



普通高等教育“十二五”规划教材
微生物学实验教程系列

发酵工程实验教程

姜 伟 曹云鹤 主 编 宋 渊 主 审

FERMENTATION
ENGINEERING
EXPERIMENTATION



科学出版社

普通高等教育“十二五”规划教材
微生物学实验教程系列

发酵工程实验教程

姜 伟 曹云鹤 主编
宋 渊 主审

科 学 出 版 社

北 京

内 容 简 介

本教程为微生物学实验教程系列之一,由中国农业大学组织多所高校合作完成。内容涉及菌种及其改造、发酵和检测设备的原理及使用方法、发酵条件优化、过程参数控制及能力提高等综合性实验,其中菌种及其改造部分包括发酵微生物的分离纯化、常规诱变育种、基因工程育种及菌种保藏等实验;发酵设备部分包括离位灭菌和原位灭菌的发酵罐的原理及其使用方法的实验;检测设备部分重点安排了在发酵工业中经常使用的营养、气体及产物分析的气相、液相、红外光谱和质谱的原理及其使用技术的一些实验;发酵条件优化部分的实验重点针对碳源、氮源,以及一些过程参数如 pH、温度、溶解氧等的优化而设计;由于不同微生物及其产物形成的过程参数控制差异较大,本教程安排了涉及乙醇、有机酸、氨基酸、蛋白质、酶、多糖和抗生素发酵等一些综合性实验,并将过程参数的控制融于其中,以期提高使用者的综合能力。

本教程可作为生物科学、生物技术、生物工程、食品科学、发酵工程等专业本科生的实验教材,也可作为硕士生、博士生及本领域技术人员实验的参考书。

图书在版编目(CIP)数据

发酵工程实验教程/姜伟,曹云鹤主编. —北京:科学出版社,2014.6

微生物学实验教程系列 普通高等教育“十二五”规划教材

ISBN 978-7-03-041113-6

I. ①发… II. ①姜… ②曹… III. ①发酵工程—实验—高等学校—教材 IV. ①TQ92-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2014)第 129089 号

责任编辑:刘 畅/责任校对:彭 涛
责任印制:阎 磊/封面设计:迷底书装

科 学 出 版 社 出 版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

北京市文林印务有限公司 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2014 年 6 月第 一 版 开本:720×1000 B5

2014 年 6 月第一次印刷 印张:15

字数:302 000

定价:29.80 元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

微生物学实验教程系列编委会

主 委 员	任	李季伦	中国农业大学
	员	李季伦	中国农业大学
		陈文新	中国农业大学
		邢来君	南开大学
		陈冠军	山东大学
		赵良启	山西大学
		顾桂芬	中国农业大学
		楼慧强	中国农业大学
		何 群	中国农业大学
		李 颖	中国农业大学
		李大伟	中国农业大学
		王贺祥	中国农业大学
		封文海	中国农业大学
		宋 渊	中国农业大学
		袁红莉	中国农业大学
		文 莹	中国农业大学

《发酵工程实验教程》编委会

主 编 姜 伟 曹云鹤

编写人员 (按姓氏汉语拼音排序)

曹云鹤 (中国农业大学)

杜 鹃 (河北工程大学)

关 锋 (江南大学)

郭伟群 (国家粮食局科学研究院)

贺平丽 (中国农业大学)

姜 伟 (中国农业大学)

刘 凯 (山东农业大学)

吕利华 (山西大学)

王世伟 (中国科学院微生物研究所)

魏晓星 (青海大学)

朱瑞艳 (燕山大学)

主 审 宋 渊

总 序

中国农业大学生物学院微生物学科创建于 1958 年, 由原北京农业大学植保系和土化系的微生物学教研组合并组建而成, 是我国高等院校第一个农业微生物学专业。1981 年被国务院学位委员会列为第一批博士点, 1993 年被评为农业部重点学科, 2001 年被评为国家级重点学科。

本学科特色是研究、挖掘和利用丰富的微生物资源, 为农业生产服务。研究方向包括根瘤菌资源调查和系统发育学、固氮酶的生化机制及遗传调控、真菌生理及遗传学、药用及食用真菌学、微生物发酵工程、土壤和环境微生物学, 并在此基础上, 加强了微生物分子遗传, 增加了病毒学、免疫学和生物质能源等研究方向。1985 年, 原在植保系的微生物专业参与了中国农业大学生物学院的组建, 建立了微生物系, 于 2003 年更名为“微生物及免疫学系”。目前本系开设的本科生课程包括: 微生物生物学, 原核生物进化与系统分类学, 真菌生物学, 微生物生理学, 微生物遗传学, 微生物发酵工程, 食用菌学, 资源与环境微生物学, 病毒学及免疫学, 每门课程均有理论课和实验课。

本系俞大绂教授等老一代学者及多位已经退休的老师在微生物学教学思想、课程设置及团队建设等方面, 为学科发展做出了巨大的贡献, 也为后人的工作奠定了良好的基础。在教学中突出的特色是理论课程与实验课程的紧密结合, 特别是对于本专业入门的实验课程, 积极推进将“死标本”的观察转变为学生自行分离和观察活体标本, 使学生们从被动地接受知识转变为主动地参与学习, 有利于促进学生们掌握实验技能, 并锻炼思考和分析能力。这种教学理念和模式一直沿用至今。目前本系担任教学工作的是一支中、青年教师结合的队伍, 他们责任心强、思想活跃、虚心进取, 不断进行教学改革, 积极探讨在新的形势下, 如何正确解决“基础与创新”、“理论与实践”、“教学与科研”的关系, 认真履行着教师的职责。

本套实验教程的基本资料均来自教师们多年的积累。本系历来坚持教学与科研并重的原则, 在多年的发展过程中, 逐步规划将教师的科研方向与所承担的课程内容紧密相关, 保证教学内容中基础知识与前沿知识相结合, 很多实验设计出自任课教师的科研积累。大家齐心协力, 勇于创新, 不断更新实验教学内容, 使各门实验课程的教学工作一直受到学生的好评。

本系承担的 9 门本科生微生物学实验课程一直没有编写正式出版的教材。最近, 在大家的努力和领导的支持下, 各位主编在近年完成实验课教学大纲修订的前提下, 汇集了来自其他兄弟院校教师们的智慧, 终于完成 9 本实验教程的编写, 这是大家

共同努力的结果。

衷心感谢南开大学邢来君教授、山东大学陈冠军教授、山西大学赵良启教授欣然接受我们的邀请，不仅为本套教材的审稿付出辛勤劳动，同时作为本套实验教程编委会成员，为保证教材的质量献计献策。感谢中国农业大学生物学院领导的支持和“教育部高等学校专业综合改革试点”项目的资助，感谢来自兄弟院校全体参编教师们的认真合作。感谢科学出版社为编辑和出版本套教材所付出的努力。希望这套实验教程的出版，为本学科和相关学科读者的学习和工作带来有益的参考，也希望广大读者提出批评和建议，以便我们今后做出修改。



2014年1月

前 言

发酵工程是微生物学基础知识应用于生产实际的重要课程之一，是研究利用微生物大量生产各种有用物质的一门现代工业学科。它既研究生产过程与微生物的关系，又研究工程学的问题，包括研究改造或构建适合于工业生产的微生物菌种，研究创造合适的环境条件以使微生物积累某种产物和相关的工业设备，是现代生物技术的重要组成部分。同时，发酵工程也是一门实践性很强的学科，为了配合发酵工程的理论教学，我们编写了本实验教程。

中国农业大学是国内较早从事微生物学科研究和教学的大学之一，20 世纪 80 年代开设了《工业微生物学》和《农用抗生素》两门课程，后经课程改革于 90 年代将《工业微生物学》和《农用抗生素》两门课程合并为《发酵微生物学及其实验》；21 世纪初课改更名为《发酵工程及实验》；为了加强实践教学，2011 年再次课改形成《发酵工程》和《发酵工程实验》两门独立的课程，现为生物技术专业的必修课和全校的选修课。为了适应新时期的教学，我们组织编写了《发酵工程》和《发酵工程实验教程》。

本教程中的实验内容涉及菌种及其改造、发酵和检测设备的原理及使用方法、发酵条件优化、过程参数控制及能力提高等。既有一些基础及经典的发酵工程实验，又有利用现代分子生物手段进行菌种改造、构建及其发酵的实验；既设计了一些利用普通设备就能完成的实验，又设计了一些需要利用大型设备如液相色谱、质谱等才能完成的实验；既包括一些传统发酵产品如有机酸、氨基酸、乙醇、抗生素、酶制剂等的实验，又安排一些前沿性的实验如利用基因工程技术构建菌种而后进行重组蛋白质或酶的发酵实验。

本教程由中国农业大学、江南大学、燕山大学、山东农业大学、青海大学、山西大学、河北工程大学、中国科学院微生物研究所、国家粮食局科学研究院等单位的曹云鹤（实验三、实验七和实验二十六）、杜鹃（实验三十四）、关锋（实验十七、实验十八、实验十九、实验二十和实验三十一）、郭伟群（实验二十一）、贺平丽（实验十一、实验十二和实验十三）、姜伟（实验十、实验二十三、实验二十四、实验二十五、实验三十五和实验三十六）、刘凯（实验一、实验二、实验八、实验三十二和实验三十三）、吕利华（实验四、实验五、实验二十九和实验三十）、王世伟（实验二十二）、魏晓星（实验六和实验九）和朱瑞艳（实验十四、实验十

五、实验十六、实验二十七和实验二十八)共同编写,希望对读者掌握发酵工程的一些相关技术和操作有所帮助,由于作者水平有限,本书难免有不妥之处,敬请读者提出宝贵意见。

编 者

2014年3月

目 录

总序

前言

实验一 抗真菌的放线菌筛选	1
一、实验目的	1
二、实验原理	1
三、实验材料	2
四、实验步骤	2
五、实验结果	5
六、思考题	5
七、参考文献	6
实验二 蛋白酶产生菌的筛选	7
一、实验目的	7
二、实验原理	7
三、实验材料	8
四、实验步骤	8
五、实验结果	8
六、思考题	9
七、参考文献	9
实验三 海底淤泥中 β -半乳糖苷酶产生菌的分离纯化	10
一、实验目的	10
二、实验原理	10
三、实验材料	11
四、实验步骤	12
五、实验结果	15
六、思考题	15
七、参考文献	16
实验四 紫外线诱变	17
一、实验目的	17
二、实验原理	17
三、实验材料	18

四、实验步骤	18
五、实验结果	19
六、思考题	19
七、参考文献	20
实验五 亚硝基胍诱变	21
一、实验目的	21
二、实验原理	21
三、实验材料	22
四、实验步骤	22
五、实验结果	23
六、思考题	23
七、参考文献	23
实验六 大肠杆菌表达外源蛋白工程菌的构建	24
一、实验目的	24
二、实验原理	24
三、实验材料	28
四、实验步骤	28
五、实验结果	31
六、思考题	31
七、参考文献	31
实验七 毕赤酵母表达酶工程菌株的构建	32
一、实验目的	32
二、实验原理	32
三、实验材料	37
四、实验步骤	38
五、实验结果	42
六、思考题	43
七、参考文献	43
实验八 发酵微生物菌种的保藏与复壮	44
一、实验目的	44
二、实验原理	44
三、实验材料	46
四、实验步骤	46
五、实验结果	49
六、思考题	50
七、参考文献	50

实验九 BIOTECH-7BG-2002 型发酵罐的构造、原理及其使用方法	51
一、实验目的	51
二、实验原理	51
三、实验材料	52
四、实验步骤	52
五、实验结果	54
六、思考题	54
七、参考文献	54
实验十 Biostat C 42 D300 型发酵罐的使用原理及方法	55
一、实验目的	55
二、实验原理	55
三、操作步骤	58
四、思考题	62
五、参考文献	62
实验十一 高效液相色谱 (HPLC) 的原理及使用方法	63
一、实验目的	63
二、实验原理	63
三、高效液相色谱在微生物发酵工业中的应用	68
四、思考题	72
五、参考文献	72
实验十二 气相色谱的原理及其在发酵中的应用	73
一、实验目的	73
二、实验原理	73
三、气相色谱在发酵中的应用	74
四、思考题	76
五、参考文献	76
实验十三 质谱的原理及其在发酵中的应用	77
一、实验目的	77
二、实验原理	77
三、质谱技术在发酵工业中的应用	83
四、思考题	86
五、参考文献	86
实验十四 碳源种类及浓度对细胞生长及产物积累的影响	88
一、实验目的	88
二、实验原理	88
三、实验材料	89

四、实验步骤	90
五、思考题	91
六、参考文献	91
实验十五 氮源种类及浓度对细胞生长及产物积累的影响	92
一、实验目的	92
二、实验原理	92
三、实验材料	93
四、实验步骤	93
五、思考题	95
六、参考文献	95
实验十六 pH、温度及转速对细胞生长及产物积累的影响	96
一、实验目的	96
二、实验原理	96
三、实验材料	97
四、实验步骤	98
五、实验结果	99
六、思考题	99
七、参考文献	99
实验十七 玉米淀粉的乙醇发酵及乙醇含量测定	100
一、实验目的	100
二、实验原理	100
三、实验材料	102
四、实验步骤	102
五、实验结果	104
六、思考题	104
七、参考文献	104
实验十八 啤酒酿造	105
一、实验目的	105
二、实验原理	105
三、实验材料	107
四、实验步骤	108
五、实验结果	110
六、思考题	110
七、参考文献	110
实验十九 果酒酿造	111
一、实验目的	111

二、实验原理	111
三、实验材料	113
四、实验步骤	113
五、实验结果	114
六、思考题	114
七、参考文献	115
实验二十 固态法白酒的酿造、蒸馏及勾兑	116
一、实验目的	116
二、实验原理	116
三、实验材料	117
四、实验步骤	117
五、实验结果	119
六、思考题	120
七、参考文献	120
实验二十一 阿维菌素发酵、提取和检测	121
一、实验目的	121
二、实验原理	121
三、实验材料	123
四、实验步骤	123
五、实验结果	125
六、思考题	125
七、参考文献	125
实验二十二 链霉菌噬菌体的纯化和效价测定	126
一、实验目的	126
二、实验原理	126
三、实验材料	128
四、实验步骤	129
五、实验结果	129
六、思考题	130
七、参考文献	130
实验二十三 四环素的定向发酵、效价测定及提取	131
一、实验目的	131
二、实验原理	131
三、实验材料	133
四、实验步骤	133
五、实验结果	135

六、思考题	135
七、参考文献	136
实验二十四 管碟法检定四环素的生物效价	137
一、实验目的	137
二、实验原理	137
三、实验材料	138
四、实验步骤	138
五、实验结果	139
六、思考题	139
实验二十五 表达外源蛋白大肠杆菌工程菌的高密度培养	140
一、实验目的	140
二、实验原理	140
三、实验材料	142
四、实验步骤	142
五、实验结果	144
六、思考题	144
七、参考文献	144
实验二十六 重组毕赤酵母的高密度培养及酶的诱导表达	145
一、实验目的	145
二、实验原理	145
三、实验材料	148
四、实验步骤	148
五、实验结果	150
六、思考题	150
七、参考文献	150
实验二十七 谷氨酸的发酵及产物提取	152
一、实验目的	152
二、实验原理	152
三、实验材料	154
四、实验步骤	154
五、实验结果	155
六、思考题	156
七、参考文献	156
实验二十八 柠檬酸的发酵及产物提取	157
一、实验目的	157
二、实验原理	157

三、实验材料	159
四、实验步骤	159
五、实验结果	160
六、思考题	161
七、参考文献	161
实验二十九 酸乳及乳酸饮料的发酵	162
一、实验目的	162
二、实验原理	162
三、实验材料	163
四、实验步骤	163
五、实验结果	165
六、思考题	165
七、参考文献	165
实验三十 多聚羟基烷酸的发酵及产物提取	166
一、实验目的	166
二、实验原理	166
三、实验材料	168
四、实验步骤	168
五、实验结果	169
六、思考题	170
七、参考文献	170
实验三十一 产酸克氏杆菌固氮条件下的发酵培养及固氮酶活性测定	171
一、实验目的	171
二、实验原理	171
三、实验材料	173
四、实验步骤	173
五、实验结果	174
六、思考题	174
七、参考文献	174
实验三十二 酱油酿造	175
一、实验目的	175
二、实验原理	175
三、实验材料	177
四、实验步骤	177
五、实验结果	181
六、思考题	181

七、参考文献·····	182
实验三十三 米曲霉培养及蛋白酶的分析·····	183
一、实验目的·····	183
二、实验原理·····	183
三、实验材料·····	184
四、实验步骤·····	184
五、实验结果·····	185
六、思考题·····	186
七、参考文献·····	186
实验三十四 红曲的发酵及色素提取·····	187
一、实验目的·····	187
二、实验原理·····	187
三、实验材料·····	190
四、实验步骤·····	190
五、实验结果·····	191
六、思考题·····	192
七、参考文献·····	192
实验三十五 香菇菌丝体的固体培养和液体深层培养·····	193
一、实验目的·····	193
二、实验原理·····	193
三、实验材料·····	195
四、实验方法·····	195
五、实验结果·····	196
六、思考题·····	197
七、参考文献·····	197
实验三十六 猴头菇菌丝体的液体深层培养及猴头多糖的提取·····	198
一、实验目的·····	198
二、实验原理·····	198
三、实验材料·····	199
四、实验方法·····	200
五、实验结果·····	201
六、思考题·····	202
七、参考文献·····	202
附录Ⅰ 缩略词表·····	203
附录Ⅱ 实验常用培养基配方及其配制方法·····	204
附录Ⅲ 实验常用试剂的配制·····	218