

普通高等教育“十一五”规划教材

# 发 酵 工 程

韦革宏 杨 祥 主编

科 学 出 版 社

北 京

## 内 容 简 介

本书全面介绍了发酵工程的概念、原理、发展方向及应用领域。全书共有 11 章,在内容安排上分为两大部分,前半部分即第一章至第七章主要阐述发酵工程的基本概念、理论及基本原理。后半部分即第八章至第十一章主要介绍发酵工程在工业、农业、新型能源、环境保护、食品酿造等方面的应用。

本书可供农林院校、综合性大学、师范院校的生物学专业与其他相关专业的本科生使用。

### 图书在版编目(CIP)数据

发酵工程/韦革宏,杨祥主编.—北京:科学出版社,2008  
(普通高等教育“十一五”规划教材)  
ISBN 978-7-03-021077-7

I.发… II.①韦…②杨… 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(2008)第 019015 号

责任编辑:甄文全 丛楠 / 责任校对:陈玉凤  
责任印制:张克忠 / 封面设计:耕者设计工作室

科学出版社 出版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

中国科学院印刷厂印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

\*

2008 年 2 月第 一 版 开本:787×1092 1/16

2008 年 2 月第一次印刷 印张:21

印数:1—4 000

字数:543 000

定价:34.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换(环伟))

## 《发酵工程》编写委员会

主 编：韦革宏 杨 祥

副 主 编：王卫卫 段开红 任大明

编写人员（按姓氏汉语拼音排序）：

段开红（内蒙古农业大学）

韩珍珠（西南科技大学）

任大明（沈阳农业大学）

王卫卫（西北大学）

王彦杰（黑龙江八一农垦大学）

韦革宏（西北农林科技大学）

温志强（福建农林大学）

颜 霞（西北农林科技大学）

杨 祥（西北农林科技大学）

杨丽华（内蒙古农业大学）

张 良（沈阳农业大学）

张江波（西北农林科技大学）

## 前 言

发酵工程是生物工程的重要组成部分，是利用微生物为大规模工业生产服务的一门工程技术。发酵技术历史悠久，在国民经济和人民生活各方面正发挥着越来越大的作用。尤其是现代发酵工程，广泛应用基因工程、细胞工程、酶工程等新技术，形成了 21 世纪最重要的生物工程支柱产业。在人类可持续性发展的进程中，正显示着其巨大的优势。为人类解决所面临的能源短缺、环境污染、疾病控制等重大难题提供全新的思路和途径。发酵工程技术及成果正在被广泛地应用于工农业生产、环境保护及人们的医药卫生保健事业。因此可以说发酵工程是 21 世纪最具发展潜力的重要理论与应用学科之一。

生物工程被认为是生物科学最前沿的学科，为适应经济和社会发展需要，很多高校设有生物工程及生物技术或与之相关的本科专业，而发酵工程则是这些专业所开设的重要骨干课程。同时越来越多的相关专业，甚至一些文科及管理学科专业也相继设置发酵工程课程。但目前对于综合大学、农林院校、师范院校相关专业的教学却缺乏与之相适应的教材。基于这种要求和意愿，我们多所院校在科学出版社的大力支持下，编写了这本发酵工程教材。本教材的编写宗旨就是使同学们在掌握发酵工程基本知识、基本理论和基本技能的基础上，更多地了解发酵工程在生物、农林方面的应用，为同学们今后从事相关生物医药、生物农药、生物肥料、发酵食品饮料、新型能源、环境保护等工作打下一个坚实的理论及应用基础。

参与编写本教材的老师来自国内部分农林和综合院校。他们都长期从事发酵工程的教学及相关的科研工作，有着较为丰富的理论基础和实践经验。在编写过程中，编者参阅了大量的国内外先进教材、专著和文献。在内容安排上注重理论与应用紧密结合与联系。既注重基础理论，又努力反映学科发展的前沿动态，特别是发酵工程在农林业方面的应用实例。使之成为同学们学习发酵工程课程的重要指导教材。本教材也可供从事发酵工程工作的科技人员及相关人士参考。

本书共 11 章，编写分工是：第一章由韦革宏、杨祥编写，第二章由颜霞编写，第三章由王卫卫编写，第四章由张江波编写，第五章由王彦杰编写，第六章由段开红、杨丽华编写，第七章由张良编写，第八章由任大明编写，第九章由韩珍珠编写，第十章由杨祥编写，第十一章由温志强编写。全

书由韦革宏和杨祥统稿。

在编写本书过程中，我们参考了许多国内外相关的教材和文献资料，引用了一些重要的结论及相关的图表，在此向各位前辈及同行致以衷心的感谢。在编写过程中，还得到了相关院校领导及有关部门的大力支持和关心。科学出版社的领导和编辑同志对本书的出版做了大量辛勤细致的工作，在此谨致以衷心的感谢。

由于编者的水平有限，加之时间仓促，书中错误和不足之处在所难免。诚挚的希望专家和同行以及广大读者给予批评指正。

编 者

2007年11月18日

# 目 录

## 前言

第一章 发酵工程概述	1
第一节 发酵工程的概念	1
一、发酵的定义	1
二、发酵工程的概念及特点	1
三、发酵工程的产品类型	3
第二节 发酵工程的发展简史	7
一、传统发酵时期	7
二、近代发酵工程时期	8
三、现代发酵工程时期	11
第三节 发酵工程的基本内容	12
一、发酵工程的一般特征	12
二、发酵工程菌种的特点	14
三、发酵工程中常见发酵罐的类型	14
四、发酵过程的优化	23
五、发酵工业的逐级放大	24
第四节 发酵工程常见的主要发酵类型	24
一、液体发酵与固体发酵	25
二、厌氧发酵与好氧发酵	30
三、分批发酵与连续发酵	31
四、单一纯种发酵与混合发酵	37
五、固定化发酵技术	38
第五节 发酵工程的后处理	39
一、发酵工程后处理技术的特点	40
二、发酵液的特点	40
三、下游工程的目的产物的特点	41
四、发酵产物提取精制的基本流程	41
五、发酵产物提取的基本方法	41
复习思考题	46
第二章 微生物菌种选育	47
第一节 菌种的来源	47
一、工业发酵常见微生物种类	47
二、工业微生物来源	49

三、微生物菌种的选择性分离 .....	49
四、重要工业微生物菌种的分离 .....	52
第二节 发酵高产菌种选育 .....	54
一、自然选育 .....	54
二、诱变育种 .....	54
三、杂交育种 .....	59
四、原生质体融合 .....	59
五、基因工程育种 .....	61
第三节 菌种退化和菌种保藏 .....	64
一、菌种退化 .....	64
二、微生物菌种保藏 .....	67
三、菌种保藏机构 .....	69
第四节 微生物菌种的扩大培养 .....	70
一、种子的制备过程 .....	70
二、种子质量的控制 .....	72
复习思考题 .....	75
<b>第三章 发酵机制及发酵动力学</b> .....	<b>77</b>
第一节 发酵工程微生物的基本代谢及产物 .....	77
一、微生物初级代谢及产物 .....	77
二、微生物次级代谢及产物 .....	77
第二节 微生物代谢调控机制 .....	78
一、微生物初级代谢的调节 .....	79
二、微生物次级代谢的调节 .....	82
三、微生物发酵中的代谢调控 .....	82
第三节 糖代谢产物的发酵机制 .....	84
一、厌氧发酵代谢产物发酵机制 .....	84
二、好氧发酵代谢产物发酵机制 .....	86
第四节 氨基酸和核酸发酵机制 .....	88
一、氨基酸发酵机制 .....	88
二、核苷酸发酵机制 .....	92
第五节 抗生素发酵机制 .....	93
一、抗生素的发酵机制 .....	93
二、几种抗生素的生物合成 .....	94
第六节 微生物发酵的动力学 .....	97
一、分批培养中微生物的生长曲线 .....	97
二、微生物生长速度的动力学方程 .....	99
三、分批培养中微生物细胞生长与产物形成的动力学 .....	100
复习思考题 .....	103

第四章 发酵工业培养基及原料处理	104
第一节 发酵营养基质的组成	104
一、碳源营养	104
二、氮源营养	106
三、无机盐及微量元素	108
四、水	110
五、生长因子、前体物质、产物促进剂和抑制剂	110
第二节 工业发酵中营养基质的种类	112
一、不同原料纯度的培养基	112
二、物理状态不同的培养基	113
三、工业发酵中用途不同的培养基	113
第三节 工业发酵中营养基质的选择	115
一、营养基质的选择	115
二、培养基成分用量的确定	116
第四节 工业发酵中营养基质的配制方法	117
一、淀粉质原料制糖工艺及培养基的配制方法	117
二、糖蜜原料培养基的制备过程	125
复习思考题	127
第五章 发酵工程的灭菌与空气除菌	128
第一节 常用的灭菌方法	128
一、化学灭菌	128
二、射线灭菌	128
三、干热灭菌	129
四、湿热灭菌	129
第二节 培养基与发酵设备的灭菌	129
一、灭菌的基本原理	129
二、培养基的灭菌	131
三、发酵设备的灭菌	137
第三节 空气的除菌	137
一、发酵使用的净化空气的标准	138
二、空气预处理	139
三、空气净化的方法	141
四、介质过滤除菌的材料及原理	143
五、空气净化的工艺流程	147
复习思考题	148
第六章 发酵条件及过程控制	150
第一节 营养基质和菌体浓度的影响及其控制	150
一、碳源的种类和浓度对发酵过程的影响及控制	150

二、氮源的种类和浓度的影响及控制 .....	152
三、磷酸盐浓度的影响及控制 .....	154
四、菌体浓度的影响及其控制 .....	154
第二节 温度的影响及其控制 .....	155
一、影响发酵温度的因素 .....	155
二、发酵最适温度选择 .....	157
三、发酵过程温度的控制 .....	158
第三节 pH 的影响和控制 .....	159
一、pH 对发酵过程的影响 .....	159
二、发酵过程中影响 pH 变化的因素 .....	160
三、发酵过程中 pH 的控制 .....	160
第四节 通气和搅拌 .....	162
一、微生物对氧的需求 .....	162
二、影响氧溶解及传递的因素 .....	164
三、提高溶解氧的措施 .....	167
第五节 泡沫的影响和控制 .....	168
一、发酵过程中泡沫的产生 .....	168
二、泡沫对发酵过程的影响 .....	169
三、泡沫的消除和控制 .....	169
第六节 二氧化碳和呼吸商 .....	172
第七节 发酵终点的判断 .....	174
第八节 发酵的优化控制 .....	175
一、培养基的优化 .....	175
二、工艺控制优化 .....	176
第九节 发酵过程的计算机控制 .....	177
一、计算机控制概述 .....	177
二、计算机控制系统及其功能 .....	178
三、计算机在最优化控制中的作用 .....	179
第十节 发酵过程的精确检测 .....	180
一、发酵过程的参数 .....	180
二、在线仪器监测 .....	181
三、离线发酵分析 .....	182
复习思考题 .....	182
<b>第七章 发酵染菌及防治 .....</b>	<b>184</b>
第一节 发酵异常现象及染菌分析 .....	184
一、种子培养和发酵的异常现象 .....	184
二、染菌隐患的检查 .....	185
三、发酵染菌的原因 .....	186

四、染菌原因的分析 .....	187
五、染菌隐患的处理 .....	188
第二节 染菌对发酵的影响 .....	189
一、染菌对不同发酵过程的影响 .....	189
二、杂菌的种类和性质对发酵过程的影响 .....	189
三、染菌发生的时间不同对发酵的影响 .....	189
四、染菌程度对发酵的影响 .....	189
第三节 杂菌污染后的挽救和处理 .....	190
一、种子培养期染菌的处理 .....	190
二、发酵前期染菌的处理 .....	190
三、发酵中、后期染菌的处理 .....	190
四、染菌后对设备的处理 .....	190
第四节 染菌的预防措施 .....	190
一、强化空气净化过程 .....	190
二、严格培养原料及设备的灭菌 .....	192
三、定期检测发酵设备及管道 .....	195
四、严格培养物的移接 .....	197
五、预防噬菌体危害 .....	198
第五节 食用菌及生物农药生产中应注意的染菌问题 .....	200
一、食用菌生产中的染菌的危害 .....	200
二、生物农药生产中的染菌问题 .....	201
复习思考题 .....	201
第八章 现代发酵工业主要产品的工艺过程 .....	202
第一节 抗生素 .....	202
一、概述 .....	202
二、抗生素工业发酵生产过程 .....	204
三、青霉素发酵生产工艺 .....	206
第二节 氨基酸 .....	208
一、概述 .....	208
二、氨基酸工业发酵生产过程 .....	209
三、赖氨酸工业发酵 .....	214
第三节 有机酸 .....	215
一、概述 .....	215
二、柠檬酸工业发酵 .....	216
三、乳酸工业发酵 .....	217
第四节 酶制剂 .....	220
一、概述 .....	220
二、酶制剂的生产工艺 .....	221

三、米曲霉 $\alpha$ -淀粉酶生产工艺 .....	225
第五节 核苷酸类物质 .....	226
一、概述 .....	226
二、肌苷酸工业发酵 .....	227
三、鸟苷酸工业发酵 .....	229
第六节 其他现代发酵工程的产品 .....	230
一、工业发酵生产维生素 .....	230
二、工业发酵生产单细胞蛋白 .....	231
三、工业发酵生产多糖 .....	232
复习思考题 .....	232
<b>第九章 发酵工程在食品、饮料方面的应用</b> .....	233
第一节 酒类的发酵 .....	233
一、酒的分类 .....	233
二、白酒的酿造 .....	234
三、啤酒的酿造 .....	241
四、葡萄酒酿造 .....	243
五、黄酒的酿造 .....	246
第二节 调味品的酿造 .....	249
一、豆腐乳的发酵生产 .....	249
二、豆豉的酿造 .....	251
三、酱油的酿造 .....	252
四、醋的酿造 .....	255
五、其他发酵食品的酿造 .....	257
复习思考题 .....	259
<b>第十章 发酵工程在农业方面的应用</b> .....	260
第一节 生物(微生物)肥料的发酵 .....	260
一、生物肥料概述 .....	260
二、微生物(生物)肥料的发酵生产 .....	263
第二节 生物农药的发酵 .....	270
一、生物农药概述 .....	270
二、细菌生物农药发酵 .....	271
三、放线菌类生物农药的发酵 .....	274
四、真菌生物农药的发酵生产 .....	278
第三节 生物饲料的发酵 .....	280
一、生物饲料概述 .....	280
二、酵母菌体蛋白发酵 .....	281
三、其他生物饲料的发酵 .....	289
复习思考题 .....	291

---

---

第十一章 发酵工程在新型能源及环境保护方面的应用	292
第一节 乙醇的发酵	292
一、概述	292
二、乙醇发酵的原料	293
三、乙醇发酵有关的微生物	293
四、乙醇发酵生化机制	294
五、乙醇的发酵工艺	295
六、乙醇蒸馏与精馏	299
第二节 沼气发酵的工艺类型	300
一、沼气发酵理论机理	300
二、沼气发酵的基本工艺流程	300
三、厌氧消化器的类别	302
第三节 发酵工程在环境保护中的应用	309
一、污水的生物处理	309
二、有机固体废弃物的微生物处理	315
复习思考题	318
主要参考文献	319

# 第一章 发酵工程概述

发酵工程是生物工程的重要组成部分和基础，是生物工程产业化的重要环节。它是利用生物技术对微生物进行质的改造，或构建出微生物原来不具有的新性状的菌株。同时，在开发微生物资源和改进传统微生物生产工艺中广泛采用新技术和新方法，使传统的劳动密集型微生物产业向技术密集型技术产业方向发展，形成了众多的生物工程新型产业。

发酵工程的内容随着科学技术的发展不断扩大和充实。现代发酵工程不仅包括菌体生产和代谢产物的发酵生产，还包括微生物机能的利用。其主要内容包括生产菌种的选育，发酵条件的优化与控制，反应器的设计及产物的分离、提取与精制等。

## 第一节 发酵工程的概念

### 一、发酵的定义

#### 1. 发酵（fermentation）的传统概念

发酵最初来自拉丁语“发泡”（fervere）这个词，是指酵母作用于果汁或发芽谷物产生  $\text{CO}_2$  的现象。巴斯德研究了酒精发酵的生理意义，认为发酵是酵母在无氧条件下的呼吸过程，是“生物获得能量的一种形式”。也就是说，发酵是在厌氧条件下，糖在酵母菌等生物细胞的作用下进行分解代谢，向菌体提供能量，从而得到产物酒精和  $\text{CO}_2$  的过程。然而，发酵对不同的对象具有不同意义。对生物化学家来说，关于发酵的定义是指微生物在无氧条件下分解代谢有机物质释放能量的过程。

#### 2. 发酵的现代概念

生物学家把利用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或其代谢产物的过程统称为发酵。

### 二、发酵工程的概念及特点

#### 1. 发酵工程的概念

发酵工程是利用微生物特定性状和功能，通过现代化工程技术生产有用物质或应用于工业化生产的技术体系，是将传统发酵与现代的 DNA 重组、细胞融合、分子修饰和改造等新技术结合并发展起来的发酵技术。也可以说是渗透有工程学的微生物学，是发酵技术工程化的发展。由于主要利用的是微生物发酵过程来生产产品，因此也可称为生物工程。

发酵工程基本上可分为发酵和提取两大部分。发酵部分是微生物反应过程，提取部分也称为后处理或下游加工过程。虽然发酵工程的生产是以发酵为主，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，但因为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。发酵工程就是要研究和解决整个过程的工艺和设备问题，将实验室和中试成果迅速扩大到工业化生产中去。

### 2. 微生物工业发酵的基本过程

微生物的工业发酵方式多种多样，但发酵总的过程是相似的。其基本步骤如图 1-1 所示。其中有的发酵过程环节繁多，有的则可省去其中的某些步骤。

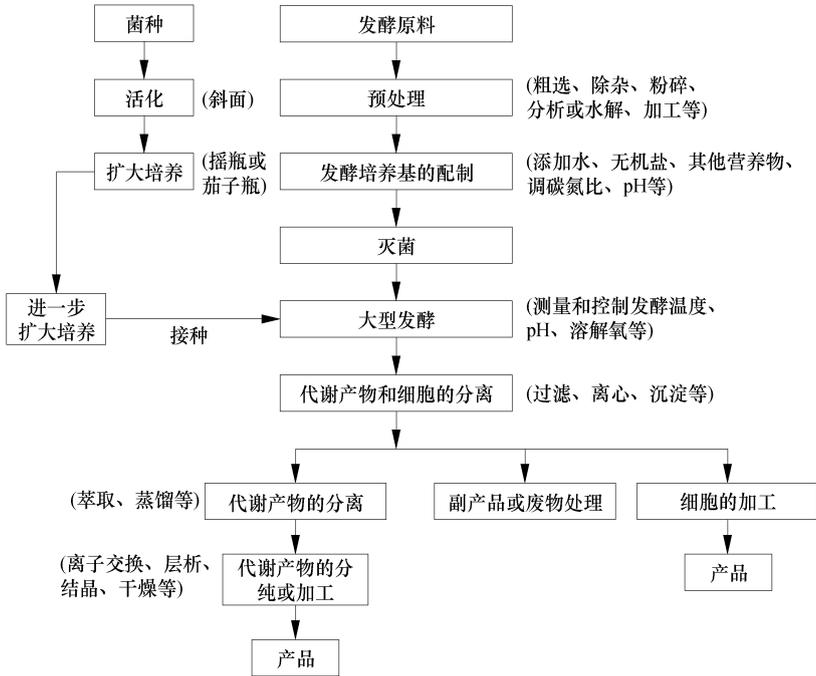


图 1-1 微生物工业发酵的基本过程

### 3. 发酵工程技术的特点

(1) 发酵工程主体微生物的特点：①微生物种类繁多、繁殖速度快、代谢能力强，容易通过人工诱变获得有益的突变株；②微生物酶的种类很多，能催化各种生物化学反应；③微生物能够利用有机物、无机物等各种营养源；④可以用简易的设备来生产多种多样的产品；⑤不受气候、季节等自然条件的限制等优点。

(2) 发酵工程技术的特点：与传统酿造技术相比，源于酒类、酱类、醋类等酿造技术的发酵工程技术发展非常迅速，并具有以下特点：①发酵过程以生命体的自动调节方式进行，数十个反应过程能够在发酵设备中一次完成；②反应通常在常温常压下进行，条件温和，耗能少，设备较简单；③原料通常以糖蜜、淀粉等碳水化合物为主，可以是农副产品、工业废水或可再生资源（如植物秸秆、木屑等），微生物本身能有选择地摄取所需的物质；④容易生产复杂的高分子化合物，能高度选择地在复杂化合物的特定部位进行氧化、还原、官能团引入或去除等反应；⑤发酵过程中需要防止杂菌污染，大多情况下设备需要进行严格的冲洗、灭菌，空气需要过滤等。

(3) 发酵工程反应过程的特点：与化学工程相比，发酵工程反应过程具有如下特点：①作为生物化学反应，通常是在温和的条件（如常温、常压、弱酸、弱碱等）下进行；②原料来源广泛，通常以糖、淀粉等碳水化合物为主；③反应以生命体的自动调节

方式进行,若干个反应过程能够像单一反应一样,在单一反应器内很容易地进行;④发酵产品多数为小分子产品,但也能很容易地生产出复杂的高分子化合物,如酶、核苷酸的生产等;⑤由于生命体特有的反应机制,能高度选择性地对复杂化合物在特定部位的氧化、还原、官能团导入等反应;⑥生产发酵产品的微生物菌体本身也是发酵产物,富含维生素、蛋白质、酶等有用物质。除特殊情况外,发酵液一般对生物体无害;⑦要特别注意防止发酵生产操作中的杂菌污染,一旦发生杂菌污染,一般都会遭受损失;⑧通过微生物菌种的改良,能够利用原有设备较大幅度地提高生产水平(图 1-2,图 1-3)。



图 1-2 国外一家现代化发酵制药企业全景图

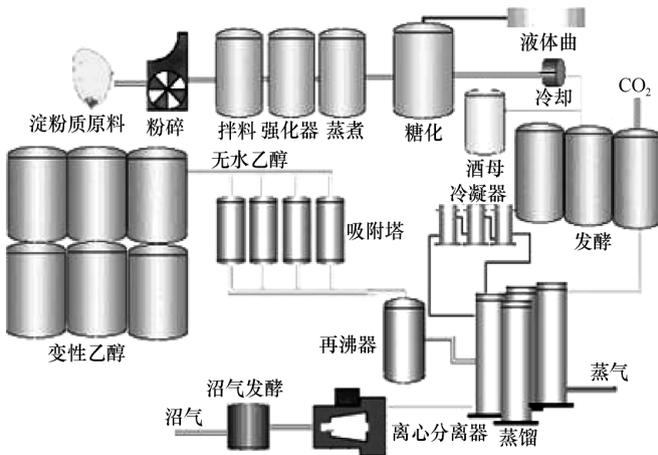


图 1-3 乙醇发酵生产工艺流程

### 三、发酵工程的产品类型

人类利用微生物生产各种产品已有数千年的历史。最初,微生物的应用仅限于食品与酿酒发酵。随着近代微生物工程或发酵工程的发展,应用领域逐渐扩展到医药、轻工、农业、化工、能源、环境保护及冶金等多个行业。特别是基因工程和细胞工程等现代生物技术的发展和结合,人们通过细胞水平和分子水平改良或创建微生物新的菌种,使发酵工程的发酵水平大幅度提高,发酵产品的种类和范围不断增加,其中包括许多动、植物细胞产品。发酵工程产品类型常见的有下列 16 种。

#### 1. 酿酒

酿酒是人类利用微生物发酵最早的领域,是微生物工业的母体工业。目前全世界饮料酒产量约 2 亿吨,其商品产量和产值在微生物工业中均占首位。饮料酒以含糖原料(果汁、甘蔗汁、蜂蜜等)和淀粉质原料(米、麦、高粱、玉米、红薯、土豆等)经酿造加工而成,其中起主要作用的是霉菌和酵母,前者将淀粉转变为糖,后者将糖转化为

酒精。饮料酒分发酵酒和蒸馏酒两大类，发酵酒包括葡萄酒、啤酒、果酒、黄酒和青酒等，蒸馏酒有白酒、白兰地、威士忌酒、俄德克、金酒、老姆酒等。

## 2. 发酵食品

发酵食品是人类很早以前利用微生物发酵的又一领域。天然食品经微生物（包括细菌、霉菌和酵母）适度发酵后，产生各种风味物质，使之味道更好，并有利于贮存。根据功能的不同，发酵食品又可分为发酵主食品、发酵副食品、发酵调味品和发酵乳制品等。

①发酵主食品：面包、馒头、包子、发面饼等；②发酵副食品：火腿、发酵香肠、豆腐乳、泡菜、咸菜等；③发酵调味品：酱、酱油、豆豉、食醋、酵母自溶物等；④发酵乳制品：奶酒、干酪、酸奶等。

## 3. 有机酸

醋酸和乳酸的生产和利用，在人们认识微生物之前就开始了。饮料酒在有氧条件下自然放置可制成醋，牛乳酸败可制成酸奶。而有机酸工业，则是随着近代发酵技术的建立而逐渐形成的。

霉菌（特别是曲霉）和细菌都具有生产有机酸的能力，其生产方法可分为两类：一类是以碳水化合物和碳氢化合物为原料的中间代谢产物发酵；另一类是以糖、糖醇、醇、有机酸等为原料的生物转化发酵。目前，采用发酵法生产的有机酸主要有醋酸（乙酸）、丙酸、丙酮酸、乳酸、丁酸、琥珀酸、延胡索酸、苹果酸、酒石酸、衣康酸、 $\alpha$ -酮戊二酸、柠檬酸、异柠檬酸、葡萄糖酸、抗坏血酸、曲酸、水杨酸等。

## 4. 醇及有机溶剂

乙醇的工业化生产始于19世纪初，而丙酮-丁醇、丁醇、异丙醇、甘油等的生产始于20世纪初，可用微生物发酵法生产的其他醇类和溶剂还有丁二醇、二羟丙酮、甘露糖醇、阿拉伯糖醇、木糖醇、赤藓糖醇等。目前全世界酒精年总产量约为2500万吨，其中60%以上用于燃料酒精，其余用于饮料工业、化学工业和医药工业等。除酒精外，其他醇类及溶剂的产量较少，而丙酮、丁醇和甘油等有机溶剂目前大多采用化学方法生产。

## 5. 酶制剂

酶是一种生物催化剂，它具有作用专一性强、催化效率高等特点，能在常温和低浓度下催化复杂的生化反应。没有酶，就没有生物体的一切生命活动。动物、植物、微生物都有细胞原生质分泌的各种特异的酶，借以催化各种生化反应，并呈现各种生命现象。事实上，微生物发酵现象都是在各种各样的酶催化作用下完成的。

中国酒曲是世界上最早的微生物粗酶制剂，其中含有淀粉酶、蛋白酶、脂肪酶和酒化酶等。1897年德国人毕希纳证明发酵是由于微生物酶的作用，为近代酶学打下了基础。1898年，日本人高峰让吉从米曲霉中提取到高峰淀粉酶，这是利用微生物生产酶制剂产品的开端。

目前，生物界已发现的酶有数千种，用微生物发酵法生产的酶有上百种。按照酶催化反应的类型，将其分为氧化还原酶、转移酶、水解酶、裂解酶、异构酶和连接酶（合成酶）六类。而工业化生产的酶制剂，按用途不同分为工业用酶和医药用酶两大类，前者一般不需要纯制品，而后者要求的纯度较高，其价格是前者的数千倍至数百万倍。由微生物生产的工业用酶制剂主要有糖化酶、 $\alpha$ -淀粉酶、异淀粉酶、转化酶、异构酶、半

乳糖酶、纤维素酶、蛋白酶、果胶酶、脂肪酶、凝乳酶、氨基酰化酶、甘露聚糖酶、过氧化氢酶等，医药用酶主要有蛋白酶、胃蛋白酶、胰蛋白酶、核酸酶、脂肪酶、尿激酶、链激酶、天冬酰胺酶、超氧化物歧化酶、溶菌酶、血溶栓酶、植酸酶等(图 1-4)。

## 6. 氨基酸

氨基酸是构成蛋白质的基本化合物，也是营养学中极为重要的物质。自从 1955 年日本人木下祝郎成功地用发酵法获得谷氨酸以来，现在几乎所有的氨基酸均可用发酵法生产。目前全世界氨基酸的总产量约 100 多万吨，其中产量最大的是谷氨酸（味精），其余的产量较少，主要有赖氨酸、精氨酸、蛋氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、天冬氨酸等。

## 7. 核酸类物质

核酸的单体是核苷酸，由含氮碱基（嘌呤或嘧啶）、戊糖（核糖或脱氧核糖）与磷酸三部分组成，若仅由前两部分组成则称为核苷。核苷酸发酵始于 20 世纪 60 年代，最早的产品是鲜味剂肌苷酸（IMP）和鸟苷酸（GMP）。此后，发现许多核酸类物质如肌苷、腺苷、三磷酸腺苷（ATP）、烟酰胺腺苷嘌呤二核苷酸（NAD，辅酶 I）、黄素腺嘌呤二核苷酸（FAD）、单磷酸核苷（UMP）等具有特殊的疗效且用途正在日益扩大，从而促进了核酸类物质的生产。

## 8. 抗生素

抗生素是由微生物产生的具有生理活性的物质，它不但可以抑制其他微生物的生长与代谢，有的还可抑制癌细胞的生长，还具有抗血纤维蛋白溶酶（plasmin）作用。自从 1928 年弗莱明（A. Fleming）发现青霉素以来至今已发现的抗生素有 6000 余种，其中绝大多数来自于微生物，目前由微生物生产的医用和兽用抗生素已达上千种。此外，某些天然抗生素在长期的使用中，会诱使一些病原菌产生抗药性。为了解除抗药性，同时也为了扩大抗菌谱，采用半合成的方法，将天然抗生素的侧链去掉，再用化学法加上新的侧链，如此生产的抗生素被称为半合成抗生素。研究最多的是青霉素型（如甲氧苄青霉素、氨苄青霉素、苯唑青霉素、磺苄青霉素等）和头孢菌素型（如头孢 I 号、头孢 II 号、头孢 III 号、头孢 IV 号、头孢 V 号、头孢 VI 号等）半合成抗生素，其他半合成抗生素有丁胺卡那霉素、甲烯土霉素、强力霉素、二甲胺四环素、四氢吡咯甲基四环素、去甲基金霉素、利福平、氯林肯霉素、乙酰螺旋霉素等。

## 9. 生理活性物质

生理活性物质是指能促进或抑制某些生化反应，使生物维持其正常的生命活动的一类物质。如前所述的抗生素和某些核酸类物质（AMP、ATP、NAD 等）都应归为生理活性物质，除此之外，其他生理活性物质还有维生素、激素、酶抑制剂、杀菌剂和杀虫剂等。

## 10. 微生物菌体产品

微生物菌体产品是指发酵的最终产物是微生物本身。按用途不同，微生物菌体产品



图 1-4 现代畜牧业使用的重要酶制剂——植酸酶制剂

可分为如下几类：

- (1) 活性干酵母 (ADY)。包括面包活性干酵母和各种酿酒活性干酵母。
- (2) 活性乳酸菌制剂。直接食用可用于改善人体肠道微生物生态区系；此外，由各种乳酸菌制成的干剂用做直投型酸奶发酵剂。
- (3) 食用和药用酵母。包括作为营养强化剂或添加剂用的普通食用酵母，用于协助消化的普通药用酵母，以及具有特殊功效或治疗作用的富集酵母，如富锌酵母、富铁酵母、富铬酵母、富硒酵母和富维生素酵母等。
- (4) 饲用单细胞蛋白 (SCP)。作为饲料蛋白质，其粗蛋白含量高达 40%~80%。生产 SCP 的原料非常广泛，包括糖质、淀粉质、纤维质以及工农业生产废弃物等再生资源，也可利用甲烷、甲醇、乙醇、乙酸和正烷烃等石油化工产品。根据原料的不同，可选用的微生物有藻类、酵母、细菌、丝状真菌和放线菌等。
- (5) 其他菌体产品。其他菌体产品有食用菌、药用真菌、某些工业用粗酶制剂 (胞内酶) 和生物防治剂等。

### 11. 生物农药及生物增产剂

- (1) 微生物杀虫剂。包括病毒杀虫剂，如核型多角体病毒、质型多角体病毒、颗粒体病毒、重组杆状病毒；细菌杀虫剂，如苏云金芽孢杆菌、重组苏云金芽孢杆菌；真菌杀虫剂，如虫霉菌杀虫剂、白僵菌杀虫剂；动物杀虫剂，如原生动孢子虫杀虫剂、新线虫杀虫剂、索线虫杀虫剂等。
- (2) 防治植物病害微生物。如细菌 (假单胞菌属、土壤杆菌属等)、放线菌 (细黄链菌)、真菌 (木霉)、各种弱病毒和农用抗生素 (如杀稻瘟菌素、灭瘟素 S、春日霉素、庆丰霉素) 等。
- (3) 生物除草剂。如环己酰胺、双丙磷 A、谷氨酰胺合成酶等。
- (4) 生物增产剂。有固氮菌、钾细菌、磷细菌、抗菌制剂等，作为农业生产的辅助肥料及抗菌增产剂。

### 12. 生物能

乙醇是替代石油的可再生能源，目前世界上 60% 以上的酒精用于汽油醇。甲烷是微生物利用有机废弃物厌氧发酵的产物。其他有微生物产氢、微生物燃料电池，此外还有藻类产油等。

### 13. 环境净化

自然界本身就存在着碳和氮的循环，而微生物对生物物质的排泄及尸体的分解起着重要作用。利用生物技术手段处理生产和生活中的有机废弃物，加速了这一分解过程的进行，且可对环境卫生做出很大的贡献。

(1) 厌氧处理。在厌氧条件下，微生物利用分解废弃物中的碳水化合物、蛋白质和脂肪等有机物质产生沼气，在治理环境的同时，又可获得一定量的能源，此外，经厌氧发酵后的残渣还可用做肥料，可谓一举三得。

(2) 好气处理。利用好气性微生物使有机物氧化，最终将 BOD (生化需氧量——一种用微生物代谢作用所消耗的溶解氧量来间接表示水体被有机物污染程度的一个重要指标，其定义是：在有氧条件下，好氧微生物氧化分解单位体积水中有机物所消耗的游离氧的数量，单位为 mg/L) 成分分解成二氧化碳和水。目前广泛应用的有活性污泥法和生物膜法等。

(3) 特殊处理。利用特殊微生物降解某些有害物质, 如酚、有机氮、有机磷、氰、腈、汞及某些金属离子等。

#### 14. 微生物冶炼

在金属浸取中, 应用最广的微生物是氧化亚铁硫杆菌 (*Thiobacillus ferrooxidans*), 它能将亚铁氧化成高铁, 把硫和低价的硫化物氧化成硫酸, 将含硫金属矿石 (主要是尾矿、贫矿) 中的金属离子形成硫酸盐而释放出来。可用此法浸出的金属有铜、钴、铅、铀、锌、金等。

#### 15. 转基因产品

可利用基因重组技术将动、植物细胞的基因转入微生物, 通过微生物发酵生产动、植物细胞产品。常用的受体菌有大肠杆菌、枯草杆菌、啤酒酵母、毕赤酵母等。产品有胰岛素、生长激素、干扰素、疫苗、血纤维蛋白溶解剂、红细胞生成素、单克隆抗体等。

#### 16. 其他

其他微生物发酵产品有多糖 (黄原胶、右旋糖酐、葡聚糖等)、高果糖浆、甜味肽等。

## 第二节 发酵工程的发展简史

为了更好地了解发酵工程的现状与未来, 有必要从发酵工程的发展与微生物学、生物化学、化学工程、发酵工程技术和微生物工业的关系来认识和回顾发酵工程发展的重要阶段。

### 一、传统发酵时期

微生物学诞生于 19 世纪 50 年代, 但人类利用微生物的历史却非常悠久。远在人类的穴居时代, 我们的祖先就知道将一些采摘的野果存放一段时间就会有酒味。发现将吃剩下并经过贮存后的兽肉比鲜肉的味道更好。因而, 在学会了种植和畜牧, 进入定居的农业社会后不久, 人类就开始利用剩余的谷物酿酒, 大约在 9000 年前就已经开始了原始的啤酒生产。公元前 6000 年左右, 在黑海与里海的外高加索地区, 就已经开始种植葡萄和酿制葡萄酒。在公元前 2400 年左右, 在埃及第五王朝的墓葬壁画上, 就有烤制面包和酿酒的大幅浮雕图 (图 1-5)。公元前 25 世纪古巴尔干人开始制作酸奶。公元前 17 世纪古西班牙人曾用类似目前细菌浸取铜矿的方法获取铜。

根据我国的《黄帝内经》和《汤液醪醴论》的文字记载可知, 我国利用微生物酿酒起源于公元前 2200~2600 年, 已经有 4000 多年的历史。从考古挖掘出来的用于盛酒、煮酒和斟酒的青铜器皿等判断, 其历史至少可以追溯到 4000 多年前的“龙山文化时期” (图 1-6), 甚至是 5000~6000 年前的“仰韶文化时期”



图 1-5 古埃及酿酒壁画

(图 1-7)。我国的酱油酿造开始于周朝，距今已有 3000 年的历史。在汉武帝时代开始有了葡萄酒，至今也已有 2000 多年的历史。而发酵后经过蒸馏生产的白酒，大概始于宋代。



图 1-6 龙山文化遗址出土的陶制酒器



图 1-7 宝鸡北首岭出土的仰韶文化时期的水鸟啄鱼蒜头壶

约在 3000 多年前的商代后期，人们发现发了霉的豆腐可以治外伤。在 2500 年前（东周中期）就清楚疯狗的危害性而将其攻而杀之。在约 1000 年前我国已开始用轻症天花病人的痘（人痘）对健康人进行接种以防传染，这种接痘方法后来传到国外，比 1798 年英国的琴纳（E. Jenner）发明的牛痘接种约早了 800 年。在约 3500 年前的商代，就开始用人畜的粪便和桔梗、杂草沤制堆肥。约在 2000 前的西汉后期就提倡采用豆粮隔年轮作的方法来提高粮食的产量（当时并不知道根瘤菌的存在及其固氮作用）等等。

在当时人们并不知道微生物与发酵的关系，对发酵的原因根本不清楚，只是依靠口传心授，一代代的传授着这种发酵的工艺。这一时期被称为自然发酵时期。因此在其后相当长的时期中传统发酵工艺并没有获得很大的突破。尽管如此，这些经验对后来的微生物学的发展及发酵工程的建立发挥了重要的作用。

17 世纪下半叶，随着显微镜的发明，人们逐渐认识到微生物的存在。到了 19 世纪中叶，法国著名生物学家巴斯德通过实验发现，原来酒精发酵是由活的酵母引起的，其他的发酵过程也是各种微生物作用的结果，从而揭示了微生物和发酵之间的关系，这样人们对发酵的认识就发生了质的飞跃。

## 二、近代发酵工程时期

### （一）近代发酵工程建立的初期

微生物的发现和发酵技术的建立与显微镜的诞生是密不可分的。1590 年荷兰人詹生（Z. Janssen）最早制作了显微镜，但因放大倍数的限制而无法观察到微生物的活动。1665 年英国人胡克（R. Hooke）制作的显微镜观察到了霉菌，还观察到了植物切片中存在胞粒状物质，因而把它称为细胞（cell），此名称一直沿用至今。1680 年荷兰人列文虎克（A. VanLeeuwenhoek）制成了能放大 200~300 倍的显微镜，观察了污水、牙垢、腐败有机物等，直接看到了微小生物，并对杆菌、球菌、螺旋菌等作了相当正确的描述，为人类进一步了解微生物创造了条件，并为近代发酵技术的建立奠定了基础。

在显微镜诞生后的 200 年间，人们一直在进行着对各种各样的微小生物观察，但并

没有把微生物的活动与发酵联系起来。直到 19 世纪 60 年代, 法国人巴斯德 (L. Pasteur) 才揭示了发酵的秘密, 认识到发酵是由微生物的活动所引起的。他发现了加热的肉汁不发酵, 不加热时则产生发酵, 由此提出了一种科学的消毒方法——巴斯德消毒法, 即将食品、牛乳和饮料酒等加热至 60℃ 并维持一段时间后可杀死其中的微生物, 防止酸变与腐败。时至今日, 这种既可杀死营养细胞又不明显破坏食品和饮料营养成分的消毒方法仍在广泛应用。之后, 巴斯德继续对酒精发酵、乳酸发酵、葡萄酒酿造和食醋制造等各种发酵现象进行了研究。1857 年他明确指出酒精是酵母细胞生命活动的产物, 并在 1863 年进一步提出所有的发酵都是微生物作用的结果, 而不同的微生物引起不同的发酵。

巴斯德的发现使人类认识了微生物与发酵的关系, 但他没有建立纯培养技术 (即只含有一种微生物的培养方法)。19 世纪末, 德国人科赫 (R. Koch) 首先应用固体培养基分离微生物。1881 年他与他的助手们发明了加入琼脂的固体培养基, 此为琼脂培养基的起源。皮特里 (Petri) 创造了一种“皮式培养皿”, 供平板培养之用: 在平皿中用接种针蘸上混合菌液在固体培养基表面划线, 经培养后即可获得由单个细胞长成的菌落, 此种方法一直沿用至今。与此同时, 丹麦人汉逊 (Hansen) 研究成功了啤酒酵母的纯培养方法, 并于 1878 年确定了“汉逊稀释法”纯培养原理。1881 年 Jargensen 采用“汉逊稀释法”选择优良酵母菌株用于啤酒发酵, 由此揭开了人类有目的分离有益微生物来生产所需要的产品的序幕。

微生物纯培养技术的建立, 开创了人为控制微生物的时代, 促进了近代发酵工业的建立。首先, 通过上述技术的应用, 改进了发酵管理工程技术, 发明了简便的密闭式发酵罐, 初步建立了人工控制环境条件的发酵系统, 使啤酒、葡萄酒、酱油等生产的腐败现象大大减少, 生产规模和发酵效率不断提高, 并逐渐由手工作坊向大型工业化生产的转变。在此基础上, 逐渐建立了丙酮、丁醇、甘油、酒精、有机酸、固体酶制剂等工业。至 20 世纪 20 年代, 近代发酵工程得以建立起来, 近代发酵工业初步形成。

近代微生物发酵工业中, 主要的发酵产品为饮料酒、有机溶剂和多元醇等厌氧发酵产品, 有机酸、粗酶制剂 (包括中国的酒曲) 等好氧微生物的发酵培养产品的生产则主要采用固态培养法和表面培养法。1879 年马奎阿特 (Marquardt) 根据巴斯德效应理论 (在有氧条件下酵母的繁殖速度加快, 而酒精的产率下降, 这种通风抑制酒精发酵的现象称为巴斯德效应), 首先使用通气法生产酵母。随后, 丹麦和德国的科学家提出了连续补料培养酵母的方法, 使酵母产量大大增加。到目前为止, 这是一种能生产大量酵母菌体而不产生大量酒精的唯一方法。20 世纪 70 年代后, 连续补料的培养方法被其他微生物工业广泛采用, 可用来消除底物抑制和提高产物的转化率。

## (二) 近代发酵工程全面发展时期

近代发酵工程全面发展时期是指从 20 世纪 40 年代初到 20 世纪 70 年代末。这一时期的起始标志是青霉素工业的迅速发展。由此带动了一批微生物次级代谢产品和新的初级代谢产品的开发。开创了好气发酵工程, 促进了发酵工业的发展, 是发酵工程发展史上重要的标志性阶段。

### 1. 青霉素的发现及其开发概况

1928 年 9 月英国伦敦圣马利医院的细菌学家弗莱明发现有一个能引起化脓性炎症的金黄色葡萄球菌的培养皿被空气夹带的青霉菌所污染了。奇怪的是在那个青霉菌菌落周围的金黄色葡萄球菌都长不出来了, 而形成了一个透明的抑菌圈。当时他就敏感地意识到可能是那掉下的青霉菌会产生一种抗细菌物质, 因而把这株从空气中落下的青霉菌

的菌落保藏了起来，准备进一步研究。其后他发现他所保存的青霉为点青霉（*Penicillium notatum*），同时将它分泌的抗菌物质称为青霉素（Penicillin）。第二年，他继续把所获得的菌种进行培养，并初步对培养液里的青霉素进行提取以及初步的动物实验后，发现青霉素确实有强烈的杀灭多种病原菌的能力，且毒性不大。但由于青霉素是微生物所产生的次级代谢产物，其产量远比初级代谢产物低，结构也较复杂，性能又不够稳定，因此要投入生产还存在很多困难。人们开始希望利用化学合成的方法来将其进行开发，因此对它在生物技术方面的开发被延迟了近 10 年。1941 年因第二次世界大战（1939~1945 年）的爆发，前线和后方的不少伤员都希望能有一种比当时磺胺类药物更为有效和安全的治疗外伤炎症及其继发性传染病的药物。这时英国政府请病理学家弗洛里（H. W. Florey）和生化学家钱恩（E. B. Chain）参加到弗莱明的研究队伍中加速对青霉素的研制开发。在他们积累了一定量的青霉素后，先对动物进行了实验，再对一位患血液感染的病人进行临床实验，都证明了青霉素具有卓越的效能且毒性很小。然而，因战事急剧发展使此项研究开发难以继续，其后的青霉素的开发是在转移到美国后完成的。当时由英国的弗洛里为首的一批研究人员在美国一些研究单位和药厂的支持下分兵两路，其中主要力量仍是进行化学合成的开发，只有少数人在进行生物合成的开发。后者的开发是在药厂中进行的，开始时是以大量的扁瓶为发酵容器，湿麦麸为主要培养基，用表面培养法生产青霉素。这种发酵方法虽然技术手段落后，而且耗费大量的劳动力，但终究能获得一定量的青霉素，而化学合成路线却进展不大（青霉素的化学合成到 1950 年以后才完成，终因步骤多，成本高、无法进行生产）。对于发酵法生产青霉素虽然获得成功，但当时是由被称为“瓶子工厂”中生产出来的，不能满足需求，于是决定请工程技术人员来共同改造原有生产线。不久新的发酵生产线开始运转了，以大型的带机械搅拌和无菌通气装置的发酵罐取代了瓶子发酵，引用了当时新型的逆流离心萃取机——波特皮尔耐克萃取机作为发酵滤液主要提取手段以减少青霉素在 pH 剧变时的破坏；与此同时，上游研究人员则寻找到了一株从发霉的甜瓜中选出的适用于液体培养的产黄青霉（*Penicillium chrysogenum*）菌株，使青霉素发酵的效价提高了几百倍，同时还发现以玉米浆（生产玉米淀粉的副产品）和乳糖（生产干酪时的副产品）为主的培养基可使青霉素的发酵效价约提高 10 倍。不久，辉瑞药厂就建立起一座具有 14 个约 26m<sup>3</sup>（7000gal）发酵罐的车间生产青霉素，并获得成功。为了表彰他们对人类做出的贡献，1945 年，弗莱明、弗洛里和钱恩因发明和开发了青霉素被授予诺贝尔医学奖。

青霉素的投产，虽然经历了十来年的时间，但它开辟了一个新的以生产上百种抗生素和其他次级代谢产物的工业微生物产品道路，同时也对原有的和新的初级代谢产物产品的生产方式起到了重大的引导作用，原来以固体发酵为主的有机酸和酶制剂生产大多都改为液体发酵生产。同时一个新的交叉学科——生物化学工程建立了起来(图 1-8)。

## 2. 人工诱变育种与代谢控制发酵工程技术的建立

随着微生物遗传学和生物化学的发展，促进了 20 世纪 60 年代氨基酸、核苷酸微生物工业的建立，这是通过对遗传因子（DNA）水平的改造来实现人工调控微生物代谢的目的。日本于 1956 年用发酵法制造谷氨酸成功，至今已有 22 种氨基酸用发酵法生产，其中 18 种是直接发酵，4 种用酶法转化。氨基酸发酵工业引进了人工诱变育种与代谢控制发酵的新型发酵工程技术。代谢控制发酵工程技术以动态生物化学和微生物遗传学为基础，将微生物进行人工诱变，得到适合于生产某种产品的突变株，再在人工控制的条件下培养，即能选择性地大量生产人们所需要的物质。此项工程技术目前已用于核苷酸类物质、有机酸和一部分抗生素的发酵生产。近代分子生物化学、分子遗传学研究的进展更促进该项工程技术和工程理论的发展。因此，代谢控制发酵工程技术的建

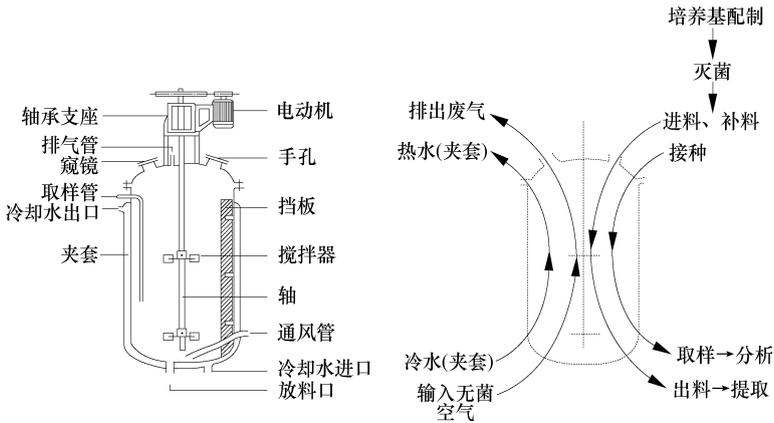


图 1-8 现代发酵工程使用的深层液体发酵罐及工艺

立，可以说是发酵工程发酵技术发展的重要的转折期。

### 3. 发酵动力学、发酵的连续化自动化工程技术的建立

随着微生物工业向大型发酵罐连续化、自动化方向发展，发酵工程中利用数学、流体力学、化学工程原理、电子计算机技术和自动控制对发酵过程的研究，使间歇式发酵和连续发酵过程的工艺控制更为合理。新工艺、新设备层出不穷。日本的塔式连续发酵设备可以适用于各种连续通风发酵的目的。法国 L-M 型单级连续发酵槽，用于连续培养酵母，其结构简单而效率却相当高。最新设计的实验型万能发酵罐适于任何发酵生产，可以同时记录 24 个不同的物理化学和生物化学的数据。日本对塔式连续发酵设备进行了数学模拟计算，取得了良好的效果。发酵过程的全部基本参数、包括温度、pH、罐压、溶解氧、氧化还原电位、空气流量、CO<sub>2</sub> 含量等均可自动控制。有关泡沫的控制也已实现了自动化，国外不少发酵工厂已实施程序自动控制，大大提高生产效率。这种发酵的连续化、自动化工程已成为生物工程（发酵工程）技术体系建立的重要的标志。

### 4. 微生物酶反应生物合成和化学合成反应相结合工程技术的建立

随着各种矿产物的开发和石油化工的迅速发展，在有用物质的生产中，微生物发酵生物合成工程技术与化学合成工程技术正在进行激烈的竞争，矿产物的开发和石油化工的发展正在为化学合成法提供丰富的原料，利用逐步化学合成法生产一些低分子的有机化合物是有利的，例如乙醇、丙酮及丁醇等。美国工业生产 100 种发酵制品，其中酒精、丙酮、丁醇大部分改用合成法生产。葡萄糖酸、谷氨酸、乳酸的一部分也用合成法制造。而对于那些用化学合成法不能生产的一些复杂物质，则采用微生物发酵生物合成法可以在常温常压下一步完成。此外，即使可以用化学合成法生产产品的生产中，仍然有很多产品采用微生物发酵法来生产。

## 三、现代发酵工程时期

现代发酵工程时期是指利用现代分子生物技术即 DNA 重组技术所获得的“工程菌”、细胞融合所得的“杂交”细胞以及动植物细胞或固定化活细胞等，使发酵工业的范畴突破了利用天然微生物的传统发酵，逐步建立起新型的发酵体系，生产天然微生物或人体及其他动植物所不能产生或产量很少的特殊产物。这方面最重要的产品就是基因工程药品。所用的发酵设备是各种类型的新型生物反应器，甚至直接用转基因动植物作

生物反应器。

基因工程技术的应用使发酵工程得到迅速发展,它使人们可以按照自己的意志,改良或创建微生物新种,从而生产出各种特定的微生物产品,或提高现有微生物产品的产量。自20世纪80年代以来,已有数百种基因工程产品相继问世,其中包括各种疫苗、单克隆抗体、免疫调节剂、激素、医疗中使用的酶和活性蛋白等自然微生物所不能生产的生物制品。

基因工程的研究、开发和应用首先集中在许多多肽或蛋白质的生化药物中,这是因为在历史上与医药有关的基础学科比较发达的缘故。目前,在医药方面的应用约占整个基因工程应用的60%左右。长期以来,困扰着医学界的一些疾病诊断、预防和治疗中有着重要价值的人体活性多肽(如激素、神经多肽、淋巴因子和凝血因子等),由于材料来源困难或技术方法问题而无法大量合成,只能勉强沿用传统技术从动物中提取,但由于原料来源短缺,制成品各批次质量参差不齐以及毒副作用较大等而限制其在临床上的应用。目前,通过重组DNA技术产生的工程菌已大量高效地合成出许多人体中的活性多肽,如干扰素、白介素、促红细胞生成素、人生长激素、集落刺激因子和胰岛素等,基因工程药物为人体战胜多种疑难疾病提供了有力的武器,也是国际医药工业发展的新的增长点,如单就A型干扰素而言,目前已有49个国家批准销售,年销售额约3亿美元,它可用于治疗十几种严重疾病,包括:肝炎、毛细胞性白血病、卡波济肉瘤、多发性骨髓瘤、外阴部疣、乳头瘤病、肾癌、髓细胞性白血病、膀胱癌、基底细胞癌、疱疹等。

现代生物技术特别是基因工程给发酵工程赋予新的生命力,但从培养液中将目标产物提取出来并加以纯化,并非易事。因为目标产物浓度低,有时还包括在细胞中。另外在工程菌的培养中,为了获得重组菌体,往往采用高密度培养。但在实际发酵过程中,通过研究高密度培养的工艺条件,获得高浓度的菌体,却得不到高浓度的目标产物。因为重组菌存在不稳定性,导入的嵌有外源基因的质粒容易从宿主细胞内脱落而使外源基因不表达。因此,除了在DNA重组过程中本身设法提高其在宿主内的稳定性以增加表达量外,还需要研究提高稳定性的培养工艺条件。

现代发酵工程产品种类不断增加,是方兴未艾的高新技术产业。今后利用发酵工程不但用来生产一些贵重或有特殊功效的药物,还在农业和化工原料的应用中显示巨大的潜力,另外利用现代发酵工程技术对传统的发酵工业进行改造将产生出巨大的经济效益。

纵观整个微生物发酵学即发酵工程的发展,从历史发展的角度来分析,发酵工程或称为微生物培养技术的发展主要表现为下面几个重要特点:①从少量培养发展到大规模培养;②从浅层培养发展到厚层(固体)或深层(液体)培养;③从以固体培养技术为主发展到以液体培养技术为主;④从静止式液体培养发展到通气搅拌式的液体培养;⑤从单批培养发展到连续培养以至多级连续培养;⑥从利用分散的微生物细胞发展到利用固定化的细胞集团;⑦从单纯利用微生物细胞到大量培养、利用高等动、植物细胞;⑧从单菌发酵发展到混菌发酵;⑨从利用野生菌种发酵发展到利用变异株以及“工程菌”的发酵等。

### 第三节 发酵工程的基本内容

#### 一、发酵工程的一般特征

发酵工程是有微生物参与的反应过程,这种反应过程是指由生长繁殖的生物物质所引起的生物反应过程。这些过程既有利用原有微生物特性获得某种产物的过程,又有利

用微生物消除某些物质(废水、废物的处理)的过程,但是它们都是活的微生物的反应过程。因此,其产物可以是代谢过程的中间或终点时的代谢产物,也可以是有有机物质的降解物或微生物自身的细胞。

发酵工程与化学工程非常接近,化学工程中许多单元操作在发酵工程中得到应用。国外许多学术机构把发酵工程作为化学工程的一个分支,称为“生化工程”。但由于发酵工程是培养和处理活的有机体,所以除了与化学工程有共性外还有它的特殊性。例如:空气除菌系统、培养基灭菌系统等都是发酵工程工业中所特有的。再如化学工程中,气液两相混合、吸收的设备,仅有通风和搅拌的作用,而通风机械搅拌发酵罐除了上述作用外,还包括复杂的氧化、还原、转化、水解、生物合成以及细胞的生长和分裂等作用,而且还有其严格的无菌要求,不能简单地与气体吸收设备完全等同起来。提取部分的单元操作虽然与化工中的单元操作无明显区别,但为适应菌体与微生物产物的特点,还要采取一些特殊措施并选用合适的设备。简言之,发酵工程就是化学工程中各有关单元操作结合了微生物特性的一门技术性学科。

### 1. 发酵工程的一般特征

与化学工程相比,发酵工程中微生物反应过程具有以下特点:

(1) 作为生物化学反应,通常在常温常压下进行,因此没有爆炸之类的危险,各种设备都不必考虑防爆问题,还有可能使一种设备具有多种用途。

(2) 原料通常以糖蜜、淀粉等碳水化合物为主,加入少量的各种有机或无机氮源,只要不含毒物,一般无精制的必要,微生物本身就有选择地摄取所需物质。

(3) 反应以生命体的自动调节方式进行,因此数十个反应过程能够像单一反应一样,在称为发酵罐的单一设备内很容易地进行。

(4) 能够容易地生产复杂的高分子化合物,是发酵工业最有特色的领域。

(5) 由于生命体特有的反应机制,能高度选择性地对复杂化合物在特定部位的氧化、还原、官能团导入等反应。

(6) 生产发酵产物的生物物质菌体本身也是发酵产物,富含维生素、蛋白质、酶等有用物质。因此,除特殊情况外,发酵液等一般对生物体无害。

(7) 发酵生产在操作上最需要的是防止杂菌污染。进行设备的冲洗、灭菌、空气过虑等,使全过程在无菌状态下运转,是非常重要的。一旦失败,就要遭受重大损失。特别是噬菌体对发酵的危害更大。

(8) 通过微生物的菌种改良,能够利用原有生产设备使生产飞跃上升。

### 2. 存在的问题

发酵过程的这些特征决定了发酵工程的种种优点,使得发酵工程成为生物工程的核心之一而受到了广泛重视。但是,发酵过程中也有一些问题应该引起特别的注意,例如:①底物不可能完全转化成目的产物,副产物的产生不可避免,因而造成了提取和精制困难,这是目前发酵行业下游操作落后的原因之一;②微生物的反应是活细胞的反应,产物的获得除受环境因素影响外,也受细胞内因素的影响,并且菌体易发生变异,实际控制相当困难;③原料是农副产品,虽然价廉,但质量和价格波动较大;④生产前准备工作量大,花费高,相对化学反应而言,反应器效率低;⑤与化工相比,虽然设备简单,能耗也低,但因过高的底物或产物浓度常导致酶的抑制或细胞不能耐受过高的渗透压而失活,因此,底物浓度不能过高,从而导致使用大体积的反应器,并且要在无杂菌污染情况下进行操作;⑥发酵废液常具有较高的COD(Chemical Oxygen Demand, 化学需氧量——即在一定的条件下,采用一定的强氧化剂处理水样时,所消耗的氧化剂

量。它是表示水中还原性物质多少的一个指标。)和 BOD (Biochemical Oxygen Demand, 有机污染物经微生物分解所消耗溶解氧的量), 在发酵过程中常常需要对这两个重要的条件进行调节控制。

## 二、发酵工程菌种的特点

发酵工程是以微生物的生命活动为基础的。自然界的微生物的种类繁多, 广泛分布于土壤、水和空气等自然界中, 尤以土壤中最多。有的从自然界分离出来就能利用, 有的需要对分离到的野生菌株进行人工诱变, 得到的突变体才能被利用。发酵工程利用的菌种趋势为由发酵菌转向转化菌; 由野生菌转向变异菌; 由自然选育转向代谢控制育种; 由诱发基因突变转向基因重组的定向育种。

尽管发酵工程的菌种类型多种多样, 但是从工业化生产对菌种的要求上来看, 发酵工程的菌种应具有下述特点: ①能在廉价原料制成的培养基上迅速生长, 并生成所需要的代谢产物, 产量高; ②可以在易于控制的培养条件下(糖浓度、温度、pH、溶解氧、渗透压等)迅速生长和发酵, 且所需的酶活力高; ③生长速度和反应速度较快, 发酵周期短; ④根据代谢控制的要求, 选择单产高的营养缺陷型突变菌株或调节突变菌株或野生菌株; ⑤选育抗噬菌体能力强的菌株, 使其不易感染噬菌体; ⑥菌种纯粹, 不易变异退化, 以保证发酵生产和产品质量的稳定性; ⑦菌种不是病原菌, 不产生任何有害的生物活性物质和毒素(包括抗生素、激素、毒素等), 以保证安全。

## 三、发酵工程中常见发酵罐的类型

发酵罐是发酵工程中常用设备中最重要、应用最广泛的设备, 可以说发酵罐是整个发酵工业的心脏。

发酵罐的定义是指为特定一种或多种微生物所进行的生长代谢过程提供良好环境的容器。对于某些工艺来说, 发酵罐是个密闭容器, 同时附带精密控制系统; 而对于另一些简单的工艺来说, 发酵罐只是个开口容器, 有时甚至简单到只要有一个开口的空间环境就可进行发酵。

### (一) 工业发酵常用设备发展史

发酵罐伴随着微生物发酵工业的发展已经历了近 300 年的历史。英国学者 Stanbury (1984) 把工业发酵的发展过程分为 5 个阶段, 而发酵罐的发展同样经历了这些阶段。①第一阶段是 1900 年以前, 早在 17 世纪人们已用木制容器来发酵得乙醇和酒。那时的发酵罐是现代发酵罐的雏形, 它带有简单的温度和热交换仪器。18 世纪中叶开始进行酵母发酵生产, 发酵罐随之进一步完善; ②第二阶段是 1900~1940 年, 出现了 20m<sup>3</sup> 的钢制发酵罐, 在面包酵母发酵罐中开始使用空气分布器, 机械搅拌开始用在小型的发酵罐中; ③第三阶段是 1940~1960 年, 第一个大规模工业生产青霉素的工厂于 1944 年 1 月 30 日在美国的 Terre Haute 投产, 其发酵罐体积是 54m<sup>3</sup> (Callaham, 1944)。以青霉素为代表的抗生素工业的兴起引起工业发酵的一场变革, 机械搅拌、通风、无菌操作和纯种培养等一系列技术开始完善, 许多技术和装备一直沿用至今。发酵工艺过程的参数检测和控制方面已出现耐蒸汽灭菌的在线连续测定的 pH 电极和溶氧电极, 计算机开始进行发酵过程的控制。发酵产品的分离和纯化设备逐步实现商品化; ④第四阶段是 1960~1979 年。机械搅拌通风发酵罐的容积增大到 80~150m<sup>3</sup>。由于大规模生产单细胞蛋白的需要, 又出现了压力循环和压力喷射型的发酵罐, 它们可以克服一些气体交换和热交换问题。ICI (英国帝国化工公司, Imperial Chemical Industries) 的 1500m<sup>3</sup> 压力循环发酵罐可连续发酵 100 天而不染菌 (Smith, 1981)。计算机开始在

发酵工业上得到广泛应用；⑤第五阶段是1979年至今。由于生物工程和生物技术的迅猛的发展，给发酵工业提出了新的要求。于是，大规模细胞培养发酵罐应运而生，胰岛素、干扰素等基因工程的产品大量生产，为造福人类健康事业做出了新的贡献。

发酵罐与其他工业设备的突出差别是对纯种培养有着很高的要求，几乎达到十分苛刻的程度。工艺操作上的任何一点疏忽都会给企业造成不可挽回的巨大损失。因此，发酵罐的严密性，运行过程中所要求的高度可靠性是发酵工业设备的显著特点。同时，现代发酵工业为了获得更大的经济利益，发酵罐更加趋向大型化和自动化方向发展。例如，废水处理  $27\,000\text{m}^3$ ；单细胞蛋白  $1500\text{m}^3$ ；啤酒  $320\text{m}^3$ ；柠檬酸  $200\text{m}^3$ ；面包酵母  $200\text{m}^3$ ；抗生素  $200\text{m}^3$ ；干酪  $20\text{m}^3$ ；酸乳酪  $10\text{m}^3$ 。

在发酵罐的自动化方面，目前正在利用计算机控制整个发酵过程。作为参数检测的重要手段如 pH 电极、溶解氧电极、溶解二氧化碳电极等在线检测已相当成熟和先进。

随着生物工程尤其是基因工程的迅速发展，特别是环保方面的迫切需要，使发酵罐的结构操作原理和方法等都发生了很大的变化，就连术语“发酵罐”也常常代之以“生化反应器”。尽管如此，发酵工业上最常用的还是通风搅拌发酵罐。除了通风搅拌发酵罐外，其他形式的发酵罐如气升式发酵罐、压力循环发酵罐、带超滤膜的发酵罐等在工业上也有着广泛的应用。

发酵工程提供的生物工程产品很多，它们的生产工艺流程比较相似，所用的典型发酵设备有：种子制备设备、主发酵设备、辅助设备（无菌空气和培养基的制备）、发酵液预处理设备、粗产品的提取设备、产品精制与干燥设备、流出物回收、利用和处理设备等。

## （二）发酵罐的类型和特征

### 1. 发酵罐的分类

各种不同类型的发酵罐都可用于大规模的生物反应过程，它们在设计、制造和操作方面的精密程度，取决于某一产品的生物化学过程对发酵罐的要求。发酵罐的分类有以下几种。

（1）按微生物生长代谢需要分类。这种分类将发酵罐分为好氧的和厌氧的二大类。抗生素、酶制剂、酵母、氨基酸、维生素等产品都是在好氧发酵罐中进行；而丙酮-丁醇、酒精、啤酒、乳酸等采用厌氧发酵罐。它们的主要差别是由于对无菌空气的需求不同，前者需要强烈的通风搅拌，目的是提高氧在发酵液中的传质系数  $K_L a$ ；后者则不需要通气。

（2）按照发酵罐设备特点分类。可以分为机械搅拌通风发酵罐和非机械搅拌通风发酵罐。前者包括循环式、非循环式的通风式发酵罐以及自吸式发酵罐等。后者包括循环式的气升式、塔式发酵罐，以及非循环式的排管式和喷射式发酵罐。这两类发酵罐是采用不同的方式使发酵罐内的气、固、液三相充分混合，从而满足微生物生长和产物形成对氧的需求。

（3）按容积分类。一般认为  $1\sim 50\text{L}$  的是实验室发酵罐； $50\sim 5000\text{L}$  是中试发酵罐； $5000\text{L}$  以上是生产规模的发酵罐。

（4）按微生物生长环境分类。发酵罐内存在两种系统，即悬浮生长系统和支持生长系统。一般来说，大多数发酵罐都含有这两种系统。在悬浮生长系统中微生物细胞是浸没在培养液中，且伴随着培养液一起流动。在支持生长系统中，微生物细胞生长在与培养液接触的界面上，形成一层薄膜。然而实际上悬浮生长系统的容器内壁上和上部的罐壁上也会生长着一层菌体膜；在支持生长系统中也有菌体分散在培养液之中。

（5）按操作方式分类。可分为分批发酵和连续发酵。要特别注意的是，不是所有的

发酵罐都可以同时适用于这两种发酵系统。分批发酵时，发酵工艺条件随着营养液的消耗和产物的形成而变化。每批发酵过程结束，要放罐、清洗和重新灭菌，再开始新一轮的发酵。分批发酵系统是非稳定态的过程。连续发酵时，新鲜营养液连续流加入发酵罐内，同时，产物连续地流出发酵罐。分批发酵的主要优点是污染杂菌的比例小，操作灵活性强，可用来进行几种不同产品的生产。其缺点是发酵罐的非生产停留时间所占比重重大，非稳定态工艺过程的设计和操作困难。连续发酵的主要优点是可连续运行几个月的时间，非生产时间短；缺点是容易染菌。它适用于不易染菌的产品如丙酮-丁醇发酵、酒精、啤酒发酵等。

(6) 其他类型。一种新型的超滤发酵罐已开始工业发酵中得到应用，在运行时，成熟的发酵液通过一个超滤膜使产物能透过膜进行提取，酶可以通过管道返回发酵罐继续发酵，新鲜的底物可源源不断地加入罐内。

### 2. 发酵罐的基本特征

发酵罐是现代发酵工程中重要的设备，是微生物进行发酵的重要场所。为使微生物发挥最大的生产效率，现代发酵工程所使用的发酵罐应具有下面重要的特征：①发酵罐应有适宜的径高比。罐身较长，氧的利用率较高；②发酵罐应能承受一定的压力。因为发酵罐在灭菌和正常工作时，要承受一定的压力（气压和液压）和温度；③发酵罐的搅拌通风装置能使气液充分混合，实现传质传热作用，保证微生物发酵过程中所需的溶解氧；④发酵罐内应尽量减少死角，避免藏污积垢，保证灭菌彻底，防止染菌；⑤发酵罐应具有足够的冷却面积；⑥搅拌器的轴封要严密，以减少泄漏。

### 3. 发酵罐设计原则

发酵罐的主要功能是为菌体生长，或为某一特定的微生物混合发酵剂提供一个便于控制的环境，从而获得人们所期望的产物。在设计和制造发酵罐时，应该考虑到以下原则：①发酵罐应在无菌条件下工作数天，且应在长时间运转过程中保持稳定；②通气和充分搅拌，以满足微生物代谢的需要，但不应损伤菌体；③尽可能低的功率消耗；④发酵罐上应配备有温度和 pH 检测系统以及采样装置系统；⑤发酵罐内的蒸发损失不应太多；⑥在放料、清洗和维修等操作过程中具有最低的劳动力消耗；⑦发酵罐应有较好的适应性，以满足不同生产厂家的需求；⑧发酵罐内表面应该光滑，而且尽可能的采用焊接而不是用法兰来连接；⑨用于中试规模的发酵罐与用于实际生产的发酵罐应具有相同的几何形状，有利于放大生产；⑩使用既能满足工艺要求又比较便宜的制造材料，同时应配备完善的供给设施（表 1-1）。

表 1-1 发酵工厂供给设施

供给设施项目	供给设施项目	供给设施项目
压缩空气	蒸汽冷凝液	发酵器控制和监测设备
无菌压缩空气 (1.5~3.0atm)	电	维修设备
冷却水 (12~15℃)	立式发电机	萃取和回收设备
冷却水 (4℃)	排污系统	材料运输附属设备
热水	电动机	
蒸汽 (高压蒸汽)	培养基贮藏设备	

### (三) 常见的工业发酵罐类型

#### 1. 机械搅拌通气发酵罐

##### 1) 机械搅拌通气发酵罐

(1) 机械搅拌通气发酵罐。这种发酵罐是指发酵工厂最常用的通气发酵罐，也称为通用式发酵罐，它是利用机械搅拌器的作用使通入的无菌空气和发酵液充分混合，促使氧在发酵液中溶解，满足微生物生长繁殖和发酵所需要的氧气，同时强化热量的传递。主要部件包括罐体、搅拌器、挡板、轴封、空气分布器、传动装置、冷却装置、消泡器、视镜等（图 1-9，图 1-10）。

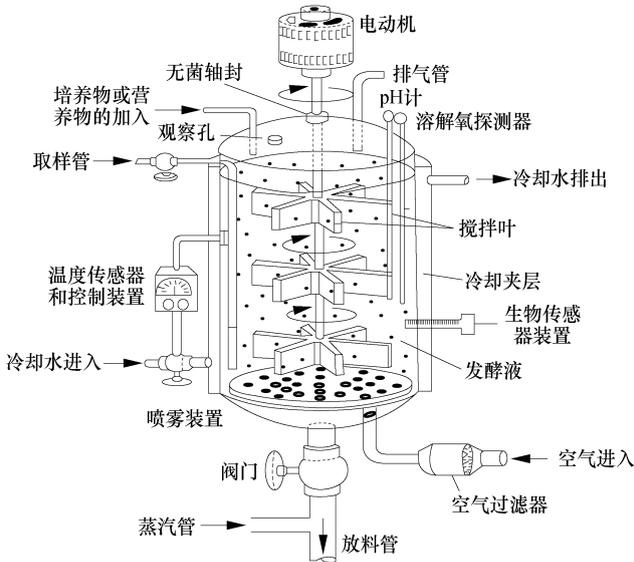


图 1-9 发酵工业中使用的大型通气搅拌发酵罐示意图

(2) 通用型机械搅拌通气发酵罐特点。这种发酵罐是发酵工业最常用的发酵装置，多用于抗生素、维生素、氨基酸、酶类的生产。呈圆筒状，罐高/罐径多为 1.0~3.0m，通入的空气经分布管进入罐内。搅拌多为平桨式和涡轮式，一般可分为上段或下段两层。为了改善空气在罐内的混合状态，罐内装有挡板，在罐内上部装有消泡桨。为降低发酵罐温，在罐内装有冷却排管，罐外装有冷却罐套（图 1-9，图 1-10）。

(3) 存在的不足。这种通用型发酵罐也存在一些不足：①不同种类的培养物在培养过程中产生剧烈的泡沫占据了罐内有效容积，因此要增加消泡剂用量；②搅拌需要较大的动力，罐体越大，消耗动力也越大。这不仅耗能，而且还涉及搅拌结构功能、轴封的严密程度等一系列问题；③内部结构复杂，罐体不易洗净，增加了杂菌污染机会；④搅拌的剪切作用容易损伤放线菌、霉菌的菌体，有可能降低产率。为了补救上述缺陷，人们曾研究了提高氧的移动率、形成高的通气量等方法，确保微生物的正常生长。

(4) 通用型发酵罐的常规大小。标准式或通用型发酵罐是既有机械搅拌，又有压缩空气分布装置的发酵罐，其容积从几升到几百上千立方米的都有，常见的尺寸如下（图 1-11，图 1-12）：

$$\frac{H}{D} = 1.7 \sim 4 \quad \frac{d}{D} = 1/2 \sim 1/3 \quad \frac{W}{D} = 1/8 \sim 1/12 \quad \frac{B}{D} = 0.8 \sim 1.0$$

$$\left[ \frac{s}{d} \right]_2 = 1.5 \sim 2.5 \quad \left[ \frac{s}{d} \right]_3 = 1 \sim 2$$

式中， $H$ ——发酵罐筒身高度，m；  
 $D$ ——发酵罐内径，m；  
 $d$ ——搅拌器直径，m；  
 $W$ ——挡板的宽度，m；  
 $B$ ——下搅拌桨距底部的间距，m；  
 $s$ ——两搅拌桨的间距，m。

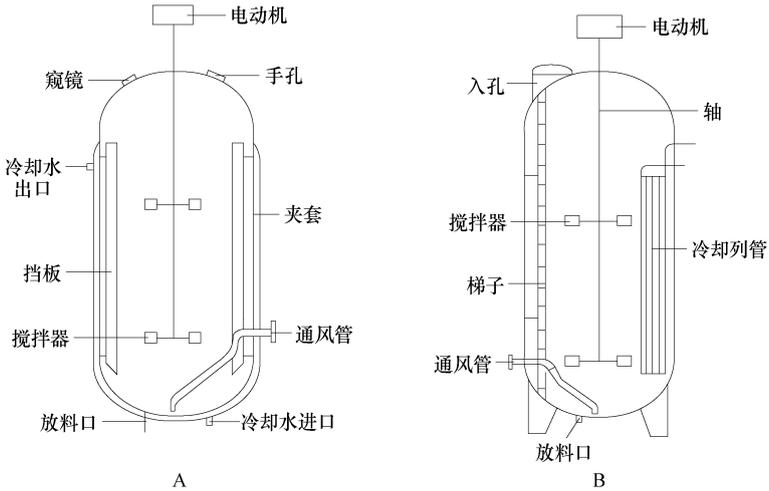


图 1-10 通用式发酵罐  
 A. 夹套传热；B. 蛇管传热

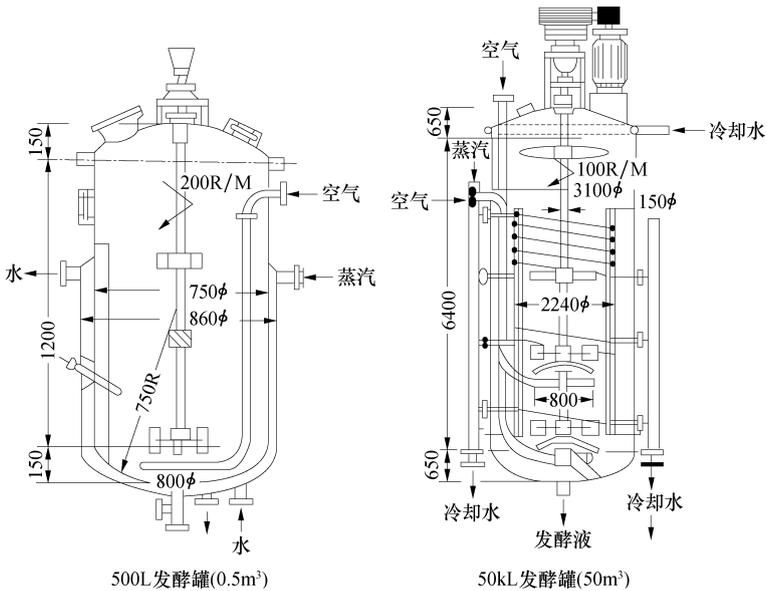


图 1-11 常见 500L、500kL 通气搅拌发酵罐工艺尺寸