

第二章 微生物发酵制药工艺

2.1 微生物发酵与制药

2.2 微生物生长与生产的关系

2.3 制药微生物生产菌种建立

2.4 培养基制备

2.5 灭菌工艺

2.6 发酵培养技术

2.7 发酵工艺过程的控制

2.8 抗生素的生产工艺

2.1 微生物发酵与制药

- 发酵
- 发酵制药
- 发酵制药的基本过程

1、发酵概念

- 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
- 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（抗逆境条件）。
抗生素，毒素，色素

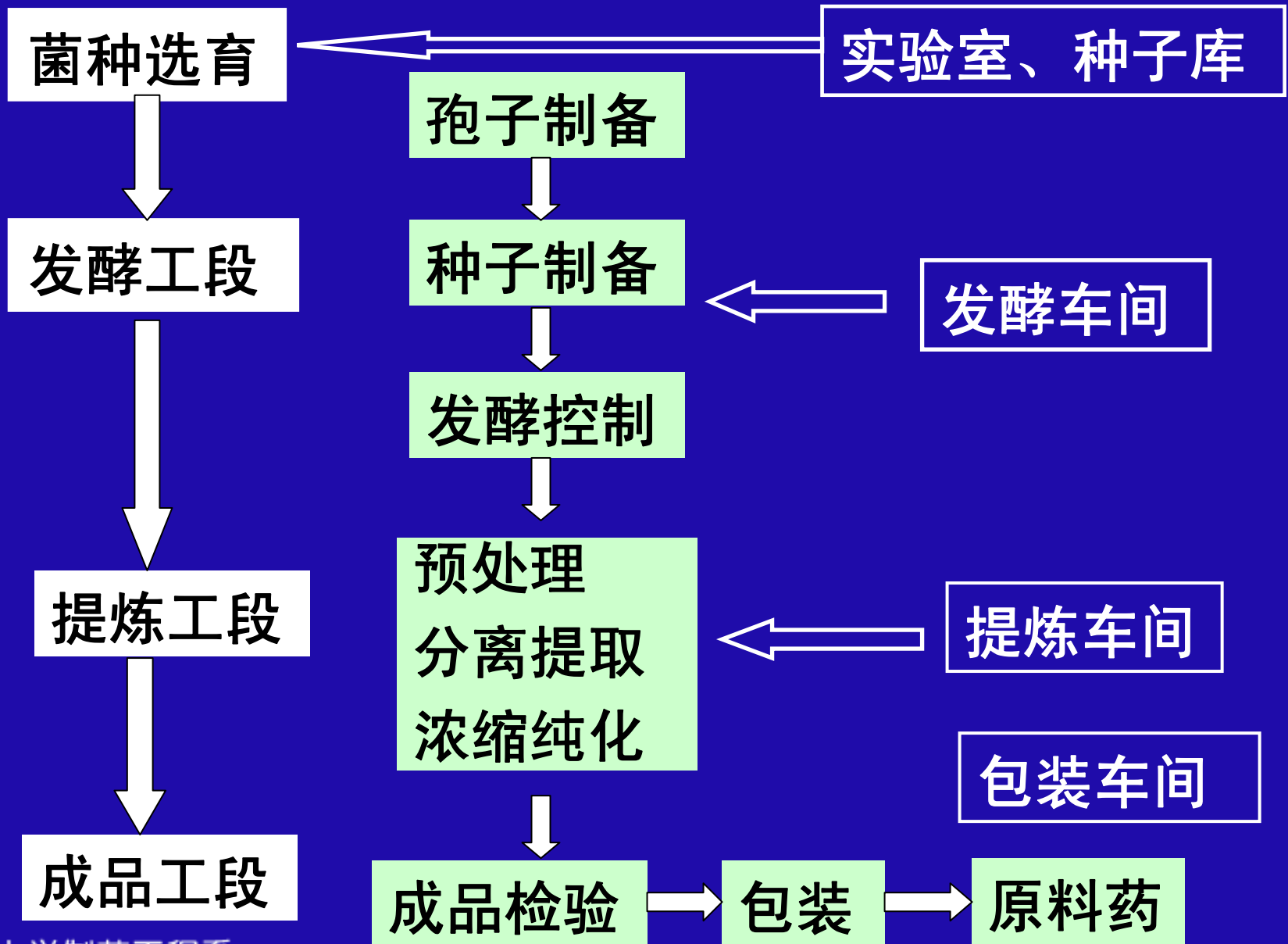
2、发酵制药

- 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
- WWI：对抗细菌性感染药物的需求，使发酵技术奇迹般应用成功。

发酵制药

发酵与制药

3、
发酵制药的基本过程



2.2 微生物的生长与生产的关系

微生物发酵过程特征

微生物生长动力学

影响动力学的因素

动力学模型

1、微生物发酵基本过程特征（批 式）菌体生长与产物生成的特征，三个阶段

发酵前期 (fermentation prophase)

菌体生长期 (cell growth phase)

发酵中期 (fermentation metaphase)

产物合成（生产）期 (product synthesis phase)

发酵后期 (fermentation anaphase)

菌体自溶期 (cell autolysis phase)

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。

2、微生物的生长动力学

生长曲线：生物量或细胞数目随培养时间变化曲线。

意义：描述微生物从生长到自溶死亡的整个过程。

生长速率 r ：单位时间（t）内菌浓或质量（X）变化：

$$r = \frac{dX}{dt}$$

比生长速率 μ ：单位菌体浓度的生长速率

生长速率的标准化，菌体活力大小

$$\mu = \frac{dX}{dt} \left(\frac{1}{X} \right)$$

菌体生物量与时间的关系是S形曲线。

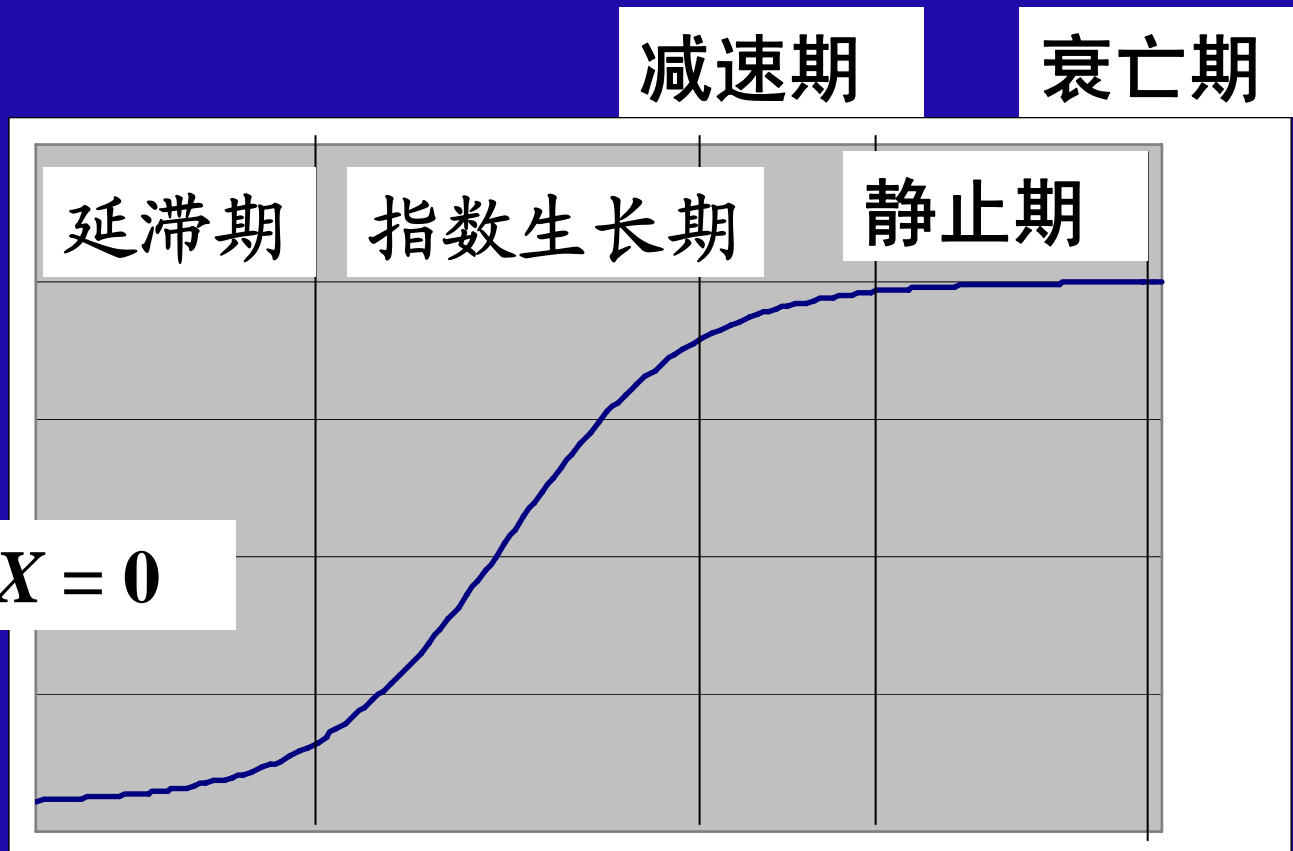
分为五个阶段

$$dX/dt = \mu_{max} X$$

$$dX/dt = \mu X$$

$$dX/dt = (\mu - k_d) X = 0$$

$$dX/dt = -k_d X$$



3、影响生长动力学的因素

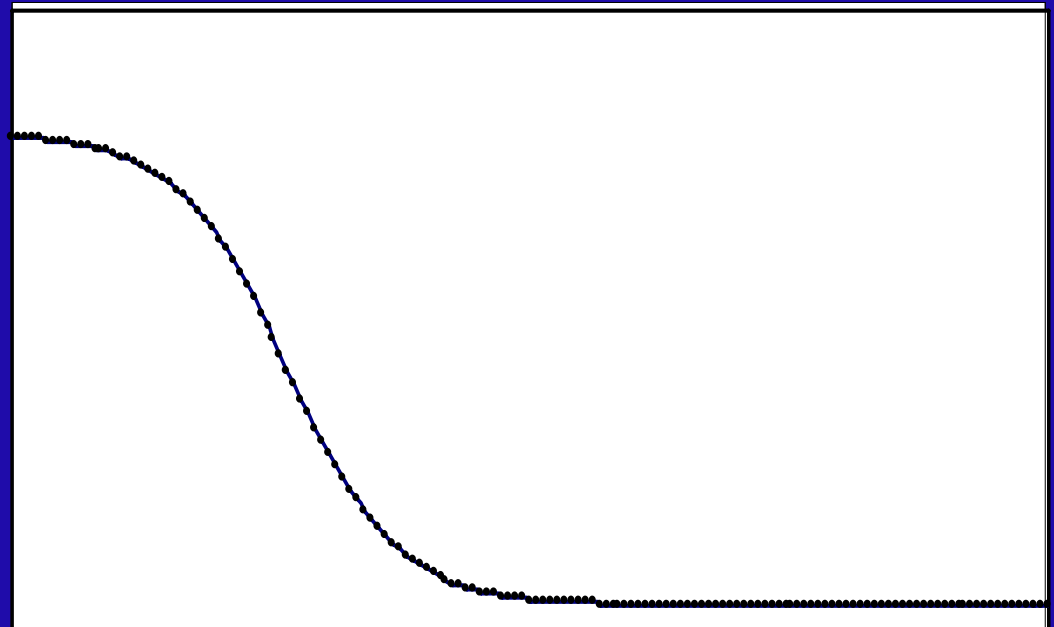
(1) 基质浓度对菌体生长的影响

菌体生长过程，基质逐渐被吸收利用，浓度呈现降低。

基质浓度的减少可用基质消耗速率和比消耗速率表示：

$$r_s = -\frac{dS}{dt}$$

$$q_s = -\frac{dS}{dt} \left(\frac{1}{X} \right)$$



限制性基质浓度与比生长速率的关系

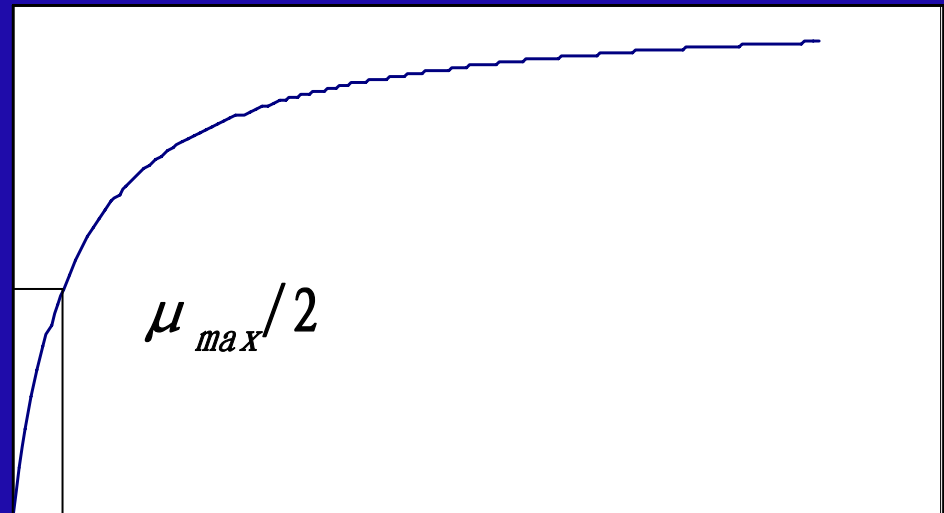
Monod方程:

$$\mu = \mu_{max} S / (K_s + S)$$

S 很低, 浓度与比生长速率成正比。

S 很高, 菌体以最大比生长速率进行生长。

比生长速率



K_s

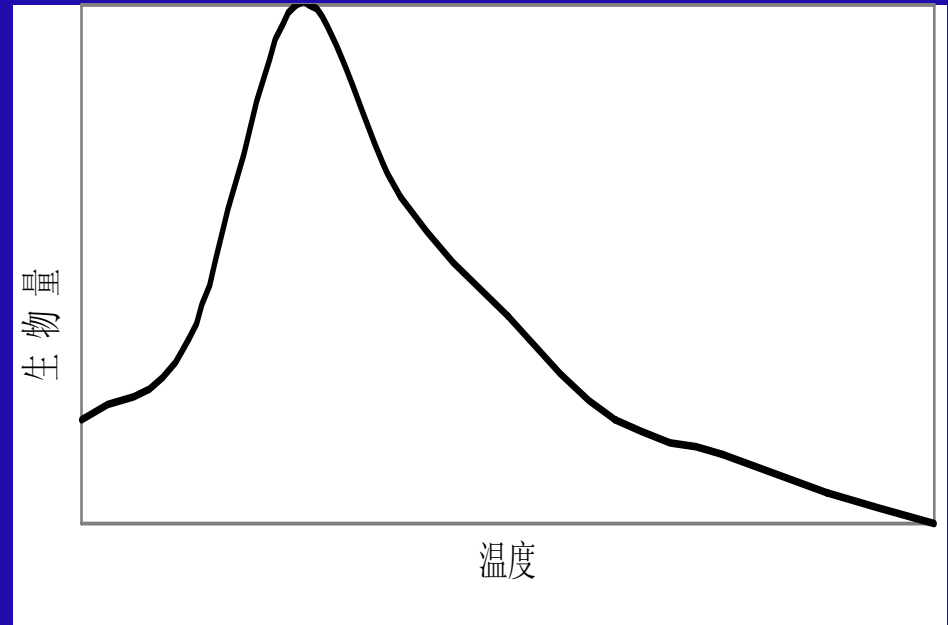
基质浓度

μ_{max} : 各种基质对菌体的生长效率, 不同基质之间比较。

K_s : 菌体对基质亲和力, K_s 越小, 亲和力越大, 利用越好。

(2) 温度

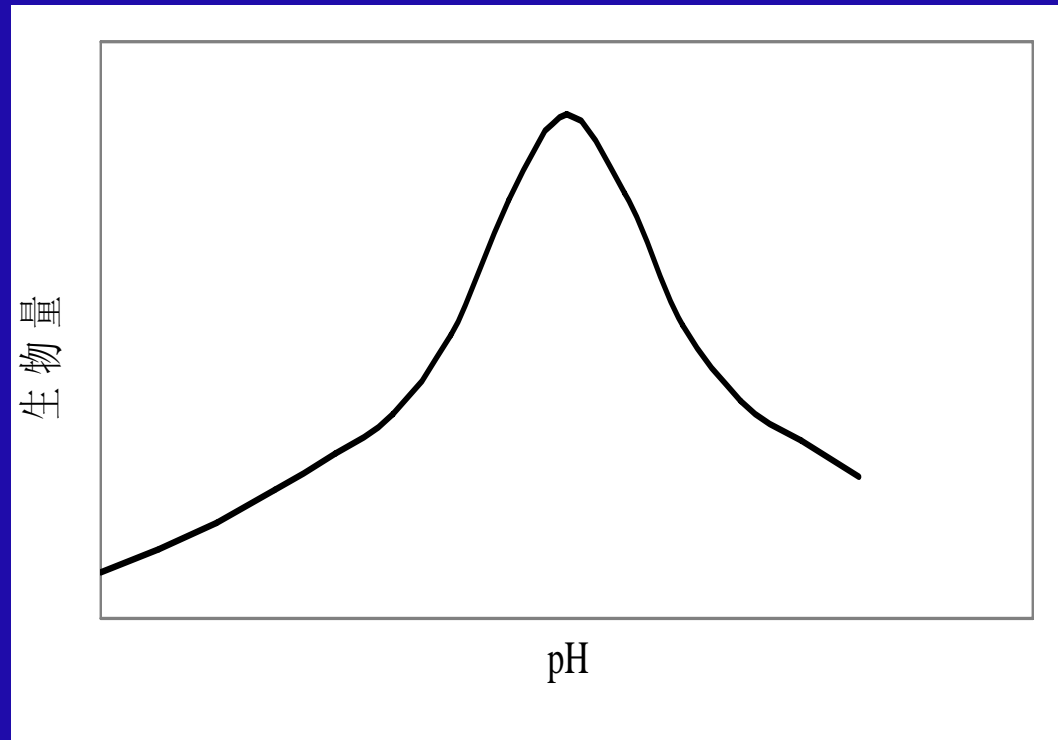
随温度升高而速率增加，超过一定温度点后，随温度升高，速率迅速下降。



在适宜的生长温度范围内，细胞生长速率和比生长速率与温度关系分别为：

$$dX/dt = (\mu - k_d) X; \quad \mu = A \exp(-E_g/RT)$$

(3) pH值



pH值对菌体生长速率的影响与温度的影响类似，在适宜的pH值范围，生长速率最大

4、生长与生产关系的模型

- Gaden把生长与生产分为三种：
- I型：生长与生产偶联型
- II型：生长与生产半偶联型
- III型：生长与生产非偶联型

I型：菌体生长与生产偶联型

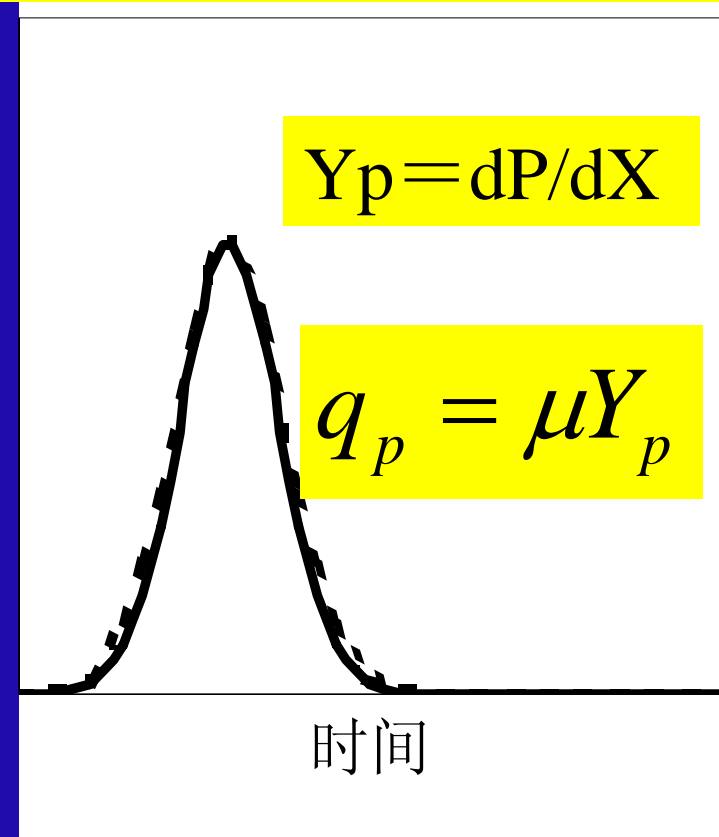
coupling model

菌体生长与产物生成直接关联，
生长期与生产期是一致

菌体生长、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，最大值出现
的时间接近。

产物：初级代谢的直接产物，如
有机酸，乳酸、醋酸等。

$$r_p = \frac{dP}{dt} = Y_P dX / dt = Y_P \mu X$$



II型：生长与生产半偶联型

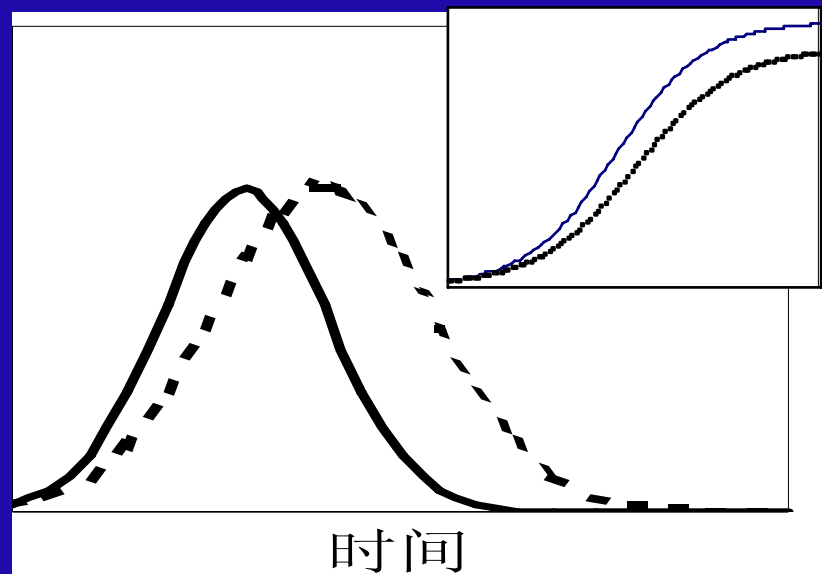
semi-coupling model

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。

生长期期内，无产物生成，生长中后期生成大量的产物

产物：氨基酸的发酵，一部分组成型表达的蛋白质药物

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



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

III型：生长与产物生成非偶联型，
non-coupling model

生长期与生产期在独立的两个阶段

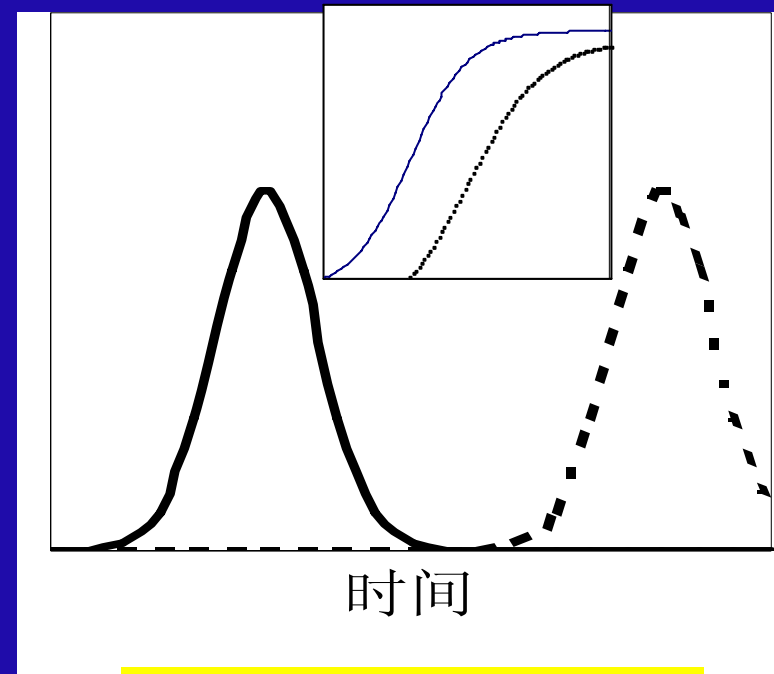
先形成物质消耗和生长高峰

后菌体静止期，产物大量生成，出现产物高峰。

抗生素等次级代谢产物

诱导型基因工程菌的生产

$$r_p = \frac{dP}{dt} = \beta X$$



$$q_p = \beta$$

小结

微生物发酵过程特征：前、中、后期

微生物生长动力学：生长速率与比生长速率

影响动力学的因素：基质浓度（基质消耗、Monod方程）、温度、pH

动力学模型：偶联、非偶联、半偶联，生长与生产之间的关联

思考题

- (1) 微生物发酵过程可分为几个时期，各有何特征？
- (2) 描述微生物生长动力学过程，分析其影响因素。
- (3) 分析微生物生长与生产之间的关联模型。

第二章 微生物发酵制药工艺

2.1 微生物发酵与制药

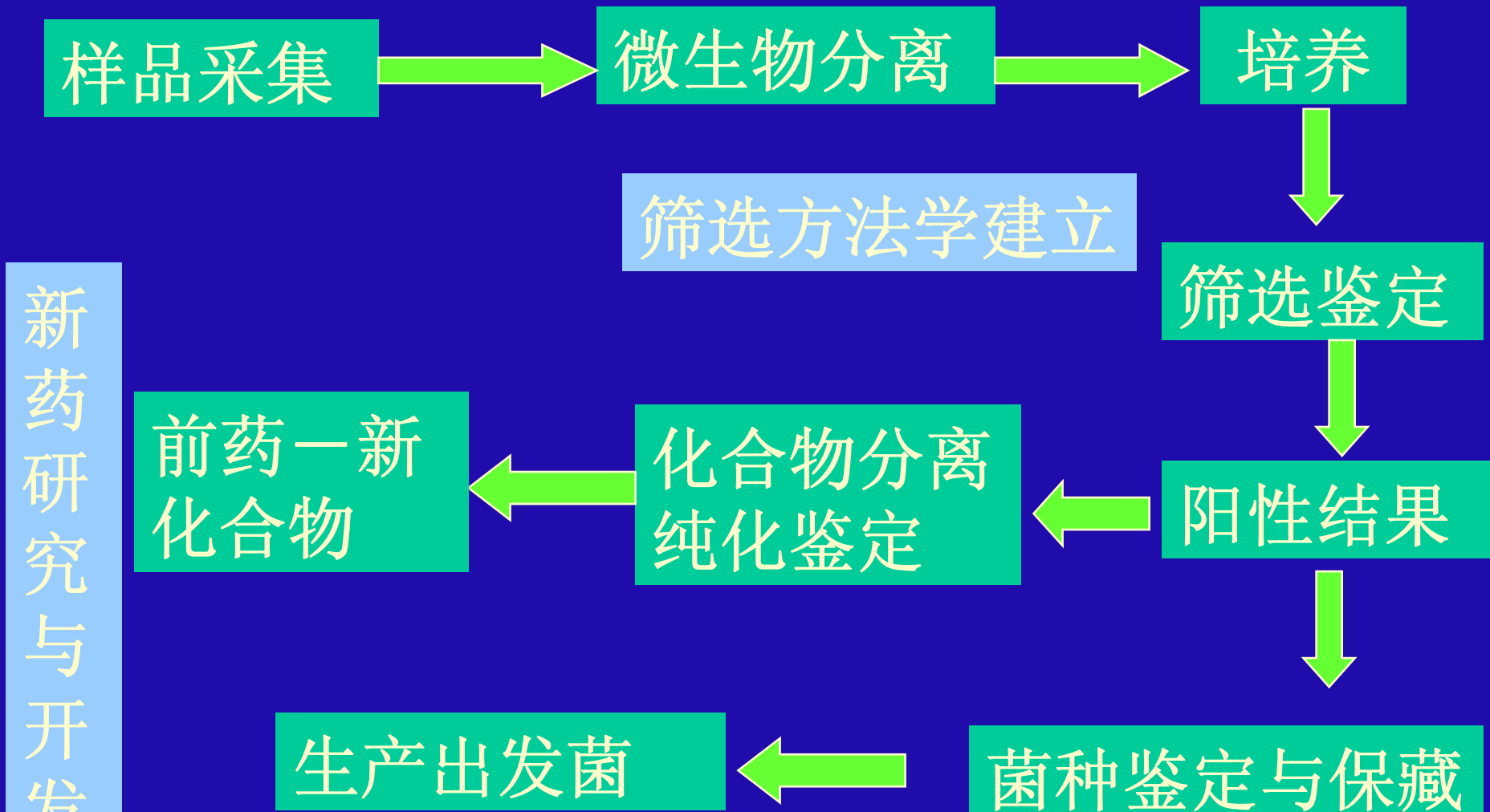
2.2 微生物生长与生产的关系

2.3 制药微生物生产菌种建立

2.3 制药微生物生产菌种的建立

- ❖ 生产菌的自然分离（出发菌的获取）
- ❖ 菌种选育
- ❖ 菌种保藏

微生物药物与菌种的筛选流程



1、生产菌的自然分离(1)

- ❖ 来源：大陆土壤、海洋水体
- ❖ 样品的采集：表层土壤（0—10cm），海洋（0—100m）
- ❖ 预处理：根据分离目的和微生物的特性。
 - （1）温度；
 - （2）SDS—酵母膏， CaCO_3 、 NaOH 处理，减少细菌，有利于放线菌分离；乙酸乙酯、氯仿、苯处理，除去真菌。
 - （3）离心、膜过滤

1、生产菌的自然分离(2)

❖ 培养基:

选择适宜的培养基，营养和pH；添加抑制剂。

❖ 分离方法:

(1) 稀释法：无菌水，生理盐水，缓冲液

(2) 滤膜法：0.22 — 0.45 μm 。细菌在膜上，放线菌菌丝可穿透，进入培养基。

❖ 培养条件：温度。放线菌：25—30℃，32—37℃，45—50℃；7—14天至1月。

药物的筛选

❖ 琼脂扩散法——活性测定：

非致病菌为对象，筛选生物活性物质。

耐药和超敏菌种。

HPLC、LC—MS等，分析鉴定活性物质。

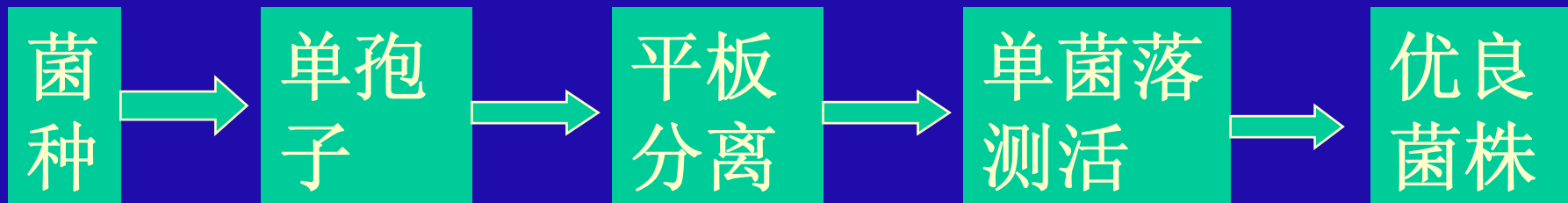
❖ 靶向筛选

❖ 高通量筛选

❖ 高内涵筛选

2、菌种选育——自然选育（1）

- ❖ 定义：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。
- ❖ 应用：（1）菌种的提纯复壮。（2）防止退化，稳定生产水平。1年1次。
- ❖ 过程



效率低, 增产幅度小

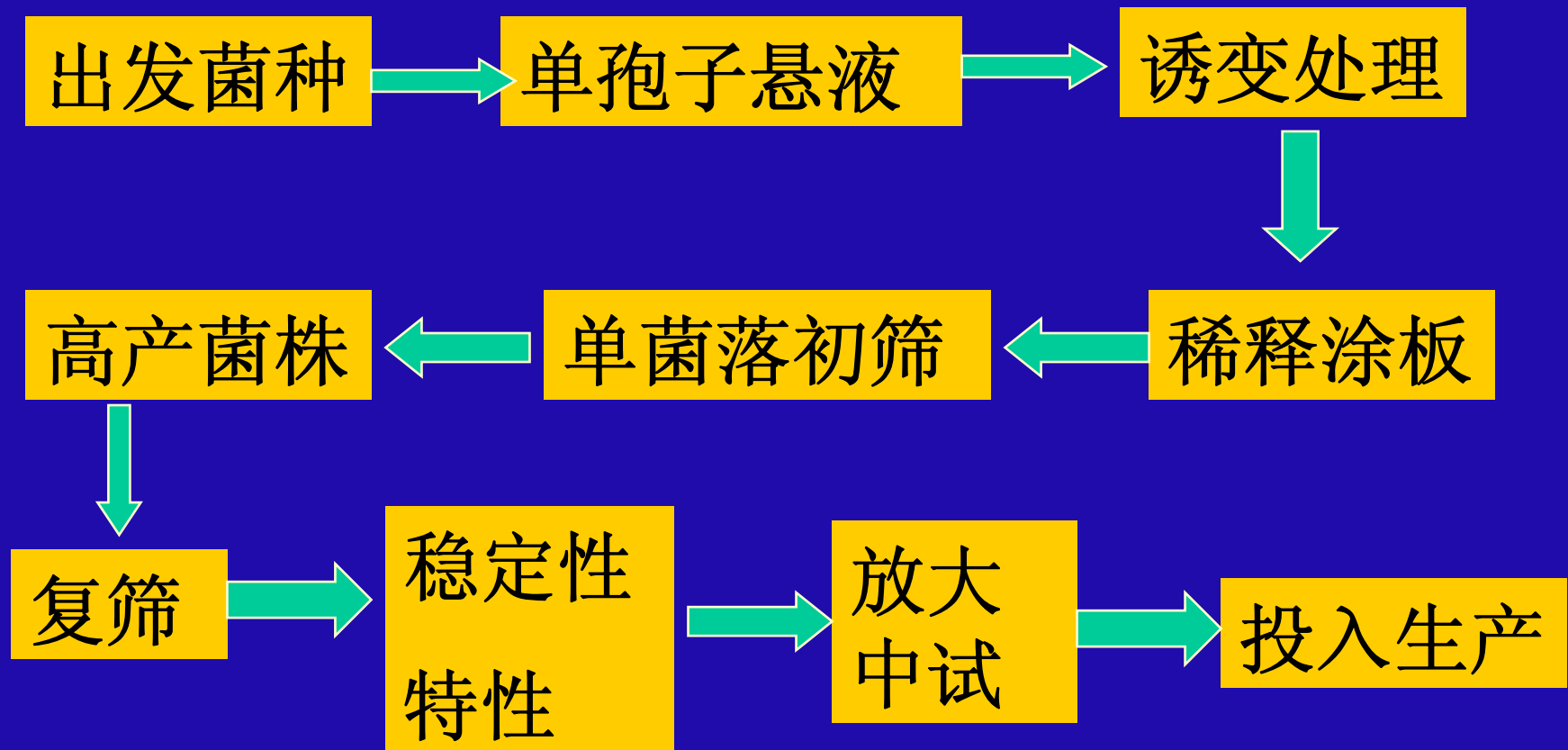
2、菌种选育——诱变育种（2）

- ❖ 定义：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。
- ❖ 物理类：紫外线，快中子，激光，太空射线。
- ❖ 化学类：碱基类似物，嵌合剂，亚硝酸。
- ❖ 生物类：噬菌体，转座子。
- ❖ 特点：快速，简单，效益大。
- ❖ 缺点：无定向性。

诱变方案设计

- ❖ 出发菌种的选择：较高产，对诱变剂敏感。
- ❖ 诱变剂的使用：交叉使用多种，合理组合。中等剂量（80%致死率）。
- ❖ 选择压：施加一定的选择压，获得耐药菌株。措施：添加抗生素，提高前体浓度，增加产物浓度。

诱变育种流程



2、菌种选育——杂交育种（3）

❖ 概念：

两个不同基因型的菌株，通过结合或原生质体融合，使遗传物质发生重新组合，从中分离筛选出具有优良性状的新菌株。

❖ 特点：有一定的定向性。

❖ 种类：

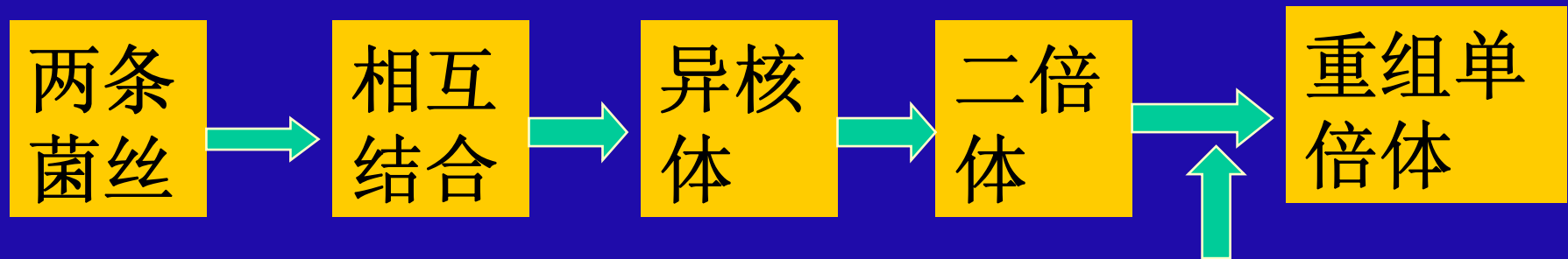
体细胞重组

接合

原生质体融合

(1) 体细胞重组殖育种

- ❖ 概念：准性生殖
- ❖ 范围：放线菌，半知菌纲的真菌
- ❖ 过程



- ❖ 产黄青霉：提高青霉素产量
- ❖ 灰黄链霉菌：灰黄霉素产量

对氟苯丙氨酸

(2) 接合育种

- ❖ 概念
- ❖ 范围：细菌、放线菌
- ❖ 过程：

两种细胞
混合培养

基因片段进
入另一细胞

合子

重组单
倍体

虽然有成功报导，但多数效果不显著。

(3) 原生质体融合育种

❖ 概念

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。

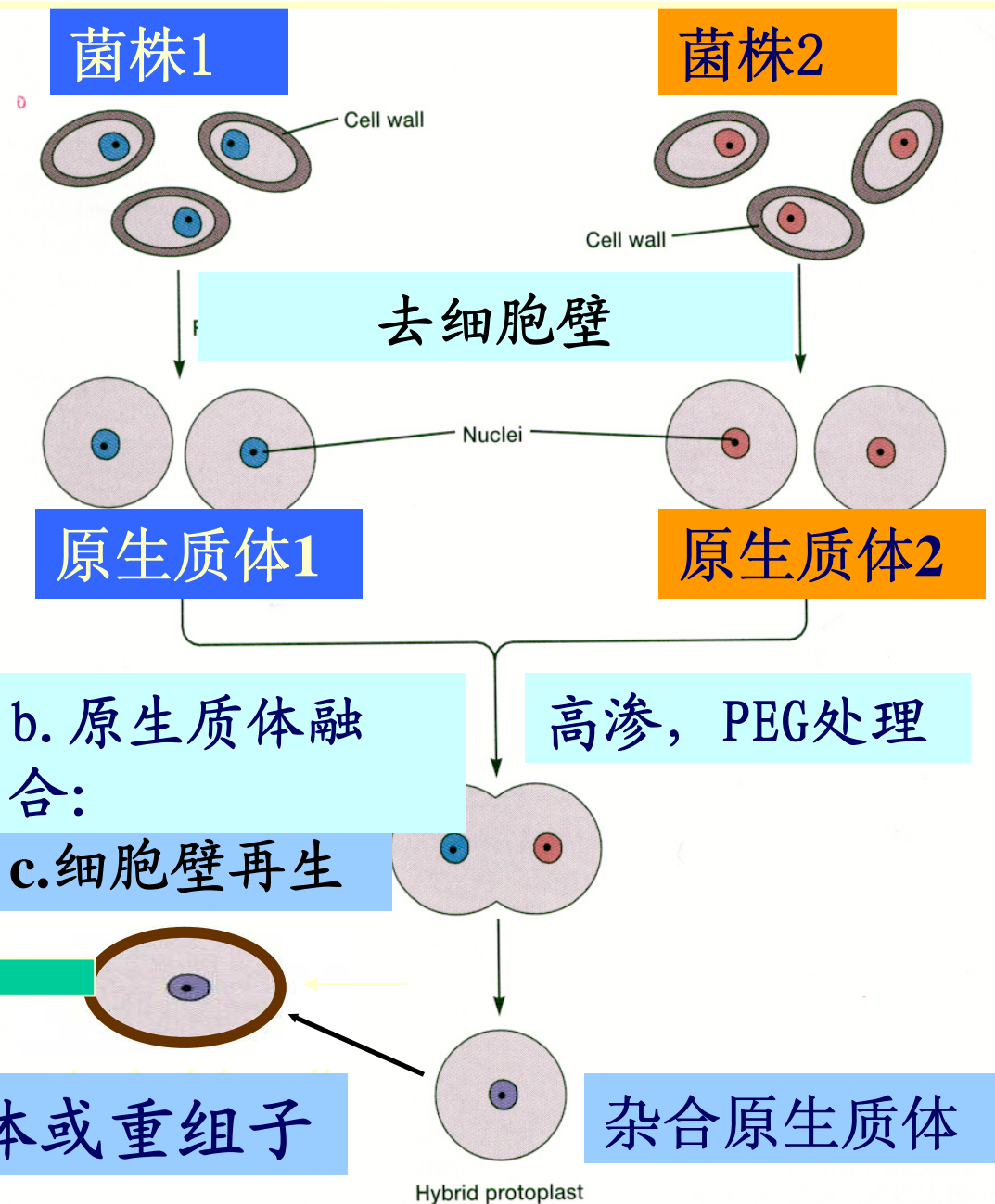
发酵制药

生产菌种的建立

操作过程

a. 原生质体制备:

用去壁酶处理将微生物细胞壁除去，制成原生质体。



e. 高产菌株

d. 筛选, 鉴定

2、菌种选育——分子定向育种 (4)

- ❖ 定向分子育种概念：
- ❖ 在分子水平，体外模拟自然进化机制，是突变、重组、选择的重复循环。
- ❖ 获得有益突变，淘汰有害突变，使进化向有益的方向发展。

原理与操作过程

突变：产生多样性。随机突变，诱变

重组：产生新功能。同源重组，非同源重组

选择和筛选：表面展示，活性检测

野生型随机突变1—2循环，积累有益突变。

多轮循环，组合有益突变，消除有害突变。

基因组shuffling

随机突变获得单个性状优良的菌株

多个菌株的原生质体混合、融合、再生，形成第一个融合库（F1）

再次重复循环融合，得到融合库F2、F3、F4

筛选鉴定

2、菌种选育——组合生物合成（5）

- ❖ 概念：
- ❖ 将控制不同产物的生物合成基因进行有矢组合，形成新的基因模块，从而合成新化合物。
- ❖ 是基因工程育种的一种

3、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。

❖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）

保藏方法

- ❖ 低温斜面保藏：低温降低新陈代谢。4℃，RH70%以下。短期保藏，1—6个月；易变异
- ❖ 石蜡封存：隔绝氧气，减少蒸发。4℃，约1年。
- ❖ 砂土管保藏：干燥抑制生长。孢子吸附在砂土上，真空抽气干燥。干燥器于冰箱，数年。
- ❖ 冷冻干燥保藏：保护剂降低菌体细胞冰点，减少冰晶对细胞伤害。低温避光，中期保藏，5~10年。
- ❖ 液氮保藏：培养物与冷冻保护剂混合，密封。液氮（-196℃）罐或-80℃冰箱。低温、缺氧、避光和营养缺乏环境。长期保藏。

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>
- ❖ ATCC: American Type Culture Collection,
<http://www.atcc.org/>
- ❖ IFO: Institute for Fermentation, Osaka, Japan
- ❖ NCTC: National Collection of Type Culture,
London, UK

小结

- ❖ 生产菌的分离：自然分离与筛选
- ❖ 菌种选育：自然选育、杂交育种、定向育种
- ❖ 菌种保藏：低温、干燥；机构

思考题

- (1) 如何进行生产菌的分离与筛选？
- (2) 比较各种菌种选育方法的优缺点。
- (3) 菌种保藏的原理是什么？有那些主要方法，各有何优缺点？

第二章 微生物发酵制药工艺

2.1 微生物发酵与制药

2.2 微生物生长与生产的关系

2.3 微生物生产菌种建立

2.4 发酵培养基制备

2.4 发酵培养基制备

❖ 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。

2.4.1 培养基的成分

碳源

氮源

无机盐

水

生长因子

前体与促进剂

消泡剂

1、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。

碳源种类

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

2、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。

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 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。

3、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。

4、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。

5、生长因子（growth factor）

概念：

维持微生物生长所必需的微量有机物，不起碳源和氮源作用。

种类：

维生素、氨基酸、嘌呤或嘧啶及其衍生物、脂肪酸等。

天然成分中含有：一般无需添加。

营养缺陷型菌株：必需添加。

6、前体 (precursor)

❖ 概念:

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。

❖ 使用:

添加前体是提高抗生素产量的重要措施。
多次少量流加的工艺。

6、促进剂 (accelerant)

❖ 概念:

促进产物生成的物质，但不是营养物，也不是前体的一类化合物。

❖ 种类:

氯化物有利于灰黄霉素、金霉素合成。

表面活性剂吐温、清洗剂，脂溶性小分子化合物等，起诱导作用。

7、消沫剂（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。

2.4.2 培养基种类及其质量控制技术

培养基的种类

按用途：选择性、鉴别性、富营养培养基等

按物理性质：固体，半固体、液体培养基

按化学组成：合成、半合成、天然培养基

按发酵过程中所处位置和作用：斜面或平板固体、种子、发酵和补料培养基。

1、固体培养基

➤概念：（solid medium）

细菌和酵母的固体斜面或平板培养基，链霉菌和丝状真菌的孢子培养基。

➤制备：

液体培养基添加1.0-2.0%琼脂粉。

➤作用：

提供菌体的生长繁殖，形成孢子。

1、固体培养基—要求与质量控制

❖ 单细胞培养基:

营养丰富，满足菌体生长迅速，不能引起变异。

❖ 孢子培养基:

基质浓度较低，无机盐浓度适量，以利于孢子形成。营养不宜太丰富，否则不易产生孢子。

2、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。

2、种子培养基—要求与质量控制

培养基成分必需完全，营养丰富。

用速效性、容易被利用的碳、氮源和无机盐等物质，但浓度不宜高。

种子培养基要与发酵培养基相适应，主要成分接近，不能差异太大。

缩短发酵的延滞期。

3、发酵培养基

❖概念： (fermentation medium)

提供微生物生长、目标产物生成的生产用培养基。

❖作用：

不仅要满足菌体的生长和繁殖，还要满足菌体合成目标产物，是发酵生产中最关键和最重要的培养基。

3、发酵培养基—要求

- ❖ 营养物质浓度和粘度适中
- ❖ 组成上丰富完整
- ❖ 不同菌种和不同产物，对培养基的要求差异很大，组成和配方需要优化

4、补料培养基(fed medium)

- ❖ 概念：发酵过程中添加补充的培养基。
- ❖ 作用：稳定工艺条件，延长发酵周期，提高目标产物产量
- ❖ 组成：各种必要的营养物质，碳源、氮源、前体
- ❖ 制备：按单一成分配制，各自独立控制，或按一定比例制成复合补料培养基。

5、控制发酵培养基质量

(1) 控制水质：

恒定水源和恒定的水质。

地下深层井水，对水质定期化验检查，使用符合要求的水质配制各种培养基

措施：检测与控制水质参数

pH、溶解氧、可溶性固体、污染程度、各种矿物，特别是重金属的种类和含量。

(2) 控制培养基原料的质量:

来源与种类的选择

农产副品：因品种、产地、加工、贮存条件不同而质量差异较大。

化学原料：杂质含量也不相同。

❖措施：保持稳定的原料来源。

更换原料时，必需再进行一系列试验，确保产量和质量的控制和稳定性。

原料的选择试验：

不同碳源、氮源对菌种生长的能力和产物的生产能力很不相同。

对原料进行试验，选择满足发酵要求的来源。

注意：

- ❖ 碳氮浓度与配比：适宜
- ❖ 速效和缓效成分相互配合，发挥综合优势
- ❖ pH：配制时加入酸碱性物质搭配，甚至使用缓冲剂。

(3) 控制培养基的黏度:

❖对发酵的影响:

- ✓高黏度的培养基，不易彻底灭菌
- ✓影响发酵的通气搅拌等物理过程
- ✓直接影响菌体对营养的利用
- ✓目标产物的分离提取造成困难

❖措施：固体不溶性成分，淀粉、黄豆粉等增加培养基的黏度，酶水解，降低大分子物质

(4) 控制灭菌操作:

高压蒸气灭菌影响培养基的有效成分甚至是活性。

较高温度下长时间灭菌，营养成分会破坏，甚至产生有毒物质。

磷酸盐与碳酸钙、镁盐、铵盐也能反应，生成沉淀或络合物，降低利用度。

维生素等不耐高温分解破坏、失活。

2.4.3 制药生产用培养基的配制

一般设计原则

设计思路

计算与定量配制

优化

1、培养基设计一般原则

- ❖ 生物学原则：根据不同微生物营养和反应需求设计。
营养物质组成：较丰富，浓度适当。
成分之间比例：恰当，C/N比适宜，有机和无机氮
原料之间：不能产生化学反应。适宜的pH和渗透压
- ❖ 工艺原则：不影响通气搅拌、分离精制和废物处理，过程容易控制。
- ❖ 低成本原则：原料来源方便，质量稳定，质优价廉。
- ❖ 高效经济原则：满足菌体生长和合成产物的需求，最高得率，最小副产物。

2、培养基设计基本思路

- ❖ 起始培养基：根据他人的经验和使用。
- ❖ 单因素实验：确定最适宜的培养基成分。
- ❖ 多因素实验：各成分之间最佳配比和浓度优化。
- ❖ 中试放大试验：摇瓶、小型发酵罐，到中试，最后放大到生产罐。
- ❖ 综合考虑各种因素，产量、纯度、成本等后，确定一个适宜的生产配方。

3、理论计算与定量配制

- ❖ 微生物生长和生产可用下列表达式表示：

碳源和能源 + 氮源 + 其他营养物质 → 细胞 + 产物 +
 $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} + \text{热量}$

- ❖ 单位细胞生物量所需最小的营养物质：
- ❖ 单位产量的最小底物浓度：

碳源和氮源进行转化率计算和分析

- ❖初步计算：参考微生物的化学和元素组成。
- ❖转化率：单位质量原料生产的产物量或细胞量。
- ❖理论转化率：根据代谢途径的物料衡算
- ❖实际转化率：发酵过程中实际测量数值计算。
- ❖目标：使实际转化率靠近理论转化率。

无法从生化反应原理来推断和计算出最佳培养基配方
根据生理学和生物化学理论
参照前人所用的经验培养基
结合菌的特殊生物学和产品特征要求
进行大量细致和周密的试验研究

小结

培养基组成与作用：C、N、无机盐、水、生长因子、前体与促进剂、消泡剂

培养基制备与质量控制：固体、种子、发酵培养基

生产用培养基制备：原则、思路、优化

思考题

- (1) 培养基组成成分有哪些，有何作用？
- (2) 固体培养基、种子培养基、发酵培养基的组成特点及其如何衔接？
- (3) 如何研制生产用培养基？

第二章 微生物发酵制药工艺

2.1 微生物发酵与制药

2.2 微生物生长与生产的关系

2.3 制药微生物生产菌种建立

2.4 培养基制备

2.5 灭菌工艺

2.5 灭菌工艺

灭菌方法与原理

培养基灭菌工艺

空气除菌工艺

几个概念

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。

2.5.1 灭菌方法与原理

- 1、化学灭菌
- 2、物理灭菌

1、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。

2、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。

2.5.2 培养基灭菌

1、微生物高温死亡动力学与灭菌的关系

微生物受热死亡过程的一级动力学反应：

$$-dX/dt = k_d X$$

微生物浓度与灭菌时间成正比，浓度越高，灭菌时间越长。

灭菌时间与比死亡速率之间的关系

$$t = \frac{1}{k_d} \ln\left(\frac{X_0}{X}\right)$$

k_d 与微生物种类、生理状态、灭菌温度有关
以杀死芽孢的温度和时间为指标。

确保彻底灭菌，实际操作中增加50%的保险系数。

2、培养基灭菌的操作方式

(1)分批灭菌操作，间歇灭菌,实罐灭菌:

配制好培养基输入发酵罐内，直接蒸汽加热，达到灭菌要求的温度和压力后维持一段时间，再冷却至发酵要求的温度。

特点：不需其他的附属设备，操作简便，手动。

缺点：加热和冷却时间较长。营养成分损失较多，罐利用率低。适合小批量生产规模。

分批操作的灭菌过程

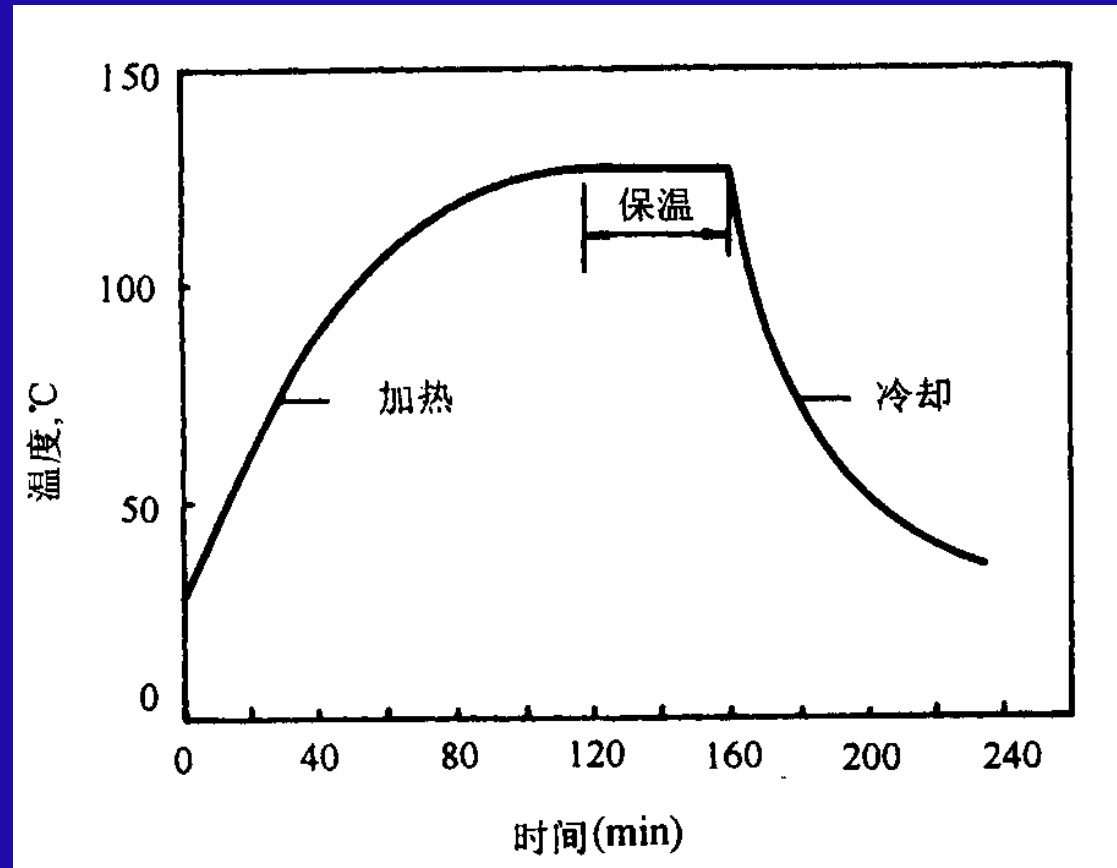
加热升温:

维持灭菌温度:

15—30min, 121℃;
0.09—0.10 MPa

冷却降温:

每段对灭菌的贡献于
取决时间长短。



分批灭菌的操作过程

- ❖ 通入蒸汽：空气管、夹套通入蒸汽。
- ❖ 加热升温：70℃，取样管、放料管通入蒸汽。
- ❖ 维持保温：120℃，罐压0.1MPa，排气。调节进汽和排气量，维持30min。
- ❖ 冷却降温：依次关闭排气、进汽阀。罐压低于空气压力后，通入无菌空气，夹套通入冷却水降温。

(2) 连续灭菌操作

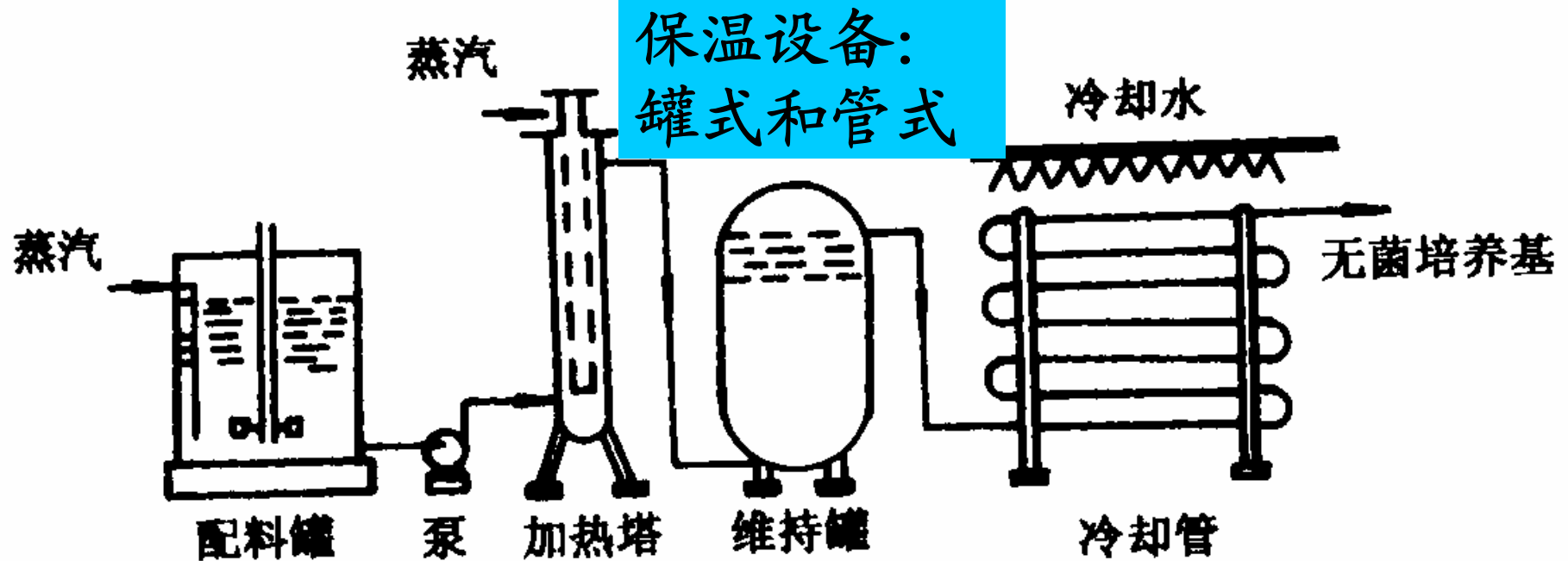
高温短时灭菌操作，连消：

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。

(2) 连续灭菌操作流程图

培养基与高压蒸汽直接混匀，达到灭菌温度
(130—140℃)



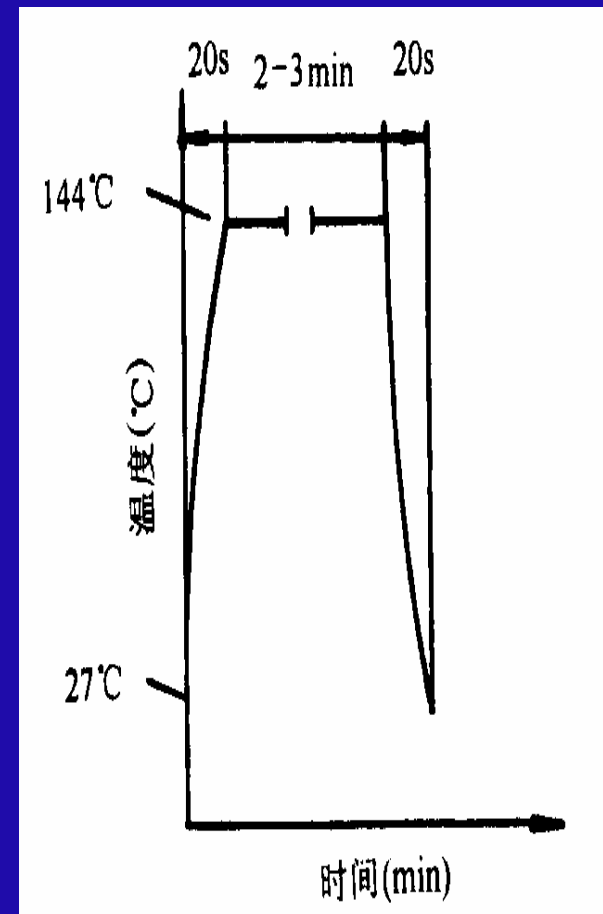
加热器：喷射式和塔式

冷却器：喷淋式、螺旋板式、真空冷却

(2) 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。

2.5.3 空气除菌操作工艺

1、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。

空气流量：一般0.1-2.0。

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，或失败率 10^{-3} 。

2、工业制备大量空气的方法

- ❖ 加热灭菌：利用空气压缩时所产生的热量除菌，无菌化程度不高的发酵过程。
- ❖ 静电除菌：通过高压电场，带电粒子被吸附。
- ❖ 介质过滤：捕集粒子及各种微生物。发酵工业采用。

3、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 μm 。
- ❖ 离心场作用：颗粒及其微生物沉降
- ❖ 直接被截留：颗粒惯性碰撞，相互集聚成大颗粒。气流速度越大，惯性越大，截留效果越好。
- ❖ 静电引力：有一定作用。

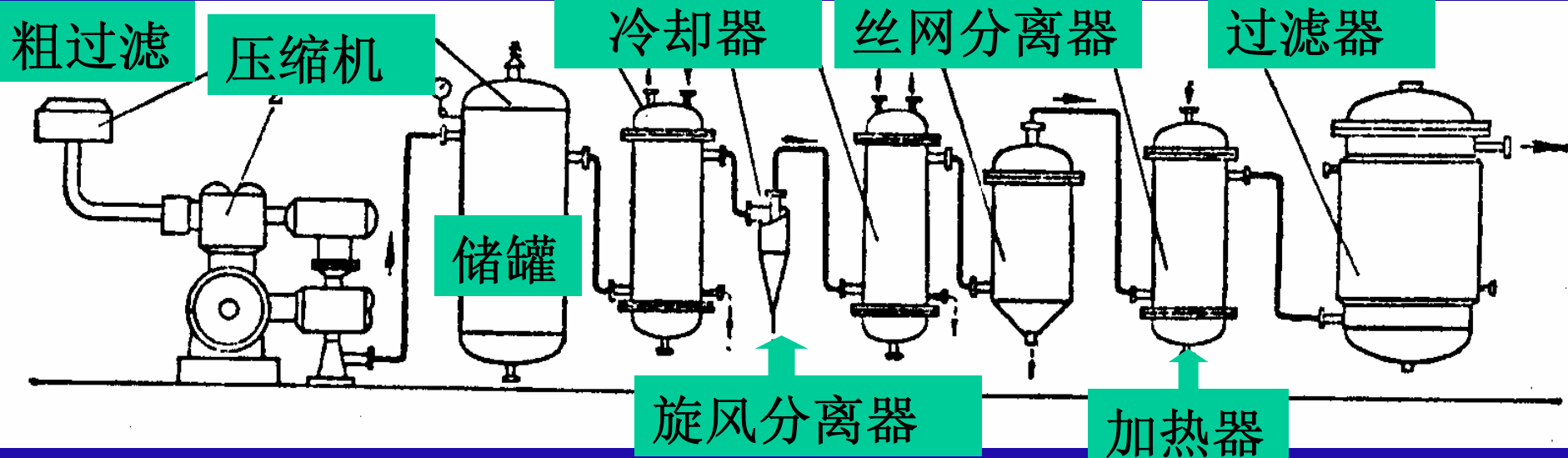
4、空气过滤介质

- ❖ 膜过滤介质：孔径小于被截留微生物体积
硝酸纤维酯、聚四氟乙烯、聚砜、尼龙膜，四氟乙
烯、纤维素树脂微孔滤膜。0.1-0.5 μm
- ❖ 深层过滤介质：空隙大于被截留微生物体积。
纤维状或颗粒状：棉花(50 μm)、玻璃纤维、活性炭
过滤纸：超细玻璃纤维纸(1-1.5 μm)
金属烧结管：单根或几十根甚至上百根金属微孔滤
管安装在过滤器内。

5、空气灭菌工艺过程

I: 空气预处理

III: 空气过滤



II: 除去空气中油和水

小结

灭菌方法与原理：化学、物理

培养基灭菌：间歇式，连续操作

空气除菌：过滤除菌工艺

思考题

- (1) 与灭菌相关的几个概念有何不同？
- (2) 比较分析培养基的间歇和连续灭菌工艺的优缺点及操作要点。
- (3) 空气过滤灭菌的工艺过程及其主要关键点是是什么？

2.7 发酵培养工艺控制

微生物发酵生产水平取决于：

生产菌种性能与合适的环境条件

发酵过程各种参数处于不断变化状态

关键在于过程检测与控制

检测仪器与主要参数

- ❖ 就地探头：pH，溶氧，温度，液位
- ❖ 在线仪器：尾气分析仪
- ❖ 离线仪器：基质、产物浓度

生物学参数：菌体浓度，形态，杂菌

物理参数：温度，压力，搅拌，粘度

化学参数：基质浓度，pH，溶解氧，尾气，补料，消泡

2.7.1 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，干重或鲜重，细胞数目表示。

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

菌体遗传特性与发酵罐氧传质特性的综合反映。

控制策略：

中间补料、控制 CO_2 和 O_2 量。

3. 发酵污染杂菌的检测与控

种子污染

培养基灭菌不彻底

空气带菌

设备及其附件渗漏

2.7.2 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：搅拌器引起的液体之间和液体与设之间的摩擦所产生的热量。
- ❖ 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，引起水分蒸发所需的热能。
- ❖ 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式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。

$$Q_c = F_w c (T_{ex} - T_{in}) / V$$

(2) 根据罐温与时间的变化

$$Q_f = (M_1 c_1 + M_2 c_2) S$$

(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；电热缠
- ❖ 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； CO_2 和 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。

2.7.3 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。

补料控制： 经验方法和动力学方法。

补料时间、数量和方式： 代谢类型。

动力学方法：

菌体比生长速率、糖比消耗速率、产物的比生产速率等参数控制。

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。

控制pH策略

分阶段控制：生长最适pH和产物最适pH。

缓冲液控制：碳酸钙和磷酸盐缓冲液。

补加酸或碱进行控制：

补料方式控制：流加糖率来控制pH。

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
使之需氧不超过设备的供氧能力。

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

$$r_{O_2} = Q_{O_2} X$$

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O₂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CO₂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	$K_L a$	好	好
挡板	$K_L a$	好	好
通气速度	溶解氧浓度, a	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
中间介质	K_L	好	好

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

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

❖ CO₂释放率CER

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

呼吸熵RQ

- ❖ 概念:
- ❖ 产生 CO_2 与吸收 O_2 摩尔比值，正常情况为1。
- ❖ 提供耗氧和碳源情况
- ❖ 平衡碳源利用维持溶氧水平在临界值以上
- ❖ 保证 CO_2 维持在临界抑制值以下

2.7.4 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。

2.7.5 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

$$t = \frac{1}{\mu_m} \ln \left(\frac{X_1}{X_2} \right) + t_T + t_D + t_L$$

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
- ❖补料或消沫剂的其残留，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，DO，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。

小结

生物学参数:形态, 菌浓, 污染

物理参数: 温度, 罐压, 搅拌

化学参数: 基质, pH, 溶氧, CO_2

消沫, 补料控制

终点判断: 最大效益, 最低成本, 最短时间

思考题

- (1) 发酵过程中检测的主要参数有几类?
- (2) 分析生物学参数:形态, 菌浓, 污染
- (3) 温度和搅拌控制原理是什么?
- (4) 发酵过程中基质、pH和溶氧控制策略有哪些? 为什么?
- (5) 泡沫形成的原因及其消沫的方式有哪些?
- (6) 如何确定发酵终点?

第二章 微生物发酵制药工艺

2.1 微生物发酵与制药

2.2 微生物生长与生产的关系

2.3 制药微生物生产菌种建立

2.4 培养基制备

2.5 灭菌工艺

2.6 发酵培养技术

2.7 发酵工艺过程的控制

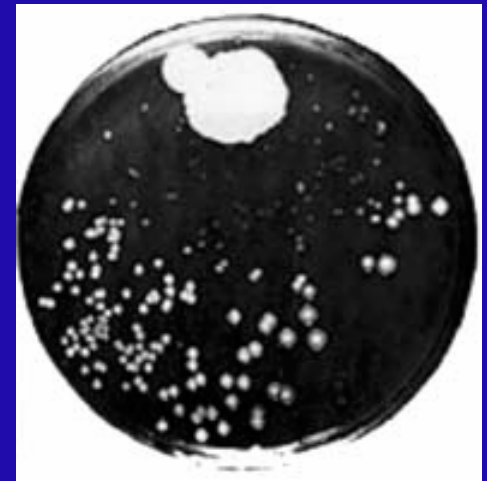
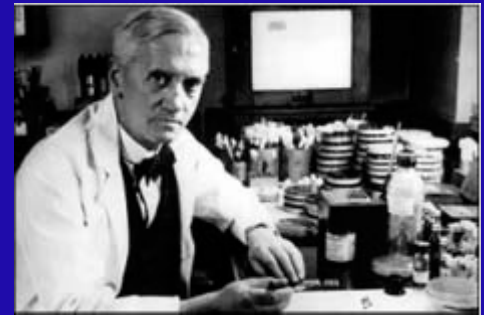
2.8 青霉素的生产工艺

2.8 青霉素的生产工艺

- 青霉素的概述
- 生产菌的生物学特性
- 发酵工艺过程
- 提炼工艺过程

2.8.1 概述—发现（1）

- 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。



- 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。



2.8.1 概述—作用机理（2）

- 细胞壁合成中的肽多糖合成的第三阶段
- 肽多糖的D-丙氨酰-D-丙氨酸二肽类似物
- 竞争性与转肽酶结合，使转肽酶不能催化多肽链之间的交联。
- 生长中的细胞有效，静止细胞无效
- 高效、安全的抗细菌感染药物

2.8.1 概述—应用（3）

（1）临床抗感染治疗：大多数革兰氏阳性菌和某些革兰氏阴性细菌及螺旋体等。

毒性小，但需要皮试。

（2）各种半合成抗生素的原料：

氨苄青霉素，磺苄青霉素，乙氧萘青霉素
头孢菌素母核。

2.8.1 概述—分子结构及衍生物 (4)

➤ 6-氨基青霉烷酸 (6-aminopenicillanic 6APA) 苯乙酰衍生物。

➤ 侧链基团不同，形成不同的青霉素

➤ G: 苄基青霉素, $C_6H_5CH_2-CO-$, 为主

➤ 双氢霉素F: 戊青霉素

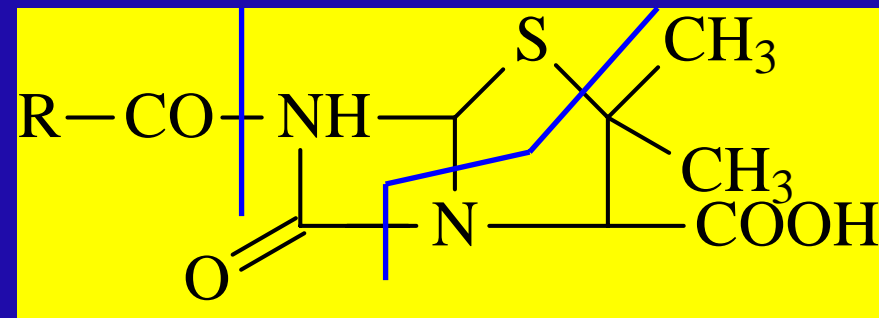
➤ X: 对羟苄基青霉素

➤ F: 2-戊烯基青霉素

➤ K: 庚青霉素

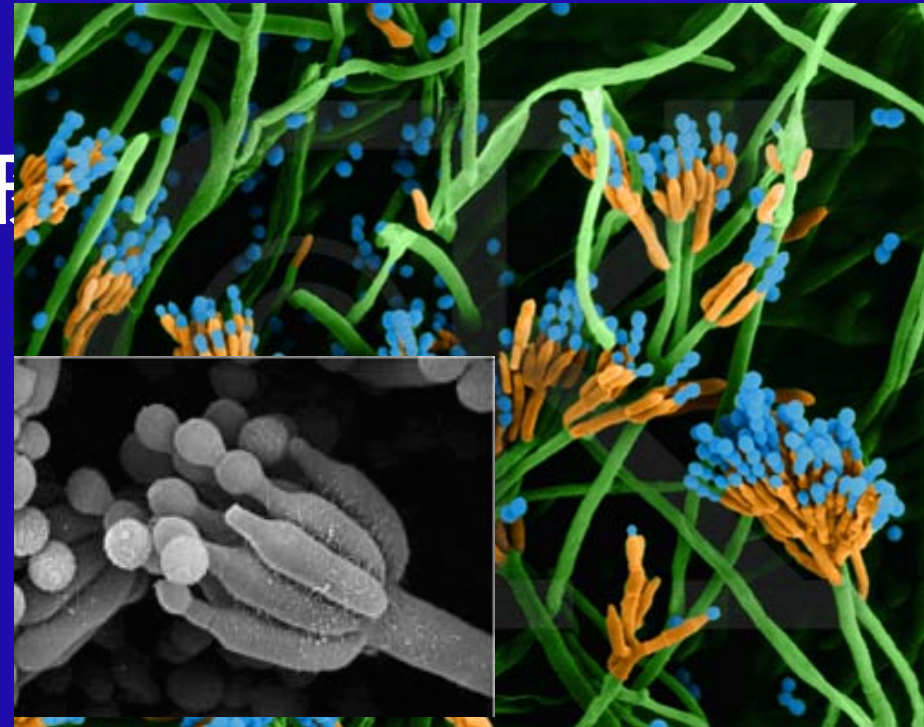
➤ V: 苯氧甲基青霉素

➤ 产品: 钠、钾、普鲁卡因、二苄基乙二胺



2.8.2 青霉素生产菌的生物学特性

- 产黄青霉: *Penicillium chrosogenum*
- 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。



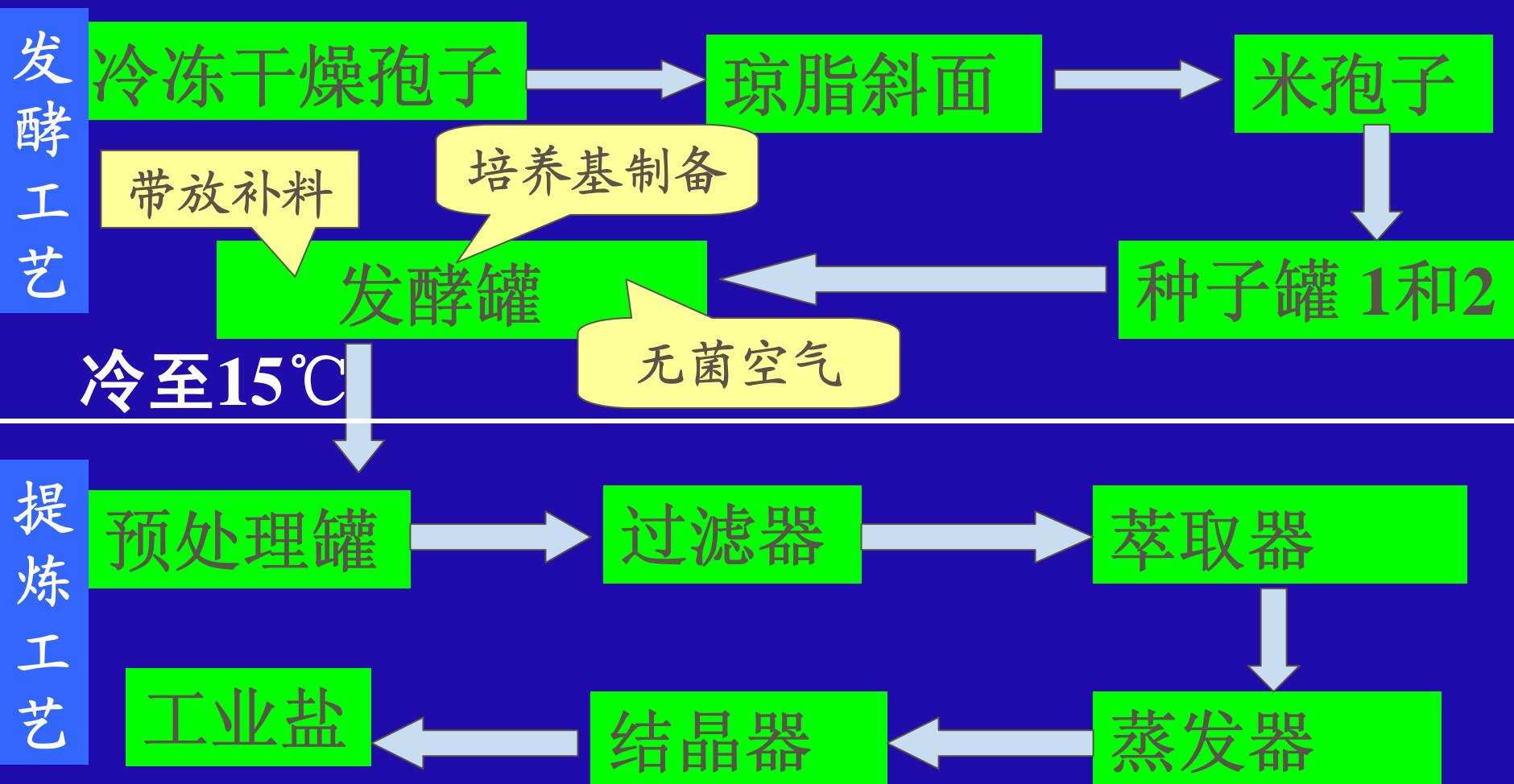
发酵培养下的生长过程及细胞学变化

- 第1期：分生孢子萌发，具有小泡。
- 第2期：菌丝繁殖，嗜碱性，类脂肪小颗粒。
- 第3期：脂肪包涵体，贮藏物，嗜碱性很强。
- 第4期：空泡，嗜碱性减弱，开始产生抗生素。
- 第5期：大空泡，中性染色大颗粒，脂肪包涵体消失，青霉素产量最高。
- 第6期：个别细胞自溶，胞内无颗粒，释放氨，pH上升。
- 第7期：菌丝完全自溶，仅有空细胞壁。

镜检控制

- 规定时间取样，显微镜观察7个时期的态变化，控制发酵。
- 1—4期为菌丝生长期，3期的菌体适宜种子。
- 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。
- 第6期到来之前结束发酵。

青霉素生产流程框图



2.8.3 发酵工艺过程

1、生产孢子制备工

- 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。

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

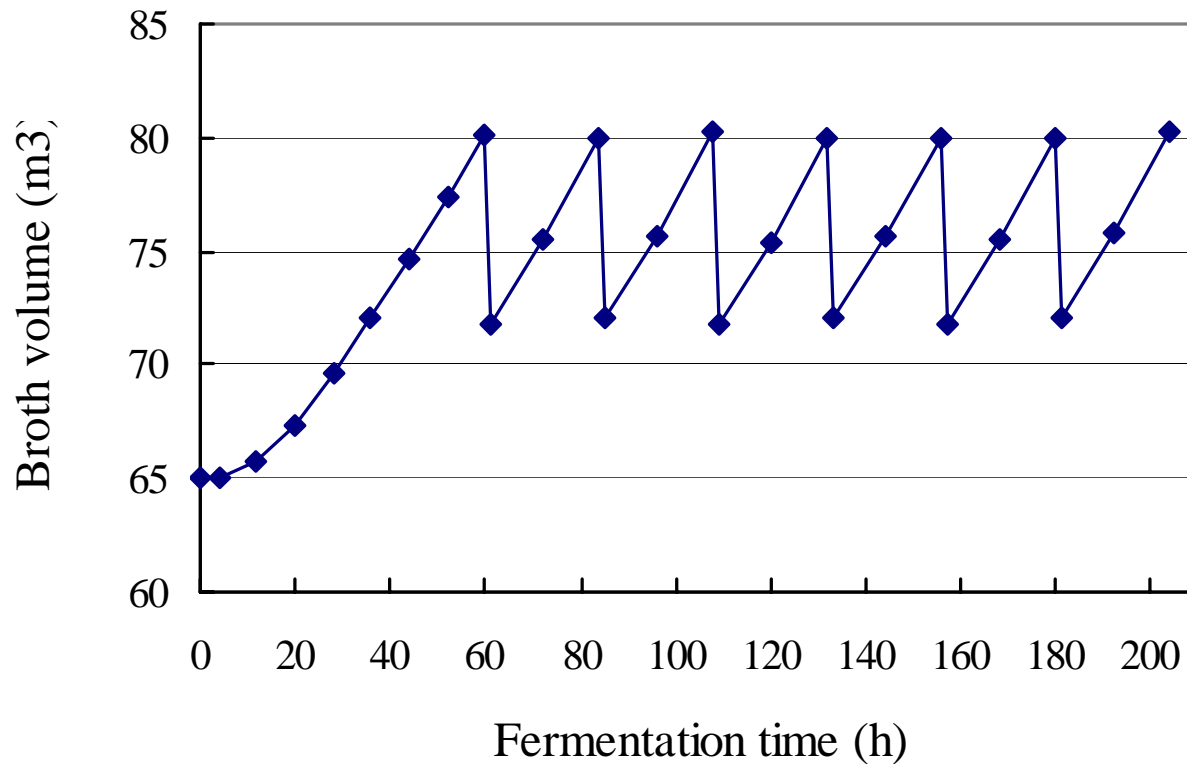
3、生产罐培养工艺

- 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， 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℃。

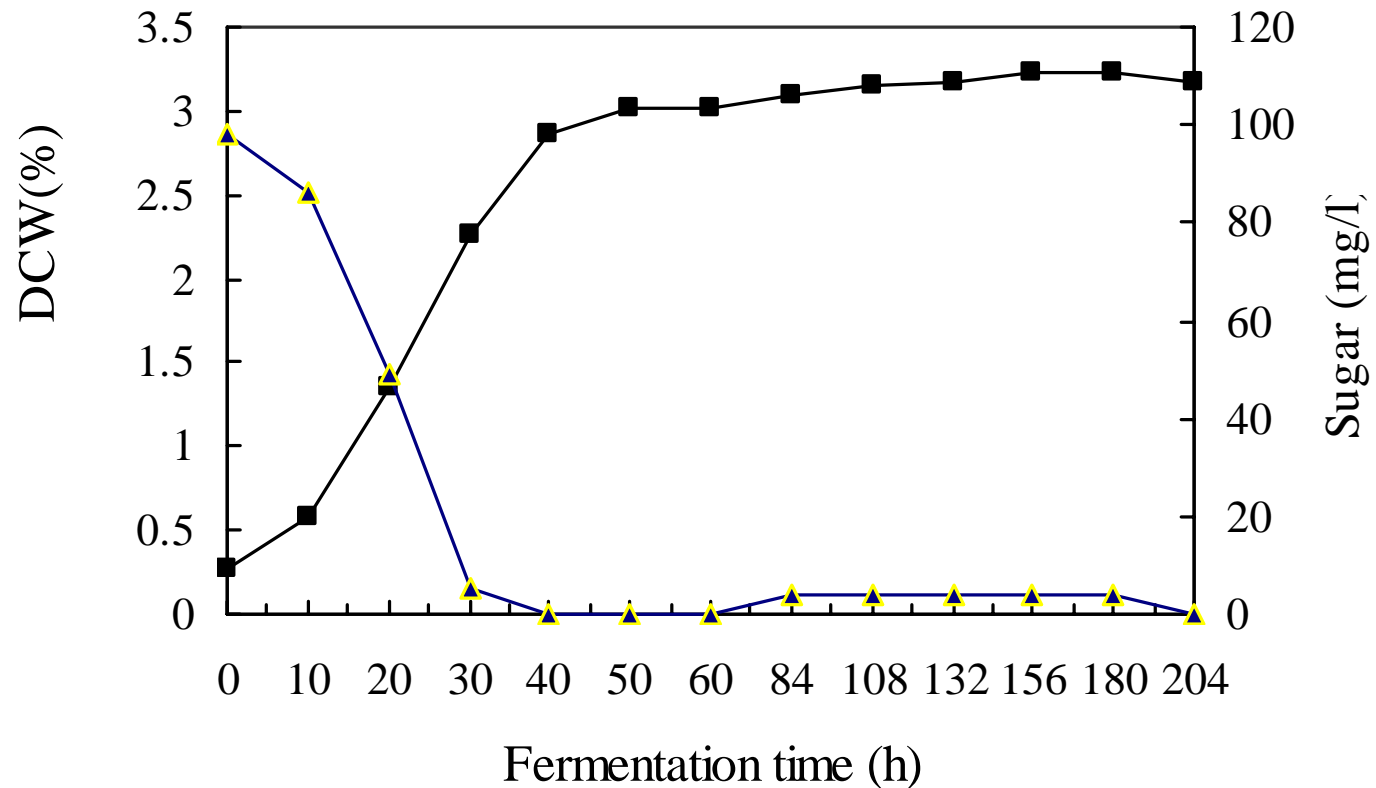
4、发酵培养与过程控制

- 操作方式：反复分批式发酵
- 发酵罐：100M³，装料80M³.
- 带放：6-10次，带放量10%，间隔24h。
- 发酵周期：180-220h

青霉素的生产周期



发酵动力学



(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CO₂和O₂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/M³，流速：1.0-2.5kg/M³.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°C ，分泌青霉素 20°C 。
- 20°C 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°C 左右，后期降温控制 24°C

(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 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) 消沫

天然油脂：玉米油；

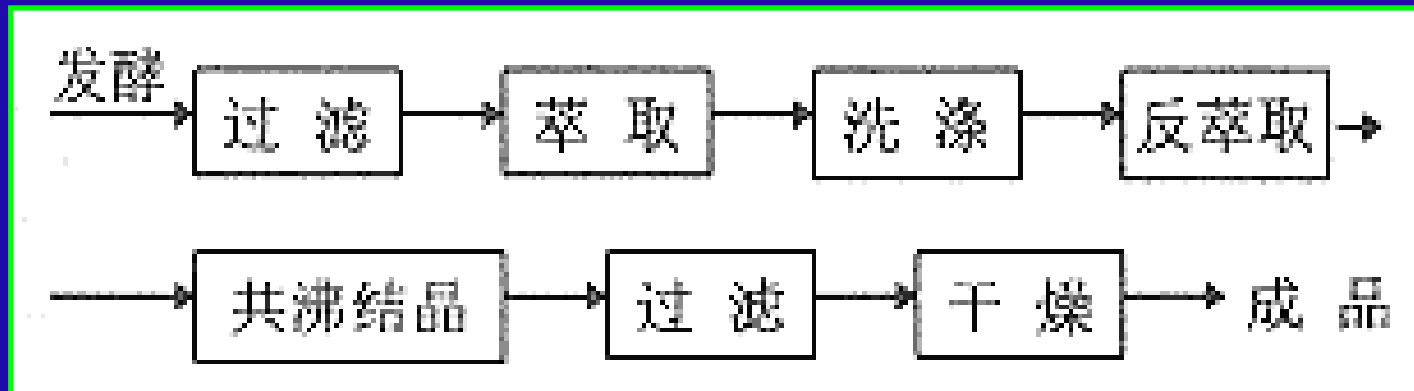
化学消沫剂：泡敌。

策略：少量多次。

注意：前期不宜多加入，影响呼吸代谢。

2.8.4 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/M³

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，利于后续的分选纯化过程。

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。

小结

青霉素的概述

生产菌特性

发酵工艺过程

提炼工艺过程

思考题

- (1) 青霉素发酵工艺的建立对抗生素工业有何意义？
- (2) 如何根据青霉素生产菌特性进行发酵过程控制？
- (3) 青霉素发酵过程的控制原理及其关键点是什么？
- (4) 青霉素提炼工艺中采用了哪些单元操作，为什么？