



# 四川轻化工大学课程实施大纲

课程名称：发酵制药学

---

授课班级：生物制药 2020 级

---

任课教师：刘忠渊，胡楠

---

工作部门：化学工程学院

---

联系方式：18281368117（67208）

18883243756

---

四川轻化工大学 制

2023 年 2 月

# 《发酵制药学》课程实施大纲

## 基本信息

课程代码：16551002

课程名称：发酵制药学

学 分：2

总 学 时：32

学 期：2022-2023 第 2 学期

上课时间：1-8 周

上课地点：N1-421

答疑时间和方式：当面答疑、电子邮件、QQ、电话

答疑地点：N1-421，N1S-519

授课班级：生物制药 2020 级

任课教师：刘忠渊，胡楠

学 院：化学工程学院

邮 箱：lzy1168@163.com

联系电话：18281368117(67208)

18883243756

# 目 录

1. 教学理念.....	1
2. 课程介绍.....	3
2.1 课程的性质	
2.2 课程在学科专业结构中的地位、作用	
2.3 课程的历史与传统文化	
2.4 课程的前沿及发展趋势	
2.5 课程与经济社会发展的关系	
2.6 学习本课程的必要性	
3. 教师简介.....	6
3.1 教师的职称、学历	
3.2 教育背景	
3.3 研究兴趣（方向）	
4. 先修课程.....	6
5. 课程目标.....	7
6. 课程内容.....	7
6.1 课程的内容概要	
6.2 教学重点、难点	
6.3 学时安排	
7.课程实施.....	9
7.1 教学单元一	

7.1.1 教学日期	
7.1.2 教学目标	
7.1.3 教学内容（含重点、难点）	
7.1.4 教学过程	
7.1.5 教学方法	
7.1.6 作业安排及课后反思	
7.1.7 课前准备情况及其他相关特殊要求	
7.1.8 参考资料（具体到哪一章节或页码）	
7.2 教学单元二	
7.2.1 教学日期	
7.2.2 教学目标	
7.2.3 教学内容（含重点、难点）	
7.2.4 教学过程	
7.2.5 教学方法	
7.2.6 作业安排及课后反思	
7.2.7 课前准备情况及其他相关特殊要求	
7.2.8 参考资料（具体到哪一章节或页码）	
.....	
<b>8. 课程要求.....</b>	<b>113</b>
8.1 学生自学要求	
8.2 课外阅读要求	
8.3 课堂讨论要求	

8.4 课程实践要求	
<b>9. 课程考核</b>	<b>114</b>
9.1 出勤（迟到、早退等）、作业、报告等的要求	
9.2 成绩的构成与评分规则说明	
9.3 考试形式及说明	
<b>10. 学术诚信</b>	<b>115</b>
10.1 考试违规与作弊处理	
10.2 杜撰数据、信息处理等	
10.3 学术剽窃处理等	
<b>11. 课堂规范</b>	<b>115</b>
11.1 课堂纪律	
11.2 课堂礼仪	
<b>12. 课程资源</b>	<b>116</b>
12.1 教材与参考书	
12.2 专业学术著作	
12.3 网络课程资源	
<b>13. 教学合约</b>	<b>117</b>
13.1 教师作出师德师风承诺	
13.2 阅读课程实施大纲，理解其内容	
13.3 同意遵守课程实施大纲中阐述的标准和期望	
<b>14. 其他说明</b>	<b>117</b>

## 1. 教学理念

### 1.1 以学生为本

学生始终是教学过程的主体。在课堂教学的过程中，教师需关注学生的全面发展，将学生的个人职业发展作为教学的重中之重。作为生物制药专业的本科毕业生，经过 4 年的大学本科教育后，大多数将会进入制药相关的行业，成为我国医药事业建设中的一员，因此学生的全面发展不仅与其自身的职业发展密切相关，而且会影响整个医药行业的发展。作为大学教师，需要给予学生的不仅仅是专业知识和技能，培养其综合分析能力，使其在毕业后能够在相关领域有所建树，成就个人的同时，更好地为社会服务。

### 1.2 注重教学效果

《发酵制药学》是生物制药专业的一门专业核心课程，是在学习了微生物学、生物化学、化工原理和分析化学等基础知识后开设的一门专业必修课程。由于发酵工程是整个生物技术的核心，是工业微生物实现实验室与工厂化生产的具体操作，是生物技术在生产实践中应用的原理及方法的一部分，是基因工程及酶工程等生物制药技术工业化的过程与方法。通过对发酵制药学的学习，不仅掌握发酵制药工程原理及发酵优化控制过程，而且对系统了解生物技术及其工业化应用都具有深远的意义。通过本课程的教学，使学生全面掌握发酵制药的原理与应用，熟悉现代发酵制药的发展方向，为学生今后从事与发酵制药工业相关的生产、研究和开发打下良好的理论与技术基础。

在课堂上，教师除了传授专业知识外，还有更重要的一环，那就是要培养学生的综合学习能力、分析问题能力、解决问题能力等。从长远来看，大学本科毕业的学生在专业道路上明显要比专科毕业的学生走得更远，这必然与大学本科教育注重综合能力的培养密切相关。针对这一问题，作为专业课的教师，除了在授课过程中向学生传授理论知识，对学生的综合能力产生潜移默化的影响外；还应有针对性地设计一些相应的教学环

节，例如：增加当今研究热点或发酵制药实践中具体案例的分析；引导学生针对具体应用中遇到的问题，查阅资料，分析问题产生的原因并提出解决方案；鼓励学生针对授课过程中感兴趣的点进行资料查阅并制作 PPT 进行汇报，扩充知识面；增加相配套的实验课程的比重，尤其是其中的综合设计类型的比重等，使大学教育真正给予学生一种能力，扩充知识面，促进学生综合能力的培养和提升。

### **1.3 教学方法的多样性**

采用合理的教学方法对于教学的有效性起着至关重要的作用。在《发酵制药学》课程的讲授中，课堂教学仍然以教师的讲授为主，应把一些重点知识、难点知识，尤其是与现代研究热点或实际生产相关的知识点讲透。结合本人科研实际，对于具体的应用可以多列举一些案例来加深学生的印象；也可采用启发式的教学，组织学生查阅相关的资料后进行分组讨论，从而提高学生的课堂参与性，激发学生的学习热情和兴趣，增长学生的见识。另外，除了课程理论教学外，本门课程还需配套实验教学环节，让学生通过相关的实验设计和操作，能够对课堂讲授的内容有更直观、深刻的认识，从而提高学生的实践动手能力。

## 2. 课程介绍

### 2.1 课程的性质

“二十一世纪是生命科学世纪”，而发酵制药学作为生命科学最前沿的应用学科之一，是生物制药专业通向生物高新技术的必修课程之一。具体来讲，发酵工程是整个生物技术的核心，是工业微生物实现实验室与工厂化生产的具体操作，是生物技术在生产实践中应用的原理及方法的一部分，是基因工程及酶工程等生物制药技术工业化的过程与方法。本课程以微生物学、生物化学、化工原理和分析化学为基础，重点论述发酵制药工程的基础理论和技术，以发酵工程为主线，紧密联系生产实践。通过本课程的教学，使学生全面掌握发酵制药的原理与应用，熟悉现代发酵制药的发展方向，为学生今后从事与发酵制药工业相关的生产、研究和开发打下良好的理论与技术基础。它既是现代生物科学、生物制药、生物技术等相关学科的重要基础技术，又是处于生命科学前沿的极具潜力的独立学科，是生物科学、生物制药、生物技术等相关专业的专业必修课。

### 2.2 课程在学科专业结构中的地位、作用

四川轻化工大学开设的生物制药专业旨在培养具有扎实的生物技术和药学基础理论、基本知识，熟练掌握现代生物制药生产的原理、技术和方法，了解生物制药企业设备、生产、储存、销售和管理等环节的基本知识和技能，具有良好的开拓精神、创新意识和实践能力，能够胜任现代生物制药企业及其相关的科研院所岗位基本要求的德、智、体、美全面发展的应用型高级专业人才。而《发酵制药学》作为生物技术和制药领域技术性很强的一门学科，在生物制药专业学生的整个发展中起到了至关重要的作用。一方面，《发酵制药学》与人类健康生活息息相关，作为应用技术性很强学科能够充分地调动学生的学习积极性，起到较好的承上启下作用；另一方面，《发酵制药学》是《细胞工程》、《酶工程》、《蛋白质工程》课程的下游技术与延伸，与其紧密相连，并与其



一起构成了生物制药专业完整的专业课程体系。

## 2.3 课程的历史与文化传统

微生物发酵制药的历史悠久。免疫学方面，我国宋朝真宗年间（公元 998-1022 年）就开始利用接种人痘的免疫技术预防天花病。1796 年英国医生 E.Jenner 利用接种牛痘苗预防天花并获得成功。到 19 世纪末，陆续发明了预防或治疗各种细菌性传染病的疫苗和类毒素。1928 年，英国细菌学家 Fleming B 发现抗菌物质青霉素。10 年后，通过动物实验，把青霉素从细菌学家好奇的物质转变为医学上具有活力的物质。1941 年 Florry 利用发酵技术大规模制备青霉素获得成功。

在 20 世纪 40 年代，一共发现了 14 种抗生素，50 年代发现了 20 余种，60 年代开始了化学结构改造的合成和半合成抗生素阶段。目前发现并分离到约 9000 种抗生素，半合成抗生素约 1000 种。此后，利用微生物生产疫苗的研究获得了蓬勃的发展。

随着细胞融合技术和基因工程的问世，为微生物制药来源菌的获得提供了一种有效的手段。工程菌和融合子经发酵后能生产原微生物所不能产生的药物或提高其生产效率。同时近年来发酵工艺及其控制研究也得到了发展，利用计算机在线控制以及固定化细胞技术为微生物发酵制药工艺带来了新的发展空间。

## 2.4 课程的前沿及发展趋势

《发酵制药学》是二十一世纪生物制药相关领域技术性很强的一门学科。随着微生物应用技术、分子生物学、基因工程等新技术的不断出现，对微生物学的研究迅速向纵深发展，已经从细胞水平、酶学水平逐渐进入到基因水平、分子水平和后基因组水平。例如，DNA 重组技术的出现即为构建具有特殊功能的基因工程菌提供了令人兴奋的成果和良好的前景，已实现了利用基因工程微生物大量生产人工胰岛素、干扰素和生长素等贵重药品，并形成了一个崭新的生物制药产业。

## 2.5 课程与经济社会发展的关系

发酵制药的主要产品是为社会提供大量优质生物药物产品，为人类提供临床诊断、治疗和保健等社会服务。一些困扰人类健康的主要疾病，例如心脑血管疾病、糖尿病、肝病、癌症等都与基因有关。依据已经破译的基因序列和功能，找出这些基因并针对相应的病变区位进行药物筛选，发酵生产基因工程药物，甚至基于已有的基因知识来设计新药，就能“有的放矢”地修补或替换这些病变的基因，从而根治顽症。

发酵制药将成为 21 世纪医药中的耀眼明星。目前世界各国可用发酵法生产的抗生素约 400 种，其中广泛应用的大约 120 种。2017 年世界总产量约为 28000 吨。仅青、四、红和头孢四类抗生素的产值就达 126 亿美元，最大的发酵罐为 400 立方米。

全球范围内使用最为普遍的是 VA、VC 和 VE，三者每年市场销售额近 20 亿美元，其中 VE 超过 10 亿美元，其余为 VB 族，每个品种都有 0.5-1.5 亿美元的市值。在各种用途中，维生素作为动物饲料的市场正以每年 2-3% 速度增长，在药用和食品领域都以 4-5% 的速度增长。目前国际上正在研究中的除干扰素以外、还有口蹄疫疫苗，狂犬病疫苗等十余种。今后几年内，随着重组 DNA 的工作逐步深入并应用，定会对人类健康引起实质性的改善。

## 2.6 学习本课程必要性

发酵制药是从 20 世纪 40 年代初发展起来的是一门理论性与实践性较强的学科，经过多年来的进步与发展，其方法与技术已经渗透到现代生物制药的各个分支领域，成为生物制药的一门核心技术。许多科学家预言生物学将成为 21 世纪最重要的学科，发酵制药工程及相关领域的产业将成为 21 世纪的主导产业之一。发酵制药包含许多独特的实验方法和技术，不仅内容丰富，涉及面广，实用性也强。因此，《发酵制药学》作为生物制药专业的专业必修课程之一，使学生通过本门课程的学习，能够熟悉发酵制药工

程操作原理，掌握发酵制药工程实验方法和技术，并进一步运用这些知识和技能去进行药物研发和生产，从而造福人类和推动社会的进步。

### 3. 教师简介

#### 3.1 教师的职称、学历

刘忠渊 教授 博士； 胡楠，讲师，博士

#### 3.2 教育背景

时 间	学习或工作单位	职位
1992.09-1996.07	新疆大学	学士
2000.09-2004.07	新疆大学	硕士
2005.09-2008.07	新疆大学	博士
2008.09-2010.07	清华大学	博士后

#### 3.3 研究兴趣（方向）

生物制药、蛋白质的结构与功能研究、功能基因的资源挖掘

### 4. 先修课程

微生物学、生物化学、细胞生物学、基因工程等课程是本门课程的基础。要学习并掌握好本门课程，需要提前复习这些相关知识。

## 5. 课程目标

发酵制药学是生物制药专业的一门专业核心课程,是在学习了微生物学、生物化学、化工原理和分析化学等基础知识后开设的一门专业必修课程。由于发酵工程是整个生物技术的核心,是工业微生物实现实验室与工厂化生产的具体操作,是生物技术在生产实践中应用的原理及方法的一部分,是基因工程及酶工程等生物制药技术工业化的过程与方法。因此,通过对发酵制药学的学习,不仅掌握发酵制药工程原理及发酵优化控制过程,而且对系统了解生物技术及其工业化应用都具有深远的意义。

本课程系统的介绍发酵制药工程的基础理论和技术,它以发酵工程为主线,紧密联系生产实践。通过本课程的教学,使学生全面掌握发酵制药的原理与应用,熟悉现代发酵制药的发展方向,为学生今后从事与发酵制药工业相关的生产、研究和开发打下良好的理论与技术基础。

## 6. 课程内容

### 6.1 课程的内容概要

掌握发酵制药反应过程基本原理,熟悉产物分离和纯化的一般过程与常规方法,了解发酵制药工程基本设备,掌握抗生素、氨基酸等几种典型发酵产品的生产过程,使学生初步具备选育新菌种、探求新工艺、新设备和从事微生物发酵制药生产研究的能力。

### 6.2 教学重点、难点

教学重点: 制药微生物菌种选育常用方法及过程、发酵过程中优化控制的理论和方法、发酵工艺的控制过程、青霉素及氨基酸的发酵生产等。

教学难点: 确定发酵制药工艺的参数,优化发酵生产工艺条件。

### 6.3 学时安排

周次及日期	讲课（教学大纲分章和题目的名称）	讲课学时
第 1 周 (2/28)	第 1 章 绪论（概述、主要内容和发展趋势）	2
第 1 周 (3/2)	第 2 章 发酵制药微生物菌种（菌种筛选）	2
第 2 周 (3/7)	第 2 章 发酵制药微生物菌种（筛选及保藏）	2
第 2 周 (3/9)	第 3 章 发酵工艺条件的优化 （发酵培养基设计与优化）	2
第 3 周 (3/14)	第 3 章 发酵工艺条件的优化 （种子扩大原理与技术）	2
第 3 周 (3/16)	第 4 章 发酵动力学 （分批发酵动力学）	2
第 4 周 (3/21)	第 4 章 发酵动力学 （连续发酵动力学）	2
第 4 周 (3/23)	第 5 章 发酵制药的灭菌工艺 （无菌原理与技术）	2
第 5 周 (3/28)	第 5 章 发酵制药的灭菌工艺 （空气除菌原理与流程设计）	2
第 5 周 (3/30)	第 6 章 发酵制药工艺控制 （发酵过程控制及参数检测）	2
第 6 周 (4/4)	第 6 章 发酵制药工艺控制 （发酵过程放大）	2
第 6 周 (4/6)	第 7 章 发酵生产的设备及产物分离纯化 （发酵生产的设备）	2
第 7 周 (4/11)	第 7 章 发酵生产的设备及产物分离纯化 （分离纯化）	2
第 7 周 (4/13)	第 8 章 抗生素发酵生产工艺	2

第 8 周 (4/18)	学生专题报告：胰岛素发酵生产工艺	2
第 8 周 (4/20)	学生专题报告：酒精发酵生产工艺	2

## 7.课程实施

### 7.1 教学单元一 第 1 章 绪论（2 学时）

#### 7.1.1 教学日期

第一周 第一讲

#### 7.1.2 教学目标

掌握发酵制药工程的基本知识；了解微生物发酵制药的发展简史、发酵制药工程的一般工艺过程和工艺发展趋势。

#### 7.1.3 教学内容（含重点、难点）

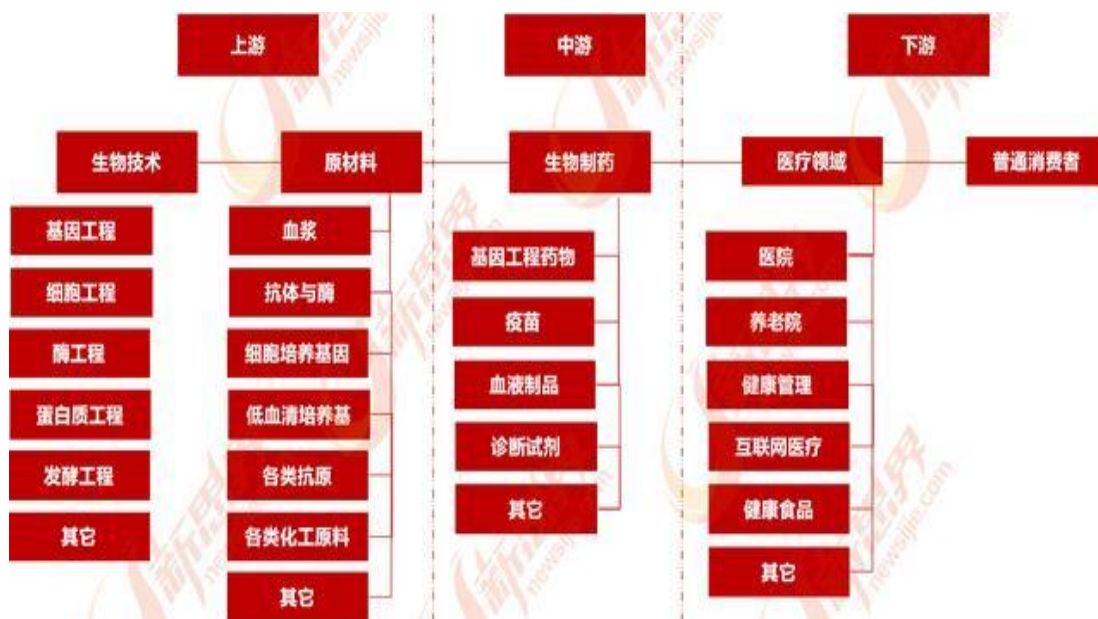
重点：发酵制药的概念、研究内容和任务

难点：发酵制药的研究内容；发酵制药的理论基础

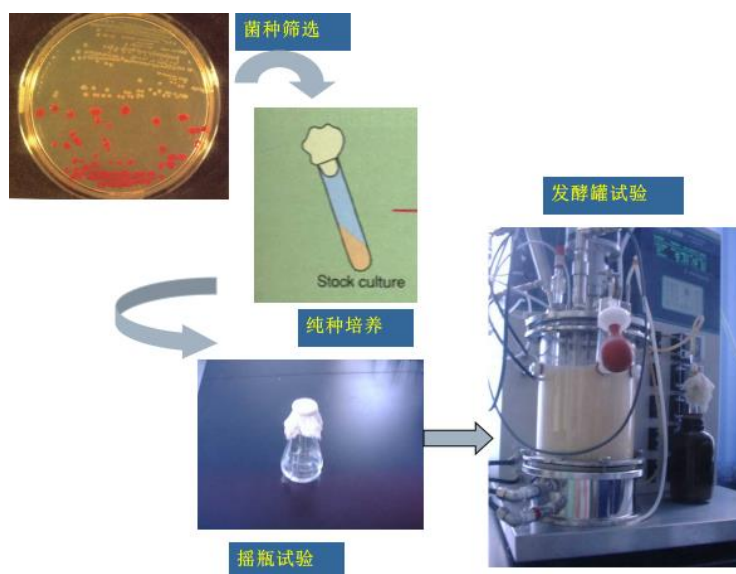
主要知识点：发酵制药的概念与基本步骤、发酵工程制药的特点、发酵制药种类、发酵制药中的微生物。

#### 7.1.4 教学过程

生物制药产业链



## 发酵制药的技术路线简介



## 发酵的概念

概念：通过微生物培养而获得产物的过程。

种类：用产品说明，冠以产物名而成，如青霉素发酵，维生素发酵；发酵工程按需氧分为好氧发酵和厌氧发酵。

初级代谢产物：在初级代谢过程中形成的产物，包括各种小分子前体、单体和多糖、蛋白质、脂肪、核酸等。生长所必须的。几乎所有生物初级代谢基本相同。氨基酸，核苷酸，有机酸。

次级代谢产物：比较复杂的化合物，不是细胞生长必需的，对生命活动有意义。抗生素，毒素，色素。

发酵工程发展可以根据发酵工业的技术进步划分为六阶段

Δ 发酵本质的认识

Δ 纯培养技术的建立

Δ 通气搅拌纯培养发酵技术的建立

Δ 诱变技术与代谢调控发酵技术的建立

Δ 石油作为原料的发酵技术体系的建立

Δ 基因工程菌的应用

## 发酵工业的一般过程



液体的深层发酵

原料预处理及培养基配制



培养基、发酵罐及其附属设备灭菌



纯种制备及扩大培养



控制发酵过程形成大量产物



提取精制产物，获得合格产品



发酵过程中产生的三废问题

发酵制药概念



利用制药微生物的生长繁殖，通过发酵，代谢合成药物，然后从中分离提取、精制纯化，获得药品的过程。

## 抗生素的发现

1928 年，英国细菌学家 Fleming B 发现抗菌物质青霉素。在 20 世纪 40 年代，一共发现了 14 种抗生素，50 年代发现了 20 余种，60 年代开始了化学结构改造的合成和半合成抗生素阶段。目前发现并分离到约 9000 种抗生素，半合成抗生素约 1000 种，共万种以上。但实际生产和应用的只有 100 余种。

## 微生物发酵制药的发展简史

微生物发酵制药的历史悠久。免疫学方面，我国宋朝真宗年间（公元 998-1022 年）就开始利用接种人痘的免疫技术预防天花病。1796 年英国医生 E.Jenner 利用接种牛痘苗预防天花并获得成功。

到 19 世纪末，陆续发明了预防或治疗各种细菌性传染病的疫苗和类毒素。此后，利用微生物生产疫苗的研究获得了蓬勃的发展。

第二次世界大战初期，随着人们对抗生素，尤其是对青霉素重要事件的认识，才大大推动了微生物发酵制药的发展。1929 年 Fleming 在研究金黄色葡萄糖球菌时偶然发现了青霉素，但是当时人们认为动物实验的结果不能指导人的医学实践。10 年后，通过动物实验，把青霉素从细菌学家好奇的物质转变为医学上具有活力的物质。1941 年 Florry 利用发酵技术制备大规模青霉素获得成功。



随着细胞融合技术和基因工程的问世，为微生物制药来源菌的获得提供了一种有效的手段。工程菌和融合子经发酵后生产原料微生物所不能产生的药物或提高生产效率。同时近年来发酵工艺及其控制研究也得到了发展，利用计算机在线控制以及固定化细胞技术为微生物发酵制药工艺带来了新的发展空间。

## 发酵制药种类

### ① 微生物菌体发酵

微生物菌体发酵是以获得微生物菌体为目的，如：面包的酵母发酵、单细胞蛋白发酵（利用各种碳源）、真菌类（各种蘑菇、冬虫夏草）、生物防治剂（苏云金杆菌，伴孢晶体可以毒杀鳞翅目、双翅目害虫）。

### ② 微生物酶发酵

微生物酶发酵是以获得酶为目的的发酵，如青霉素酰化酶，用于半合成青霉素时，制备中间体 6-氨基青霉烷酸。

### ③ 微生物代谢产物发酵

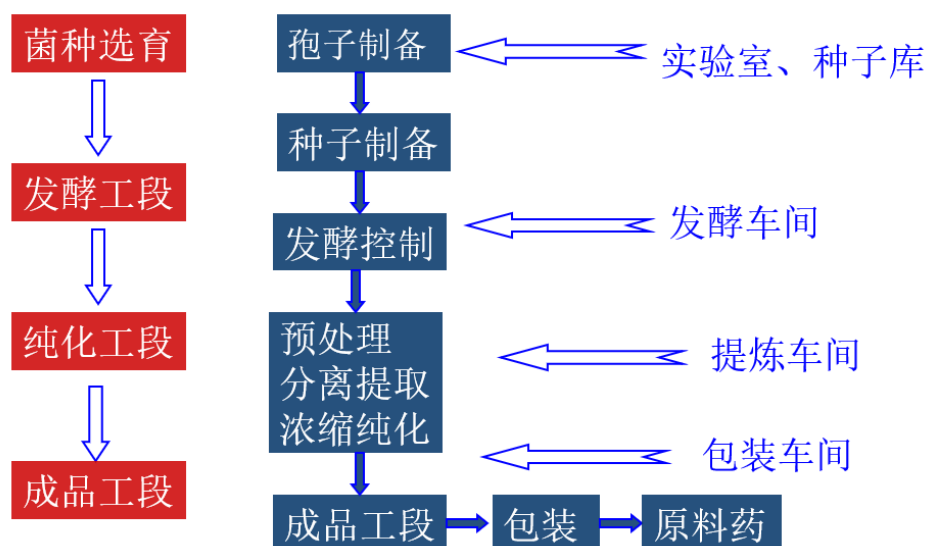
初级代谢产物：氨基酸，核苷酸，维生素，有机酸。

次级代谢产物：最主要的是抗生素。

### ④ 微生物转化发酵

利用微生物的一种或多种酶把一种化合物转变为结构相关的更有价值的产物的生化反应为转化发酵。

### 发酵制药的基本过程



### 发酵制药—产物种类

#### 种类

抗生素

氨基酸

维生素

核苷与核苷酸

酶类

酶抑制剂

免疫调节剂

#### 药物举例

青霉素，链霉素，头孢菌素C

谷氨酸，赖氨酸，丝氨酸

$V_{B2}$ ， $V_{B12}$ ， $V_C$

肌苷与肌苷酸，尿苷与尿苷酸

蛋白酶，链激酶，葡激酶

他汀类，伏立波糖

环孢菌素A，他克莫司

### 发酵工程制药的特点

- 微生物菌种选育获得高产
- 发酵的理论产量存在约 10% 的变量

- 发酵过程常温常压，操作条件温和
- 纯种培养、无菌条件
- 生产过程是以生物体的自动调节方式进行的
- 分子水平生产，定向发酵、突变、杂交等手段
- 投资少、见效快

### 发展趋势

- 利用 DNA 重组技术和细胞工程技术的发展、新的工程菌和新型微生物的开发
- 新型的生理活性多肽和蛋白质类药物：干扰素、白介素促红细胞生成素等；
- 新型菌体制剂和疫苗。

### 制药微生物的种类

细菌、放线菌和丝状真菌

细菌主要生产环状或链状多肽类抗生素，如芽孢杆菌(*Bacillus*)产生杆菌肽(bacitracin)。细菌还可以产生氨基酸和维生素，如黄色短杆菌(*Brevibacterium flarum*)产生谷氨酸，大小菌生产维生素 C。

放线菌主要产生各类抗生素，以链霉菌属最多，诺卡菌属较少，还有小单孢菌属。生产的抗生素主要有氨基糖苷类(链霉素、新霉素、卡那霉素等)、四环类(四环素、金霉素、土霉素等)、放线菌素类(放线菌素 D)大环内酯类(红霉素、螺旋霉素、柱晶白霉素)和多烯大环内酯类(制霉菌素、抗滴虫霉素等)。

真菌的曲菌属产生桔霉素，青霉素菌属产生青霉素和灰黄霉素等，头孢菌属产生头孢霉素等。

我国微生物发酵制药工业起步较晚。

1949 年 上海建立了青霉素实验所；

1953 年 5 月 1 日上海第三制药厂正式投产青霉素；

1957 年 我国开始氨基酸发酵的研究，

1958 年 建成华北制药厂，投产了青霉素、链霉素、土霉素和红霉素等品种；

1964 年谷氨酸发酵成功；

50 年代 开始核酸发酵生产；

70 年代 成功研究出“二步发酵法”生产维生素 C 技术。

目前 基因工程药物已经成为研究热点。

### **7.1.5 教学方法**

一单元的教学方法主要采用课堂讲授的形式展开，为了提高同学们对发酵制药学课程的兴趣。主要从与同学们生活息息相关的方面入手；讲解生物制药领域的重大事件；并进一步讲解当今发酵制药在各个领域的研究热点和难点，以充分调动同学们的学习热情。

### **7.1.6 作业安排及课后反思**

（1）思考身边与发酵制药相关的事情，如抗生素、胰岛素等；

（2）了解发酵制药的应用情况。

### **7.1.7 课前准备情况及其他相关特殊要求**

教师认真备课；学生上课前对参考教材进行预习。对生物化学、基因工程和微生物学的基础有一定要求。

### **7.1.8 参考资料（具体到哪一章节或页码）**

《发酵工程原理与技术》，余龙江主编，绪论（p1-p10）

## 7.2 教学单元二 第2章 发酵制药微生物菌种 (2学时)

### 7.2.1 教学日期

第一周 第二讲

### 7.2.2 教学目标

掌握微生物分离筛选的基本概念、原理与技术应用；掌握菌种选育的基本原理、技术方法及其应用；掌握菌种保藏的基本原理、技术方法及其应用。

### 7.2.3 教学内容（含重点、难点）

重点：菌种高效筛选方法

难点：优良菌种选育的原理、技术方法及其应用

### 7.2.4 教学过程

#### 工业化菌种的要求

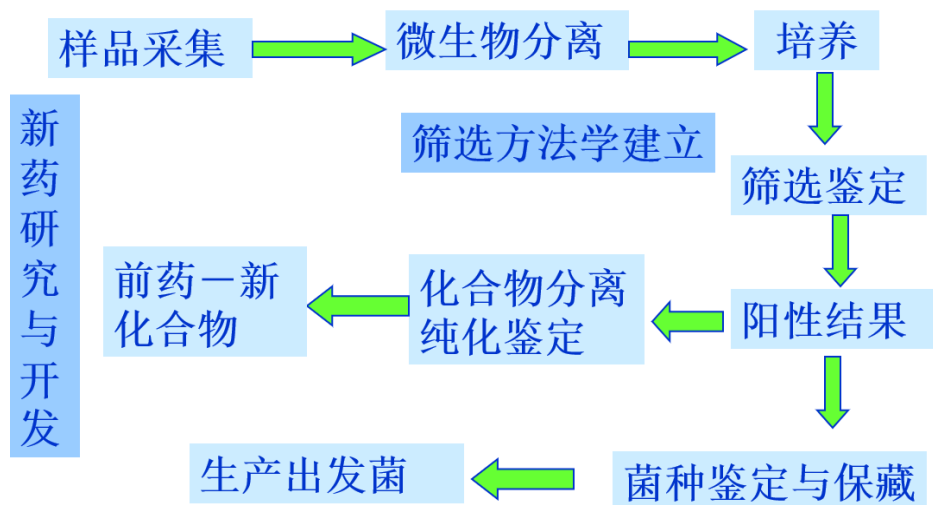
- ❖ 1.遗传稳定性：能长期繁殖，不易变异和退化。纯种，无杂菌及噬菌体。
- ❖ 2.易生长性：生长旺盛、迅速；
- ❖ 4.容易培养性：条件易控，利用价廉易得的原料。
- ❖ 3.抗污染性：自身保护机制，抵抗杂菌污染能力强。
- ❖ 4.经济性：发酵周期短，产量高，良好经济能力。
- ❖ 5.突变敏感性：对各种诱变较敏感，提高的潜力大。
- ❖ 6.生产特性要符合工艺要求，对放大设备的适应性强。
- ❖ 7.菌种不是病原菌，不产生任何有害的生物活性物质和毒素。

## 2.2 菌种的分离筛选

### 发酵工业菌种的来源

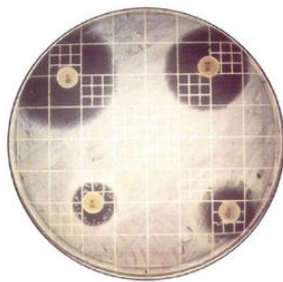
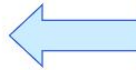


### 微生物药物与菌种的筛选流程



## 获得合适的菌株的方法

- 1.合适的取样地点
- 2.合适的预处理方法
- 3.最快速的分离筛选方法

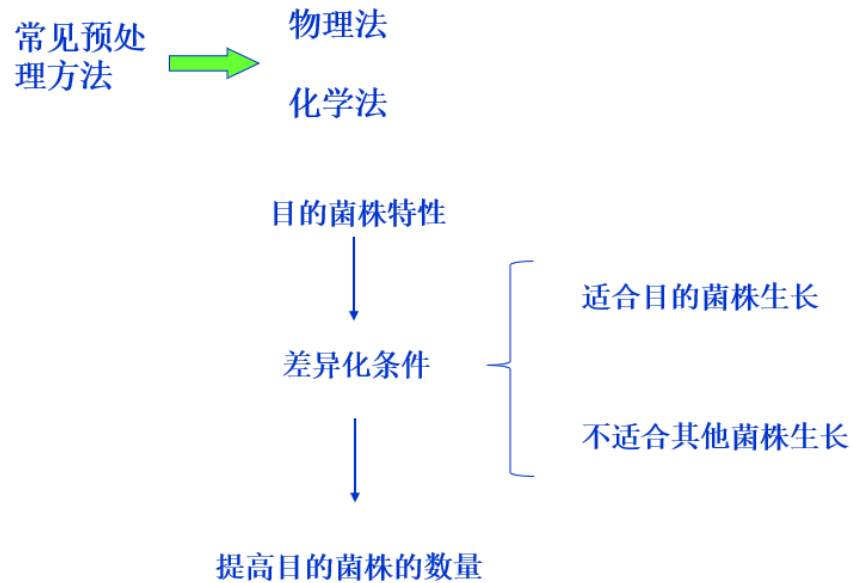


## 采样的注意事项

1. 采样时应尽可能保持相对无菌；
2. 所采集的样本必须具有某种代表性；
3. 采好的样必须标上样本的种类及采集日期、地点以及采集地点的地理、生态参数等；
4. 应充分考虑采样的季节性和时间因素；
5. 采好的样应及时处理，暂不能处理的应贮存于 4℃，贮存时间不宜过。因为试样中的微生物群体脱离了原来的生态环境，其内部生态环境会发生变化。



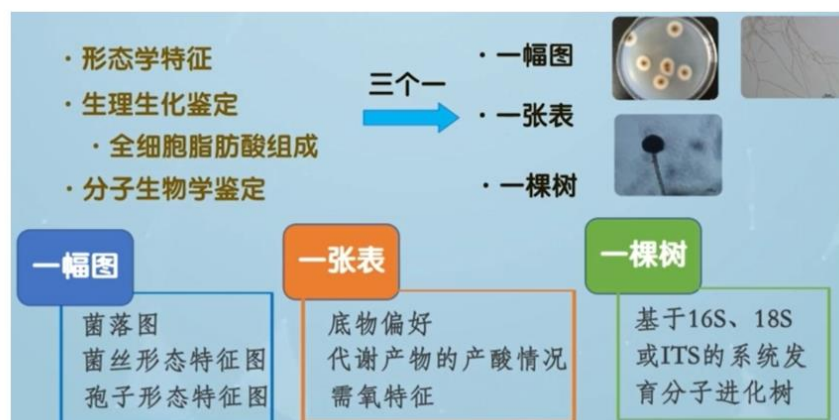
## 如何确定合适的预处理方法



## 2.3 菌种的鉴定

### 菌种鉴定的主要内容

形态学特征      生理生化鉴定      分子生物学鉴定



## 2.4 菌种的选育

通过各种手段突破固有的反馈调节机制或引入新的代谢途径来获得高产菌株，促使目标产物的过量积累。

### 菌种选育改良的目标

提高目标产物的产量

缩短发酵周期

适应较广的原料

提高目标产物的含量或浓度

改良菌种性状，改善发酵过程

改变生物合成途径，以获得高产的新产品

### 常见的菌种改良方法

自然选育

诱变育种

细胞工程育种

基因工程育种

## 7.2.5 教学方法

本单元的教学方法主要采用课堂讲授的形式，形象举例，介绍菌种筛选的方法。

## 7.2.6 作业安排及课后反思

思考发酵制药菌种筛选思路。

## 7.2.7 课前准备情况及其他相关特殊要求

教师认真备课；学生上课前对参考教材进行预习。

### 7.2.8 参考资料（具体到哪一章节或页码）

《发酵工程原理与技术》，余龙江主编，发酵工业菌种（p12-p18）

## 7.3 教学单元三 第2章 发酵制药微生物菌种（菌种筛选及保藏）（2学时）

### 7.3.1 教学日期

第二周 第三讲

### 7.3.2 教学目标

常用工业菌种育种的方法；诱变、基因转移、基因重组的原理及操作方法；不同微生物菌种保藏原理、方法及各自的应用优缺点。本章重点掌握菌种的保藏方式。

### 7.3.3 教学内容（含重点、难点）

重点：菌种的保藏方式。

难点：常用工业菌种育种的方法。

主要知识点：诱变、基因转移、基因重组的原理及操作方法、菌种保藏原理、方法及各自的应用优缺点。

### 7.3.4 教学过程

#### 自然选育

❖ 不经过人工诱变处理，根据菌种的自然突变而进行的菌种筛选过程。

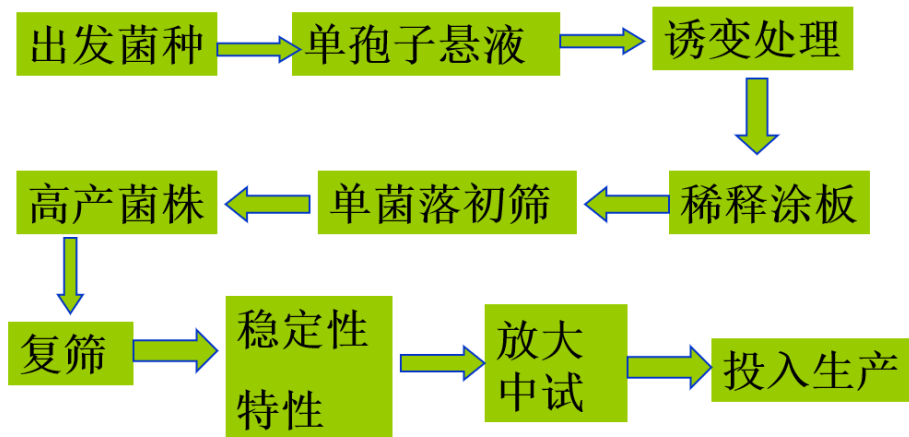
#### 诱变育种

人为创造条件（诱变剂处理），使菌种发生变异，筛选优良个体，淘汰劣质个体。

❖ 物理诱变    化学诱变    生物诱变

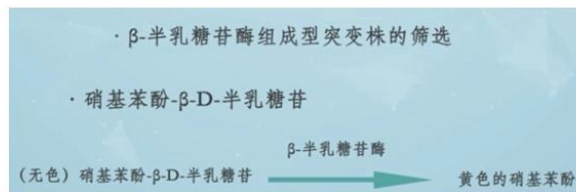
特点：速度快、收效大、方法简便，但缺乏定向性

## 诱变育种流程



## 组成型突变株筛选方法

### 指示剂 筛选法



### 诱导剂筛选法

控制诱导剂的添加浓度，以筛选组成型突变株

- 低于诱导浓度的诱导物作为唯一碳源
  - 野生型出发菌株因利用该碳源的酶不能被诱导出来——不能生长
  - 组成型突变株不需要诱导就能产生水解酶——生长逐渐增多
- 不含诱导物的培养基——以诱导物为唯一碳源的培养基
  - 组成型突变株——无需诱导合成酶——适应期短——比例增加
- 诱导能力很低但能作为良好碳源的底物
  - 苯- $\beta$ -半乳糖

## 抗分解阻遏突变株的选育



★ **分解阻遏现象:** 在微生物代谢过程中, 一些易利用的碳源或者氮源及其降解物, 会阻遏那些难利用的碳源或氮源降解酶的诱导合成, 这就是分解阻遏现象。

★ **葡萄糖效应:** 葡萄糖或某些容易利用的碳源, 其分解代谢产物阻遏某些编码诱导酶体系的基因的转录的现象。

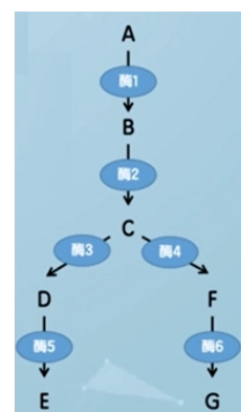
抗分解代谢阻遏作用  
突变株打破了微生物  
对慢碳源或慢氮源利  
用的限制作用。



## 抗反馈作用突变株的选育

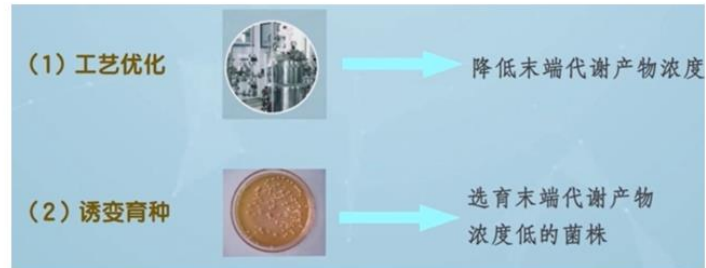
### 反馈调节机制

- ❖ 1. 产物与合成途径的第一个酶及最后一个酶结合
- ❖ 2. 与分支途径的第一个酶（酶3或酶4）结合
- ❖ 3. 含有分支途径的总合成途径的第一个酶常为变构酶。
- ❖ 4. 与总合成途径的第一个酶的表达调控蛋白结合



## 如何抗反馈调节作用？

方法一：降低末端代谢产物浓度

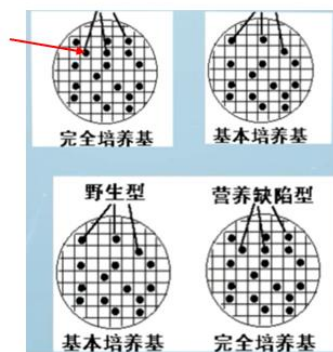


方法二：选育抗反馈调节作用突变株

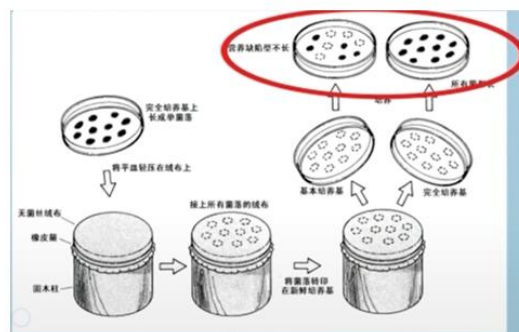


## 营养缺陷型菌株的筛选方法

逐个检出法



影印培养法



夹层培养法



## 原生质体融合育种

- ❖ 通过生物学、化学或物理学的方法，使两个不同种类的体细胞融合在一起，从而产生具有两个亲本遗传性状的新细胞。
- ❖ 用去壁酶处理将微生物细胞壁除去，制成原生质体，在高渗条件下，用聚乙二醇（PEG）促进原生质体发生融合，再生细胞壁，从而获得异核体或重组子，这一技术叫原生质体融合。

## 基因工程育种

第一代基因工程育种

蛋白质工程育种

代谢工程育种

基因组工程育种

全局转录机器工程育种

合成生物学育种

## 菌种保藏

- ❖ 原因：菌种经过多次传代，会发生遗传变异，导致退化，从而丧失生产能力甚至菌株死亡。
- ❖ 目的：保持菌种原有优良特性，延长生命时限，长期存活、不退化，不污染，随时为生产供菌。
- ❖ 原理：使菌种代谢处于不活跃状态，即生长繁殖受抑制的休眠状态。
- ❖ 措施：物理和化学方法（温度：低温；水分：干燥；氧气：缺氧；营养：缺乏）

理想的菌种保藏方法应具备的条件

(1)经长期保藏后菌种存活健在；

(2)保证高产突变株不改变表型和基因型，特别是不改变初级代谢产物和次级代谢产物生产的高产能力。

(3)菌种保藏的基本措施是低温、干燥、真空。

### 冷冻保藏

- ❖ 冷冻保藏为保藏微生物菌种的最简单而有效的方法。
- ❖ 通过冷冻，使微生物代谢活动停止。一般而言，冷冻温度愈低，效果愈好。为了获得满意的冷冻结果，通常应在培养物中加入一定的冷冻保护剂。冷冻保藏时温度要求在-20℃以下，同时应认真掌握好冷冻速度和解冻速变。
- ❖ 冷冻深藏的缺点之一是培养物运输较困难。

### 普通冷冻保藏技术(-20℃)

- ❖ 将液体培养物或从琼脂斜面培养物收获的细胞分接到试管或指管肉，然后贮藏于一冰箱的冷藏室中，或于温度范围在-5~-20℃的普通冰箱(-20℃)中。或者，将菌种培养在小的试管或培养瓶斜面上，待生长适度后，将试管或瓶口用橡胶塞严格封好，同上置于冰箱中保存。
- ❖ 用此方法可以维持若干微生物的活力 1—2 年。

### 超低温冷冻保藏技术(-60 — -80℃)

- ❖ 要求长期保藏的微生物菌种，一般都要求在-60℃以下进行保藏。
- ❖ 在超低温冷藏柜中保藏菌种的一般方法是：
  - ❖ 1. 离心收获对数生长中期至后期的微生物细胞；
  - ❖ 2. 用新鲜培养基重新悬浮所收获的细胞；
  - ❖ 3. 加入等体积的 20%甘油或 10%二甲亚砜；



- ❖ 4. 混匀后分装入冷冻指管或安瓿中，于-70℃超低温冰箱中保藏。

## 液氮冷冻保藏技术

### 冷冻保护剂

在液氮冷冻保藏中，最常用的冷冻保护剂是二甲亚砜和甘油，最终使用浓度一般为甘油 10%、二甲亚砜 5%。所使用的甘油一般用高压蒸汽灭菌，而二甲亚砜最好为过滤灭菌。

### 冻干保藏

- ❖ 冷冻干燥的基本方法：是通过在减压条件下使冻结的细胞悬液中的水分升华，使培养物干燥。此法是微生物菌种长期保藏的最为有效的方法之一。
- ❖ 冷冻干燥过程中必须使用冷冻保护剂，目前国内常用脱脂乳和蔗糖，国外尚有运用动物血清等的。
- ❖ 大部分微生物菌种可以在冻干状态下保藏 10 年之久而不丧失活力。而且经冻干后的菌株无需进行冷冻保藏，便于运输。

## 菌种保藏三要素

- 典型菌种的优良纯种的休眠体；
- 创造有利于种子休眠的环境（低温、干燥、缺氧、避光、缺少营养）；
- 尽可能采用多种不同的手段保藏同一菌株。

方法名称	主要特点	适用范围	保藏期
斜面低温保藏法	传代培养，4℃保藏	各种微生物的短期保藏。	1-6个月
石蜡油封存法	石蜡油隔绝空气，室温或4℃保藏	各种微生物的中短期保藏，不适用某些能分解烃类的菌种。	1-2年
砂土管保藏法	沙土管作载体，干燥器中抽真空，室温或4℃保藏	产孢子微生物和芽孢细菌的长期保藏，不适用对干燥敏感的微生物	1-10年
麸皮保藏法	麸皮作载体，干燥，4℃保藏	产孢子霉菌和某些放线菌，工厂多采用此法	1年
甘油悬液保藏法	悬浮于10-15%甘油中，需低温冰箱	基因工程菌	1年/10年
冷冻真空干燥保藏法	用保护剂制备悬液，快速冻结，减压抽真空，需冻干机	各类微生物	5-15年
液氮超低温保藏法	保护剂，超低温（-196℃），需超低温液氮设备	各类微生物	15年以上
宿主保藏法	与培养基混合直接低温保存	专性活细胞寄生微生物（如病毒）	

### 保藏机构—中国

- ❖ 中国典型培养物保藏中心:China Center for Type Culture Collection (CCTCC)。
- ❖ 中国科学院典型培养物保藏委员会,下设 9 个库
- ❖ 中国普通微生物菌种保藏管理中心：China General Microbiological Culture Collection Center (CGMCC)，微生物所（真菌和细菌）；武汉所（病毒）
- ❖ 抗生素菌种保藏管理中心（CACC）：中国医学科学院抗生素所，四川抗生素所，华北制药集团抗生素所

### 保藏机构—国外

- ❖ WFCC : World federation for culture collections,  
<http://www.wdcm.riken.go.jp/wfcc.html>
- ❖ 美国的典型菌种保藏中心 ATCC: American Type Culture Collection,  
<http://www.atcc.org/>
- ❖ 日本发酵研究所 IFO: Institute for Fermentation, Osaka, Japan

❖ 英国国家典型菌种保藏所 NCTC: National Collection of Type Culture, London, UK

### 7.3.5 教学方法

本单元的教学方法主要采用课堂讲授和举例分析的形式进行。

### 7.3.6 作业安排及课后反思

菌种保存的方法。

### 7.3.7 课前准备情况及其他相关特殊要求

教师认真备课；学生上课前对参考教材进行预习。

### 7.3.8 参考资料（具体到哪一章节或页码）

《发酵工程原理与技术》，余龙江主编，发酵工业菌种（p18-p30）

## 7.4 教学单元四 第3章 发酵工艺条件的优化（2学时）

### 7.4.1 教学日期

第二周 第四讲

### 7.4.2 教学目标

掌握常用培养基的基本要求，培养基的组成成分及其来源、培养基的种类。本章重点学习发酵培养基的选择。

### 7.4.3 教学内容（含重点、难点）

重点：培养基的选择和确定。

难点：发酵培养基的选择。

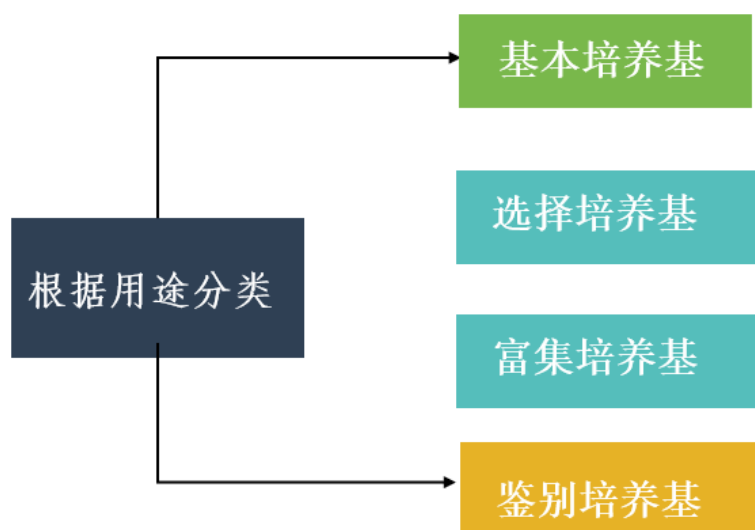
主要知识点：碳源、氮源、无机盐、水、生长因子、前体与促进剂和消泡剂、培养基的种类、固体培养基、种子培养基、发酵培养基。

### 7.4.4 教学过程

## 培养基的选择和确定

### ❖ 培养基概念（medium）

供微生物生长繁殖和合成各种代谢产物所需要的按一定比例配制的多种营养物质的混合物。培养基的组成和比例是否恰当，直接影响微生物的生长、生产和工艺选择、产品质量和产量



## 种子培养基

- ❖ 概念：（Seed medium）供孢子发芽和菌体生长繁殖，摇瓶和种子罐培养基，为液体。

- ❖ 作用：使种子扩大培养，增加细胞数目，生长形成强壮、健康和高活性的种子。

### 种子培养基特点

- ❖ （1）必须有较完全和丰富的营养物质，特别需要充足的氮源和生长因子。
- ❖ （2）种子培养基中各种营养物质的浓度不必太高。供孢子发芽生长用的种子培养基，可添加一些易被吸收利用的碳源和氮源。
- ❖ （3）种子培养基成分还应考虑与发酵培养基的主要成分相近。

### 发酵培养基

是发酵生产中最主要的培养基，它不仅耗用大量的原材料，而且也是决定发酵生产成功与否的重要因素。

### 判断是否满足发酵培养基的要求

#### 1.原料要合适

原料本身不能抑制菌体生长或产物合成

原料应来源广泛、价格低廉

原料应便于采购、运输和大规模储藏

保证每批次原料质量的稳定性

#### 2. 应有利于产物合成能力的提高

用于维持能耗的营养物质越多，底物利用率越低

用于产物合成的营养物质越多，底物转化率越高，产物合成能力越高

在保证菌体产物合成的同时，保证菌体生物量的积累

有利于提高产物的合成速率，缩短发酵周期，提高发酵效率

#### 3. 应有利于发酵过程的进行

好氧发酵设计的培养基要有利于提高发酵液中氧的溶解度

有利于产品的分离纯化，减少副产物的生成

尽可能规避“三废”物质的产生

## 培养基的成分

❖ 碳源

❖ 氮源

❖ 无机盐

❖ 水

❖ 生长因子

前体与促进剂和消泡剂

## 碳源(carbon sources)

❖ 概念：

构成微生物细胞和代谢产物中碳素的营养物质。

❖ 作用：为正常生理活动和过程提供能量来源，为细胞物质和代谢产物的合成提供碳骨架。

❖ 种类：

糖类：葡萄糖、淀粉、糊精和糖蜜

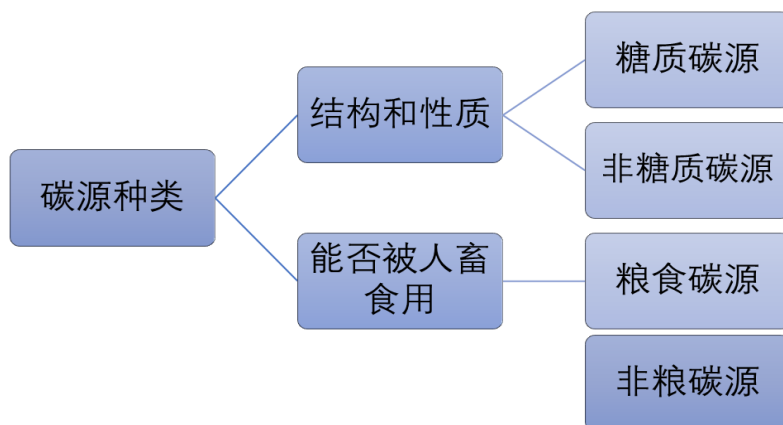
脂肪：豆油、棉籽油和猪油

醇类：甘油、乙醇、甘露醇、山梨醇、肌醇

蛋白类：蛋白胨、酵母膏

速效碳源：糖类、有机酸

迟效碳源：酪蛋白水解产生的脂肪酸



## 糖蜜

糖蜜是制糖生产时的结晶母液，它是制糖工业的副产物。

糖蜜主要含有蔗糖，总糖可达**50%~75%**。

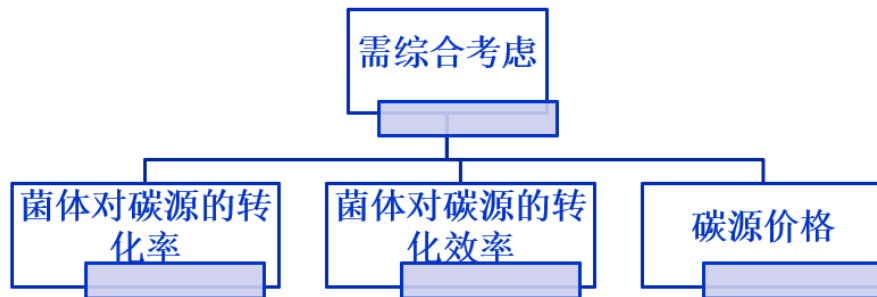
一般糖蜜分甘蔗糖蜜和甜菜糖蜜葡萄糖蜜。

表 4-1 甘蔗糖蜜和甜菜糖蜜的糖成分<sup>a</sup>

糖 <sup>b</sup>	甜菜(%) <sup>c</sup> (W/V) <sup>d</sup>	甘蔗(%) <sup>c</sup> (W/V) <sup>d</sup>
蔗糖 <sup>e</sup>	48.5 <sup>d</sup>	33.4 <sup>d</sup>
棉子糖 <sup>e</sup>	1.0 <sup>d</sup>	0 <sup>d</sup>
转化糖 <sup>*f</sup>	1.0 <sup>d</sup>	21.3 <sup>d</sup>

<sup>a</sup>转化糖：以葡萄糖计的还原糖的含量。<sup>e</sup>

## 确定合适的碳源



### 氮源 (nitrogen sources)

#### ❖ 概念:

☞ 构成微生物细胞和代谢产物中氮素的营养物质。

#### ❖ 作用:

☞ 为生长和代谢主要提供氮素来源。

#### ❖ 种类: 无机氮源、有机氮源

### 有机氮源

- ❖ 几乎所有微生物都能利用有机氮源:
- ❖ 黄豆饼粉、花生饼粉、棉籽饼粉、玉米浆、蛋白胨、酵母粉、尿素。

### 无机氮源

- ❖ 氨水、铵盐和硝酸盐等。氨盐比硝酸盐更快被利用。
- ❖ 工业应用: 主要氮源或辅助氮源; 调节pH值
- ❖ 生理酸性物质: 代谢后能产生酸性残留物质。  
(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>利用后, 产生硫酸
- ❖ 生理碱性物质: 代谢后能产生碱性残留物质。  
硝酸钠利用后, 产生氢氧化钠。

### 无机盐和微量元素



概念：组成生理活性物质或具有生理调节作用矿物质

❖ 作用方式：

☞ 低浓度起促进作用，高浓度起抑制作用。

❖ 种类：盐离子

☞ 磷、硫、钾、钠、镁、钙，常常添加

铁、锌、铜、钼、钴、锰、氯，一般不加。

### 注意事项

A. 对于其它渠道有可能带入的过多的某种无机离子和微量元素在发酵过程中必须加以考虑

例：铁离子

青霉素发酵中，铁离子的浓度要小于 $20\mu\text{g/ml}$   
发酵罐必须进行表面处理

B、使用时注意盐的形式（pH的变化）

例：黑曲霉NRRL-330,生产 $\alpha$ -淀粉酶，P对酶活的影响

	pH	酶活
不加	4.25	120分钟
加 $\text{K}_2\text{HPO}_4$	5.45	30分钟
加 $\text{KH}_2\text{PO}_4$	4.62	75分钟

## 水

❖ 菌体细胞的主要成分。

❖ 营养传递的介质。

❖ 良好导体，调节细胞生长环境温度。

❖ 培养基的主要成分之一。

## 生长因子（growth factor）

❖ 概念：

广义说，凡是微生物生长不可缺少的微量有机物质都称为生长因子(又称生长素)，包括氨基酸、嘌呤、嘧啶、维生素等；狭义说，生长素仅指维生素。

与微生物有关维生素主要是 B 族维生素，这些维生素是各种酶的活性基的组成部分，没有它们，酶就不能活动。

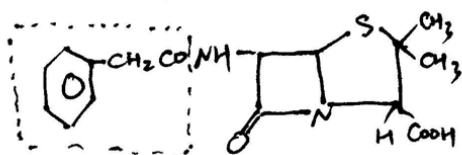
☞ 天然成分中含有：一般无需添加。

❖ 营养缺陷型菌株：必需添加。

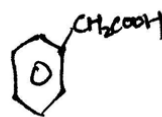
凡是缺少合成生长素类物质的微生物(即缺少了合成生长素过程中的某种酶)，统称为营养缺陷型。

## 前体

前体指加入到发酵培养基中的某些化合物，被直接结合到目标产物分子中，而自身的结构无多大的变化。但是产物的产量却因加入前体而有较大的提高。



青霉素：分子量356



苯乙酸:分子量136

**作用：**前体有助于提高产量和组份

**用量：**前体的用量可以按分子量衡算，具体使用有转化率的问题

例：6000单位/ml的青霉素G,需要多少苯乙酸

青霉素=6000\*0.6（微克）=36mg/ml

苯乙酸=（36\*136）/356=13.8mg/ml=1.38%

**实际使用时的转化率在46-90%之间**

例某厂单耗为：0.337（kg/10亿青霉素）

转化率为：13.8/[(0.337/0.6)\*36]=68%

前体	产物
苯氧乙酸，苯乙酸及其衍生物	青霉素V，青霉素G
氯化钠	金霉素，氯霉素，灰黄霉素
肌醇，精氨酸	链霉素
丙酸、丙醇	红霉素
丁酸盐	柱晶白霉素
丙酸盐	核黄素
β-紫罗酮	类胡萝卜素
氯化钴	维生素B <sub>12</sub>
α-氨基丁酸	L-异亮氨酸
甘氨酸	L-丝氨酸
邻氨基苯甲酸	L-色氨酸

## 产物促进剂

所谓产物促进剂是指那些非细胞生长所必需的营养物，又非前体，但加入后却能提高产量的添加剂。

添加剂	酶	微生物	酶活力增加倍数
Tween(0.1%)	纤维素酶	许多真菌	20
	蔗糖酶	许多真菌	16
	$\beta$ -葡聚糖酶	许多真菌	10
	木聚糖酶	许多真菌	4
	淀粉酶	许多真菌	4
	脂酶	许多真菌	6
	右旋糖酐酶	绳状青霉 QM121	20
	普鲁兰酶	产气杆菌 QMB1591	1.5
大豆酒精提取物(2%)	蛋白酶	米由霉	2.87
	脂肪酶	泡盛曲霉	2.50
植酸质 (0.01-0.3%)	蛋白酶	曲霉、桔青霉、枯草杆菌、假丝酵母	2~4
			-
洗净剂 LS(0.1%)	蛋白酶	栖土曲霉	1.6

促进剂提高产量的机制还不完全清楚，原因是多方面的

- 有些促进剂本身是酶的诱导物；
- 有些促进剂是表面活性剂，可改善细胞的透性，改善细胞与氧的接触从而促进酶的分泌与生产，
- 也有人认为表面活性剂对酶的表面失活有保护作用；
- 有些促进剂的作用是沉淀或螯合有害的重金属离子。

### 消泡剂（defoaming agent）

❖ 概念：

☞ 降低泡沫的液膜强度和表面黏度，使泡沫破裂的化合物。

❖ 种类：表面活性剂，低表面张力。

❖ 天然动植物油脂类、高分子化合物（高碳醇脂肪酸和酯类、聚醚类、硅酮类）。

❖ 作用：消除泡沫，防止逃液和染菌。

#### 7.4.5 教学方法

本单元的教学方法主要采用课堂讲授、结合实验室常用培养基介绍分析。

#### 7.4.6 作业安排及课后反思

思考如何选择发酵培养基。

#### 7.4.7 课前准备情况及其他相关特殊要求

教师认真备课；学生上课前对参考教材进行预习。

#### 7.4.8 参考资料（具体到哪一章节或页码）

《发酵工程原理与技术》，余龙江主编，发酵培养基设计与优化（p33-p38）

### 7.5 教学单元五 第3章 发酵工艺条件的优化（种子扩大培养）（2学时）

#### 7.5.1 教学日期

第三周 第五讲

#### 7.5.2 教学目标

通过对本单元的学习，掌握生产用培养基设计一般原则，学习培养条件的确定，掌握发酵培养技术，掌握种子扩大培养的原理及方法。

#### 7.5.3 教学内容（含重点、难点）

重点：培养条件的确定。

难点：影响种子质量的因素及其控制措施，微生物种子扩大培养的特点。

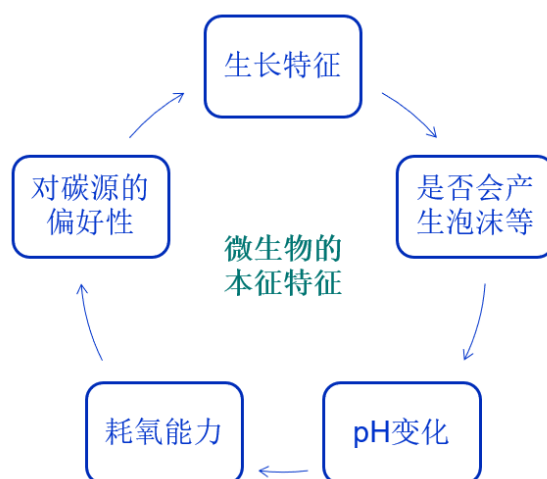
主要知识点：培养基设计一般原则、培养基设计基本思路、培养条件的确定、温度、pH 值、氧气、发酵培养技术、种子制备，发酵培养基的选择、发酵培养基的设计和注意事项、发酵类型的定义、培养技术、发酵培养的操作方式。

## 7.5.4 教学过程

### 生产用培养基的配制

#### 总原则

基于微生物本征特性及目标产物的代谢途径来确定合适的方案。



### 培养基设计原则

#### 1. 选择合适的底物

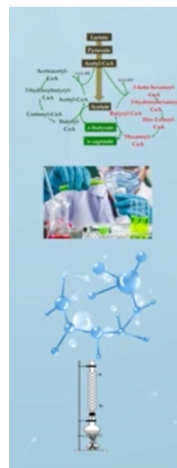
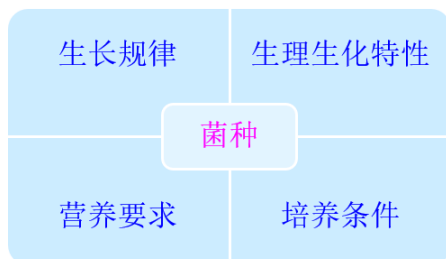
- (1) 考虑菌种的同化能力
- (2) 考虑菌种的底物转化率：菌种将底物转化为自身生长繁殖所需的能力
- (3) 判断微生物利用底物能力的高低：亲和常数  $K_s$
- (4) 代谢中的固有反馈作用：速效碳氮源和迟效碳氮源的配合使用，在积累生物量的同时消除反馈作用。

#### 2. 确定培养基的碳氮比

氮源丰富，有利于菌体的生长；碳源丰富，有利于产物的合成；碳源不足，会引起菌体的衰老和自溶

## 培养基的设计思路

前期调查研究：菌种，产物



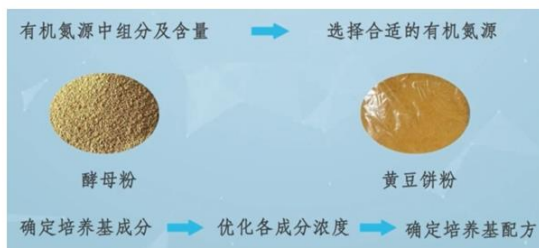
发酵过程中哪些营养成分是必不可少的？  
有没有相应的代谢抑制剂或促进剂？

### 选择合适的营养成分

研究各种重要的金属离子和非金属离子对发酵的影响

确定发酵培养基中无机盐和微量元素种类和最适范围

最适的合成培养基



## 培养基的优化方法（多因素）

正交实验

响应面分析法

均匀设计法

遗传算法

神经算法

## 发酵培养技术

- ❖ 选择合适的培养基；提供适宜的环境条件
- ❖ 微生物发酵工艺过程的三个工段：

种子制备      接种      发酵培养

保证菌种的性能处于最佳状态：是保障发酵产量的重要手段





## 种子制备

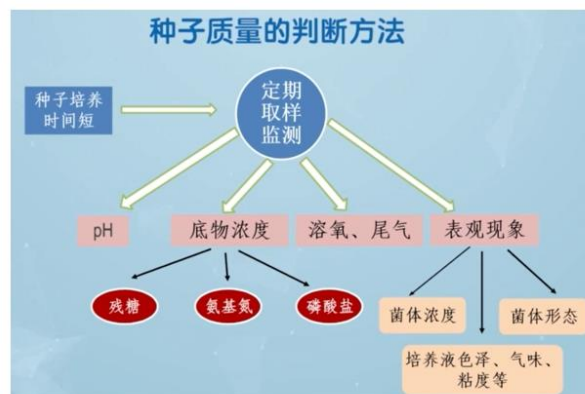


获得高质量种子的关键因素：**接种龄**，**接种量**

**接种龄**：在种子罐中培养的菌种自接入该种子罐培养到转入下一级种子罐或发酵罐时所经历的时间。

**种龄**：微生物接种培养后所经历的培养时间

**接种量**：移入到发酵罐中的种子液体积与接种后培养液总体积的比例



### 大量地接入培养成熟的菌种的优点：

- ❖ 1.可以缩短生长过程的延缓期，因而缩短了发酵周期，提高了设备利用率，
- ❖ 2.节约了发酵培养的动力消耗，
- ❖ 3.并有利于减少染菌机会，
- ❖ 一般都将菌种扩大培养，进行两级发酵或三级发酵。
- ❖ 接种量和培养物的生长过程的延缓期长短呈反比。
- ❖ 接种量过多也无必要。因培养种子费时，而且过多地移入代谢废物，反而会影响正常发酵。

### 孢子制备

- ❖ 种子活化：将保存菌种接种在固体培养基上，在适宜条件下培养，恢复其固有生物特性。
- ❖ 放线菌孢子：采用琼脂斜面培养基。
- ❖ 霉菌孢子：大米、小米、玉米、麸皮、麦粒等天然农产品为培养基。
- ❖ 细菌：采用碳源有限而氮源丰富的配方。

### 生产种子制备

- ❖ 摇瓶种子制备：母瓶、子瓶。
- ❖ 种子罐种子制备：一级、二级、三级种子。
- ❖ 种子罐级数：制备种子需逐级扩大培养的次数
- ❖ 确定种子级数的因素：
- ❖ 菌种生长特性及菌体繁殖速度：生长快，少
- ❖ 发酵罐的容积：越大，多
- ❖ 产物的品种及生产规模：越大，多

- ❖ 所选用工艺条件：有利于生长的工艺，少

## ❖ 发酵培养基的设计和优化

### 摇瓶、反应器培养基研究的两个层次

- 摇瓶——培养基设计的第一步
- 反应器——最终的优化的基础配方

#### 例：青霉素发酵

发酵摇瓶：玉米浆4%，乳糖10%， $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$  0.8%

轻质碳酸钙1%

发酵罐：葡萄糖流加控制总量10-15%，玉米浆总量4-8%

补加硫酸、前体等

摇瓶发酵培养基和罐的基础培养差别很大

### 发酵类型的定义：

- ❖ 一级发酵：将孢子或菌丝接入直接发酵罐
- ❖ 二级发酵：经过一级种子罐，再到发酵罐；谷氨酸生产
- ❖ 三级发酵：二级种子扩大培养，经过二次种子罐，再接入发酵罐。青霉素生产
- ❖ 四级发酵：三级种子扩大培养，经过三级种子罐，再到发酵罐。链霉素生产菌

### 接种方式

- ❖ 单种法：一个种子罐的种子接种一只发酵罐。
- ❖ 双种法：两个种子罐的种子接种一只发酵罐。

❖ 倒种法：从发酵罐中取出一定量发酵液，接种到另一个发酵罐。

#### 发酵级数的确定

一般由菌丝体培养开始计算发酵级数，但有时，  
工厂从第一级种子罐开始计算发酵级数

谷氨酸：三级发酵

一级种子（摇瓶）→二级种子（小罐）→发酵

青霉素：三级发酵

一级种子（小罐）→二级种子（中罐）→发酵

## 2 培养技术

A 固体表面培养技术：Solid surface culture

原始，最早采用。

B 液体深层培养：Liquid submerged culture

主要的发酵培养技术

C 高密度培养（high cell density culture）

概念：菌体浓度（干重）至少达到 50g/L 以上的一种理想培养，发酵工艺目标和方向。

优点：

❖ 缩小发酵体积

❖ 增加表达量

❖ 成本低，生产率高。

## 3 发酵培养的操作方式

A 分批式操作；间歇式操作；不连续操作

B 流加式操作，补料一分批式操作

C 半连续式操作，反复分批式或换液培养

D 连续式操作，衡态操作

## E 灌流式操作

### A 分批式操作

- ❖ 概念：培养液一次性装入发酵罐，一次性接种，经过一段时间培养，一次性卸出全部培养物。
- ❖ 特点：非衡态过程—发酵体系的组成（基质、产物及细胞浓度）都随发酵时间而变化。
- ❖ 缺点：开始时基质浓度很高，到中后期，营养物浓度很低，产物浓度很高，对发酵不利。
- ❖ 辅助时间：清洗罐，装料、灭菌，时间长。

### B 流加式操作

- ❖ 概念：装入大部分培养液，一次性接种，在培养过程中连续不断补充新培养基，但不取出培养液。
- ❖ 特点：
- ❖ 流加能源和碳源物质及氨水等。
- ❖ 克服了批式的缺点，使生长和生产保持适宜水平。
- ❖ 缺点：整个发酵体积不断增加。

### C 半连续式操作

- ❖ 概念：培养液一起装入发酵罐，一次性接种。间歇取出部分发酵培养物（带放），同时补充同等数量的新培养基；然后继续培养，直至发酵结束。
- ❖ 特点：
- ❖ 发酵罐内的培养液总体积保持不变
- ❖ 使生长和生产保持适宜水平。

- ❖ 缺点：丧失部分前体，丧失部分菌体，利于非生产菌突变株的生长

#### **D 连续式操作**

- ❖ 概念：培养液一起装入发酵罐，接种后培养过程中，不断补充新培养基,同时取出包括培养液和菌体在内的发酵液，直至发酵结束。
- ❖ 特点：恒定状态的发酵，发酵罐内体积及其物系的组成将不随时间而变。培养基连续稳定流加；产物连续稳定收获；提高菌体密度；自动化。
- ❖ 缺点：时间长，杂菌污染、突变机会增多。

#### **E 灌流（注）式操作**

- ❖ 概念：培养液与菌体一起装入发酵罐，菌体培养过程中，不断补充新培养基，取出部分条件培养基，菌体仍然滞留罐内。
- ❖ 特点：除去有毒害的代谢物，补充营养物质。

### **7.5.5 教学方法**

本单元的教学方法主要采用课堂讲授、举例和讨论的形式进行。

### **7.5.6 作业安排及课后反思**

查阅资料，了解培养条件的确定、发酵培养基的选择。

### **7.5.7 课前准备情况及其他相关特殊要求（教师、学生）**

教师认真备课；学生上课前对参考教材进行预习。

### **7.5.8 参考资料（具体到哪一章节或页码）**

《发酵工程原理与技术》，余龙江主编，发酵培养基设计与优化（p39-p43）

种子扩大原理与技术（p75-p84）

## 7.6 教学单元六 第4章 发酵动力学（分批发酵动力学）（2学时）

### 7.6.1 教学日期

第三周 第六讲

### 7.6.2 教学目标

掌握发酵动力学主要研究内容及相关参数概念，掌握细胞生长、基质消耗、产物形成的质量衡算方法，掌握 Monod 方程的生物学意义及参数求解，掌握分批发酵的动力学特征。

### 7.6.3 教学内容（含重点、难点）

重点：微生物细胞生长、基质消耗以及产物合成的质量衡算，Monod 方程应用及发酵动力学参数求解。

难点：分批发酵动力学方程的生物学意义及其应用。

### 7.6.4 教学过程

#### 发酵动力学

是研究发酵过程中菌体生长、基质消耗、产物生成的动态平衡及其内在规律，定量描述微生物生长和产物形成过程。包括细胞生长动力学，基质消耗动力学，产物合成动力学。

#### 发酵动力学的内容：

- 1.发酵动力学参数特征：微生物生长速率、发酵产物合成速率、底物消耗速率及其转化率、效率等；
- 2.影响发酵动力学参数的各种理化因子；
- 3.发酵动力学的数学模型。

#### 发酵动力学的意义：

确定最佳发酵工艺条件，建立工艺参数控制方案。模拟使生产控制达到最优化。

### 如何研究发酵动力学？

#### ①了解发酵动力学参数

##### 本征动力学参数

反映某种微生物在特定培养条件下所特有的生长、产物合成、基质消耗等代谢过程变化的特征参数，如微生物对底物的亲和常数  $K_s$ 、最大比生长速率  $\mu_m$  等；

##### 表观动力学特征参数

反映的是微生物细胞群体代谢的宏观特征，如微生物比生长速率  $\mu$ 、底物消耗速率  $-dS/dt$  等；

#### ②构建发酵动力学的数学模型

表征微生物生长、底物消耗与产物合成之间定量关系。

### 发酵类型分为

固体发酵、浅层液体发酵、深层液体发酵

以发酵工业中应用比较广泛的液体深层发酵的三种发酵方式为例，针对微生物发酵的表观动力学，通过研究微生物群体生长、代谢，来定量反映细胞群体表观速率变化规律。



细胞生长动力学

基质消耗动力学

产物合成动力学

## 4.2 分批发酵动力学

分批发酵：一次性投料、接种直到发酵结束的过程。



## 微生物发酵阶段

发酵前期(fermentation prophase): 菌体生长期

发酵中期(fermentation metaphase): 产物合成(分泌)期

发酵后期(fermentation anaphase): 菌体自溶期

### 发酵前期特征

- ❖ 从接种至菌体达到一定临界浓度的时间, 包括延滞期、对数生长期和减速期。
- ❖ 代谢特征: 碳源、氮源等基质不断消耗, 减少
- ❖ 生长特征: 菌体不断地生长和繁殖, 生物量增加。
- ❖ 溶氧变化: 不断下降, 菌体临界值时, 浓度最低。
- ❖ pH变化: 先升后降—先氨基酸作为碳源, 释放出氨, 而后氨被利用。先降后升—先用糖作为碳源, 释放出丙酮酸等有机酸, 后又被利用。

### 发酵中期特征

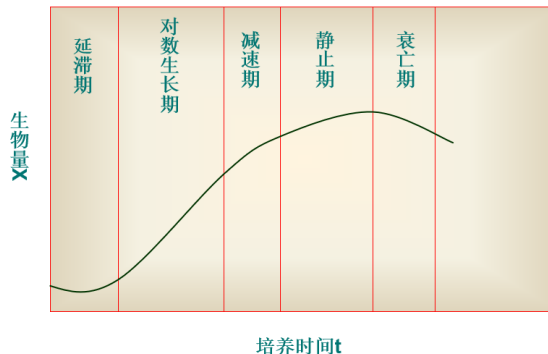
- ❖ 以次级代谢产物或目标产物的生物合成为主的一段时间。
- ❖ 菌体生长恒定就进入产物合成阶段
- ❖ 呼吸强度: 无明显变化, 不增加菌体数目
- ❖ 产物量: 逐渐增加, 生产速率加快, 直至最大高峰, 随后合成能力衰退。
- ❖ 对外界变化敏感: 容易影响代谢过程, 从而影响整个发酵进程。

## 发酵后期特征

- ❖ 菌体衰老，细胞开始自溶的一段时间
- ❖ 合成产物能力衰退，生产速率减慢。
- ❖ 氨基氮含有增加，pH上升
- ❖ 发酵必须结束，否则产物被破坏
- ❖ 菌体自溶给过滤和提取等带来困难。
- ❖ 自溶作用（autolysis）自溶作用是细胞的自我毁灭，溶酶体将酶释放出来将自身细胞降解。在正常情况下，溶酶体的膜是十分稳定的，不会对细胞自身造成伤害。如果细胞受到严重损伤，造成溶酶体破裂，那么细胞就会在溶酶体酶的作用下被降解，如某些红细胞常会有这种情况发生。在多细胞生物的发育过程中，自溶对于形态建成具有重要作用。

## 制药微生物的生长动力学

菌体的生物量与时间的关系是**S**形曲线



### (1) 延迟期

延滞期（lag phase）或适应期是指接种后，菌体的生物量没有明显增加的一段时间。延迟期是菌体适应环境的过程。延迟期时间长短不一，与遗传和环境因素有关，由菌体与环境相互作用的程度决定的。因不同接种量、不同菌种和菌龄等而表

现不同。工业上希望延迟期越短越好，常采用如种子罐与发酵罐培养基尽量接近，对数期的菌体作为种子、加大接种量等方法进行放大培养和发酵生产。

## **(2)对数生长期**

对数生长期(log phase)是菌体快速繁殖，生物量的增加呈现对数速度增长的过程。特点是生长速率达到最大值，并保持不变。细胞的化学组成与生理学性质稳定。菌体生长不受限制，细胞分裂繁殖和代谢极其旺盛。可以认为细胞组分恒定，菌体细胞的生长速率与生物量是一级动力学关系。

## **(3) 减速期**

减速期(decline phase)是指菌体生长速率下降的一段时间。由培养基中基质浓度下降，有害物质积累等不利因素引起。在减速期内，生长速率与菌体浓度仍符合一级动力学关系，但受基质浓度限制。一般生物的减速期较短。

## **4) 静止期**

静止期(decline phase)是指菌体净生长速率为零的一段时间。分裂与死亡同步进行，生长和死亡速率相等。

## **(5) 衰亡期**

衰亡期(decline phase)是指菌体死亡速率大于生长速率的一段时间，这时，细胞自溶，死亡加速，细胞浓度迅速下降。菌体死亡速率也符合一级动力学：

## 细胞比生长速率

单位菌体浓度的细胞生长随时间变化率

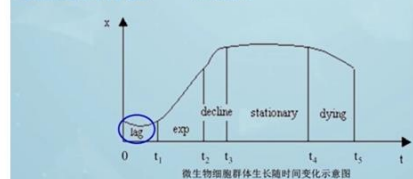
$$\mu = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} \quad \text{或} \quad \mu_n = \frac{1}{N} \frac{dN}{dt}$$

$X$ —细胞浓度 (g/L) ;  $N$ —细胞个数;  $t$ —生长时间;

$\mu$  —以细胞浓度表示的比生长速率;

$\mu_n$  —以细胞数量表示的比生长速率。

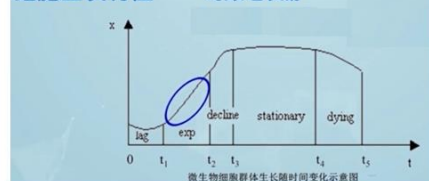
细胞生长特征——延迟期



细胞适应环境 → 未增殖、数量几乎不变

$$\mu = 0 \quad \frac{dX}{dt} = 0 \quad X = X_0$$

细胞生长特征——对数增长期



微生物比生长速率达到最大

$$\mu = \mu_m \quad \frac{dX}{dt} = \mu_m \cdot X$$

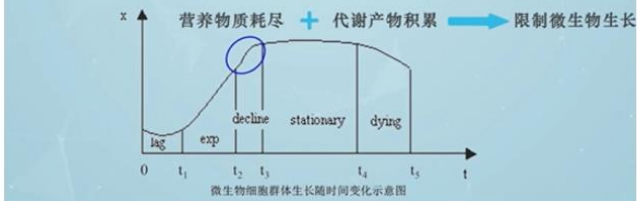
$$\ln x = \ln x_0 + \mu_m t$$

$$x = x_0 e^{\mu_m t}$$

$X_0$ 、 $X_t$ —初始微生物浓度和 $t$ 时细胞浓度;

$N_0$ 、 $N_t$ —初始细胞个数和 $t$ 时细胞个数;

### 细胞生长特征 —— 衰减期



比生长速率 $\mu$ 满足Monod方程

$$\mu = \frac{\mu_m S}{K_s + S}$$

菌体生物量

$$\ln x = \ln x_0 + \mu_m t$$

$$x = x_0 e^{\mu_m t}$$

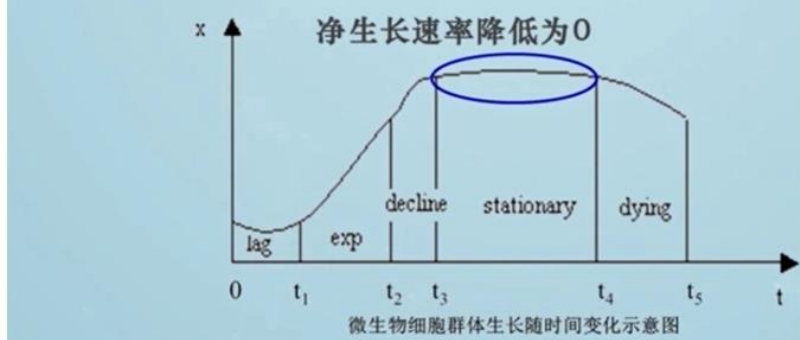
若发酵液中不存在抑制物时，Monod 模型：

$$\mu = \frac{\mu_m S}{K_s + S}$$

式中：S—限制性基质浓度，mol/m<sup>3</sup>

K<sub>s</sub>—底物亲和常数(也称半饱和速度常数)，表示微生物对底物的亲和力；K<sub>s</sub>越大，亲和力越小， $\mu$ 越小，底物利用率越慢。

### 细胞生长特征 —— 稳定期



$$\mu = \frac{1}{x} \frac{dx}{dt} = 0, \quad x = x_{\max} \text{ (浓度最大)}$$

不生长或生长率与死亡率相等

## 细胞生长特征——Monod 模型

$$\mu = \frac{\mu_m S}{K_s + S}$$

- 在无抑制作用情况下（但有底物限制存在）

如下三种不同表达式

$$\mu = \mu_m \left[ 1 - \exp\left(-\frac{S}{K_s}\right) \right]$$

$$\mu = \mu_m \frac{S^n}{K_s + S^n}$$

$$\mu = \mu_m \frac{S}{K_s x + S}$$

式中  $n$  为常数  
 $x$  为细胞浓度

## 细胞生长特征——Monod 模型

$$\mu = \frac{\mu_m S}{K_s + S}$$

- 培养液中有抑制物的情形

- ① 高浓度底物抑制存在的情况下

$$\mu = \frac{\mu_m}{1 + K_s / S + S / K_{is}}$$

式中， $K_{is}$  为抑制常数，  
抑制作用越强， $K_{is}$  越小

- ② 高浓度产物抑制的情况下

$$\mu = \mu_m \frac{S}{K_s + S} (1 - kP) \Rightarrow \text{线性}$$

$$\mu = \mu_m \frac{S}{K_s + S} \exp(-kP) \Rightarrow \text{指数}$$

$$\mu = \mu_m \frac{S}{K_s + S} - k_1(P - k_2) \Rightarrow \text{产物积累一定量才有抑制作用}$$

其中： $k$ ， $k_1$ ， $k_2$  为常数

## 分批发酵动力学参数间定量关系

延迟期	$\mu = \begin{cases} 0 \\ \mu_m \\ \frac{\mu_m s}{K_s + s} \\ 0 \\ -a \end{cases}$	$x = \begin{cases} x_0 & (0 < t < t_1) \\ x_0 e^{\mu_m (t-t_1)} & (t_1 < t < t_2) \\ x_0 e^{\mu_m (t_2-t_1)} e^{\mu (t-t_2)} & (t_2 < t < t_3) \\ x_m & (t_3 < t < t_4) \\ x_m e^{-a (t-t_4)} & (t_4 < t < t_5) \end{cases}$
指数生长期		
衰减期		
稳定期		
衰亡期		

## 基质消耗动力学

基质作用 {

- 合成新的细胞物质；
- 合成微生物代谢产物；
- 提供微生物细胞生命活动的能量

**得率系数：**消耗单位营养物所生成的细胞或产物的量。

### 生长得率系数

- ①  $Y_{x/s}$ 、 $Y_{x/o}$ 、 $Y_{x/kcal}$ ：消耗每克营养物、每克分子氧以及每千卡能量所生成的细胞克数；
- ②  $Y_{x/c}$ 、 $Y_{x/N}$ 、 $Y_{x/p}$ 、 $Y_{x/Ave^-}$ ：消耗每克C、每克N、每克P和每个有效电子所生成的细胞克数；
- ③  $Y_{x/ATP}$ ：消耗每克分子的三磷酸腺苷生成的细胞克数。

产物得率系数:

$$Y_{p/s}, Y_{P/O_2}, Y_{ATP/s}, Y_{CO_2/s}$$

消耗每克营养物(s)或每克分子氧(O<sub>2</sub>)生成的产物(P)、ATP或CO<sub>2</sub>的克数。

表观得率: 对底物的总消耗而言的细胞得率

$$Y_{x/s} = \frac{\Delta x}{\Delta s} \quad Y_{p/s} = \frac{\Delta p}{\Delta s}$$

专一性得率: 专一性用于生长的底物量 $\Delta S'$

$$Y_G = \frac{\Delta x}{\Delta s'} \quad Y_P = \frac{\Delta p}{\Delta s'}$$

\*专一性用于生长的底物量 $\Delta S'$ 不含用于维持能耗及产物形成部分的用量。

## 基质消耗动力学

基质消耗速率与生长、合成关系如下:

表观:  $\frac{dx}{dt} = -Y_{x/s} \cdot \frac{ds}{dt} \Rightarrow -\frac{ds}{dt} = \frac{1}{Y_{x/s}} \cdot \frac{dx}{dt} = \frac{\mu x}{Y_{x/s}}$

$$\frac{dp}{dt} = -Y_{p/s} \cdot \frac{ds}{dt} \Rightarrow -\frac{ds}{dt} = \frac{1}{Y_{p/s}} \cdot \frac{dp}{dt}$$

专一性:  $-\frac{ds}{dt} = \frac{\mu x}{Y_G} + mx + \frac{1}{Y_P} \cdot \frac{dp}{dt}$

**m**为维持细胞结构和生命活动所需能量的细胞维持系数



•为了扣除细胞量的影响

•定义：基质比消耗速率  $q_S = -\frac{1}{x} \cdot \frac{ds}{dt}$

产物比生成速率  $q_P = \frac{1}{x} \cdot \frac{dP}{dt}$

$$q_S = \frac{\mu}{Y_G} + m + \frac{q_P}{Y_P} \quad \leftarrow -\frac{ds}{dt} = \frac{\mu x}{Y_G} + mx + \frac{1}{Y_P} \cdot \frac{dp}{dt}$$

$$q_S = \frac{\mu}{Y_{X/S}} \quad \leftarrow -\frac{ds}{dt} = \frac{1}{Y_{X/S}} \cdot \frac{dx}{dt} = \frac{\mu x}{Y_{X/S}}$$

$$q_S = \frac{q_P}{Y_{P/S}} \quad \leftarrow -\frac{ds}{dt} = \frac{1}{Y_{P/S}} \cdot \frac{dp}{dt}$$

$$\frac{\mu}{Y_{X/S}} = \frac{\mu}{Y_G} + m + \frac{q_P}{Y_P} = \frac{q_P}{Y_{P/S}}$$

若生长阶段产物生成可以忽略，即  $\frac{q_P}{Y_P} \approx 0$

$$\frac{1}{Y_{X/S}} = \frac{1}{Y_G} + \frac{m}{\mu}$$

$$\frac{\mu}{Y_{X/S}} = \frac{\mu}{Y_G} + m + \frac{q_P}{Y_P} = \frac{q_P}{Y_{P/S}}$$

若生产阶段微生物生长可以忽略,  $\frac{\mu}{Y_G} \approx 0$

$$\frac{1}{Y_{P/S}} = \frac{1}{Y_P} + \frac{m}{q_P}$$

## 产物合成动力学

根据发酵时间过程分析, 微生物生长与产物合成存在以下三种关系:

- 与生长相关→生长偶联型
- 与生长部分相关→生长部分偶联型
- 与生长不相关→无关联

### I 型: 菌体生长与产物生成偶联型(coupling model)

菌体的生长与产物生成直接关联, 生长期与生产期是一致的。细胞生长、基质消耗、能源利用和产物生成动力学曲线几乎平行, 变化趋势同步, 都有最大值, 出现的时间接近。

## ❖ I型：菌体生长与产物生成偶联型

乙醇、乳酸、醋酸等初级分解代谢产物的生成属于此类型。

所以产物生成速率和比速率分别为：

$$r_p = \frac{dP}{dt} = Y_p \frac{dX}{dt} = Y_p \mu X; \quad q_p = \mu Y_p$$

$P$ 为产物生成量， $Y_p$ 为产物生成的得率系数

## ❖ II型：菌体生长与产物生成半偶联型（semi-coupling model）

该模型介于偶联和非偶联模型之间，产物生成与基质消耗、能量利用之间存在间接关系。产物来自能量代谢所用的基质，但是在次级代谢与初级代谢分开的。

在细胞生长期內，基本无产物生成，在生长的中后期生成大量的产物而进入产物形成期。分批发酵出现两个高峰，先是基质消耗和菌体生长的高峰，然后是产物形成的高峰。

### ❖ II型：菌体生长与产物生成半偶联型（semi-coupling model）

如柠檬酸和氨基酸的发酵，一部分组成型表达的蛋白质药物也属于此类型。产物生成速率和比速率分别为：

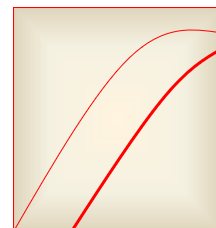
$$r_p = \frac{dP}{dt} = \alpha \mu X + \beta X$$

$$q_p = \alpha \mu + \beta$$

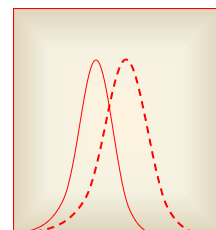
$R_p$ 为产物生成率； $Y_p$ 为产物生成的得率系数； $Q_p$ 为比速率； $P$ 为产物生成量， $\alpha, \beta$ 为常数

产物间接由能量代谢生成，不是底物的直接氧化产物，而是菌体内生物氧化过程的主流产物（与初生代谢紧密关联）。

生物量或产量



比生长或比生长速率



时间t

### ❖ III 型：菌体生长与产物生成非偶联型（non-coupling model）

菌体生长期与产物生成期为独立的两个阶段，先形成物质消耗和菌体生长高峰，几乎没有或很少有产物生成，然后进入菌体生长静止期，产物大量生成，并出现产物高峰。

产物可能来自于中间代谢途径，而不是分解代谢过程，物质消耗和菌体生长之后，菌体利用中间代谢途径，初级代谢与产物形成是完全分开的。

### 与生长不相关→无关联：抗生素发酵

$$\frac{dP}{dt} = \beta x \Rightarrow q_p = \beta$$

若考虑到产物可能存在分解时，则

$$\frac{dP}{dt} = \beta x - k_d P = q_p x - k_d P$$

产物生成与能量代谢不直接相关，通过细胞进行的独特的生物合成反应而生成。

### 分批发酵的优缺点

优点：

- 操作简单、投资少
- 运行周期短
- 染菌机会减少
- 生产过程、产品质量较易控制

缺点：

- 不利于测定过程动力学，存在底物限制或抑制问题，会出现底物分解阻遏效应及二次生长现象。

- 对底物类型及初始高浓度敏感的次级代谢物如一些抗生素等就不适合用分批发酵（生长与合成条件差别大）
- 养分会耗竭快，无法维持微生物继续生长和生产
- 非生产时间长，生产率较低

### 7.6.5 教学方法

本单元的教学方法采用课堂讲授发酵动力学基本参数及求解。

### 7.6.6 作业安排及课后反思

查阅资料，了解微生物的发酵动力学及其应用。

### 7.6.7 课前准备情况及其他相关特殊要求（教师、学生）

教师认真备课；学生上课前对参考教材进行预习。

### 7.6.8 参考资料（具体到哪一章节或页码）

《发酵工程原理与技术》，余龙江主编，发酵动力学（p86-p96）

## 7.7 教学单元七 第4章 发酵动力学（连续发酵动力学等）（2学时）

### 7.7.1 教学日期

第四周 第七讲

### 7.7.2 教学目标

掌握连续发酵动力学及补料分批发酵的动力学特征。

### 7.7.3 教学内容（含重点、难点）

重点：连续发酵动力学及补料分批发酵的动力学特征。

难点：连续发酵动力学方程的生物学意义及其应用。

### 7.7.4 教学过程

## 连续发酵

**概念：**在发酵过程中，连续向发酵罐流加培养基，同时以相同流量从发酵罐中取出培养液。

**连续发酵特点：**

添加培养基的同时，放出等体积发酵液，形成连续生产过程，获得相对稳定的连续发酵状态。

**连续发酵类型：**单级 和 多级连续发酵

## 单级恒化器连续发酵动力学

**定义：**

① 稀释率  $D=F/V$  ( $\text{h}^{-1}$ )

$F$ —流量 ( $\text{m}^3/\text{h}$ )     $V$ —培养液体积 ( $\text{m}^3$ )

② 理论停留时间

$$T_L = \frac{1}{D}$$

### 单级恒化器连续发酵

#### ● 细胞的物料衡算 ( $\mu$ 和 $D$ 的关系)

积累的细胞 (净增量) = 流入的细胞-流出的细胞+生长的细胞-死亡的细胞

$$\begin{aligned}\frac{dx}{dt} &= \frac{F}{V}x_0 - \frac{F}{V}x + \left(\frac{dx}{dt}\right)_G - \alpha x \\ &= Dx_0 - Dx + \mu x - \alpha x\end{aligned}$$

对于单级恒化器：  $x_0 = 0$  且通常有：  $\mu \gg \alpha$

$$\therefore \frac{dx}{dt} = (\mu - D)x$$

## 单级恒化器连续发酵

### ● 限制性基质的物料衡算

积累的营养组分=流入量-流出量-生长消耗量-  
维持生命需要量-形成产物消耗量

$$\frac{ds}{dt} = \frac{F}{V} S_0 - \frac{F}{V} S - \frac{\mu x}{Y_{X/S}} - mx - \frac{q_P x}{Y_{P/S}}$$

稳态时,  $\frac{ds}{dt} = 0$ , 一般条件下,  $mx \ll \frac{\mu x}{Y_{X/S}}$

产物相对菌体生长量较少,  $\frac{q_P x}{Y_{P/S}} \approx 0$

$$\therefore D(S_0 - S) = \frac{\mu x}{Y_{X/S}}$$

限制性基质的物料衡算  $D(S_0 - S) = \frac{\mu x}{Y_{X/S}}$

稳态时,  $\mu = D$

$$x = Y_{X/S}(S_0 - S)$$

单级连续培养两个稳态方程是:

$$\begin{cases} \mu = D \\ x = Y_{X/S}(S_0 - S) \end{cases}$$

## 产物的物料衡算

❖ 产物变化率=细胞合成产物速率+流入-流出-分解项

$$\begin{aligned}\frac{dP}{dt} &= \left( \frac{dP}{dt} \right)_{\text{细胞合成}} + DP_0 - DP - k_D P \\ &= q_P x + D(P_0 - P) - k_D P\end{aligned}$$

❖ 当连续发酵处于稳态,  $\left( \frac{dP}{dt} \right)_{\text{总变化}} = 0$  ,

且加料中不含产物, 即  $P_0 = 0$  , P分解速率可忽略。

得  $DP = q_P x$

## 多级恒化器连续发酵

假设两级发酵罐内培养体积相同, 即  $V_1=V_2$ ; 且第二级不加入新鲜培养基, 则对于第一级动力学模型(方程)与单级相同。

稳态时

$$\left\{ \begin{array}{l} \mu_1 = D \\ x_1 = Y_{X/S}(S_0 - S_1) \\ S_1 = \frac{K_s D}{\mu_m - D} \\ Dx_1 = DY_{X/S} \left( S_0 - \frac{K_s D}{\mu_m - D} \right) \\ DP_1 \approx q_P x_1 \end{array} \right.$$



## ● 多级恒化器的第二级动力学模型

$$\mu_1 = \frac{\mu_m S_1}{k_s + S_1} = \frac{\mu_m}{1 + K_S/S_1}$$

$$\mu_2 = \frac{\mu_m S_2}{k_s + S_2} = \frac{\mu_m}{1 + K_S/S_2}$$

$$\because S_1 < S_0, \quad S_2 < S_1$$

$$\therefore \mu_2 < \mu_1 = D$$

从第二级开始, 比生长速率  $\mu_n$  不再等于稀释率  $D$

## 第二级细胞物料衡算

$$\frac{dx_2}{dt} = Dx_1 - Dx_2 + \mu_2 x_2 - \alpha x_2$$

$$\text{第二级稳态时, } \frac{dx_2}{dt} = 0, \therefore \mu_2 = D \left( 1 - \frac{x_1}{x_2} \right)$$

$$\text{同理, 由稳态方程可得, } \mu_n = D \left( 1 - \frac{x_{n-1}}{x_n} \right)$$

## ● 第二级基质物料衡算

$$\frac{dS_2}{dt} = DS_1 - DS_2 - \frac{\mu_2 x_2}{Y_{X/S}} - mx_2 - \frac{q_P x_2}{Y_{P/S}}$$

$$\diamond \text{ 稳态时, } \frac{dS_2}{dt} = 0$$

$$x_2 = \frac{DY_{X/S}}{\mu_2} (S_1 - S_2) = Y_{X/S} \frac{D}{\mu_2} (S_1 - S_2)$$

## 第二级基质物料衡算

$$\mu_2 = D \left( 1 - \frac{x_1}{x_2} \right) \quad x_2 = Y_{X/S} \frac{D}{\mu_2} (S_1 - S_2)$$

$$x_2 - x_1 = Y_{X/S} (S_1 - S_2)$$

$$\begin{aligned} x_2 &= x_1 + Y_{X/S} (S_1 - S_2) \\ &= Y_{X/S} (S_0 - S_1) + Y_{X/S} (S_1 - S_2) \end{aligned}$$

$$\therefore x_2 = Y_{X/S} (S_0 - S_2)$$

### ● 细胞形成产物的速率： $DP_2$

$$\begin{aligned} \frac{dP_2}{dt} &= DP_1 - DP_2 + \left( \frac{dP_2}{dt} \right)_{\text{细胞合成}} - kP_2 \\ &= DP_1 - DP_2 + q_P x_2 \end{aligned}$$

$$\diamond \text{ 稳态时 } \frac{dP_2}{dt} = 0$$

$$\therefore DP_2 = DP_1 + q_P x_2 = q_P x_1 + q_P x_2$$

- 第二级发酵罐产物浓度

$$P_2 = P_1 + \frac{q_P x_2}{D}$$

同理类推

$$P_n = P_{n-1} + \frac{q_P x_n}{D}$$

### 细胞回流单级恒化器连续发酵

- 细胞生长动力学方程

❖ 细胞的物料衡算( $\mu$ 与 $D$ 的关系)

积累的细胞=进入培养液中的细胞+再循环流入的细胞  
-流出的细胞+生长的细胞-死亡的细胞

$$\frac{dx_1}{dt} = \frac{F}{V} x_0 + \frac{aF}{V} \cdot C_{x_1} - \frac{(1+a)F}{V} x_1 + \mu x_1 - \alpha x_1$$

假定：细胞死亡很少 ( $\alpha=0$ )

培养基无菌加入 ( $x_0=0$ )

$$D=F/V$$

由稳态条件  $\frac{dx_1}{dt} = 0$

$$aDCx_1 - (1+a)Dx_1 + \mu x_1 = 0$$

得

$$\therefore \mu = D(1+a-aC)$$

❖ 限制性基质的物料衡算 ( $x_1$ 与 $D$ 的关系)

积累的基质 = 进入基质+循环流入基质-流出基质-  
消耗的基质

$$\frac{dS}{dt} = \frac{F}{V}S_0 + \frac{aF}{V} \cdot S - \frac{(1+a)F}{V}S - \frac{\mu x_1}{Y_{x/s}}$$

### ● $x_1$ 与 $D$ 的关系

$$D=F/V$$

稳态时,  $\frac{dS}{dt} = 0$

$$\therefore DS_0 + aDS - (1+a)DS = \frac{\mu x_1}{Y_{x/s}}$$

$$x_1 = \frac{D}{\mu} Y_{x/s} (S_0 - S) \quad \mu = D(1+a-aC)$$

代入 $\mu$ 有:

$$x_1 = \frac{1}{1+a-aC} \cdot Y_{x/s} (S_0 - S)$$

$$\therefore \frac{1}{1+a-aC} > 1$$

∴  $x_1$  比单级无再循环的  $x$  要大

$$\text{又 } \mu = \frac{\mu_m S}{K_s + S} \Rightarrow S = \frac{K_s \mu}{\mu_m - \mu} = K_s \cdot \frac{D(1+a-aC)}{\mu_m - D(1+a-aC)}$$

代入  $x_1$  式, 得

$$x_1 = \frac{Y_{X/S}}{1+a-aC} \left( S_0 - K_s \cdot \frac{D(1+a-aC)}{\mu_m - D(1+a-aC)} \right)$$

### ● 最终流出的细胞量 $x_e$ 与 $D$ 关系

❖ 假定分离器无细胞生长和基质消耗, 则有细胞物料衡算式:

流入分离器细胞 = 流出分离器细胞 + 再循环细胞

$$(1+a)Fx_1 = Fx_e + aF \cdot Cx_1$$

$$\begin{aligned} \therefore x_e &= (1+a-aC)x_1 = Y_{X/S}(S_0 - S) \\ &= Y_{X/S} \left[ S_0 - \frac{K_s D(1+a-aC)}{\mu_m - D(1+a-aC)} \right] \end{aligned}$$

### 连续发酵动力学的优缺点

- ❖ 添加新鲜培养基, 克服养分不足所导致的发酵过程过早结束, 延长对数生长期, 增加生物量等;
- ❖ 在长时间发酵中, 菌种易于发生变异, 并容易染上杂菌;
- ❖ 如果操作不当, 新加入的培养基与原有培养基不易完全混合。

#### 7.7.5 教学方法

教学方法主要采用课堂讲授、案例分析和课堂讨论的形式进行。

#### 7.7.6 作业安排及课后反思

查阅资料，了解连续发酵动力学。

#### **7.7.7 课前准备情况及其他相关特殊要求**

教师认真备课；学生上课前对参考教材进行预习。

#### **7.7.8 参考资料（具体到哪一章节或页码）**

《发酵工程原理与技术》，余龙江主编，发酵动力学（p96-p108）

## 7.8 教学单元八 第 5 章 发酵制药的灭菌工艺（无菌原理与技术）（2 学时）

### 7.8.1 教学日期

第四周 第八讲

### 7.8.2 教学目标

掌握灭菌方法与原理、培养基灭菌工艺。

### 7.8.3 教学内容（含重点、难点）

重点：掌握灭菌方法与原理及培养基灭菌的注意事项。

难点：理解培养基灭菌的操作方式。

主要知识点：灭菌方法与原理、化学灭菌、物理灭菌、干热灭菌、蒸汽灭菌、培养基灭菌、培养基灭菌的操作方式。

### 7.8.4 教学过程

- ❖ 灭菌：指用化学或物理的方法杀灭或去除物料及设备、空间中所有生物的技术或工艺过程。
- ❖ 发酵和细胞车间：无菌培养，培养基和空气无菌
- ❖ 制剂车间：无菌洁净空间，设备无菌，原料无菌；
- ❖ 制药用水：无菌纯净水
- ❖ 相关工艺：需要验证

概念：

- ❖ 杂菌：除生产菌以外的任何微生物。
- ❖ 污染：感染杂菌的培养或发酵体系。
- ❖ 消毒：杀灭或清除病原微生物，达到无害化程度，杀灭率 99.9% 以上。
- ❖ 杀菌：杀灭或清除一切微生物，达到无活微生物存在的过程，杀灭率 99.9999%

以上。

- ❖ 灭菌：微生物杀灭率 99.999999% 以上。

## 灭菌方法与原理

### 化学灭菌

- ❖ 用化学物质杀灭微生物的灭菌操作。
- ❖ 化学灭菌剂：氧化剂类等，卤化物类，有机化合物等。
- ❖ 机理：蛋白质变性，酶失活，破坏细胞膜透性，细胞死亡。
- ❖ 应用：皮肤表面、器具、实验室和工厂的无菌区域的台面、地面、墙壁及空间的灭菌。

### 常用的灭菌剂:

化学物质名称	有效浓度	化学物质名称	有效浓度
新洁尔灭(苯扎溴铵)	0.25%	甲醛	37%
杜灭芬	0.25%	戊二醛	2%
高锰酸钾	0.1%-0.25%	苯酚	0.1%-0.15%
漂白粉	5%	过氧乙酸	0.02%-0.2%
酒精	75%	焦碳酸二乙酯	0.01%-0.1%
煤酚皂（来苏尔）	1%—5%		

### 物理灭菌

各种物理条件如高温、辐射、超声波及过滤等进行灭菌

紫外线等射线：局部空间

干热灭菌：实验室器皿

蒸汽灭菌：培养基

效果好，操作方便，广泛使用



## 干热灭菌

- ❖ 在高温 120℃ 以上，蛋白质、酶、核酸、生物膜等生物大分子变性、凝聚破坏，甚至是降解，生物细胞破裂，内容物释放，生物体死亡。对于干热灭菌，足够长的时间和足够高的温度，都可以杀灭生物体。干热灭菌效果没有湿热灭菌好，是实验室常用的器皿的方法。工业采用 160℃、2h，或 170℃、1h 干热空气，用于需保持干燥的器械、容器的灭菌。温度越高，时间相应缩短。

## 蒸汽灭菌

- ❖ 湿热灭菌效果优于干热灭菌；
- ❖ 原因在于湿热状态下，穿透力强，蒸汽冷凝时释放出大量能量，使蛋白质、核酸等内部的化学键破坏、降解，导致生物体死亡。
- ❖ 一般在 115℃~140℃，保持一段时间，可以杀死各种生物体。
- ❖ 湿热灭菌常用于培养基和设备容器的灭菌。
- ❖ 常用条件为 115℃~121℃，压力  $1 \times 105 \text{ Pa}$ ，维持 15~30 分钟。

芽孢是一种休眠体，外面有厚膜包裹，耐热性很强，不易杀灭。因此在设计灭菌操作时，经常以杀死芽孢的温度和时间作为指标。为了确保彻底灭菌，实际操作中往往增加 50% 的保险系数。

## 2 培养基灭菌

### 影响培养基灭菌的因素

- ❖ 微生物种类：不同的微生物  $k$  值（比死亡速率）不同。
- ❖ 初始菌浓度：灭菌时间与初始菌浓度的对数成正比。
- ❖ 灭菌时间和温度：温度越高，时间越短
- ❖ 培养基成份：油脂、蛋白质增加微生物的耐热性；固体颗粒影响热穿透。

- ❖ 传热与混合状况：泡沫影响受热均匀度。
- ❖ 蒸汽中空气：降低蒸汽分压和灭菌温度。
- ❖ pH：酸性 pH 下可加快微生物热死速率。

### 灭菌高温对培养基质量的影响

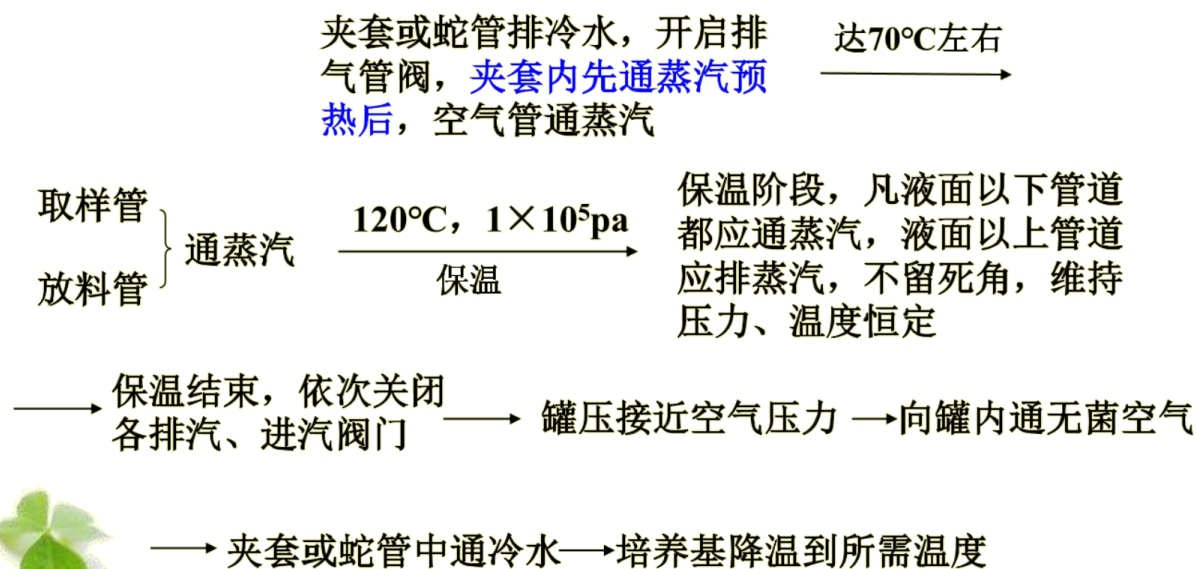
- ❖ 破坏营养：成分降解，褐变，有毒害物质
- ❖ 形成沉淀物：多肽类沉淀，磷酸盐和碳酸盐
- ❖ 改变 pH：一般降低，酸化

### 减少高温有害的措施

- ❖ 采用连续灭菌方法
- ❖ 分别灭菌：含 Ca 或 Fe 的培养基与磷酸盐先作分别灭菌，然后再混合，不易形成磷酸盐沉淀
- ❖ 高温破坏的糖培养基：低压灭菌。
- ❖ 高温破坏维生素等：过滤灭菌

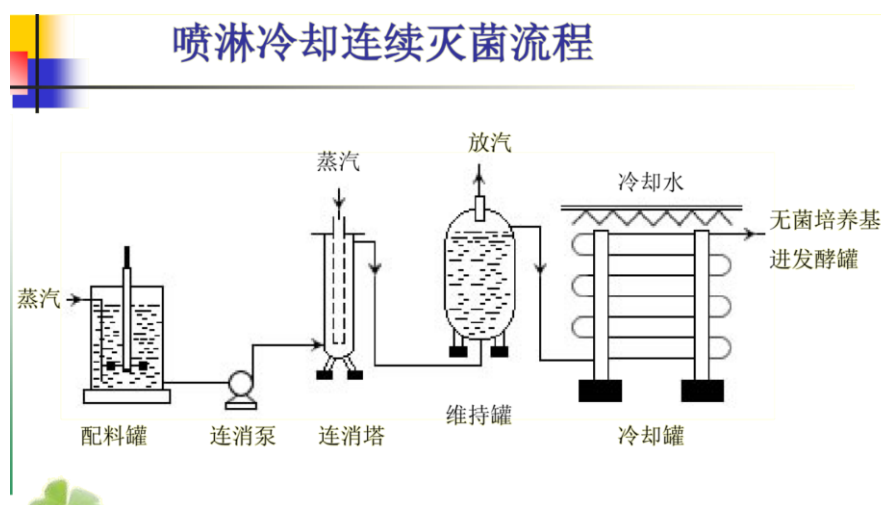
### 培养基灭菌的操作方式

分批灭菌的操作过程：



### 连续灭菌操作

- ❖ 高温短时灭菌操作，连续。
- ❖ 培养基在发酵罐外经过一套灭菌设备连续的加热灭菌，冷却后送入已灭菌的发酵罐内的工艺过程。
- ❖ 加热升温、维持灭菌温度和冷却降温三个阶段由不同的设备执行：加热器，保温设备，冷却器。



### 连续灭菌—操作过程

- ❖ 配料：配料罐，配制培养基。□
- ❖ 预热罐：定容和预加热。70—90℃。□
- ❖ 加热器：培养基与蒸汽混合，快速升到 130—140℃。□
- ❖ 维持罐：维持灭菌时间,5—7 分钟。□
- ❖ 冷却管：培养基经过冷却水管冷却。40—50℃。
- ❖ 输入灭菌的发酵罐中。

### 连续灭菌的特点

- 1) 高温快速灭菌工艺，营养成分破坏的少
- 2) 热能利用合理，易于自动化控制；
- 3) 不适合粘度大或固形物含量高的培养基灭菌；
- 4) 增加了连续灭菌设备及操作环节，增加染菌几率。
- 5) 对压力要求高，一般为 0.45-0.8 MPa

### 连续灭菌的优点：

- 1) 保留较多的营养质量；
- 2) 容易放大；
- 3) 较易自动控制；
- 4) 糖受蒸汽的影响较少（配料分离）；
- 5) 缩短灭菌周期；
- 6) 在某些情况下，可使发酵罐的腐蚀减少；
- 7) 发酵罐利用率高；
- 8) 蒸汽负荷均匀。

### 分批灭菌的优点

- 1) 设备投资较少;
- 2) 染菌的危险性较小;
- 3) 人工操作较方便;
- 4) 对培养基中固体物质含量较多时更为适宜;

#### **7.8.5 教学方法**

教学方法采用课堂讲授、案例分析的形式进行

#### **7.8.6 作业安排及课后反思**

查阅培养基灭菌相关文献，了解灭菌的方法。

#### **7.8.7 课前准备情况及其他相关特殊要求**

教师认真备课；学生上课前对参考教材进行预习。

#### **7.8.8 参考资料（具体到哪一章节或页码）**

《发酵工程原理与技术》，余龙江主编，无菌原理与技术（p56-p66）

### **7.9 教学单元九 第 5 章 发酵制药的灭菌工艺（空气除菌原理与流程设计）（2 学时）**

#### **7.9.1 教学日期**

第六周 第九讲

#### **7.9.2 教学目标**

掌握无菌空气的要求、学习空气除菌的方法、理解空气除菌原理、掌握空气除菌操作工艺。

#### **7.9.3 教学内容（含重点、难点）**

重点：了解菌空气的要求、掌握空气除菌原理。

难点：空气除菌操作工艺。

主要知识点：无菌空气的要求、空气除菌方法、空气除菌原理、空气除菌操作工艺。

#### 7.9.4 教学过程

### 第二节 空气除菌

#### 一、无菌空气的要求

##### 1. 空气中的微生物

细菌和细菌芽孢较多，也有酵母，霉菌孢子和病毒。

微生物大小不一，一般附着在空气中的灰尘上或雾滴上，空气中微生物的含量一般为  $10^3 \sim 10^4$  个 / 米<sup>3</sup>。

灰尘粒子的平均大小约 0.6 $\mu\text{m}$  左右，所以空气除菌主要是去除空气中的微粒(0.6-1 $\mu\text{m}$  )

##### 2. 无菌空气的标准

百分数：99.99%

美国联邦宇航局等级标准：

100 级（直径小于 0.5 微米粒子数少于 3.5 个/L）

温度：25 °C—40°C    湿度：30%—45%

#### 二、空气除菌的方法

##### 1. 加热灭菌

❖ 利用空气被压缩时所产生的热量进行保温杀菌，主要设备为空压机和空气贮罐

##### 2. 辐射杀菌

❖ 利用 240-300nm 的射线，可结合甲醛熏蒸

##### 3. 静电除菌

❖ 采用静电除去微生物、尘埃、水雾和油雾等

##### 4. 过滤除菌

- ❖ 利用过滤器中的过滤介质进行除菌

### 三、过滤介质

- ❖ 原理：过滤介质填充到过滤器中，空气流过时借助惯性碰撞、阻截、扩散、静电吸附、沉降等作用将尘埃微生物截留在介质中，达到除菌的目的。

主要设备：填充床过滤器

#### 1.棉花

- ❖ 传统的过滤介质，棉花纤维直径为 16-21 $\mu\text{m}$ ，装填密度达 150-200 $\text{kg}/\text{m}^3$

#### 2.玻璃纤维

- ❖ 直径为 8-19 $\mu\text{m}$ ，填充系数为 6-10%

#### 3.活性炭

- ❖ 采用直径 3mm，长 5-10mm 圆柱状活性炭，工厂一般夹在两层棉花中间

#### 4.超细玻璃纤维纸

- ❖ 用造纸的方法将超细玻璃纤维（直径 1-1.5 $\mu\text{m}$ ）做成 0.25-1mm 厚的纤维纸，纤维纸的密度为 380 $\text{kg}/\text{m}^3$ 。

#### 5.烧结材料

- ❖ 包括：烧结金属、烧结陶瓷、烧结塑料等

#### 6.石棉滤板

- ❖ 采用 20%的石棉和 80%的纸浆制成。

#### 7.膜过滤

- ❖ 如 Milipore 公司的 0.22 $\mu\text{m}$  的膜式过滤器，采用聚四氟乙烯、偏聚二氟乙烯、聚丙烯、纤维素脂膜等。

### 空气除菌操作工艺

发酵对空气的要求

- ❖ 好氧微生物需要氧气供应，通入空气。
- ❖ 连续一定流量的压缩无菌空气。
- ❖ 压强：0.2-0.4 MPa。
- ❖ 空气质量：相对湿度小于 70%；比培养温度高 10—30℃；洁净度 100 级。

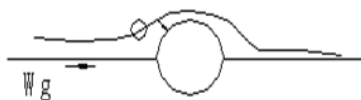
空气除菌原理

空气中附着在尘埃上的微生物大小为 0.5-5 $\mu\text{m}$ 。

是依靠气流通过滤层时，基于滤层纤维的层层阻碍，迫使空气在流动过程中出现无数次改变气速大小和方向的绕流运动，从而导致微生物微粒与滤层纤维间产生撞击、拦截、布朗扩散、重力及静电引力等作用，从而把微生物微粒截留、捕集在纤维表面上，实现了过滤。

### (1) 惯性冲击滞留作用机理

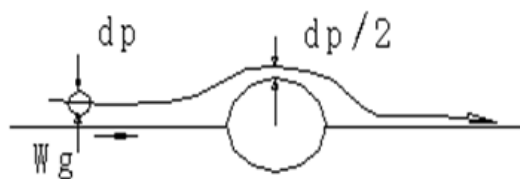
- ❖ 当微粒随气流以一定的速度垂直向纤维方向运动时，空气受阻即改变运动方向，绕过纤维前进，而微粒由于它的运动惯性较大，未能及时改变运动方向随主导气流前进，于是微粒直冲到纤维的表面，由于磨擦粘附，微粒就滞留在纤维表面上。





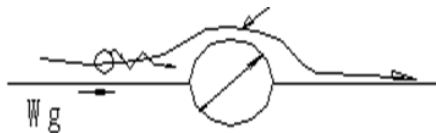
## (2) 拦截滞留作用机理

当气流速度下降到一定值时，若微粒随气流慢慢靠近纤维时，受纤维所阻改变方向，绕过纤维前进，并在纤维的周边形成一层边界滞留区，滞留区的气流流速更慢，当与纤维表面接触时就被捕集。



## (3) 布朗扩散作用机理

直径很小的微粒在很慢的气流中能产生一种不规则的直线运动，称为布朗扩散。



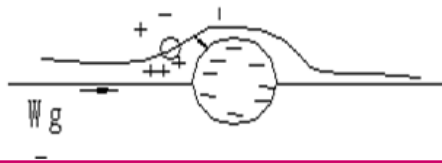
## (4) 重力沉降作用机理

❖ 重力沉降是一个稳定的分离作用，当微粒所受的重力大于气流对它的拖带力时，微粒就容易沉降。

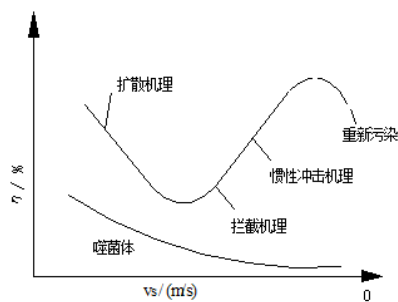


## (5) 静电吸附作用机理

悬浮在空气中的微粒大多带有不同电荷，这些带电的微粒会受带异性电荷的物体所吸引而沉降。



### 除菌效率



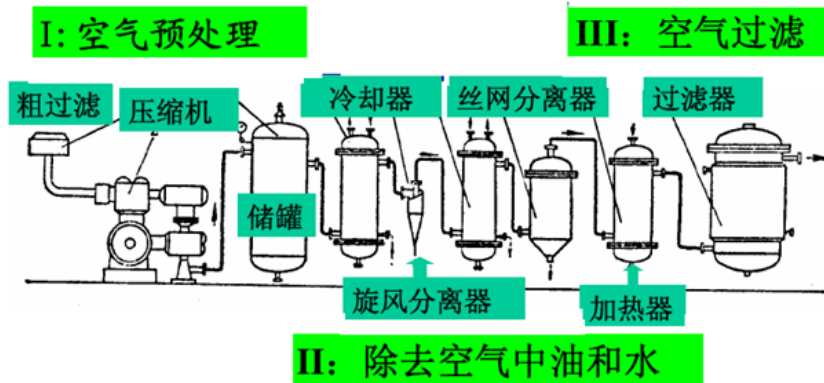
图H-15 过滤除菌效率( $\eta$ )与风速( $v_s$ )的关系

当空气流过介质时，上述五种除菌机理同时起作用，不过气流速度不同，起主要作用的机理也就不同。当气流速度较大时，除菌效率随空气流速的增加而增加，此时惯性冲击起主要作用；当气流速度较小时，除菌效率随气流速度的增加而降低，此时扩散起主要作用；当气流速度中等时，可能是截留起主要作用。如果空气流速过大，除菌效率又下降，则是由于已被捕集的微粒又被湍动的气流夹带返回到空气中。

## 影响深层过滤效率的因素

- ❖ 微粒大小、过滤介质的种类、规格、介质的填充密度、过滤介质层厚度以及所通过的空气气流速度等。

# 空气灭菌工艺过程



## (I) 空气预处理

❖ 目的：提高空气的洁净度

❖ 措施：

(1)高空取气，提高空气吸入口位置，采风塔高，设计流速 8m/s。每升 16m，空气杂菌降一个数量级。

(2)加强过滤，空压机吸入口前安装粗过滤器。流速 0.1-0.5 m/s。

## (II) 除油除水—气液分离设备

❖ 除去空气中油和水：冷却空气湿度 160%，形成油滴和水滴。

❖ 旋风分离器：空气速度 15—25m/s。完全除去 20um 以上离子，对 16um 离子的分离效率为 60—70%。

❖ 丝网除沫器：1um 以上雾滴除去率 98%

空气除菌相关计算概念：

## 空气除菌相关概念

**空气绝对湿度**：1m<sup>3</sup> 湿空气中含有的水蒸气质量(kg)。也就是湿空气的水蒸气密度。

**空气相对湿度 (Φ)：**

- 空气绝对湿度与相同温度下饱和绝对湿度之比
- 或
- 空气中水蒸气分压与相同温度下饱和水蒸气分压之比

$$\Phi = P_w / P_s$$

$P_w$ ——空气中水蒸气分压，Pa

$P_s$ ——相同温度下饱和水蒸气分压，Pa

饱和蒸汽压 $P_s$ 可根据对应表格查得

**空气湿含量 (X)：**1kg干空气中含有的水汽量 (kg/kg干空气)，即湿空气中水蒸气质量与干空气质量之比值。

### 7.9.5 教学方法

教学方法采用课堂讲授、案例分析的形式进行。

### 7.9.6 作业安排及课后反思

了解空气灭菌的原理；

### 7.9.7 课前准备情况及其他相关特殊要求

教师认真备课；学生上课前对参考教材进行预习。

### 7.9.8 参考资料（具体到哪一章节或页码）

《发酵工程原理与技术》，余龙江主编，无菌原理与技术（p68-p71）

## 7.10 教学单元十            第 6 章 发酵制药工艺控制（发酵过程控制及参数检测）（2 学时）

### 7.10.1 教学日期

第六周 第十讲

### 7.10.2 教学目标

掌握常用的发酵培养工艺控制基本原理及应用，理解发酵热的基本原理；了解化学参数的检测与控制。

### 7.10.3 教学内容（含重点、难点）

重点：了解发酵培养工艺控制。

难点：化学参数的检测与控制。

主要知识点：发酵培养工艺控制、生物学检测主要的参数与控制、发酵热、温度的选择原则、温度的控制方式、压力的检测与控制、搅拌的检测与控制、化学参数的检测与控制、供氧原理、临界溶氧测定、影响供氧因素

### 7.10.4 教学过程

发酵过程控制的核心：

- 围绕发酵工艺这条**主线**
- 在弄清发酵动力学过程及其**放大**规律基础上
- **优化**发酵过程参数，并从分子、细胞和反应器**三个层次**揭示参数优化的机理
- 通过发酵放大过程的**优化控制**
- 实现高产、高效、高转化率、低成本**四个目标**，达到产品发酵单位及性价比的最优化。

发酵过程控制的一般步骤：

## 发酵过程控制的一般步骤

确定能反映发酵过程变化的各种参数/因素及其检测方法



确定这些参数/因素的影响机制及其最适水平或范围



建立模型定量描述各参数之间随时间变化的关系



通过计算机在线检测与控制，验证各种控制模型的可行性及其适用范围，实现发酵过程优化控制

发酵过程的参数检测分类：

## 发酵过程的参数检测

参数按性质可分为三类：

### ➤ 生物参数

- 菌体浓度、菌体比生长速率、呼吸强度、摄氧率、菌丝形态、关键酶活力等

### ➤ 物理参数

- 温度、搅拌转速、空气流量、罐压、溶解氧、尾气  $O_2/CO_2$  浓度、表观粘度、发酵液密度等

### ➤ 化学参数

- 基质浓度（碳源、氮源、磷源等）、pH、产物浓度等

并非所有产品的发酵过程中都需检测上述全部参数，而是根据该产品的特点和可能条件，有选择地检测部分参数。

生物学检测主要的参数与控制

❖ 1.细胞形态

❖ 镜检：

☞ 显微镜检测，染色，光学、荧光，电镜

❖ 应用：

❖ 是否污染，发酵过程状态，菌种的真实性。

## 2. 菌体浓度

❖ 概念：

☞ 菌浓：单位体积发酵培养液内菌体细胞的含量。

❖ 应用：

❖ 决定适宜补料量、供氧量等，以得到最佳生产水平。

## 临界菌体浓度控制

❖ 概念：

☞ 摄氧速率与氧传递速率平衡时的菌体浓度

菌体浓度超过此浓度，抗生素的生产速率会迅速下降。

☞ 菌体遗传特性与发酵罐氧传质特性的综合反映。

## 发酵污染杂菌的检测与控制

❖ 种子污染

☞ 培养基灭菌不彻底

❖ 空气带菌

❖ 设备及其附件渗漏

## 物理参数的检测与控制

❖ 1.温度的检测与控制

❖ 发酵温度概念:发酵中的所维持温度

❖ 在生长和生产的最适温度范围内

- ❖ 测定：
- ❖ 热电阻等热敏原件测定，温度计上读出。

### (1) 发酵热的构成与计算

- ❖ 发酵热 (**fermentation heat**)
- ❖ □产生热与散失热之差
- ❖ □产生热：生物热和搅拌热
- ❖ □散失热：蒸发热、显热和辐射热。
- ❖ □ $Q_{\text{发酵}} = Q_{\text{生物}} + Q_{\text{搅拌}} - Q_{\text{蒸发}} - Q_{\text{显}} - Q_{\text{辐射}}$

### 生物热(biological heat)

- ❖ 概念：
  - ☞ 菌体生长过程中直接释放到体外的热能。
- ❖ □影响因素：
- ❖ □培养基成分：越丰富，生物热越多。
- ❖ □菌体浓度、呼吸强度：越大，生物热越多。
- ❖ □不同生长阶段：生物热也不同。
- ❖ □发酵热平衡的主要依据：对数期的生物热

### 搅拌热(agitation heat)

- ❖ 概念：搅拌器引起的液体做机械运动时因为摩擦所产生的热量。
- ❖ □影响因素：
- ❖ □发酵罐：搅拌设备、搅拌方式
- ❖ □培养基：发酵液黏度。
- ❖ □计算：单位体积发酵液的消耗功率与热功量 (**3600kJ/kWh**) 的乘积。



## 散失热

- ❖ 蒸发热：空气进入发酵罐后，引起水分蒸所需的热能。
- ❖ 显热：废气排出时带走的热能。
- ❖ 辐射热：发酵液中部分热能以辐射热的形通过罐体辐射到大气中。
- ❖ 影响因素：
- ❖ 温度差异而造成的热能损失。
- ❖ 发酵温度、通气温度和流量等

## 发酵热计算

- ❖ 发酵热=搅拌热+生物热--冷却热
- ❖ （1）根据冷却水流量、温度变化。
- ❖ （2）根据罐温与时间的变化
- ❖ （3）根据化合物的燃烧热
- ❖ **1 M 葡萄糖产生 281 J**

### （2）温度的选择原则

- ❖ 选择最适温度并严格控制。
- ❖ 不同菌种：不同温度。
- ❖ 两段变温发酵培养：生长阶段，选择适宜的菌体生长温度，生产阶段选择最适宜的产物生产温度。
- ❖ 后期降温控制：避免产物降解。

### （3）温度的控制方式

- ❖ 一般不需要加热，往往经常需要降温冷却
- ❖ 夹套层、蛇形管，热交换；

- ❖ 冷却水降温：滞后，需要一定的经验和技巧
- ❖ 冷冻盐水循环式降温：迅速
- ❖ 建立冷冻站：提高冷却能力
- ❖ 发酵温度与冷却偶联

## 2.压力的检测与控制

- ❖ 概念：罐体内的压力，由压力表读出。
- ❖ 罐压的影响：维持正压，防止污染; $\text{CO}_2$  和  $\text{O}_2$  的溶解度
- ❖ 不同生物对压力耐受不同
- ❖ 控制：进或出口阀门，进入或排出气体或空气流量

维持工艺所需压力：0.02—0.05 MPa

## 3.搅拌的检测与控制

- ❖ 搅拌的影响：
- ❖ 气体的传递速度和发酵液的混合均匀程度
- ❖ 搅拌指标：
- ❖ 搅拌转速和搅拌功率。
- ❖ 搅拌控制策略：
- ❖ 发酵中不同阶段对氧需求进行调节。

## 化学参数的检测与控制

- ❖ 基质浓度
- ❖ pH
- ❖ 溶解氧
- ❖ 尾气

### 1. 基质浓度的检测与控制

- ❖ 基质浓度：发酵液中糖、氮、磷等发酵液中营养物质的浓度
- ❖ 检测：在线或离线。

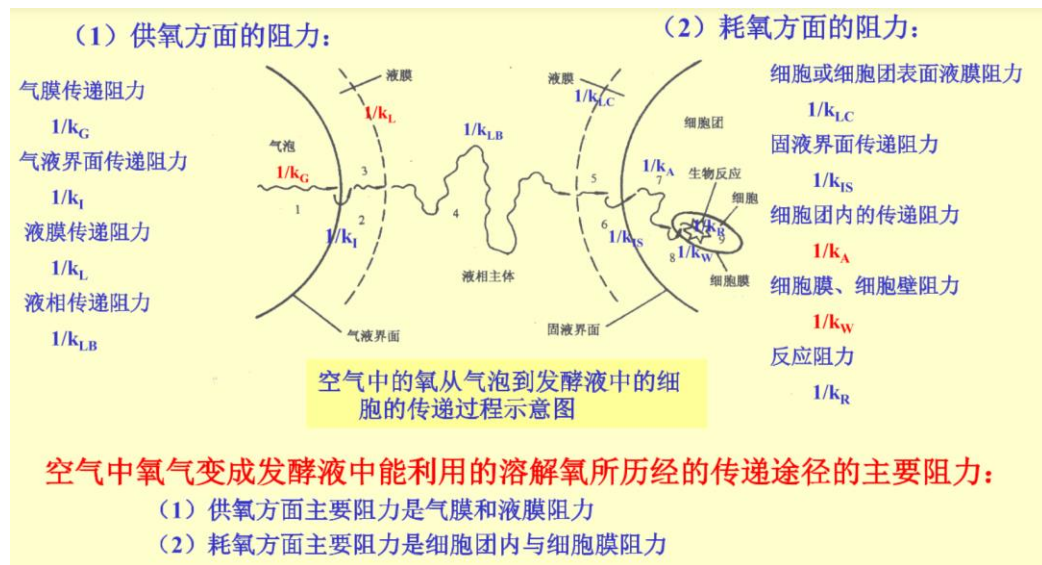
### 2. pH 检测与控制

- ❖ 发酵中 pH 的变化是酸和碱综合表现。
- ❖ 酸的来源：
  - ❖ 糖类原料中的酸性杂质；
  - ❖ 糖在高温灭菌中氧化或反应生成酸；
  - ❖ 糖被代谢生成有机酸，分泌到培养液。
- ❖ 碱的来源：
  - ❖ 水解酪蛋白和酵母粉等作为碳源利用。

### 3. 溶解氧的检测与控制

- ❖ 概念：溶于培养液中的氧含量
- ❖ 表示：绝对含量，饱和氧浓度的百分数。
- ❖ 检测：在线溶氧电极。
- ❖ 控制策略：供应量和需要量二个方面考虑使之需氧不超过设备的供氧能力。

氧传递阻力：



## 供氧 oxygen supply 原理

- ❖ 氧溶解过程: 氧从空气气泡扩散到培养液氧溶解速率: dissolved oxygen rate 氧传递速率: oxygen transfer rate, OTR

$$r_{DO} = \frac{dC}{dt} = K_L \alpha (C_1 - C_2)$$

## 耗氧 oxygen consumption

- ❖ 菌体吸收溶解氧的过程
- ❖ □ 摄氧速率 (Oxygen uptake rate, OUR)
- ❖ □ 耗氧速率

## 临界氧浓度

- ❖ 不影响呼吸或产物合成的最低溶解氧浓度。□
- ❖ 供氧必需大于或等于耗氧□
- ❖ 溶解氧速率大于或等于菌体摄氧速率, 才能使发酵正常进行。

$$K_L \alpha (C_1 - C_2) = Q_{O_2} X$$

### 临界溶氧测定

- ❖ 测定：尾气  $O_2$  变化和通气量；溶氧电极
- ❖ 细菌和酵母：3—10%
- ❖ 放线菌：5—30%
- ❖ 霉菌：10—15%。
- ❖ 呼吸临界氧浓度和合成临界氧浓度可能不一致。

### 影响供氧因素—氧推动力

- ❖ 增加氧分压：通入纯富氧空气，增加溶氧浓度，不经济。
- ❖ 提高罐压：增加  $CO_2$  浓度，对设备要求高
- ❖ 改变通气速率：两倍，有时达 5—10 倍。
- ❖ 降低发酵温度

### 影响供氧因素—体积传递系数 $K_L a$

- ❖ 搅拌器设计，类型、叶片、直径、挡板、位置
- ❖ 空气分布器的类型与位置
- ❖ 增加搅拌强度
- ❖ 增加挡板

### 其他工艺条件

- ❖ 改变培养基粘度
- ❖ 液化培养基
- ❖ 中间补水

❖ 添加表面活性剂等

❖ 间接策略:控制菌体浓度

## 各种溶氧控制方法的比较

方法	作用机理	控制效果	对生产的作用
气体成分	溶解氧浓度	好	好
搅拌速度	$K_L \alpha$	好	好
挡板	$K_L \alpha$	好	好
通气速度	溶解氧浓度, $\alpha$	中	不定
温度	溶解氧浓度, 需求	不定	不定
基质浓度	氧需求	好	不定
罐压	溶解氧浓度	中	好

综合供氧与耗氧的平衡  
(过高溶氧水平对菌体生长有不可逆的抑制作用)

### 7.10.5 教学方法

教学方法主要采用课堂讲授、举例和课堂讨论的形式进行。

### 7.10.6 作业安排及课后反思

思考化学参数的检测与控制。

### 7.10.7 课前准备情况及其他相关特殊要求

教师认真备课；学生上课前对参考教材进行预习。

### 7.10.8 参考资料（具体到哪一章节或页码）

《发酵工程原理与技术》，余龙江主编，发酵过程优化与控制（p146-p159）、发酵过程氧的供需（p114-128）

## **7.11 教学单元十一                  第 6 章 发酵制药工艺控制（发酵过程放大）（2 学时）**

### **7.11.1 教学日期**

第七周 第十一讲

### **7.11.2 教学目标**

理解与掌握泡沫的检测与控制、发酵终点的判断、发酵过程放大的原则和准则

### **7.11.3 教学内容（含重点、难点）**

重点：掌握泡沫的检测与控制

难点：发酵终点的判断

主要知识点：废气检测与控制、泡沫的检测与控制、机械消沫、化学消沫、罐压、空气流量、搅拌转速、发酵终点的判断、发酵过程当打的设计依据和基本要求。

### **7.11.4 教学过程**

#### **4.废气检测与控制**

- ❖ 废气中的氧含量和细胞的摄氧速率有关
- ❖ 二氧化碳为细胞呼吸产生并释放出
- ❖ 应用于计算：
- ❖ 细胞的摄氧速率、呼吸速率和发酵罐的供氧能力。

❖ 摄氧率OUR

$$r_{O_2} = OUR = V \frac{C_{O_2in} - C_{O_2out}}{L} = Q_{O_2} X$$

❖ CO<sub>2</sub>释放率CER

$$r_{CO_2} = CER = V \frac{C_{CO_2in} - C_{CO_2out}}{L} = Q_{CO_2} X$$

### 泡沫 foam 的检测与控制

- ❖ 概念：
- ❖ 气体分散在少量液体中，气体与液体之间被一层液膜隔开就形成了泡沫。
- ❖ 液面上的泡沫，气相所占比例大，与液体有明显界限。
- ❖ 流态泡沫，分散于发酵液内部，比较稳定，与液体之间无明显界限。

#### 1、泡沫形成的原因及其影响

- ❖ 发泡物质：蛋白质类、糖类，黄豆饼粉，代谢产物。
- ❖ 快速搅拌、灭菌体积太大或不彻底。
- ❖ 发泡影响：减少装料量，降低氧传递。
- ❖ 逃液，增加了污染，甚至无法搅拌。
- ❖ 菌体呼吸受阻，代谢异常或自溶

#### 2、泡沫控制

- ❖ 培养基调整与工艺控制：
- ❖ 少加或缓加起沫基质；
- ❖ 改变发酵条件，如 pH、升高温度、减少通气、降低搅拌速率；

改变发酵工艺，如分批投料。

### 机械消沫 mechanical defoaming



- ❖ 机械强烈震动或压力变化使泡沫破裂。
- ❖ 罐内消沫桨转动打破泡沫
- ❖ 泡沫引出罐外，通过喷嘴加速力或离心力消除泡沫。
- ❖ 消沫转子上添加消沫剂，能增强消沫效果。
- ❖ 优点：节省原料，污染机会低，但效果不理想。

## 化学消沫

- ❖ 用消沫剂(**defoaming agent**)消沫
- ❖ 机理：加入消沫剂，降低了泡沫的液膜强度和表面黏度，使泡沫破裂。
- ❖ 种类：
- ❖ 天然油脂类：动植物油脂
- ❖ 高碳醇脂肪酸和酯类：十八醇，聚乙二醇。
- ❖ 聚醚类：聚氧乙烯氧丙烯甘油，泡敌
- ❖ 硅酮类：不溶于水，10%乳液。

## 消沫剂的使用

- ❖ 取决于在发酵液中扩散能力。
- ❖ 与惰性载体、乳化剂或分散剂并用
- ❖ 消沫剂之间联合使用，也能互补增效。
- ❖ 消沫剂的添加会影响发酵过程，微生物的生长和产物的合成，要注意其不良影响。

## 罐压

- ❖ 发酵容器都装有压力测量装置，最通用的是弹簧压力表。因为培养过程和高压蒸汽灭菌时都需要观察压力的变化情况。
- ❖ 发酵过程中，空气压力对微生物生长繁殖和产物合成的影响主要表现为压力

提高氧的溶解度，改善发酵过程中溶氧的供应。但是罐压增加，也相应地提高CO<sub>2</sub>分压，而后者的增加对有些微生物的正常生长可能产生不利的影响。

- ❖ 单圈弹簧管压力计是最常用的压力表，一般安装在发酵罐和过滤器的顶部，它所指示的数字是表示高于大气压的压力数。
- ❖ 控制压力的方法，一般为调节进口或出口阀门，改变进入或排出的空气(或气体)量，以维持工艺规程所需的压力。
- ❖ 在自动控制的发酵罐中，可选用霍尔效应压力计或各种远传式压力计，它们可以将压力转变成各种电信号然后与仪表联接，后者根据压力大小，反馈控制阀门的开关，达到调节的目的。

## 空气流量

- ❖ 发酵生产中，一般以通风比来表示空气流量，通常以一分钟内通过单位体积培养液的气体体积比来表示( $V / V \cdot m$ )。
- ❖ 例如，装有 2.5m<sup>3</sup> 培养液的发酵罐，若每分钟通入无菌空气 1.25m<sup>3</sup>，则称为通气比为 1:0.5，或简称通风量为 0.5( $V / V \cdot m$ )。

## 通气对氧的溶解速率的影响

- ❖ 主要表现为气体的表面线速度( $V$ )与溶氧系数( $KLa$ )成正比，由于通气量增大，有利于提高溶氧速率，但如果加大通气量而不维持原有搅拌功率，则由于增加通气量，使发酵液密度下降，从而导致搅拌功耗下降，而搅拌功耗对提高溶氧的影响将更为显著。因此，如果加大通气量而不维持原有搅拌功率时，对提高溶氧并不十分有效。

## 测定和调节空气流量的方法

- ❖ 测定空气流量最简便的方法是转子流量计。

- ❖ 它是一种结构简单、直观、压力损失小、维修方便的仪器；通常直接安装在发酵罐的排气管道上。
- ❖ 转子流量计基本上由两个部件组成，一件是从下向上逐渐扩大的锥形管；另一件是置于锥形管中可以上下自由移动的转子，当流量足够大时，气流产生的作用力能将转子托起并使之升高，流量的大小决定了转子平衡时所在位置的高低。因此，可以从已知刻度上测出空气流量。

空气流量调节是通过开启阀门实现的。

## 6. 搅拌转速

- ❖ 发酵罐搅拌转速与发酵的溶氧系数关系十分密切。因为溶氧系数  $KLa$  正比于单位发酵液的搅拌功率消耗，而功耗与搅拌转速的三次方成正比。所以在一定几何结构条件下(如罐的径高比、搅拌叶片直径、挡板等)发酵罐的溶氧系数(或称体积传质系数) $KLa$  主要受搅拌转速的影响。

### 搅拌影响溶氧系数主要有 3 个方面

- ❖ ①搅拌把通入的无菌空气打成细小气泡，增加气液接触面积(即增大内表面积  $a$ )，而且小气泡从罐底上升到液面要比大气泡慢，也增加气液接触时间；
- ❖ ②搅拌造成的涡流运动使气泡不直接从罐底上升至顶部，而变成螺旋运动上升，这也增加了气液表面的上升时间，利于氧的溶解；
- ❖ ③搅拌所形成的湍流断面减少液膜的厚度，从而减少液膜阻力，增大了  $KLa$ 。
- ❖ 目前试验用小型发酵罐都采用变速马达，因此可以根据发酵工艺需要(主要是取决于溶氧速率的需要)调节搅拌转速。

国内工业规模发酵罐所用马达多数为固定转速，通过变速箱或皮带盘进行减速。因此在发酵过程中，一般是无法调整搅拌速度的。

如果在大型发酵罐上采用变速马达，虽然一次投资费用较大些，但是在发酵过程中根据不同时期微生物对氧需要进行调节搅拌转速，这样将使生产过程更科学、合理和经济。

### 发酵终点的判断

- ❖ 最低成本获得最大生产能力的时间。
- ❖ 原料和发酵成本的影响因素：
- ❖ 产率：单位体积、单位时间内的产量
- ❖ 得率：转化率，单位原料生产的产物量
- ❖ 发酵系数：单位发酵周期内发酵体积生成产物
- ❖ 体积产率：发酵单位除以总发酵时间

#### 1、经济原则

- ❖ 在最大生产率时，终止发酵。□
- ❖ 发酵总生产周期：最短

#### 2、产品质量原则

- ❖ 对后续分离纯化的影响：
- ❖ □发酵时间太短，营养物质残留
- ❖ □补料或消沫剂的残留，以允许的残量为标准
- ❖ □发酵时间太长，菌体自溶，改变发酵液性质
- ❖ □增加分离纯化难度。
- ❖ □对于抗生素，放罐前 **16** 小时停止补料和消沫。

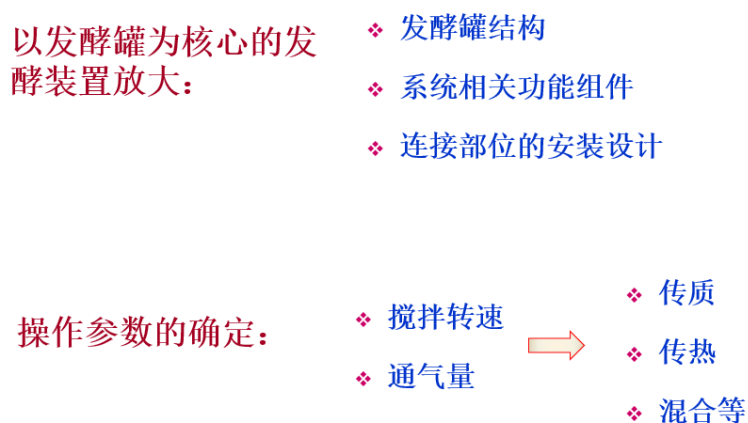
### 生物、物理、化学指标

- ❖ 产物浓度，过滤速度，菌体形态，氨基氮，**pH**，发酵液的外观和粘度等。

- ❖ 一般自溶前放罐。
- ❖ 按照常规经验计划进行作业。
- ❖ 特殊因素
  - 染菌、代谢异常等情况。

## 发酵过程放大的主要内容

### 发酵过程放大的主要内容



## 发酵罐放大的设计依据

### 发酵罐放大的设计依据

- 发酵类型及菌种特性：
- ❖ 基因工程菌或普通菌种？
  - ❖ 固体或液体发酵？
  - ❖ 好氧或厌氧发酵？
  - ❖ 好氧程度？
  - ❖ 抗杂菌污染能力？
- 
- 培养基特点：
- ❖ 离子浓度及腐蚀性？
  - ❖ 有无不耐热基质？
  - ❖ 是否需要补加流料或控pH？
  - ❖ 是否需预处理（糖化、过滤等）？
  - ❖ 能否重复利用？

放大过程的准则和方法：

❖ **准则：**根据发酵工艺中试研究的**放大规律**来确定：

$K_L a$ （传氧系数）、 $P/V$ （功率体积比）或 $N_d$ （搅拌器转速、直径）相等

❖ **方法：**

❖ **经验放大法：**依据对已有装置的操作经验建立

❖ **因次分析法：**根据通气准数等准数相等原则进行放大

❖ **时间常数法：**根据变化量与变化率之比大小确定主要影响因素

**反应时间常数、扩散时间常数、混合时间常数、传质时间常数**

❖ **数学模型法：**根据相应原理及实验结果对放大过程进行模型模拟，以确定主要影响因素及放大方法。

#### 7.11.5 教学方法

教学方法采用课堂讲授、案例分析和课堂讨论的形式进行。

#### 7.11.6 作业安排及课后反思

查阅文献，了解泡沫的检测与控制

#### 7.11.7 课前准备情况及其他相关特殊要求

教师认真备课；学生上课前对参考教材进行预习。

#### 7.11.8 参考资料（具体到哪一章节或页码）

《发酵工程原理与技术》，余龙江主编，发酵过程优化与控制（p154-p162），发酵过程放大（p133-137）

### 7.12 教学单元十二      第 7 章 发酵生产的设备及产物分离纯化（发酵生产的设备） （2 学时）

#### 7.12.1 教学日期

第七周 第十二讲

### 7.12.2 教学目标

理解与掌握反应器分类、反应器设计的原则和目标、好氧通气搅拌发酵装置。

### 7.12.3 教学内容（含重点、难点）

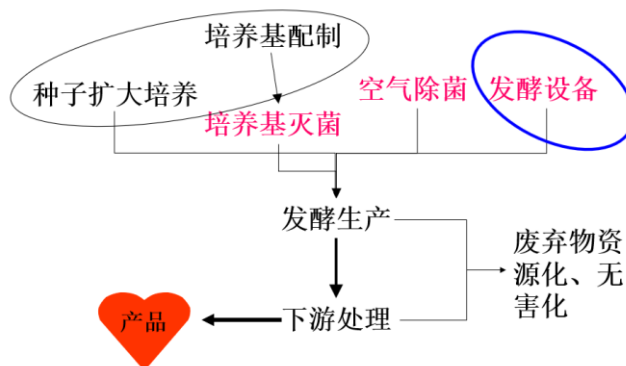
重点：反应器设计的原则和目标

难点：好氧通气搅拌发酵装置

主要知识点：生物反应器设计应遵循原则、微生物细胞反应器-发酵罐、发酵罐的类型、搅拌器的型式与流型、通风发酵罐中溶氧速率与通气、搅拌的关系、动物细胞培养生物反应器、植物细胞培养生物反应器。

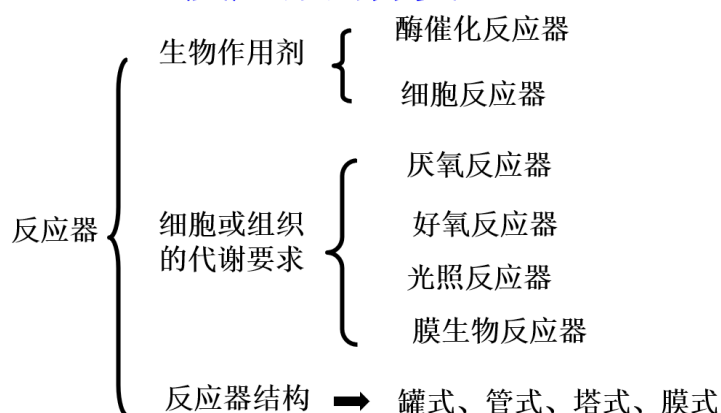
### 7.12.4 教学过程

#### 发酵工程的一般流程



#### 1 反应器分类及设计的原则和目标

## 1.1 反应器的分类



## 1.2 反应器的设计目标和原则

### 1) 反应器具备条件

生物反应器是进行生物反应的核心设备，无论是使用微生物、酶或动植物细胞（或组织）作为生物催化剂，所需要反应器都应具备：

- A 严密的结构；
- B 良好的液体混合性能；
- C 较高的传质、传热性能；
- D 结构简单，能耗低；
- E 配套而又可靠的检测和控制仪表。

判断生物反应器好坏的唯一标准是该装置能否适合工艺要求以取得最大的生产效率。

### 2) 反应器设计的目标

生物反应器设计的主要目标是获取高质量、低成本的成品。而做到低成本的一个重要因素是增效节能。

### 3) 生物反应器设计应遵循原则

- (1) 生物反应器应具有适宜的径高比。满足不同生物体生长代谢的溶氧和厌氧需求。
- (2) 应承受一定的压力。满足正常工作和灭菌时的压力、温度要求，因此罐体各部件要有一定的强度，能应承受一定的压力。



- (3)有搅拌通风装置的反应器能使气液固三相充分混合，满足物料必须的溶氧要求。
- (4)反应器应尽量减少死角，消除藏垢积污场所，保证灭菌彻底。
- (5) 反应器应有恰当的冷却装置和冷却面积，满足生物体生长代谢过程中的温度要求。
- (5)尽量减少法兰连接，防止因设备震动和热膨胀，引起法兰连接处移位，造成污染。
- (6) 保证灭菌工作的顺利进行，培养系统中已灭菌部分地区与未灭菌部分之间不能直接连通；某些部分能单独灭菌。

### **发酵罐发展历史：**

第一阶段:1900 年以前，是现代发酵罐的雏形，它带有简单的温度和热交换仪器。

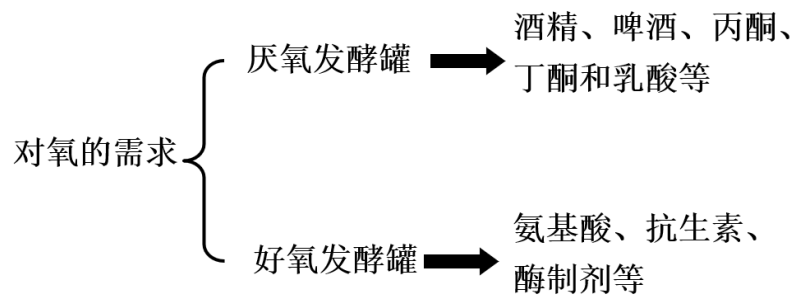
第二阶段:1900-1940 年，出现了 200m<sup>3</sup> 的钢制发酵罐，在面包酵母发酵罐中开始使用空气分布器，机械搅拌开始用在小型的发酵罐中。

第三阶段：1940-1960 年，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，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。

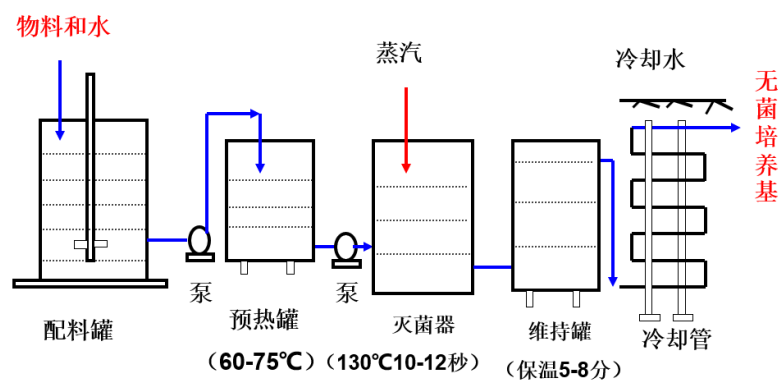
第四阶段：1960-1979 年，机械搅拌通风发酵罐的容积增大到 80-150m<sup>3</sup>。由于大规模生产单细胞蛋白的需要，又出现了压力循环和压力喷射型的发酵罐，它可以克服一些气体交换和热交换问题。计算机开始在发酵工业上得到广泛应用。

第五阶段：1979 年至今。生物工程和技术的迅猛发展，给发酵工业提出了新的课题。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走上商品化。

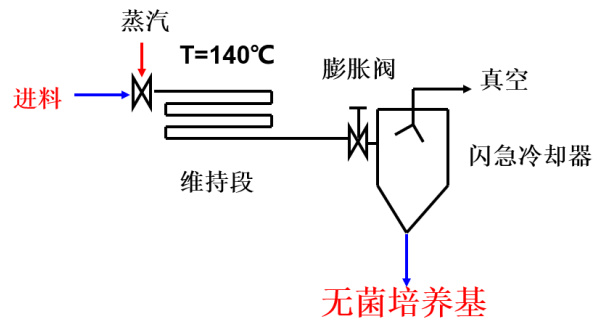
## **2 微生物细胞反应器-发酵罐**



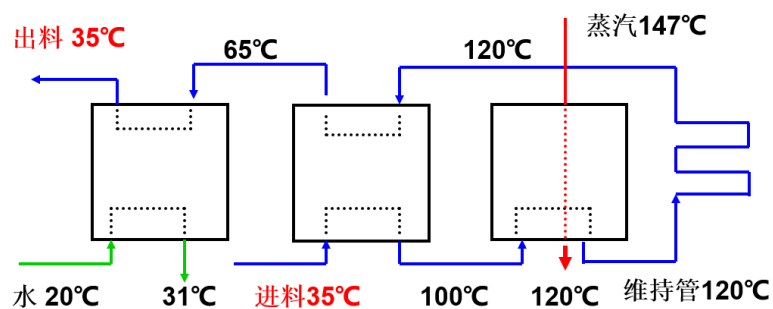
### ➤ 连消塔—喷淋冷却连续灭菌流程



### ➤ 喷射加热-真空冷却连续灭菌流程



### ➤ 薄板换热器连续灭菌流程图



## 2.1 机械搅拌通风发酵罐

### ■ 发酵罐的基本条件

适宜的径高比（高与直径的比值为 2.5—4）

能承受一定压力、温度

搅拌通风装置保证气液充分混合

具有足够的冷却面积

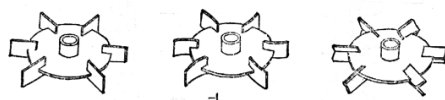
死角少，灭菌彻底

轴封严密，泄漏少

### ■ 发酵罐的搅拌器

- 功能：打碎空气（径向），使发酵液充分混合（轴向）

- 类型：平叶式、弯叶式、剑叶式

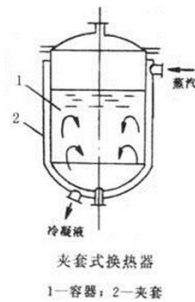
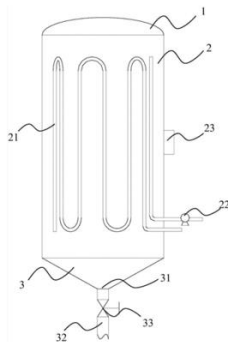
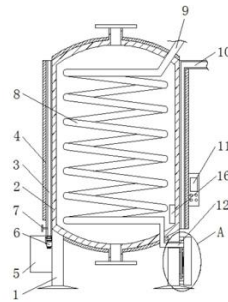


- 叶片数量：一般**6**片，最少**3**片，最多**6**片

### 发酵罐的换热装置

夹套式换热装置：结构简单，死角少，利于灭菌，降温效果较差，适用于小型发酵罐。竖式蛇管换热装置：降温效果较好，节水。

竖式列管（排管）换热装置：降温效果好，但要求水源充足。



## 挡板

作用：克服涡流，将径向改变为轴向流动，增加溶氧速率。

大小：宽， $0.1-0.12 D$ ；长，液面至罐底。

位置：与罐壁的间距， $1/5-1/8 W$ 。

数量：4 块，竖式蛇管换热装置也起一定挡板作用。

## 机械消泡方法

罐内消泡：在发酵罐内消除泡沫

耙式消泡桨、碟式消泡器等

罐外消泡：将泡沫引出发酵罐外，消泡后再返回罐内

旋转叶片消泡器、离心式消泡器等

液体深层厌气发酵设备、酒精发酵罐的结构

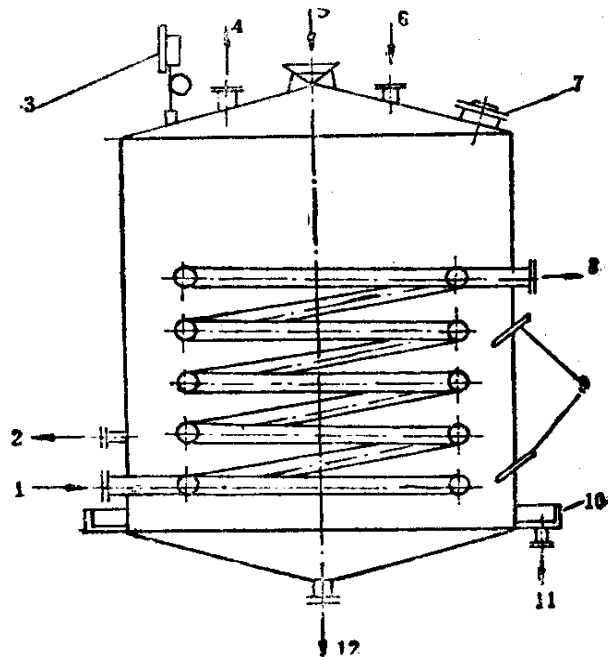


图 5-1 酒精发酵罐

1—冷却水入口 2—取样口 3—压力表  
4—CO<sub>2</sub>气体出口 5—喷淋水入口 6—  
料液及酒母入口 7—人孔 8—冷却水出  
口 9—温度计 10—喷淋水收集槽 11—  
喷淋水出口 12—发酵液及污水排出口

### 自吸式发酵罐-非循环机械搅拌

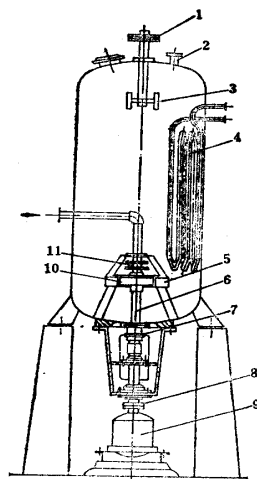
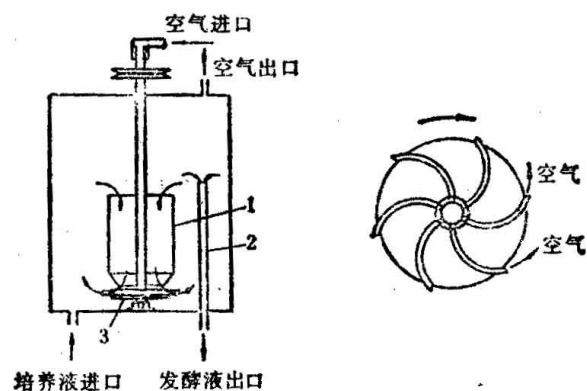


图 6-25 自吸式发酵罐

1—皮带轮 2—排气管 3—消泡器 4—冷却排管  
5—定子 6—轴 7—双端面轴封 8—联轴节  
9—马达 10—转子 11—端面轴封

### 伍式发酵罐（循环机械搅拌）



伍式发酵罐简图

1—套筒 2—溢流管 3—搅拌器

### 带升式发酵罐（循环通气搅拌）

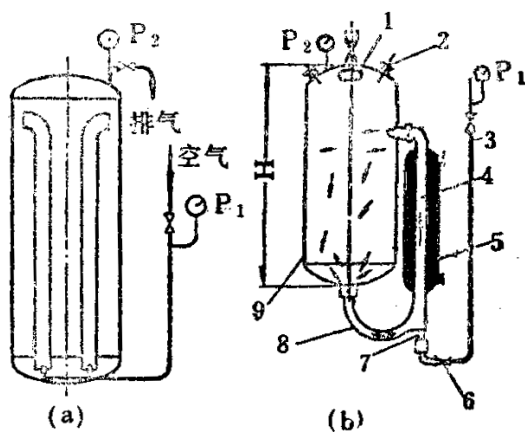
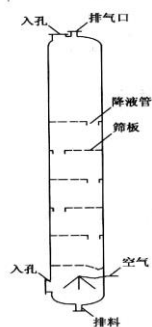


图 6-1 带升式发酵罐

1—人孔 2—视镜 3—空气管 4—上升管 5—冷却器 6—单向阀门 7—空气喷嘴 8—带升管 9—罐体

### 塔式发酵罐（非循环通气搅拌）

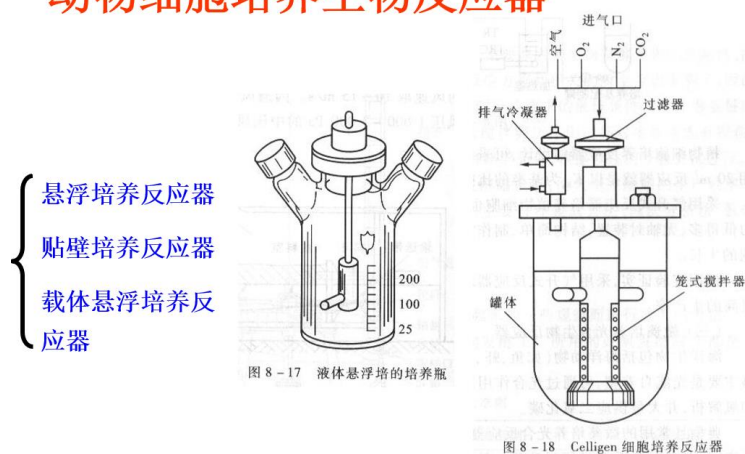


## 2.2 其他类型生物反应器

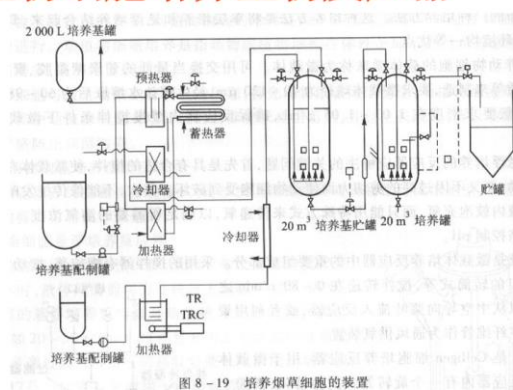
### 生物反应器：

为特定的细胞或酶提供适宜的增殖或进行特定生化反应环境，并且都是利用生物催化剂进行生化反应的设备。

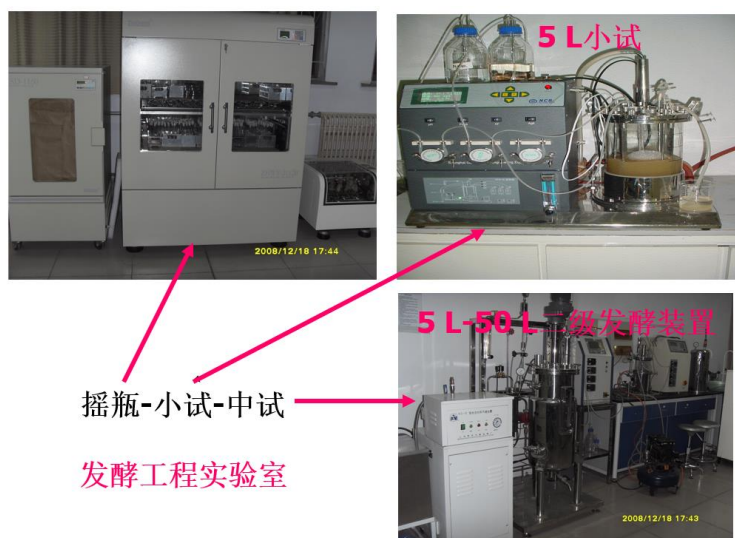
### 动物细胞培养生物反应器



### 植物细胞培养生物反应器



此外还有微藻培养光合生物反应器



## 搅拌轴功率的计算

发酵罐直径  $D$  (m)、搅拌器直径  $d$  (m) 液柱

高度  $H_L$  (m)、搅拌器形式、搅拌器转速  $n(\text{r}\cdot\text{min}^{-1})$ 、液体粘度  $\mu$  (Pa·S)、液体密度  $\rho$  ( $\text{kg}/\text{m}^3$ )、重力加速度  $g$  ( $\text{m}/\text{s}^2$ ) 以及有无挡板等。

轴功率 (W):  $P = \Phi(n, d, \rho, \mu, g)$

目前，一般每立方米发酵培养液的功率吸收为 1-3.5 KW。

### (一) 搅拌器的型式与流型

1、分为轴向和径向推进两种型式。

前者为螺旋桨式，或者为涡轮式。

#### (1) 螺旋桨式搅拌器

顺时针和逆时针旋转分别将液体向下和向上推进，形成轴向的螺旋运动。

其混合效果较好，但造成的剪率较低，对气泡的分散效果不好。常用以提高液体循环速度。螺距一般等于搅拌器直径。

#### (2) 圆盘平直叶涡轮搅拌器

圆盘的作用：无菌空气由单开口管通至搅拌器下方，大的气泡受到圆盘的阻挡，



避免从轴部的叶片空隙上升，保证了气泡的更好的分散。

圆盘平直叶涡轮搅拌器具有很大的循环输送量和功率输出，适用于各种流体，包括粘性流体、非牛顿型流体等。

### (3) 圆盘弯叶涡轮搅拌器

圆盘弯叶涡轮搅拌器的搅拌流型与平直涡轮的相似，但前者造成的液体径向流动较为强烈，因此在相同的搅拌转速时，前者的混合效果较好。但由于前者的流线叶型，在相同的搅拌转速时，输出的功率较后者的为小。因此在混合要求特别高，而溶氧速率相对要求略低，可选用圆盘弯叶涡轮。

### (4) 圆盘箭叶涡轮搅拌器

其搅拌流型与上述两种涡轮相近，但它的轴向流动较强烈，但在同样转速下，它造成剪率低，输出功率也较低。

## 2、流型

搅拌器在发酵罐中造成的流型，对气固液相的混合效果、氧气的溶解、热量的传递都影响较大。搅拌器造成的流体流动型式不仅决定于搅拌器本身，还受罐内附件及其安装位置的影响。

### (1) 罐中心装垂直螺旋桨搅拌器的搅拌流型

周边无挡板：轴中心形成凹陷的漩涡。

周边有垂直挡板：液体的螺旋状流受挡板折流，被迫向轴心方向流动，使漩涡消失。

### (2) 涡轮式搅拌器的流型

在涡轮平面的上下两侧形成向上和向下的两个翻腾。如不满足全挡板条件，轴中心位置也有凹陷的漩涡。

### （3）装有套筒时的搅拌器搅拌流型

在罐内与垂直的搅拌器同中心安装套筒，可以大大加强循环输送效果，并能将液面的泡沫从套筒的上部入口，抽吸到液体之中，具有自消泡能力。例如，伍式发酵罐。

分为搅拌器在套筒外和套筒内两种。

### （二）搅拌器轴功率的计算

发酵罐液体中的溶氧速率以及气液固相的混合强度与单位体积液体中输入的搅拌功率有很大关系。在相同的条件下，输入于单位体积不通气液体中的功率要大于通气液体中的功率。

### 通风发酵罐中溶氧速率与通气、搅拌的关系

#### （一）双膜理论

只有溶解于培养液中的氧才能为其中的微生物所利用。

空气被分散成细小的气泡，尽可能增大气液两相的接触界面和接触时间，以促进氧的溶解。氧的溶解过程实质上就是气体吸收过程，这一过程可以用气体吸收的基本理论即双膜理论阐明。

双膜理论的基本前提：

- （1）气泡和液体之间存在界面，两边分别有气膜和液膜，均处于层流状态，氧分子只能借浓度差以扩散方式透过双膜，气体和液体主流空间中任一点的氧分子浓度相同。
- （2）在双膜之间的界面上，氧气的分压强与溶于液体中的氧的浓度处于平衡关系。
- （3）传质过程处于稳定状态，传质途径上各点的氧浓度不随时间而变。

### **7.12.5 教学方法**

教学方法采用课堂讲授的形式进行。

### **7.12.6 作业安排及课后反思**

复习所讲内容，重点是发酵罐的类型和结构。

### **7.12.7 课前准备情况及其他相关特殊要求**

教师认真备课；学生上课前对参考教材进行预习。

### **7.12.8 参考资料（具体到哪一章节或页码）**

《发酵工程原理与技术》，余龙江主编，发酵工业主要装备（p48-54），发酵过程放大（p134-137）

## **7.13 教学单元十三 第 7 章 发酵生产的设备（发酵产物分离纯化）（2 学时）**

### **7.13.1 教学日期**

第八周 第十三讲

### **7.13.2 教学目标**

掌握空气除菌设备、产品纯化设备、两相分离设备、离子交换设备、色谱分离设备、蒸发浓缩设备等。

### **7.13.3 教学内容（含重点、难点）**

重点：掌握空气除菌设备。

难点：产品纯化设备。

主要知识点：空气除菌设备、产品纯化设备、两相分离设备、离子交换设备、色谱分离设备、蒸发浓缩设备。

### **7.13.4 教学过程**

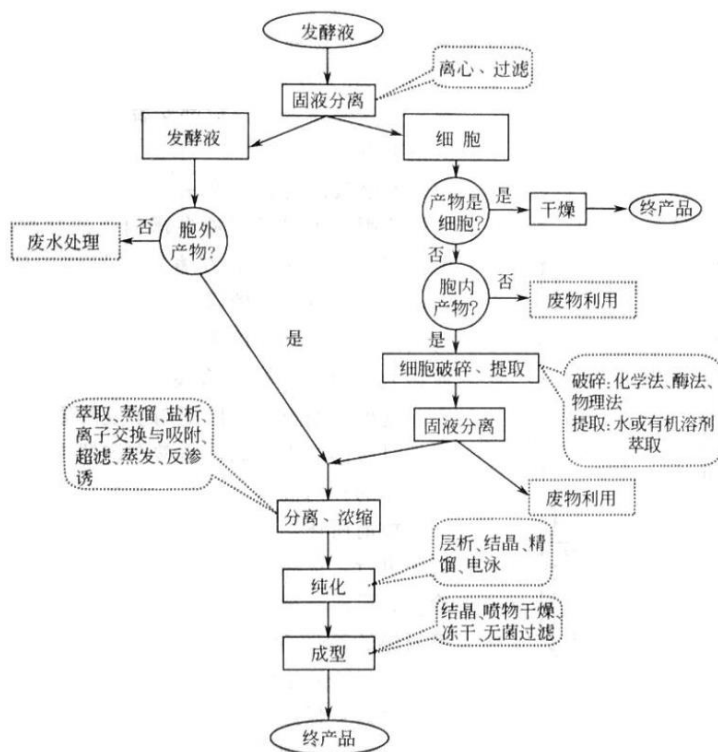
## 发酵工程下游加工过程的研究内容

- (1) 确立最佳的分离方法
- (2) 确定最佳的分离工艺流程和操作条件
- (3) 分离设备的选型和设计

## 发酵工程下游加工过程的特点

- (1) 培养液成分复杂
- (2) 目标物质含量低，而杂质浓度高
- (3) 目标物质稳定性差
- (4) 下游加工过程有弹性
- (5) 注意生物安全性

## 发酵产物下游加工过程的一般流程：



发酵产品的分离纯化工艺简图

## 发酵液预处理

- (1) 分离菌体和其他悬浮颗粒(细胞碎片、核酸和蛋白质的沉淀物);
- (2) 除去部分可溶性杂质和改变滤液性质, 以利于提取和精制的顺利进行。

## 预处理的方法

(1) 发酵液的凝聚 ( $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 18\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{FeCl}_3$ 、 $\text{ZnSO}_4$ 、 $\text{MgCO}_3$ ) 和絮凝 (天然有机高分子絮凝剂——多糖类 (如壳聚糖及衍生物)——海藻酸钠——明胶和骨胶等; 人工合成聚合物——聚丙烯酰胺类衍生物——聚苯乙烯类衍生物——聚丙烯酸类)。

- (2) 杂蛋白质的去除

絮凝作用

等电点沉淀

变性沉淀

加各种沉淀剂沉淀

吸附

- (3) 酶解法去除不溶性多糖

## 发酵液的固—液分离

固—液分离即是将发酵液中的悬浮固体, 如细胞、菌体、细胞碎片以及蛋白质的沉淀物或它们的絮凝体分离除去。

常规的固—液分离技术包括: 过滤、离心

## 发酵产物粗分离技术

- 萃取分离技术
- 浓缩分离技术

■ 沉淀分离技术

■ 吸附分离技术

**发酵产物精制技术：**色谱（层析）分离技术、膜分离技术、结晶分离技术、干燥技术

**离子交换与色谱分离设备**

**一、离子交换设备**

根据物质吸附性质的不同，可用吸附法进行分离；

根据分子电离（电负性）的差异，可用离子交换法、电泳法和等电聚焦法等进行分离；

根据分子形状和大小的不同，可用凝胶过滤层析、膜分离等分离；

根据配体特异性的不同，可用亲和层析法进行分离。

**现有的离子交换设备**

按结构型式分为罐式、塔式、槽式等。

按操作方式分为间歇式、周期式与连续式；

按两相接触方式的不同，可分为固定床、移动床、流化床等。其中固定床设备是现今应用最多的离子交换设备；

使用单一交换柱不能连续生产，多柱串联虽可实现连续生产，但设备投资增加。

**（一）间歇式离子交换设备**

一般的离子交换罐为具有椭圆形封头的圆筒形设备，树脂层高度约占圆筒高度的50~70%，须留有充分的空间，以备反冲时树脂层的膨胀。

交换罐上部溶液分布装置，使溶液均匀通过树脂层。

罐底有多孔板、筛网及滤布以支持树脂层，或者用块石英石或卵石直接铺于罐底以支持树脂层。

**1、反吸附离子交换罐（流化床）**

被交换的溶液由罐的下部导入，其流速和粘度以使树脂在罐内呈沸腾状态而不溢出罐外为宜，交换后的溶液则由罐顶的出口溢出。

优点：省去菌丝过滤、液固两相接触面大而且较均匀，操作时不产生短路、死角，以及流速大和生产周期短

缺点：树脂的饱和度不及正吸附的高、罐内树脂高度要比正吸附时低一点，以免树脂外溢。

## **2. 固定床离子交换设备**

用多孔陶土板、粗粒无烟煤、石英砂等作为树脂支撑体。被处理的溶液从树脂上方加入，经过分布管使液体均匀分布于整个树脂的横截面。

加料方式：重力式和压力式。

再生方式：顺流与逆流两种。

逆流再生有较好的效果，再生剂用量可减少；但要发生树脂层的上浮。

如将阳、阴两种树脂混合起来，则制成混合离子交换设备，可避免采用单床时溶液变酸及变碱的现象，因而可减少目标产物的破坏。

## **3、薄膜压滤式离子交换设备**

当溶质的吸附扩散变得非常慢的时候，细微分开的树脂就会有利于吸附。因为其表面积大，易于吸附扩散。

但细微分开的树脂也存在水力问题，即压缩产生的阻力较大。

薄膜压滤式离子交换设备可解决这一问题，即在加压情况下不会压缩树脂饼，防止阻力增大。

## **4、活动式自动化离子交换设备**

### **（二）半连续移动床式离子交换设备**

移动床离子交换设备是一种半连续式离子交换装置。

特点：离子交换与树脂再生、清洗分别在设备的不同单元中进行。

## 二、色谱分离设备

色谱技术是利用混合物中各种组分的物理化学性质（分子的形状和大小、分子的极性、吸附力、分子亲和力、分配系数等）不同，使各组分以不同程度分布在两相中，当流动相流过固定相时，各组分以不同的速度移动，而达到分离的目的。

### 1、柱层析装置

柱色谱装置主要由进样系统（一般为恒压泵）、层析柱、收集器和检测系统组成。

### 2. 薄层凝胶层析装置

### 3. AM90-1 型凝胶层析仪

### 4、封闭连续柱层析装置

特点：将洗脱和产品浓缩结晶两道工序结合起来，缩短了生产周期，洗脱液的用量可显著减少。

## 二、蒸发浓缩设备

### 1、真空浓缩器

### 2、膜式蒸发器

#### 1)升膜蒸发器

#### 2)降膜蒸发器

#### 3)旋转刮板蒸发器

#### 4)板式蒸发器

### 7.13.5 教学方法

教学方法采用课堂讲授和案例分析的形式进行。



### 7.13.6 作业安排及课后反思

复习空气除菌设备、产品纯化设备。

### 7.13.7 课前准备情况及其他相关特殊要求

教师认真备课；学生上课前对参考教材进行预习。

### 7.13.8 参考资料（具体到哪一章节或页码）

《发酵工程原理与技术》，余龙江主编，发酵工业主要装备（p48-54），发酵产物分离纯化（p173-199）

## 7.14 教学单元十四 第8章 抗生素发酵生产工艺（2学时）

### 7.14.1 教学日期

第八周 第十四讲

### 7.14.2 教学目标

了解抗生素生产工艺概况、工艺操作要点、对产物影响的主要因素及控制，产物分离提纯主要方法。

### 7.14.3 教学内容（含重点、难点）

重点：重点了解青霉素发酵生产的具体操作过程。

难点：青霉素的提炼工艺。

主要知识点：青霉素生产菌的生物学特性、生产孢子制备、种子罐培养工艺、生产罐培养工艺、发酵培养与过程控制、提炼工艺。

### 7.14.4 教学过程

**抗生素：**是生物在其生产活动过程中所产生，并能在低微浓度下有选择性地抑制或杀灭其他微生物或肿瘤细胞的有机物。

## 根据抗生素的作用机制分类

- ❖ 抑制细胞壁合成 (Cell Wall Synthesis) : 青霉素
- ❖ 抑制细胞膜功能 (Cell Membrane Damage) : 多烯类抗生素
- ❖ 抑制蛋白质合成 (Protein Synthesis) : 四环素
- ❖ 抑制核酸合成 (Nucleic Acid Synthesis) : 丝裂霉素

## 根据抗生素的化学结构分类

- ❖  $\beta$ -内酰胺类 ( $\beta$ -lactam): 青霉素类 (penicillins)  
头孢菌素类 (cephalosporins)
- ❖ 氨基糖苷类 (aminoglycosides) : 链霉素、庆大霉素
- ❖ 大环内酯类 (macrolides) : 红霉素、麦迪加霉素
- ❖ 四环素类 (tetracyclines) : 四环素、土霉素
- ❖ 多肽类 (polymyxin) : 多粘菌素

## 生产前期研究

- ❖ 产生菌的筛选
- ❖ 抗菌性试验
- ❖ 提取、精制、鉴定
- ❖ 毒性试验
- ❖ 药理和临床试验

## 抗生素生产菌改良

人工诱变法：紫外线、X-线、r-线照射、亚硝基胍、亚硝酸、秋水仙素、氮芥等诱变剂处理

DNA 重组技术

## 青霉素的生产工艺

### 发现

- ❖ 1929: Fleming 在葡萄球菌培养皿中，污染的霉菌周围出现透明的抑菌圈。
- ❖ 杀菌物质，断言太不稳定，无法分离并用作药物。
- ❖ 1939: 牛津病理家 Howard Florey 化学家 Ernst Chain, Norman Heatley。发酵瓶培养霉菌，培养里提取，测活性，青霉素结晶。

### 发展

- ❖ 1940: 8 只鼠注射链球菌，提取物对 4 只治疗。未经治疗鼠在 24 小时内死亡，治疗鼠存活数天至数周。
- ❖ 1941 年 2 月开始治疗第一批人类病人。
- ❖ 1943: 威斯康辛大学小组，取得突破
- ❖ 生产菌表面培养：几十个单位。
- ❖ 深层培养产黄青霉：100U/ml。
- ❖ X、UV 诱变育种：1000—1500U/ml。
- ❖ 不产色素变种：66000—70000U/ml
- ❖ 目前：85000U/ml。

## 二 青霉素生产菌的生物学特性

- ❖ 产黄青霉： *Penicillium chrysogenum*
- ❖ 孢子:绿色和黄色
- ❖ 菌落：平坦或皱褶，圆形。

青霉穗:分生孢子链状

深层培养菌丝：球状和丝状两种

## 发酵条件下的生长过程

第1期：分生孢子萌发，形成芽管，原生质未分化，具有小泡。

第2期：菌丝繁殖，原生质体具有嗜碱性，类脂肪小颗粒。

第3期：形成脂肪包涵体，机理贮藏物，没有空泡，嗜碱性很强。

第4期：脂肪包涵体形成小滴并减少，中小空泡，原生质体嗜碱性减弱，开始产生抗生素。

第5期：形成大空泡，有中性染色大颗粒，菌丝呈桶状，脂肪包涵体消失，青霉素产量最高。

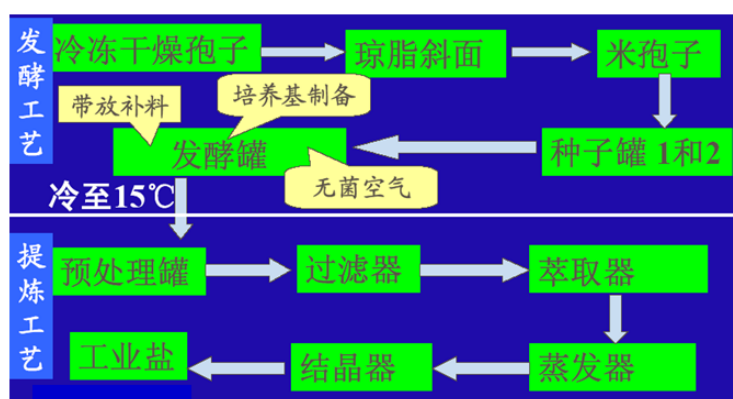
第6期：出现个别自溶细胞，细胞内无颗粒，仍然桶状。释放游离氨，pH上升。

第7期：菌丝完全自溶，仅有空细胞壁。

## 镜检

- ❖ 规定时间取样，显微镜观察7个时期的形态变化，控制发酵。
- ❖ 1—4期为菌丝生长期，3期的菌体适宜为种子。
- ❖ 4—5期为生产期，生产能力最强，通过工程措施，延长此期，获得高产。
- ❖ 在第六期到来之前结束发酵。

## 三 发酵工艺过程



## 1 生产孢子制备工作

- ❖ 斜面种子：砂土孢子用甘油、葡萄糖、蛋白胨组成的固体培养基进行培养。
- ❖ 米孢子：移植到小米或大米固体培养基上，生长 7 天，25℃。
- ❖ 注意：每批孢子必需进行严格摇瓶试验，测定效价及杂菌情况。

### 摇瓶实验

- ❖ 其实是试管实验的放大，把试管里进行的实验，放到三角瓶中进行，为了促进供氧，就把三角瓶放在摇床上进行发酵实验。

从试管到三角瓶，再到发酵罐，是一个逐级放大的过程，主要是为了找出大规模工业生产是实验室实验之间的差距。

## 2 种子罐培养工艺

- ❖ 一级种子发酵：发芽罐，孢子萌发，形成菌丝。

培养基：葡萄糖，玉米浆，碳酸钙，玉米油，消沫剂等。空气流量 1: 3（体积比）；300-350rpm；pH 自然，温度  $27\pm 1^{\circ}\text{C}$ ，40h

- ❖ 二级种子罐：繁殖罐，大量繁殖。接种量 10%

培养基：葡萄糖、玉米浆，玉米油，消沫剂等。1:1-1.5；250-280rpm；pH 自然， $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ 。10-14h

- ❖ 质量：菌丝致密，菌丝粗壮，III 期，倍增期 6-8h

## 3 生产罐培养工艺

- ❖ 三级罐：生产罐；接种量 20%。

- ❖ 培养基：花生饼粉，葡萄糖，尿素，硝酸铵，硫代硫酸钠，苯乙酰胺， $\text{CaCO}_3$ ，玉米油，硅油。

- ❖ 参数条件：

- ☞ 通气量 1: 0.8-1.2;
- ☞ 150-200r/min;
- ☞ 前 60 小时:pH6.4-6.6, 26℃;
- ☞ 60 小时后: pH6.7, 24℃。

#### 4 发酵培养与过程控制

- ❖ 操作方式: 反复分批式发酵。
- ❖ 发酵罐: 100M<sup>3</sup>, 装料 80M<sup>3</sup>。
- ❖ 带放: 6-10 次, 带放量 10%, 间隔 24h。
- ❖ 发酵周期: 180-220h。

##### (1) 过程控制——补料分批操作控制基质浓度

- ❖ 前 40 小时: 培养基中的主要营养物
- ❖ 40 小时后: 低速连续补加葡萄糖、氮源和苯乙酸等, 维持一定的最适浓度。
- ❖ 半饥饿状态: 延长合成期, 提高产量。
- ❖ 碳源占成本 12% 以上, 采用糖化液流加, 降低成本。
- ❖ 糖与 6APA 结合形成糖基-6APA, 影响青霉素产量。

##### 流加碳源控制

- ❖ 根据残糖、pH、尾气中 CO<sub>2</sub> 和 O<sub>2</sub> 含量。
- ❖ 葡萄糖的波动范围较窄, 浓度过低使抗生素合成速度减慢或停止, 过高则导致呼吸活性下降, 甚至引起自溶。
- ❖ 残糖 0.3-0.6% 左右, pH 开始升高时流加糖。
- ❖ 浓度: 500kg/m<sup>3</sup>, 流速: 1.0-2.5kg/m<sup>3</sup>·h。

##### 流加氮源控制

- ❖ 玉米浆：最好，含有多种氨基酸及其前体苯乙酸和衍生物。
- ❖ 补加无机氮源：硫酸铵、氨水、尿素。
- ❖ 氨基氮浓度：0.01-0.05%。

### 盐离子控制

- ❖ 无机盐：硫、磷、镁、钾等。
- ❖ 铁对青霉素合成有毒，30-40 ug/ml 以下。
- ❖ 罐壁涂环氧树脂保护层。

### (2) 添加青霉素侧链前体

- ❖ 时期：合成阶段。
- ❖ 种类：苯乙酸及其衍生物，苯乙酰胺、苯乙胺、苯乙酰甘氨酸。
- ❖ 毒性：抑制细胞生长和青霉素合成。
- ❖ 策略：低浓度流加。
- ❖ 浓度：苯乙酸 0.1%，苯乙酰胺 0.05-0.08%。
- ❖ 控制：保持供应速率略大于生物合成需要。

### 提高产量的其他物质流加

- ❖ 表面活性剂：新洁尔灭、聚氧乙烯、山梨糖醇酐、单油酸酯、单月桂酸酯、三油酸酯
- ❖ 可溶性高分子化合物：聚乙烯醇、聚丙烯酸钠、聚乙二胺、聚乙烯吡咯烷醇
- ❖ 其他：剪切保护剂；分散剂

### (3) 温度控制

- ❖ 适宜菌丝生长温度 30℃，分泌青霉素 20℃。
- ❖ 20℃青霉素破坏少，周期很长。

- ❖ 变温控制，不同阶段不同温度。
- ❖ 生长阶段:较高温度，缩短生长时间；生产阶段适当降低温度，以利于青霉素合成。
- ❖ 前期控制 26℃左右，后期降温控制 24℃。

#### (4) pH 控制

- ❖ 合成适宜 pH6.4—6.6 左右，避免超过 7.0
- ❖ 直接加酸或碱：自动控制
- ❖ 流加葡萄糖：恒速；变速，依赖 pH 变化快慢。
- ❖ pH 下降：补加  $\text{CaCO}_3$ 、通氨、尿素或提高通气量
- ❖ pH 上升：补加糖、生理酸性物质（硫酸铵、油脂）

#### (5) 溶氧控制

- ❖ <30%饱和度，产率急剧下降；
- ❖ <10%，造成不可逆的损害。
- ❖ 临界溶氧浓度：30%。
- ❖ 通气比：1: 0.8—1.5 。
- ❖ 适宜的搅拌速度:保证气液混合，提高溶氧。
- ❖ 调整搅拌转速:各阶段的生长和耗氧量不同。

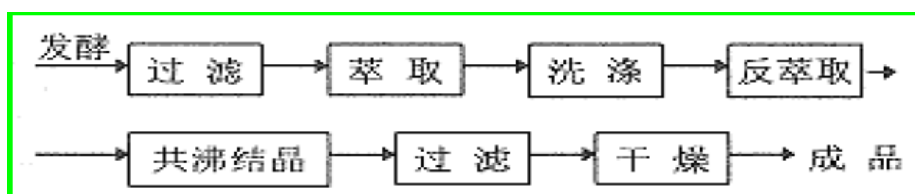
#### (6) 消泡

- ❖ 天然油脂：玉米油；
- ❖ 化学消沫剂：泡敌（丙三醇聚氧丙烯聚氧乙烯醚）。
- ❖ 策略：少量多次。
- ❖ 注意：前期不宜多加入，影响呼吸代谢。

### 四 提炼工艺过程



- ❖ 青霉素不稳定，遇酸、碱、热分解失活水溶液中不稳定，非极性溶剂中稳定易溶于有机溶剂，水中溶解度很小青霉素盐很稳定；降解产物具有致敏性防止降解，条件温和、快速。



## 1 预处理

- ❖ 青霉素的存在部位：发酵液。
- ❖ 浓度较低：10—30kg/m<sup>3</sup>。
- ❖ 含有大量杂质：菌体细胞、核酸、杂蛋白质、细胞壁多糖等、残留的培养基、色素、盐离子、代谢产物等。
- ❖ 目的：浓缩目的产物，去除大部分杂质，改变发酵液的流变学特征，利于后续的分离纯化过程。
- ❖ 预处理:发酵液加少量絮凝剂沉淀蛋白。

## 2 过滤

- ❖ 鼓式真空过滤机过滤：
  - ☞ 一次滤液：pH6.2-7.2，略浑，棕黄或绿色，蛋白质含量 0.5-2.0%。
- ❖ 板框式过滤机过滤：
  - ☞ 硫酸调节 pH4.5-5.0，加入 0.07%溴代十五烷吡啶，0.07%硅藻土为助虑剂。
- ❖ 二次滤液：澄清透明，用于提取（收率 90%）

## 3、溶剂萃取

- ❖ 原理：青霉素游离酸易溶于有机溶剂，而霉素盐易溶于水。

- ❖ 萃取剂：青霉素分配系数高的有机溶剂。
- ❖ 工业上通常用：醋酸丁酯和醋酸戊酯。
- ❖ 除去蛋白质：加 0.05-0.1%乳化剂 PPB。
- ❖ 萃取：2—3 次。

#### 逆流萃取过程

- ❖ 正相萃取：酸化 pH1.8-2.0，
- ❖ 滤液：醋酸丁酯=1：0.3，碟片式离心机分离（浓缩 1.5-2.1）反相萃取：pH6.8-7.4（磷酸盐、碳酸盐缓冲液）。把青霉素从丁酯中提取到缓冲液中。
- ❖ 反复萃取 2—3 次，达到结晶要求。
- ❖ 萃取条件：10℃下。萃取罐冷冻盐水冷却。

#### 4 脱色

- ❖ 萃取液中添加活性炭，除去色素。
- ❖ 过滤，除去活性炭。

#### 5 结晶——直接结晶

- ❖ 加醋酸钠—乙醇溶液反应：得到结晶钠盐。

加醋酸钾—乙醇溶液：得到青霉素钾盐

#### 5 结晶——共沸蒸馏结晶

- ❖ 萃取液，再用 0.5 M NaOH 萃取
- ❖ pH6.4-6.8 下得到钠盐水浓缩液。
- ❖ 加 3-4 倍体积丁醇，16-26℃，真空 0.67-1.3KPa）下蒸馏。
- ❖ 水和丁醇形成共沸物而蒸出。钠盐结晶析出。
- ❖ 结晶经过洗涤、干燥（60℃真空 16h），磨粉，装桶，得到青霉素产品。

#### 7.14.5 教学方法

教学方法采用课堂讲授、案例分析、举例和课堂讨论的形式进行。

#### 7.14.6 作业安排及课后反思

了解青霉素生产工艺。

#### 7.14.7 课前准备情况及其他相关特殊要求

教师认真备课；学生上课前对参考教材进行预习。

### 7.15 教学单元十五 第 9 章 氨基酸发酵生产工艺（2 学时）

### 7.16 教学单元十六 第 10 章 酒精发酵生产工艺（2 学时）

#### 教学日期

第九周 第十五讲 第九周 第十六讲

#### 教学目标

让学生了解氨基酸和酒精发酵的生产工艺的具体工作如何开展，激发学生对发酵制药的兴趣。

#### 教学内容

翻转课堂，学生主讲、老师点评。每个专题请 3 名同学专题汇报，每个班各 1 名。

## 8. 课程要求

### 8.1 学生自学的要求

学生上课前，需对课本进行预习。预习时可参考本大纲的内容进行快速阅读。课后，学生需对课堂上重点强调的内容进行复习，以达到熟练掌握理论知识的目的。

### 8.2 课外阅读的要求

课外，参考教材中的内容，特别是课堂上进行重点强调、补充的内容可通过查阅相关的书籍，或者通过网络（如中国知网、万方、小木虫、优酷视频等）进行相关知识的延伸阅读和了解，以达到扩充知识面的目的。

### 8.3 课堂讨论的要求

对老师提出的讨论题目结合所学知识、自身经验等进行认真思考，积极参与，踊跃发言。在整个讨论过程中，教师不得限制学生的发言，可适当地进行点拨，从而达到最大限度地调动学生学习本门课程的积极性，启发学生的思考能力的目的。

### 8.4 课程实践的要求

按照课程的安排要求，学生需准时参加，不得无故迟到、早退甚至旷课，认真完成课程相关的专题汇报。对于专题汇报，需先进行大组讨论，确定总的中心思想和具体实施途径后，再查阅文献具体实施。

## 9. 课程考核方式及评分规程

### 9.1 出勤（迟到、早退等）、作业等的要求

教师：不得无故调课、停课、迟到和早退，且至少需在每堂课开始前 10-15 分钟到达上课地点，检查多媒体教学设备及课件播放情况是否正常，若有问题需及时调整。

学生：严格考勤，随机抽查点名（对于缺过课的同学，随机点名时要重点抽查）。如若三次随机点名未到，且未向任课教师或辅导员请假的学生，其平时成绩为 0。若学生无故缺课达到本门课程 1/3 学时的，取消其考试资格，该门课成绩为不合格。

课堂专题汇报和讨论要积极认真地准备，教师需鼓励大家积极发言、点评，并对学生发言过程中错误的知识点和认知进行纠正和解释。课堂专题汇报主要以 PPT 的形式进行展现。

### 9.2 成绩的构成与评分规则说明

该门课程成绩构成如下：期末考试卷面成绩占 60%，作业占 20%，考勤占 20%；

课程成绩=卷面总成绩×60%+作业成绩×20%+考勤成绩×20%。

### **9.3 考试形式及说明（含补考）**

考试形式为闭卷形式，相关要求按照四川轻化工大学考试相关要求执行。

## **10. 学术诚信规定**

### **10.1 考试违规与作弊**

考试违规和作弊者，按照四川轻化工大学有关规定进行处理。

### **10.2 杜撰数据、信息等**

杜撰数据和信息者，按照四川轻化工大学有关规定，交学校学术委员会讨论处理。

### **10.3 学术剽窃等**

学术剽窃者，按照四川轻化工大学有关规定，交学校学术委员会讨论处理。

## **11. 课堂规范**

### **11.1 课堂纪律**

按照四川轻化工大学关于课堂纪律的要求执行。

教师认真授课，上课时不得接听或拨打电话，不得讲授与课程无关的内容，在整个教学过程中需维持课堂良好的纪律，以保证教学质量。

学生认真听讲，积极踊跃发言，在教师授课时，对于不懂的或有争议的问题，可以随时举手打断老师，进行讨论式的学习和讲解。不得在上课时打闹，吃零食，玩手机，做任何与课程无关的事。

### **11.2 课堂礼仪**

教师和学生的课堂礼仪按照四川轻化工大学关于课堂礼仪的规定执行。总的要求是教师应衣着规范，干净整洁，普通话标准，为人师表，如无特殊情况，不得坐着授课；

学生同样应衣着整齐，不得着奇装异服，应具备大学生应有的青春风貌。

## 12. 课程资源

### 12.1 教材与参考书

《发酵工程原理与技术》，余龙江主编，高等教育出版社，2016 年

### 12.2 专业学术专著

《发酵工程原理与技术》，陈坚、堵国成，化学工业出版社，2012 年

《发酵工艺原理与技术》，李学如、涂俊铭，华中科技大学出版社，2014 年

《发酵工程》，韩北忠，中国轻工业出版社，2013

《微生物发酵工艺学原理》，韩德权、王梓，化学工业出版社，2013 年（2018 年重印）

### 12.3 网络课程资源

百度文库（地址：<http://wenku.baidu.com>）

小木虫论坛（地址：<http://emuch.net/bbs>）

丁香园（地址：<http://www.dxy.cn>）

### 12.4 课外阅读资源

图书馆的相关资源

电子图书馆中的中国知网、万方的相关资源。

## 13. 教学合约

### 13.1 教师作出师德师风承诺

为了更好地贯彻国家的相关规定，履行教师的职业道德，塑造良好的教师形象，我承诺在整个教学过程中将始终遵守《教师职业道德规范》，教书育人，爱岗敬业；认真执行《中国教育改革和发展纲要》及《教师法》等有关法律法规；积极参加教改实验和科研，探索更好的教育教学方法；关爱学生，尊重学生，理解和亲近学生，不对学生进

行体罚，杜绝任何有损学生身心健康的行为；自觉遵守学校各项规章制度和工作纪律；廉洁从教，身正为范，以德立身。

### 13.2 阅读课程实施大纲，理解其内容

学生应认真阅读课程实施大纲，如有异议或建议，可以向授课教师提出，教师根据实际情况作出修改和调整；如无异议，则视为同意遵守课程实施大纲当中所确定的责任与义务。

### 13.3 同意遵守课程实施大纲中阐述的标准和期望

课程实施大纲编写完成后旨在提高教学规范和效率，学生需按照达到本课程实施大纲所要求的标准进行学习。

## 14.其他说明          无