

NAU



南京农业大学
NANJING AGRICULTURAL UNIVERSITY

发酵工程



主讲人：陈晓红

电 话：13951009867

E-mail: xhchen@njau.edu.cn

第四章 发酵培养基

第一节 培养基的选择和确定

第二节 培养基的灭菌

第一节 培养基的选择和确定

- 一、培养基的营养成分
- 二、培养基的用途
- 三、发酵培养基的选择
- 四、培养基成分的营养与作用
- 五、培养基确定方法

一、培养基的营养成分

- 微生物的营养活动，是依靠向外界分泌大量的酶。将周围环境中大分子的蛋白质、糖类、脂肪等营养物质分解成小分子化合物，再借助细胞膜的渗透作用，吸收这些小分子营养来实现的。
- 所有发酵培养基都必须提供微生物生长繁殖和产物合成所需的能源，包括碳源、氮源、无机元素、生长因子及水、氧气等。对于大规模发酵生产，除考虑上述微生物的需要外，还必须重视培养基原料的价格和来源。

微生物的营养来源

(1) 能源

- **自养菌：光；氢，硫胺；亚硝酸盐，亚铁盐。**
- **异养菌：碳水化合物等有机物，石油天然气和石油化工产品，如醋酸。**

(2) 碳源 (速效、缓效) :

- **碳酸气;**
- **淀粉水解糖, 糖蜜、亚硫酸盐纸浆废液等**
- **石油、正构石蜡, 天然气**
- **醋酸、甲醇、乙醇等石油化工产品**

(3) 氮源 (速效、缓效)

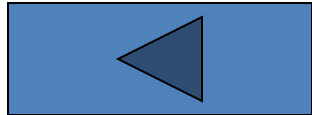
- 豆饼或蚕蛹水解液，味精废液，玉米浆，酒糟水等有机氮
- 尿素，硫酸铵，氨水，硝酸盐等无机氮
- 气态氮

(4)无机盐

- 磷酸盐，钾盐，镁盐，钙盐等其他矿盐
- 铁、锰、钴等微量元素
- 其他

(5) 特殊生长因子

- 硫胺素、生物素、对氨基苯甲酸、肌醇等



二、培养基的用途

(一) 培养基的分类

(二) 发酵生产中的培养基类型

- 筛选菌种
- 保藏菌种
- 检验杂菌
- 培养种子
- 发酵生产

(一) 培养基的分类

(1) 按培养基组成物质的化学成分

- 合成培养基、天然培养基。

(2) 按物理性状

- 固态，液态

(3) 按用途

- 选择性培养基、鉴别培养基、富集培养基等
- 种子培养基、发酵培养基

1.1 天然培养基

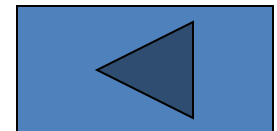
- 采用化学成分还不清楚或化学成分还不恒定的各种植物和动物组织或微生物的浸出物、水解液等物质(例如牛肉膏、酵母膏、麦芽汁、蛋白胨等)制成。
- 适合于各类异养微生物生长，而一般自养微生物都不能生长。

1.2 合成培养基

- 是用化学成分和数量完全了解的物质配制而成的。成分精确，重复性强，可以减少不能控制的因素
- 适用于在实验室范围作有关营养、代谢、分类鉴定、生物测定及选育菌种、遗传分析等定量研究工作。（定量研究）
- 但一般微生物在合成培养基上生长较慢，有些微生物营养要求复杂，在合成培养基上不能生长。

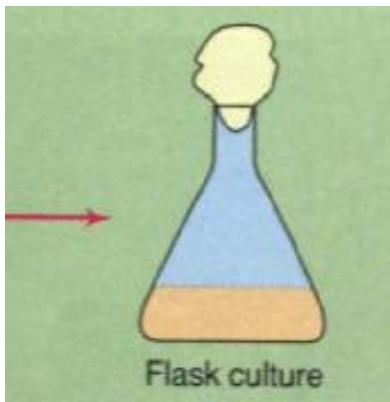
1.3 半合成培养基

- 多数培养基配制是采用一部分天然有机物作碳源、氮源和生长因子的来源，再**适当加入一些化学药品以补充无机盐等成分**，使其更能充分满足微生物对营养的需要。
- 大多数微生物都能在此培养基上生长繁殖。因此，在微生物工业生产上和试验研究中被广泛使用。

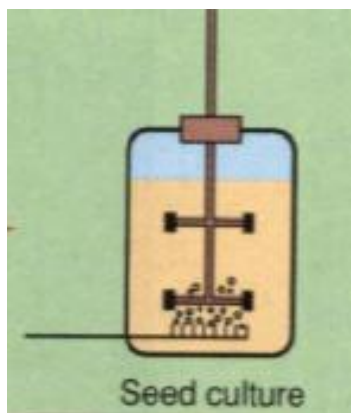


2.1 液体培养基

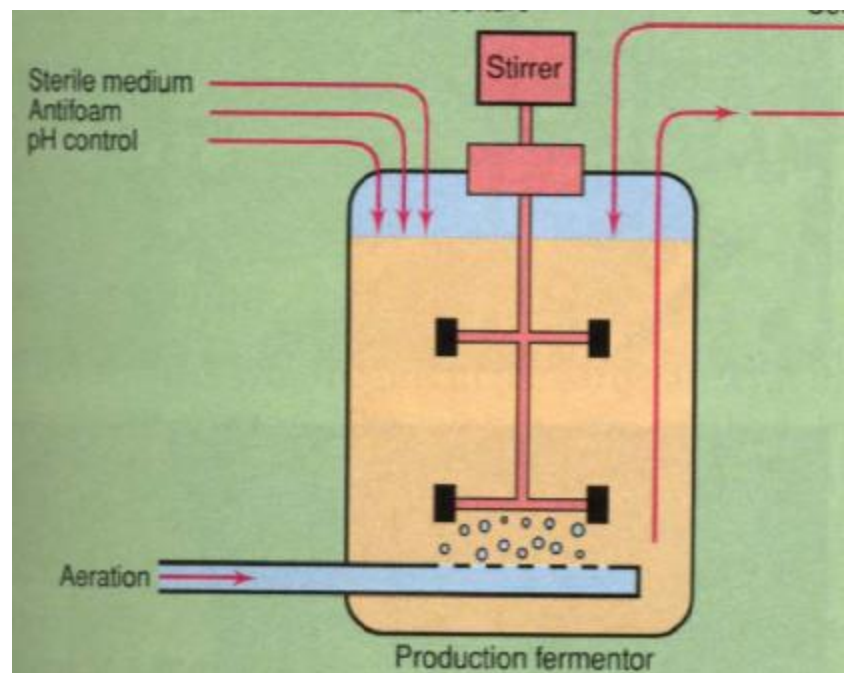
- 常用于大规模的工业生产及生理代谢等基本理论研究工作。
- 发酵工业多用作培养种子和发酵的培养基。
- 根据微生物对氧的要求情况，分别作静止或通风搅拌培养。
- 在菌种筛选工作和菌种培养工作中，也常用液体培养基进行摇瓶培养
- 微生物在液体培养基中生长的情况有时也可用作鉴定菌种的参考。



生理代谢
菌种筛选



种子培养



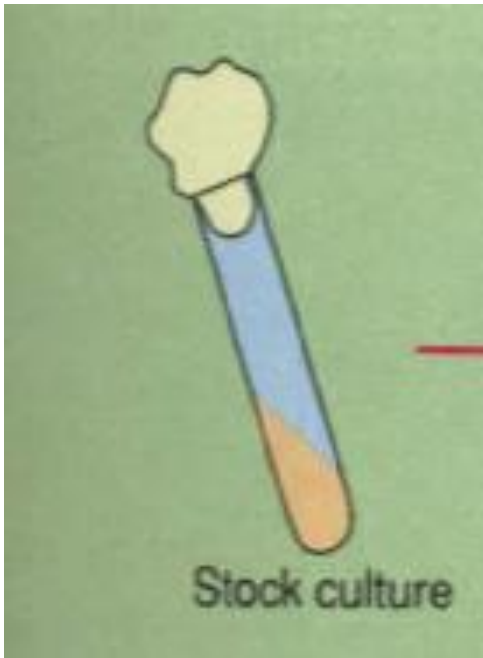
发酵培养

2.2 固体培养基

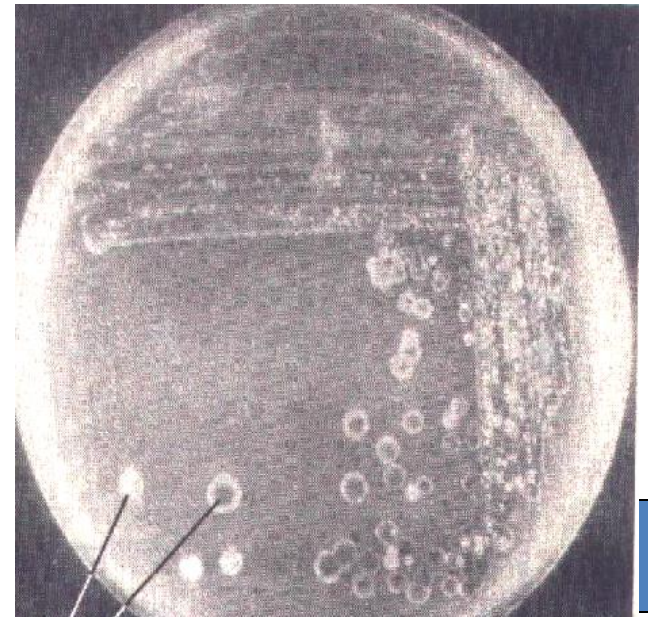
- **分类：斜面试管、平板等**
- **是在液体培养基中加入凝固剂配成的，最常用的凝固剂是琼脂。**

- **作用：**

固体培养基在菌种的分离、保藏、菌落特征的观察、活菌计数和鉴定菌种方面是不可缺少的。



在制曲、酶制剂、柠檬酸等生产中，用来培养霉菌等的固体种子和发酵培养基是由麸皮等农作物加无机元素等制成的。



- **增殖培养基**：可以配制成适合某种微生物生长而不适合其他微生物生长，从而达到从自然界分离这种微生物的目的（如.....）。
- **鉴别培养基**：是根据微生物能否利用培养基中某种营养成分，借助指示剂的显色反应，以鉴别不同种类的微生物（如.....）。
- **选择培养基**：是在培养基内加入某种化学物质以抑制不需要菌的生长，而促进某种需要菌的生长（如.....）。

(二) 发酵生产中的培养基类型

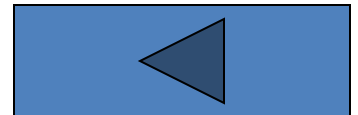
- **工业发酵中培养基往往是依据生产流程和作用分为：**
- **斜面培养基**
- **种子培养基**
- **发酵培养基**
- **摇瓶培养基**

1. 斜面培养基

- 作用：供微生物细胞生长繁殖、保藏**
- 包括细菌，酵母等的斜面培养基以及霉菌、放线菌孢子培养基或麸曲培养基等**
- 这类培养基主要作用是供给细胞生长繁殖所需的各类营养物质。**

特点:

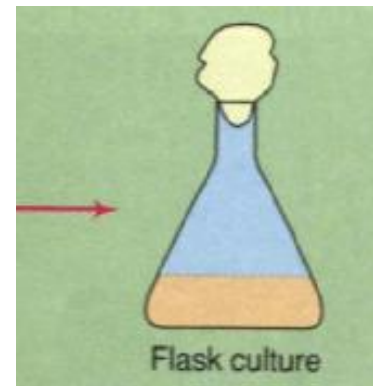
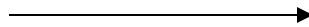
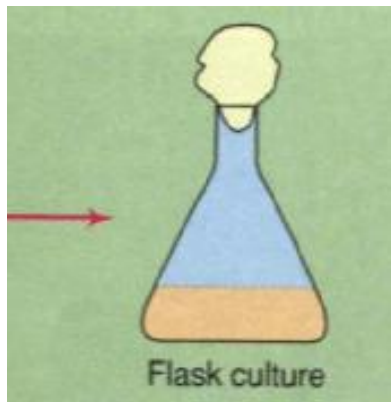
- 1.富含有机氮源，少含或不含糖分。有机氮有利于菌体的生长繁殖，能获得更多的细胞。
- 2.对于放线菌或霉菌的产孢子培养基，则氮源和碳源均不宜太丰富，否则容易长菌丝而较少形成孢子。（限制性氮源适于产生孢子）
- 3.斜面培养基中宜加少量无机盐类，供给必要的生长因子和微量元素。



2. 种子培养基

包括摇瓶种子和小罐种子培养基

- 培养种子的目的：
- 扩大培养，增加细胞数量；
- 同时也必须培养出强壮、健康、活性高的细胞。
以使细胞迅速进行分裂或菌丝快速生长。



种子培养基特点：

- 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。
- 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（速效，利于营养体增殖）。
- 种子培养基成分还应考虑与发酵培养基的主要成分相近。



3. 发酵培养基

- 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。
- 发酵培养基设计基本要求：

(1) 根据产物合成的特点来设计培养基：

对于生长与产物相耦联的发酵类型，充分满足细胞生长繁殖的培养基就能获得最大的产物。

对于生产氨基酸等含氮的化合物时，它的发酵培养基除供给充足的碳源物质外，还应该添加足够的铵盐或尿素等氮素化合物。

在生物化学中，耦联具有不同的含义：

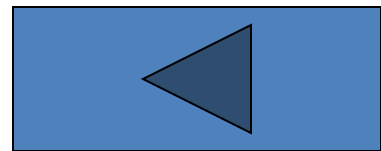
一个化学反应发生时其它反应以化学计量学的关系相伴进行的现象。

主要用于如下两种情形：

- ◆ 氧化与还原的耦联。
- ◆ 氧化还原反应或分解反应与磷酸化反应相耦联。在生物体内酶反应中可看到放能反应的进行与由ADP和正磷酸生成ATP（吸能反应）相耦联。

(2) 发酵培养基的各种营养物质的浓度应尽可能高些，这样在同等或相近的转化率条件下有利于提高单位容积发酵罐的利用率，增加经济效益。

(3) 发酵培养基需耗用大量原料，因此，原料来源、原材料的质量以及价格等必须予以重视。



三、发酵培养基的选择原则

- 必须**提供合成微生物细胞和发酵产物的基本成分**。
- 有利于**减少培养基原料的单耗**，即提高单位营养物质所合成产物数量或最大产率。
- 有利于**提高培养基和产物的浓度**，以提高单位容积发酵罐的生产能力。
- 有利于**提高产物的合成速度**，缩短发酵周期。

- **尽量减少副产物的形成，便于产物的分离纯化。**
- **原料价格低廉，质量稳定，取材容易。**
- **所用原料尽可能减少对发酵过程中通气搅拌的影响，利于提高氧的利用率，降低能耗。**
- **有利于产品的分离纯化，并尽可能减少产生“三废”的物质。**

发酵培养基的设计注意事项

- 1、 提供必要的营养成分：**培养基成分必须满足细胞生长，代谢活动和合成产物所需的基本要求。
- 2、 配制合适的浓度：**可以从发酵动力学有关生长、产物合成和基质利用物料平衡的关系中大致推算所需原料或大致计算出主要原料的需要量。
- 3、 注意主成分与其他成分的配比。**

4、控制合适的pH：微生物的生长繁殖或产物的合成往往需要一定的pH环境，在最适pH值下有利于加快各种酶的反应。因此在整个发酵过程中应使培养基的pH适合于微生物生长或产物合成所需。

pH的具体控制方法

- 可以在微生物培养过程中加入酸或碱或流加某些营养物质调节培养基的pH，但更应在配制培养基时考虑所用营养物质的组成成分，使其pH值适合该微生物生长或合成代谢产物的需要。
- 还要注意有些营养物质被利用后培养基的pH变化情况。

- **控制pH最常用的方法是在培养基中添加具有一定缓冲能力的物质作为营养物，如以磷酸盐作为磷的成分；或者避免使用容易产生生理酸性或碱性使培养基pH波动太大的物质。**

5、避免产生微生物不能利用的物质或形成沉淀

- 葡萄糖与铵盐或氨基酸的氨基在灭菌高温下作用形成深褐色物质。这种物质不被微生物利用。因此这两类营养物不宜直接配在一起进行灭菌，而应采用分开灭菌后再加入发酵罐内。
- 硫酸铵中的 SO_4^{2-} 与钙盐易形成难溶的硫酸钙，因此二者也不宜直接配成培养基。

6、注意代谢调节物的影响：

有些物质存在于培养基中往往能明显地促进或抑制发酵产物的形成。

- 前体物质**
- 诱导剂**
- 阻遏物**
- 抑制剂**
- 金属离子**

(1) 添加有关前体物质：

- **前体物质：**是指当添加到发酵培养基中的某些化学物质基本上不改变其分子结构而直接进入产物中的小分子物质，从而在一定条件下控制产物的合成方向和提高产量。
- 在发酵中添加前体物质将有利于产物的合成和显著提高产量，如苯乙酸及其衍生物被认为是青霉素的前体物质。

(2) 添加诱导物:

- **目前工业用微生物酶多数为诱导酶，如蛋白酶、淀粉酶、纤维素酶等。**
- **诱导物的存在能大大强化诱导酶的生物合成。**
- **酶的正常底物或底物的类似物都可作为诱导物。**
- **在各种微生物酶的发酵培养基中必须加入诱导物，例如淀粉、糊精或麦芽糖是淀粉酶或糖化酶的诱导物。只有添加这些物质的培养基，才能获得高产。**

(3) 注意阻遏物或抑制剂的影响

- **培养基中存在反馈阻遏物或分解阻遏物均能影响酶的合成，降低发酵产量。**
- **有些酶的抑制剂却能提高某些代谢产物的产量，最早利用抑制剂提高中间代谢物产量的例子是甘油发酵中加入亚硫酸钠。**
- **在培养基配制时必须注意加入有益的抑制剂，而避免混入有害的抑制物。**

反馈阻遏作用

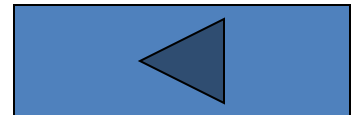
- 在合成代谢途径中，终产物或其衍生物对该途径上一个或多个酶形成的抑制作用。
- 即在合成过程中有生物合成途径的终点产物对该途径的一系列酶的量调节所引起的阻遏作用。反馈阻遏是转录水平的调节,产生效应慢。

阻遏物 (repressor)

- 与DNA或RNA结合来组织转录或翻译的一类蛋白质。阻遏物repressor 基于某种调节基因所制成的一种控制蛋白质，具有抑制特定基因（群）产生特征蛋白质的作用。

(4) 金属离子的影响

- 有些种类的发酵生产对金属离子相当敏感，因为有些金属离子是中间代谢酶的抑制剂或激活剂。**
- 因此对于有重大影响的金属离子必须严格控制。如柠檬酸发酵中铁、锰和锌离子都能明显影响产量，钙离子对细菌淀粉酶的生产有促进作用，而钴离子对葡萄糖异构酶的发酵是必需的，这些在培养基配制时都必须予以注意。**



第二节

发酵培养基灭菌

- **巴氏消毒**
- **实消**
- **连消**

一、巴氏消毒

适用于：不耐高温培养基成分，pH低于4.5，固态发酵

- **致死温度**：使微生物死亡所需温度
- **致死时间**：在致死温度以上使微生物死亡所需时间
- **热阻**：微生物对热的抵抗能力，常用致死时间表示
- **相对热阻**：某一微生物在某一条件下的致死时间与另一微生物在相同条件下的致死时间之比
- **1/10衰减时间**：90%死灭时间，活的微生物90%死灭所需要时间
- **对数残留定律**：微生物受热死亡的速率与任一瞬间残存的个数成正比

二、空消和实消（分批灭菌）

- **空消：**在发酵罐装入培养基前通入蒸汽对发酵罐和管道进行灭菌。一般参数
121°C/30min
- **实消：**在发酵罐装入培养基后，通入蒸汽对发酵罐、培养基和管道（空气路除外）进行灭菌。一般参数121°C/30min

二、空消和实消

- **实消:**

洗罐 → 空消 → 加培养基 → 搅拌调浆 → 溶解, 调pH (注意灭菌后一般会使pH下降0.3) → 加消泡剂 → 打开所有排气阀, 尤其是最低位置排气阀, → 蒸汽通入蛇管或夹套预热至80~90℃ (防止进罐蒸汽很快形成冷凝水、糊化) → 蒸汽进罐 (从进汽口、出料管口、取料口直接进入, 压力不小于2公斤: 1)使罐内正压, 2) 冷凝水增加量不至于太多, 压力高, 冷凝水少 → 升罐温至118℃~120℃, 表压力0.9~1kg维持30min, 计时25min蒸汽阀门关, 5min缓冲, 此时排气阀一直打开的表压要自然上升, 表压不能高于空气来路的压力, 否则管内培养基倒流入过滤器内。 → 30min之后立即引入无菌空气保压, 压力大于大气压, 且能增加培养基中溶解氧 → 开启冷凝水, 降温至接种温度, 注意缓冲, 冷却接种。

- **实消优缺点:**

优点: 不需要专门灭菌设备, 投资少, 灭菌效果可靠; 对蒸汽需求较低

缺点: 蒸汽用量变化大, 造成锅炉负荷波动大, 培养基在高温处停留长, 造成营养破坏。

- **灭菌注意事项:**

- 1) **管道要畅通**
- 2) **防止逆流, 防止激烈的翻动**
- 3) **蒸汽需要灭过头 (活蒸汽, 灭过头)**
- 4) **在搅拌时通入空气, 使培养基密度下降, 电机功率小, 灭菌前搅拌则功率大, 电机损耗大**

附：无菌空气的制备方法：过滤除菌

(能量消耗少，得气量大)

空气过滤的目的：1) 无菌，2) 压力，
3) 温度（维持菌体生长）

- 高空采气、远离烟囱、粗过滤（防止杂质对空压机的损坏） 所以：

A、微生物工厂的选址一般在空气清新处 如森林、湖泊、郊区。

B、只要穿透过滤器，压强不低于4~4.5kg，流量越大越好，一级 压缩

发酵生产中制备无菌空气的大致过程

空气—空压机—贮气罐—冷却—除油水—加热
空气预处理
—→总过滤器—→分过滤器—→无菌空气
空气过滤

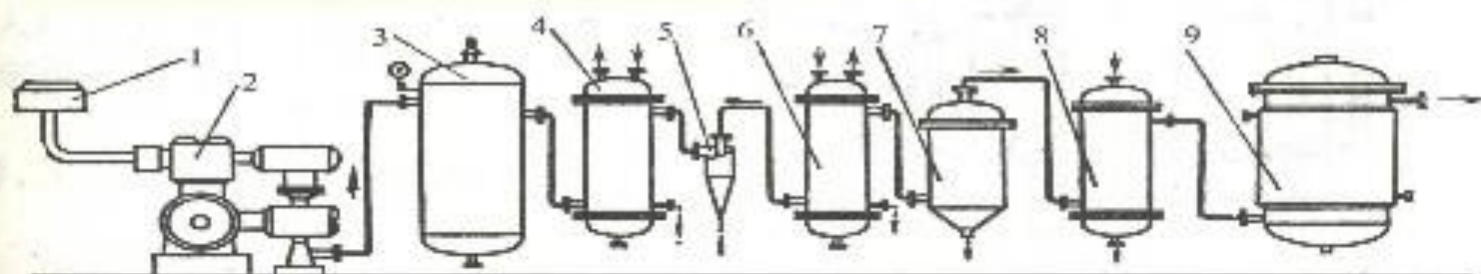


图 20-4 空气除菌设备流程 (两级冷却)

1—粗过滤器；2—压缩机；3—贮罐；4、6—冷却器；5—旋风分离器；7—丝网过滤器；8—加热器；
9—过滤器

- 高空采气→粗过滤→空压机 → 贮气罐 → 列管冷凝器 → 油水分离器（旋风分离器）→二级冷却→去雾器→加热器 →总过滤器→分过滤器→发酵罐（种子罐）

A、空压机要求：水冷、低压、大流量；

B、贮气罐作用：（1）稳流，去除脉冲；
（2）初步杀死一些细菌；
（3）去除一些油水
（4）贮气

C、油水分离器作用：除去大颗粒的油水

D、二级冷却作用：温度更低，去除残留水分

E、去雾器作用：去除细微的油、水滴

F、加热器作用：仍有露滴，降低相对湿度，除去，自此空气中除去湿度可进总过滤器

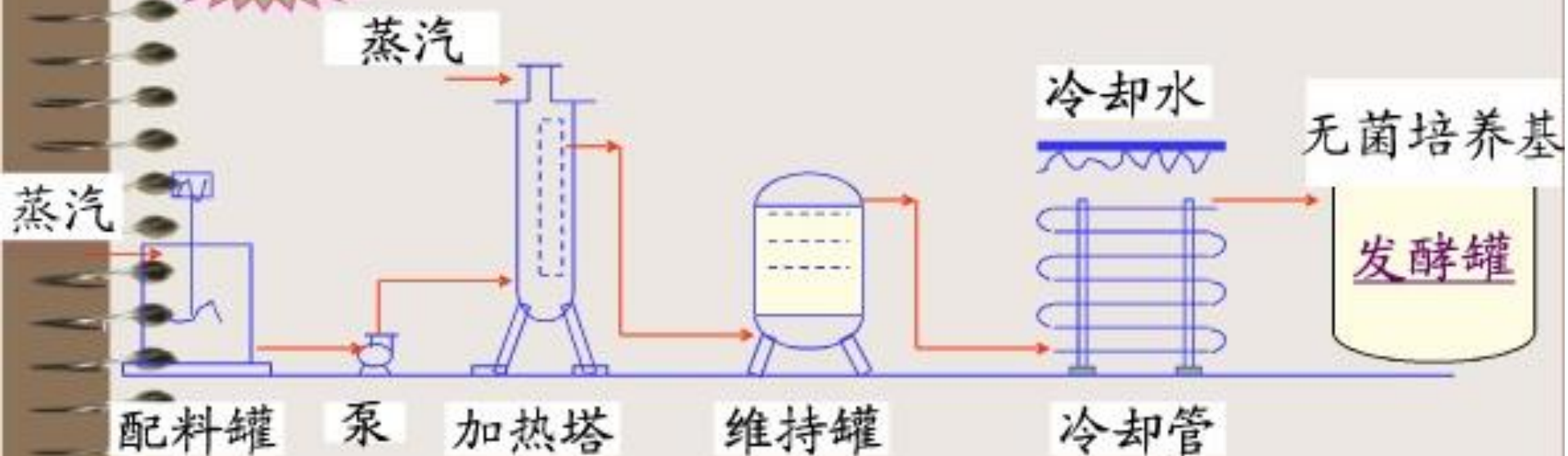
三、连消 (连续灭菌)

- 必备装备：连消塔
- 蒸汽 $126\sim 132^{\circ}\text{C}$ ， 压力 5kg
- 泵压力 6kg
- 连消塔 $126\sim 132^{\circ}\text{C}/20\sim 30\text{s}$
- 维持罐 120°C 左右 $5\sim 7\text{min}$
- 冷却水冷却后培养基温度 $40\sim 50^{\circ}\text{C}$

将培养基在发酵罐外通过连续灭菌装置进行加热、保温和冷却而进行灭菌。

问题

连续灭菌的基本设备有哪些？



- **优点:**

- 1) **与分批灭菌相比，培养液受热时间短，可最大程度保留培养基中养分**
- 2) **产品质量较易控制**
- 3) **蒸汽负荷均匀，锅炉利用率高，适合自动控制，操作方便，降低劳动强度**

- **缺点:**

染菌的几率高，水消耗大，提倡用循环水

四、影响培养基灭菌的因素

- **温度、时间**：温度低点，可在培养基中加入**甲醛或过氧化氢**，可达灭菌目的，在加热时可挥发掉不影响微生物生长。高温时，可大量缩短时间。
- **pH值**：中性pH条件下微生物较耐热，但在酸或碱性条件下易灭菌。越酸，时间短。
- **油脂、糖类，蛋白等生物大分子**：会增加微生物耐热性（生物大分子对微生物的保护作用），将微生物包起来，含量越多，死亡速率越慢，高盐可加快微生物死亡，削弱微生物耐热性。
- **泡沫**：越多越耐热
- **培养基颗粒大小**：颗粒越小，微生物越易杀灭。

五、培养基的无菌检查

1、活菌镜检法：培养基涂开，染色，活菌无色或淡蓝色。

2、平板培养检查：

发酵罐：用9mL肉汤培养基，加1~2mL灭菌培养基，倾注平板37℃培养

要求48h内不长菌，则培养基已灭好，对慢生菌，培养基中加对甲基苯甲酸1%促使其早长菌。

3、培养基显色法：如酚红指示剂，9mL酚红肉汤培养基加1~2mL灭菌培养基，37℃培养6h 肉汤由红变黄即为染菌

—该方法常用于无菌空气检查

五、培养基的无菌检查

- **染菌率**=发酵罐染菌的批数/总投量批数
- 工业发酵中**染菌率**控制在1/1000
- **染菌处理**：补充1/3原培养基配方，再一次灭菌，弥补第二次灭菌破坏的营养成分；
- **发酵罐处理**：用甲醛0.12~0.17L/m³罐加水（罐体积2/3），煮半小时，若对连消，要求每星期消毒一次，1000kg水中加入4瓶甲醛浸泡3~5小时后放掉水。