

---

---

# 第十一章

## 工业发酵染菌的防治

---

---

# 本章讲述的内容

- 第一节 发酵染菌的危害
- 第二节 发酵过程中的染菌的判断
- 第三节 发酵染菌率和染菌原因的分析
- 第四节 发酵染菌的防止
- 第五节 噬菌体感染和处理方法

## 第一节 发酵染菌的危害

- 发酵染菌能给生产带来严重危害，防止杂菌污染是任何发酵工厂的一项重要工作内容。尤其是无菌程度要求高的液体深层发酵，污染防止工作的重要性更为突出。
- 所谓“杂菌”，是指在发酵培养中侵入了有碍生产的其他微生物。
- 几乎所有的发酵工业，都有可能遭受杂菌的污染。染菌的结果，轻者影响产量或产品质量，重者可能导致倒罐，甚至停产。

---

## 一，染菌对不同品种发酵的影响

- 青霉素
- 疫苗
- 柠檬酸
- 谷氨酸
- 肌苷、肌苷酸
- 酶制剂

## 二，不同种类的杂菌对发酵的影响

- **青霉素发酵：**污染细短产气杆菌比粗大杆菌的危害大
- **链霉素发酵：**污染细短杆菌、假单孢杆菌和产气杆菌比粗大杆菌的危害大
- **四环素发酵：**污染双球菌、芽孢杆菌和夹膜杆菌的危害较大

- 柠檬酸发酵：最怕污染青霉菌
- 肌苷、肌苷酸发酵：污染芽孢杆菌的危害最大
- 谷氨酸发酵：最怕污染噬菌体
- 高温淀粉酶发酵：污染芽孢杆菌和噬菌体的危害较大

### 三，不同染菌时间对发酵的影响

- **种子培养期染菌**：菌体浓度低、培养基营养丰富
- **发酵前期染菌**：杂菌与生产菌争夺营养成分，干扰生产菌的繁殖和产物的形成
- **发酵中期染菌**：严重干扰生产菌的繁殖和产物的生成
- **发酵后期染菌**：如杂菌量不大，可继续发酵。如污染严重，可采取措施提前放罐

---

---

## 四，不同染菌途径对发酵的影响

- 种子带菌：种子带菌可使发酵染菌具有延续性
- 空气带菌：空气带菌也使发酵染菌具有延续性，导致染菌范围扩大至所有发酵罐
- 培养基或设备灭菌不彻底：一般为孤立事件，不具有延续性
- 设备渗漏：这种途径造成染菌的危害性较大

## 五，染菌对产物提取和产品质量的影响

- 对过滤的影响：
  - ❖ 发酵液的粘度加大
  - ❖ 菌体大多自溶
  - ❖ 由于发酵不彻底，基质的残留浓度增加
- 造成的后果：
  - ❖ 过滤时间拉长，影响设备的周转使用，破坏生产平衡
  - ❖ 大幅度降低过滤收率

---

---

- 对提取的影响

- ❖ 有机溶剂萃取工艺：染菌的发酵液含有更多的水溶性蛋白质，易发生乳化，使水相和溶剂相难以分开
- ❖ 离子交换工艺：杂菌易粘附在离子交换树脂表面或被离子交换树脂吸附，大大降低离子交换树脂的交换量

- 对产品质量的影响
  - ❖ 对内在质量的影响：染菌的发酵液含有较多的蛋白质和其它杂质。对产品的纯度有较大影响。
  - ❖ 对产品外观的影响：一些染菌的发酵液经处理过滤后得到澄清的发酵液，放置后会出现混浊，影响产品的外观。

## 六，染菌对三废处理的影响

- 使过滤后的废菌体无法利用
- 发酵染菌的废液，生物需氧量（**BOD**）增高，增加三废治理费用和时间

---

## 七，发酵染菌的危害

- 直接经济损失
- 间接经济损失

## 第二节 发酵过程中染菌的检查判断

### 一，杂菌的检查方法

• 目前生产上常用的杂菌检查方法有：

①显微镜检查：染色 → 镜检

②平板划线检查：

到平板 → 空培养 → 待测样品划线 → 培养观察

③酚红肉汤培养检查：

无菌肉汤培养基空培养 → 接入样品 → 培养观察

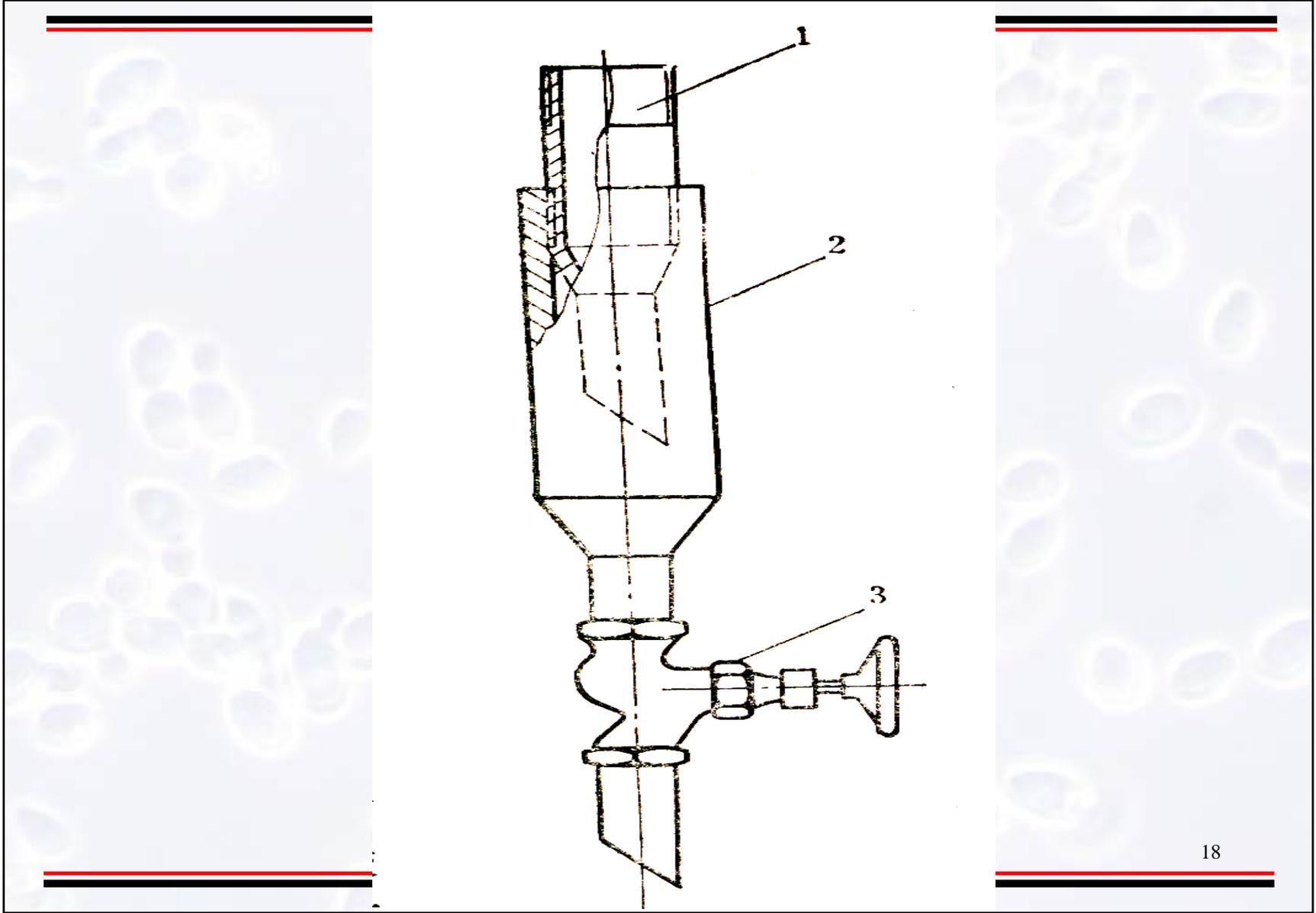
- 判断发酵是否染菌应以无菌试验结果为根据
- 无菌试验的目的：
  - 1, 监测培养基、发酵罐及附属设备灭菌是否彻底
  - 2, 监测发酵过程中是否有杂菌从外界侵入
  - 3, 了解整个生产过程中是否存在染菌的隐患和死角

## 二，各种检查方法的比较

- 显微镜检查方法简便、快速，能及时发现杂菌，但由于镜检取样少，视野的观察面也小，因此不易检出早期杂菌。
- 平板划线法和肉汤培养方法的缺点是需经较长时间培养(一般要过夜)才能判断结果，且操作较繁琐，但它要比显微镜能检出更少的杂菌，而且结果也更为准确

### 三，杂菌检查中的问题

- 检查结果应以平板划线和肉汤培养结果为主要根据
- 平板划线和肉汤培养应做三个平行样
- 要定期取样
- 酚红肉汤和平板划线培养样品应保存至放罐后12小时，确定为无菌时方可弃去
- 取样时防止外界杂菌混入的措施



#### 四，检查的工序和时间

- 选择那些生产工序和时间的样品检查也是十分重要的问题。科学合理的选择检查工序和时间，对于除去已污染杂菌的物料，避免下道工序再遭染菌，有着直接的指导意义。有时即使由于检查时间较长，未能及时据导本批生产，但对于找出造成染菌事故的环节，分析染菌原因，杜绝染菌漏洞也是不可缺少的。
- 由于生产菌种相产品的不同，检查的时间也不完全一样：但总的原则是一致的，即每个工序或经一定时间都应进行取样检查。

# 发酵过程的杂菌检查

工 序	时 间	被检物名称	检 查 方 法
斜面		成熟斜面, 抽查	平板划线
一级种子		成熟培养液	平板及镜检
二级种子	0 小时	灭菌后, 接种前	平板
一级种子	0 小时	接种后发酵液	平板
二级种子	培养中期	发酵液	平板及镜检
二级种子	成熟种子	发酵液	平板及镜检
发酵	0 小时	接种前发酵液	平板
发酵	0 小时	接种后发酵液	平板
发酵	8 小时	发酵液	平板及镜检
发酵	16 小时	发酵液	平板及镜检
发酵	24 小时	发酵液	平板及镜检
发酵	放罐前	发酵液	镜检
总过滤器	每月一次	无菌空气	肉汤
分过滤器	每月一次	无菌空气	肉汤

---

---

除了以上的方法外，在实际生产中还可以根据以下参数的异常变化来判断是否染菌

- 溶解氧
- pH值
- 尾气中CO<sub>2</sub>含量

## 第三节发酵染菌率和染菌原因的分析

### 一、发酵染菌率

- **总染菌率**：指一年内发酵染菌的批次与总投料批次数之比乘以100得到的百分率
- **设备染菌率**：统计发酵罐或其他设备的染菌率，有利于查找因设备缺陷而造成的染菌原因
- **不同品种发酵的染菌率**：统计不同品种发酵的染菌率，有助于查找不同品种发酵染菌的原因

- **不同发酵阶段的染菌率**：将整个发酵周期分成前期、中期和后期三个阶段，分别统计其染菌率。有助于查找染菌的原因。
- **季节染菌率**：统计不同季节的染菌率，可以采取相应的措施制服染菌。
- **操作染菌率**：统计操作工的染菌率，一方面可以分析染菌原因，另一方面可以考核操作工的灭菌操作技术水平。

## 二、染菌原因的分析

- 避免在发酵生产中污染杂菌应以预防为主。“防重于治”，事前防止胜于事后挽救。如果一旦发生染菌现象就要尽快找出原因及时纠正、堵塞漏洞才能减少损失，并从中吸取经验教训，避免以后有类似情况发生，保持生产的正常进行。但在发酵生产中，往往因为生产过程的环节很多，同时各工厂的生产设备、产品种类和管理措施不尽相同，引起染菌的原因比较复杂，有时不能及时找出而耽误了生产。

## 1, 国外一抗生素发酵染菌原因的分析

染菌原因	百分率, %	染菌原因	百分率, %
种子带菌	9.64	蛇管穿孔	5.89
接种时罐压跌零	0.19	接种管穿孔	0.39
培养基灭菌不透	0.79	阀门泄漏	1.45
空气系统带菌	19.96	罐盖漏	1.54
搅拌轴密封泄漏	2.09	其他设备漏	10.13
泡沫冒顶	0.48	操作问题	10.15
夹套穿孔	12.36	原因不明	24.91

## 2, 国内一制药厂发酵染菌原因的分析

染菌原因	百分率, %
外界带入杂菌 (取样、补料带入)	8.20
设备穿孔	7.60
空气系统带菌	26.00
停电罐压跌零	1.60
接种	11.00
蒸汽压力不够或蒸汽量不足	0.60
管理问题	7.09
操作违反规程	1.60
种子带菌	0.60
原因不明	35.00

26

### 3, 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。

#### 4, 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

## 5, 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

## 第四节发酵染菌的防止

### 一、种子带菌的原因及防止

#### 1, 带菌的原因

- 无菌室的无菌条件不符合要求
- 培养基灭菌不彻底
- 操作不当

## 2, 种子带菌的防止

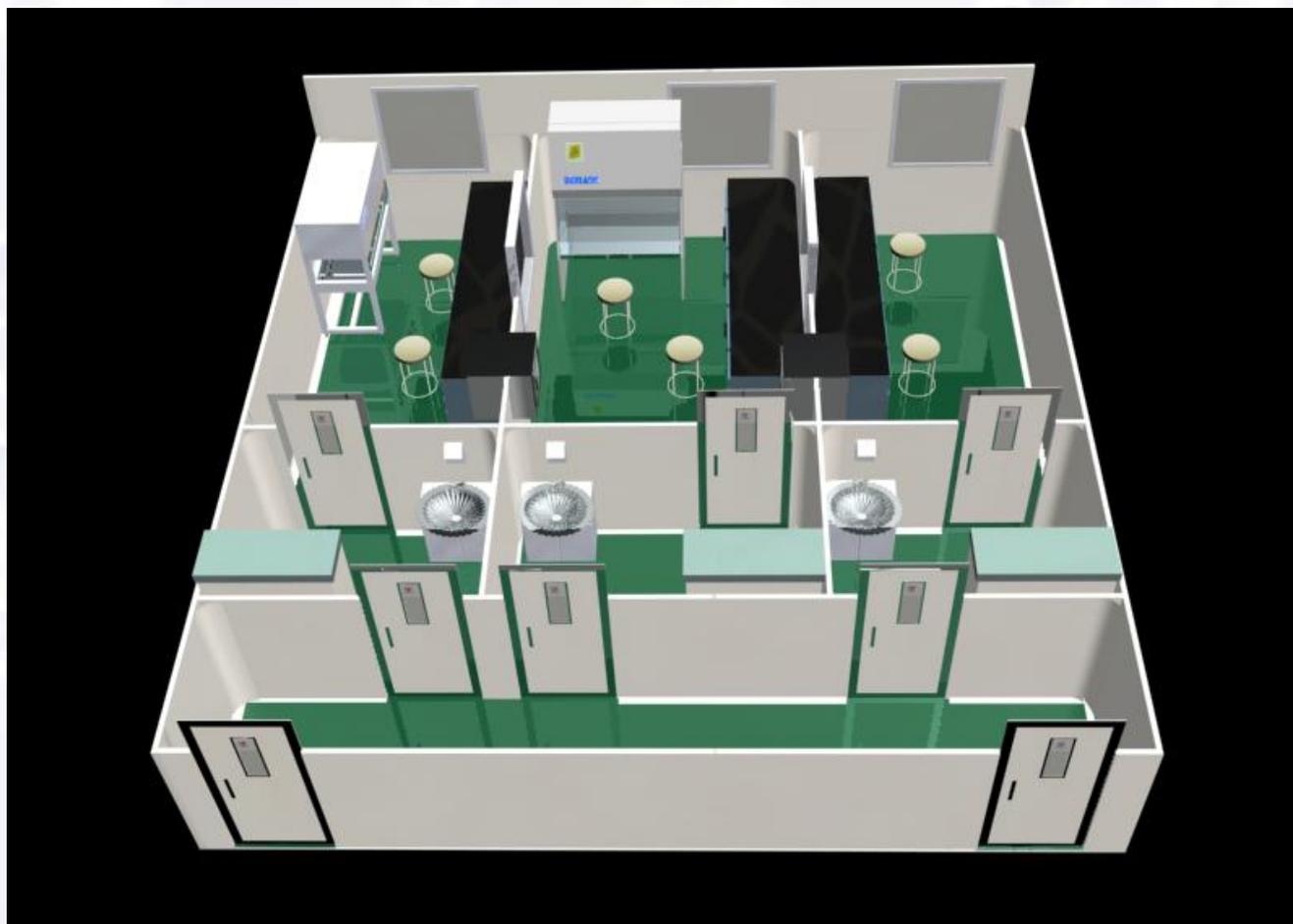
- 种子带杂菌是发酵前期染菌的原因之一。在每次接种后应留取少量的种子悬浮液进行平板、肉汤培养，借以说明是否是种子中带杂菌。种子培养的设备 and 装置有无菌室、灭菌锅和摇瓶机等。

## (1) 无菌室

无菌室的基本要求：

- 无菌室面积不宜过大，一般约4-6米<sup>2</sup>高约2.6米。
- 为了减少外界空气的侵入，无菌室要有1-3个套间(缓冲过道)
- 无菌室内部的墙壁、天花板要涂白漆或采用磨光石子，要求无裂缝，墙角最好做成圆弧形。
- 室内布置应尽量简单，最好能安装空气调节装置，通入无菌空气并调节室内的温湿度。
- 无菌室的每个套间一般都用紫外线灭菌。

# 无菌室立视图





## 化学灭菌药剂

- 用作喷洒或揩擦的(以揩擦为主)：

75%酒精

0.25%新洁而灭(季胺盐)

0.6~1%漂白粉

0.5%石炭酸

0.5%过氧乙酸

1%煤酚皂(来苏尔)

0.5%高锰酸钾

300单位 / 毫升土霉素

50单位 / 毫升制霉菌素等

- 用作熏蒸的：

甲醛(每立方米空间约用10毫升)或硫磺(每立方米空

间约用2-3克)。

## 无菌室内无菌度的要求

- 把无菌培养皿平板打开盖子在无菌室内放置30分钟，根据一般工厂的经验，长出的菌落在3个以下为好。

## (2) 种子培养基灭菌的注意事项

- 灭菌操作时需要注意排气管是否畅通
- 固体培养基可采用两次灭菌的方法
- 通入蒸汽后使瓶内培养基温度达到121°C所需的时间与瓶内培养基的体积有关

培养基体积(毫升)	50	200	500	1000	2000
升温至 121°C 需要的时间(分)	1	3	8	12	20

### (3) 种子摇瓶培养的注意事项

- 保证摇瓶间的清洁卫生
- 摇瓶内液体装料不宜过多
- 瓶口包扎的纱布一般为八层以上

## 二、发酵设备、管件的渗漏与配置

- 设备和管件的渗漏一般是指设备和管件由于腐蚀、内应力或其他原因形成微小漏孔所发生的渗漏现象。这些漏孔很小，特别是不锈钢材料形成的漏孔更小，有时肉眼不能直接觉察，需要通过一定的试漏方法才能发现。

## 1, 设备渗漏的原因

- 发酵液中腐蚀性物质对设备的腐蚀
- 磨蚀
  - ❖ 发酵液中固体物料因搅拌桨的搅动与冷却管摩擦而引起管外壁磨损
  - ❖ 冷却介质和加热时蒸汽的冲击，引起管内壁的磨损
- 设备加工不良
  - ❖ 弯管时，弯头处管壁变薄
  - ❖ 焊接不良

## 2, 盘管渗漏的防止

- 放罐后要认真学习清洗发酵罐
- 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: 先在发酵罐内放满清水, 用压缩空气通入管子, 观察水面有无气泡产生以确定管子有否渗漏和渗漏的部位。气压法快速方便, 但管子下部弯曲处积水不易排尽, 有漏孔时不产生气泡就难以发现。
  - 水压试验: 用手动泵或试压齿轮泵将水逐渐压入冷却管, 泵到一定压力时, 观察管子有否渗漏现象

- 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

与发酵罐相连接的管路很多，有空气、蒸汽、水、物料、排气、排污等管路，管路多，相应的管件和阀门也多。管道的连接方式、按装方法以及选用的阀门形式对防止污染有很大的关系。所以，与发酵有关的管路不能同一般化工厂的化工管路完全一样，而有其特殊的要求。

# (1) 阀

## A, 截止阀

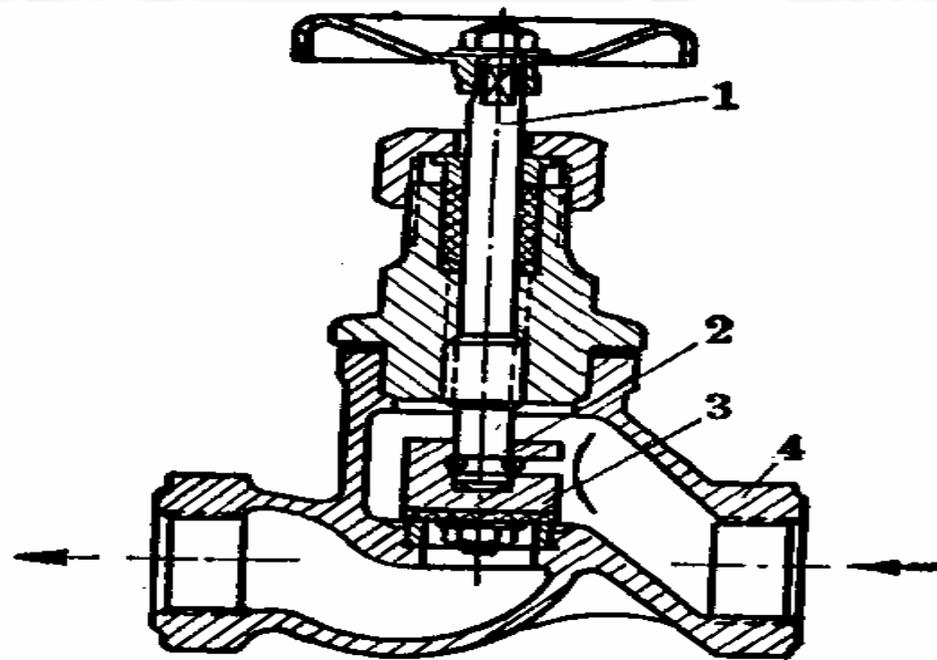


图 7-5 截止阀

1—阀杆； 2—阀心；  
3—阀座； 4—阀体

---

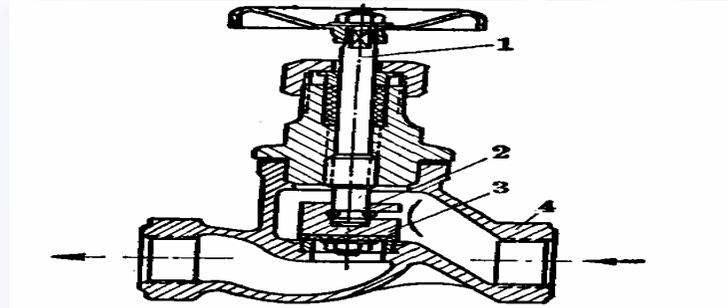
---

截止阀在使用中经常发生以下两个问题：

- 阀心轧坏。物料中的硬质物或焊接施工后的焊渣以及螺钉零件等被带到阀内，当关闭时，阀心与阀座被上述坚硬物轧住，能将紧密面轧成凹凸不平的痕迹，就关不严密。
- 填料的渗漏。操作时用扳手过分关紧，会使阀杆弯曲，弯曲后的阀杆不仅启动费力，并且使填料部分不紧密而引起渗漏，操作中需要注意。阀门在使用一定时间后，阀杆磨损或填料损坏也会引起渗漏，就需要将填料压盖适当拧紧或更换填料。

## 截止阀安装应注意的问题

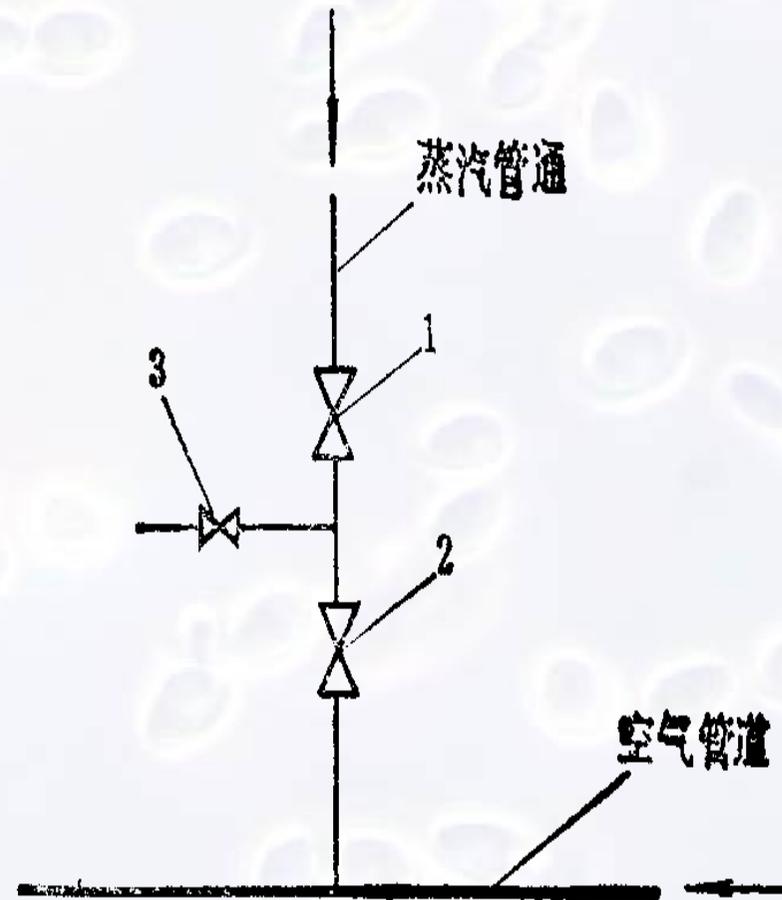
- 方向问题



- ❖ 一般发酵罐附近连接的各种管道，只有在灭菌通蒸汽时，对关闭时的阀门，严密度要求较严格，因而在发酵罐临近的截止阀按规定装置的反方向安装。
- ❖ 打料、接种、加油、加糖等管道上的截止阀，在发酵过程中还需要灭菌，阀门应按正向安装。

- 防漏

在发酵罐底的出料阀门和空气管道连接的蒸汽管道上的阀门，可安装双重阀，其优点是：  
即使阀门1有渗漏，蒸汽也可通过阀门3排除



## B, 隔膜阀

隔膜阀有以下优点:

- 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。但须定期检查隔膜有否老化及脱落。

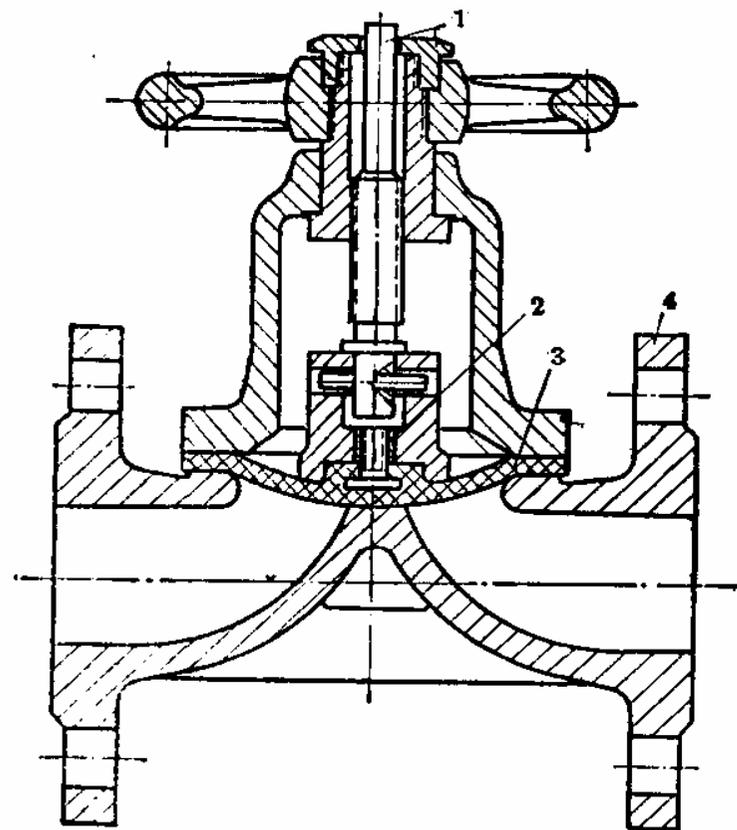


图 7-6 隔膜阀

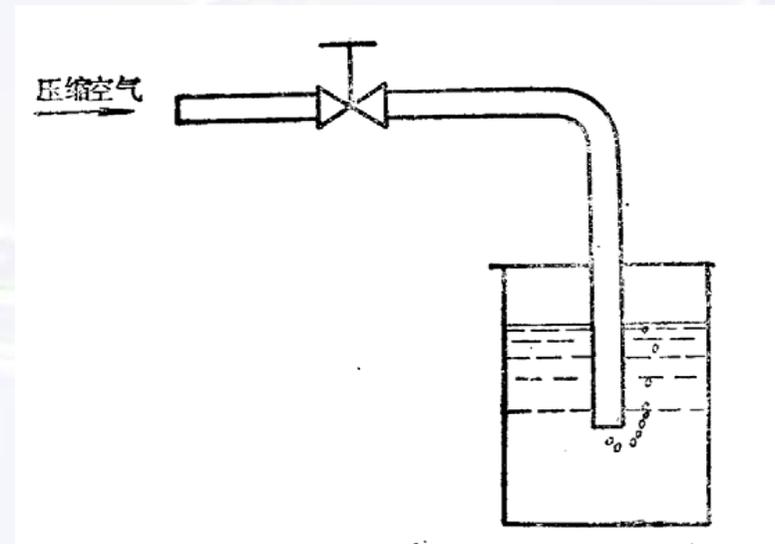
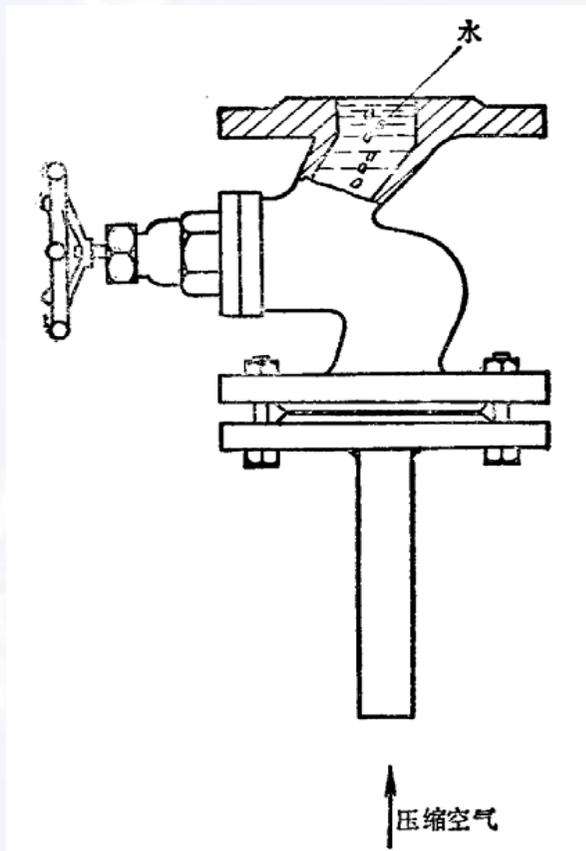
1—阀杆; 2—阀芯;  
3—隔膜; 4—阀体

### 膜隔阀的缺点：

- 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。
- 橡胶隔膜是橡胶和帘布复合制成，如质量不好，帘布与橡胶易脱落，固定隔膜的螺栓也易脱落。

- 隔膜阀适用于移种、打料管道。这些管道上若装置截止阀，如渗漏或关闭不严，易发生染菌事故。

# 阀门试漏的方法



## (2) 管路的连接

- 螺纹连接：螺纹连接简单，但装拆较麻烦，为了便于装拆，要在管路上适当位置安装活接头(亦称“由宁”)，接头平面用石棉橡胶板或橡皮等作垫圈。由于管路受冷热和震动的影响，活接头的接口易松动，使密封面不能严密而造成渗漏。如在接种输液时，因液体快速流动造成局部真空，在渗漏处将外界空气吸入、空气中的菌就被带入发酵罐中而造成危害。所以，重要的管路连接大多采用法兰连接。
- 法兰连接：法兰连接密封可靠，压力、温度和管径的适用范围大，但费用较高。
- 焊接。焊接的方法比其他方法简便，而且密封可靠。所以空气灭菌系统、培养液灭菌系统和其他物料管路以焊接连接为好。但需经常拆卸的管路则不宜用焊接连接。

由宁



法兰



## 6, 管路的配置

### (1) 排气管与下水管

- 发酵厂中若干发酵罐的排气管路大多汇集在一条总的管路上, 以节约管材, 下水管亦然。但在使用中, 有相互串通, 相互干扰的弊病, 一只罐染菌往往会影晌其他罐。排气管路的串通连接尤其不利于污染的防止。故对于排气和下水管路要考虑发酵的特点进行配置, 对于容易染菌的场合还是以每台发酵罐具有独立的排气、下水管路为宜。倘若使用一根总的排气管时, 必须选择较大直径的管子, 保证排气下水通畅不致倒回到发酵罐内。

## (2) 发酵罐的管路

- 由于罐体和有关管路均需用蒸汽进行灭菌，所以要保证蒸汽能够达到所有需要灭菌的地区，对于某些蒸汽可能达不到的死角(如阀)要装设与大气相通的旁路(图中的小阀门)。在灭菌操作时，将旁路阀门打开，使蒸汽自由通过。接种、取样和加油等管路要配置单独的灭菌系统，使能在发酵罐灭菌后或在发酵过程中单独进行灭菌。

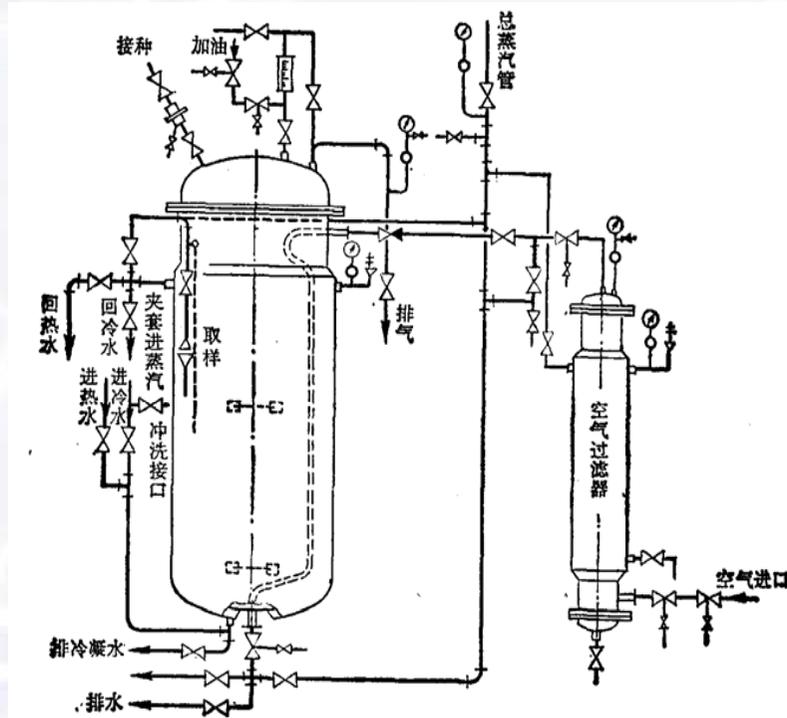


图 7-7 发酵罐的管路

### 三、发酵罐与管件的死角

- 所谓**死角**是指灭菌时因某些原因使灭菌温度达不到或不易达到的局部地区。发酵罐及其管路如有死角存在，则死角内潜伏的杂菌不易杀死，会造成连续染菌，影响生产的正常进行。

# 1, 法兰连接的死角

- 发酵工厂的有关管路要保持光滑、通畅、密封性好，以避免和减少管道染菌的机会。例如法兰与管子焊接时受热不匀使法兰翘曲密封面发生凹凸不平现象就会造成死角(图7-8c)。垫片的内圆比法兰内径大或比较小以及安装时没有对准中心也会造成死角(图7-8a、b)。

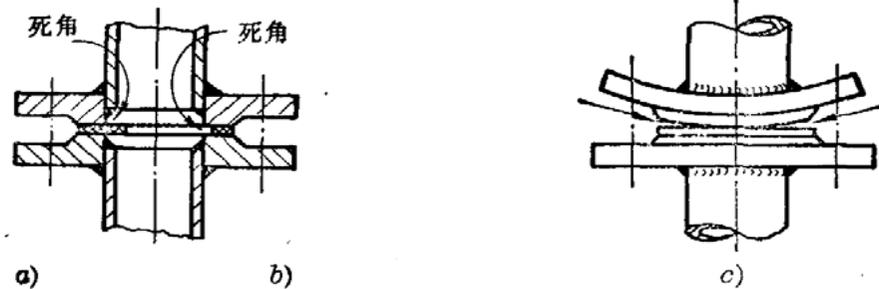


图 7-8 法兰的死角

a—垫圈内圆过小； b—垫圈内圆过大； c—法兰不平造成的泄漏与死角

## 2, 渣滓在罐底与用环式空气分布管所形成的死角

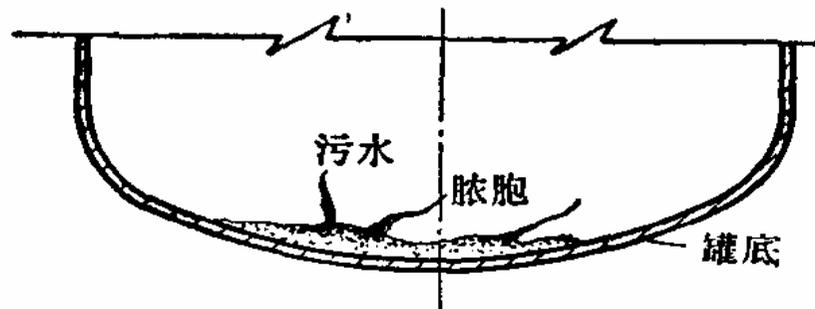


图 7-9 罐底积垢

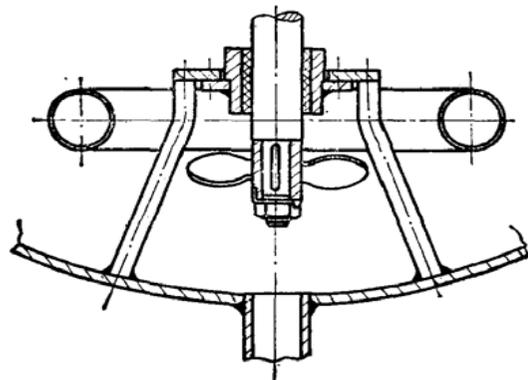


图 7-10 底轴承下的小型搅拌桨

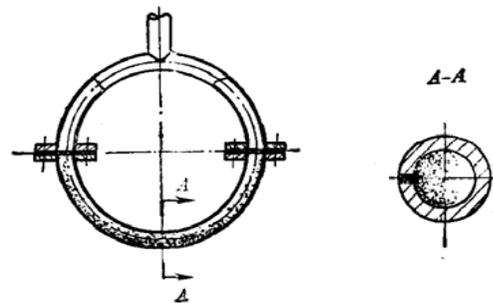
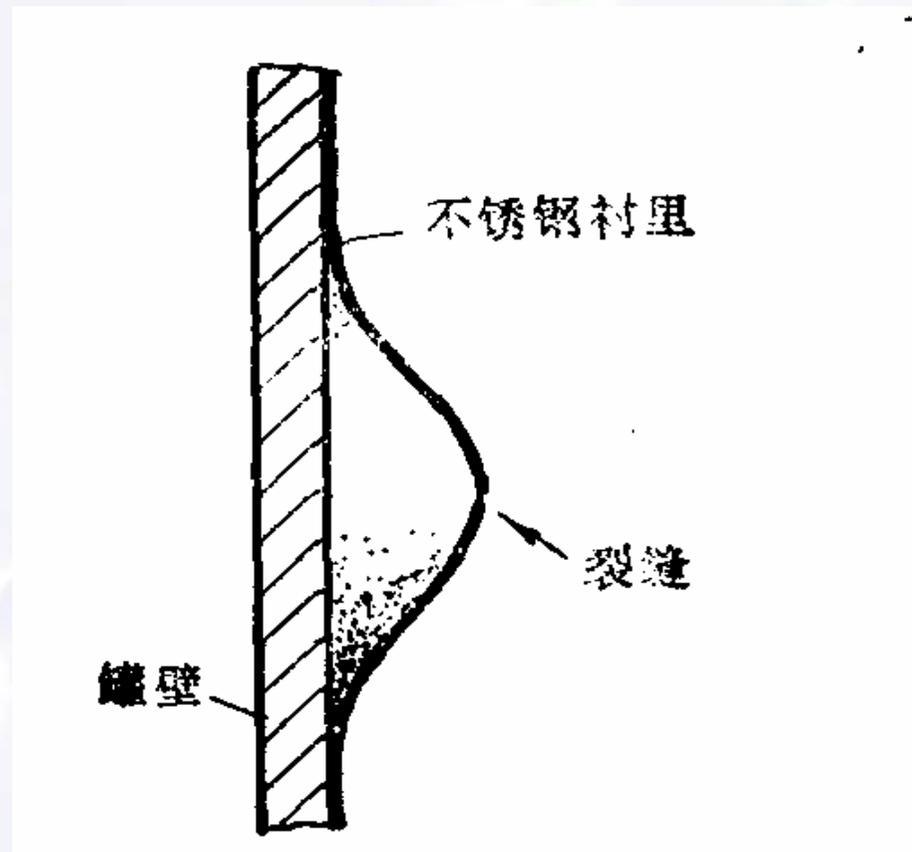


图 7-11 空气分布管中形成的死角

### 3, 不锈钢衬里的死角



## 4，接种管路的死角

- 采用种子罐时是利用压力差将种子罐中培养好的种子输入发酵罐内，种子罐与发酵罐的一段连接管路的灭菌是与发酵罐的灭菌同时进行的。如下图所示有一小段管路存在蒸汽不流通的死角，所以应在阀1的半截上装设旁通，焊上一个小的放气阀，此段管路即可得到蒸汽的充分灭菌。

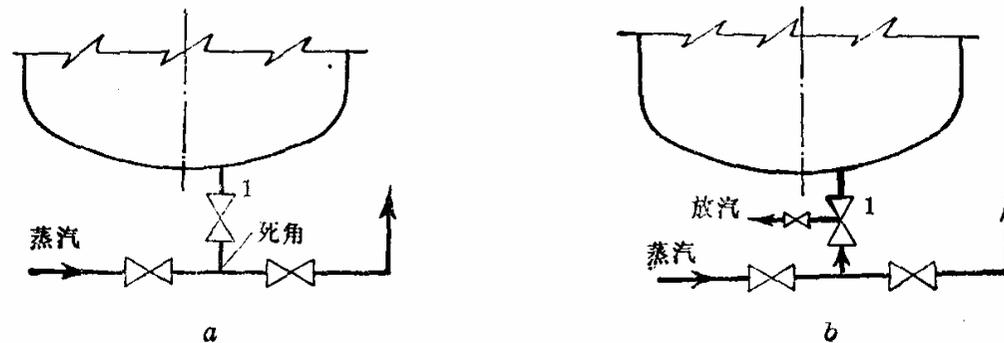
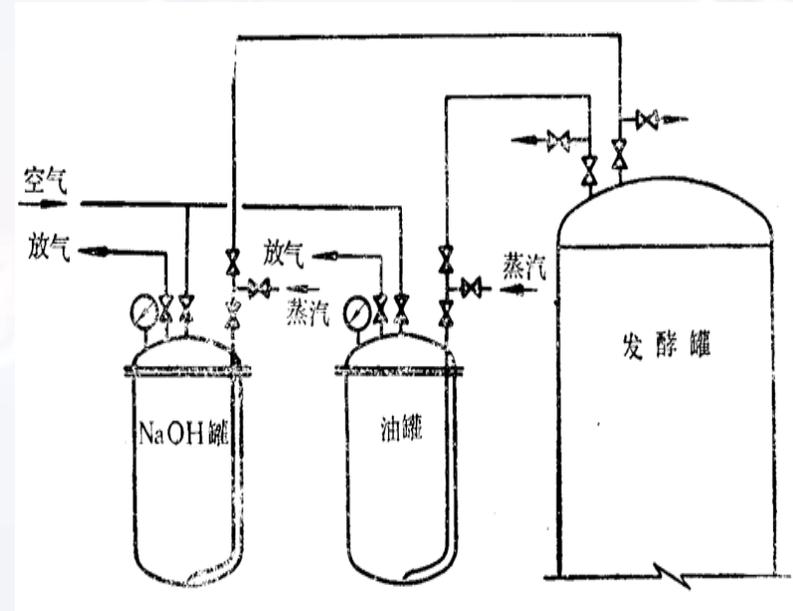
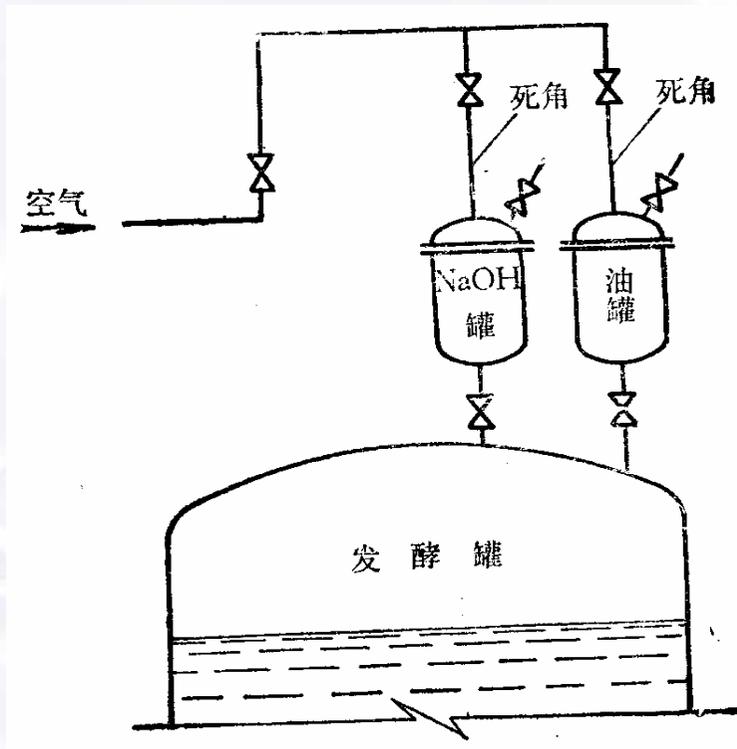


图 7-13 种子罐的接种管路

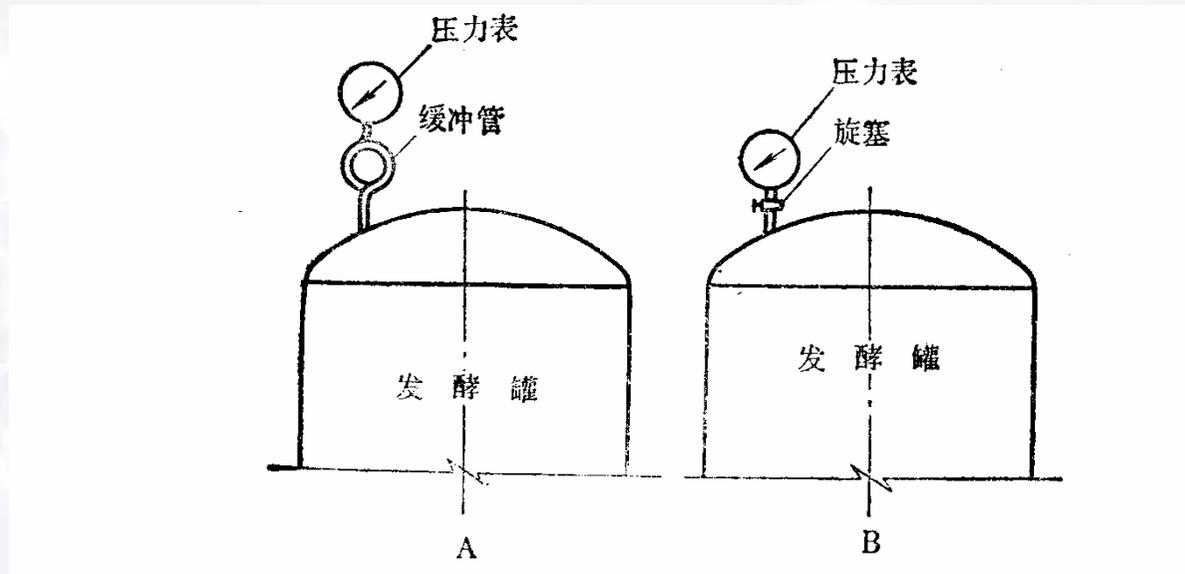
## 5，排气管的死角

- 罐顶排气管弯头处如有堆积物，其中窝藏的杂菌不容易彻底消灭，而当发酵时受搅拌的震动和排气的冲击就会一点点地剥落下来造成污染。另外排气管的直径太大，灭菌时蒸汽流速小也会使管中部分耐热菌不能全部杀死。所以排气管要与罐的尺寸有一定比例，不宜过大或过小。

## 6, 不合理补料管配置造成的死角



## 7, 压力表安装不合理形成的死角



## 四、染菌后的挽救措施

- 种子培养或种子罐中发现污染。
- 发酵早期染菌可以适当添加营养物质，重新灭菌后再接种发酵。
- 中后期染菌，如果杂菌的生长将影响发酵的正常进行或影响产物的提取时，应该提早放罐。
- 有些发酵染菌后发酵液中的碳、氮源还较多，如果提早放罐，这些物质会影响后处理提取使产品取不出，此时应先设法使碳、氮源消耗，再放罐提取。

- 有时发酵罐偶而染菌，原因一时又找不出，一般可以采取以下措施：
  - (1)连续灭菌系统前的料液贮罐在每年4-10月份(杂菌较旺盛生长的时间)加入0.2%甲醛，加热至80° C，存放处理4小时，以减少带入培养液中的杂菌数。
  - (2)对染菌的罐，在培养液灭菌前先加甲醛进行空消处理。甲醛用量每立方米罐的体积0.12~0.17升。
  - (3)对染菌的种子罐可在罐内放水后进行灭菌，灭菌后水量占罐体的三分之二以上。这是因为细菌芽孢较耐干热而不耐湿热的缘故。

---

---

## 第五节 噬菌体感染和处理方法

- 利用细菌或放线菌进行的发酵容易感染噬菌体。
- 噬菌体是病毒的一种，直径约0.1微米，可以通过细菌过滤器，所以通用的空气过滤器不易将其除去。

# 一、引起噬菌体感染的原因

- 设备的渗漏
- 空气系统、培养基灭菌不彻底

## 二、预防噬菌体感染的措施

- 发酵罐的排气管要用汽封或引入药液(如高锰酸钾、漂白粉或石灰水等溶液)槽中。
- 取样、洗罐或倒罐的带菌液体要处理后才允许排入下水道。
- 把好种子关，实现严格的无菌操作。
- 搞好生产场地的环境卫生。车间四周要经常进行检查，如发现噬菌体即时用药液喷洒。

### 三、感染噬菌体后采用的理方法

- 选育抗性菌株。
- 轮换使用专一性不同的菌株。
- 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)。
- 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)。
- 其他方法。如谷氨酸发酵在初期感染噬菌体, 可以利用噬菌体只能在生长阶段的细胞(即幼龄细胞)中繁殖的特点, 将发酵正常并已培养了16~18小时(此时菌体已生长好并肯定不染菌)的发酵液加入感染噬菌体的发酵液中, 以等体积混合后再分开发酵。实践证明, 在谷氨酸发酵中, 采用这个方法可获得较好的效果。