



河北科技大学
HEBEI UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY

发酵过程菌种选育、实验、中试 及放大过程的优化

河北科技大学生物科学与工程学院

徐亲民

13513370405

2023年7月·石家庄

导言——当前存在的问题

- 菌种选育、发酵实验、中试及放大是一个系统工程，必须统一领导，互相配合，最怕相互扯皮。
- 近几十年发酵工艺除少数品种外，大多数进步不大，主要原因是习惯势力作祟，一成不变的菌种，一成不变的配方，一成不变的设备，一成不变的工艺，缺乏创新思维和创新实验。
- 在发酵工艺控制方面，经验占据统治地位，缺乏理论指导。
- 在发酵实验方面，实验条件脱离生产实际，并以静态思维应对瞬息万变的发酵动态过程，所得实验结果很难在生产上放大。



目录

- ◆ 菌种选育的方法与思考
- ◆ 发酵实验的目的、要求与研究内容
- ◆ 摇瓶实验的运用与优化
- ◆ 小发酵罐实验的运用与优化
- ◆ 发酵中试及其优化
- ◆ 实验误差及其处理
- ◆ 发酵过程的放大与优化
- ◆ 灭菌与发酵过程放大的关系
- ◆ 发酵尾气的测量及应用
- ◆ 实验室安全注意事项
- ◆ 实验室设计举例



菌种选育概述

- ◆ 菌种选育包括“育”和“选”两个步骤，前者是采用各种方法使菌种的基因发生有利于生产的突变或重组，后者则是从突变或重组的细胞中选出真正的高产菌株。
- ◆ 在菌种选育中所消耗的时间和精力，“育”一般只占20%左右，“选”则要占到80%左右。
- ◆ 在菌种选育中讲究方法，让“育”和“选”完美结合，可以提高选育效率，少走弯路，多快好省地得到高产菌株。
- ◆ 菌种的退化是必然的，选育工作就是同退化赛跑，按快节奏做是走一步退半步，按慢节奏做是走一步退一步，不去做则只退不进。



菌种退化的表象

- ❑ 菌落和细胞形态改变
- ❑ 表面培养产生的可溶性色素改变
- ❑ 生长速度减慢
- ❑ 产孢子或芽胞数量减少甚至缺失(?)
- ❑ 沉没培养细胞分化能力减弱
- ❑ 对氮代谢的活力下降
- ❑ 对抗生素及其他有毒物质的抗性减弱
- ❑ 对外界不良环境条件的抵抗力下降
- ❑ 代谢产物生产能力下降



防止菌种退化的方法

- ❑ 控制继代培养特别是产孢子或芽孢继代培养次数
- ❑ 用正常单菌落进行继代培养
- ❑ 利用不易退化的细胞形态如菌丝或营养细胞进行继代培养
- ❑ 采用高效菌种保藏方法(隔氧、超低温或冷冻干燥)
- ❑ 定期进行分离纯化(自然复壮)
- ❑ 利用恒化器淘汰生长速率下降的退化细胞
- ❑ 加强菌种选育, 诱变筛选与自然复壮的密切结合
- ❑ 筛选和培养过程中给与选择压力(人没有压力不进步, 物种没有压力不进化, 这就是所谓“适者生存”)



菌种选育的目标

- 目标代谢产物产量高
- 目标代谢产物纯度高，结构类似物或同系物少
- 单位生物量的代谢耗糖少，相应地耗氧和代谢热也少(即维持代谢强度低)
- 生长速度快，对不良环境的耐受力强
- 对原材料的选择范围广，利用率高
- 对高温的抵抗力强
- 沉没培养菌丝粗短，不结成致密的大菌丝球，流变学性能好，有利于混合及氧的传递
- 液态发酵代谢产物向胞外分泌性能好



高产菌种的一般特性

- 表面培养菌落和细胞形态均一
- 表面培养产生特征性可溶性色素
- 沉没培养产生特征性气味
- 对高温和有毒物质的抵抗力强
- 对氮源和硫源的代谢力强
- 沉没培养过程中放线菌和霉菌菌丝形态呈现明显的分化，分化后的菌丝较粗短，不易结球
- 生芽胞的细菌能形成较多的芽胞(?)



菌种选育的一般方法

- 自发突变，自然分离
- 物理因子诱变
- 化学因子诱变
- 原生质体融合
- 人工基因重组

以上各种选育方法(除基因重组外)，正突变的几率都不高，一般不会高于1%，要获得高产菌株，都离不开海量工作量的筛选。给予适当的选择压力，第一时间淘汰不良细胞，筛选获得高产菌种的几率可大幅度提高。



筛选的重要性

- 不管是自发突变还是强力诱变，负突变率永远高于正突变率，两者的差别仅为强力诱变比自发突变的总突变率要高得多，因而在同样的正突变率下，正突变总数也要高得多。
- 将不到1%甚至1‰的正突变细胞找出来无异于大海捞针，我们是否可以反向思维，将99%以上的负突变细胞先行淘汰，使正突变细胞得以浓缩？
- 要实施这一设想，必须了解负突变或者退化细胞的特征。



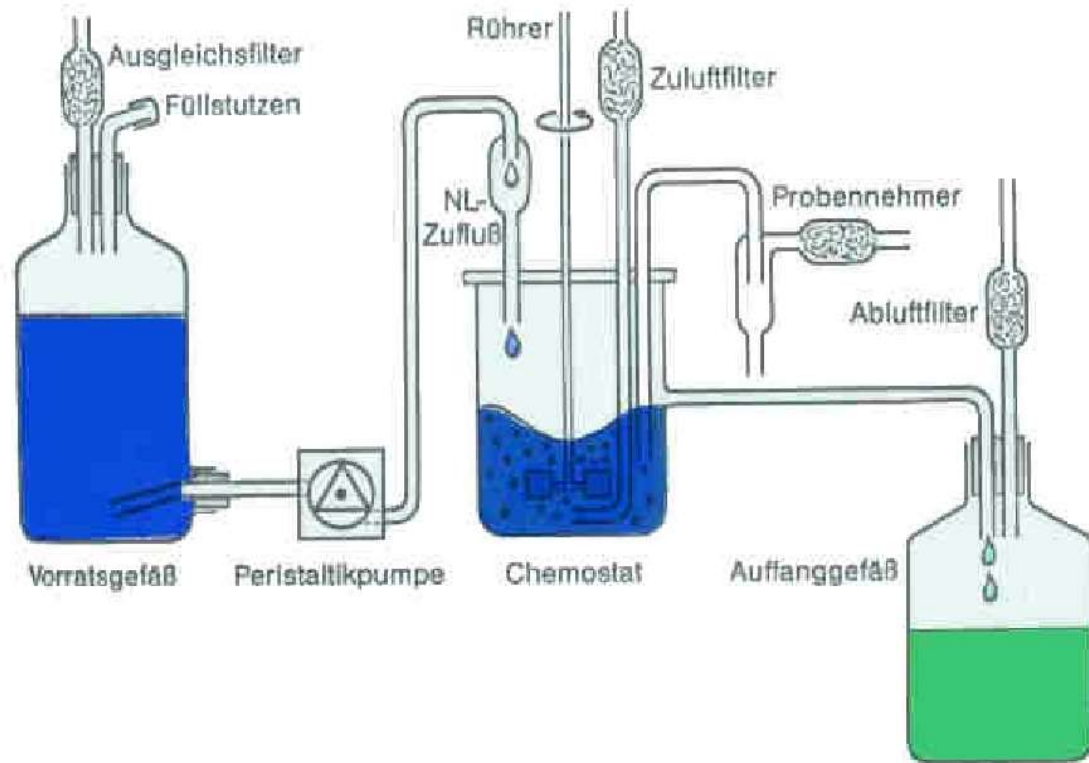
浓缩正突变细胞的一般方法

- 浓缩正突变就是要给予选择压力，使负突变细胞先一步自行淘汰，这一方法又称为理性化筛选。主要方法有：
 - 高生长速率细胞筛选
 - 蛋白质和核酸生物合成抑制剂抗性细胞筛选
 - 生物合成初级代谢中间体类似物抗性筛选
 - 终产物水解酶抑制作用筛选
 - 生物合成瓶颈酶脱抑制/阻遏作用筛选
 - 反馈抑制剂类似物敏感活性筛选
 - 耐热细胞筛选



恒化器在用于淘汰生长速率低的细胞

在恒化器中培养菌种，达到稳定状态后不断加大稀释速率，直至恒化器内的细胞即将完全洗出时，收集剩余的细胞即生长速率快的细胞，涂平板进行单细胞分离筛选高产细胞。



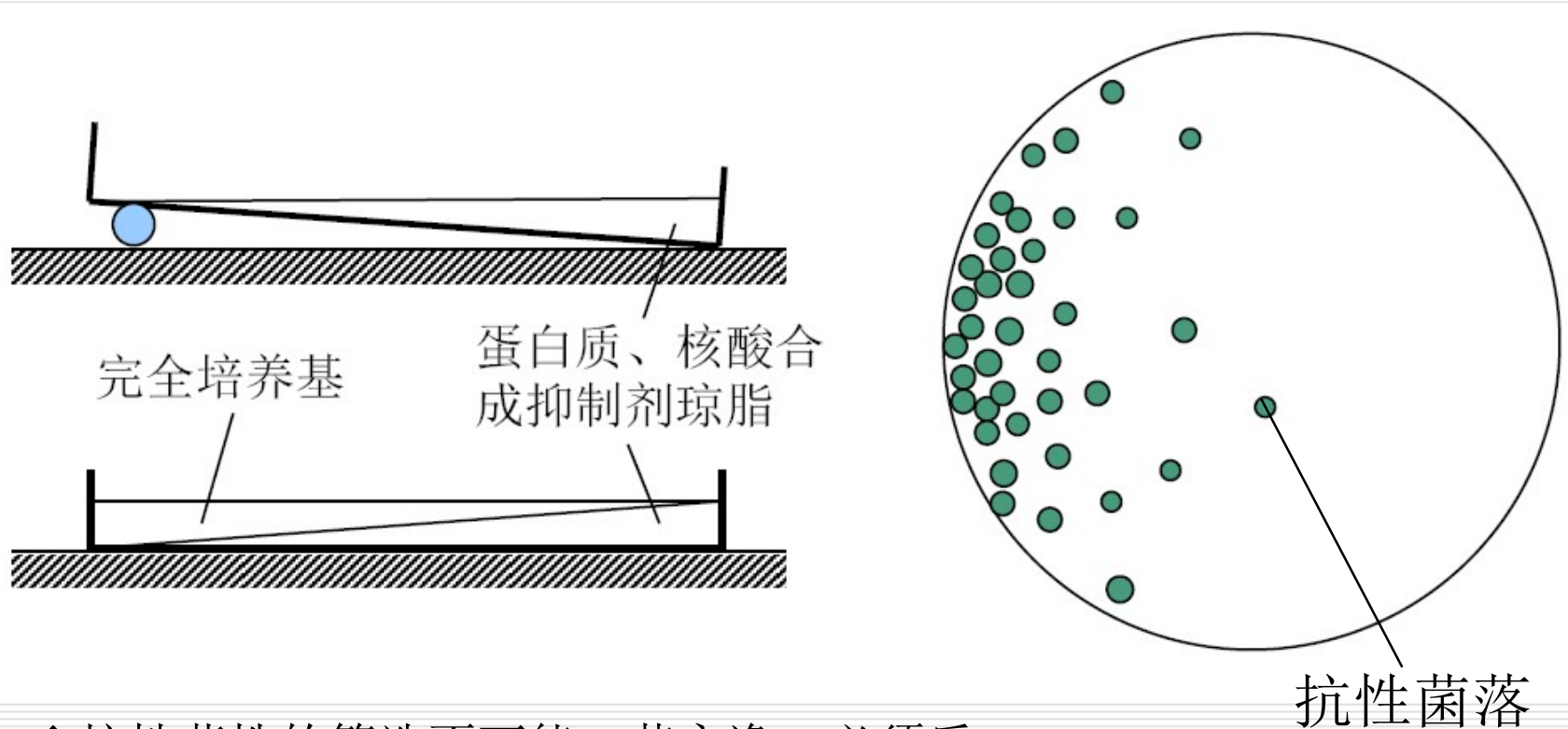
抗性菌株的筛选

- 抗氨基酸类似物和核苷酸类似物菌株在生产氨基酸和核苷酸方面起着重要作用。
- 对抑制核酸和蛋白质生物合成的抗生素具有抗性的菌株，往往有较高的抗生素生物合成能力。
- 对多种抗生素具有抗性的菌株往往比单一抗性更能提高抗生素生产能力。
- 抗性菌株对环境化学毒性的抵抗力增强。
- 由于抗性基因与抗生素生物合成基因通常在一条基因簇上，因此抗性基因的激活也常常伴随着抗生素生物合成基因的激活。

注意：不要试图增强对自产抗生素的抗性，这将提高对自产抗生素的水解活力。



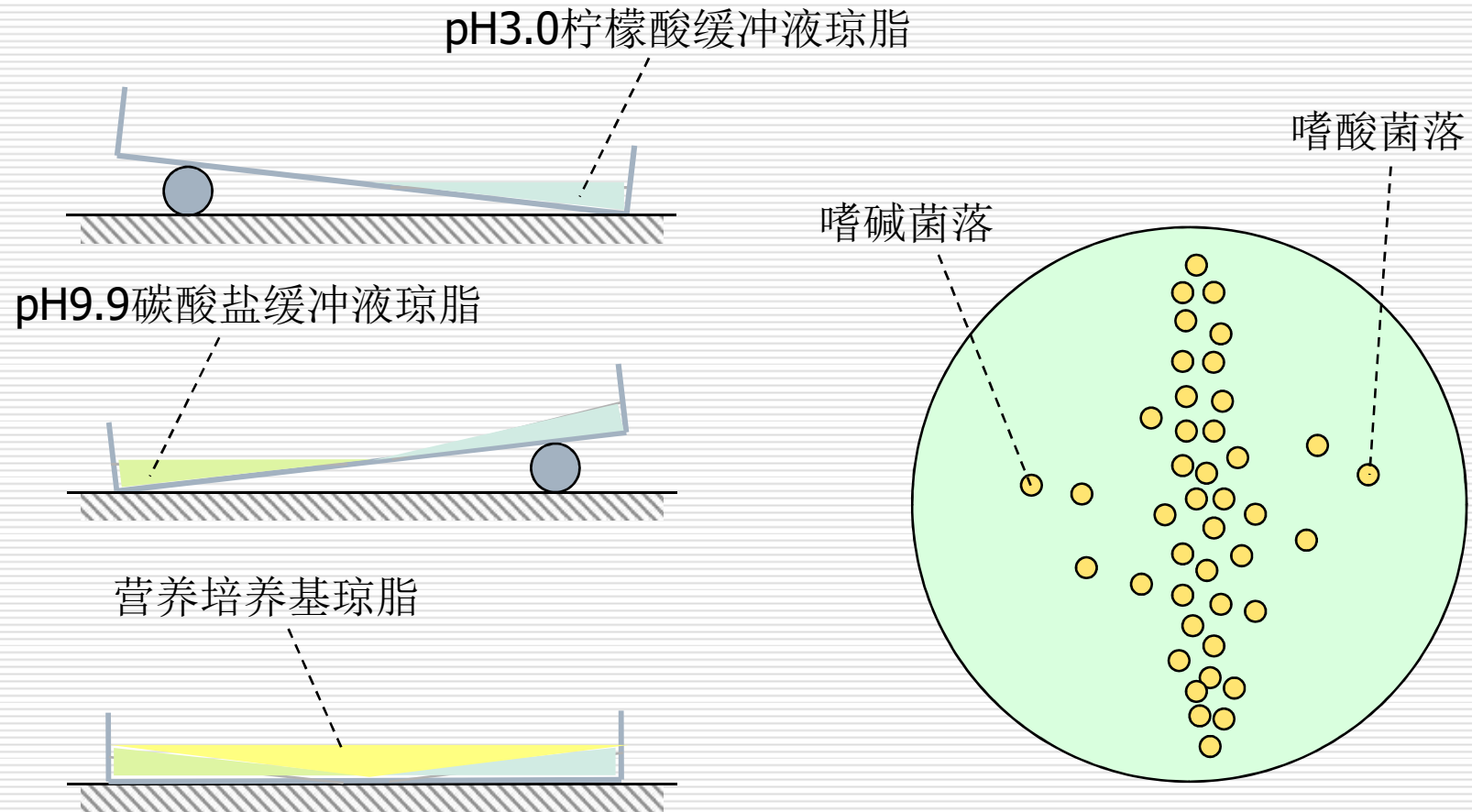
用平板梯度法筛选抗性菌株



◆抗性菌株的筛选不可能一劳永逸，必须反复进行，才能使抗性功能遗传下去。



用pH梯度法筛选耐酸或耐碱菌株



热诱变和热筛选

- 研究表明，在一定温度下加热孢子或细胞的悬浮液，可引起DNA中G-C碱基对的置换，从而产生一定的诱变作用。这种诱变所获得的正突变率远大于其他诱变方法，而且突变后的遗传稳定性好。
- 热还具有一定的筛选效果，可淘汰不耐热和遗传不稳定的细胞，这是提高正突变率和突变后遗传稳定性的一个重要方法。
- 激光和微波的诱变机理主要是热效应。



菌种筛选工作的新思路

- 用稀薄培养基短发酵周期初筛获得前期发酵高单位菌种，既可大幅度提高筛选效率，选出的菌种还更容易放大到生产。
 - 用大装量摇瓶筛选获得需氧量少亦即耗糖少的菌种，放大生产后有利于节约能源和原材料成本。
 - 用透明的平板分离培养基便于观察菌落形态和色素，积累高产菌株形态学方面的知识和经验。
 - 用西林小瓶或多孔塑胶板做发酵初筛，并实现自动化操作，可大幅度提高初筛效率。
 - 不要过分依赖高效液相分析，用生物测定或其他平板测定法，可大幅度提高初筛检测效率。
-



菌种斜面培养使用的耐高温螺纹密封盖试管

这种试管斜面在培养成熟后
螺纹盖拧紧密封可室温保藏
5年以上。



发酵实验的目的

- 开展摇瓶和小发酵罐发酵实验，提高发酵水平和质量，降低物耗和能耗，缩减发酵成本。
- 为生产车间提出工艺改进方案，包括配方以及温度、pH、溶氧、补料等的控制工艺。
- 对发酵原材料进行筛选，开展廉价原材料代用实验，为原材料采购提供依据。
- 协助菌保中心进行新菌种发酵实验，提供有关新菌种发酵水平、发酵条件和生理特性的数据，制定新菌种制种的质量标准和发酵工艺规程。
- 进行生产跟踪实验，协助生产车间查找发酵水平、能耗和质量波动的原因，并提出解决办法。



对发酵实验室工作的一般要求

- 对发酵实验要跟踪观察，有规律地采取各项实验数据，在每批发酵实验结束后绘制代谢曲线。
- 发酵实验使用的原材料规格要与生产一致，除特殊情况外，一般不采用试剂级。
- 发酵实验采用的通气、搅拌和溶氧条件要考虑生产放大的可能性。
- 维护好发酵实验设备，消灭滴、漏、跑、冒及其他故障，时刻保持设备完好状态。
- 原材料、设备备件和实验用品要放置有序，用标签标注品名、规格、数量和储藏条件，对农副产品及其他有机原材料还要标注生产或进货日期。
- 保持实验设备、仪器、用品和场所的清洁卫生。



对发酵实验室工作人员的一般要求(一)

- 身体健康，能胜任高强度的与发酵实验相关的脑力与体力劳动。
- 认真学习发酵工程理论和实际操作技能，对专业知识有比较全面的了解与掌握。
- 能够查阅国内外与所实验品种及一般发酵工程技术相关的专业文献，并对外文文献有一定的阅读和综述能力。
- 熟练掌握配料、灭菌、工艺计算、工艺控制、无菌实验、显微标本制备与染色、pH与溶氧电极校验与保养、常规化学与仪器分析、一般设备维修等操作技能。



对发酵实验室工作人员的一般要求(二)

- 能熟练运用计算机办公软件，编辑和处理文字、数据、公式、化学结构式和各种图像，对实验数据进行统计学分析，写出合格的发酵实验报告。
- 树立严格的安全意识，熟悉压力容器、高温设备、危险化学品、防爆设备、电气设备和消防器材的安全使用，严防烫伤、中毒、触电、爆炸、火灾等事故的发生。
- 强化保密意识，严防实验菌种的丢失，不对外泄漏发酵实验配方、方法、工艺和数据。一般情况下，实验记录不得带出实验室，也不得拷贝到个人电子存储设备上。



实验计划的制定

- 实验计划包括实验项目计划和日常工作安排计划两个方面。
- 项目计划以季和年为单位制定，季度计划包括实验内容、进度、所需试剂和原材料、外协项目、责任人等；年度计划还需有仪器设备添置计划。
- 日常工作计划应本着紧张、有序的原则制定，既保证每个工作日都有一定工作量，又要尽量减少加班的时间和次数。
- 日常工作计划可以用图表的形式表达，使大家一目了然。



日常工作安排图表举例

日期	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
星期	一	二	三	四	五	六	日	一	二	三	四	五	六	日	
斜面	→							↓							
母瓶	→		↓						↓						
种子			↓	→			↓					↓			
发酵			↓	↓	→						↓	↓	→		
分析	常规	常规	常规	常规	常规	常规	常规	常规	常规	常规	常规	常规	常规	常规	
			效价	效价						效价	效价				
其他	母瓶 配料 灭菌 接种	配制 标定 检测 试剂	种子 配料 灭菌 接种	发酵 配料 灭菌	发酵 接种			母瓶 配料 灭菌 接种	配制 标定 检测 试剂	种子 配料 灭菌 接种	发酵 配料 灭菌	发酵 接种			
责任人															

“其他”栏中应注明每天上、下午需要做的具体事情，如斜面、母瓶、发酵瓶、实验罐等培养基配制、灭菌、接种、取样、放瓶、检测等等，并落实到责任人。



摇瓶实验

- 摇瓶实验是发酵研究必不可少的步骤。
- 摇瓶实验可以以较少的人力、物力在短时间内获得大量实验数据。
- 摇瓶实验使用的摇床一般为偏心旋转式的(往复式的仅用于试管和圆底烧瓶的振荡培养), 偏心距25~50 mm, 转速100~250 rpm可调。
- 摇床有封闭式和开放式两种(前者自行控温, 后者置于恒温室内), 一般来说开放式效果较好。
- 封闭式摇床内部空间和安装开放式摇床的恒温室内要保持清洁, 但不要用紫外灯或化学灭菌剂灭菌, 以免产生的臭氧及气味影响微生物生长。



开放式摇床与封闭式摇床



考虑到运转的稳定性，摇床应当选用重心比较低的。



摇瓶实验的目的

- 摇瓶实验的首要目的是为了平衡优化基础培养基，获得最快的前期菌体生长速率和最高的起步单位，并为确定补料方案提供依据。
- 摇瓶实验的第二个目的是进行跟踪实验，查找实验罐发酵和生产罐发酵产量低于摇瓶或产生波动的原因及解决办法。
- 摇瓶实验的第三个目的是进行原材料质量验证、筛选和节约代用实验。
- 在摇瓶实验中也可以进行一些简单的补料试验。
- 摇瓶实验不能以获得高于补料分批发酵生产水平的效价为目的，这一目的很难达到，即使达到也很难在生产中放大实施。



实验原材料的选择(一)

- ❑ 在了解实验菌种生理生化特性和目标产物化学结构的基础上，选择能符合该菌种营养要求并被较快利用，以及与目标产物部分结构相似或代谢产物与目标产物生源结构相似的原材料。
- ❑ 原材料应尽量无毒，不易燃、爆，不易受潮，质量稳定，容易贮藏，价格低廉，有长期稳定的供应来源，运输方便。
- ❑ 原材料在溶解和灭菌后粘度要尽量低，通气、搅拌产生的泡沫尽量少。
- ❑ 用于补料的原材料溶解度要大，配制后浓度高，且在灭菌后不产生沉淀。



实验原材料的选择(二)

- 所有原材料都应当了解其产地，品种，规格，主要成分、有害杂质和水分含量，加工方法、粒度、包装和贮存条件、贮存时间等等，并记录在案。
- 不使用陈年、霉烂、生虫、腐臭、潮解、变质和颜色很深的原材料。
- 最终选用什么原材料要通过摇瓶发酵和小实验罐发酵数据确定。
- 对同类原材料做比较试验时要在相同的可同化C、N、P、S水平上进行。
- 为了缩短工作周期，加快工作进度，原材料选择的初步试验可以采用较短的发酵周期，最终复试时再延长发酵周期，其他试验工作也照此办理。



培养基配方的摇瓶实验

- 培养基配方实验以短周期为宜，其目的首先是适合细胞生长，其次是适合代谢产物合成。
- 适合细胞生长以生长速率为指标，要求能在12~32 h内(因菌种而异)达到最大菌体浓度。
- 适合代谢产物合成以起步效价为指标，要求20~40 h(因产物而异)的起步效价最高。
- 要同时实现以上两个指标，必须在达到最大菌体浓度后培养基中残余的C、N、P、S(特别是C、N)等仅仅能够维持细胞慢速生长，从而适合于产物(主要是次级代谢产物)的合成。
- 实现了以上两个指标，就完成了摇瓶配方实验的任务，剩下的工作交由小发酵罐试验去做(通过补料持续再现摇瓶优化配方，从而达到持续高产)。



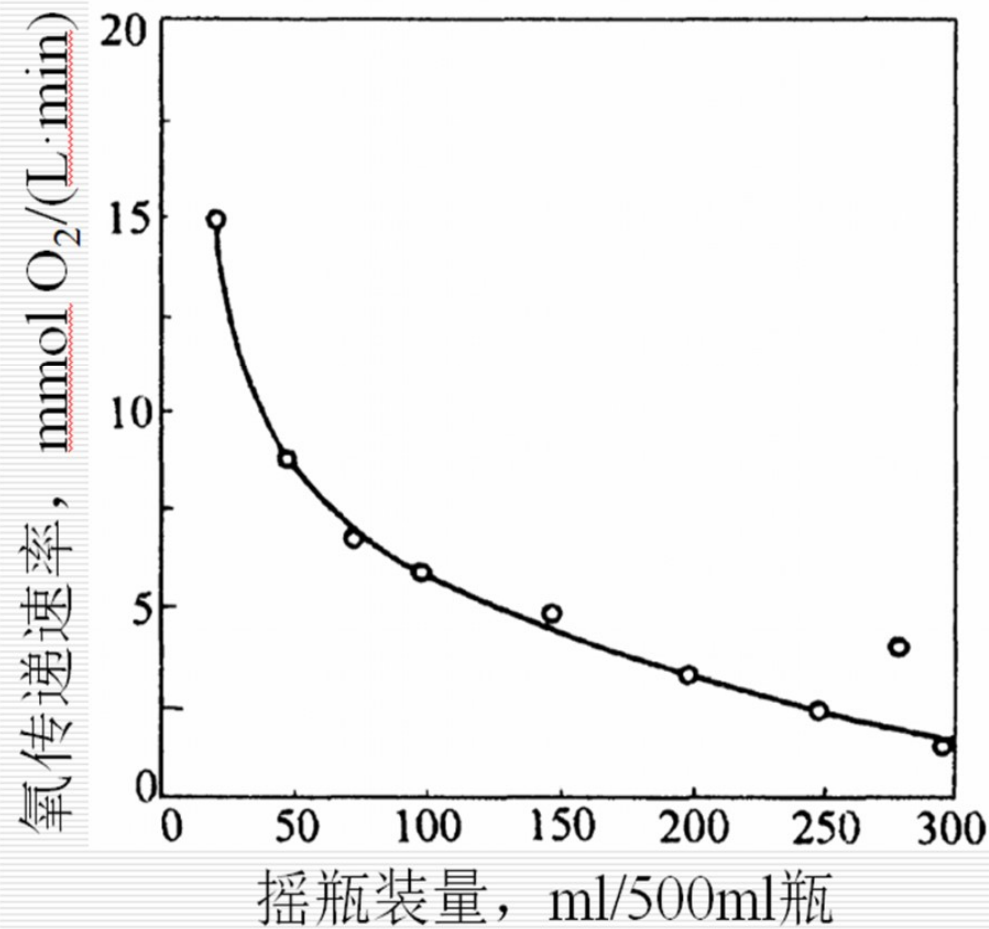
摇瓶实验中的培养基装量

摇瓶容积	培养基装量
150 ml	20~25 ml
250 ml	35~40 ml
500 ml	70~80 ml
750 ml	100~120 ml
1 L	140~170 ml

装量越小，溶氧效果越好。但采用较大装量获得的摇瓶实验结果，较容易在发酵罐上放大。



摇瓶装量对氧传递速率的影响



摇瓶瓶口使用的隔菌覆盖材料

- ❑ 原棉棉塞(打湿后发硬,影响通气,故不推荐,更不能用于脱脂棉塞)
- ❑ 八层纱布(最常用,但要勤洗涤、勤更换,自来水洗涤后要用软水冲洗,防止纱布变硬)
- ❑ 耐热泡沫塑料塞
- ❑ 耐热泡沫橡胶塞
- ❑ 多孔陶瓷芯橡胶塞

不管采用何种覆盖材料,都应当避免在灭菌和振荡培养中被培养基玷污!



多孔陶瓷芯隔菌硅胶塞



摇瓶形状、大小和摇床偏心距对氧传递速率的影响

形状和大小	培养基装量	氧传递速率($\text{mmol O}_2 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)	
		25 mm	50 mm
方形 $4 \times 4 \text{mm}$	0.125ml	6.7	25.4 ± 5.9
$8 \times 8 \text{mm}$	0.5ml	15.2 ± 2.4	33.6 ± 4.4
$15 \times 15 \text{mm}$	2.5ml	39.3	50.5 ± 3.5
$50 \times 50 \text{mm}$	19.5ml	47.7	58.1
圆形 $\Phi 6.6 \text{mm}$	0.26ml	5.0	16.4

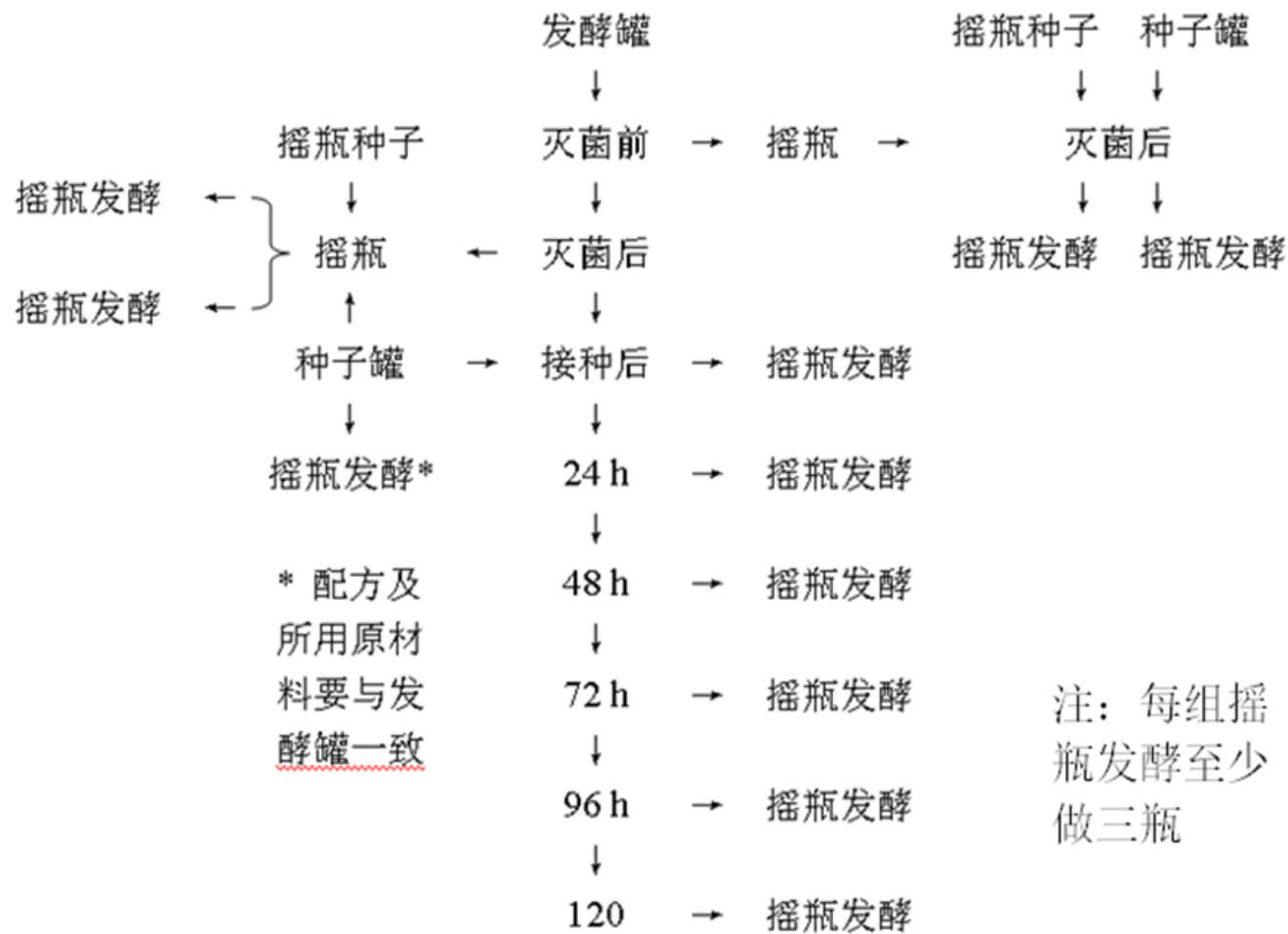


发酵罐摇瓶跟踪实验

- 发酵罐摇瓶跟踪实验用于查找发酵罐与摇瓶实验数据产生差距的原因，既可用于小型发酵罐，也可用于生产发酵罐。
- 跟踪实验的具体目的是查找摇瓶种子与种子罐种子之间、摇瓶灭菌与发酵罐灭菌之间、摇瓶培养与发酵罐培养条件之间的差异。
- 跟踪实验按下页图所示程序安排。
- 其中自种子罐和发酵罐取样要在火圈保护下进行，所用取样瓶要事先灭菌并干燥，取样后在无菌室按所需体积分装摇瓶，每项跟踪实验分装3~5瓶。

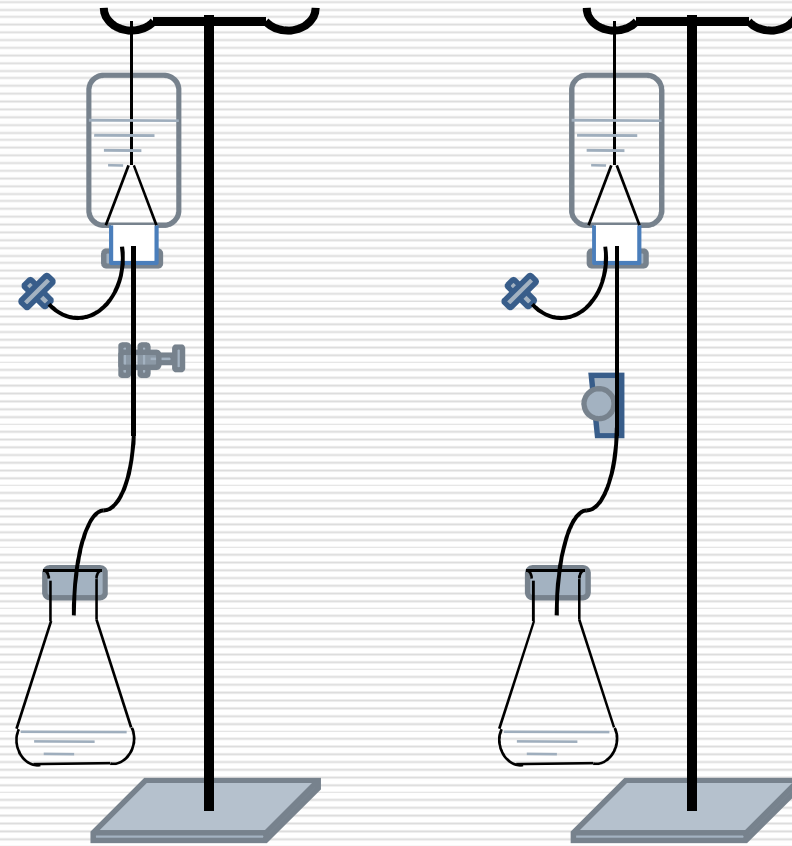


发酵罐摇瓶跟踪实验程序



用医用点滴管进行摇瓶自动补料

摇瓶置摇床上，用螺旋夹或点滴调节钮调节补料流速(每分钟滴数)。这一方法也可用于小发酵罐自动补料，但补料瓶应置于发酵罐上方2米以上，而发酵罐内压力不得高于0.02MPa。



小发酵罐实验(一)

目的

- 将摇瓶实验的配方、工艺条件转移到小型发酵罐，进行更加深入细致的实验研究。
- 探索发酵罐中pH、DO、菌浓、残糖、氨氮、效价等随发酵时间的变化。
- 比较摇瓶代谢与发酵罐代谢的差异，找出适合于发酵罐的配方和工艺条件。
- 进行补料试验，探索根据pH、DO、尾气CO₂含量、菌体浓度、相应物质的残留量等进行补料的最佳工艺及工艺控制点。
- 在摇瓶发酵的基础上进一步提高发酵效价。
- 进行动力、原材料、劳动力等的发酵成本核算。



小发酵罐实验(二)

重点

- 补料工艺研究
- 补碳源的种类、时机及控制指标
- 补氮源的种类、时机及控制指标
- 补磷源、硫源的种类、时机及控制指标
- 选择可能的前体物质进行补料试验
- 通过补料稳定C、N、P、S、pH和DO在摇瓶实验所得最佳水平上
- 通过补料使菌体生长和活力维持最佳状态
- 通过补料满足发酵过程菌体持续生长和产物持续合成对原料的需求（由物料衡算确定）
- 通过补料延长发酵周期，提高产品效价和产量



发酵试验过程pH的控制

- 使发酵过程的pH稳定在合适的范围内，对提高发酵产量至关重要，方法主要是控制C、N源的代谢平衡。
- 当发酵前期pH急剧上升时，要降低基础培养基中速效N源的用量；pH急剧下降时，要降低基础培养基中速效C源的用量。
- 发酵中后期pH有持续上升趋势时，要及时补入速效C源；有持续下降趋势时，要及时补入速效N源。补料量以少量多次、不造成pH较大波动为宜。
- 在一般情况下，葡萄糖是最好的速效C源，氨水和铵盐是最好的速效N源，发酵过程用流加葡萄糖、氨水和铵盐综合控制pH可以达到很好的效果，但要注意氨氮水平和溶氧水平的变化。
- 不是万不得已时，不用无机酸、碱调节pH。

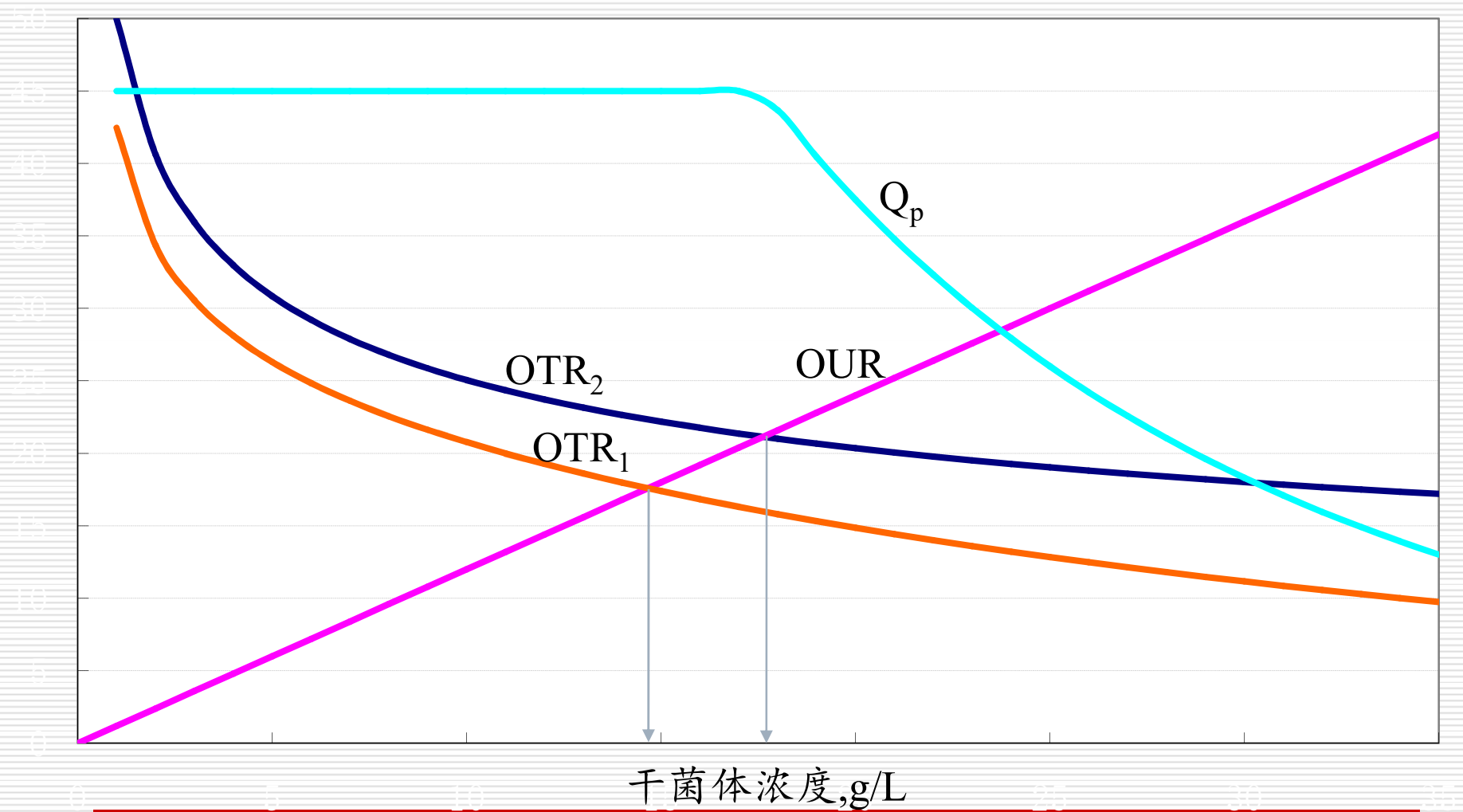


发酵试验过程DO的控制

- 对于高度好氧的微生物发酵过程，DO的控制也是至关重要的。
- DO的控制归根结底是菌浓的控制，氧在发酵液中的溶解度与菌浓成反比，而氧的消耗速率与菌浓成正比。
- 发酵前期DO的快速下降是正常的，但在下降到某一谷底后应当回升到一个合适和稳定的水平。
- DO偏高可增加补料(糖)量，反之则减少补料(糖)量。
- 如果菌浓过高引起DO过低，首先要限制营养的补给，其次才提高搅拌转速和通气量，并适当补水。
- 要注意排除染菌原因造成的DO过低。



生物质浓度对氧平衡的影响



发酵试验过程补碳源的控制

- 由于代谢产物的生物合成过程大多存在碳的分解代谢产物阻遏或抑制，有的甚至特别敏感，因此发酵过程的残碳控制至关重要。
- 根据残糖测定结果控制补糖，由于时间的滞后及测定的准确性差而很难达到预期效果。
- pH及DO(特别是DO)对残糖都十分敏感，可以作为补糖的控制依据。
- 利用实时计算的氧消耗速率或二氧化碳生成速率控制补糖是更加精确和理性的控制方法，但需要配备尾气氧和二氧化碳分析仪。
- 动植物油兼作优良碳源和消沫剂在发酵过程中广泛应用，但其加入对DO、糖代谢和后提取的影响不可忽略。



发酵试验过程氨氮的控制

- NH_4^+ 尽管是良好的氮源，但也对很多发酵产品的生物合成有抑制或阻遏作用，必须在发酵过程中予以精细控制。
- 发酵液中 NH_4^+ 浓度的控制可通过流加氨水或铵盐来实施，但这一流加过程中要同时注意 pH 的稳定。
- 不能以发酵工厂目前普遍测定的甲醛氮作为 NH_4^+ 浓度的控制指标，因为甲醛法测定的氮既包含 NH_4^+ 氮，也包括各种氨基氮和胺氮，后两者往往占优势，因此甲醛氮充足并不代表 NH_4^+ 氮也足够。合理的控制指标应该是测定的 NH_4^+ 氮。
- 发酵中后期甲醛氮高还意味着有大量细胞自溶，这不是 NH_4^+ 氮充足而是 NH_4^+ 氮或 C 源严重不足的表现。



发酵试验过程其它营养物质的控制

- P、S和某些无机元素也是不可或缺和过量的，要根据对发酵滤液中残量的测定或物料衡算来确定是否需要补加。
- 对于补料分批发酵过程和反复补料分批发酵过程，由于补料、蒸发、中间放料、代谢等所造成的发酵液体积复杂的不断变化，采用常规方法很难进行发酵过程的物料衡算，必须借助于计算机对发酵过程进行数学模拟。
- 引入数学模型可以预测发酵过程对各种营养物质的需要，从而能更加理性化地进行综合控制，但这种控制还需辅以某些必要的检测。



发酵试验的日常检测与控制

- 摇瓶实验检测同菌种选育中的菌种特性试验。
- 对实验罐发酵，除效价外，要求从接种后的8~24h开始，每4、8或12 h取样检测一次，次级代谢的效价则从48~72 h开始，每12~24 h检测一次。
- 实验罐发酵的pH可以补入氨水、硫酸、葡萄糖、玉米浆进行调节，但在进行这种补料时还要考虑罐内残糖和氨氮的含量，使其处于合适的水平上。
- 实验发酵罐DO过高时可补入糖或油进行调节，过低时首先要限制营养的补给，其次可以提高搅拌转速或通气量或补水，一般不采用提高罐压的方法。



发酵试验的常规检测项目

- 常规检测包括pH、菌浓、菌体形态、无菌状态、残糖、氨氮、甲醛氮、前体、效价等。
- 对于摇瓶发酵实验，必要时每天卸下一个摇瓶进行上述检测，为此要根据检测次数安排配制和接种的摇瓶数量。
- 测定效价的摇瓶样要同时测定发酵滤液体积或称重，以计算发酵总亿效价，排除水分蒸发的影响。
- 对实验罐种子，要求从培养8~24 h开始，每4~8 h取样检测一次，一般不测效价。达到对数生长期后，则每2~4 h无菌取样一次，接种入发酵瓶进行平行实验，以考察最合适的种龄。
- 对实验罐发酵，一般从发酵12~24 h开始，每6~12 h取样检测一次(取样起始和间隔时间由发酵周期确定)。



摇瓶发酵与发酵罐发酵的差异

	摇瓶	小发酵罐	大发酵罐
通气方式	表面通气	沉没鼓泡通气	沉没鼓泡通气
液/固悬浮	好	好	较差
液/液分散	差	好	较差
剪切作用	弱	较强	更强
氧传递速率	较差	较好	较好但不均匀
培养基装量对溶氧的影响	显著	不显著	不显著
速效C、N源代谢速率	较慢	较快	较快
CO ₂ 溶解量	少	多	更多
参数稳定性	好	较差	较好但不均匀



摇瓶与发酵罐氧传递系数的比较

发酵容器	氧传递系数 $k_L a(\text{h}^{-1})$
试管	20
扁瓶	50
摇瓶	500
挡板摇瓶	1200
10 L机械搅拌发酵罐	3000~4000

注：以上均为以水为介质测得的结果，如果换成发酵液，所得数值可能下降一个数量级。



摇瓶与发酵罐差异总结

- 由上所述，发酵罐的发酵条件总体优于摇瓶，因而发酵表达水平也应高于摇瓶。
- 如果发酵罐的发酵水平低于摇瓶，有可能是：
 1. 发酵培养基中加入的速效碳源过多或速效氮源过多，造成代谢不平衡，影响pH、DO的稳定和发酵产物的表达。
 2. 发酵使用的菌种对剪切作用敏感，在搅拌罐中细胞容易破碎而影响发酵水平。
- 第一种情况，可对基础培养基中速效碳、氮源的用量以pH、DO为依据做相应调整，并通过流加补料控制。
- 第二种情况，可在摇瓶中加入几粒小玻璃珠进行验证，确认剪切的影响后改变发酵罐搅拌器形式。



发酵过程的中试

□ 发酵过程中试的目的

- ◆ 承上启下，对实验室研究结果进行小规模验证，为生产放大提供工艺依据。
- ◆ 探索实验室选育的新菌种适合于生产环境的发酵培养基配方和工艺条件。
- ◆ 对生产上发现的问题进行小规模研究，以期找出问题的症结和解决办法。
- ◆ 对引进的新菌种、新产品、新技术、新装备进行工艺验证。
- ◆ 对长期停产的品种进行复产前的小规模试生产。



发酵产业化过程及中试所处的地位

过程阶段	技术完善水平	规模(L)	技术成熟水平
产业化	9	≥ 100000	大规模工业化生产
产业转化	8	~ 10000	半生产规模技术验证
活力展示	7		工艺与工厂设计
技术开发	6	~ 1000	中试验证
	5	~ 100	强化技术经济性能
	4		小试的展开与整合
可行性展示	3	~ 1	开展小试的技术基础
	2	~ 0.1	具有可行性的技术应用
基础研究	1	~ 0.01	有希望的研究结果



中试所需的主要装备

- 500~5000 L与生产罐结构及几何形状相似的发酵罐及其配套种子罐、补料罐
- 搅拌转速检测及变频调速装置
- 温度、空气流量、pH、DO检测与控制装备
- 自动补料与计量装备
- 尾气分析设备(气体质谱仪或尾气O₂和CO₂分析仪，前者的分析精度和响应速度均比后者高一个数量级，除O₂和CO₂外，还能检测包括水蒸气，氨，挥发性醇、醛、酸在内的尾气中所有其它气体成分)
- 测糖仪、NH₄⁺检测仪、高效液相色谱仪等分析仪器
- 其他与发酵实验研究有关的新装备



实验误差

- 实验误差是不可避免的客观存在，我们不可能做到不出现误差，但可以尽量减少和消除误差。
- 实验误差具有以下三个特点：
 - 非零性——误差的存在是绝对的
 - 不确定性——误差的大小和正负是随机变化的
 - 未知性——误差的真值是不可知的
- 实验误差包括随机误差、系统误差和粗大误差三种，它们各具有不同的特点。



随机误差及其减少方法

- 随机误差由某些不易控制的因素造成的，即在相同条件下做多次实验和测量，其误差数值时大时小，偏向时正时负。
- 随机误差服从统计学中的正态分布，即重复实验和测量数据大部分集中在平均值或中值左右，呈大致的对称分布。
- 随着实验和测量次数的增加，平均值或中值可以接近真值，随机误差减小，但不会消除。
- 因此减少随机误差的方法就是增加重复实验的次数。



系统误差及其减少方法

- 由某些固定不变的因素引起的。在相同条件下进行多次实验和测量，其误差数值的大小和正负保持恒定，或误差随条件改变按一定规律变化。
- 减少系统误差的方法为：
 - 进行空白实验
 - 进行对照实验
 - 测量时增加标准品对照或空白对照



粗大误差及其消除方法

- ❑ 粗大误差是实验数据按专业知识判断与实际明显不符的误差，主要是由于实验人员操作失误、仪器故障、试剂污染、环境突发变化等所致。
- ❑ 这类误差往往与正常值相差很大，所以也称不正常误差。
- ❑ 通过对实验人员进行严格训练，对实验试剂进行标定，加强维护保养保持测量仪器的完好，控制实验环境稳定等可以消除这类误差。
- ❑ 在整理数据时应将明显不符合正常情况的数据作为粗大误差加以剔除。
- ❑ 千万不要将发生粗大误差的数据错误地判断为自己的重大实验成果，给后人留下笑柄。



实验结果的人工记录

- 实验记录是为了对实验过程进行管理，以确保对实验进度的监控和对实验效果的总结、评价。
- 系统、完整的记录有利于对实验全过程进行追溯，是对每位实验员工的工作数量和质量进行考核的重要依据，也是日后知识产权保护的法律证据。
- 记录必须即时，尽量减少追记，内容必须真实、可靠，字迹必须工整、清晰。
- 不得任意撕毁或涂改记录，必须更改时，可用一条或二条横线划在更改处，使原数据仍可辨认，在旁边重写正确的数据并签注姓名及日期。
- 记录如需重新誊写，则原有记录不得销毁，而应作为重新誊写记录的附件保存。
- 实验记录应有专门印制、每页都有编号的记录本。



仪表及计算机记录

- 对于自控发酵罐和自动记录仪表，要经常检查仪表及计算机记录数据是否正常，如不正常要及时查找原因，恢复正常。
- 非发酵实验人员，不得操作发酵控制计算机，该计算机必须与外部网络断开。
- 在每批发酵结束后，要对计算机记录数据在专用文件夹或存储器内进行存储。
- 任何情况下，实时和存储的记录数据都不得删除或修改，以保持纪录的真实性，为此，可以加锁或加密控制。



实验总结

- 每月或每季度书写简单的实验小结一份，限A4纸1~2页。
- 每半年写出实验报告一份，限A4纸2~5页。
- 每年书写详细实验总结一份，篇幅为A4纸5~8页。
- 如果项目有多人参加，则项目负责人须综合各人的年度报告书写项目总体的年度报告。
- 实验报告、总结要有数据，有分析，有结论，有今后改进计划，数据要用图表表示，必要时要对大量摇瓶数据进行统计分析。
- 实验报告和总结都应注明参加实验的人员和执笔人，以备日后查考。



记录数据的修约规则

- 实验数据的修约应采用“4舍、6入、5留双”规则。具体实施方法如下：
 - 当保留位数后面第一个数字小于或等于4时舍去，大于或等于6则进1；当保留位数后面第一个数字等于5，5后（右边）非0应进1，5后为0看奇偶：5前偶数应舍去，5前奇数则进1。
- 例如（保留1位小数）：

2.2500→**2.2** **2.1507**→**2.2** **2.0500**→**2.0**
2.1500→**2.2** **3.7431**→**3.7** **2.3653**→**2.4**



发酵过程的放大与缩小

- 根据实验室和中试所得实验结果设计和操作生产规模发酵罐的过程称为放大。
- 反过来，根据已有生产规模发酵罐设计和操作实验室或中试规模发酵罐的过程称为缩小。
- 放大的主要任务是根据小发酵罐的工艺条件确定大发酵罐的工艺条件，特别是通气、搅拌条件。
- 根据放大和缩小的几何相似原理设计的发酵罐有利于实验室和中试的实验结果在生产规模发酵罐上重现。



发酵过程放大研究的主要内容

- 发酵罐的几何形状放大
- 发酵罐传热面积的放大
- 通气量的放大
- 搅拌转速和搅拌功率的放大

其中的重点是搅拌转速和搅拌功率的放大



发酵罐几何形状的放大

- 发酵罐几何形状放大是发酵过程放大的基础。
- 不同规模发酵罐几何形状相似是发酵过程放大的前提。
- 所谓几何相似就是发酵罐的结构和各部件的几何尺寸比例相同。一般以发酵罐内径为基准，不同大小的发酵罐应保持高径比及各部件尺寸与罐内径之比值一定，也要保持比传热面积(传热面积与发酵罐容积的比值)一定。



典型的机械搅拌发酵罐各部件几何尺寸比例

- $H=2.5D_t\sim 3.0D_t$
- $D_i=0.3D_t\sim 0.4D_t$
- $C=1.2\sim 1.8D_i$
- $C_1=D_i$
- $B=0.1D_t$

H : 发酵罐内部空间高度

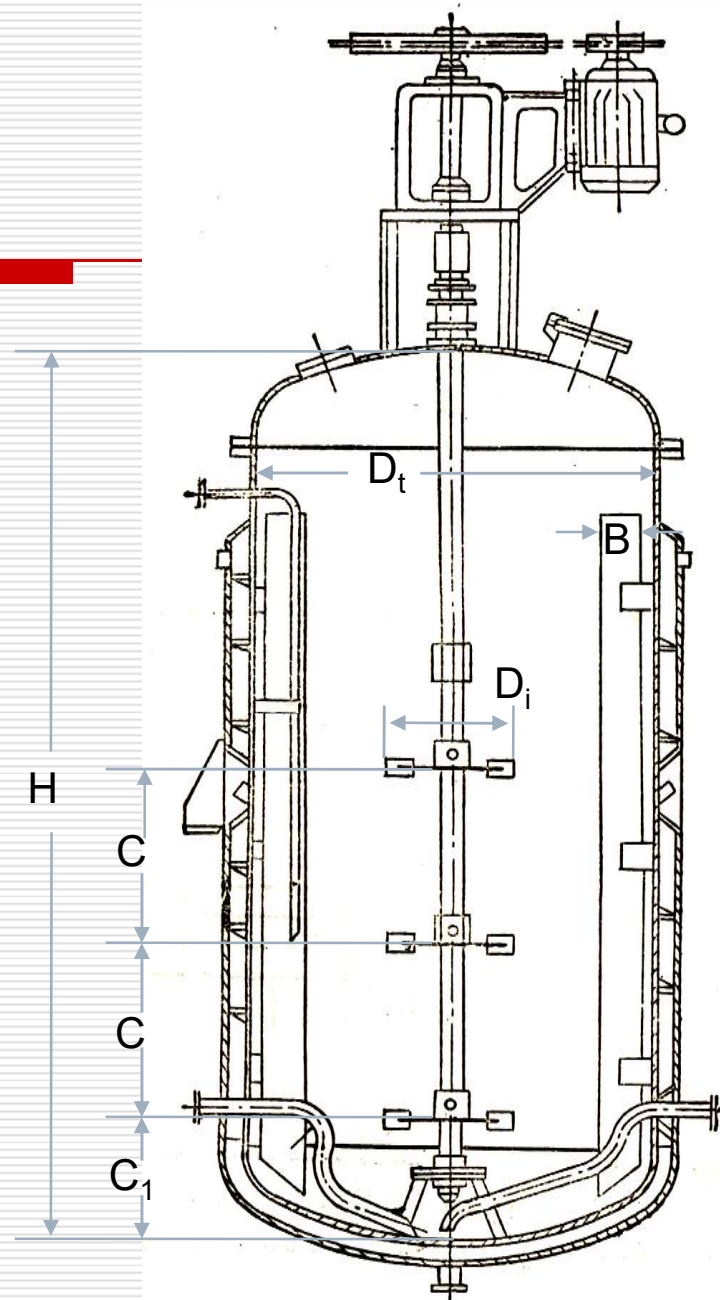
D_t : 发酵罐内径

D_i : 搅拌叶轮直径

C : 搅拌叶轮间距

C_1 : 下层搅拌至罐底距离

B : 挡板宽度



典型的100 m³ 机械搅拌发酵罐

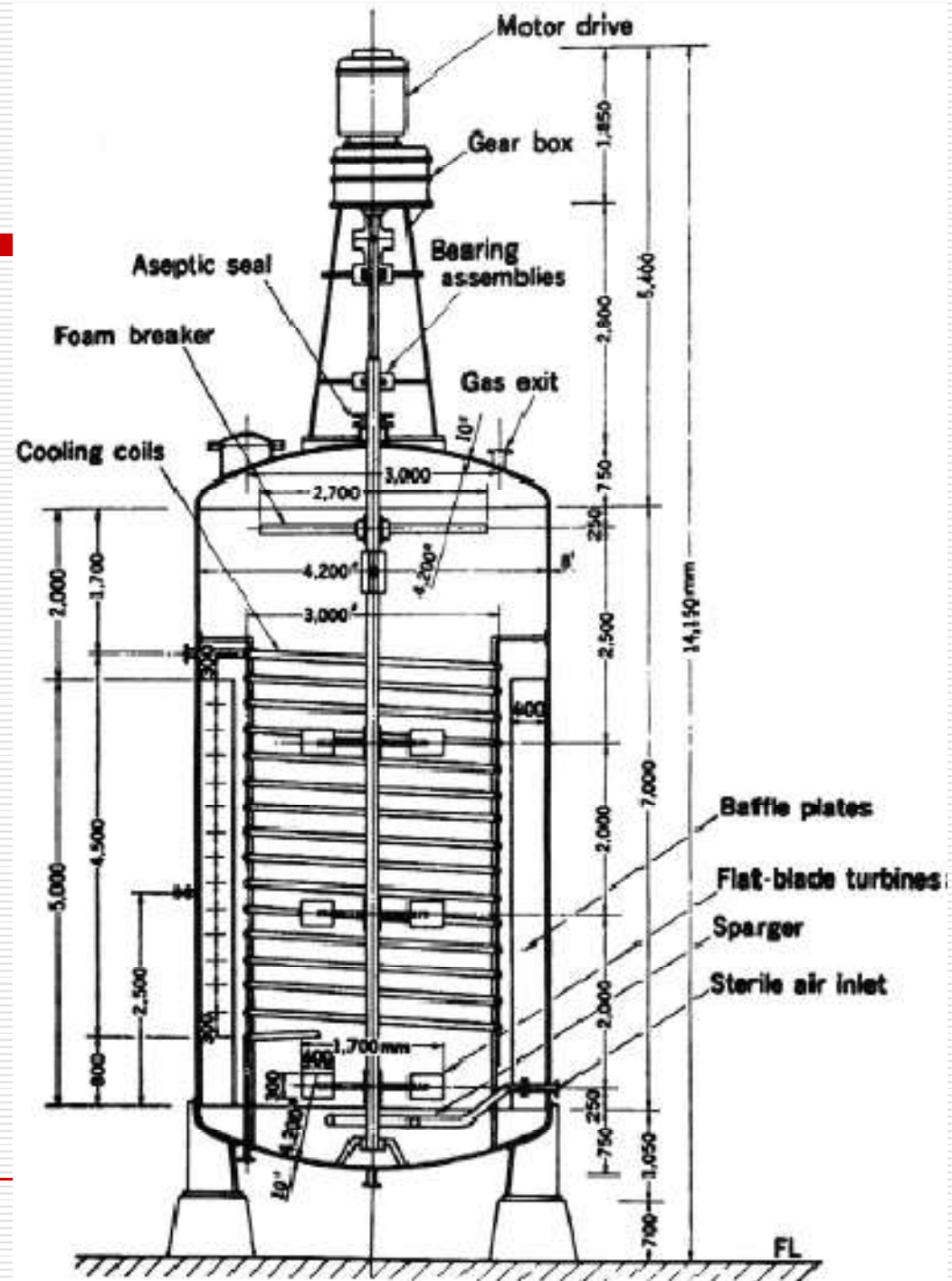
几何尺寸:

□ $H=8500$

□ $D_t=4200$

□ $D_i=1700$

□ $C=2000$



发酵罐传热面积的放大

- 原则：单位容积的传热面积相等。
- 方法：小罐筒体表面积与罐容积之比值比较大，可只采用夹套或外盘管传热；大罐筒体表面积与罐容积之比值比较小，除外盘管之外，还必须加装内盘管；罐越大，所需内盘管的表面积越大。
- 内盘管的设计：有垂直型盘管和水平型盘管两种。前者可起部分挡板作用，且容易取出罐外进行维修，但传热效果较差，内部存水不易放出；后者由于冷水流动方向与搅拌方向相反，传热效果较好，内部存水易放出，但不能取出罐外维修。



通气量的放大

- 原则：单位发酵液体积所给予的通气量或空气在罐内以空截面为基准的上升线速度相等。
- 方法：根据几何相似的原则，入罐空气管道的截面积原则上应与罐内径成正比，但随着发酵罐体积的增大，液层深度越高，空气上升的阻力就越大，因此大发酵罐的空气入罐管道线速度要大于小发酵罐，也就是说入罐空气管道的截面积与罐内径之比要小一些。



搅拌转速放大的依据

- ☑ 单位发酵液体积吸收的搅拌功率相等 ($\frac{P_1}{V_{L1}} = \frac{P_2}{V_{L2}}$)
- ☐ 氧的气/液传质系数相等 [$(k_L a)_1 = (k_L a)_2$]
- ☐ 搅拌叶轮尖端线速度相等 ($n_1 D_{i1} = n_2 D_{i2}$)
- ☐ 搅拌雷诺准数相等 ($n_1 D_{i1}^2 = n_2 D_{i2}^2$)
- ☐ 单位液体体积搅拌泵流量相等 ($\frac{Q_1}{V_{L1}} = \frac{Q_2}{V_{L2}}$)

按以上不同依据所得到的放大结果极不相同!



单位发酵液体积等功率放大

□ 不通气下的搅拌功率

➤ 小罐 $P_1 = N_{p1} \rho_1 N_1^3 D_{i1}^5$

➤ 大罐 $P_2 = N_{p2} \rho_2 N_2^3 D_{i2}^5$

□ 如果是同样的发酵过程(即发酵液性质相同)和同样的搅拌器, 则 $N_{p1} = N_{p2}$, $\rho_1 = \rho_2$

□ 如果是几何相似, 则 $V_L \propto D_i^3$

□ 于是, 由 $P_1/V_{L1} = P_2/V_{L2}$ 计算得

$$\frac{N_1}{N_2} = \left(\frac{D_{i2}}{D_{i1}} \right)^{2/3} = \left(\frac{V_{L2}}{V_{L1}} \right)^{2/9}$$



在几何相似前提下等功率放大系列容积 发酵罐搅拌转速参考数据

$V_t(\text{m}^3)$	$D_t(\text{m})$	$D_i(\text{m})$	$N(\text{r}/\text{min})$
0.01	0.18	0.06	930
0.1	0.38	0.13	560
1	0.83	0.28	330
10	1.8	0.6	200
100	3.8	1.3	120
1000	8.3	2.8	72



等单位通气量放大空气管道配置的参考数据

罐容积 m ³	罐内径 m	液层深度 m	入罐空压 MPa	出罐空压 MPa	标称空量 m ³ /min	工况空量m ³ /min		设计空速 m/s	入罐管径mm		出罐管径mm	
						入罐	出罐		计算	取值	计算	取值
0.01	0.19	0.30	0.12	0.05	0.007	0.003	0.005	6.16	3	4	4	4
0.05	0.32	0.51	0.12	0.05	0.034	0.015	0.023	7.02	7	8	8	8
0.1	0.40	0.64	0.12	0.05	0.068	0.031	0.045	7.49	9	10	11	15
0.5	0.68	1.09	0.12	0.05	0.340	0.155	0.227	8.95	19	20	23	25
1	0.86	1.38	0.12	0.05	0.680	0.309	0.453	9.79	26	25	31	32
2.5	1.17	1.87	0.13	0.05	1.700	0.739	1.133	11.16	37	40	46	50
5	1.47	2.35	0.13	0.05	3.400	1.478	2.267	12.47	50	50	62	65
10	1.85	2.97	0.13	0.05	6.800	2.957	4.533	14.09	67	65	83	80
25	2.52	4.02	0.14	0.05	17.000	7.083	11.333	16.86	94	100	119	125
100	3.99	6.39	0.15	0.05	68.000	27.200	45.333	23.17	158	150	204	200
120	4.24	6.79	0.16	0.05	81.600	31.385	54.400	24.27	166	200	218	250
150	4.57	7.31	0.17	0.05	102.000	37.778	68.000	25.73	177	200	237	250
200	5.03	8.05	0.18	0.05	136.000	48.571	90.667	27.82	192	200	263	250
240	5.35	8.55	0.19	0.05	163.200	56.276	108.800	29.27	202	200	281	300



氧的气/液等传质系数放大(一)

- 计算氧的气/液传质系数的经验式:

$$k_L a = \alpha \left(\frac{P}{V_L} \right)^a u_s^b$$

- 式中的指数 a 和 b 随发酵罐的大小而异, 右表给出的是经验值。

发酵罐容积(L)	a	b
5	0.95	0.67
500	0.65	0.62
50000	0.45	0.5



氧的气/液等传质系数放大(二)

- 设放大前后的通气线速度 v_s 相等，则当发酵罐由5 L放大到50000 L时，应有：

$$\left(\frac{P_2}{V_{L2}}\right)^{0.45} v^{0.5} = \left(\frac{P_1}{V_{L1}}\right)^{0.95} v^{0.67}$$

- 整理后得：

$$\frac{N_1^{2.85}}{N_2^{1.35}} = \frac{v^{-0.17} D_{i2}^{0.9}}{D_{i1}^{1.9}}$$



各种放大依据所得结果的比较

放大依据	10m ³ 发酵罐/10L发酵罐						
	P	P/V	N	ND	Re	N/D	Q/V
单位体积吸收功率相等	10 ³	1	0.215	2.15	21.5	0.021	0.215
搅拌转速相等	10 ⁵	10 ²	1	10	10 ²	10 ⁻¹	1
搅拌叶尖端线速度相等	10 ²	10 ⁻¹	10 ⁻¹	1	10	10 ⁻²	10 ⁻¹
搅拌雷诺准数相等	10 ⁻¹	10 ⁻⁴	10 ⁻²	10 ⁻¹	1	10 ⁻³	10 ⁻²
剪切力与泵流量比相等	10 ⁸	10 ⁵	10	10 ²	10 ³	1	10
单位体积泵流量相等	10 ⁵	10 ²	1	10	10 ²	10 ⁻¹	1

P =搅拌功率, V =发酵液体积, N =搅拌转速, D =搅拌叶轮直径, Re =搅拌雷诺准数, Q =搅拌泵流量, ND 代表剪切作用



等功率放大后不同规模发酵罐参数的比例因子

V_t (m^3)	D_t	A_c	D_i	N	n_{tip}	Q	Q/V	H
	$V_t^{1/3}$	$V_t^{2/3}$	$V_t^{1/3}$	$V_t^{-2/9}$	$V_t^{1/9}$	$V_t^{7/9}$	$V_t^{-2/9}$	$V_t^{2/9}$
2	1.26	1.59	1.26	0.86	1.08	1.72	0.86	1.17
20	2.71	7.38	2.71	0.52	1.39	10.31	0.52	1.95
200	5.85	34.26	5.85	0.31	1.80	61.81	0.31	3.26

V_t : 发酵罐容积

D_t : 发酵罐内径

A_c : 发酵罐表面积

D_i : 搅拌叶轮直径

N : 搅拌转速

v_{tip} : 搅拌叶尖端线速度

Q : 搅拌泵流量

Q/V : 比泵流量

H : 发酵罐高度

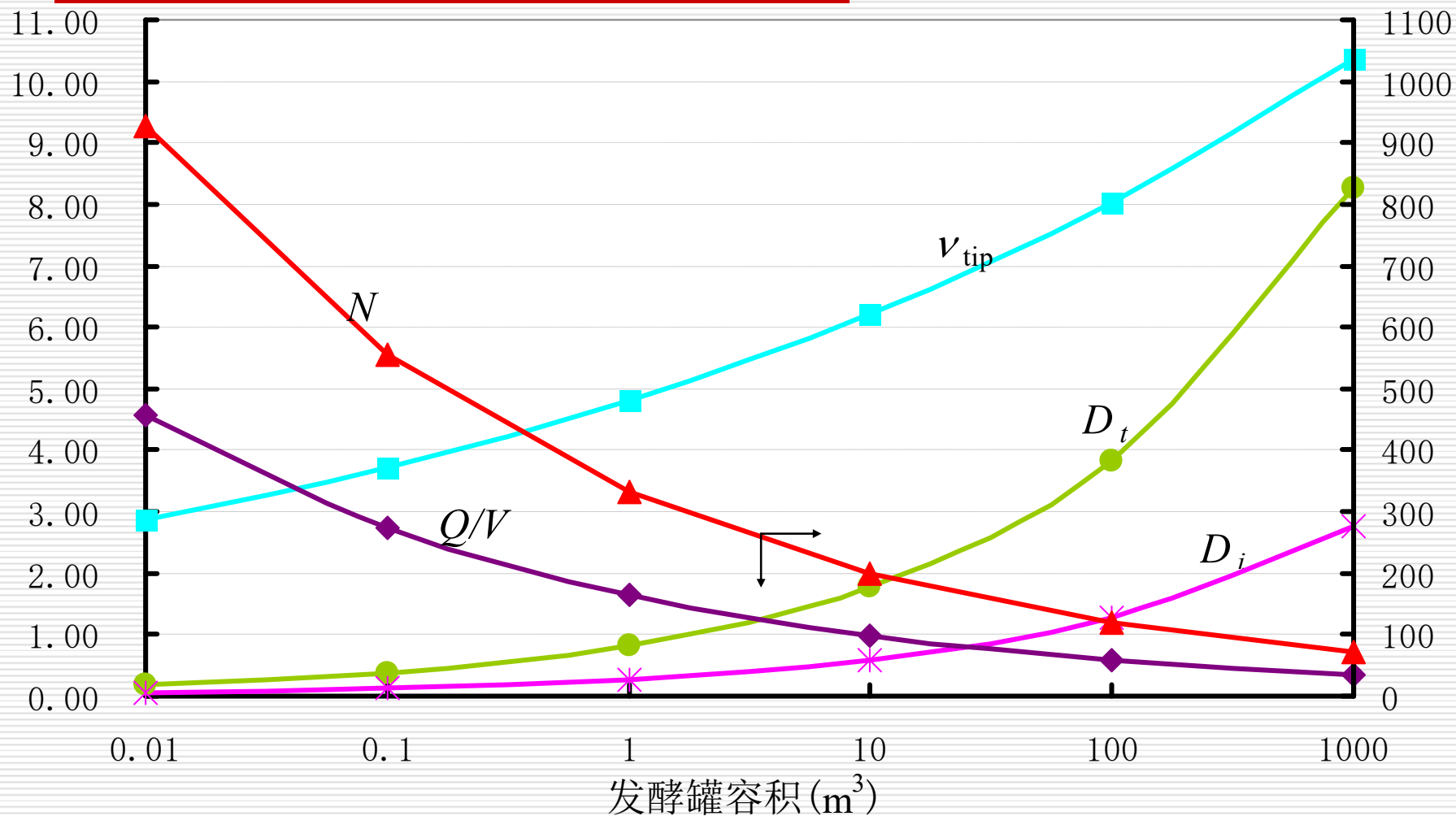


等功率放大后不同规模发酵罐的转速与配管一览表

罐容积 m ³	罐内径 m	液层深度 m	搅拌转速 r/min	压缩空气 mm	物料 mm	蒸汽 mm	冷却水 mm	排气 mm
0.01	0.19	0.35	900	6	10	6	10	6
0.05	0.33	0.59	630	10	15	10	15	10
0.25	0.56	1.01	440	15	25	15	20	20
0.5	0.71	1.27	380	20	32	20	25	25
2	1.12	2.02	280	32	50	40	40	40
5	1.52	2.74	230	50	65	50	50	65
15	2.20	3.96	180	65	80	65	80	80
30	2.77	4.98	155	80	100	80	100	100
60	3.49	6.28	130	100	125	100	125	150
120	4.39	7.91	115	125	150	125	150	200
200	5.21	9.38	100	150	200	150	200	250
300	5.96	10.74	92	200	200	150	200	300
500	7.07	12.73	82	250	250	200	250	350



等功率放大对各项参数的影响



等功率放大对混合时间的影响

- 按单位发酵液体积吸收功率相等原则进行放大后，大罐的混合效果下降，混合时间延长。其表达式如下：

$$t_m \propto D_t^{2/3} \propto V_t^{2/9}$$



等功率放大过程的氧传递系数和混合时间

Scale	Oxygen Transfer (mmoles/L.h)	Mixing Time (s)
Bench	~400	~1
Pilot	~200	~30
Commercial	~100	~100



非几何相似情况下的功率放大

- 如果大罐与小罐非几何相似，则按以上单位发酵液体积消耗的功率相等原则计算得到的搅拌功率，应乘以以下校正系数：

$$f_c = \sqrt{\frac{D_{2t} H_{2L}}{D_{2i} D_{2i}} \frac{D_{1t} H_{1L}}{D_{1i} D_{1i}}}$$

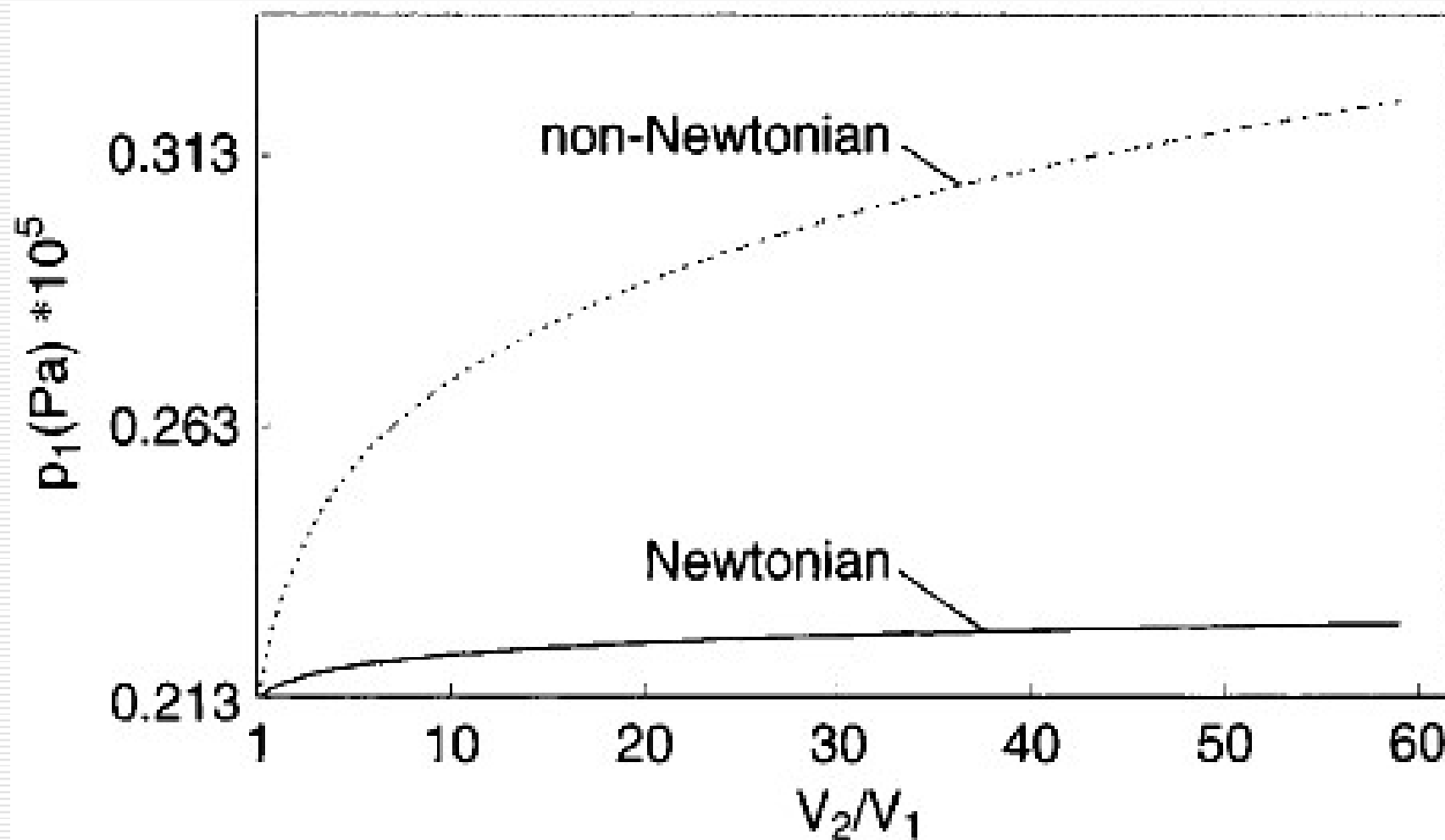
式中： H_L 为发酵液层深度

- 由此得：

$$P_2 = f_c \frac{V_2 P_1}{V_1}$$



不同放大比和不同类型培养液维持相同氧消耗速率所需要的氧分压



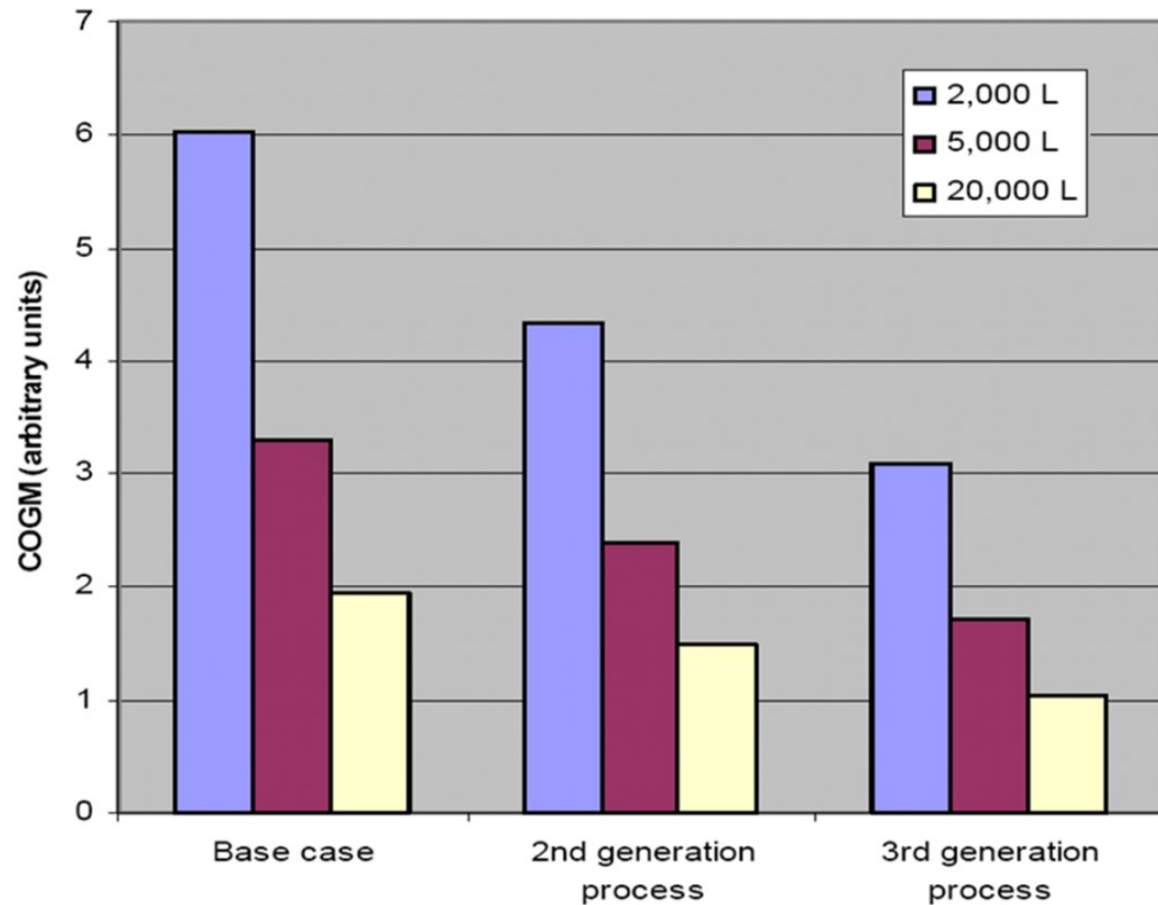
一些过程放大的经济性 $Cost_2 = Cost_1 \left(\frac{Capacity_2}{Capacity_1} \right)^R$

Equipment	Size Range	R
Fermenter	0.2~0.9 m ³	0.18
	0.9~14 m ³	0.34
	14~200 m ³	0.70
Autoclave	3.8~18.5 m ³	0.37
Freeze Dryer	15~450 L	0.41
Homogenizer	0.04~7 m ³ /h	0.5
Ultrafiltration	20~800 m ²	0.86
Ion-exchange	5~200 ft ³	0.73~0.94
Electrodialyzer	8~640	0.37

R 值越小，放大的经济性越好。当 $R > 0.75$ 时，则放大的经济性不佳。



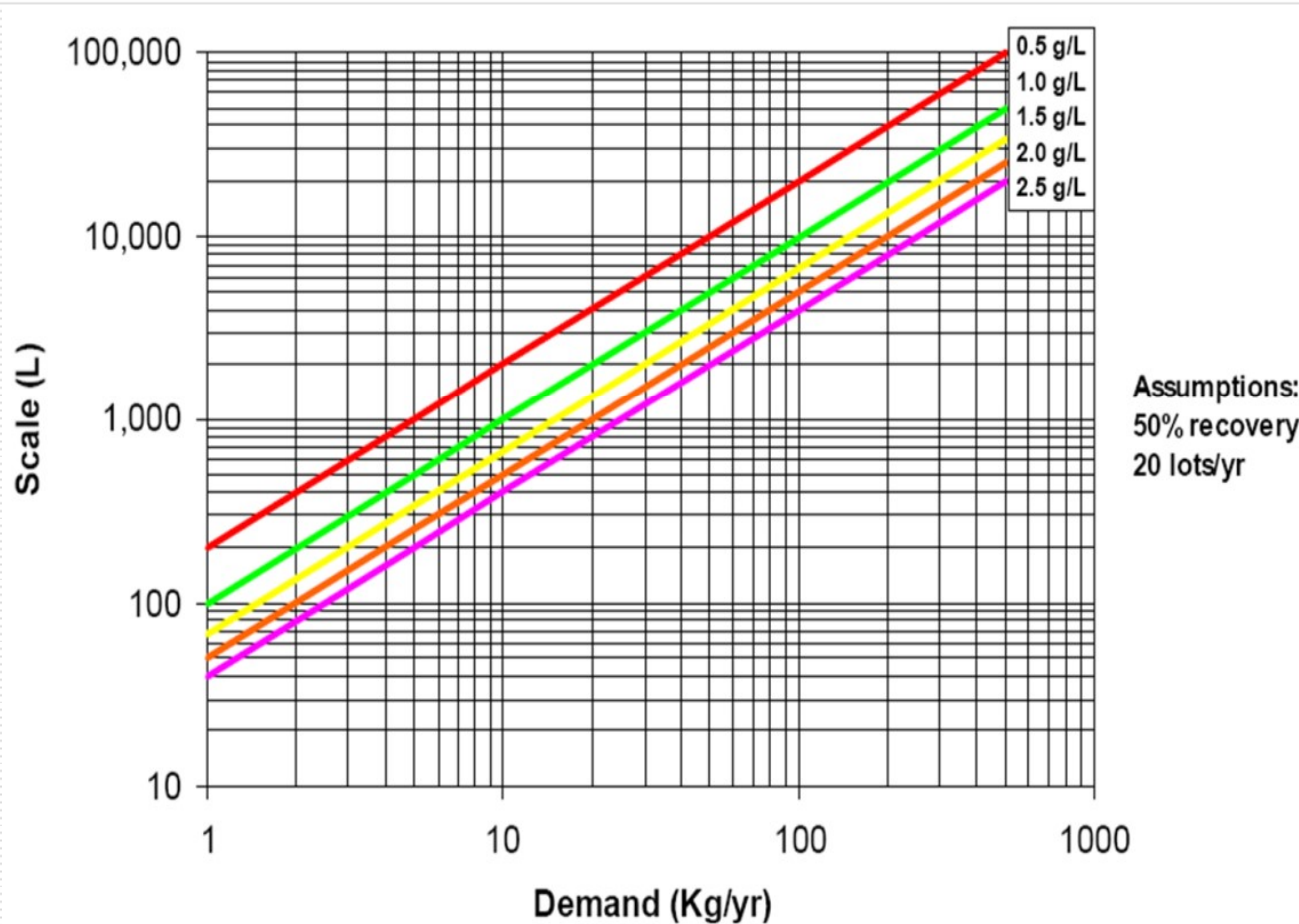
发酵罐规模对生产成本的影响



COGM=Costs of Goods Manufactured



产品需求量及发酵单位与发酵罐规模的选择



放大失败的原因及对策

- ❑ 大、小发酵罐通气量及搅拌转速(功率)不匹配——调整使之相匹配。
- ❑ 通气量及压缩空气含水量不同造成蒸发量差异——调整使之相同。
- ❑ 大罐的剪切作用强，生产菌种对剪切作用敏感——限制放大倍数或改变搅拌叶形式。
- ❑ 大罐的混合效果较差，溶氧分布不均匀，造成部分区域缺氧——限制放大倍数，使用轴流搅拌。
- ❑ 大罐实罐灭菌加热、冷却时间过长，灭菌后的培养基颜色加深，营养破坏加重——改用连续灭菌。



一体化超高温超节能连续灭菌设备

特点：

- 过热水空消、物料灭菌、顶水灭菌、无菌水无菌保压一体化
- 140~142°C/40s超高温瞬间灭菌
- 相对于灭菌物料3%的超低蒸汽消耗和超低冷凝水量
- 进料温度20 °C，灭菌物料出口40°C，无须冷却水冷却
- 热敏营养物质破坏率5%以下
- 0.05~120吨/小时多种规格可选
- 具有自主知识产权



不通气下的搅拌功率计算

- 单只涡轮搅拌器不通气下的搅拌功率：

$$P_{1,0} = N_p \rho N^3 D_i^5$$

- 多只涡轮搅拌器不通气下的搅拌功率：

$$P_{m,0} = P_{1,0} (0.4 + 0.6m)$$

式中： P_0 ——不通气下的搅拌功率，kW

N_p ——功率准数，与雷诺准数相关的参数

ρ ——被搅拌液体的密度，t/m³

N ——搅拌转速，r/s

D_i ——搅拌叶轮直径，m

m ——搅拌涡轮只数



通气下的搅拌功率计算

□ Michel经验式:

$$P_g = C \left(\frac{P_0^2 N D_i^3}{Q_g^{0.56}} \right)^{0.45}$$

□ 福田秀雄修正式:

$$P_g = 0.00225 \left(\frac{P_0^2 N D_i^3}{Q_g^{0.08}} \right)^{0.39}$$

式中: P_g ——通气下的搅拌功率, kW

Q_g ——通气量, m^3/s

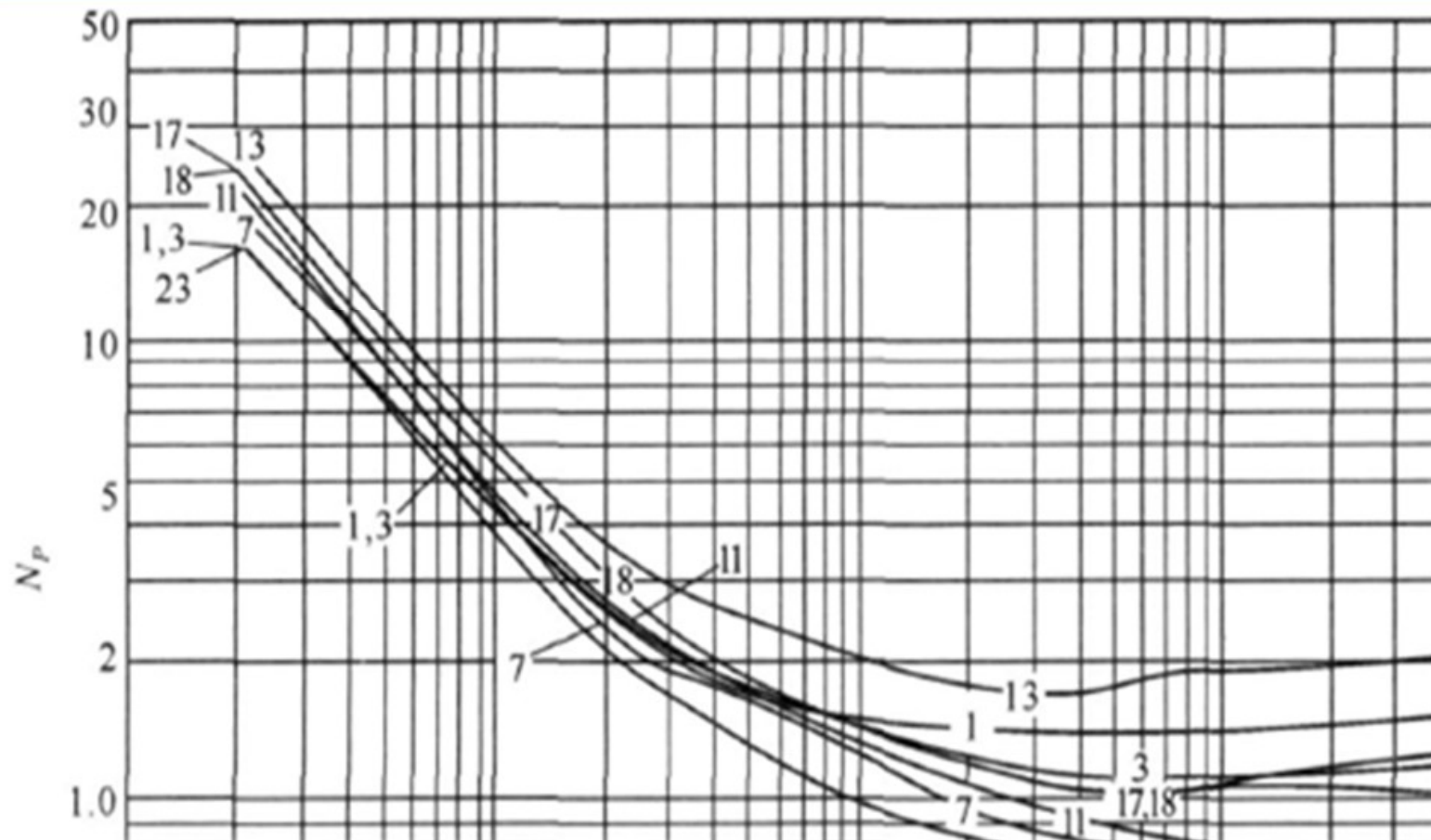
C ——经验系数, 当 $D_i/D_t=1/3$ 时, $C=0.157$

$D_i/D_t=1/2$ 时, $C=0.101$



不同搅拌器的功率准数（一）

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26



不同搅拌器的功率准数 (二)

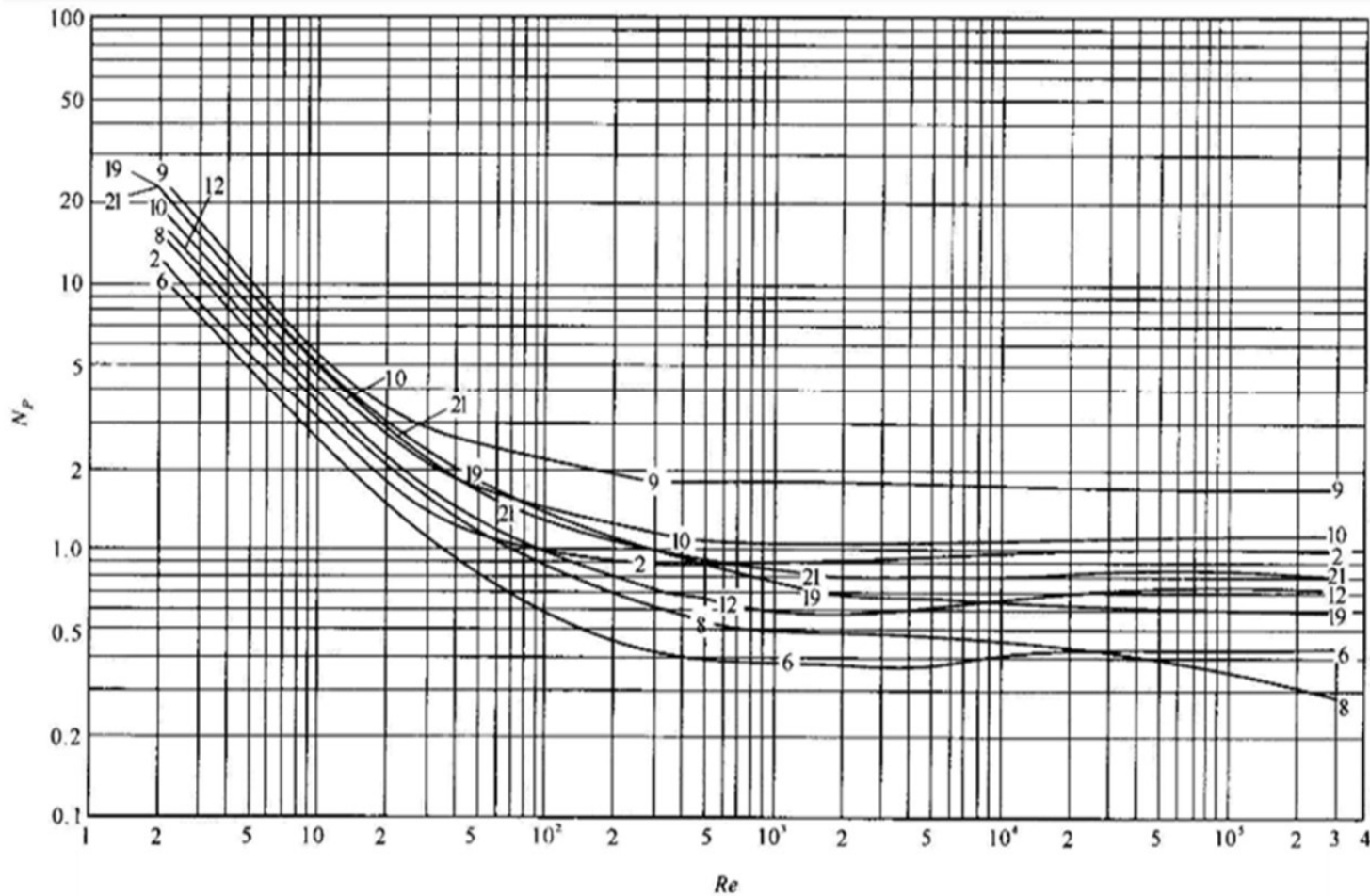


图3 功率准数曲线图(搅拌器编号为2,6,8,9,10,12,19,21)



不同搅拌器的功率准数（三）

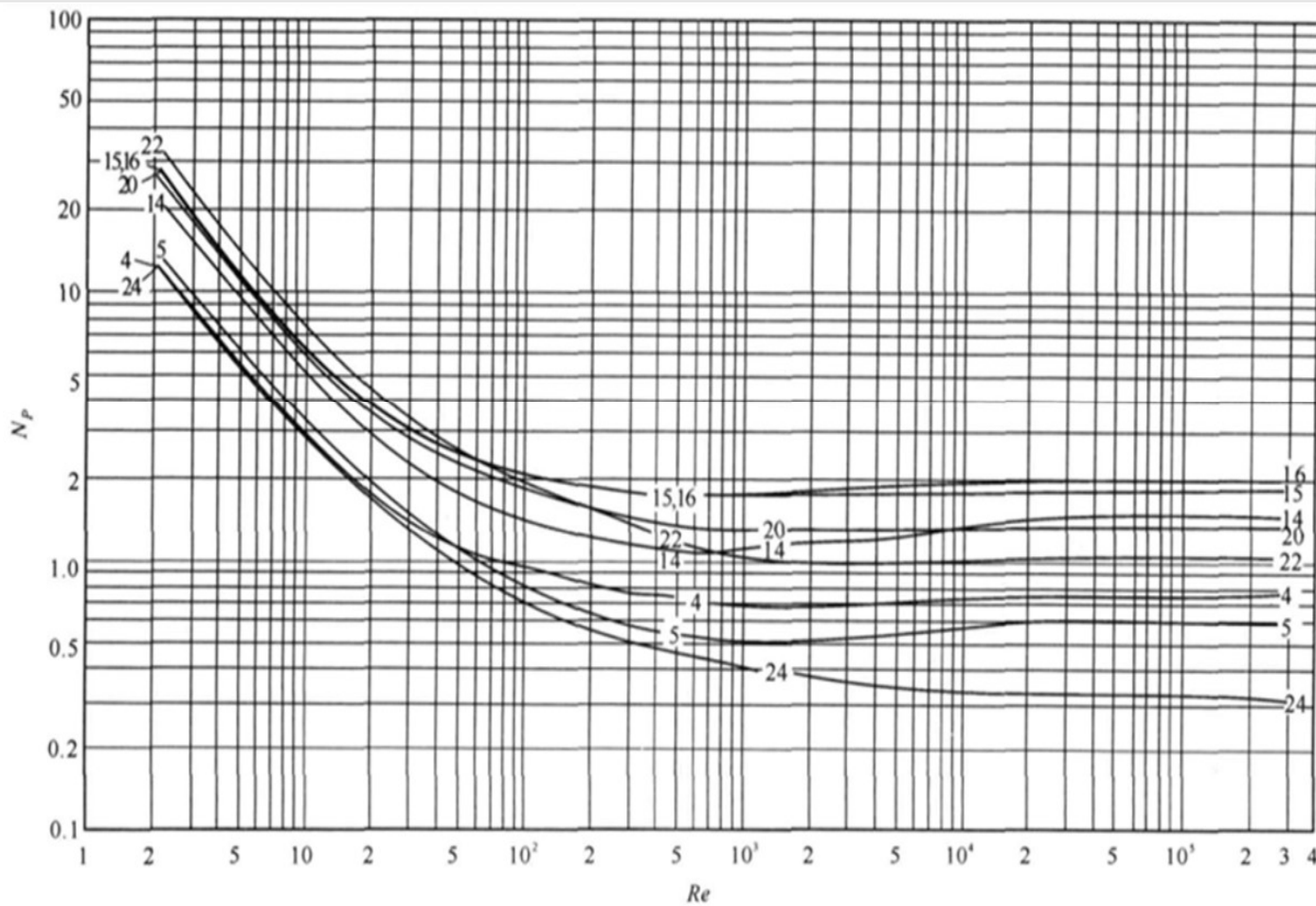


图4 功率准数曲线图(搅拌器编号为4,5,14,15,16,20,22,24)



称 搅 拌 器 编 号 、 名 称 及 结 构 参 数

编号	名称	D/B	b/D	C/B	h/B	L/D	H/B	n_1	S/D	θ	α	σ_1/R	σ_2/R	ϵ	功率曲线位置	备注
1	二叶平桨	0.4	0.164	0.35				1 2							图 2	
2	二叶平桨	0.6	0.109	0.35				1 2							图 3	
3	二叶有孔平桨	0.4	0.164	0.35				1 2			0.47	0.81	7.5%		图 2	
4	二叶有孔平桨	0.6	0.109	0.35				1 2			0.36	0.87	8.7%		图 4	
5	二叶折桨	0.4	0.164	0.35				1 2		45°					图 4	转动方向为下压 物料, b 为斜向尺寸
6	二叶折桨	0.6	0.109	0.35				1 2		45°					图 3	转动方向为下压 物料, b 为斜向尺寸
7	二叶管形桨	0.4	0.164	0.35				1 2							图 2	
8	二叶管形桨	0.6	0.109	0.35				1 2							图 3	
9	四叶有孔平桨	0.4	0.138	0.35				1 4			0.5	0.8	6.1%		图 3	
10	四叶有孔平桨	0.6	0.092	0.35				1 4			0.41	0.86	8.1%		图 3	
11	四叶折桨	0.4	0.138	0.35				1 4		45°					图 2	转动方向为下压 物料, b 为斜向尺寸
12	四叶折桨	0.6	0.092	0.35				1 4		45°					图 3	转动方向为下压 物料, b 为斜向尺寸
13	六直叶圆盘涡轮	0.4	0.108	0.35		0.25		1 6							图 2	
14	六直叶圆盘涡轮	0.6	0.072	0.35		0.25		1 6							图 4	
15	六叶半管圆盘涡轮 (I)	0.4	0.108	0.35		0.25		1 6							图 4	半管凸面迎着流体
16	六叶半管圆盘涡轮 (II)	0.4	0.108	0.35		0.25		1 6							图 4	半管凹面迎着流体
17	六叶半管圆盘涡轮 (I)	0.6	0.072	0.35		0.25		1 6							图 2	半管凸面迎着流体
18	六叶半管圆盘涡轮 (II)	0.6	0.072	0.35		0.25		1 6							图 2	半管凹面迎着流体
19	推进式	0.5		0.35				1 3	1						图 3	
20	二层有孔平桨	0.4	0.103	0.3	0.6			1.2 2			90°	0.4	0.83	8.5%	图 4	
21	二层有孔平桨	0.6	0.069	0.3	0.6			1.2 2			90°	0.37	0.89	9.4%	图 3	
22	二层四叶折桨	0.5	0.083	0.3	0.6			1.2 4		45°					图 4	转动方向为下压 物料, b 为斜向尺寸
23	二叶弧面桨	0.4	0.116	0.35				1 2							图 2	
24	二叶弧面桨	0.6	0.078	0.35				1 2							图 4	

引自：陈志希等，24种搅拌器的功率曲线，化学工程，38(3)，38-43，2010。

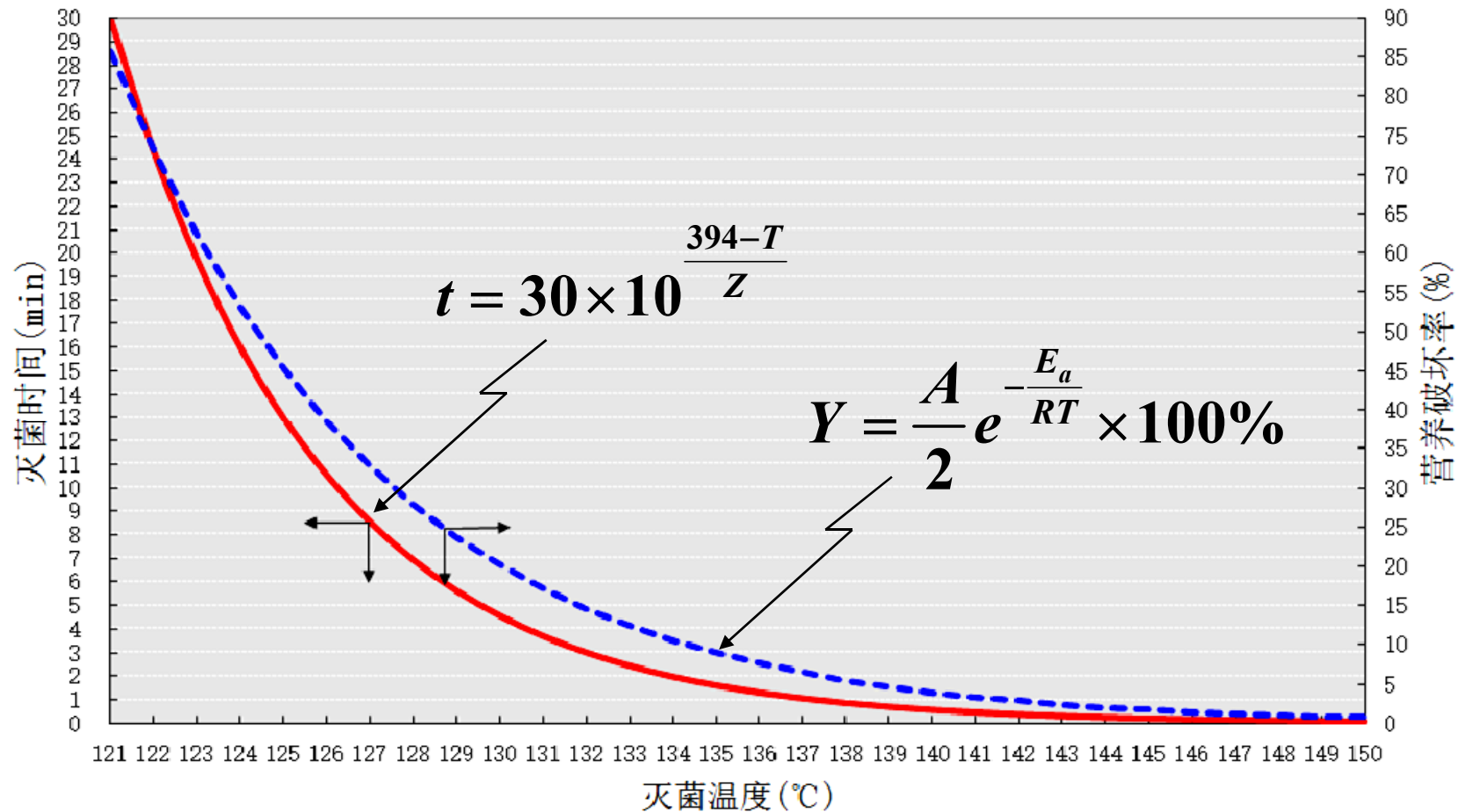


灭菌与发酵过程的放大

- ❑ 灭菌是造成发酵过程放大失败的一个重要因素。
- ❑ 摇瓶和小实验发酵罐通常灭菌过程比较温和，造成营养物质的损失比较少。
- ❑ 大发酵罐如果是实罐灭菌，因升温 and 冷却时间长，营养物质处于高温的时间显著延长，破坏严重。
- ❑ 传统的连续灭菌采用维持罐进行保温维持，因维持时间分布广，高温维持时间长，同样造成营养物质的严重破坏。
- ❑ 解决灭菌引起的放大失败问题，必须采用维持时间精度高的现代超高温瞬间连续灭菌技术。



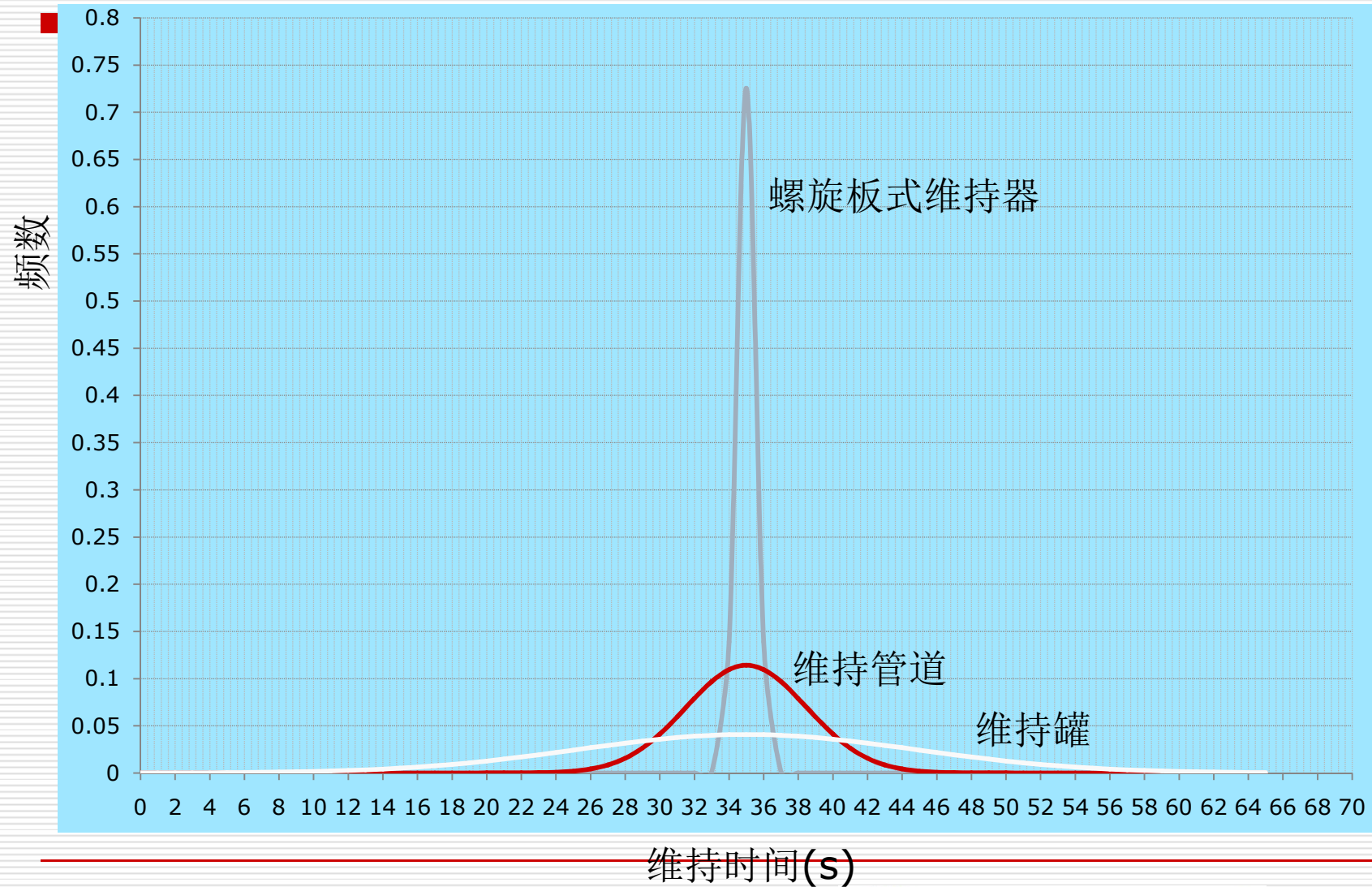
等效灭菌温度-时间与营养物质的破坏



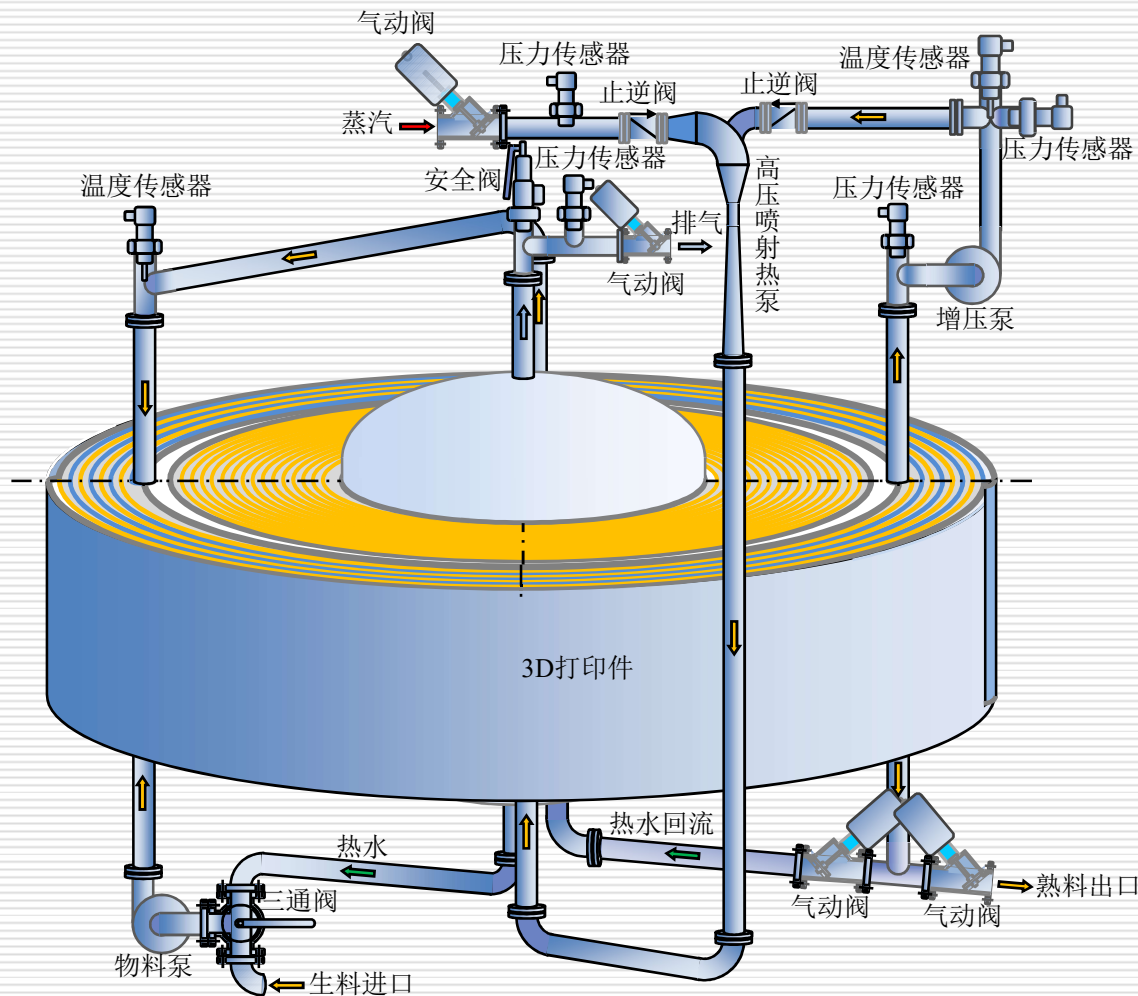
- 注：微生物以嗜热脂肪芽胞杆菌为代表($Z=11$)，营养素以维生素 B_1 为代表($E_a=92.11$)；公式中 T 的单位为 K 。



各种维持设备维持时间分布的比较



实验室微型培养基连续灭菌器

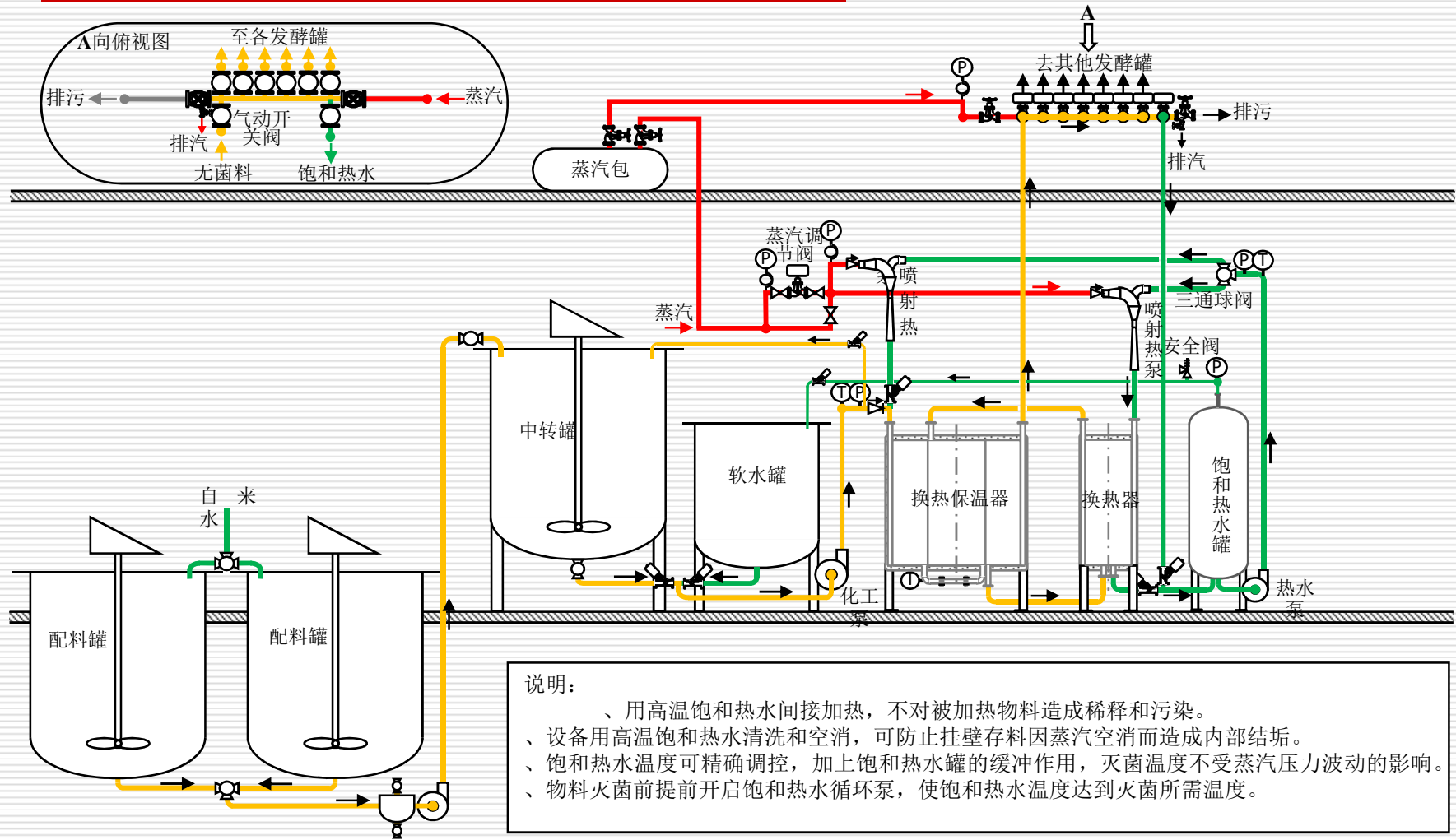


注：

1. 主机件用3D打印方式制作。
2. 设备使用前采用超高温饱和热水循环空消。
3. 培养基灭菌后用超高温饱和热水顶洗。
4. 顶洗后用超高温饱和热水对设备进行无菌保温保压。
5. 2、3、4步骤的目的都是为了防止培养基在设备内结垢堵塞通道。
6. 额定灭菌流量为1~50 L/min，灭菌工艺参数为140°C/40s(温度可调)。
7. 灭菌后可确保培养基不变色，几乎没有营养物质破坏。



中试及生产规模超高温瞬间连续灭菌系统



超高温瞬间连续灭菌系统系列产品

序号	型号规格 (t/h)	处理能力 (m ³ /h)	适用发酵罐 (m ³)	内部容积(L)				外形尺寸(Φ×高)		重量(kg)		换热负荷 (kW)
				水通道	维持通道	换热通道	合计	维持	换热	维持	换热	
1	HETI-0.05	0.03~0.05	0.01~0.2	1.4	0.74	0.4	2.5	630×370		50		6~7
2	HETI-0.25	0.18~0.25	0.2~0.5	4.8	3.34	2.2	10.3	780×420		100		32
3	HETI-1	0.75~1.0	1.0~2.0	8.3	13.0	10.6	31.8	920×510		260		130
4	HETI-3	2.2~3.0	2~5	21.7	38.6	42.5	103	1090×660		650		390
5	HETI-5	3.7~5.0	5~15	27.3	64.1	80.5	172	1170×760		940		642
6	HETI-10	7.5~10.0	15~25	56.1	128	197	380	1330×970		1630		1280
7	HETI-20	15~20	25~50	92.3	255	588	935	1730×1110		3340		2570
8	HETI-30	23~30	50~75	119	382	945	1445	2010×1260		4850		3850
9	HETI-50	38~50	75~100	237	620	2063	2920	2270×1580		7680		6420
10	HETI-75	57~75	100~200	614	930	7271	8814	2650×1860		13030		9640
11	HETI-100	75~100	200~300	794	1241	10422	12457	2890×2160		17210		12850
12	HETI-125	90~120	300~500	879	1489	13264	15632	1580×2220	2530×2220	3120	19100	15420

- 注：1、序号1~2用于实验室，以三维打印方式制作；3~5用于食品行业和发酵中试；6~12用于发酵生产。
 2、制作材质根据用户要求可使用304、321、316L不锈钢，或2205、2507双相不锈钢。
 3、可根据用户需求提供200t/h及以上的连续灭菌系统，但换热器要分2~3台制作。
 4、外形尺寸和重量为设计估算值，实际制作数据会有一些偏差。



超高温瞬间连续灭菌的优点

- 超高温灭菌穿透力强，显著加快细菌热死速率。
- 高速流动状态下灭菌温度均匀，无灭菌死角。
- 快速升温 and 冷却，被灭菌物料整体受热时间短，从而显著降低营养物质破坏率。
- 易将一些物质分开灭菌，减少美拉德反应的发生。
- 灭菌温度和时间控制精度高，灭菌过程重现性好。
- 灭菌效果不受规模的影响，有利于过程的放大。
- 易于实现灭菌过程的自动化。
- 减少发酵罐非生产占用时间，提高设备利用率。



发酵过程的尾气分析

- 用于尾气分析的常规仪器主要是为红外二氧化碳分析仪和磁导氧分析仪，这两样仪器的共同缺点是水分干扰检测结果，因而尾气进入仪器前要先除湿。另外检测精度不高，响应时间长。
- 尖端仪器有气体质谱仪，可以检测发酵尾气中的任何成分，包括氨和挥发性有机物，提供更多的代谢信息。其响应速度快，检测精度高，受外界干扰小。尽管游离水分仍然干扰检测结果，但水蒸汽不干扰，故采用高温进样检测，还能如实定量尾气中的水分含量。
- 为了确保检测数据可靠及降低检测费用，请不要使用除气体质谱仪以外的任何质谱仪或其他气体分析仪。



除湿对尾气分析结果的影响

- 发酵尾气必然被水饱和甚至过饱和，当发酵温度为 30°C 时，尾气中的水分含量可达4.4%以上，远远超过二氧化碳及其他一些挥发性成分的含量，因此，如果将水分排出，则尾气中其他成分含量的检测结果将产生很大偏差。
- 二氧化碳在水中的溶解度很大，在低温下溶解度更大，其他一些成分如氨及低级挥发性有机物（醇、醛、酸、胺等）也在水中有很大的溶解度，因此，如果降温排水，则这些溶解性成分也同样被排出，使检测结果产生更大的偏差。



尾气分析在发酵过程优化中的应用（一）

- ❑ 判断发酵过程氧的利用率，为优化通气、节约通气成本提供依据。
- ❑ 分析发酵过程细胞的呼吸强度及其变化规律，优化发酵过程的补料。
- ❑ 计算氧的消耗速率、二氧化碳的生成速率和呼吸商，对发酵过程进行深层次的分析。
- ❑ 通过氧的消耗速率或二氧化碳的生成速率估算发酵液中的活细胞浓度和代谢热。
- ❑ 通过呼吸商数据分析发酵过程复合碳-能源各成分的代谢规律。

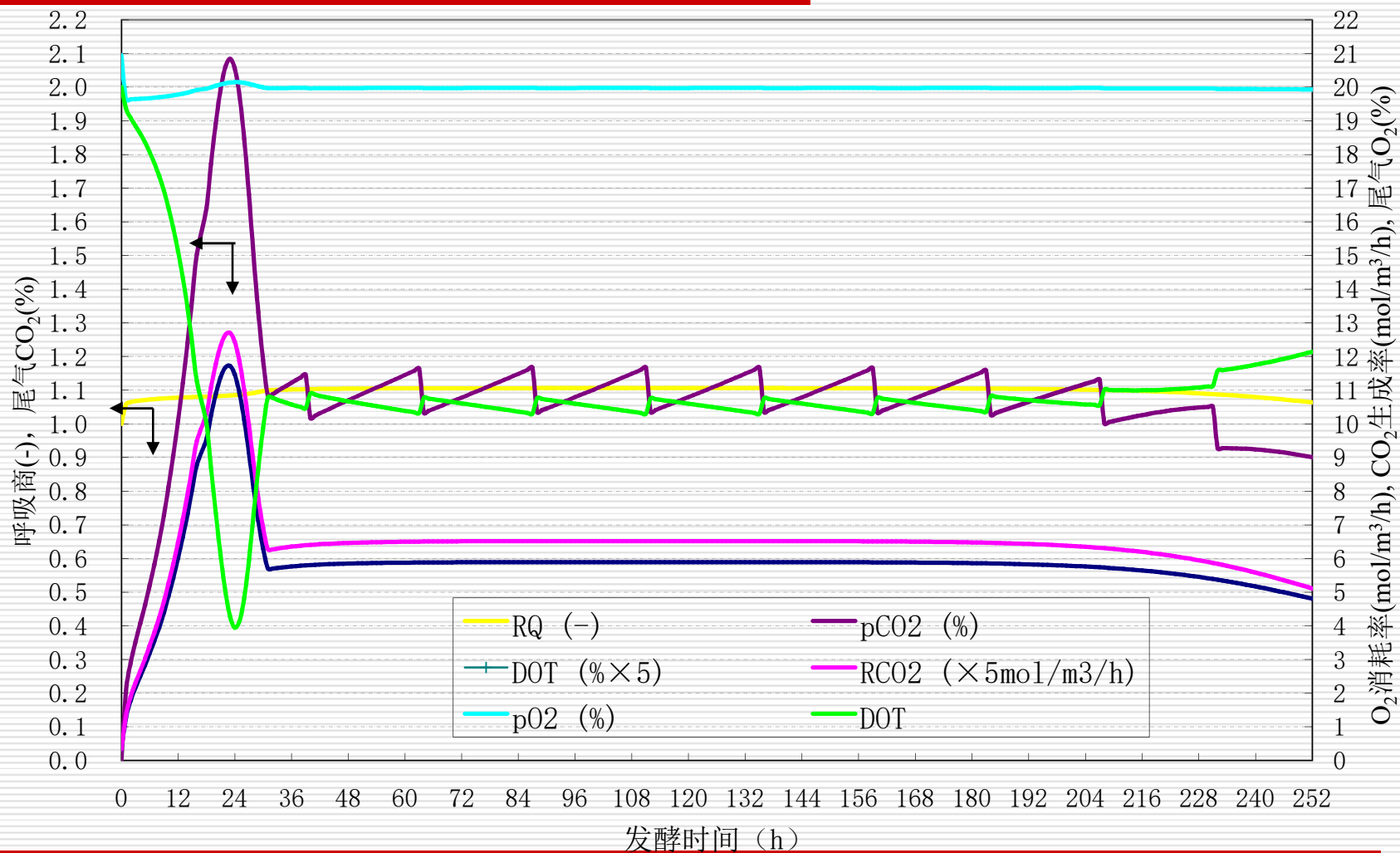


尾气分析在发酵过程优化中的应用（二）

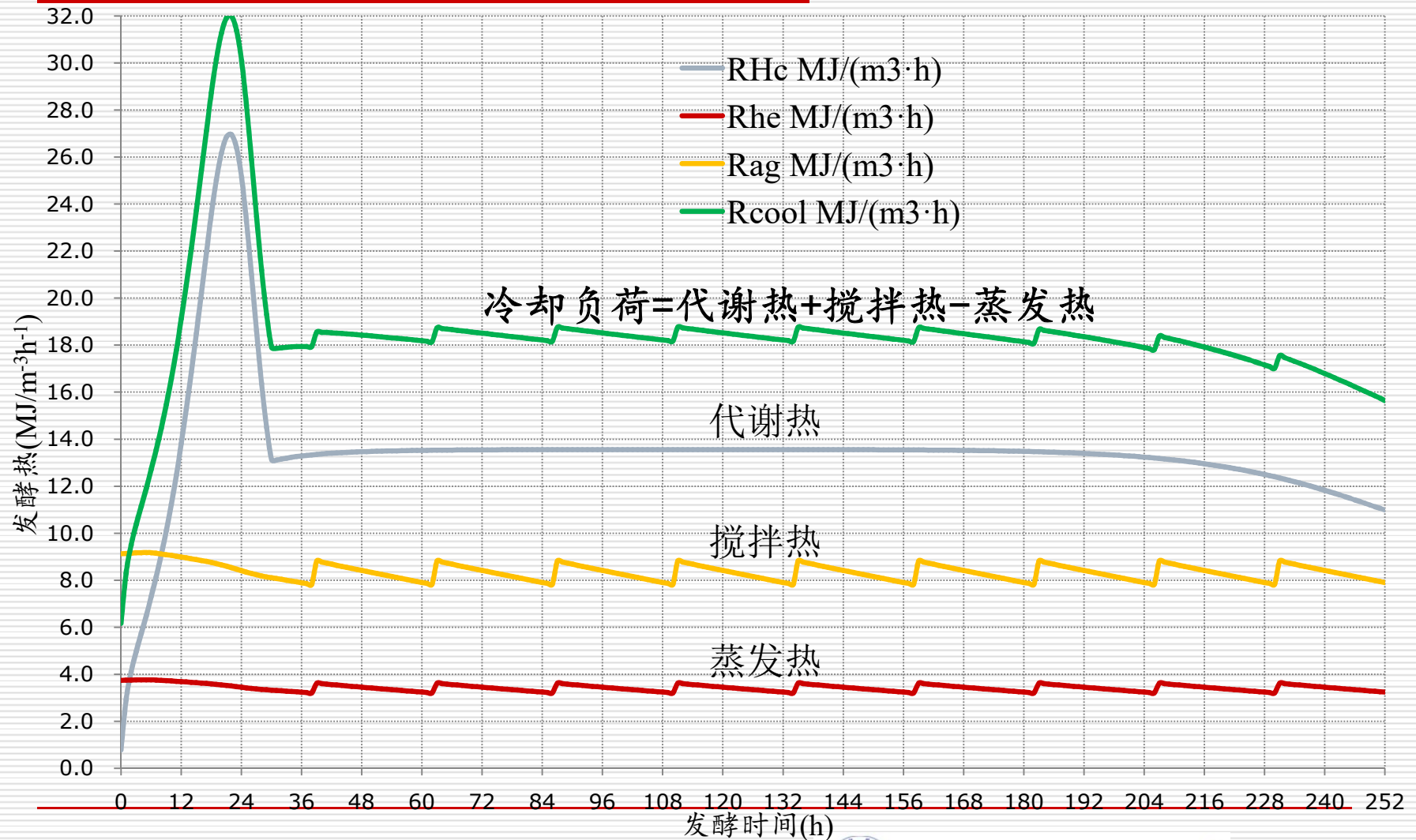
- 通过尾气中水分含量的测量估算发酵过程的水分蒸发率、发酵液体积和蒸发热，作为补料浓度、补料量或补水量的控制依据。
- 通过氧消耗率或二氧化碳生成率的测量与计算，估算代谢热，加上搅拌热和减去蒸发热，作为冷却负荷和冷却面积的计算依据。
- 通过尾气中二氧化碳浓度的测量实施通气的动态梯度控制(发酵前期减少通气量，中期加大通气量)，对整个车间的通气进行统筹优化。



典型的以葡萄糖为碳-能源好氧补料分批发酵 尾气模拟曲线



由氧消耗率计算的发酵热与冷却负荷



实验室安全

□ 电气安全：

- 防漏电，防触电，防短路，防超载，防电气火灾。

□ 危险化学品安全：

- 防中毒，防火灾，防爆炸，防环境污染，防窒息。

□ 生物安全：

- 防泄漏，防身体、衣物和环境污染。

□ 设备安全：

- 防超温、超压，防爆炸，防烫伤，防机械伤害。

□ 实验数据和材料安全：

- 防盗，防外泄。

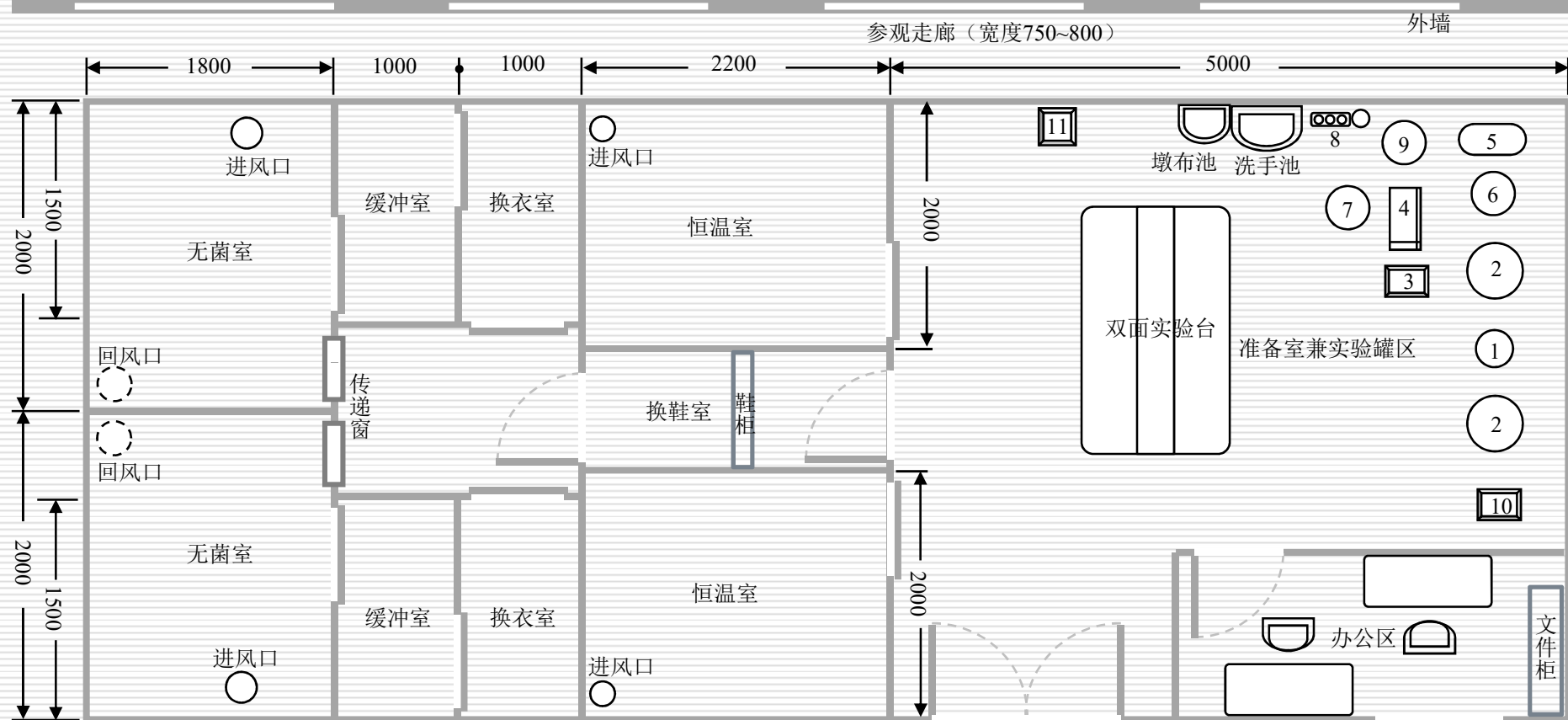


实验室操作人员安全守则

- 经安全培训考核或考试合格后上岗。
- 进实验室必须穿戴防静电工作服，必要时还需佩戴防护帽、防护眼镜、手套和口罩。
- 所有设备必须严格按安全操作规程操作。
- 较大的用电设备和高压、高温设备必须经相关安全人员检查合格并在场的情况下试车。
- 危险化学品必须专人、专库或专柜保管。
- 严禁将易燃、易爆、有毒化学品放入冰箱。
- 使用或产生有毒挥发性化合物的实验必须在通风柜内进行。
- 实验室禁烟、禁酒、禁喧哗和打闹。
- 禁止在实验室（区）用餐及存放食物。
- 办公区与实验区要有分隔。



小型简易发酵实验室设计举例

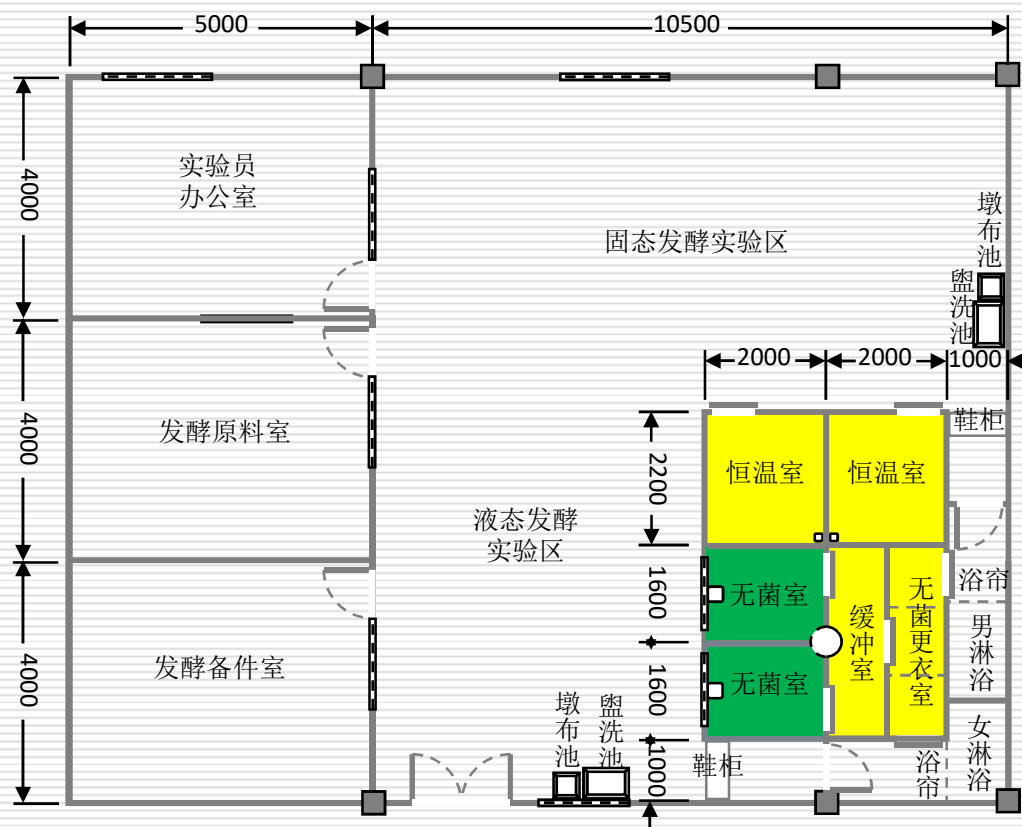


编号设备说明：1、种子罐，2、发酵罐，3、蒸汽发生器，4、连续灭菌器，5、空气压缩机，6、空气净化系统，7、配料罐，8、反渗透净水机，9、软水储罐，10、循环水冷却器，11、灭菌锅。

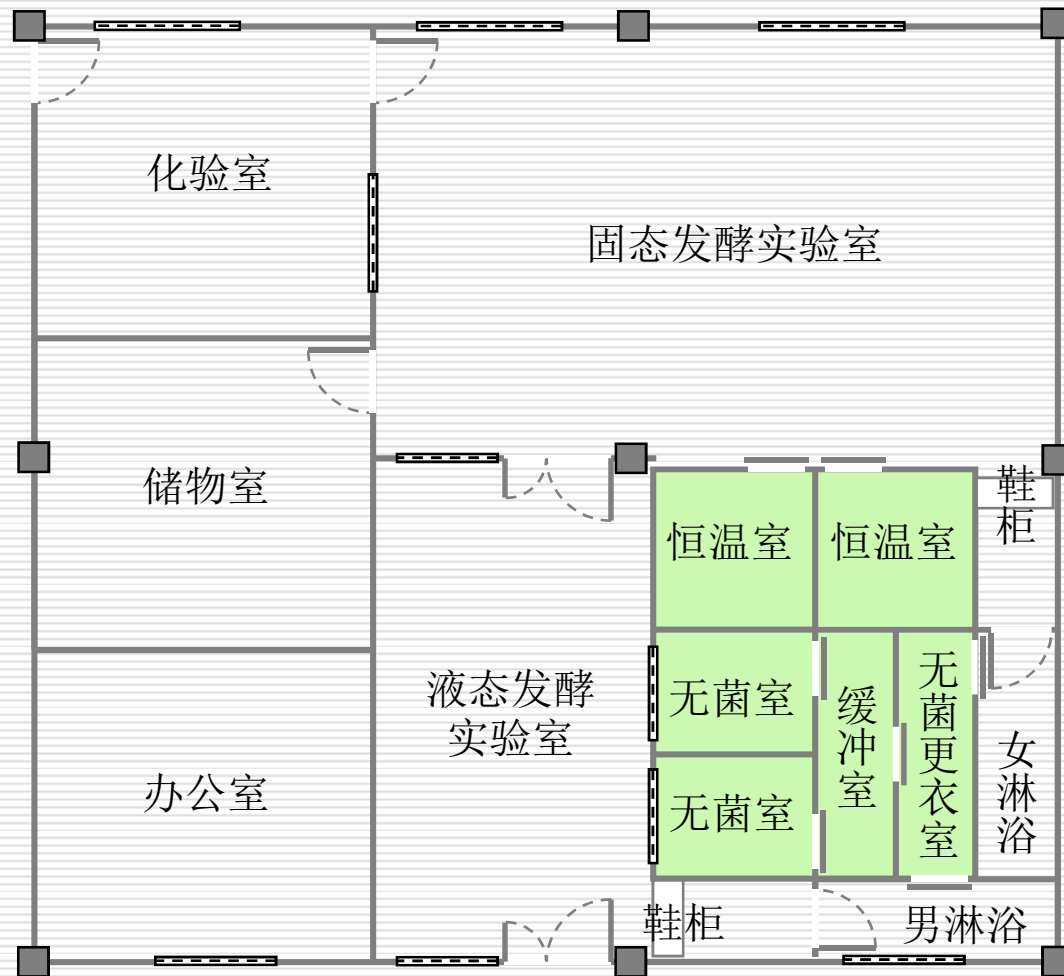


一般发酵实验室设计举例（一）

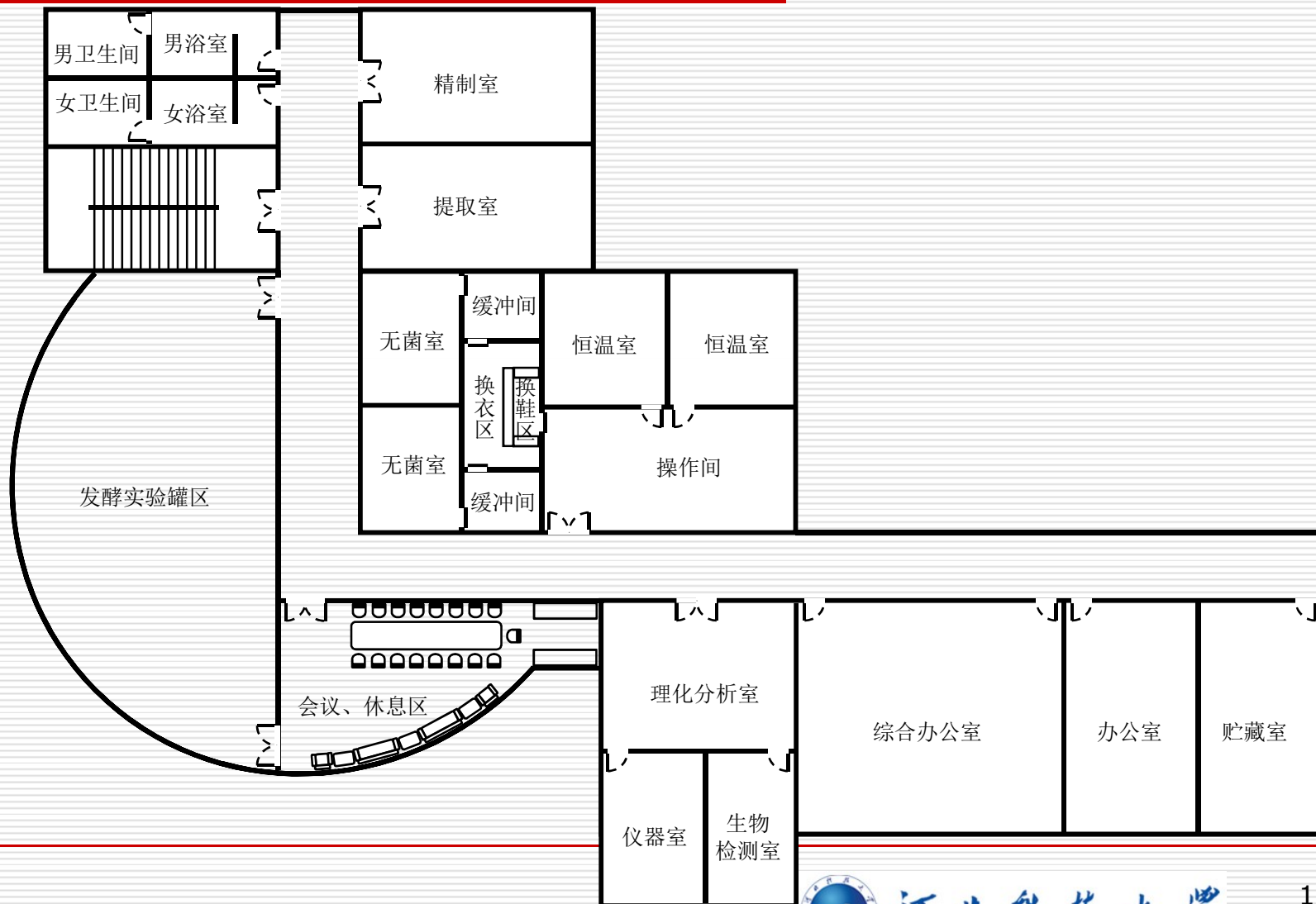
注：绿色区域为C级洁净区，黄色区域为D级洁净区，上方2.0~2.2米高度吊顶，吊顶上放置净化空调机。



一般发酵实验室设计举例（二）

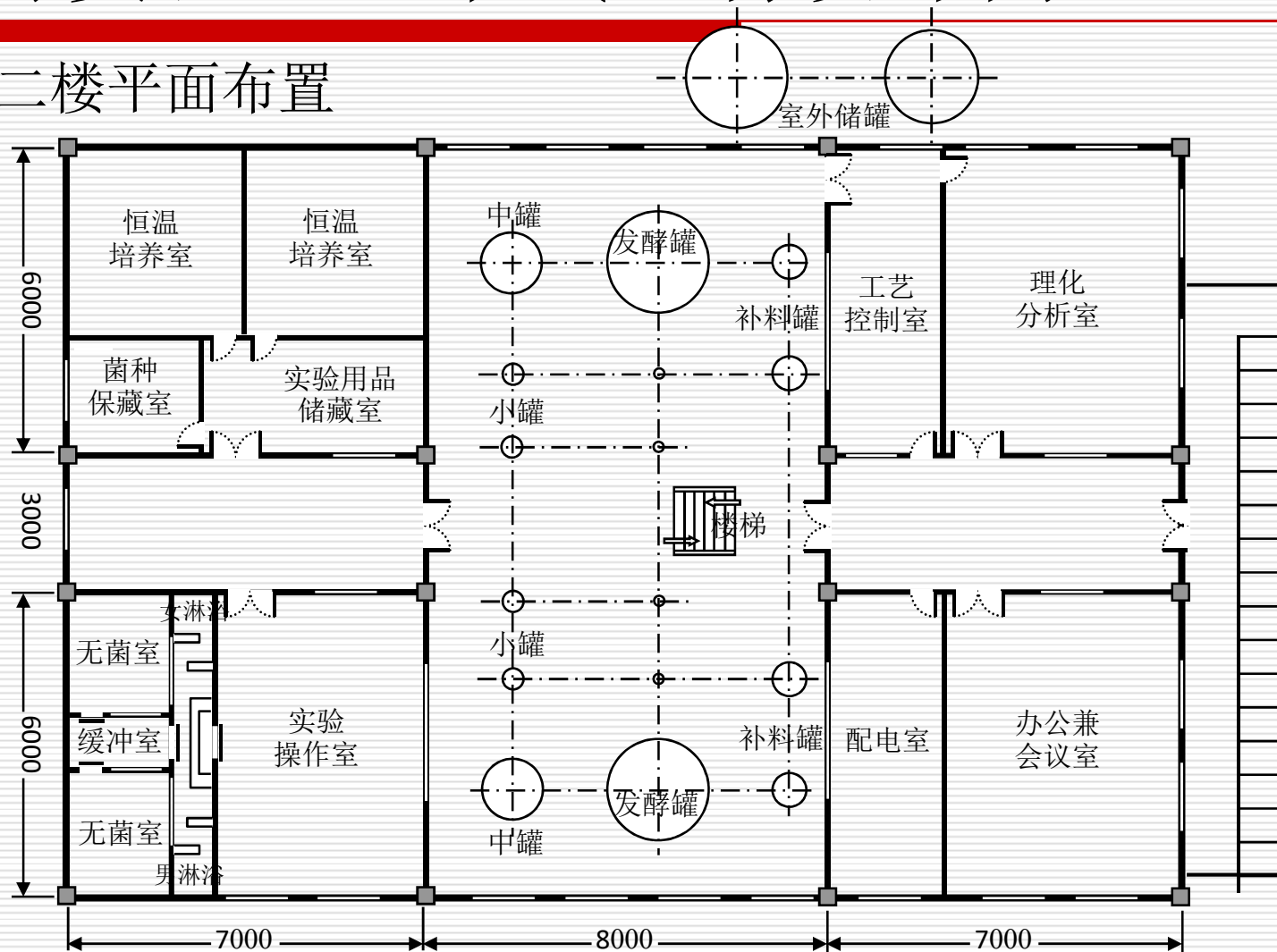


发酵实验室设计举例（含提取）



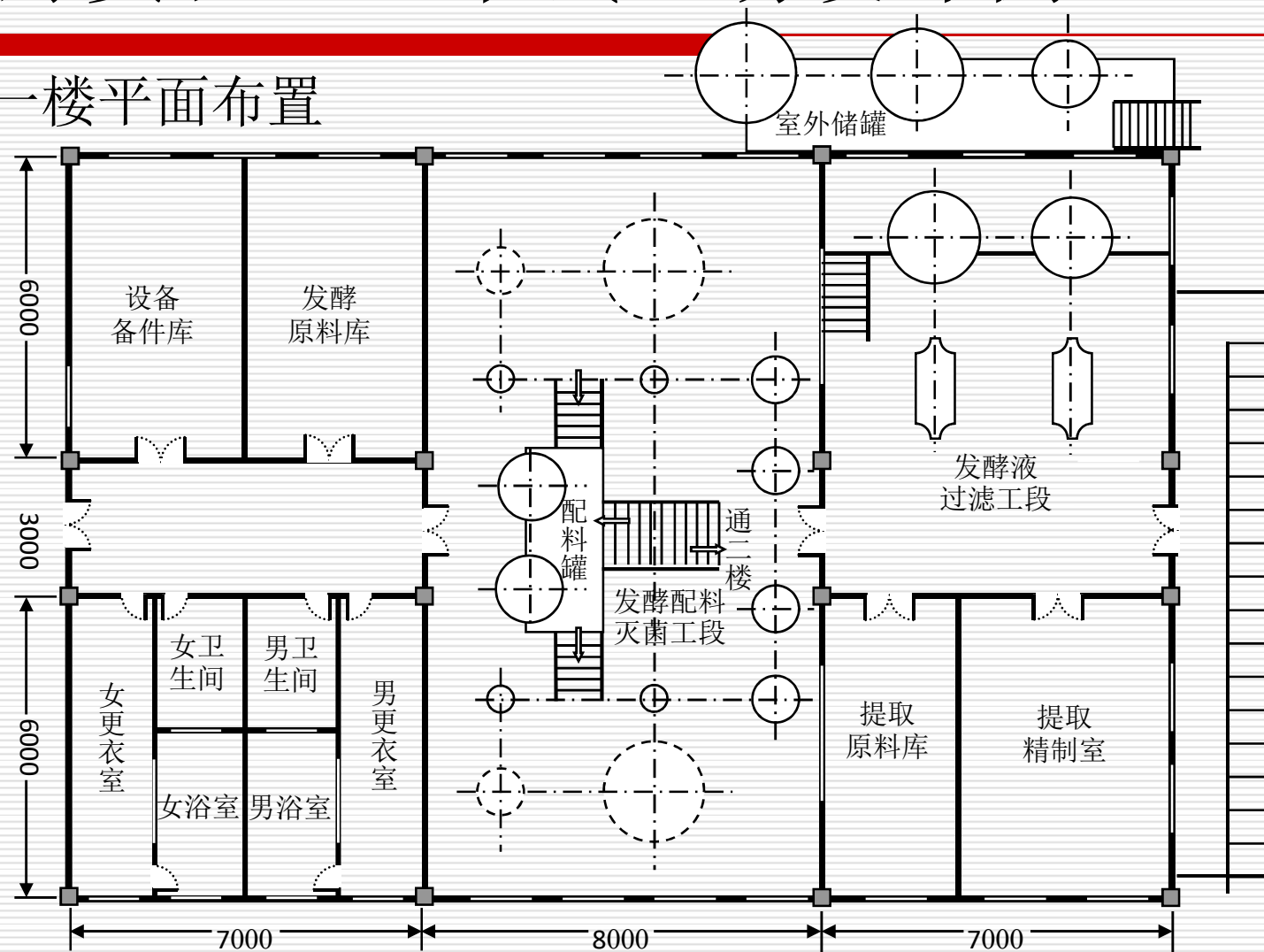
发酵实验室暨中试工场设计例一

二楼平面布置



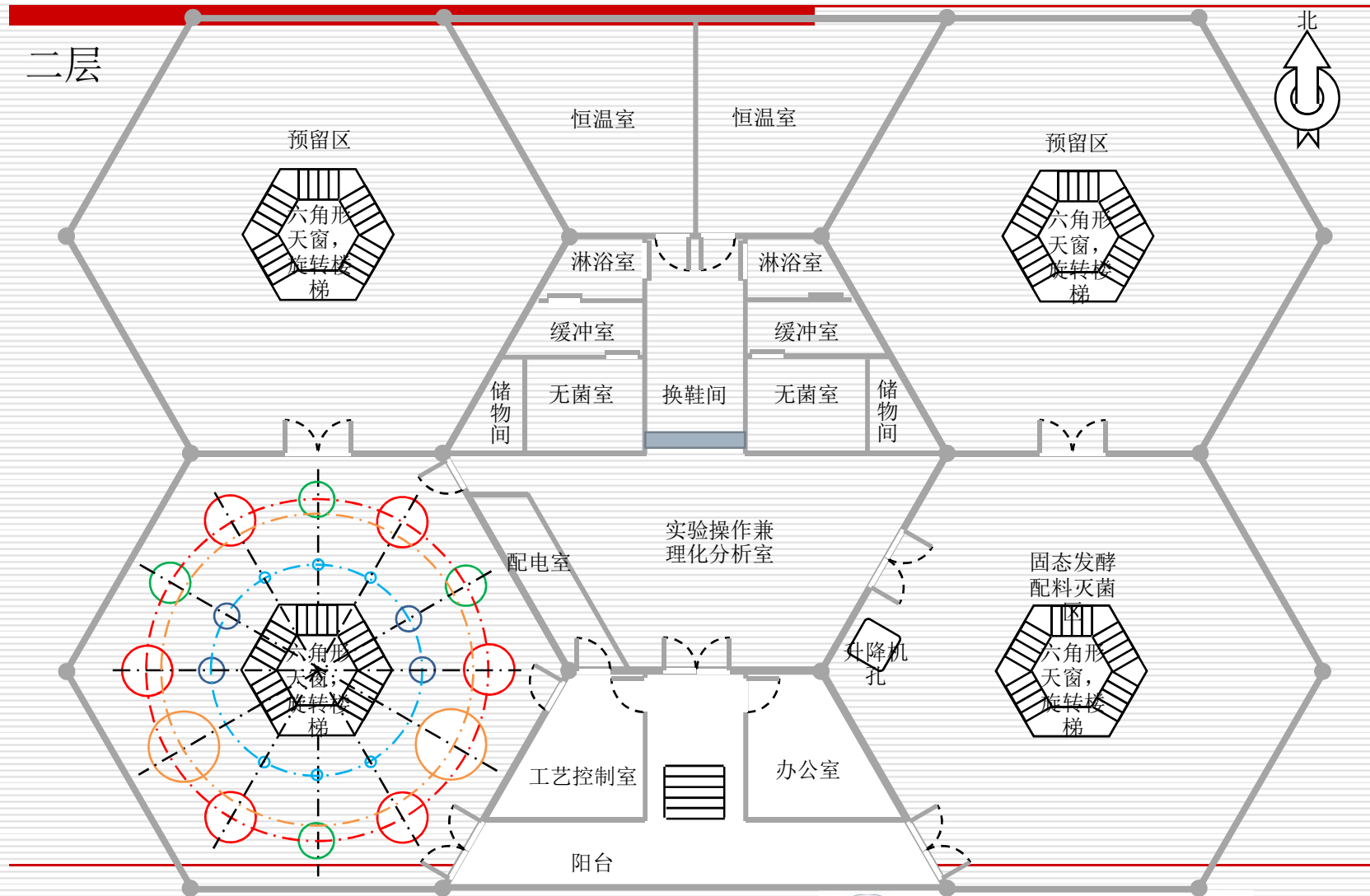
发酵实验室暨中试工场设计例一

一楼平面布置

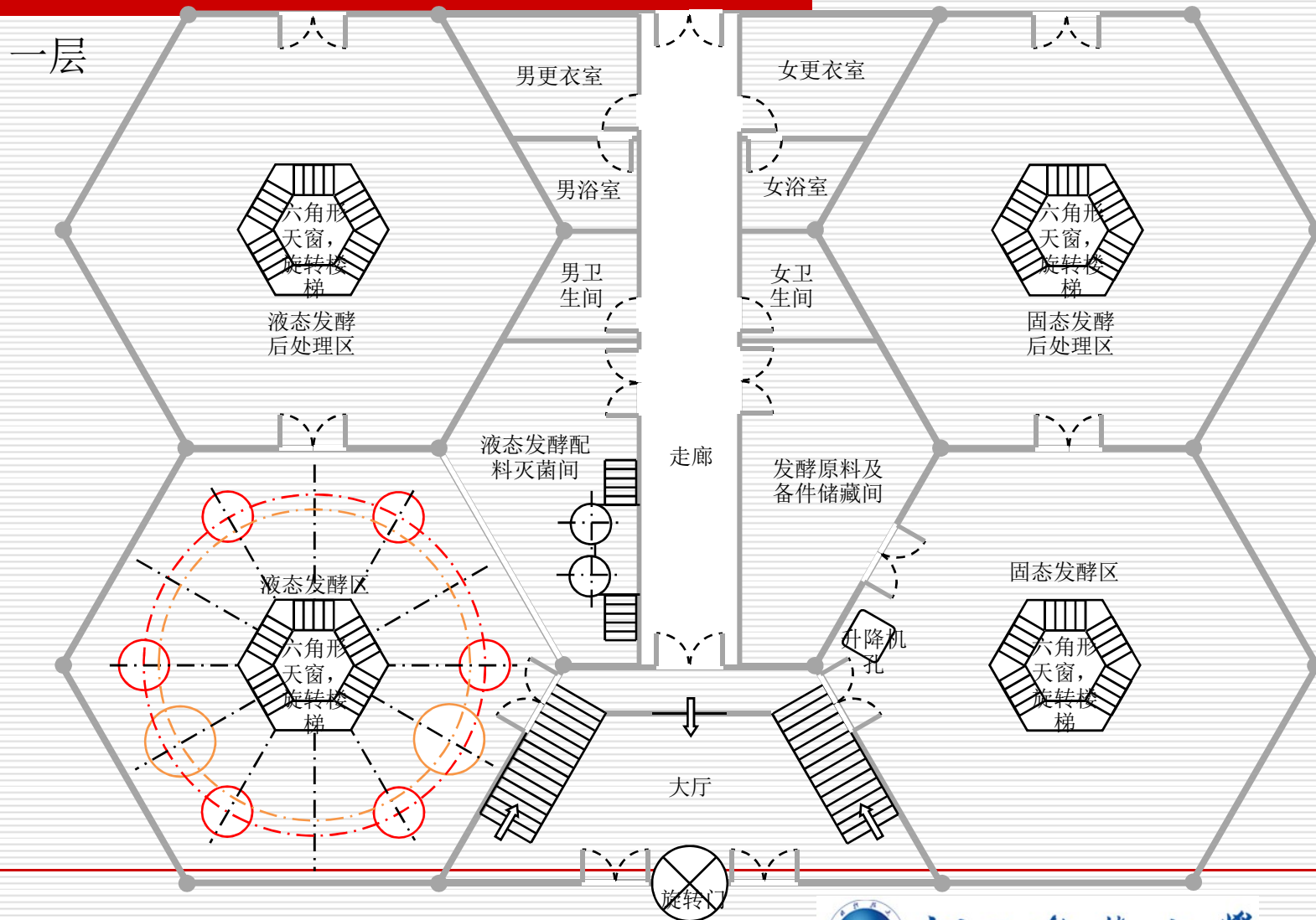


发酵实验室暨中试工场设计例二

二层

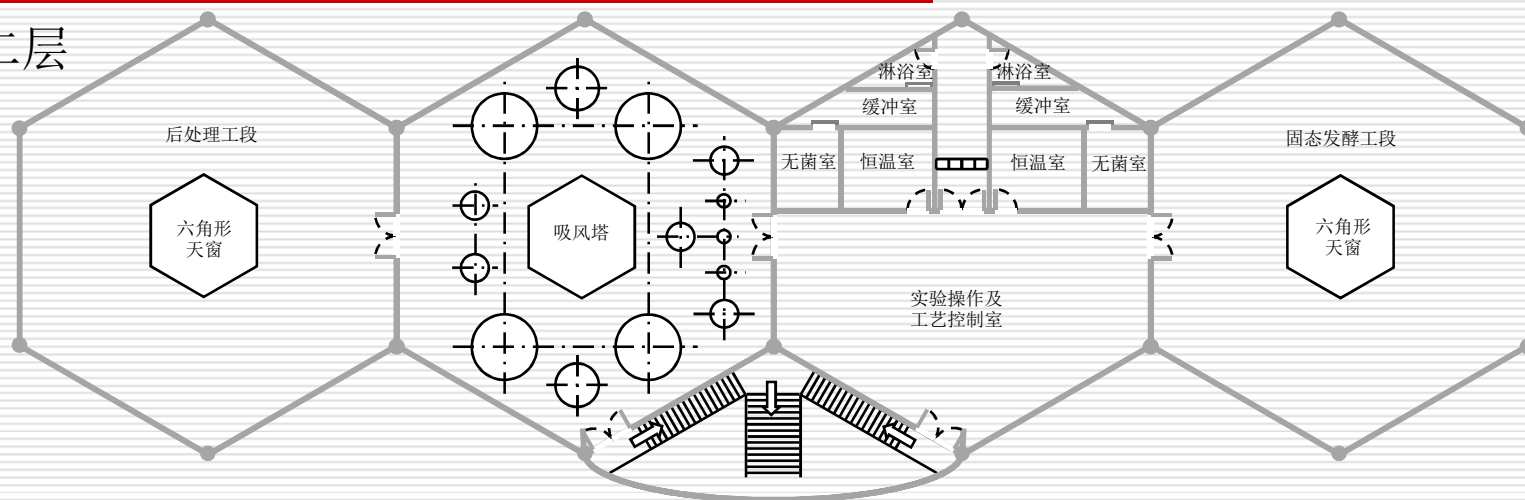


发酵实验室暨中试工场设计例二

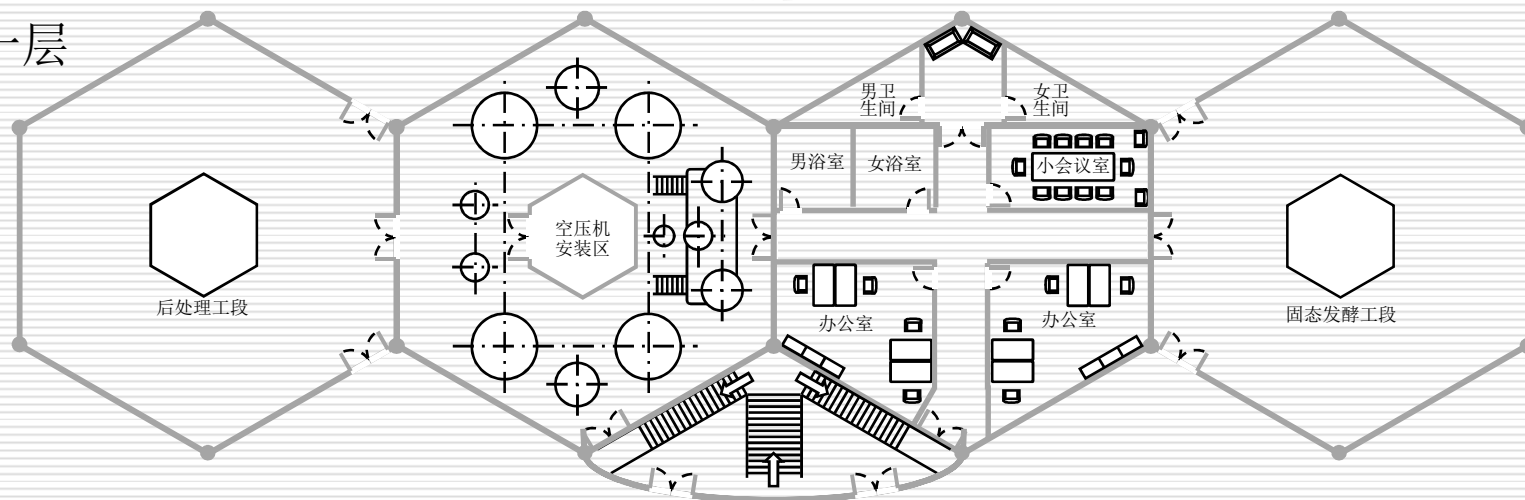


发酵实验室暨中试工场设计例三

二层



一层



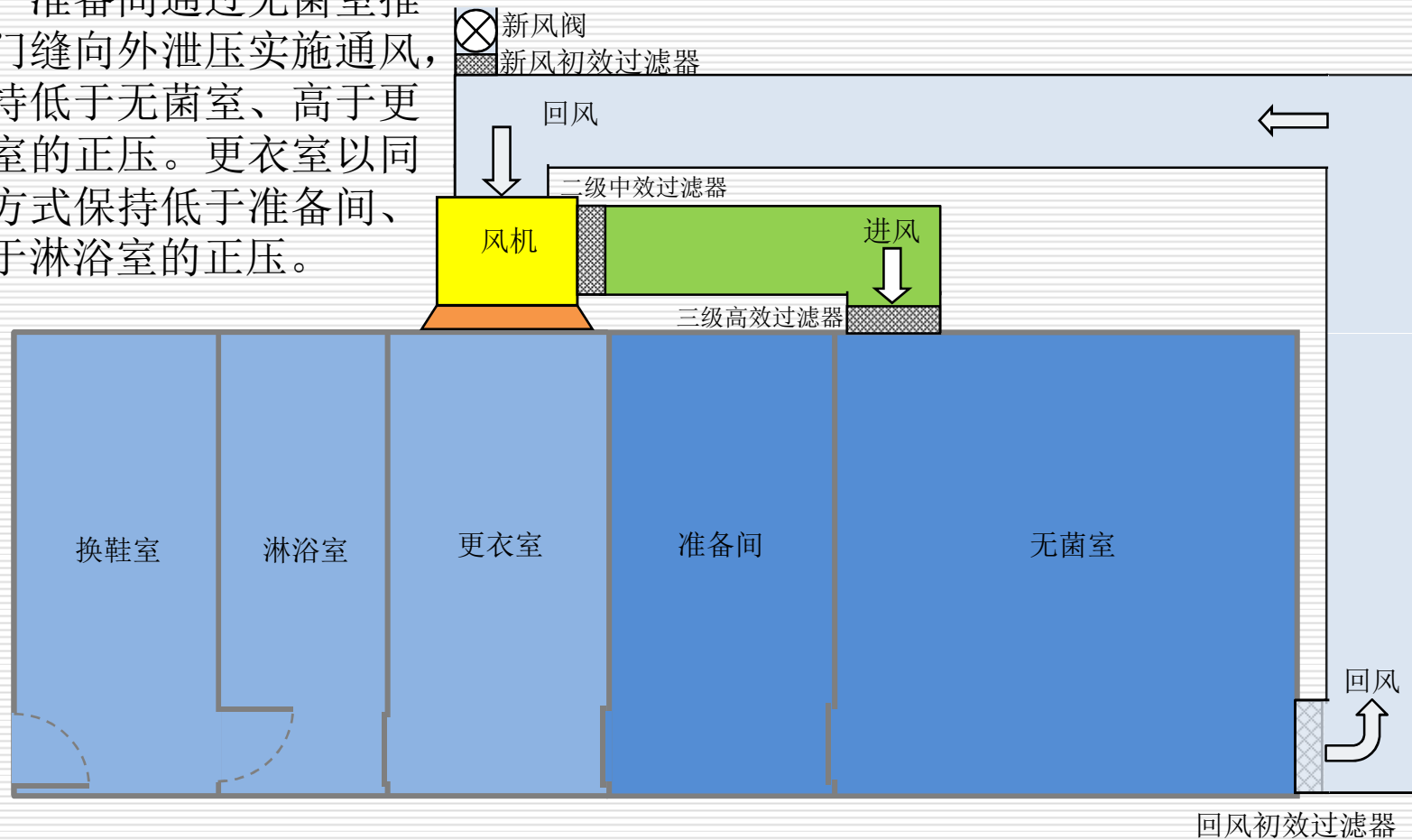
□ 恒温培养室的简易设计

- 恒温培养室是一个密闭、强制通风的微生物培养室，要求保持一定的温度、湿度、洁净度和正压，配备摇床、搁物架、照明灯等设施，但不要安装紫外灯。
- 恒温培养室的洁净度按D级标准设计，一般不设置窗户，采用保温推拉门，保温门上设有观察视窗。
- 恒温培养室的恒温控制可使用带外风过滤的冷热空调，并在通风道内装设自控加热的电热管(板)。
- 恒温培养室的湿度控制可使用加湿器，或在通风道口置纯净水盆，根据水面积大小控制不同的湿度。
- 恒温培养室吊顶高度2000~2200。
- 为满足不同培养温度的需要，恒温室至少设置两间。

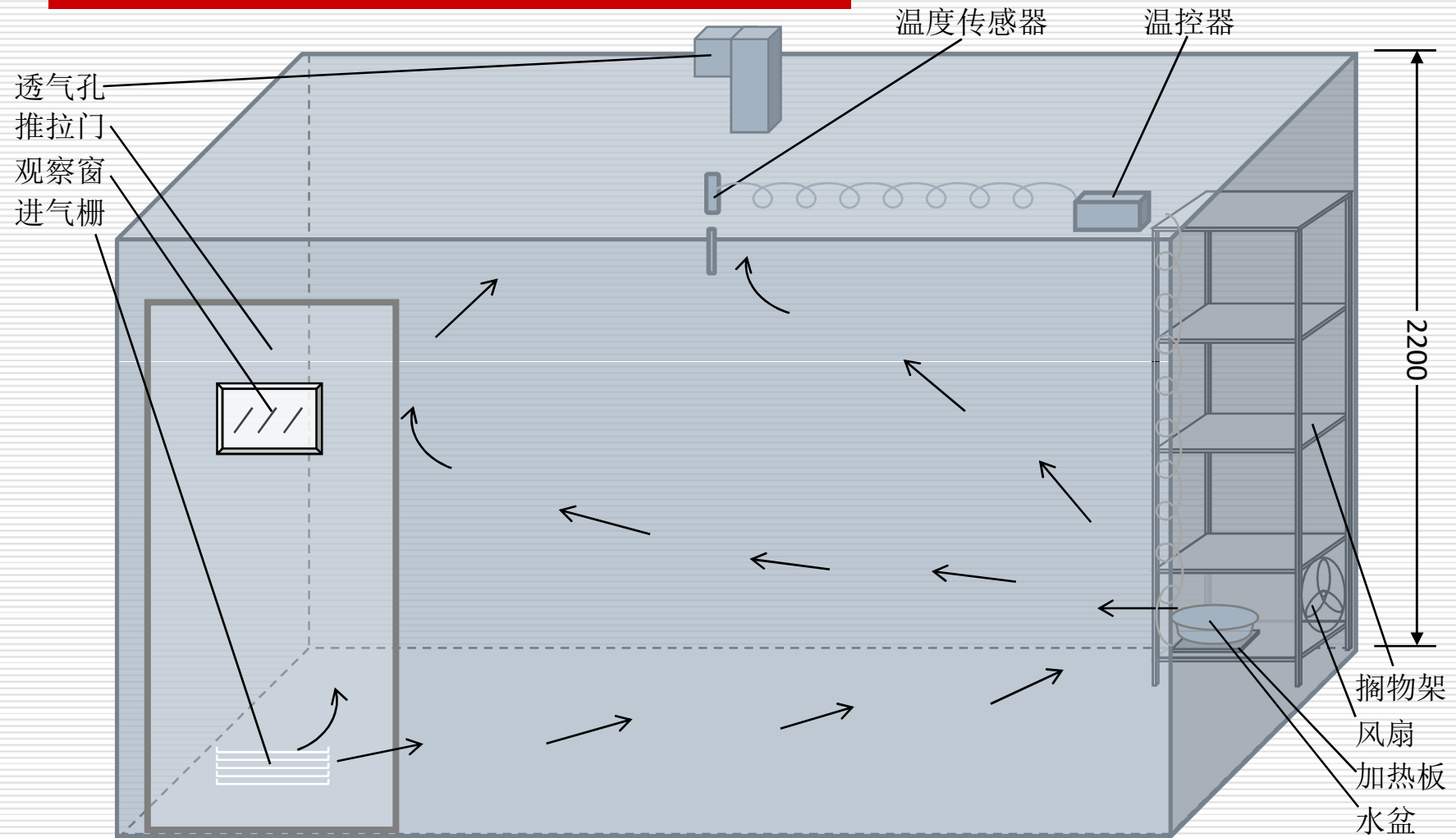


无菌室的洁净通风设计举例

注：准备间通过无菌室推拉门缝向外泄压实施通风，保持低于无菌室、高于更衣室的正压。更衣室以同样方式保持低于准备间、高于淋浴室的正压。



恒温培养室简易通风与温控设计



谢谢惠听!

演讲人：河北科技大学生物科学与工程学院 徐亲民

联系电话：13513370405(兼微信)

