

第五章：氧的供需与传递：

一．名词解释：

1. 临界氧浓度：微生物的耗氧速率受发酵液浓度的影响，各种微生物对发酵液中溶氧浓度有一个最低要求这一溶氧浓度叫做“临界氧浓度”。
2. 氧的满足度：溶解氧浓度与临界氧浓度之比。

二.简答

1. 生化反应器通气与搅拌的两个目的:

①使发酵液充分混合，以便形成均匀的微生物悬浮液，促使底物从发酵液向菌体内及代谢产物从菌体内向发酵液的传递。

②供给微生物生长和代谢所需的氧气。

临界氧浓度：微生物的耗氧速率受发酵液浓度的影响，各种微生物对发酵液中溶氧浓度有一个最低要求这一溶氧浓度叫做“临界氧浓度”

2. 比生长速率和氧浓度的关系： $u=u_m \cdot c/(K_{O_2}+c)$

3. 饱和溶氧浓度：

在一定温度和压力下，空气中的氧在水中的溶解度。(mol/m³)

例：25℃ 1×10⁵Pa 0.25mol/m³

影响氧饱和浓度的主要因素:

- ①温度:温度越高，氧饱和浓度越低
- ②溶液的性质：溶质含量越高，氧的溶解度越低
- ③氧分压： $p=HC^*$ 氧分压越高氧溶解度越高

4. 影响微生物需氧量的因素:

菌种的生理特性、培养基组成、溶氧浓度和发酵工艺条件

5. 溶氧对发酵的影响:

①为了正确控制溶解氧浓度，有必要考察每一种发酵产物的（临界溶氧浓度）和（最适溶氧浓度），并使发酵过程保持在最适溶氧浓度。最适溶氧浓度的高低与（菌种特性）和（产物合成的途径）有关。

②需氧发酵并不是溶氧愈高愈好。适当高的溶氧水平有利于菌体生长和产物合成；但溶氧太高有时反而抑制产物的形成。

6. 在发酵过程中引起溶氧异常下降可能有下列原因：

① 污染好气性杂菌，大量的溶氧被消耗掉，使溶氧在较短时间内下降到零附近，如果杂菌本身耗氧能力不强，溶氧变化就可能不明显；② 菌体代谢发生异常现象，需氧要求增加，使溶氧下降；③ 某些设备或工艺控制发生故障或变化，也能引起溶氧下降，如搅拌功率消耗变小或搅拌速度变慢，影响供氧能力，使溶氧降低。又如消沫油因自动加油器失灵或人为加量过多，也会引起溶氧迅速下降。其他影响供氧的工艺操作，如停搅拌、闷罐（关闭排气阀）等，都会使溶氧发生异常变化。

7. 在发酵过程中引起溶氧异常升高可能有下列原因：

在供氧条件没有发生变化的情况下，耗氧量的显著减少将导致溶氧异常升高。如：

1、菌体代谢出现异常，耗氧能力下降，使溶氧上升。

2、污染烈性噬菌体，影响最为明显，产生菌尚未裂解前，呼吸已受到抑制，溶氧就明显上升，菌体破裂后完全失去呼吸能力，溶氧就直线上升

8. 耗氧速率： $r=Q_{O_2} \cdot X$

r ——耗氧速率 (mmolO₂/l.h) Q_{O_2} ——比耗氧速率 (mmolO₂/g.h) X
——菌体浓度 (g/l)

耗氧速率随微生物的种类、代谢途径和菌体浓度的不同而不同

9. 供氧、耗氧和产物形成的关系通常有三种类型:

- (1) 产物形成期的氧消耗与菌体生长期的最大需氧量一致;
- (2) 产物形成期的最大需氧量超过菌体生长期的最大需氧量;
- (3) 产物形成期的最大需氧量低于菌体生长期的最大需氧量。

10. 比耗氧速率: 单位菌体浓度的好氧速率, 又称呼吸强度

11. 氧的传递途径及传质阻力

供氧: 空气中的氧从空气泡里通过气膜、气液界面和液膜扩散到液体主流中。

耗氧: 氧自液体主流通过液膜、菌体丛、细胞膜扩散到细胞内。整个过程必须克服一系列的阻力, 才能被微生物利用。

*12 供氧方面的阻力:

- ①气膜阻力 $1/k_1$, 气体主流与气液界面的气膜阻力 $1/k_G$, 与空气情况有关;
- ②气液界面阻力 $1/k_2$, 也与空气情况相关, 只有具备高能量的氧分子才能透到液相中去, 而其余的则折返回气相;
- ③液膜阻力 $1/k_3$, 气液界面至液体主流间的液膜阻力 $1/k_L$, 与发酵液的成分和浓度有关;
- ④液流阻力 $1/k_4$, 也与发酵液的成分和浓度有关, 通常这不作为一项重要阻力, 因在液体主流中氧的浓度是假定不变的, 当然这只有在适当搅拌的情况下才是这样。

*13. 耗氧方面的阻力:

- ①细胞周围液膜阻力 $1/k_5$, 与发酵液成分和浓度有关;
- ②菌丝丛或团内的扩散阻力 $1/k_6$: 这种阻力与微生物的种类、特性和生理状态等有关。单细胞的细菌和酵母不存在这种阻力, 对于菌丝菌如霉菌等这种阻力最为突出。
- ③细胞膜阻力 $1/k_7$, 与微生物的生理特性相关;
- ④细胞内反应阻力 $1/k_8$: 指氧分子与细胞内呼吸酶系反应时的阻力, 与微生物的种类、生理特性有关。

14. 供氧阻力方面液膜阻力 $1/k_L$ 比较显著, 是控制因素

15. 耗氧方面, 细胞周围液膜的阻力 $1/k_5$ 是很小的, 主要阻力是细胞膜阻力和菌丝丛阻力, 但搅拌可以减少逆向扩散的梯度, 因此也降低了这方面的阻力。

细胞内反应阻力, 只在以下三种情况下才会产生:

- (1) 培养基成分与其相应的酶的作用失活;
- (2) 一些生理条件如温度、pH 值等不适于酶的反应;
- (3) 一些代谢产物积累或不能及时从反应处移去。

16. 双膜理论:

①在气泡与包围着气泡的液体之间存在着界面, 在界面的两旁具有两层稳定的薄膜, 即气泡一侧存在着一层气膜, 液体一侧存在着一层液膜

②在气液界面上, 空气中氧的分压与溶于液体中的氧浓度处于平衡状态, 即界面上不存在氧传递的阻力

③两膜以外的气、液两相主流中, 由于流体充分流动, 氧的浓度基本上是均匀的, 也就无任何传质阻力

17. 在稳定传质过程中, 传质途径上的各点氧浓度不随时间而变化, 故通过两膜的氧传递速率 N 应相等 $N = k_G(P - P_i) = k_L(C_i - C)$

一般不采用传质系数 k_G 或 k_L , 而采用包括这两个因素在内的总传质系数 K_G 或 K_L , 同

时采用总推动力 $P-P^*$ 和 C^*-C 代替传质推动力 $P-P_i$ 和 C_i-C 。因此，上式可改写为：

$$N=K_G(P-P^*)=K_L(C^*-C)$$

18. 亨利定律：与溶解浓度相平衡的理想气体的分压与该气体所溶解的分子浓度成正比

19. 影响传氧速率的因素：

(1) 搅拌：

① 搅拌能把大的空气气泡打成微小气泡，增加了接触面积，而且小气泡的上升的速度要比大气泡慢，因此接触时间也增长。

② 搅拌使液体作涡流运动，使气泡不是直线上升而是做螺旋运动上升，延长了气泡的运动路线，即增加了气液的接触时间。

③ 搅拌使发酵液呈湍流运动，从而减少了气泡周围液膜的厚度，减少液膜阻力，因而增大了 kLa 。

④ 搅拌使菌体分散，避免结团，有利于固液传递过程中的接触面积增加，使推动力均一。搅拌器的型式及流型：下组一宜采用圆盘涡轮式搅拌器，上组宜采用平桨式

(2) 空气流速：

只有在增大 Q 的同时也相应提高转速 N ，使 P_g 不至过分降低的情况下，才能最有效地提高 KLa 。

(3) 空气分布管：单管、多孔环管及多孔分支环管，发酵工业大多采用单管空气分布器

喷口直径越小，气泡的直径越小，溶氧系数就越大

(4) 氧分压：增加空气压力即增大罐压或用含氧较多的空气或纯氧都能增加氧的分压

(5) 罐内液柱高度：通风效率是随发酵罐的高径比 H/D 的增大而增加， $H/D=2\sim3$ 为宜

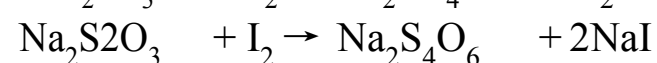
(6) 罐容 (7) 醪液性质 (8) 温度

(9) 有机物质和表面活性剂

(10) 离子强度：电解质溶液的氧传递系数 KLa 比水大，而且随电解质浓度的增加， KLa 也有较大的增加

21. 溶氧系数的测定：

(1) 亚硫酸盐氧化法



每滴定消耗 $1\text{mol Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 必有 $1/4\text{mol}$ 溶氧。

$$N_v = V \cdot N / (1000 \cdot m \cdot t \cdot 4) (\text{mol/ml} \cdot \text{min}) \quad \text{或} \quad N_v = V \cdot N \cdot 60 / (m \cdot t \cdot 4) (\text{mol/L} \cdot \text{h})$$

N_v ：溶氧速率

V ----- 实际搅拌通气样与空白样各加等量、适量 I_2 液后滴定用标准 $Na_2S_2O_3$ 体积之差 (ml)

N ----- $Na_2S_2O_3$ 的标定浓度 (mol/L)

m ----- 样液的体积 (ml)

t ----- 两次取样的间隔，即氧化时间 (min)

N_v 值代入到 $N_v = kLa(C^* - C)$ ，即可算出 kLa $kLa = N_v / 0.21$

$kd = kLa / H$

优点：

氧溶解速度与亚硫酸盐浓度无关，且反应速度快，不需要特殊仪器。

缺点：

不能在真实发酵条件下进行测定发酵液的溶氧，因为亚硫酸盐对微生物的生长有影响，且发酵液的成分、消泡剂、表面张力、黏度、特别是菌体都影响氧的传递

(2) 极谱法

取样极谱法和排气极谱法

(3) 溶氧电极法:

将电极放入Na₂SO₃水溶液中,搅拌,此时电流计的指示定为溶氧值 0%;然后用水冲洗电极,插入水中,通气搅拌,直至电流响应值达到饱和,定为溶氧值100%。

①稳态法:

正在发酵的醪液中,一方面以一定的溶氧速率 N_v 向液中供氧,另一方面正在生长的微生物也以一定耗氧速率 r 消耗溶氧。 $N_v=kLa(C^*-C)$ $r=QO_2X$

溶氧供需速率相等时, $r=Q(C_{进}-C_{出})/V$ V -发酵液的体积

$$Q(C_{进}-C_{出})/V=kLa(C^*-C)$$

*② 动态法

$$dC/dt=kLa(C^*-C)-QO_2X$$

当在某一时刻 $t=0$ 时暂时停止通风,则上式变为: $dC/dt=-QO_2X$

时间 t_1 后,恢复通风,溶液中的氧浓度又将逐步上升则:

$$C=-\frac{1}{kLa}\left(\frac{dC}{dt}+QO_2\cdot X\right)+C^*$$

以 $(dC/dt + QO_2X)$ 对 C 作图即得一斜率为 $-1/kLa$ 的直线,此直线与纵轴的交点即为饱和溶解氧浓度 C^* 。

优点:只需要单一的溶氧电极,可以测得实际发酵系统的 kLa 值。溶氧电极的响应时间应尽可能短。

kLa 值步骤?

22. Kla 和溶氧速率 N_v 的调控

(1) 提高传质推动力 C^*-C

(2) 压力调节(罐压、氧分压)

(3) 通风量和搅拌转速调节

(4) 高径比调节:

① 平均压力增高,传质推动力 (C^*-C) 增大,从而提高溶氧速率;

② 高径比大,反应器截面积小,空截面上的空气线速度 V_s 将增大,从而提高溶氧率

③ 利于降低单位溶解氧功耗即提高传氧效率

(5) 改变发酵液的理化性质:

重复地放出一部分发酵液,补充新鲜灭菌的等体积培养基,这样可以使 $kLa \uparrow$

(6) 传氧中介质的加入:

氧载体:血红蛋白、烃类碳氢化合物、含碳化合物

从需氧方面考虑:

(1) 养料的丰富程度影响菌的生长

(2) 温度的影响

(3) 限制性基质的流加控制

第七章: 发酵染菌及其防治

一. 名词解释:

1. 发酵染菌: 在发酵过程中,生产菌以外的其他微生物侵入了发酵液,从而使发酵过程失去了真正意义上的纯种培养

2. 倒种: 当种子受到杂菌污染又无备用种子时,为了保证发酵生产正常进行,从发酵罐内的发酵液中挑取一部分当作种子,接入到新的发酵罐进行发酵生产,叫“倒种”。

3.

二. 总结

1.造成发酵染菌的可能途径有哪些

- 菌种培养过程操作不当
- 培养基灭菌不彻底
- 发酵设备（如发酵罐、管道）密封不严
- 空气除菌不净

2.既然染菌不可避免，哪我们应该怎样做？

要提高生产技术水平，强化生产过程的管理，把握好各个易染菌的环节，尽可能防止发酵 染菌的发生；而且一旦发生染菌，要能尽快找出其污染的原因，并采取相应的有效措施，把发酵染菌造成的损失降低到最小。

3.	发酵过程	危害最大的杂菌种类
	青霉素的发酵	细短产气杆菌
	链霉素的发酵	细短杆菌、假单孢杆菌
	四环素的发酵	双球菌、芽孢杆菌、荚膜杆菌
	谷氨酸的发酵	噬菌体
	柠檬酸的发酵	青霉菌

4.不同生产阶段染菌对发酵的影响：

- 种子培养期染菌:对整个发酵过程的危害极大
- 发酵前期染菌：严重干扰生产菌的生长繁殖
- 发酵中期染菌：干扰生产菌的代谢，影响产物的生成
- 发酵后期染菌：影响相对较小

5.不同染菌原因对发酵的影响：

- 种子带菌：将导致染菌范围不断扩大，使生产蒙受重大损失。
- 空气带菌：使发酵大面积染菌
- 培养基或设备灭菌不彻底：一般不具延续性，使单个（批）发酵罐发酵失败
- 设备渗漏：染菌几率较大

6.发酵异常现象及染菌原因分析：

(1) 溶解氧的异常变化

- 当杂菌是好气性微生物时，溶解氧的变化是在较短时间内下降，直至接近于零，且在长时间内不能回升；
- 当杂菌是非好气性微生物，而生产菌由于受污染而抑制生长，使耗氧量减少，溶解氧升高。

(2) 排气的CO2 异常变化

如杂菌污染时，糖耗加快， CO2 含量增加，噬菌体污染后，糖耗减慢，CO2 含量减少。因此，可根据CO2 含量的异常变化判断染菌。

(3) 其它异常现象：

如菌体生长不良、pH 值的异常变化、发酵过程中泡沫的异常增多、发酵液的颜色异常变化、代谢产物含量的异常下跌、发酵周期的异常拖长、发酵液的粘度异常增加等判断染菌。

7.染菌原因分析：

(1) 从染菌的规模来分析染菌原因

大批发酵罐染菌：空气系统

部分发酵罐(或罐组)染菌：前期可能是种子带杂菌，或灭菌不彻底，中后期则可能是中间补料系统或油管路系统发生问题所造成的

个别发酵罐连续染菌：设备问题(如阀门的渗漏或罐体腐蚀磨损)，设备的腐蚀磨损所引起的染菌会出现每批发酵的染菌时间向前推移的现象

个别发酵罐偶然染菌：原因比较复杂，因为各种染菌途径都可能引起。

(2) 从染菌的时间来分析

发酵早期染菌：种子带菌、培养基和设备灭菌不彻底、设备或管道有死角

中、后期染菌：中间补料、设备渗漏、操作不合理

(3) 从染菌的类型来分析：

耐热性芽孢杆菌：死角或灭菌不彻底

球菌、酵母：可能是从蒸汽的冷凝水或空气中带来的

浅绿色菌落(革兰氏阴性杆菌)：发酵罐的冷却管或夹套渗漏

霉菌：灭菌不彻底或无菌操作不严格

①设备渗漏的原因：当设备渗漏时，往往每批染菌发生的时间逐渐提前

发酵液中腐蚀性物质对设备的腐蚀

磨蚀

设备加工不良

②盘管渗漏的防止：

放罐后要认真清洗发酵罐

控制冷却水质量，降低其中氯离子含量

对盘管定期检查、试漏，及时发现漏隙

试漏方法：气压试验 水压试验

③空气分布管渗漏的防止

④罐体渗漏的防止

⑤管件的渗漏

隔膜阀

优点：

严密不漏。

无填料。

阀结构为流线型，流量大，阻力小，无死角，无堆积物，在关闭时不会使紧密面轧坏。

检修方便

缺点：

制造不够精密；体积较大，在管道上占用较大的面积和空间。

中心易引起渗漏。

隔膜阀开关费力，需要借助扳手。

如质量不好，帘布与橡胶易脱落，固定隔膜的螺栓也易脱落。

(4) 管路的连接：

螺纹连接 法兰连接 焊接

(5) 空气过滤系统方面原因：

原因分析：进风口、生产环境、空气过滤器

染菌特点：空气过滤系统带菌会使发酵罐批批染菌、罐罐染菌，此时就要对空气过滤系统进行无菌样检测

8. 染菌的检查和判断

无菌试验方法

①显微镜检查法（镜检法）

②肉汤培养法

③平板划线培养或斜面培养检查法

④发酵过程的异常现象观察法

如果肉汤连续三次发生变色反应（由红色变为黄色）或产生混浊，或平板培养连续三次发现有异常菌落的出现，即可判断为染菌。

9. 杂菌污染的挽救及处理：

- （1）种子培养期染菌：应经灭菌后弃之，并对种子罐、管道等进行仔细检查和彻底灭菌
- （2）发酵前期染菌：营养成分消耗不多，应迅速重新灭菌；另处，补充必要的营养成分，重新接种进行发酵。
- （3）发酵中、后期染菌：可以加入适当的杀菌剂或抗生素以及正常的发酵液，以抑制杂菌的生长速度；产品的含量若达一定值，只要明确是染菌也可放罐。
- （4）发酵后对设备的处理：空罐加热灭菌后至120℃以上、30min后，才能使用。也可用甲醛熏蒸或甲醛溶液浸泡12h以上等方法进行处理

10. 杂菌污染的途径和防治：

（1）种子带菌及其防治：

原因分析：种子保存 种子培养设备 种子换代及接种 种子培养基

防治措施：

检查发生污染所用的保藏菌种。

检查发生污染的种子罐接种所用的三角瓶等器皿。

检查对三角瓶、棉花塞、培养基等所进行的灭菌操作。

检查灭菌锅的工作情况，校核温度表和压力表。灭菌锅工作时锅内空气务必排尽。检查无菌室的无菌状况，特别是接种箱。检查接种箱所用的杀菌熏剂。

检查操作人员的操作技术。

对杂菌或噬菌体进行微生物检验。

（2）空气带菌及其防治：

防治措施：

油渗入空气：改用无油润的压缩机。

列管式冷却器穿孔。

过滤介质松动，空气走短路。

过滤介质被水润湿。

过滤介质老化。

（3）设备的渗漏或“死角”造成的染菌及其防治：

设备渗漏主要是指发酵罐、补糖罐、冷却盘管、管道阀门等，由于化学腐蚀电化学腐蚀磨蚀摊口金属与原料中的泥沙之间磨损、加工制作不良等原因形成微小漏孔后发生渗漏染菌。

“死角”包括了发酵设备或连接管道的某一部位和培养基或其他物料的某一部分等。

①盘管的渗漏染菌及防治：

原因分析：由于存在温差（内冷却水温、外灭菌温），温度急剧变化，或发酵液的pH低、化学腐蚀严重等原因。

防治措施：生产上可采取仔细清洗，检查渗漏，或降低冷却水中Cl-1的含量等措施加以防治。

②空气分布管的“死角”染菌及防治：

原因分析：受搅拌与通所的影响，易磨蚀穿孔

防治措施：采取频繁更换空气分布管或认真洗涤等措施

③发酵罐的渗漏染菌及防治：

原因分析：

发生局部化学腐蚀或磨蚀，产生穿孔渗漏。

罐焊接处等的周围容易积集污垢。

发酵罐的制作不良。

发酵罐封头上的各个接口。

发酵罐的修补焊接位置不当。

防治措施：

采取罐内壁涂刷防腐涂料、加强清洗并定期铲除污垢等是有效消除染菌的措施。

采用不锈钢或复合钢可有效克服此弊端并注意清洗是可以避免染菌的。

④管路的安装或管路的配置不合理形成“死角”：

原因分析：

经常将一些管路汇集到一条总的管路上。

管路大多采用法兰连接。

防治措施：

采用单独的排气、排水和排污管可有效防止染菌的发生。

法兰的加工、焊接和安装要符合灭菌的要求尽可能减少或取消连接法兰等措施

⑤管件的渗漏形成染菌及防治：

(4) 生产原料灭菌不彻底导致的染菌：

*原因分析：

①淀粉质原料，在升温过快或混合不均匀时容易结块，使团块中心部位“夹生”，蒸汽不易进入将杂菌杀死

②培养基中诸如麸皮、黄豆饼一类的固形物含量较多，在投料时溅到罐壁或罐内的各种支架上，容易形成堆积，这些堆积物在灭菌过程由于传热较慢，一些杂菌也不易被杀灭。

*防治措施：

①升温前先通过搅拌混合均匀，并加入一定量的淀粉酶进行液化；有大颗粒存在时应先经过筛除去，再行灭菌；

②对于麸皮、黄豆饼一类的固形物含量较多的培养基，采用罐外预先配料，再转至发酵罐内进行实罐灭菌较为有效。

*具体措施：

①购进原料应干燥，仓贮原料应保持干燥。

②制各培养基时，粉碎原料先用冷水浸润，调浆罐搅拌要充分防止结块。

③粉碎原料颗粒应足够小，大颗粒会影响杀菌效果。

④假如生产原料被孢子严重污染，制成培养基后，可在30℃保温数小时，待孢子发芽后再行杀菌。

(5) 操作不当造成染菌及其防治：

*原因分析：

①灭菌时由于操作不合理，未将罐内的空气完全排除，造成压力表显示“假压”。

②产生泡沫发泡严重时泡沫可上升至罐顶甚至逃逸，以致泡沫顶罐。

③连续灭菌过程中，培养基灭菌的温度及其停留时间没有符合灭菌的要求。

④探头或元件灭菌方法不当。

***防治措施：**

灭菌升温前打开排气阀，排尽冷空气。

加入消泡剂进行消泡处理。

连续灭菌过程中，避免蒸汽压力的波动过大，严格控制灭菌温度。

探头或元件保证灭菌彻底。

(6) 噬菌体污染及其防治：

防治措施：

认真保藏好生产菌株，确保其不受污染。

严禁活菌体排放。

强化设备管理。

加强环境卫生工作。

加强对无菌空气，空间杂菌及噬菌体监测工作。

***感染噬菌体后采用的理方法：**

①选育抗性菌株。

②轮换使用专一性不同的菌株。

③加化学药物(如谷氨酸发酵可加 2~4ppm 氯霉素，0.1%三聚磷酸钠，0.6%柠檬酸钠或铵等)。

④将培养液重新灭菌再接种(噬菌体不耐热，70~80 C 经 5 分钟即可杀死)

⑤其他方法

第十章：发酵过程的代谢控制

一. 发酵过程工艺控制的目的、研究的方法和层次

1..发酵过程的种类：分批培养 补料分批培养 半连续培养 连续培养

2.分批发酵：指在一个密闭系统内投入有限数量的营养物质后，接入少量的微生物菌种进行培养，使微生物生长繁殖，在特定的条件下只完成一个生长周期的微生物培养方法

(1) 特点：

①微生物生长分为：停滞期、对数生长期、稳定期和死亡期

②停滞期细胞特征：菌体没有分裂只有生长，因为当菌种接种入一个新的环境，细胞内的核酸、酶等稀释，这时细胞不能分裂。接种物的生理状态和浓度是停滞期长短的关键。

③倍增时间：微生物细胞浓度增加一倍所需要的时间，(td)

$$td = \ln 2 / u = 0.693 / u$$

④稳定期特点：

所有微生物停止生长或细胞增加速度与死亡 速率相等。

出现二次或隐性生长

⑤二次或隐性生长：：

由于细胞的溶解作用，一些新的营养物质，诸如细胞内的一些糖类、蛋白质等被释放出来，又作为细胞的营养物质，从而使存活的细胞继续缓慢地生长，出现通常所称的二次或隐性生长。

⑥死亡期特点：

微生物细胞内所储存的能量已经基本耗尽，细胞开始在自身所含的酶的作用下死亡。细胞死亡速率大于增加速度

此时也是细胞产生或释放对人类有用的抗生素等次生代谢产物的时期

(2) 对于初级代谢产物，在对数生长期初期就开始合成并积累，而次级代谢产物则在对数

生长期后期和稳定期大量合成。

(3) 分批培养的优缺点：

优点：操作简单，周期短，染菌机会少，生产过程和产品质量容易掌握

缺点：产率低，不适于测定动力学数据

3.补料分批培养：

(1)特点：

在分批培养过程中补入新鲜的料液，以克服营养不足而导致的发酵过早结束的缺点
只有料液的加入没有料液的取出，所以发酵结束时发酵液体积比发酵开始时有所增加

(2) 补料分批培养的类型：

单一补料分批培养 重复不了分批培养

(3) 补料分批培养的优缺点：

优点：在这样一种系统中可以维持低的基质浓度，避免快速利用碳源的阻遏效应；可以通过补料控制达到最佳的生长和产物合成条件；还可以利用计算机控制合理的补料速率，稳定最佳生产工艺。

缺点：由于没有物料取出，产物的积累最终导致比生产速率的下降。由于有物料的加入增加了染菌机会。

4.连续培养：

(1) 特点：

发酵过程中一边补入新鲜料液一边放出等量的发酵液，使发酵罐内的体积维持恒定。
达到稳态后，整个过程中菌的浓度，产物浓度，限制性基质浓度都是恒定的。

(2) 连续培养的优缺点

优点：控制稀释速率可以使发酵过程最优化。发酵周期长，得到高的产量。由于 $\mu = D$ ，通过改变稀释速率可以比较容易的研究菌生长的动力学；

缺点：菌种不稳定的话，长期连续培养会引起菌种退化，降低产量。长时间补料染菌机会大大增加。

5.发酵过程工艺控制的目的:最大的比生产速率和最大的生产率；

6.发挥菌种的最大生产潜力考虑之点：

菌种本身的代谢特点 生长速率、呼吸强度、营养要求（酶系统）、代谢速率；

菌代谢与环境的相关性 温度、pH、渗透压、离子强度、溶氧浓度、剪切力等；

7.发酵过程研究的方法和层次

(1)研究方法

单因子实验 数理统计学方法

(2)研究的层次:

初级层次的研究:主要考察目的菌株生长和代谢的一般条件，如培养基的组成、最适温度、最适pH等要求。

代谢及工程参数层次研究:溶氧、搅拌 营养成分的利用速率、生长速率、产物合成速率，

(3)生产规模放大

8.代谢参数按性质分可分三类:

物理参数：温度、搅拌转速、空气压力、空气流量、溶解氧、表观粘度、排气氧（二氧化碳）浓度等

化学参数：基质浓度（包括糖、氮、磷）、pH、产物浓度、核酸量等

生物参数：菌丝形态、菌浓度、菌体比生长速率、呼吸强度、基质消耗速率、关键酶活力等。

9.从检测手段分可分为:

直接参数：通过仪器或其它分析手段可以测得的参数，如温度、pH、残糖等

- ①在线检测参数指不经取样直接从发酵罐上安装的仪表上得到的参数，如温度、pH、搅拌转速；
- ②离线检测参数指取出样后测定得到的参数，如残糖、NH₂-N、菌体浓度

间接参数：将直接参数经过计算得到的参数，如摄氧率、KLa 等.

10. CER 表示单位体积发酵液单位时间内释放的二氧化碳的量:

$$\text{呼吸熵} = \frac{\text{CO}_2}{\text{O}_2} = \frac{\text{OUR}}{\text{CER}}$$

RQ 值一方面可以了解微生物代谢的状况，另一方面也可以指导补料

11. 发酵过程的中间分析:

①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

②通过补糖不但提高了碳源，而且随着体系内葡萄糖浓度提高，糖代谢相关酶活力也提高，产能增加。

12. 糖含量

总糖指发酵液中残留的各种糖的总量。如发酵中的淀粉、饴糖、单糖等各种糖。

还原糖指含有自由醛基的单糖，通常指的是葡萄糖。

13. 氨基氮和氨氮:

①氨基氮指有机氮中的氮（NH₂-N），单位是 mg/100ml。如氨基酸中的氮，黄豆饼粉、花生饼粉中都有有机氮。发酵后期氨基氮回升

②氨氮指无机氮中的氮（NH₃-N）

14. 磷含量:

磷是核酸的组成部分，是高能化合物ATP的组成部分，磷还能促进糖代谢

15. 菌浓度和菌形态

一般前期菌浓增长很快，中期菌浓基本恒定

菌浓测定方法: 测粘度 压缩体积法（离心） 静置沉降体积法
光密度测定法 OD₆₀₀~660 适合于细菌、酵母

16. 产物浓度

17. 产物量的测定

(1)产物量的特殊表示法:

抗生素效价的表示:抗生素效价表示抗生素的有效成分的多少，效价大小用单位（U）

效价表示方法: 重量折算法 重量单位 类似重量单位 特殊单位

重量折算法: 以最低抑菌浓度为一个单位，如青霉素0.6 微克=1U

重量单位: 规定某些抗生素活性部分 1 μg=1u 如链霉素、卡那霉素、红霉素等定义活性部分 1 μg=1u

(2)酶活力的表示法

25°C 下，以最适的底物浓度，最适的缓冲液离子强度，以及最适的 pH 诸条件下，每分钟能转化一微克分子底物的酶定量为一个活性单位。

(3)测量方法:

化学法: 滴定法 比色法 测压法

物理法

生物法: 生物法以抗生素的杀菌能力为衡量效价的标准，常用的生物法测定抗生素，采用杯碟法

二. 发酵过程的pH 控制

1.pH 对微生物的影响:

微生物的影响主要是影响微生物活动环境的离子强度、细胞膜的透性及膜上的带电性和氧化-还原电位、酶活性。

2.特点:

①同种微生物的生长最适pH 和产物积累pH 往往不一致，青霉菌生长的最适pH 为 6.5～7.2，而青霉素合成的最适pH 为 6.2～6.8;

②在产物积累阶段，由于 pH 值不同，也可能会得到不同的发酵产物，如黑曲霉在酸性（pH2～3）时，进行柠檬酸发酵，而在接近中性时，则进行草酸发酵

③ 酵母：pH 3.8—6.0 细菌：pH 6.5—7.5 霉菌：pH 4.0—5.8
放线菌：pH 6.5—8.0

④同种微生物对pH 变化的反映不同:

{ pH 3.5—5.0 生长良好，不易染菌
pH >5.0 时，易染细菌
pH <3.0 时，生长受抑制，易自溶

3 发酵过程引起pH 变化的原因:

(1) 基质代谢

糖代谢：糖缺乏，pH 上升，是补料的标志之一。

氮代谢 当氨基酸中的-NH₂ 被利用后 pH 会下降；尿素被分解成 NH₃，pH 上升；NH₃ 利用后pH 下降；当碳源不足时氮源当碳源利用pH 上升

生理酸性物质、生理碱性物质： 利用后pH 会下降或上升

(2) 产物形成:

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

4.引起发酵液pH 值变化的常见因素:

(1)下降

- ①培养基中C/N 不当，有机酸积累；
- ②消沫油加得过多；
- ③生理酸性物质过多

(2)上升

- ①C/N 比例不当，N 过多，氨基氮释放；
- ②生理碱性物质过多；
- ③中间补料时碱性物加入量过大；

5.pH 对发酵的影响:

影响菌体的生长 pH 影响酶的活性 pH 值影响微生物细胞膜所带电荷的改变

pH 值影响培养基某些成分和中间代谢物的解离 pH 影响代谢方向

影响产物稳定性

黑曲霉：pH： 2—3，柠檬酸 发酵

pH： 7.0，草酸发酵

酿酒酵母：pH： 4.5-5.0—3，乙醇

发酵 pH： 8.0，甘油发酵

谷氨酸菌：pH： 7—8，GA 发酵

pH： 5.0—5.8，谷氨酰胺发酵

6.pH 在微生物培养的不同阶段有不同的影响:

四环素：菌体生长最适pH6.0~6.8，产物合成最适pH5.8~6.0 。

青霉素：菌体生长最适pH3.5~6.0，产物合成最适

7.pH 测量:

取样罐外测量: 试纸法 (精密级) 酸度计法

在线测量: 发酵用复合 pH 电极 + pH 显示仪表

8.pH 的控制策略:

(1) 调节好基础料的初始pH

若含有玉米浆, pH 呈酸性, 必须调节pH。若要控制灭菌后pH 在 6.0, 灭菌前 pH 往往要调到 6.5~6.8。

(2) 在基础料中加入维持pH 的物质:

CaCO₃ , 或具有缓冲能力的试剂, 如磷酸缓冲液

(3) 通过补料调节pH:

在补料与调pH 没有矛盾时采用补料调节pH。

①调节补糖速率, 调节空气流量来调节pH。

② 当 NH₂-N 低, pH 低时补氨水;

当 NH₂-N 低, pH 高时补(NH₄)₂SO₄。

通过补料调节pH 值既调节了培养液的pH 值, 又可补充营养, 进一步提高发酵产率

(4) 当补料与调pH 发生矛盾时, 加酸碱调pH

(5) 应急措施:

改变搅拌转速或通气量, 以改变溶解氧浓度, 控制有机酸的积累量及其代谢速度;

改变温度, 以控制微生物代谢速度;

改变罐压及通气量, 降低CO₂ 的溶解量;

改变加油或加糖量等, 调节有机酸的积累量;

(6) 不同调pH 方法的影响

(7)发酵的不同阶段采取不同的pH 值

9.实际生产中pH 控制:

(1) 调整培养基组分: 适当调整 C/N 比, 使盐类与碳源配比平衡, 一般情况: C/N 高时 (真菌培养基), pH 降低; C/N 低时 (一般细菌), 经过发酵后, pH 上升。

(2) 在发酵过程中进行控制, 根据发酵液pH 值的变化, 进行相应控制, 如过酸时, 可加入NaOH、Na₂CO₃ 等碱性物质进行中和或流加尿素、蛋白质、提高通风量等; 过碱时加H₂SO₄、HCl 或流加糖类、乳酸, 降低通风量等措施, 在生产上, 主要的过程控制方法有

①添加CaCO₃: 当用 NH₄⁺盐作为氮源时, 可在培养基中加入 CaCO₃, 用于中和 NH₄⁺被吸收后剩余的酸。

②氨水流加法: 氨水作为一种碱, 可以中和发酵中产生的酸, 且 NH₄⁺可作为氮源, 供给菌体营养。

③尿素流加法: 味精厂多采用此法, 以尿素作为菌体氮源时, 尿素→氨, 使 pH 上升, NH₄⁺→有机酸时, pH 下降, 这时随着尿素的补加, 又使发酵液pH 上升

10.发酵用复合pH 电极要求:

能高温灭菌 具有长时间的稳定性 要求一定的液络部流通, 维持的液接界电位稳定

外加不锈钢护套或工程塑料护套

三. 温度变化及其控制

1.温度对生长的影响:

嗜冷菌适应于 0~260C 生长, 嗜温菌适应于 15~430C 生长, 嗜热菌适应于 37~650C 生长, 嗜高温菌适应于 650C 以上

2.温度对微生物的影响:

酶活性、膜的通透性以及影响细胞内各种反应的速率