



发酵工程制药

生物技术制药

目 录

0 1 概述

0 2 优良菌株的选育

0 3 发酵设备

0 4 培养基和灭菌

0 5 **发酵工艺的控制**

0 6 应用实例



01



常菌体浓度的影响及控制



发酵过程的影响因素及控制

- 发酵过程控制是发酵的重要部分
- 同样的菌种，同样的培养基在不同工厂，不同批次会得到不同的结果，可见发酵过程的影响因素是复杂的，比如设备的差别、水的差别、培养基灭菌的差别，菌种保藏时间的长短，发酵过程的细微差别都会引起微生物代谢的不同。了解和掌握分析发酵过程的一般方法对于控制代谢是十分必要的。

发酵过程的影响因素及控制

(一) 菌体浓度的影响及控制

- 菌体浓度反应菌体细胞数和胜利特性
- 结构越复杂的生物，分裂所需时间越长
- 发酵中菌液需控制在合理浓度中，过高，营养消耗过快，有毒废物积累，改变菌体代谢途径，影响溶氧；过低，产率下降
- 依靠调节培养基和补料控制菌体浓度



发酵过程的影响因素及控制

(二) 培养基的影响及其控制

◆1.碳源

- 葡萄糖速效碳源，生长菌体
- 淀粉等迟效碳源，发酵次级代谢产物
- 一般在发酵中后期为保证产生次级代谢产物，有意使菌体处于半饥饿状态，在营养限制的条件下，维持产生次级代谢产物的速率在较高水平。

发酵过程的影响因素及控制

◆ 2. 氮源

- 氨基酸，玉米浆等速效氮源，生长菌体
- 豆饼等迟效氮源，发酵次级代谢产物
- 氮源太多会促使菌体大量生长。有些产物合成受到过量铵离子的抑制，因此必须控制适量的氮。

发酵过程的影响因素及控制

◆ 3. 磷酸盐和微量元素

- 微生物体内磷含量较高，培养基中以磷酸盐为主，发酵中用来计算磷含量的是磷酸根
- 抗生素对磷酸盐浓度很敏感
- 生长浓度：0.32-300 M
- 生产浓度：1.0 M
- 采用生长亚适量磷酸盐浓度

发酵过程的影响因素及控制

◆ 4. 补料

- 补基质和前体
- 中途补料，丰富培养基，避免菌体过早衰老，控制PH，改善通气等
- 通常在生长旺盛期后期，发酵液泡沫位下降，这时耗氧大，溶氧水平接近临界点
- 补料少量多次



发酵过程的影响因素及控制

（三）温度的影响及其控制

◆1、温度影响反应速率

- 发酵过程的反应速率实际是酶反应速率，酶反应有一个最适温度。另外，温度影响发酵液的物理性质

◆2、温度影响发酵方向

- 四环素产生菌金色链霉菌同时产生金霉素和四环素，当温度低于30C时，这种菌合成金霉素能力较强；温度提高，合成四环素的比例也提高，温度达到35C时，金霉素的合成几乎停止，只产生四环素。



发酵过程的影响因素及控制

◆ 1. 影响发酵温度变化的因素

➤ (1) 生物热

微生物进行有氧呼吸产生的热比厌氧发酵产生的热多。

➤ (2) 搅拌热

➤ (3) 蒸发热

通气时，引起发酵液的水分蒸发，水分蒸发所需的热量叫蒸发热

➤ (4) 辐射热

发酵罐内温度与环境温度不同，发酵液中有部分热通过罐体向外辐射。



发酵过程的影响因素及控制

◆ 2. 温度的选择与控制

➤ (1) 最适温度的选择

- ✓ 嗜冷菌适应于0 ~ 26度生长，嗜温菌适应于15 ~ 43度生长，嗜热菌适应于37 ~ 65度生长，嗜高温菌适应于65度以上生长
- ✓ 最适生长温度，最适生产（发酵）温度



发酵过程的影响因素及控制

- **发酵前期**要尽快达到大量的菌体，取稍高的温度，促使菌的呼吸与代谢，使菌生长迅速；
- **中期菌量**已达到合成产物的最适量，发酵需要延长中期，从而提高产量，因此中期温度要稍低一些，可以推迟衰老。因为在稍低温度下氨基酸合成蛋白质和核酸的正常途径关闭得比较严密有利于产物合成。
- **发酵后期**，产物合成能力降低，提高温度，刺激产物合成到放罐。如四环素生长阶段28C，合成期26C后期再升温；黑曲霉生长37C，产糖化酶32~34C。但也有的菌种产物形成比生长温度高。如谷氨酸产生菌生长30~32C，产酸34~37C。



发酵过程的影响因素及控制

➤ (2) 温度的控制

➤ 冷却水



发酵过程的影响因素及控制

(四) pH的影响及其控制

- ◆ pH与微生物的生命活动密切相关——酶催化活性
- ◆ pH的变化又是微生物代谢状况的综合反映——基质代谢、产物合成、细胞状态、营养状况、供氧状况
- ◆ 通过观察pH变化规律可以了解发酵的正常与否



发酵过程的影响因素及控制

1、发酵过程的pH控制

发酵过程中pH是不断变化的，通过观察pH变化规律可以了解发酵的正常与否

2、产物形成

某些产物本身呈酸性或碱性，使发酵液pH变化。如有机酸类 产生使pH下降，**红霉素、洁霉素、螺旋霉素**等抗生素呈碱性，使pH上升。

3、菌体自溶，pH上升，发酵后期，pH上升



实例：pH对林可霉素发酵的影响

- **林可霉素发酵开始**，葡萄糖转化为有机酸类中间产物，发酵液pH下降，待有机酸被生产菌利用，pH上升。若不及时补糖、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 或酸，发酵液pH可迅速升到8.0以上，阻碍或抑制某些酶系，使林可霉素增长缓慢，甚至停止。对照罐发酵66小时pH达7.93，以后维持在8.0以上至115小时，菌丝浓度降低， $\text{NH}_2\text{-N}$ 升高，发酵不再继续。
- **发酵15小时左右**，pH值可以从消后的6.5左右下降到5.3，调节这一段的pH值至7.0左右，以后自控pH，可提高发酵单位。

发酵过程pH变化的原因

- (1) 糖代谢：特别是快速利用的糖，分解成小分子酸、醇，使pH下降。糖缺乏，pH上升，是补料的标志之一
- (2) 氮代谢：当氨基酸中的 $-NH_2$ 被利用后pH会下降；尿素被分解成 NH_3 ，pH上升， NH_3 利用后pH下降，当碳源不足时氮源当碳源利用pH上升。
- (3) 生理酸碱物质利用后pH会上升或下降

- 1. 调节好基础料的pH。基础料中若含有玉米浆，pH呈酸性，必须调节pH。若要控制消后pH在6.0，消前pH往往要调到6.5—6.8
- 2. 在基础料中加入维持pH的物质，如CaCO₃，或具有缓冲能力的试剂，如磷酸缓冲液等
- 3. 通过补料调节pH
- 4. 当补料与调pH发生矛盾时，加酸碱调pH



发酵过程的影响因素及控制

(五) 溶氧的影响及其控制

- 溶氧(DO)是需氧微生物生长所必需。在发酵过程中有多方面的限制因素，而溶氧往往是最易成为控制因素。
- 供氧不足，代谢异常
- 通气，搅拌



发酵过程的影响因素及控制

◆ 1. 溶氧的影响

在28°C氧在发酵液中的100%的空气饱和浓度只有0.25 M左右，比糖的溶解度小7000倍。在对数生长期即使发酵液中的溶氧能达到100%空气饱和度，若此时中止供氧，发酵液中溶氧可在几秒（分）钟之内便耗竭，使溶氧成为限制因素。



发酵过程的影响因素及控制

- ◆ 2. 发酵过程的溶氧变化
 - 发酵初期，生产菌大量繁殖，需氧，溶氧下降
 - 过了生长阶段，需氧减少，溶氧上升
 - 发酵中后期，分批发酵的溶氧不变
 - 生产后期，菌体衰老，溶氧上升



发酵过程的影响因素及控制

- ◆ 3.溶氧浓度的控制
 - 通气, 搅拌
 - 补料



发酵过程的影响因素及控制

(六) CO₂的影响及控制

- CO₂是微生物代谢产物，溶解在发酵液中的CO₂对发酵有刺激或抑制作用
- CO₂和HCO₃影响膜的结构
- CO₂使PH下降
- 影响菌体的呼吸速率等
- CO₂对产物抑制，则降低浓度，对产物促进，则增加浓度
- 降低通气搅拌，则增加CO₂在发酵液中溶解度



发酵过程的影响因素及控制

(七) 发酵过程泡沫的形成与控制

- ◆ 发酵过程起泡的利弊：气体分散、增加气液接触面积，但过多的泡沫是有害的
- ◆ 泡沫产生的原因
 - (1) **通气搅拌的强烈程度**：通气大、搅拌强烈可使泡沫增多，因此在发酵前期由于培养基营养成分消耗少，培养基成分丰富，易起泡。应先开小通气量，再逐步加大。搅拌转速也如此。也可在基础料中加入消泡剂。



发酵过程的影响因素及控制

- (2) 培养基配比与原料组成：培养基营养丰富，黏度大，产生泡沫多而持久，前期难开搅拌
- (3) 菌种、种子质量和接种量：菌种质量好，生长速度快，可溶性氮源较快被利用，泡沫产生几率也就少。菌种生长慢的可以加大接种量
- (4) 灭菌质量：培养基灭菌质量不好，糖氮被破坏，抑制微生物生长，使种子菌丝自溶，产生大量泡沫，加消泡剂也无效。

起泡的危害

- **1.降低生产能力：**在发酵罐中，为了容纳泡沫，防止溢出而降低装量
- **2.引起原料浪费：**如果设备容积不能留有容纳泡沫的余地，气泡会引起原料流失，造成浪费。
- **3.影响菌的呼吸：**如果气泡稳定，不破碎，那么随着微生物的呼吸，气泡中充满CO₂，而且又不能与空气中氧进行交换，这样就影响了菌的呼吸。
- **4.染菌：**泡沫增多引起逃液，在排气管中粘上培养基，就会长菌。随时间延长，杂菌会长入发酵罐造成染菌。大量泡沫由罐顶进一步渗到轴封，轴封处的润滑油可起点消泡作用，从轴封处落下的泡沫往往引起杂菌污染。

消泡

➤ 机械消泡

➤ 消泡剂消泡：天然油脂，聚醚类消泡剂，高碳醇，硅酮类



发酵过程的影响因素及控制

(八) 染菌的防治

发酵过程污染杂菌，会严重的影响生产，是发酵工业的致命伤。

➤ (1) 污染噬菌体

噬菌体的感染力很强，传播蔓延迅速，也较防治，故危害极大。污染噬菌体后，可使发酵产量大幅度下降，严重的造成断种，被迫停产。



发酵过程的影响因素及控制

(2) 污染其它杂菌

- ▶ 有些杂菌会使生产菌自溶产生大量泡沫，即使添加消泡剂也无法控制逃液，影响发酵过程的通气搅拌。
- ▶ 有的杂菌会使发酵液发臭、发酸，致使pH下降，使不耐酸的产品破坏。特别是染芽孢杆菌，由于芽孢耐热，不易杀死，往往一次染菌后会反复染菌。
- ▶ 放线菌由于生长的最适pH为7左右，因此染细菌为多，而霉菌生长pH为5左右，因此染酵母菌为多。



发酵过程的影响因素及控制

- **青霉素发酵染菌**，绝大多数杂菌都能直接产生青霉素酶，而另一些杂菌则可被青霉素诱导而产生青霉素酶。不论在发酵前期、中期或后期，染有能产生青霉素酶的杂菌，都能使青霉素迅速破坏。
- **疫苗生产**危害很大。疫苗多采用深层培养，不加提纯而直接使用，一旦污染杂菌，不论死菌、活菌或内外毒素，都应全部废弃。



发酵过程的影响因素及控制

发酵前期染菌

- 发酵前期最易染菌，且危害最大。
- **原因** 发酵前期菌量不很多，与杂菌没有竞争优势；且还未合成产物（抗生素）或产生很少，抵御杂菌能力弱。
- 在这个时期要特别警惕以制止染菌的发生。
- **染菌措施** 可以用降低培养温度，调整补料量，用酸碱调pH值，缩短培养周期等措施予以补救。如果前期染菌，且培养基养料消耗不多，可以重新灭菌，补加一些营养，重新接种再用。



发酵过程的影响因素及控制

发酵中期染菌

- 发酵中期染菌会严重干扰产生菌的代谢。杂菌大量产酸，培养液pH下降；糖、氮消耗快，发酵液发粘，菌丝自溶，产物分泌减少或停止，有时甚至会使已产生的产物分解。有时也会使发酵液发臭，产生大量泡沫。
- **措施** 降温培养，减少补料，密切注意代谢变化情况。如果发酵单位到达一定水平可以提前放罐，或者抗生素生产中可以将高单位的发酵液输送一部分到染菌罐，抑制杂菌。



发酵过程的影响因素及控制

发酵后期染菌

- 发酵后期发酵液内已积累大量的产物，特别是抗生素，对杂菌有一定的抑制或杀灭能力。因此如果染菌不多，对生产影响不大。如果染菌严重，又破坏性较大，可以提前放罐。



发酵过程的影响因素及控制

造成染菌的主要原因总结

- 1、设备渗漏：夹套穿孔、盘管穿孔、接种管穿孔、阀门渗漏、搅拌轴渗漏、罐盖漏和其它设备漏等
- 2、空气带菌
- 3、种子带菌
- 4、灭菌不彻底

谢谢观看



thanks for watching