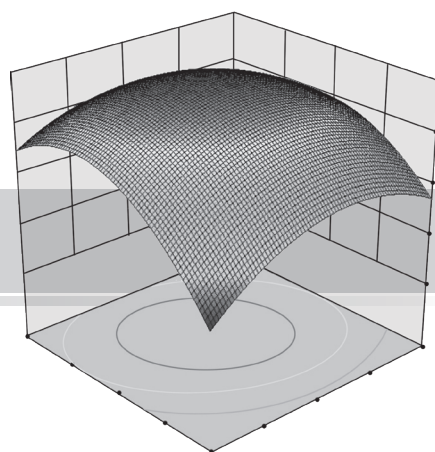


# 3



## 发酵培养基设计与优化

- 3.1 发酵培养基特点  
培养基分类；发酵培养基的基本特点
- 3.2 发酵培养基组成及其来源  
碳源；氮源；无机盐及微量元素；水；  
代谢调节物质；其他
- 3.3 发酵培养基设计  
发酵培养基设计依据；发酵培养基设计  
原则
- 3.4 发酵培养基优化  
发酵培养基优化思路；发酵培养基优化  
方法

微生物生长繁殖需要不断地从外界吸收营养物质，以获得能量并合成新的物质。研究微生物的生长、繁殖和代谢产物的合成，首先要了解微生物的营养特性和培养条件，以便能有效地控制其生长及代谢产物的合成，提高微生物的生长速率和代谢产物的合成效率，达到利用该微生物发酵进行工业化生产的目的。因此，研究微生物的营养特性，确定合理的发酵工业培养基是实现微生物发酵产业化的关键因素之一。本章系统介绍了发酵培养基特点、设计原则及其优化方法，为帮助学习者今后在实际应用过程中对培养基的设计与优化打下良好的理论、技术及应用基础。

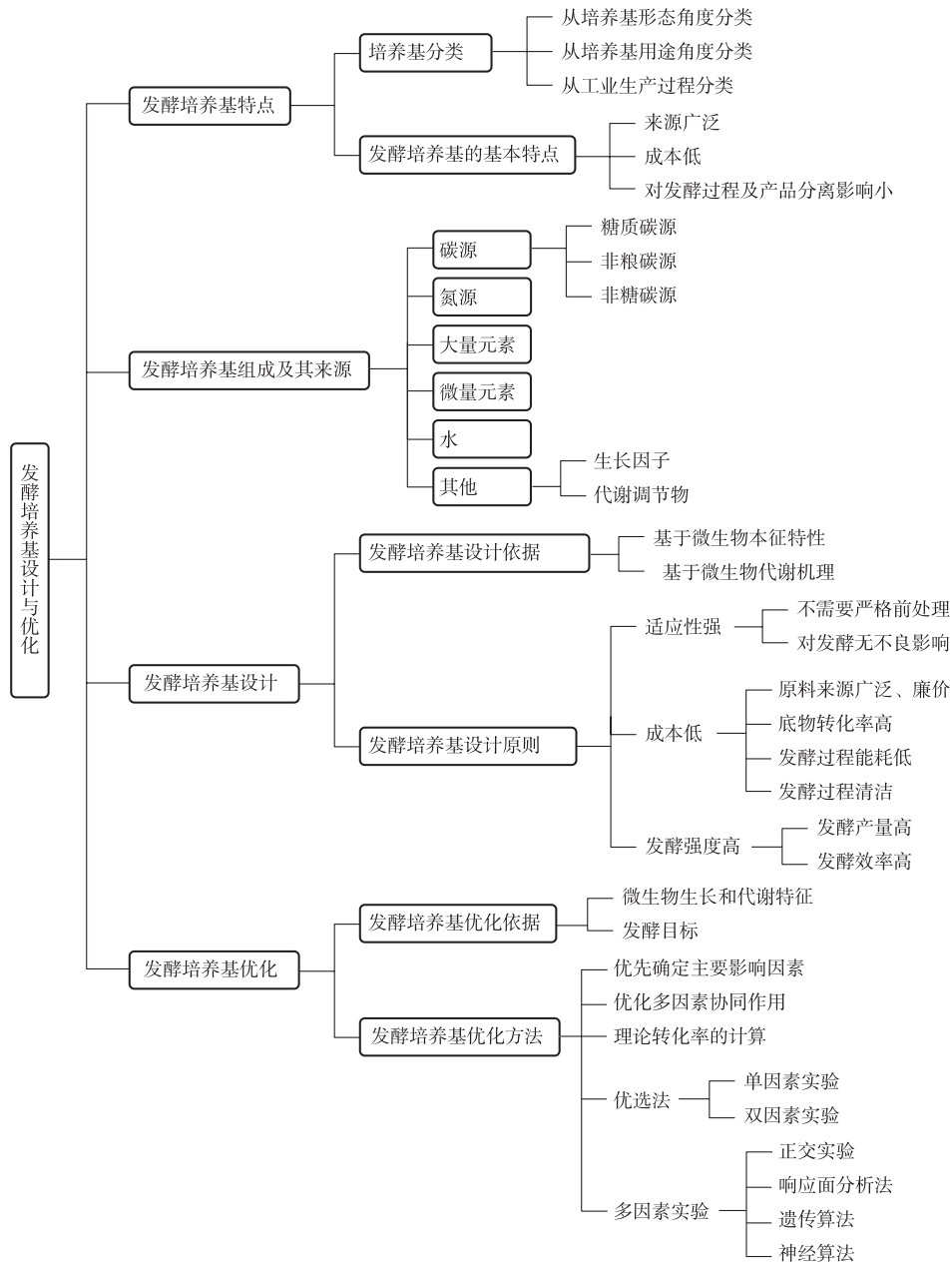
### 教学目的与要求

- (1) 掌握常用培养基的基本要求
- (2) 掌握培养基的组成成分及其来源
- (3) 掌握培养基的类型及其区别
- (4) 清晰影响培养基质量的因素
- (5) 掌握培养基设计原理与优化方法

### 重点及难点

发酵培养基的设计原理与优化方法

## 知识导图



## 问题导读

- (1) 简述培养基类型以及发酵培养基的特点。
- (2) 培养基有哪几大类物质组成？简述这些物质的来源及其作用。
- (3) 如何进行发酵培养基的设计与优化？

## 关键词

种子培养基 发酵培养基 培养基设计 培养基优化 无菌技术 培养基组成

培养基是指用于维持微生物生长、繁殖和产物形成的营养物质。合适的发酵培养基是一个发酵产品能否成功实现工业化生产的前提之一。本章主要讲述发酵工业培养基的设计与优化。不同微生物或发酵产品对发酵培养基的要求不同,会受到各种相关因素的影响和制约,如菌种特性、发酵过程特征、原材料来源以及成本等。因此,工业发酵培养基的设计是一项可综合反映整个发酵过程的各项要求,实现发酵生产目标的多技术集成的研究工作。

## 3.1 发酵培养基特点

### 3.1.1 培养基分类

微生物的培养基类型较多,一般可根据其用途、物理性质以及培养基组成物质的化学成分特征等方面进行分类。工业发酵中,培养基往往是依据生产过程及其作用分为斜面培养基、种子培养基以及发酵培养基等。

#### 3.1.1.1 根据培养基形态分类

##### (1) 固体培养基

常温下呈固体状态的培养基统称为固体培养基,根据其功能及是否可遇热融化又分为凝固培养基、非可逆性凝固培养基以及天然固体培养基。

① 凝固培养基:即遇热可融化,冷却后则凝固的固体培养基。常规的微生物菌种的筛选、鉴定、分离及选育等均选用此种固体培养基。

② 非可逆性凝固培养基:指由血清凝固成的固体培养基或由无机硅胶配成的凝固后即不能再融化的固体培养基。此种培养基可用于菌种的运输和保藏等,也可很好地筛选及培养嗜热菌。

③ 天然固体培养基:由天然固体状基质直接制成的培养基,如麸皮、米糠、木屑等。一些大型真菌等的生产均采用这种培养基。

##### (2) 液体培养基

对应于固体培养基而言,是微生物的液状培养基,是一类呈液态的培养基。培养基中80%~90%是水。微生物在液体培养基中可进行大规模培养,得到大量的细胞或者细胞产物,从而易于实现微生物培养的规模化生产。

当向配制好的液体培养基中加入0.5%左右的琼脂作为凝固剂时,形成的培养基具有半流动半凝固的特点,此种培养基称为半固体培养基,主要用于菌种鉴定、观察细菌运动特征以及噬菌体的效价测定等。

#### 3.1.1.2 根据培养基用途分类

与工业发酵过程直接相关的几种不同用途的培养基类型:孢子培养基;种子培养基;发酵培养基;补料培养基、生长培养基等。孢子培养基主要用于菌种的孵化和复壮;种子培养基用于菌种的扩大培养;发酵培养基用于微生物的大规模培养,从而获得大量的目标产物;补料培养基的作用是在较短的发酵周期内,通过向发酵培养基中添加某些营养物质,如碳氮源,从而促进目标产物的大量累积。其中,在两阶段发酵过程中,生长培养基用于快速大量积累菌体,以增加生物量,通常富含氮源,为第二阶段的产物大量生成做准备;而发酵培养基则主要用于菌体合成积累次生代谢产物,通常碳源丰富,碳氮比较高,此时菌体生物量已较大。

与菌种筛选相关的几种不同用途的培养基可分为:富集培养基;选择培养基;鉴别培养基。富集培养基主要是通过对培养基的特殊调配,使目标微生物大量繁殖,其包括加富培养基的概念;选择培养基更多地倾向于通过对其他微生物的抑制生长来获得目标微生物;鉴别培养基主要用于具有某种特

征的微生物鉴别，如特定的细菌真菌等的鉴别。

### 3.1.1.3 根据发酵工业生产过程分类

#### (1) 斜面培养基

斜面培养基是用于微生物菌种活化及其细胞生长、繁殖或菌种保藏，包括细菌、酵母等的斜面培养基以及霉菌、放线菌的产孢子斜面培养基等。

#### (2) 种子培养基

种子扩大培养的目的是在短时间内获得数量多、质量高的大量菌种，以满足后续发酵生产的需要。

#### (3) 发酵培养基

发酵培养基是发酵生产用到的培养基，它不仅要采用大量的原料，而且也是决定发酵生产成功与否的重要因素。

### 3.1.2 发酵培养基的基本特点

#### (1) 来源广泛

- ① 必须提供合成微生物细胞及其发酵产物所需的营养成分。
- ② 原料价格低廉，质量稳定，取材容易。

#### (2) 成本低

- ① 有利于减少培养基原料的单耗，即单位营养物质所合成产物多，也称为底物转化率高。
- ② 有利于提高产物的浓度，以提高单位容积发酵罐的生产能力。
- ③ 有利于提高产物的合成速率，以缩短发酵周期，也称为发酵效率高。

#### (3) 对发酵过程及产品分离影响小

- ① 有利于减少副产物的形成，便于产物的分离纯化。
- ② 所用原料尽可能减少对发酵过程中通气搅拌的影响，有利于提高供氧的利用率，降低能耗。
- ③ 有利于产品的分离纯化，并尽可能减少产生“三废”的物质。

## 3.2 发酵培养基组成及其来源

### 3.2.1 碳源

凡是含有碳元素且能被微生物生长繁殖所利用的一类营养物质统称为碳源。常用的碳源有糖类、油脂、有机酸和低碳醇等。在特殊情况下，如碳源贫乏时，蛋白质水解物或氨基酸等也可被微生物作为碳源使用。微生物可利用的发酵碳源按照能否被人类食用，可分为粮食碳源和非粮碳源。粮食碳源及非粮碳源中，根据碳源的结构与性质，又可分为糖质碳源和非糖碳源。粮食碳源中的糖质碳源包括葡萄糖和可食用淀粉等；粮食碳源中的非糖碳源包括动、植物油脂和某些有机酸类等。非粮碳源中的糖质碳源包括木薯淀粉和黄姜淀粉等；非粮碳源中的非糖碳源类型主要包括甘油、烃和醇等。

#### 3.2.1.1 粮食碳源

##### (1) 糖质粮食碳源

糖质碳源是发酵培养基中最为常用的碳源，主要有葡萄糖和可食用淀粉等。

① 葡萄糖。葡萄糖是最容易被利用的碳源之一，几乎所有的微生物都能利用葡萄糖，葡萄糖常作为培养基的一种主要成分，是促进微生物生长的速效碳源。然而过多的葡萄糖会抑制微生物的生长、

繁殖以及产物的合成。

② 可食用淀粉。可食用淀粉等多糖也是常用的碳源，它们一般都要经过菌体产生的胞外酶水解成单糖后再被吸收利用，但通常也有将其先经过液化和糖化预处理后再作为培养基的碳源使用。属于此类的有玉米淀粉等。

### (2) 非糖粮食碳源

一些可被人类食用的动、植物油脂和部分有机酸等非糖类的粮食碳源，也可以在某些情况下为一些微生物的生长繁殖提供碳源。

① 动、植物油脂。油和脂肪也能被许多微生物作为碳源，这些微生物一般都具有活性较高的脂肪酶。当微生物利用脂肪作为碳源时，要供给比糖代谢更多的溶解氧，否则，会因为缺氧导致代谢不彻底，造成脂肪酸和有机酸中间体的大量积累，影响到微生物的正常生长和繁殖。

② 有机酸。某些微生物对有机酸，如乳酸、柠檬酸、乙酸等有很强的氧化能力。因此，有机酸及其盐类也可作为某些微生物的碳源。不同的有机酸碳源，不仅能影响微生物的代谢，而且可调控整个发酵过程中 pH。

#### 3.2.1.2 非粮碳源

发酵培养基常用碳源大多是可供人畜食用的粮食、油料或以粮食为原料的产品，如有机酸和低碳醇等。为了节约用粮，进一步降低发酵成本，发酵工业选用目前不常用的非粮碳源的需求日益增加。经过多年的探索和应用，如下文所述的一系列非粮碳源被证实可有效取代糖质粮食碳源用于发酵生产。根据非粮碳源的结构与性质，其也可被分为糖质非粮碳源和非糖非粮碳源。

##### (1) 糖质非粮碳源

经济农作物中不能被人类用来食用的糖类，但可用于一些微生物的发酵碳源，属于此类碳源主要包括两大类：一类是工业制糖业采用甘蔗、甜菜制糖产生的副产物糖蜜；另一类是来自不能被大量食用的药用植物原料中含有的大量淀粉，如石蒜淀粉、黄姜淀粉等。

① 糖蜜。糖蜜是制糖工业的副产物，它含有丰富的糖、氮类化合物、无机盐和维生素等，它是微生物发酵培养基价廉物美的碳源和培养基原料。一般糖蜜分甘蔗糖蜜和甜菜糖蜜，使用时要注意。

② 石蒜淀粉。石蒜为多年生草本植物，其所含石蒜碱可入药，具一定抗癌活性，并能抗炎、解热、镇静及催吐等功效。石蒜的根茎中含有大量淀粉，经过糖化、液化处理后，可用于一些微生物的发酵。

③ 黄姜淀粉。黄姜，又名盾叶薯蓣，其根状茎含有的薯蓣皂苷元具有极高的药用价值。而其根状茎中含有大量淀粉，经过预处理后，也可用于一些微生物的发酵。

##### (2) 非糖非粮碳源

此类可作为微生物发酵碳源的结构中不含有单糖结构，且不能够被人类食用。如甘油以及化学工业中的某些烃类和醇类均属于该类碳源。

① 甘油。随着近来生物柴油工业的兴起，甘油作为其主要的副产物，出现了大量积累。为了降低生物柴油的生产成本，同时使副产物甘油得到充分利用，甘油已逐渐成为发酵工业的重要碳源之一，且相对于其他碳源而言，甘油用作发酵碳源时，具有一些优势，如：甘油为非还原性三碳化合物，在高温灭菌过程中，可有效避免还原糖与氮源之间发生的非酶褐变；甘油代替还原糖作为发酵碳源可有效减少代谢副产物乙酸的积累，从而可避免 Crabtree 效应的出现；甘油相对于葡萄糖更易于穿过细胞膜进入微生物体内，降低碳源进入微生物体内对 ATP 的消耗；甘油代谢利用的转化率相对还原糖而言较高。

② 烃和醇。此外，需要说明的是，还有一大类非糖非粮碳源就是烃和醇类等石油产品。在 20 世纪 60—70 年代，一度出现粮食和饲料来源紧张，而当时的工业发展规模相对较小，石油开采和储量相对较大，因此，人们很早就开发了利用烃和醇类等石油产品进行酵母发酵生产单细胞蛋白技术及生产工艺等，以缓解粮食和饲料短缺危机。近年来，随着石油工业的发展，微生物工业的碳源范围和发酵

#### 深入学习 3-1

不同生产工艺的  
甘蔗糖蜜和甜菜  
糖蜜的组成比较

产品类型都在扩大，正烷烃已用于有机酸、氨基酸、维生素、抗生素和酶制剂的工业发酵。

### 3.2.2 氮源

氮源主要用于构成菌体细胞结构和合成含氮代谢物。常用的氮源可分为两大类：有机氮源和无机氮源。

#### (1) 有机氮源

常用的有机氮源有黄豆饼粉、花生饼粉、棉籽饼粉、玉米浆、玉米蛋白粉、蛋白胨、酵母粉、鱼粉等。它们在微生物分泌的蛋白酶作用下水解成氨基酸，被菌体吸收后再进一步分解代谢。

玉米浆是玉米淀粉生产中的副产物，是一种很容易被微生物利用的良好氮源。尿素也是常用的有机氮源，但其成分单一，不具有上述有机氮源的特点，然而，其在青霉素和谷氨酸等生产中也常被采用，尤其是在谷氨酸生产中，尿素可使  $\alpha$ -酮戊二酸还原并氨基化，从而提高谷氨酸产量。

有机氮源不仅可为菌体生长繁殖提供营养，有的还可以为某些产物提供前体。例如，缬氨酸、半胱氨酸和  $\alpha$ -氨基己二酸都是合成青霉素和头孢菌素的主要前体，甘氨酸可作为 L-丝氨酸的合成前体等。

#### (2) 无机氮源

常用的无机氮源有铵盐、硝酸盐和氨水等。微生物可快速利用的氮源常被称为速效氮源，其主要包括某些含有铵根离子的无机氮源和以蛋白质降解产物形式存在的有机氮源等。

硫酸铵等无机氮源由于其氮代谢往往会产生酸性物质，使发酵液 pH 下降，这种经微生物代谢后能形成酸性物质的营养基质叫生理酸性物质。同理，硝酸钠等无机氮源由于其氮代谢往往会产生碱性物质，使发酵液 pH 上升，这种经微生物代谢后能形成碱性物质的营养基质叫生理碱性物质。

氨水是一种容易被利用的快速氮源，也可以调节发酵液中的 pH，它在许多抗生素发酵生产中普遍使用。由于氨水碱性较强，因此，使用时要注意防止局部过碱，加强搅拌，并采用少量多次控制流加。

### 3.2.3 无机盐及微量元素

微生物在生长、繁殖和生产过程中，需要某些无机盐和微量元素如磷、镁、硫、钾、钠、钙、氯、铁、锌、锰、铜、钼等，以作为其生理活性物质的构成或用于生理活性作用的调节，这些物质一般在低浓度时对微生物生长和产物合成有促进作用，但在高浓度时常常表现出明显的抑制作用。

### 3.2.4 水

水是所有发酵工业培养基的主要组成成分，也是微生物机体的重要组成成分。它除直接参与一些代谢外，又是进行代谢反应的内部介质。此外，微生物特别是单细胞微生物由于没有特殊的摄食及排泄器官，它的营养物、代谢物、氧气等必须溶解于水后才能进入细胞内参与正常的代谢活动。

对于发酵工厂来说，洁净、稳定的水源至关重要，尤其是在不同水源中各种矿物质含量的差异可显著影响微生物代谢，如：水中矿物质的组成对酿酒工业和淀粉糖化均有较大影响。

### 3.2.5 代谢调节物质

发酵培养基中某些成分的加入有助于调节微生物生长和产物的形成，这些添加的物质一般被称为代谢调节物质，如：生长因子、代谢抑制剂或促进剂等。

#### (1) 生长因子

从广义上讲，凡是微生物生长不可缺少的有机物质，如氨基酸、嘌呤、嘧啶、维生素等均称为生长因子。生长因子不是对于所有微生物都必需的，它只是对于某些自身不能合成或极少合成这些成分的微生物才是必不可少的营养物，如微生物营养缺陷型菌株等。

#### (2) 代谢抑制剂

在发酵过程中，加入代谢抑制剂会抑制某代谢途径的进行，同时会使另外一些代谢途径增强，从

深入学习 3-2

不同含碳量的碳源的细胞得率

深入学习 3-3

发酵中常用的有机氮源成分分析

深入学习 3-4

无机盐作用及其浓度参考范围

而实现人们所需要的某种代谢产物的积累。例如：微生物发酵生产甘油中，亚硫酸氢钠与代谢过程中的乙醛生成加成物，这就使乙醇代谢途径中的乙醛不能成受氢体，而使 NADH 在细胞中积累，从而激活 3-磷酸甘油脱氢酶的活性，使磷酸二羟基丙酮取代乙醛作为 NADH 的受氢体，而还原为 3-磷酸甘油，其水解后即形成甘油。

### (3) 代谢促进剂

代谢促进剂是指那些细胞生长非必需的，但加入后却能显著提高发酵产量的一些物质（表 3-6），常以添加剂的形式加入发酵培养基中。如谷胱甘肽的发酵制备过程中，向培养基中添加 L-半胱氨酸后，谷胱甘肽的合成酶体系活性增强，从而提高谷胱甘肽的产量。

### (4) 前体物质

前体物质是指加入到发酵培养基中，能直接被微生物在生物合成过程中结合到产物分子中去，其自身的结构并没有多大变化，但是产物的产量却因其加入而有较大提高的一类化合物。在实际生产中，前体的加入不但提高了产物的产量，而且还显著提高了产物中目的成分的比例，有利于产物分离和提高产品的品质。大多数前体如苯乙酸对微生物生长有毒性，在生产中为了减少毒性和增加前体的利用率，通常采用少量多次的流加工艺。

### (5) 辅酶或辅因子

辅酶（coenzyme）是一类可以将化学基团从一个酶转移到另一个酶上的有机小分子，与酶较为松散地结合，对于特定酶的活性发挥是必要的。由于辅酶在酶催化反应中其化学组分发生了变化，因此，可以认为辅酶是一种特殊的底物或者称为“第二底物”。

辅助因子（也称辅因子）：全酶是由蛋白质部分和非蛋白质部分组成，蛋白质部分称为酶蛋白（apoenzyme），非蛋白质部分称为辅助因子（cofactor），酶蛋白和辅助因子结合形成的复合物称为全酶，只有全酶才有催化作用。酶的辅助因子为催化活性所必需的，是与酶蛋白疏松结合的小分子量的有机物质或者是一些金属离子。

## 3.2.6 其他

对产生泡沫较多的发酵过程，为了消除泡沫对发酵的影响，同时防止逃液和染菌，常常需要在发酵培养基中加入少量消泡剂，消泡剂通常为表面活性剂，如植物油脂、吐温系列以及一些高分子化合物等。

## 3.3 发酵培养基设计

### 3.3.1 发酵培养基设计依据

尽管不同微生物生长、繁殖及其产物合成有较大差异，所需要的发酵培养基也相差很大。但是，在进行发酵培养基设计时，仍然有一些可行的依据可供参考。主要依据可基于微生物本征特性及其目标产物的代谢途径，其中，依据微生物本征特性，包括其生长特性、对碳源代谢利用的偏好、需氧程度、生长代谢过程中 pH 变化以及产生泡沫等，可以初步确定碳源类型、浓度及其添加方式，氮源等其他组成成分的类型和浓度，以及是否需要添加消泡剂等；而依据微生物目标产物合成途径，可以考虑在发酵培养基设计时是否增加促进产物合成代谢的调节剂等代谢调节物质。具体如下。

#### (1) 基于微生物本征特性

不同的微生物对不同碳源的偏好及其亲和常数随着种属的不同而各有差异，在选用碳源时，可依

#### 深入学习 3-5

各种添加剂对产酶的促进作用

#### 深入学习 3-6

发酵过程中常用的前体物质

据微生物对初始碳源浓度的适应性及其对该碳源的代谢情况，确定初始碳源浓度以及培养基中碳源总浓度和添加方式。

也可依据微生物好氧程度来确定培养基物性要求及主要原料。同时，通过了解微生物代谢对 pH 变化的影响以及 pH 变化对发酵的影响，从而确定碳源、氮源的选择，也可由此进一步选择对发酵体系中 pH 起到缓冲作用的无机盐的添加。

### (2) 基于目标产物合成途径

① 产物合成促进剂的添加，如前体物质的添加、限速酶的激活剂（辅酶或辅因子）的添加，以及能够促进辅酶的合成和促进能量代谢的物质的添加等。

② 旁路代谢抑制剂的添加，如利用林可链霉菌发酵产林可霉素的过程中，当在一定时间内向发酵液中添加一定量的旁路代谢酶抑制剂丙氨酸和三甲胺时，林可霉素的产量可得到显著提高。

③ 促进胞内产物释放，如谷氨酸发酵过程中，通过对生物素量的控制，使微生物细胞变形、拉长，改变细胞膜的通透性，从而促进谷氨酸的大量合成、分泌和积累。

## 3.3.2 发酵培养基设计原则

发酵工业培养基设计对发酵工业的安全、成本控制、菌体生长繁殖、产物的生物合成、产品的分离精制乃至产品质量都有重要影响，所以，在设计发酵培养基时，必须要在满足安全无害前提下，既利于微生物生长，又利于工业化应用，从而使目标产物的产量及生产成本方面均具有可行性。因此，发酵培养基设计原则是要在确保安全无害基础上，使所设计的发酵培养基在提高发酵强度、降低原料成本及发酵过程能耗等方面具有优势。

### 3.3.2.1 发酵强度高

#### (1) 发酵产量高

① 单位培养基能够产生最大量的目的产物。

② 培养基对菌体代谢的阻遏与诱导的影响。

在配制培养基考虑碳源和氮源时，应根据微生物特性和培养目的，注意速效碳（氮）源和迟效碳（氮）源的相互配合，发挥各自的优势。

对于快速利用的碳源葡萄糖来讲，当菌体利用葡萄糖时产生的分解代谢产物会阻遏或抑制某些产物合成所需的酶系的形成或酶的活性时，即发生“葡萄糖效应”。因此，在抗生素发酵时，作为种子培养时的培养基所含的快速利用的碳源和氮源往往比作为合成目的产物发酵培养时培养基所含的多。一般也可考虑以分批补料或连续补料的方式来控制微生物对底物的合适的利用速率，以解除所谓的“葡萄糖效应”来得到更多的目的产物。

利用的碳源如淀粉、糊精等对产酶是有利的（表 3-1）。因而淀粉、糊精等多糖也是常用的碳源，特别是在酶制剂生产中几乎都选用淀粉类原料作为碳源。

微生物利用氮源的能力因菌种、菌龄的不同而有差异。多数能分泌胞外蛋白酶的菌株，在有机氮源（蛋白质）上可以良好地生长。同一微生物处于生长不同阶段时，对氮源的利用能力不同，在生长早期容易利用易同化的铵盐和氨基氮，在生长中期则由于细胞的代谢酶系已经形成，则利用蛋白质的能力增强。因此，在培养基中有机和无机氮源应当混合使用。

有些产物会受氮源的诱导与阻遏，这在蛋白酶的生产中表现尤为明显，除个别外（例如黑曲霉生产酸性蛋白酶需高浓度的铵盐），通常蛋白酶的产生受培养基中蛋白质或脂肪的诱导，而受铵盐、硝酸盐氨基酸的阻遏。这时在培养基氮源选取时应考虑有机氮源，如以蛋白质类为主。

表 3-1 不同碳源对产酶活力的影响

碳源	地衣芽孢杆菌		黑曲霉
	生物量 / ( g/L )	$\alpha$ - 淀粉酶活力 / ( U/mL )	果胶酶活力 / ( U/mL )
葡萄糖	4.2	0	0.77
果糖	4.18	0	0
蔗糖	4.02	0	0.66
糊精	3.06	38.2	0.52
淀粉	3.09	40.2	1.92

## (2) 发酵效率高

- ① 能够提高产物的合成速率，缩短发酵周期。
- ② 能够使副产物合成的量最少。
- ③ 碳、氮比对菌体代谢的影响。

培养基中碳氮比是影响微生物生长繁殖和产物合成的关键因素之一。氮源过多，碳氮比低，会使菌体生长过于旺盛，导致 pH 偏高，不利于代谢产物的积累；氮源不足，碳氮比高，则菌体繁殖量少，从而影响产量。碳源过多则容易形成较低的 pH；若碳源不足则容易引起菌体的衰老和自溶。

微生物在不同的生长阶段，所需的最适碳氮比不同。一般来讲，碳源既作为碳架参与菌体和产物的合成又作为生命过程中的能源，所以比例要求比氮源高。一般工业发酵培养基的碳氮比为 100 : (0.2 ~ 2.0)。但在谷氨酸发酵中因为产物含氮量较多，所以，氮源比例就相对高些，一般在谷氨酸生产中取的碳氮比为 100 : (15 ~ 21)；若碳氮比例为 100 : (0.5 ~ 2.0)，则出现只长菌体而几乎不合成谷氨酸的现象。应该指出，碳氮比也随碳源及氮源的种类以及通气搅拌等条件而异，因此，很难确定一个统一的比值。

### 3.3.2.2 原料成本低

#### (1) 原料来源广泛

① 以粗代精。“粗”与“精”的概念属于人为划分。对发酵工业培养基而言，“精”更多的是指原料的精细，突出的是原料在利用之前需要对其进行多重工序的预处理，从而使原料利用难度提高，增加发酵成本等。而“粗”指发酵原料在使用前，无需经过多道工序的处理而被直接利用，这样，在节省大量人力物力的同时，也可增加发酵原料的利用率。

② 以废代好。以工农业生产中易污染环境的废弃物作为微生物培养基的原料，具有很大的利用空间，且利用有机废液进行微生物的发酵可有效降低废液中 COD、BOD 等指标，从而降低有机废水排放的处理难度和处理成本，对企业成本控制和可持续发展具有重要意义。例如，造纸厂的亚硫酸废液（含有戊糖和短小纤维）、各种发酵废液（酒精及丙酮丁醇发酵废醪、味精发酵废液）、各种酿造工业废弃物（啤酒糟、酒糟、酱渣）以及其他工业有机废弃物（花生麸、淀粉渣、胚芽饼、豆腐渣、屠宰水、黄浆水、蚕茧脱胶废水、粉丝厂废水）等，这些有机废弃物可以在某些发酵生产中加以利用。如在利用这类原料生产酵母菌等单细胞蛋白方面，国内外已有很多成功的例子。

③ 以非粮代替粮食发酵。

a. 以烃代粮。即以石油或天然气代替糖质原料来培养微生物。能利用石油作为碳源和能源的微生物在自然界中普遍存在，目前已知至少有 8 属细菌、6 属放线菌、6 属酵母和 6 属霉菌能利用石油。不同的微生物几乎能利用石油中所含的所有成分，除了合成菌体成分——石油蛋白外，还能将其氧化成

醇、醛、酸等化工产品。

b. 以糖质非粮碳源代替粮食碳源。糖质非粮碳源主要指自然界中大量存在的不可被人类食用的糖质碳源，主要是淀粉类碳源，多见于一些药用植物的块根等部位的贮藏淀粉，因其中含有药用成分，一般不能大量食用这类淀粉，属于典型的非粮碳源。经过简单的处理后，即可用于一些微生物发酵。如具有药用价值的黄姜，它的块根中均含有大约 45% 的淀粉，如果将其中的薯蓣皂素提取后，剩余的淀粉就可用于一些微生物的发酵。这样不仅实现了非粮糖质碳源的利用，而且降低了黄姜皂素污水的处理难度，有利于黄姜产业的可持续发展。

c. 以纤代糖。纤维素是一种取之不尽、用之不竭的可再生资源，由 14 000 个左右的葡萄糖单位构成的  $\beta$ -D-葡萄糖长链，自然界中含量丰富。自然界中存在着能分泌各种纤维素酶的微生物，它们能大量分解纤维素。

事实上，还有一大类非粮原料有待开发利用，主要是指植物中难降解的纤维素或半纤维素原料。因此，木质纤维素高效生物降解技术的突破将为发酵工业大幅降低原料成本提供巨大的技术支撑。

## (2) 底物转化率高

适宜的培养基原材料需转化率高，且能满足产物的高效合成。一般只有小分子能够通过细胞膜进入细胞体内进行代谢。微生物能够利用复杂的大分子是由于微生物能够分泌各种各样的水解酶系，在体外将大分子水解为微生物能够直接利用的小分子物质。由于不同微生物来源和种类的不同，所能分泌的水解酶系不同。因而在考虑培养基成分选择的时候，必须充分考虑菌种的同化能力，从而保证所选用的培养基成分是微生物能够利用的。葡萄糖是几乎所有的微生物都能利用的碳源，因此，在培养基选择时一般被优先加以考虑。但工业上如果直接选用葡萄糖作为碳源，成本相对较高，一般采用淀粉水解糖。在工业生产上将淀粉水解为葡萄糖的过程称为淀粉的“糖化”，所得的糖液称为淀粉水解糖液。

淀粉水解糖液中主要的糖类是葡萄糖。因水解条件的不同，糖液中尚有少量的麦芽糖及其他一些二糖、低聚糖等复合糖类，这些低聚糖的存在不仅降低了原料的利用率，而且会影响糖液的质量。因此，为了生产出高产、高质量的发酵产品，水解糖液必须达到一定的质量指标（表 3-2）。影响淀粉水解糖液的质量因素除原料本身外，很大程度和制备方法密切相关，目前淀粉水解糖的制备方法有酸法、酸酶法和双酶法，其中以双酶法制得的糖液质量最好。

表 3-2 淀粉水解糖液基本要求

项目	要求	项目	要求
色泽	浅黄色、杏黄色透明	葡萄糖值（DE 值）	90%以上
糊精反应	无	透光率	60%以上
还原糖含量	18%左右	pH	4.6~4.8

许多有机氮源都是复杂的大分子蛋白质。有些微生物，如大多数氨基酸产生菌，缺乏蛋白质分解酶，不能直接分解蛋白质，必须将有机氮源水解后才能被利用。

### 3.3.2.3 发酵过程能耗低

在确定培养基配方时，不仅要比较它们的单耗成本，而且还应同时考虑利用不同培养基的通气量与搅拌功率成本。因为有的培养基黏度较大，溶氧传递困难，通气量和搅拌功率便会相应增大，导致相应的动力费用增加。因此，优化培养基时要充分考虑发酵过程能耗，使生产成本降低。

综上所述，按照发酵培养基设计依据和原则，就能进行发酵培养基初步设计。

深入学习 3-7  
不同糖化工艺所得糖液质量比较

## 3.4 发酵培养基优化

### 3.4.1 发酵培养基优化思路

#### (1) 优先确定主要影响因素

- ① 根据之前的实验经验以及在培养基成分确定时必须考虑的一些问题，初步确定可能的培养基组分。
- ② 通过单因子优化实验确定最为适宜的各个培养基组分及其最适浓度。

#### (2) 优化多因素协同作用

通过多因子实验，进一步优化培养基的各种成分及其最适浓度。

### 3.4.2 发酵培养基优化方法

理论转化率是指在理想状态下根据微生物代谢途径进行物料衡算得出的转化率大小。而实际转化率是指发酵实验所得的转化率大小。由于实际发酵过程中一般有副产物形成、原材料利用不完全等因素存在，实际转化率往往要小于理论转化率。因此，如何使实际转化率尽可能接近于理论转化率是发酵控制的一个重要目标，也是发酵培养基优化的重要依据。

#### 3.4.2.1 理论转化率计算

对于确定的化学反应，其反应理论转化率可以通过反应方程式的物料衡算得出。生物反应其本质也是化学反应，因此，理论转化率也可以通过反应方程式的物料衡算得出。由于生物反应的复杂性，要给出反应物和产物的代谢总反应方程式，必须对生物代谢过程的每一步反应进行深入解析。一些主要代谢产物，因为它们的代谢途径比较清楚，所以，可以给出它们的代谢总反应方程式，然后对理论转化率进行计算。

一般地，按代谢公式计算出的得率都是理论转化率，指基质在理想状态下完全转化为产物时的转化率。在实际发酵过程中情况会比较复杂，如确定碳源的数量时，还要考虑到用于菌体生长和维持所消耗的量。

#### 3.4.2.2 单因素实验

最终的培养基成分和浓度都是通过实验获得。首先是通过单因子实验确定培养基组分，然后通过多因子实验进一步确定培养基各组分及其适宜的浓度。当然，也可以通过进一步的单因子优化实验确定主要影响因素的适宜浓度。如采用黄金分割法（0.618法）、分数法、分批试验法以及对分法等。

#### 3.4.2.3 多因素实验

实验过程中，为了确定培养基中各个组分及其最佳浓度，大多需要进行多因子的优化实验，这种多因子的优化实验即为多因素实验，其主要包括正交实验、响应面分析法、遗传算法和神经算法等。

##### (1) 正交实验

正交实验是研究多因素多水平的一种设计方法，它是根据正交性从全面实验中挑选出部分有代表性的点进行实验，这些有代表性的点具备了“均匀分散，齐整可比”的特点，正交实验是分析因式设计的主要方法。是一种高效率、快速、经济的实验设计方法。它利用一套规格化的表格，即正交表来设计实验方案和分析实验结果，能够在很多的实验条件中，选出少数几个代表性强的实验条件，并通过这几次实验的数据，找到较好的生产条件，即最优的或较优的方案。

正交实验法实际上是优选法的一种。由于正交实验法的内容比较丰富，不仅可以解决多因素选优

#### 深入学习 3-8

菌体在不同碳源中的细胞得率

#### 深入学习 3-9

常用单因素实验设计

#### 案例 3-1

裂殖壶菌发酵产棕榈酸培养基优化案例

#### 图片 3-1

常用正交表

问题,而且还可以用来分析各因素对实验结果影响的大小,从而抓住主要因素。因此,它已从优选法中独立出来,自成系统。

### (2) 响应面分析法

响应面分析方法(response surface analysis, RSA)是数学与统计学相结合的产物,能以最经济的方式,用很少的实验数量和时间对实验进行全面研究,科学地提供局部与整体的关系,从而取得明确的、有目的的结论。它与“正交设计法”不同,响应面分析方法以回归方法作为函数估算的工具,将多因子实验中,因子与实验结果的相互关系,用多项式近似,把因子与实验结果(响应值)的关系函数化,依次可对函数的面进行分析,研究因子与响应值之间、因子与因子之间的相互关系,并进行优化。

### (3) 遗传算法

发酵过程机理复杂、影响因素众多。菌种的生理生化特性及发酵工艺确定之后,适宜的培养基配方成了发酵水平、原料成本高低的决定因素。为了优化培养基配方,采用遗传算法也是一种行之有效的方法。

遗传算法(genetic algorithms, GA)是一新型智能优化算法,由美国的 Holland 提出,是进化算法(evolutionary algorithms, EA)中的一种,是基于达尔文的进化论和孟德尔的遗传学说,仿效生物的进化与遗传,根据“生存竞争”和“优胜劣汰”的原则,借助复制、交换、突变等操作,使所要解决的问题从初始解一步步逼近最优解,遗传算法模拟生物遗传和进化原理,在反复迭代的过程中,将适应度高的个体更多地遗传到下一代,为确保在整个  $n$  维空间搜索最优解,群体由一定数量的个体组成,在遗传的同时,个体在一定的概率下发生交叉互换,并在一定的概率下发生变异,所以,将在最终的群体中得到一个或若干个优良的个体,其对应的表型即为达到或接近问题的最优解。

培养基配方优化的遗传算法基本过程见图 3-1,遗传算法在整个可行域内进行随机寻优,并对搜索空间的多个解进行评估,能有效防止搜索过程限于局部最优解最终达到或逼近全局最优解。由于它在培养基优化方面具有不需要建立数学模型确定各因素之间的相互影响,有目标函数值即可的优越性而受青睐。

与其他传统搜索方法相比,GA 在搜索过程中不易陷入局部最优,即使所定义的目标函数非连续、不规则或伴有噪声,它也能以很大的概率找到全局最优解,同时,由于 GA 固有的并行性,使得它适合于大规模的并行分布处理,而且 GA 容易介入到已有的模型中并且具有可扩展性,易于和其他技术如神经网络、模糊推理、混沌行为和人工生命等相结合,形成性能更优的问题求解方法。运用配方优化的遗传算法所搜索出的决策因素最优区间,可以反馈到进一步的配方试验中,有效地缩短确定优化配方的时间与减少试验次数。

### (4) 神经算法

人工神经网络(Artificial neural network, ANN)简称神经网络,是 20 世纪 80 年代重新兴起的一种模拟人脑及其活动的理论化的数学模型,由多个非常简单的处理单元按某种分时相互联接而形成的计算系统,具有自组织、自适应、自学习等特点,对解决非线性问题特别有效,还有很强的输入输出非线性映射能力,易于学习和训练等优点。它基本上类似黑箱理论,只根据输入数据和输出数据来建

-----  
△ 案例 3-2  
响应面分析法在裂殖壶菌发酵产棕榈酸的应用

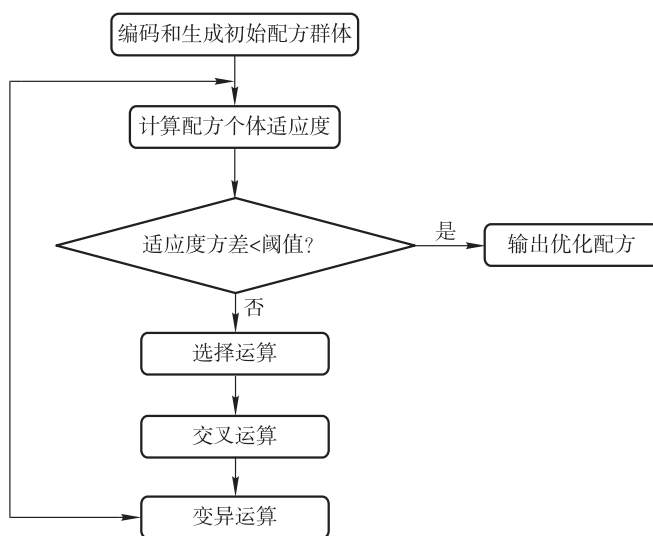


图 3-1 培养基配方优化遗传算法基本流程

-----  
△ 案例 3-3  
遗传算法在丁二酸发酵过程中的应用

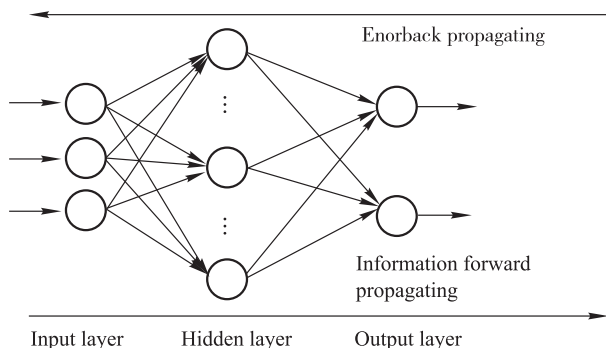


图 3-2 BP 神经网络模型

立模型，网络的统计信息储存在数量巨大的加权矩阵内，可以反映十分复杂的关系。目前，对于不同目的的神经网络有 60 多种，其中在发酵培养基优化中应用最多的是误差反传网络即 BP (Back-propagation) 神经网络。典型的 BP 神经网络如图 3-2 所示。

可以利用正交设计或是均匀设计来安排实验，得到一批准确的实验数据或者是以实验过程中积累的大量数据作为 BP 神经网络的学习样本。根据影响发酵的主要培养基成分和目标参数来设计

神经网络的拓扑结构，选用合适的初始权值和学习速率，设定结束训练的条件，然后用实验数据对神经网络进行训练。完成训练之后的 BP 神经网络，其输入与输出之间形成了一种能够映射培养基成分与目标值内在联系的关系，此时就通过神经网络建立了发酵培养基与目标参数的模型。具体方法是取一定数量的数据作为网络验证样本来检查模型是否满足实验要求。在保证模型符合实验的精度要求后，使用一定的优化方法就可以得出最佳的发酵培养基配方。

遗传算法和人工神经网络算法的程序均包含在 MATLAB 数学软件中 (<http://cn.mathworks.com>)，通过 MATLAB 软件中程序的调用与设计，可很好的实现两种优化算法的应用。

另外，作为两种行之有效的优化方法，遗传算法和人工神经网络算法相结合的优化应用也被大量应用于发酵培养基的优化中，并取得了良好的优化效果。

#### 案例 3-4

遗传算法和神经网络算法的应用

### ? 思考题

1. 简述发酵工业培养基的特点。
2. 常用的无机氮源和有机氮源有哪些？简述各类氮源在发酵培养基中的作用？
3. 工业发酵常用的碳源有哪些？常用的糖类有哪些？各有何特点？
4. 生长因子有什么作用？
5. 简述发酵培养基设计原则和应注意的问题。
6. 如何进行发酵工业培养基的优化，常用的方法有哪些？

### 网上更多学习资源……

- ◆ 教学课件
- ◆ 自测题