

三、简答题

1、简述微生物发酵生产的工业特征；

(1) 严格的无菌生长环境 (2) 发酵过程中应用计算机控制技术进行在线数据采集和控制； (3) 种子培养和生产培养的不同的工艺技术； (4) 需建立大规模动态发酵过程中各参数变化的动力学模型； (5) 存在发酵过程工艺放大问题。

2、简述发酵工业的特点（与化学工业比较）；

∴安全简单 ∴原料广泛 ∴反应专一 ∴代谢多样 ∴易受污染 ∴菌种选育

4、简述发酵工业的工程技术发展史中的五个重大转折点；

微生物分离和纯培养技术、通气搅拌的好气性发酵工程技术的建立、人工诱变育种和代谢控制发酵工程技术的建立、发酵动力学、发酵的连续化、自动化工程技术的建立、微生物反应生物合成和化学反应合成相结合的工程技术的建立。

10、菌种保藏方法主要有哪些？简述各种保藏方法的适用范围。

冻干保藏：适于 98%以上各类别的微生物，但不适于不产孢子的丝状真菌的菌丝体

低温保藏：斜面孢子，液态孢子，斜面种子→4℃保藏；一般只宜 1-2 个月（水分浓度较高）；注意：不宜用于生产菌种保藏，也不适于名贵菌种保藏。；适用于临时周转

低温定期移植法：少数冷冻保存易死亡的菌种用此法

11、以酵母菌为例，简述兼性厌氧细胞的液态扩培流程。

斜面原种 → 10mL 试管活化 (0.5 分) → 250mL 三角瓶扩培 → 3L 三角瓶 (1 分) → 20L 卡氏罐扩培 (1 分) → 200L 密闭罐种子 → 1.5-2.0 立方种子 (2 分) → 发酵罐 (0.5 分)

12、简述产孢子的丝状真菌固态扩培的工艺流程。

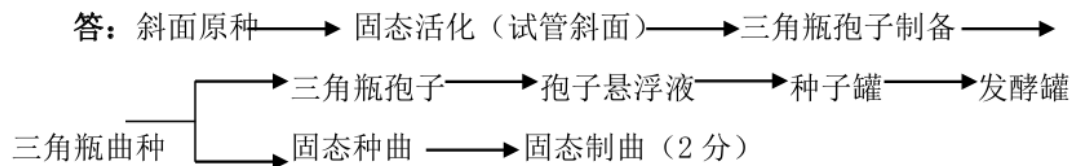
斜面原种→ 固态活化（试管斜面）→ 茄子瓶扩培（孢子房，温度、湿度控制）→三角瓶曲种培养→ 种曲房种曲培养 →曲的培养 →固态接种发酵

14、简述孢子悬浮液的制备流程（产孢子丝状真菌液体扩培）。

斜面原种 → 固态活化（试管斜面）→ 茄子瓶扩培（孢子房，温度、湿度控制）→ 孢子悬浮液制备 → 一级种子罐（好氧）→ 二级种子罐（好氧）→ 发

酵罐（好氧）

13、简述产孢子的丝状真菌用于固态发酵生产的固态曲制备程序及其用于液态发酵生产时的液态种子扩培程序。



15、简述生产车间种子制备应考虑的因素。

菌种特性（遗传稳定性）：级数少些，稳定性高

孢子发芽及菌体繁殖速度：❖生长快的细菌，级数少些，二级；慢的如链霉菌，则可四级 ❖一般级数越少，可减少因多次接种染菌的机会，但会延长发酵罐；生产产物的时间、发酵罐中孢子萌发、菌体生长占用时间

孢子瓶中孢子或菌体数量

最低接种量

生产规模

接种龄、接种量

16、简述发酵生产中大接种量和小接种量的优缺点。

小接种量，缺点：发酵周期长，能耗多，染菌机会多

大接种量，优点：易适应，立即进入对数生长期，分泌的胞外酶多，有利于对原料的充分利用，有群体优势，减少杂菌污染，缩短发酵周期，提高发酵生产率。

17、简述车间种子罐级数的确定方法（逆推法）。

指制备种子需逐级扩大培养的次数。

生产规模 → 装料系数 → 发酵罐的容积 → 最低接种量 → 最后一级种子罐（ n_x ）的种子体积 → …… → 一级种子罐（ n_1 ）的种子量 → 一级种子罐（ n_1 ）的接种量（不能超过孢子制备或摇瓶生产能力）

18、简述影响种子质量的主要因素。

培养基、种龄与接种量、温度、pH、通气和搅拌、泡沫、染菌的控制、种子罐级数的确定

19、简述生产车间种子质量异常的主要表征及其主要原因。

1) 生长过慢或过快。原因：a.培养温度是否是最适温度，b.通氧量不够，

过快主要是速效 N 过多

2) 结团。影响呼吸和营养物质吸收 原因: a.接种量不够(措施:加适量表面活性剂) b.通气搅拌速度不够。

3) 粘壁。营养不够,水分不够,丝状真菌发酵易出现此现象 原因: a.异常代谢杂质增多,产量下降 b.搅拌通气不够 c.泡沫过多(措施:消泡,改善溶解氧)。

4) 代谢异常。判断方法是镜检菌体形态

20、简述液态发酵生产中菌种生物量的测定方法主要有哪些?不同测定方法的特点是什么?(gpt)

1.干重法 2.光密度法(OD法) 3.细胞计数法 4.生物化学法

1.干重法 特点:通过离心、洗涤和干燥细胞获得干重来测定生物量。这种方法对待测样本的纯度要求较高,操作相对简单,结果可靠。

优点:可以提供较准确的生物量数据。缺点:需要较长的处理时间,并且在处理过程中可能导致细胞损失。

2.光密度法(OD法) 特点:利用分光光度计测定培养液的光密度(OD值),通常在600nm波长下进行。OD值与生物量呈正相关。

优点:快速、简便,适合连续监测生长情况。缺点:OD值受细胞形态、培养基颜色等因素影响,可能不够准确,特别是在细胞密度较高时。

3.细胞计数法 特点:采用计数室(如血球计数板)或流式细胞仪等设备直接计数单个细胞的数量。

优点:可以直接测量活细胞的数量和存活率,可以提供详细的生长信息。缺点:时间消耗较大,且对细胞的活性和形态的判断有一定要求。

4.生物化学法 特点:通过测定生物量相关指标(如蛋白质含量、DNA浓度等)来间接评估生物量。

优点:可以提供更详细的代谢信息或细胞状态。缺点:方法相对复杂,需要特定的试剂和设备。

22、简述液态发酵生产中泡沫带来的主要危害。泡沫的消除

影响装液量

导致逃液,若密封较好,泡沫从排气管排出,致染菌;若密封不好,沿轴上升,致污染;

影响通气搅拌的正常进行，从而妨碍菌的呼吸，造成 代谢异常，导致产物减少和菌体过早自溶；

影响后提取

- 物理法：改变温度法—改变泡沫、黏度或弹性—泡沫 破裂，工业上少用
- 机械法：
 - 罐内消泡法—利用消泡浆（碟片式、耙式）
 - 罐外消泡法—利用旋风分离器分离气体、液体、无气体入缸

- 化学消泡法：消泡

23、简述发酵终点判断的意义，以及判断放罐的主要指标。

合理判断对提高发酵单位时间内产量和质量有很大影响，不同类型发酵达到终点目标不同，因而对发酵终点 判断也不同

- 产物的产量增加率开始下降（产物量/体积·小时 称增长率）
- 菌体形态出现衰老（胞内出现颗粒），部分菌体出现自溶；
- 过滤速度明显下降（用移液管吸取发酵液看其流出时间）
- 残糖低，还原糖氮<0.5%
- 基氮上升，pH 上升
- 培养液的外观和黏度等：菌丝碎片增加，黏度增加

24、简述固态发酵工程的主要特点。

- 1) 发酵基质中没有游离水流动，水是培养基中较低的组分
- 2) 微生物从湿的固态吸收营养，营养物浓度存在梯度，菌体生长、营养物消耗和产物代谢累积不均匀

- 3) 高底物浓度可产生高产物浓度
- 4) 过程中糖化和发酵同时进行，操作简单低能耗
- 5) 提取工艺简单可控，有机废液少，但提取物含有底物成分
- 6) 机械化程度较低，在线传感器少，过程实时量化监控困难

26、简述发酵生产种子培养基的特点。

- 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。

27、简述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

28、简述发酵终点时发酵液的特性（gpt）。

1. 代谢产物积累：发酵液中通常会积累大量的代谢产物，如有机酸、酒精、气体（如二氧化碳）或其他生物活性物质，具体产物取决于发酵微生物和培养条件。
2. pH 变化：由于有机酸等代谢产物的产生，发酵液的 pH 值通常会降低。此外，发酵过程中可能会有缓冲系统的存在，影响 pH 变动的速度和程度。
3. 菌体浓度：在发酵终点，细胞生物量通常达到较高浓度，但随着细胞死亡和沉降，发酵液中活菌的数量可能会有所变化。
4. 营养物质消耗：发酵液中的主要营养成分，如糖分、氨基酸和维生素等，通常会显著减少，这与微生物生长和代谢活动密切相关。
5. 黏度变化：随着菌体浓度的增加和代谢产物的积累，发酵液的黏度可能会增加，影响后续的分离和提纯过程。
6. 气体含量：发酵过程中产生的气体（如二氧化碳或氢气）可能会在发酵结束时在液体中积聚，影响液体的物理性质和后续处理。

29、简述发酵工业下游加工的原则和要求。

- 原则： 1) 短时间内处理 2) 分离时尽量低温 3) 选择生物物质稳定的 pH
- 4) 要程序化进行清洗，消毒，包括厂房，设备，管路
- 要求： 1) 达到所需的纯度 2) 成本要低，得率高 3) 工艺过程要简便，对分离物质特性清楚 4) 废弃物要易处理，能够做到综合利用（零排放；清洁生产）

5) 实验室产品能够放大生产

30、简述发酵液中产物提取精制的基本流程 (gpt) 。

1.收集发酵液 2.细胞去除 3.浓缩 4.提取 5.分离和纯化 6.干燥 7.质量检验

1.收集发酵液 将发酵过程中生成的液体产品从发酵罐中收集，通常先经过过滤去除悬浮的细胞或固体杂质。

2.细胞去除 离心分离：通过离心机将细胞沉淀，分离出清液和细胞沉淀。过滤：利用滤网或微滤膜进一步去除未沉淀下来的细胞和大颗粒杂质。

3.浓缩 蒸发浓缩：通过加热蒸发水分，浓缩发酵液中的目标产物。膜浓缩：使用超滤或纳滤技术，通过膜分离浓缩目标产品，去除小分子杂质。

4.提取 溶剂提取：利用适当的有机溶剂（如醇、醚等）选择性提取目标产物。离子交换法：通过离子交换树脂去除杂质，并选择性保留目标产品。

5.分离和纯化 色谱分离：采用层析(如高效液相色谱 HPLC、空心柱色谱等)进一步分离和纯化目标产品。结晶：对于某些可结晶的产物，通过调整条件使其结晶，从而分离出纯品。

6.干燥 将提取和纯化后的产物通过喷雾干燥、冻干等方法去除水分，得到稳定的干燥产品。

7.质量检验 对最终产品进行质量分析，确保其纯度、效力和其他特性符合标准。

31、简述发酵工程目标产物的特点

1. 生物源性 2. 多样性 3. 高特异性 5. 潜在的生物活性 6. 环境友好 7. 易变性

1. 生物源性

目标产物大多来自微生物、植物或动物的代谢过程，例如酶、抗生素、有机酸和酒精等，具有生物合成的特征。

2. 多样性

根据不同的微生物和培养条件，发酵工程可以生产出广泛的产品，包括氨基酸、维生素、酶、活性肽等，化学结构和功能多样。

3. 高特异性

发酵过程中产生的目标产物通常具有高特异性，能对特定的生物反应或代谢途径产生显著影响，适用于特定的工业和医药应用。

4. 相对复杂的结构

许多发酵产品为功能性化合物,可能具有复杂的分子结构或多个功能团,这使得其合成和提取过程较为复杂。

5. 潜在的生物活性

发酵产物通常具有生物活性,能够影响生物体的生理过程,例如抗菌、抗炎、抗氧化等作用,具有应用于医药、食品和农业等领域的潜力。

6. 环境友好

相比于化学合成,发酵过程多为底物可再生利用,能环保地生产目标产品,符合可持续发展目标。

7. 易变性

由于受到多种因素(如温度、pH、营养成分等)的影响,发酵过程中目标产物的产量和质量可能存在较大波动。