

NAU



南京农业大学
NANJING AGRICULTURAL UNIVERSITY

发酵工程

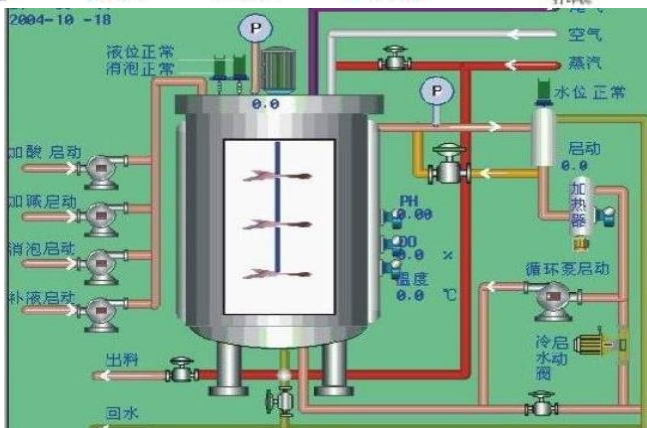
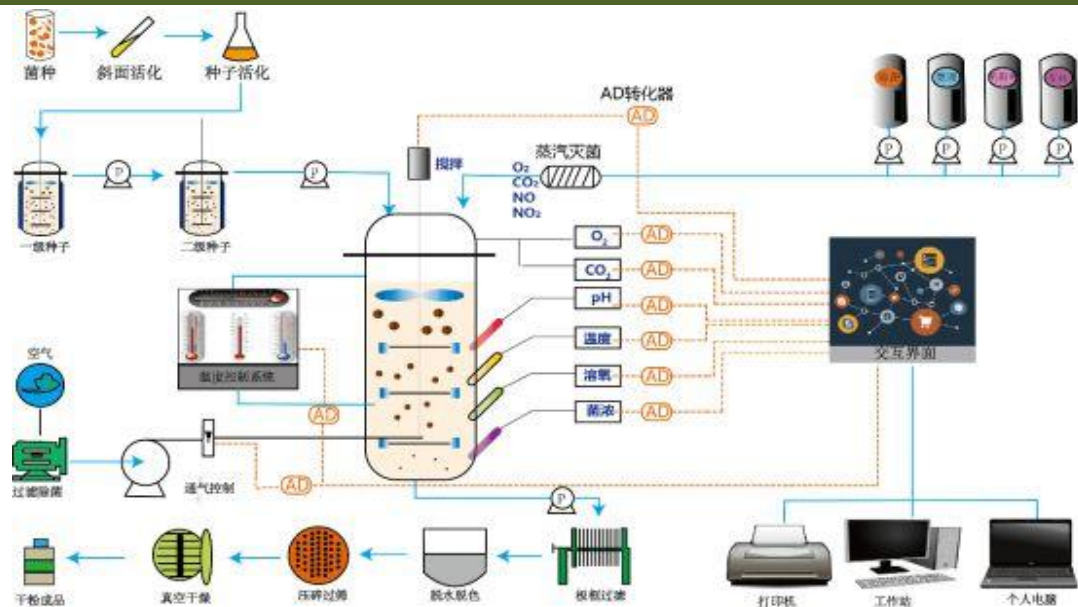


主讲人：陈晓红

电 话：13951009867

E-mail: xhchen@njau.edu.cn

发酵工程



- **主讲教师：**

陈晓红 副教授

xhchen@njau.edu.cn, 13951009867

- **课程荣誉：**

2002年11月，首批江苏省二类优秀课程

2002年10月，首批南农大优秀课程

2003年06月，校重点课程

2006年06月，校精品课程

2009年12月，江苏省精品课程

- **课程网站：**

<http://jpkc.njau.edu.cn/zymosis>

第一章 绪论

- ❧一、什么是发酵、酿造？
- ❧二、发酵工程的组成和特征
- ❧三、发酵技术的微生物技术发展史
- ❧四、发酵工业的工程技术发展史
- ❧五、发酵工业的研究对象
- ❧六、发酵工业的特点
- ❧七、发酵的类型和一般工艺
- ❧八、发酵与生物技术关系
- ❧九、发酵工程中的常用技术
- ❧十、发酵技术发展趋势及研究热点

- 发酵已经从过去简单的生产酒精类饮料、生产醋酸和发酵面包发展到今天成为生物工程的一个极其重要的分支，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一个多学科工程。
- 现代发酵工程不但生产酒精类饮料、醋酸和面包，而且生产胰岛素、干扰素、生长激素、抗生素和疫苗等多种医疗保健药物，生产天然杀虫剂、细菌肥料和微生物除草剂等农用生产资料，在化学工业上生产氨基酸、香料、生物高分子、酶以及维生素和单细胞蛋白等。

一、什么是发酵、酿造

- 发酵的英文Fermentation是从拉丁语ferver即“翻腾”、“沸涌”、“发泡”而来；因为发酵有鼓泡和类似翻腾、沸涌的现象。如中国的黄酒、欧洲的beer就以起泡现象作为判断发酵进程的标志。
- 根据以往的观念，人们通常把食品发酵作为整个发酵工业的分支。

1、发酵及发酵工业

- **狭义**——厌氧微生物或兼性厌氧微生物在无氧条件下进行能量代谢并获得能量的一种方式。
- **广义**——通过微生物的培养使某种特定代谢产物或菌体本身大量积累的过程。
- **发酵工业**：（巴斯德）是指利用生物的生命活动产生的酶，无机或有机原料进行酶加工，获得产品的工业。往往经纯种培养和提炼精制过程,产品成分单纯、无风味要求。如酒精、抗生素、柠檬酸、氨基酸、酶、维生素、某些色素等。

2、酿造(brewing)和酿造工业

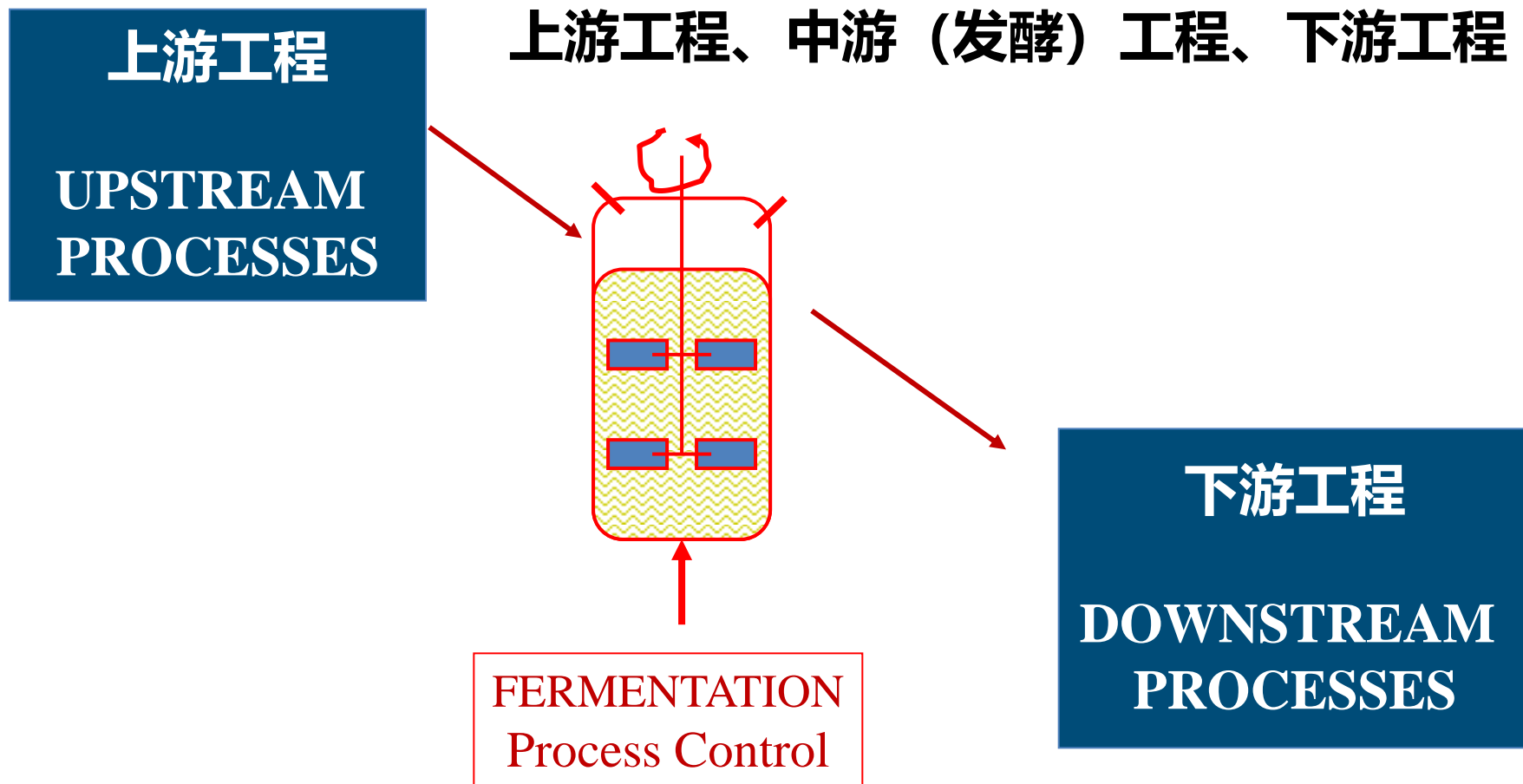
- **酿造(brewing)**: 我国人们对一些特定产品发酵生产的特殊称法，是未知的混合微生物区系参与的一种自然发酵。
- **酿造工业**: 经自然培养、不需提炼精制、产品由复杂成分构成并对风味有特殊要求的食品或调味品的生产过程。如黄酒、白酒、清酒、葡萄酒、酱油、醋、腐乳、豆豉、面酱等。

Fermentation engineering

二、发酵工程的组成

从广义上讲，由三部分组成：

上游工程、中游（发酵）工程、下游工程

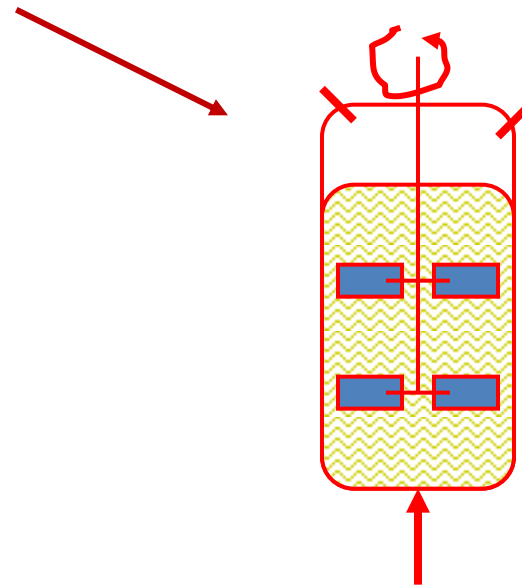


Fermentation engineering

上游工程

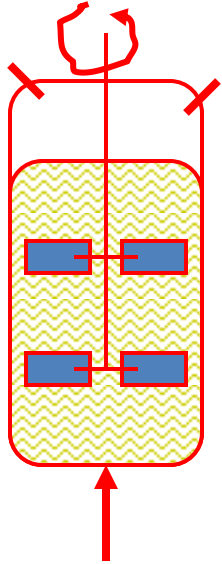
UPSTREAM PROCESSES

- genetics, cell ...
- inoculum development
- media formulation
- sterilization
- inoculation



FERMENTATION
Process Control

Fermentation engineering



FERMENTATION
Process Control

下游工程

DOWNSTREAM PROCESSES

- product extraction, purification & assay
- waste treatment
- by product recovery

发酵生产的工业特征

(1) 严格的无菌生长环境：

发酵开始前对发酵原料和发酵罐以及各种连接管道的**灭菌技术**；

发酵过程中不断向发酵罐中通入干燥无菌空气的**空气过滤技术**；

(2) 发酵过程中应用计算机控制技术进行在线数据采集和控制;

(3) 种子培养和生产培养的不同的工艺技术;

(4) 需建立大规模动态发酵过程中各参数变化的动力学模型;

(5) 存在发酵过程工艺放大问题。

发酵微生物的菌种特征

- 发酵工程所利用的微生物主要是细菌、放线菌、酵母菌和霉菌

利用微生物的特点：

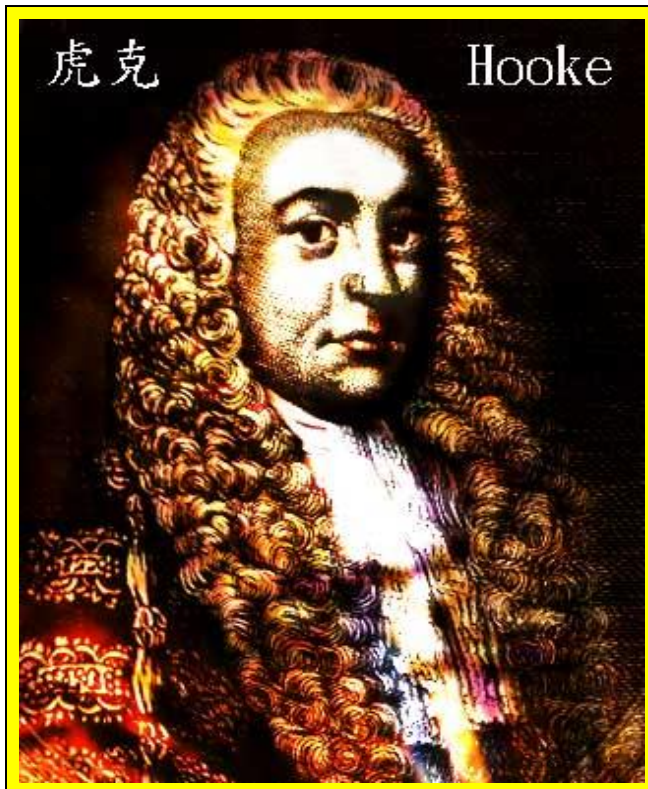
- (1)对周围环境（温度、压强、渗透压、酸碱度等）条件有极大的适应能力
- (2)有极强的消化能力
- (3)有极强的繁殖能力

三、发酵工业的微生物技术发展史

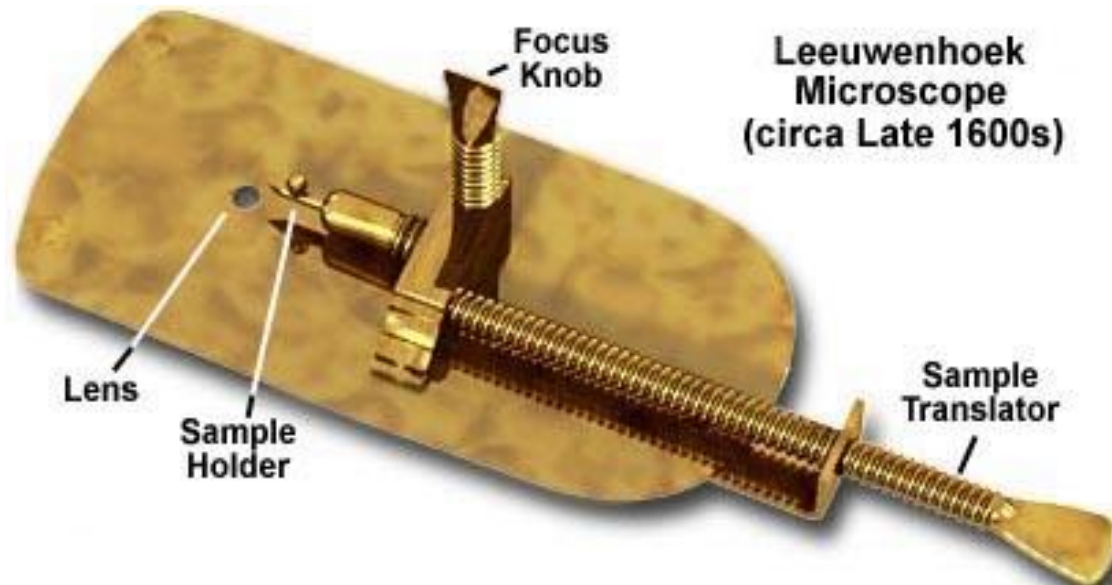
- ★ 1676年列文虎克 (Leewenhoch)
- ★ 1836—1837年Larkutzing (酵母细胞结构)
- ★ 1856—1857年Pasteur (微生物引起发酵)
- ★ 1870年Pasteur (拮抗作用)
- ★ 1880年科赫 (Robert Koch)
- ★ 1897年, Buchner (布赫纳)
- ★ 1928年, Fleming
- ★ 1940年, Florery和Chain
1945年, 抗生素工业

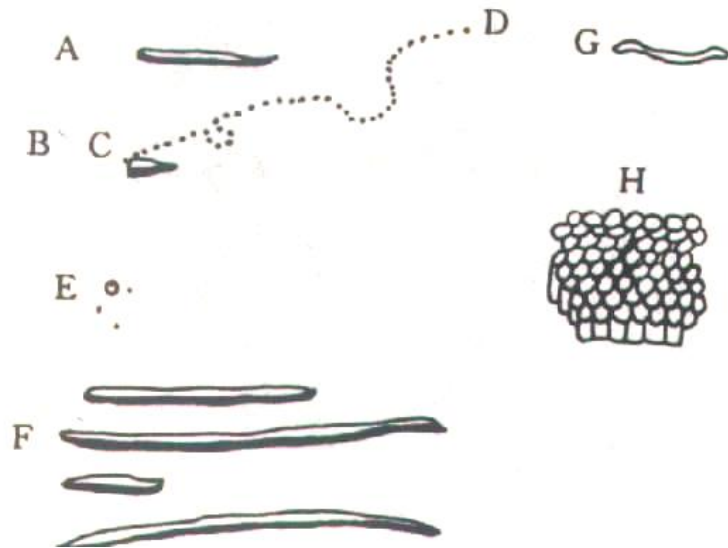
列文虎克 (Leewenhoch, 1632-1723)

——1、微生物形态学发展阶段

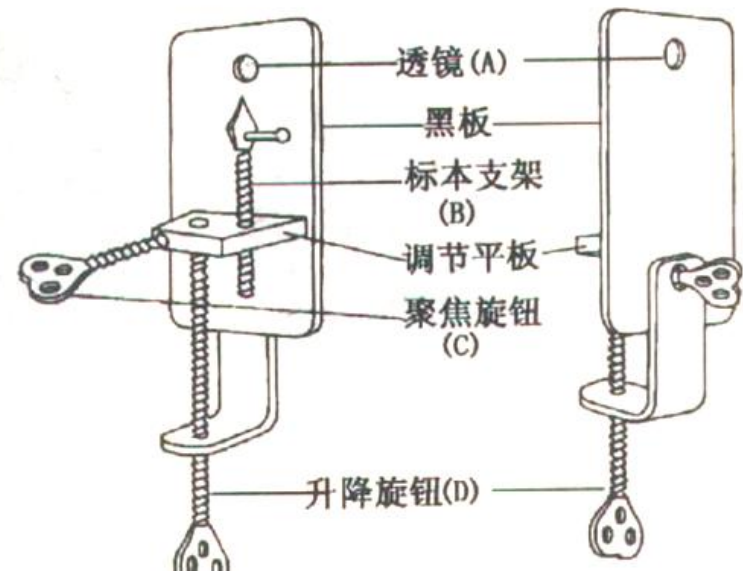


- ❖ **荷兰业余科学家**, 1676年, 用自磨镜片创造了一架能放大 266倍的原始显微镜 一生制作了 419台显微镜;
- ❖ **发表论文** 400余篇, 375 篇寄往英国皇家学会发表。





❖ Anthnoy van Leeuwenhoek 1684年寄给皇家协会信的部分内容



Anthnoy van Leeuwenhoek与他的显微镜

Larkutzing

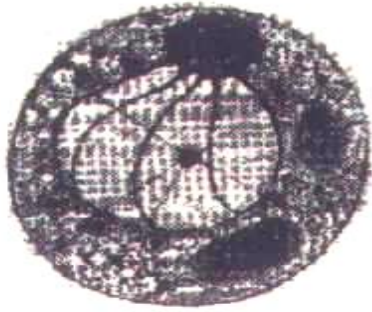
❖ 1836-1837年Larkutzing发现在啤酒的发酵中**存在活的生物体**，但并未发现发酵与微生物的关系。



(a)



(b)



(c)



酵母菌细胞结构

2、微生物生理学发展阶段

生理学发展阶段代表人物和重要事件

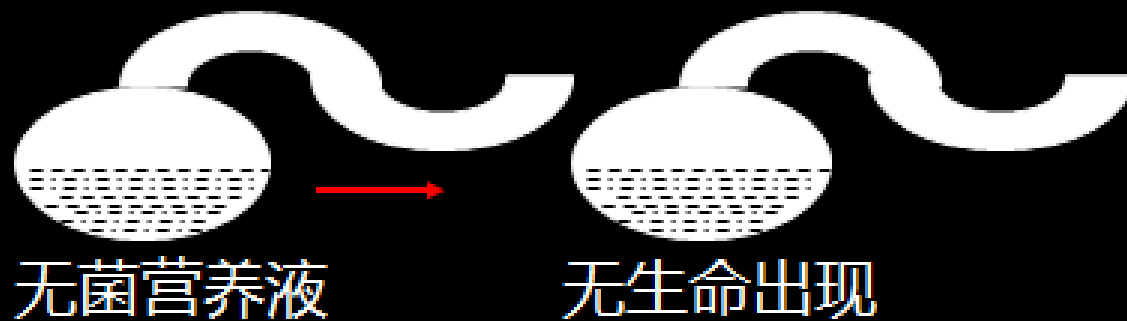
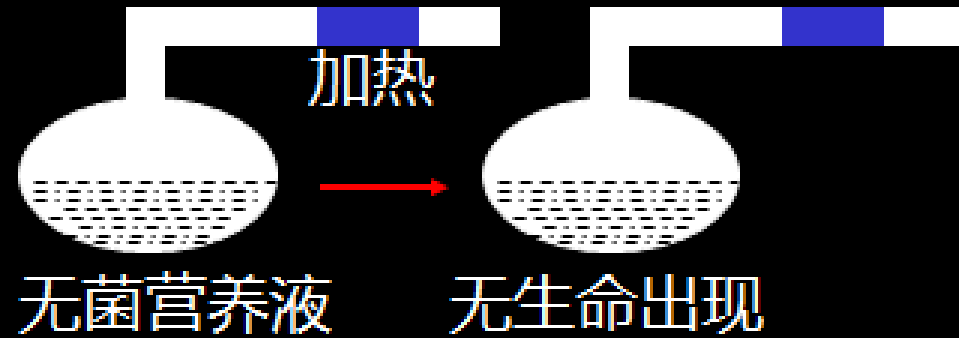
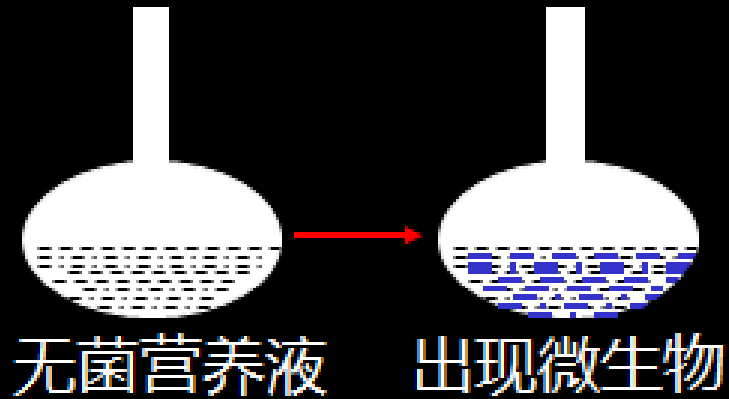
- ◆ 细菌学 (巴斯德、科赫)
 - ◆ 外科消毒术 (Lister, 1865) 和乳酸菌的分离
 - ◆ 根瘤菌等土壤微生物的研究 (M·W贝, C H维)
 - ◆ 无酵母菌压汁酶功能的发现 (E.Buchner,1897)
 - ◆ 化学药剂抗生素发现和临床应用 (1909-1935)
 - ◆ 酿造技术日趋完美
-



巴斯德的功绩

- ★ 彻底否定了自然发生说
- ★ 证实发酵由微生物引起
- ★ 免疫学—预防接种
- ★ 发明巴氏消毒法

巴斯德的 雁颈瓶实验

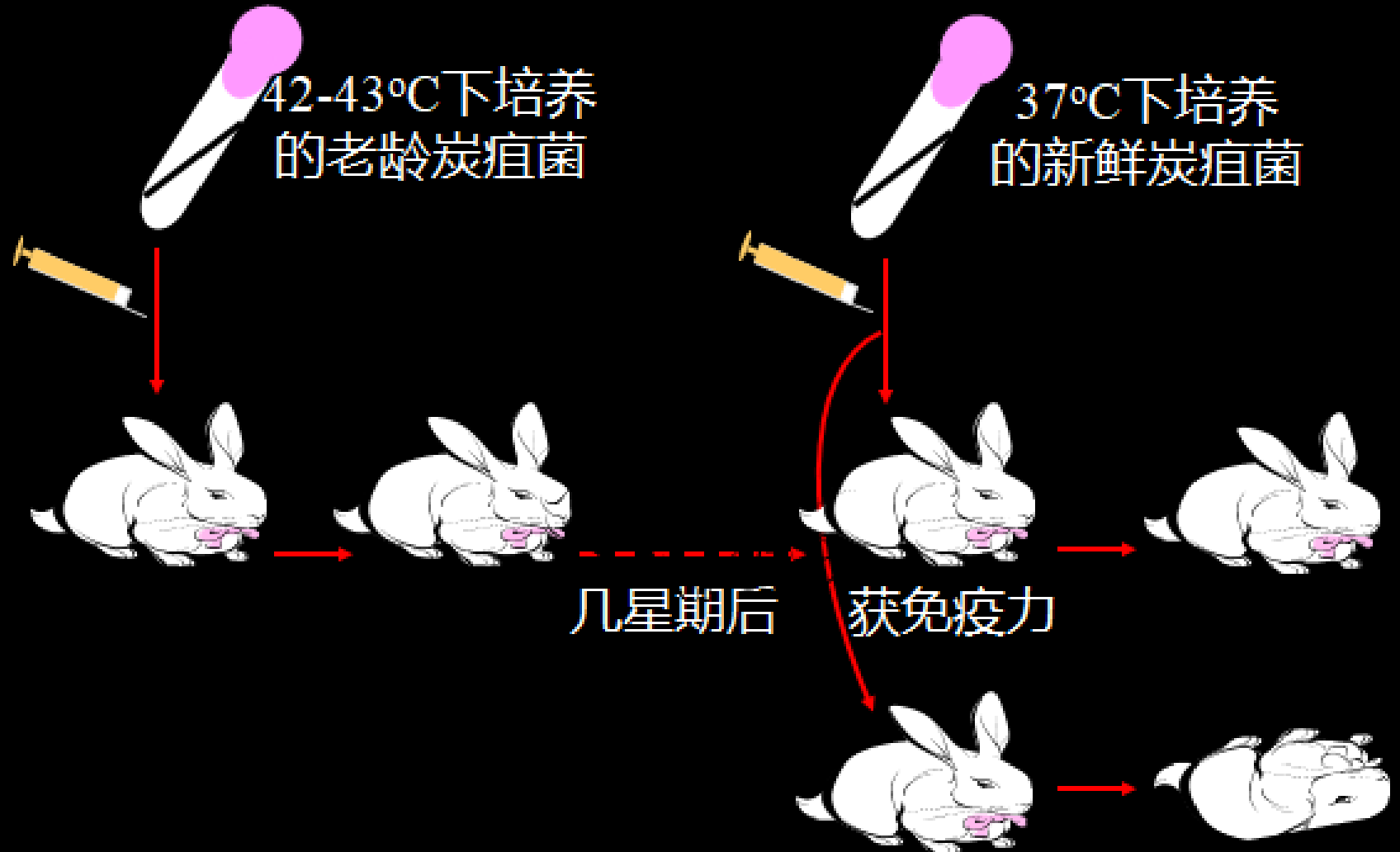


结论

1. 发酵是由微生物进行的一种化学变化，不同类型的发酵是由形态可以区别的各种特殊的微生物所引起的。
2. 1870年，Pasteur发现了微生物之间有相互抑制的作用，即拮抗作用。
3. 其间1804年，法国厨师阿卑特（Appert）发明了瓶装罐头）



巴斯德在实验室工作



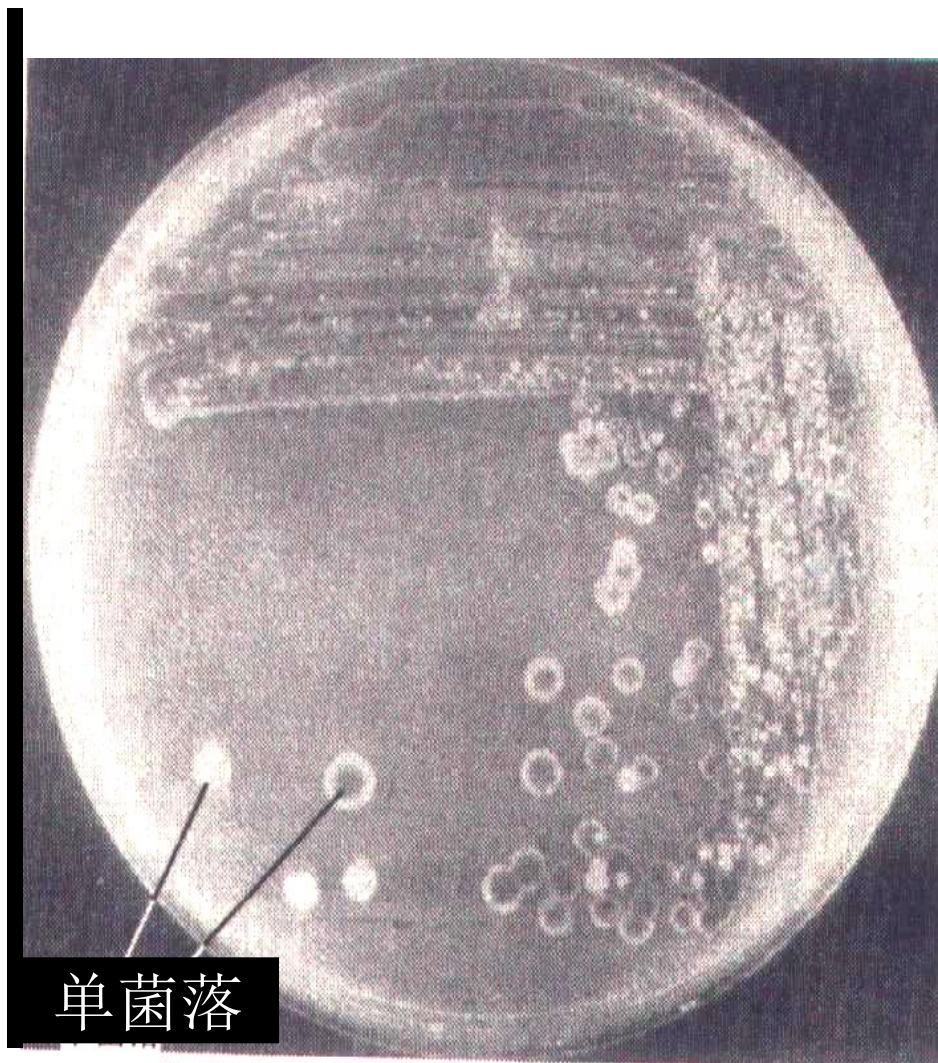
巴斯德发现免疫现象↑**动物实验**↓**人体实验**

病犬延髓 (几代减毒)→被疯狗严重咬伤的9岁男童

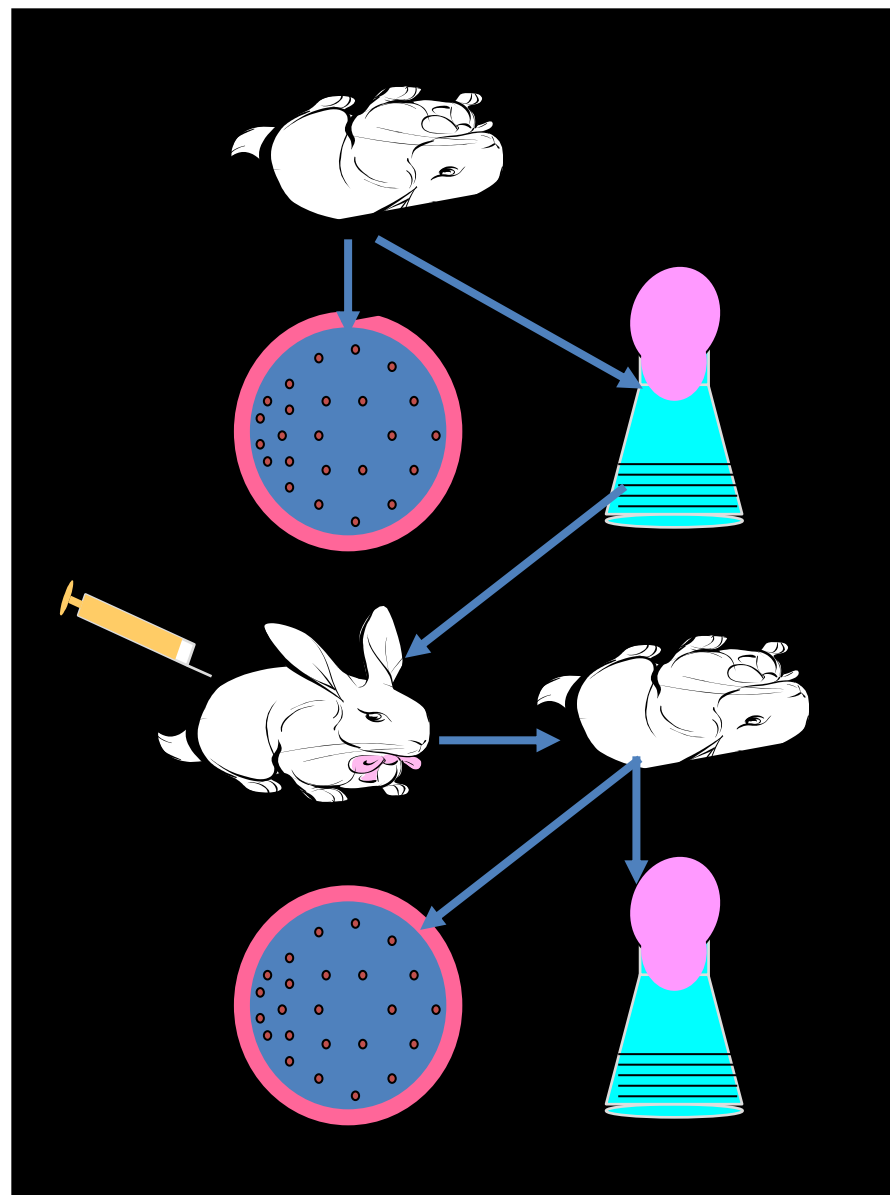


科赫的功绩

- ◆ 发明培养基并用其纯化微生物等一系列研究方法的创立
- ◆ 证实炭疽病因 — 炭疽杆菌发现结核病原菌—结核杆菌
- ◆ 科赫法则



划线法获得单菌落



科赫定理图示

结论

- 1880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。
- 建立了研究的微生物一系列方法，把早年在马铃薯块上的培养技术改为**明胶平板**（1881）和 **琼脂平板**（1882）
- 显微镜技术：包括细菌鞭毛在内的许多**染色方法、悬滴培养法以及显微摄影技术**。
- 利用平板分离方法找到并分离许多传染病的**病原菌**（炭疽、结核、链球菌）
- 1884年提出了**科赫法则**（Koch's postulates）：病原微生物存在与病体而非健康体；可纯培养；纯培养物接种后染病；可重新分离再培养。



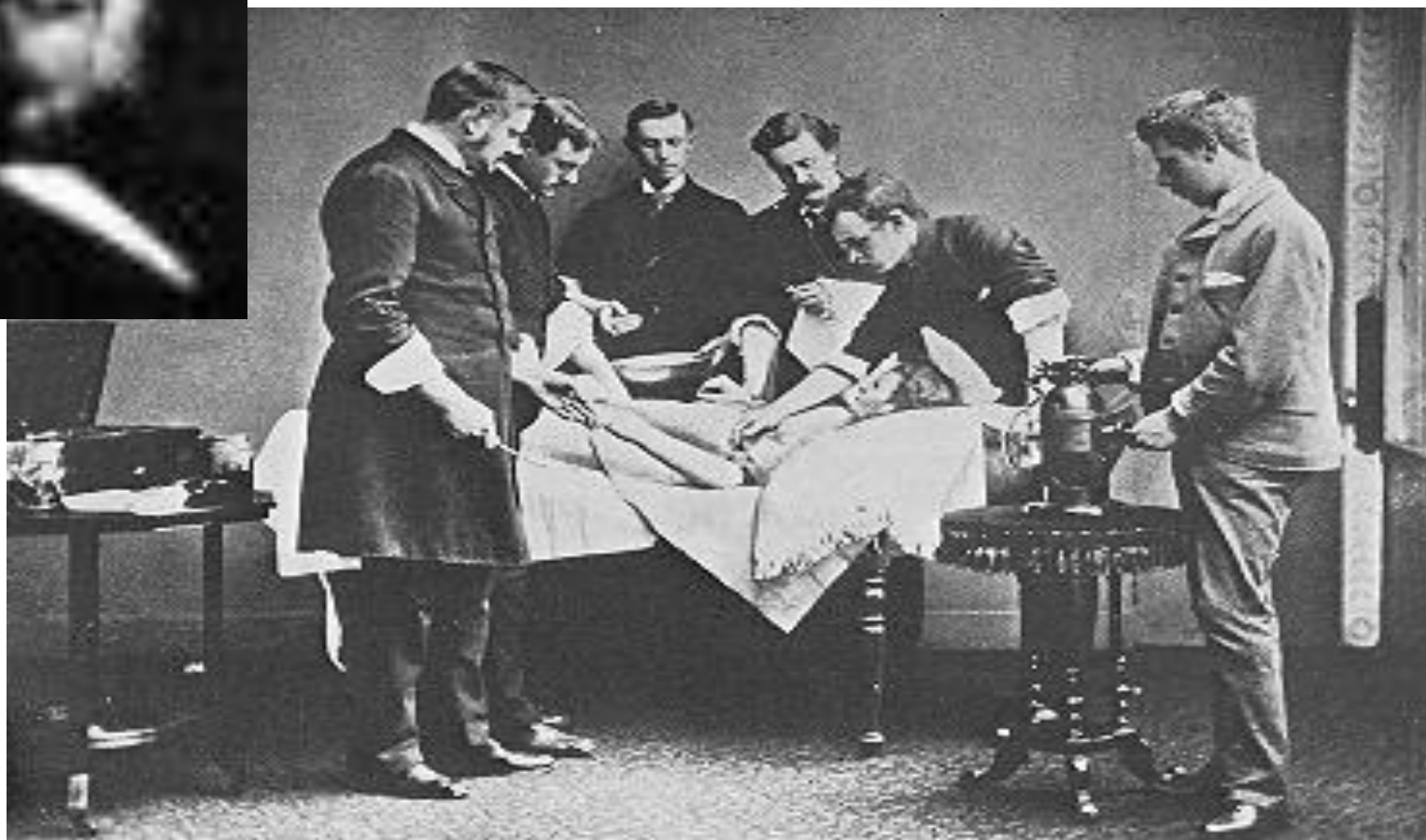
巴斯德 路易斯
(1822-1895)
微生物奠基人

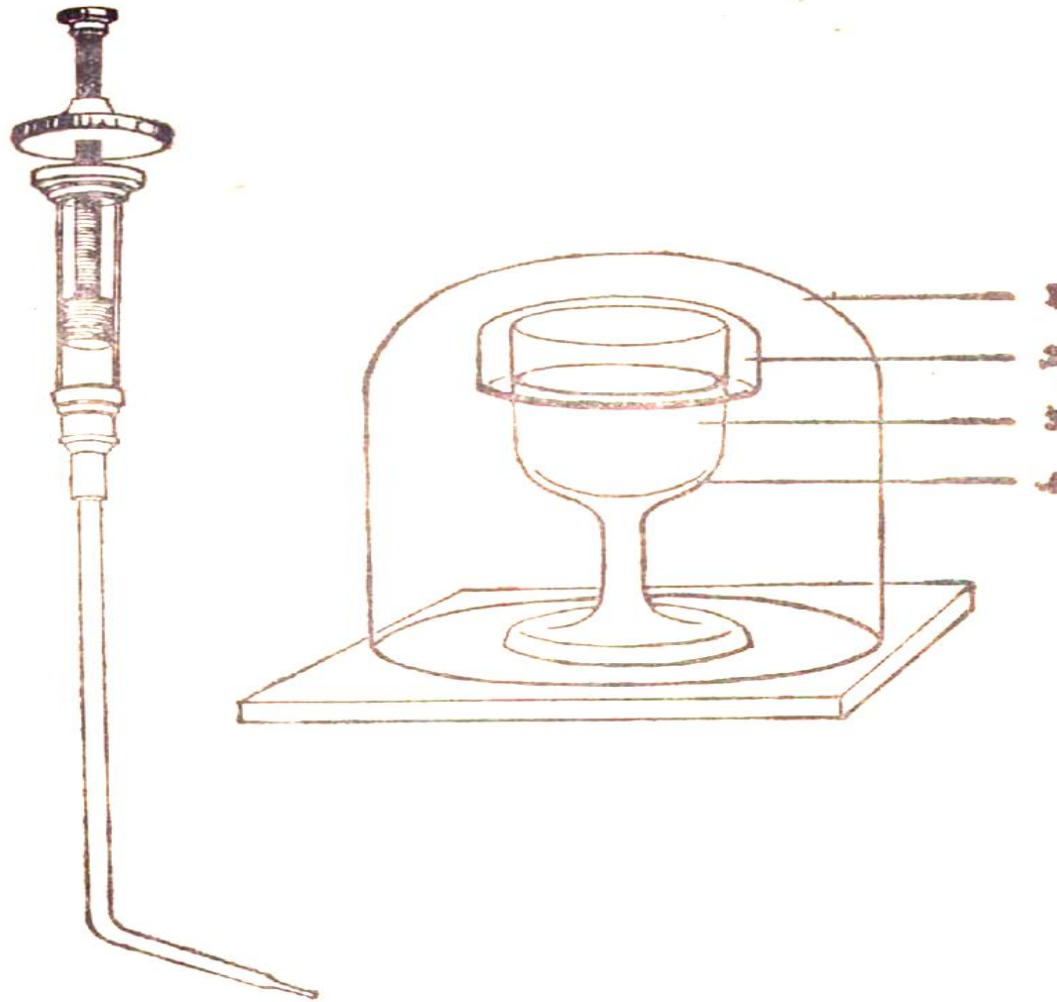


Koch, robert
(1843-1910)
细菌学奠基人



(Joseph Lister, 1827~1912) 首创用石炭酸喷洒手术室和煮沸手术用具以防术后感染，为防腐、消毒，以及无菌操作奠定了基础。





1878年，李斯特分离乳酸链球菌时用注射器和酒杯培养装置

Buchner (布赫纳)

1897年, Buchner (布赫纳) 阐明了发酵的化学本质。即发酵是由酶引起的一类化学反应。

**实验: 酵母菌细胞用石英砂磨碎制成酵母汁 (应用于医学) + 白砂糖 (防腐) 意外发现发酵
这是无生物细胞体系发酵的最初例子。**

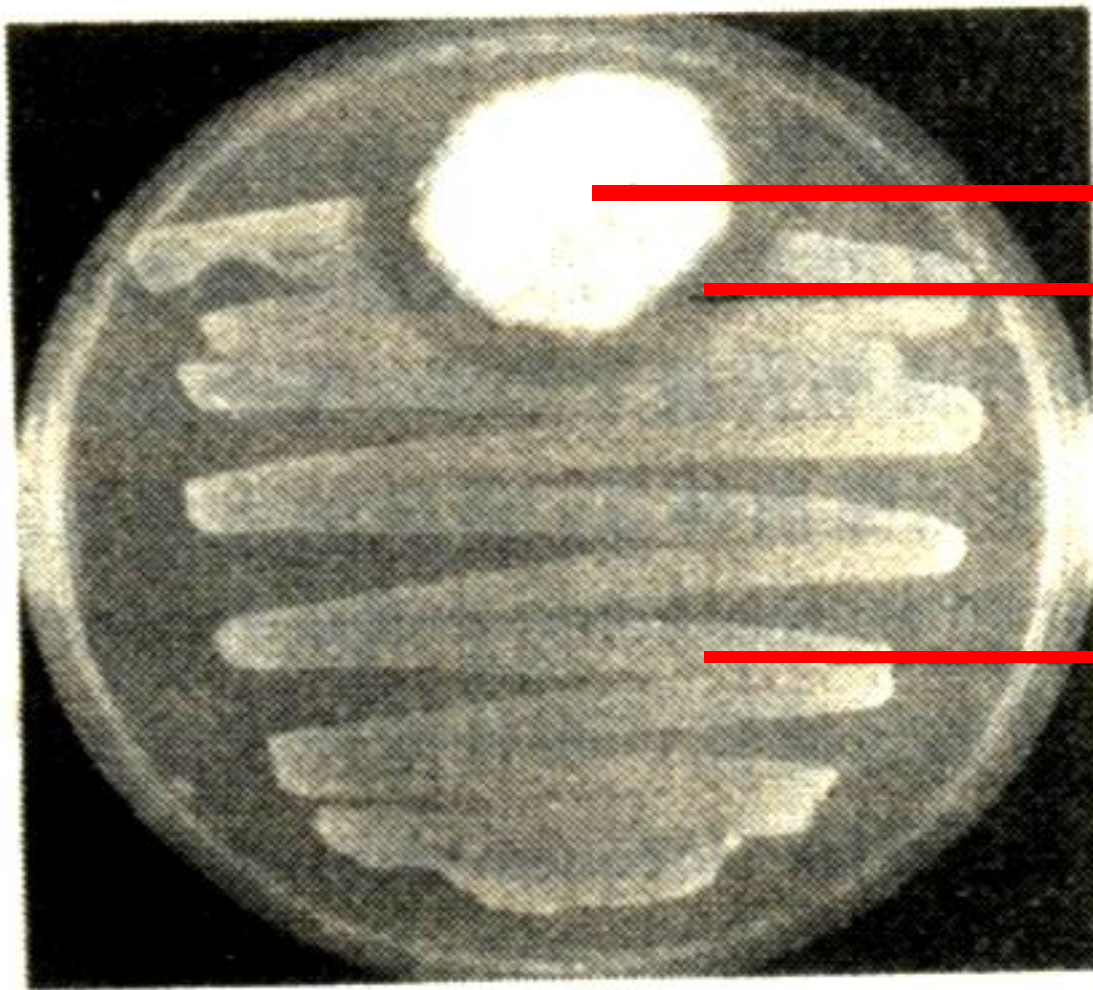


Fleming



1928年，Fleming将其
命名为：青霉素

1928 年 ，
Fleming 发现
了青霉素，开
创了好气性发
酵工程，建立
了通风搅拌技
术。



产黄青霉菌落

细菌生长
抑制区域

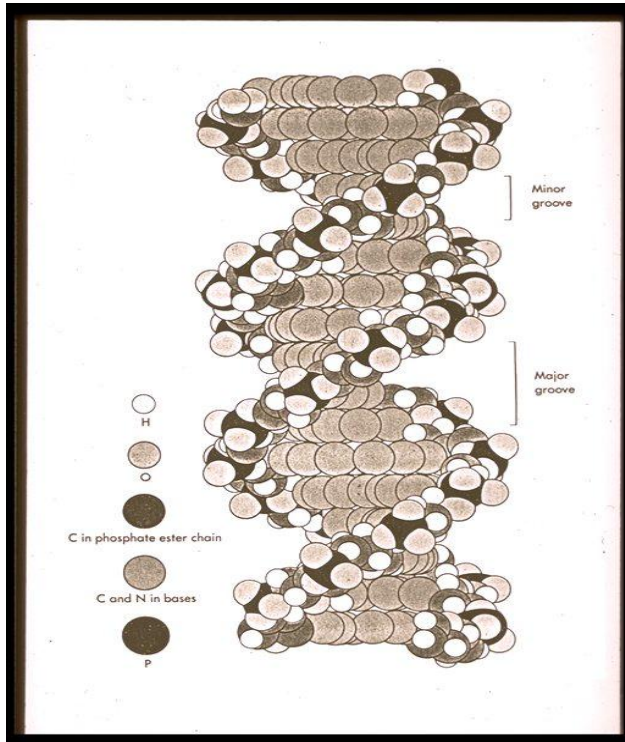
正常细菌
生长区域

霉菌菌落周围出现葡萄球菌生长的抑制现象
——[抗生素的发现](#)

Florery和Chain

- ❖ 1940年, **Florery和Chain**:
- ❖ 碘黄青霉基中得到了纯品青霉素, 继而放线菌——链霉素, 金、土、卡那、红、新、庆大……等相继发现。
- ❖ 1984年达9000多种。
- ❖ 1945年, 抗生素工业 (发酵工业正式兴起)

Watson 和 Crick



❖ 1956年，**Watson** 和 **Crick**发现DNA双螺旋结构，
为微生物遗传学及育种技术的研究带来极大发展。

分子生物学发展阶段（成熟期）特点

- ◆ 微生物学成为十分热门的前沿基础学科
- ◆ 微生物成为生物学研究中的最主要对象
- ◆ 生物工程中，发酵工程是最成熟的应用技术



氨基酸生产菌种

- ❖ 1956年，日本的土下祝郎利用发酵法制造出了Glu。
- ❖ 至今22种氨基酸用发酵法生产，其中18种直接发酵，4种用酶转化法生产。

四、发酵工业的工程技术发展史

第一个转折点——微生物纯种分离培养技术建立实现了微生物发酵的人工可控

- ❖ **自然发酵时期：知其然而不知其所以然，如厌气性——酒类，好气性——醋。**
- ❖ **微生物纯种分离培养技术，开创了人为控制微生物时代，减少了腐败现象，实现了无菌操作；发明了简便的密封式发酵罐；人工控制条件，提高发酵效率，稳定产品质量。**



第二个转折点

——通气搅拌的好氧发酵工程技术建立（深层液态发酵）

- 20世纪40年代，由于二战暴发，刺激了抗生素发酵工业的兴起，成功建立起深层通气培养法及整套工艺，包括向发酵罐内通入大量无菌空气、通过搅拌使空气分布均匀、培养基的灭菌和无菌接种、通氧量、pH、培养物供给等均已解决，刺激了有机酸、酶制剂、维生素、激素等的大规模生产。



第三个转折点

——人工诱变育种和代谢控制发酵工程技术的建立

❖ 以动态生物化学和遗传学为基础，将微生物进行人工诱变，选育高产菌株，实现有选择地大量生产目的产物。该技术先在氨基酸生产上获得成功，而后在核苷酸、有机酸、抗生素等其它产品中得到应用。

第四个转折点

——发酵动力学、发酵的连续化自动化工程技术的建立

发酵罐的大型化、多样化、连续化和自动化方面有了极大发展。发酵过程的基本参数包括T、Ph、罐压、溶O₂、Eh、空气流量、泡沫、CO₂含量等均可自动记录和控制。（在线测试探头等）

——发酵与酿造技术的第四个转折点

第五个转折点

——微生物生物合成和化学反应合成相结合工程技术的建立

针对单纯发酵法的缺陷，利用发酵法生产前体，
用化学合成法得到终产品或反之。如
Amino法生产酱油。

——发酵与酿造技术的第五个转折点

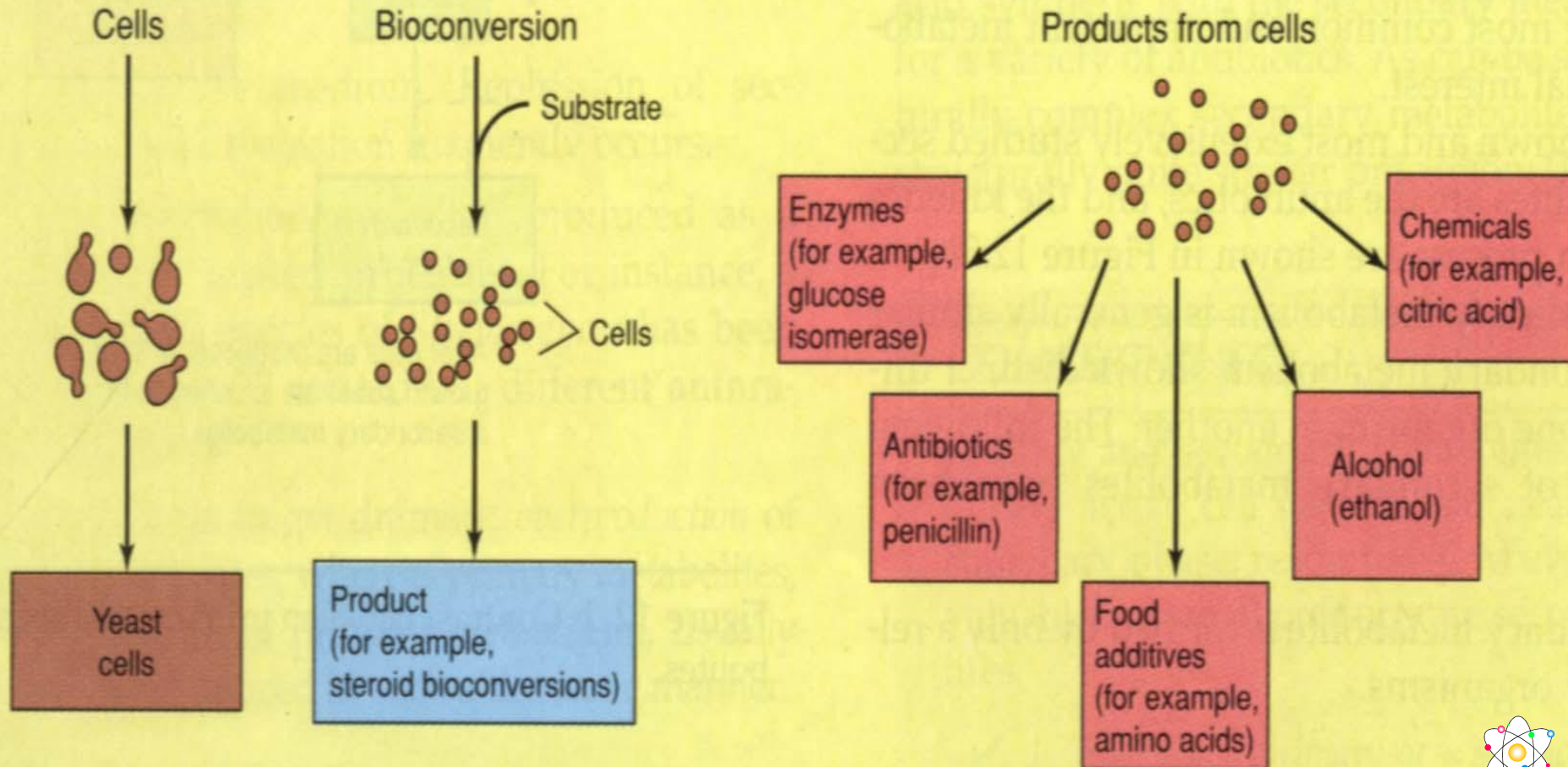
DNA重组技术

- ❖ **DNA重组技术大大推动了发酵与酿造技术的发展**
- ❖ **细胞融合技术：基因体外重组与克隆的工程菌株构建**
- ❖ **生物反应器：生化反应发生的场所（反应罐等设备、昆虫躯体、动物细胞乳腺、植物细胞的根茎果实）。**

五、发酵工业的研究对象

1、按微生物发酵产物分：

微生物细胞，酶，药物活性物质，特殊化学物质和食品添加剂



发酵生产微生物细胞

- **定义：** 是以获得具有多种用途的微生物菌体细胞为目的的产品的发酵工业，包括单细胞的酵母和藻类、担子菌，生物防治的苏云金杆菌以及人、畜防治疾病用的疫苗等。
- **特点：** 细胞的生长与产物积累成平行关系，生长速率最大时期也是产物合成速率最高阶段，生长稳定期产量最高。

发酵生产微生物酶

- **酶的特点：**易于工业化生产，便于改善工艺提高产量。
- **分类：**胞内酶 和胞外酶
- **生物合成特点：**需要诱导作用，或受阻遏、抑制等调控作用的影响，在菌种选育、培养基配制以及发酵条件等方面需给予注意。

发酵生产微生物代谢产物

❖ **代谢产物发酵：** 产品包括初级代谢产物、中间代谢产物、次级代谢产物。

1、初级代谢产物： 微生物生长不同阶段产生不同的代谢产物，对数生长期形成的产物往往是细胞自身生长所必需的，如氨基酸、核苷酸、蛋白质、脂类、糖类等。

2、次级代谢产物： 微生物细胞生长进入稳定期，有些微生物合成的在对数生长期不能合成的、对细胞代谢没有明显意义但具有明显优势的化合物。

微生物的生物转化

- **定义：是利用生物细胞对一些化合物某一特定部位（基团）的作用，使它转变成结构相类似但具有更大经济价值的化合物。**
- **最终产物是由微生物细胞的酶或酶系对底物某一特定部位进行化学反应而形成的。**

微生物特殊机能的利用

- 利用微生物消除环境污染（活性污泥）
- 利用微生物发酵保持生态平衡
- 微生物湿法冶金
- 利用基因工程菌株开拓发酵工程新领域
- 微生物能源

发酵工业的研究对象

2、按产业部门来分：

- ◆ 酿酒工业
- ◆ 传统酿造工业（调味品酿造）
- ◆ 有机酸发酵工业
- ◆ 酶制剂发酵工业：淀粉酶中95%以上为霉菌、细菌淀粉酶
- ◆ 氨基酸发酵工业
- ◆ 功能性食品生产工业：低聚糖、真菌多糖、红曲等
- ◆ 食品添加剂生产工业：黄原胶、海藻糖
- ◆ 菌体制造工业：单细胞蛋白、酵母等
- ◆ 维生素发酵工业：Vc、VB2、VB12
- ◆ 核苷酸发酵工业：ATP、IMP、GMP

六、发酵工业的特点

与化学工业相比

ॐ 安全简单

ॐ 原料广泛

ॐ 反应专一

ॐ 代谢多样

ॐ 易受污染

ॐ 菌种选育

七、发酵工艺的类型和一般工艺

❖ 按发酵基质的物理性质分：

❖ **固态发酵** (SSF, Solid State Fermentation)

是指在没有或几乎没有游离水的不流动基质上培养微生物的过程，此基质称为“**醅**”。

❖ **液态发酵** (LSF, Liquid State Fermentation 或 Liquid Submerge Fermentation)

发酵基质是流动状态，称为发酵“**液**”。

❖ **半固态发酵** (Semi---SSF)

发酵基质是流动状态，原料颗粒悬浮于液体中。基质呈流动状态，称为“**醪**”。

七、发酵工艺的类型和一般工艺

在现代发酵工业中，往往把**固态发酵、半固态发酵**称为**传统发酵工业**（酿造），而把**液态发酵**称为**现代发酵工业**（液态深层发酵），适合大规模生产及现代化调控。

七、发酵工艺的类型和一般工艺

❖ 按参与发酵的微生物种类分：

❖ **单菌发酵** (Monoculture Fermentation)

- ❖ 只有一种微生物对产品的形成是必需的，如：beer, Natto, TemPeh, 抗生素，柠檬酸发酵等。
- ❖ 西方多为之，对于霉菌较为恐惧，多用细菌。

❖ **混菌发酵** (Polyculture Fermentation)

- ❖ 指采用两种或两种以上的已知或未知的微生物进行的发酵。
- ❖ 已知：酸奶等。
- ❖ 未知：酒曲等。

七、发酵工艺的类型和一般工艺

❖ 其它分类法：

- ❖ **按原料分：**糖类发酵、蛋白质发酵、石油发酵。
- ❖ **按产品分（工业上常用）：**氨基酸发酵、有机酸发酵、核苷酸发酵、酒精发酵、维生素发酵、抗生素发酵等。
- ❖ **按对氧气需求分：**厌氧发酵、需氧发酵。
- ❖ **按发酵操作分：**分批式、连续式、流加式。

按发酵操作的分类

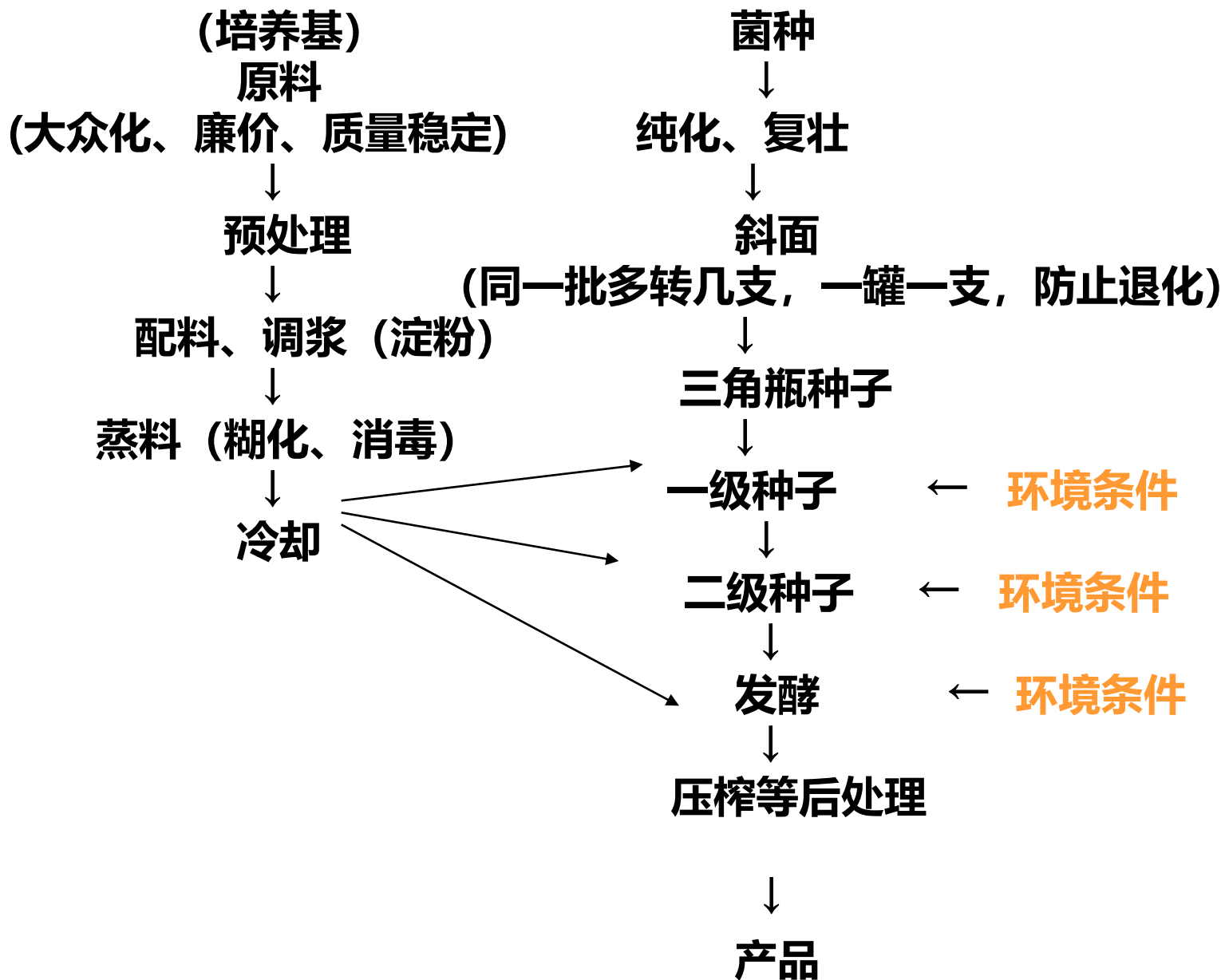
- **分批发酵**：在灭菌后的培养基中接入生产菌，而后不再向发酵液加入或移出任何物质（需氧微生物则需加氧）的培养方式。
- **连续发酵**：是一个开放系统，通过连续流加新鲜培养基并以同样的流量连续地排出发酵液，可使微生物细胞群体保持稳定的生长环境和生长状态，并以发酵中的各个变量多能达到恒定值而区别于瞬变状态的分批发酵。
- **分批补料（流加）发酵**：介于前两者之间，在分批发酵的前提下，连续地或按一定规律地向系统内补入营养物，补的可以是单一营养物也可能是多种营养物，到一定时候，便进行排料但并不排完，留 $1/3$ 至 $2/3$ ，然后再补料，重复上述操作。

七、发酵工艺的类型和一般工艺

发酵尽管有固、液及其它类型之分，但其原理、机理是相同的。在总体的工艺上也都涉及三个主要要素的处理。

俗称“发酵三条路”：

- 1、菌种**
- 2、环境条件**
- 3、培养基**



例：啤酒酵母种子制备

(兼性厌氧的细菌和酵母的液态扩培)

斜面原种 → 10mL试管, 10-12度麦芽汁5mL
(**25 °C**, 24-36h) → 250mL三角瓶, 10-12度
麦芽汁50mL (**25 °C**, 24-36h) → 3L三角瓶,
10-12度麦芽汁500mL (**20 °C**, 24-36h) → 20L
卡氏罐, 10-12度**酒花麦芽汁**10L (**15-18 °C**, 24-
36h) → 200L密闭罐, 10-12度酒花麦芽汁100L
(**10 -15°C**, 24-36h) → 1.5-2.0立方酵母罐 (**8 -
10°C**, 24-36h → 发酵罐 (**6-8 °C**发酵)

例：液体摇瓶种子制备

(好氧的细菌和霉菌菌丝体的液态扩培)

斜面原种 → 液态或固态活化 (液体试管、斜面) → 250mL三角瓶扩培 (往复式、振荡式摇床) → 1L三角瓶扩培 (往复式、振荡式摇床) → 一级种子罐 (好氧) → 二级种子罐 (好氧) → 发酵罐 (好氧)

例：孢子悬浮液制备及 产孢子丝状真菌液体扩培

斜面原种 → 固态活化（试管斜面） → 茄子
瓶扩培（孢子房，温度、湿度控制） → 孢子
悬浮液制备 → 一级种子罐（好氧） →
二级种子罐（好氧） → 发酵罐（好氧）

例：产孢子的丝状真菌固态扩培 (制曲——看视频)

斜面原种 ——> 固态活化（试管斜面） ——> 茄子瓶扩培（孢子房，温度、湿度控制） ——> 三角瓶曲种培养 ——> 种曲房种曲培养 ——> 曲的培养 ——> 固态接种发酵

八、发酵与现代生物技术的关系

- ❖ **生物技术的四大技术体系之一**
- ❖ **发酵技术的两大核心：**
 - ❖ **生物催化剂（其最有效、稳定、方便的生物催化剂形式是整体生物细胞，目前最广泛采用的是微生物细胞）**
 - ❖ **生物反应系统**

九、发酵工程中常用技术

- **微生物技术**

制片染色和显微技术、无菌操作技术、菌种分离和培养技术、合成培养基技术、育种技术、深层液态发酵技术、菌种保藏技术

- **化学技术**

发酵过程分析、产物分离技术、提取精制技术

十、发酵工程发展趋势及研究热点

- ❖ 利用育种技术有选择地创造物种（新型微生物资源）
- ❖ 发酵剂高密度培养和剂型制备技术，固定化酶和固定化细胞的生产和应用
- ❖ 生物传感器的研究与设计，发酵与酿造的在线监测和过程控制技术
- ❖ 大规模的连续发酵工艺的建设和优化
- ❖ 传统固态发酵技术的标准化、现代化（如固态发酵丝状真菌的生物量变化、均相和均一性）
- ❖ 菌种安全性评价技术革新和新资源认证