
3. 了解菌种退化的原因。
4. 掌握菌种复壮的措施。

第一节 发酵工业常用的微生物及其特性

微生物菌种在发酵工业中占有重要的地位，它是决定发酵产品是否具有工业化价值和商业化价值的关键因素，因此可以说是发酵工业的灵魂。发酵工业对各种常用菌种的要求因原料、产物、方法、设备的不同而不相同。

一、发酵工业常用菌种的特性

1. 有稳定的遗传学特性 这对于工业化生产是很重要的，通常工业化生产整个周期很长，在一个发酵周期中，菌体至少应该增殖一次，在增殖过程中，菌体应该保证原有的遗传学特征，而且要求生长速度和反应速度要快，发酵周期要短，微生物生长和产物的合成对于基质没有严格的要求。

菌种的发酵培养基应该价格低廉，来源充足，被转化为产品的效率高。如许多发酵工业都是用农副产品配制发酵培养基，不仅能满足菌种发酵所要求的营养成分，而且发酵原料易获得，转化率高。最好可以广泛地使用各种原料作为生产培养基，尽可能降低生产成本。

2. 生长条件易于满足 在微生物的工业化生产过程中，某些环境条件的实现具有一定的困难。例如，氧的传递和供给就是一个很难完全满足的条件，特别是对于高黏度、高浓度的发酵体系。

一般微生物的生长往往存在一个“临界溶氧浓度”，低于这个溶氧浓度，氧就成了微生物生长的限制性因子。临界溶氧浓度越低，说明菌体生长条件越易满足，工业化的生产成本就越低。