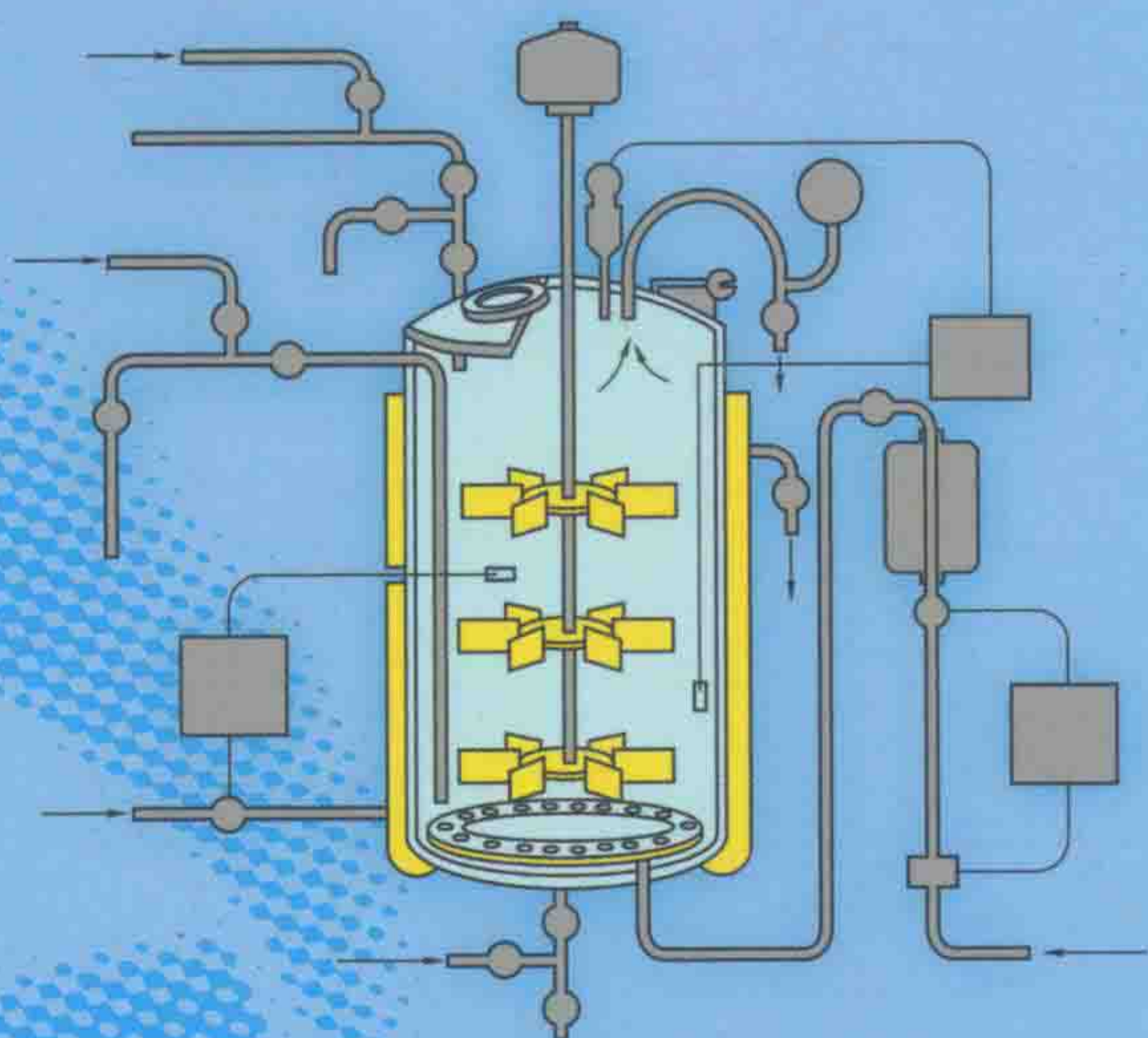




iCourse 教材
生物技术与生物工程系列



发酵工程实验教程

Practical Course of
Fermentation Engineering

主编 贾士儒 宋存江

高等教育出版社



729
68

发酵工程实验教程

Practical Course of Fermentation Engineering

主 编 贾士儒 宋存江

副主编 杨淑慎 钟 成

编 者 (按姓氏拼音排序)

蔡 峻 (南开大学)

陈守文 (湖北大学)

郭学武 (天津科技大学)

黄玉屏 (武汉大学)

贾士儒 (天津科技大学)

江 凌 (南京工业大学)

李江华 (江南大学)

刘 松 (江南大学)

刘建忠 (中山大学)

刘玉伟 (华东理工大学)

潘 力 (华南理工大学)

乔长晟 (天津科技大学)

谭之磊 (天津科技大学)

王 健 (吉林大学)

吴根福 (浙江大学)

徐庆阳 (天津科技大学)

杨淑慎 (西北农林科技大学)

张 健 (天津科技大学)

庄英萍 (华东理工大学)

陈 宁 (天津科技大学)

崔云前 (齐鲁工业大学)

韩培培 (天津科技大学)

冀志霞 (华中农业大学)

贾志华 (西北农林科技大学)

李国强 (南开大学)

林 影 (华南理工大学)

刘建党 (西北农林科技大学)

刘新利 (齐鲁工业大学)

马 挺 (南开大学)

彭 方 (武汉大学)

宋存江 (南开大学)

王 斌 (华南理工大学)

王淑芳 (南开大学)

辛明秀 (北京师范大学)

杨 超 (南开大学)

张 岗 (陕西中医药大学)

钟 成 (天津科技大学)

内容提要

发酵工程实验是生物工程、生物技术等专业的重要课程。考虑到本科教学的课程容量,本书采用“纸质教材+数字课程”的形式进行课程的构建和教材编写,兼顾基础性、前沿性和应用性。全书包括三部分,绪论,介绍实验室组成、安全性、实验方案设计、实验室守则以及实验用菌种;第一篇“单元实验”,共35个实验,包括发酵工程的前期准备和中间检测以及产物发酵与分离纯化实验;第二篇“综合实验”,包括聚羟基脂肪酸酯、短链脂肪酸、 β -半乳糖苷酶、发状念珠藻、红霉素、微生物脱硫和啤酒发酵等7个综合实验。

本书提供了与纸质教材相配套的数字课程。数字课程包含了选修实验以及与正文知识点相对应的知识拓展、深入学习、教学课件、视频资料、延伸阅读、电子表格、图片和参考文献等栏目,便于不同条件的学校开设实验课及学生的自主学习。

本书将国内外最新实验技术与作者科学研究相结合,联合我国教学实验用微生物菌种平台为读者提供低价实验用菌种是本教材的又一亮点。

本书可供从事发酵工程、生化工程、生物工程、环境工程和制药工程的广大高校师生作为实验教材,也可供科研院、所和工厂企业技术与管理人员使用。

图书在版编目(CIP)数据

发酵工程实验教程 / 贾士儒, 宋存江主编. -- 北京: 高等教育出版社, 2016.8

iCourse·教材: 生物技术与生物工程系列

ISBN 978-7-04-045180-1

I. ①发… II. ①贾… ②宋… 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(2016)第076789号

Faijao Gongcheng Shiyān Jiaocheng

项目策划 吴雪梅 王莉 单冉东

策划编辑 王莉 单冉东

责任编辑 田红 单冉东

封面设计 王凌波

责任印制 尤静

出版发行 高等教育出版社
社址 北京市西城区德外大街4号
邮政编码 100120
印刷 北京明月印务有限责任公司
开本 889mm×1194mm 1/16
印张 14.25
字数 420千字
购书热线 010-58581118
咨询电话 400-810-0598

网 址 <http://www.hep.edu.cn>
<http://www.hep.com.cn>
网上订购 <http://www.hepmall.com.cn>
<http://www.hepmall.com>
<http://www.hepmall.cn>
版 次 2016年8月第1版
印 次 2016年8月第1次印刷
定 价 29.00元

本书如有缺页、倒页、脱页等质量问题,请到所购图书销售部门联系调换

版权所有 侵权必究

物料号 45180-00

iCourse · 数字课程 (基础版)

发酵工程实验教程

主编 贾士儒 宋存江

登录方法:

1. 访问<http://abook.hep.com.cn/45180>, 进行注册。已注册的用户输入用户名和密码登录, 进入“我的课程”。
2. 点击页面右上方“绑定课程”, 正确输入教材封底数字课程账号 (20位密码, 刮开涂层可见), 进行课程绑定。
3. 在“我的课程”中选择本课程并点击“进入课程”即可进行学习。课程在首次使用时, 会出现在“申请学习”列表中。

课程绑定后一年为数字课程使用有效期。如有使用问题, 请发邮件至: lifescience@pub.hep.cn



iCourse · 教材
生物技术与生物工程系列

发酵工程实验教程

主编 贾士儒 宋存江

用户名

密码

验证码

9873

进入课程

注册

内容介绍

纸质教材

版权信息

联系方式

发酵工程实验教程数字课程与纸质教材一体化设计, 紧密配合。立足全面展示实验设计的目的、方法与结果并反映学科快速发展的趋势和成果, 数字课程涵盖了知识拓展、深入学习教学课件、视频资料、延伸阅读、电子表格、图片、参考文献等内容, 充分运用了多种形式的媒体资源, 丰富了知识的呈现形式, 更加贴合实验课程的实际需要。在提升课程教学效果的同时, 为学生学习提供了更多的思考和探索空间。

高等教育出版社

<http://abook.hep.com.cn/45180>

出版说明

“十二五”期间为高等教育继续深化改革、走以提高质量为核心的内涵式发展道路的关键时期。教育教学改革的核心是课程建设，课程建设水平对教学质量和人才培养质量具有重要影响。2011年10月12日教育部发布了《教育部关于国家精品开放课程建设的实施意见》（教高〔2011〕8号），开启了信息技术和网络技术条件下校、省、国家三级精品开放课程建设的序幕。作为国家精品开放课程展示、运行和管理平台的“爱课程（iCourse）”网站也逐渐为高校师生和社会公众认知和使用。截至目前，已有2600多门资源共享课和800多门视频公开课在“爱课程（iCourse）”网站上线。

高等教育出版社承担着“‘十二五’本科教学工程”中国家精品开放课程建设的组织实施和平台建设运营的重要任务，在与广大高校的调研和协作中，我们了解到当前高校的教与学发生了深刻变化，也真切感受到课程和教材建设所面临的挑战和机遇。如何建设支撑学生自主学习和校际共建共享的课程和新形态教材成为现实课题，在教育部高等学校生物技术、生物工程类专业教学指导委员会的指导下，结合我社2009年以来在数字课程建设上的探索和实践，我们提出了“高等学校生物技术与生物工程专业精品资源共享课及系列教材”建设项目，项目建设得到了众多高校的积极响应和广泛参与。2013年5月以来，分别在上海、天津、沈阳、杭州、武汉、无锡、银川等地陆续召开了项目启动会议、主编会议和编写会议。2015年，项目成果“iCourse·教材：生物技术与生物工程系列”陆续出版。

本系列教材涵盖生物技术、生物工程专业15门基础课程及专业课程，在出版形式、编写理念、内容选取和体系编排上有不少独到之处，具体体现在以下几个方面：

1. 采用“纸质教材+数字课程”的出版形式。纸质教材与丰富的数字教学资源一体化设计，纸质教材内容精炼适当，并以新颖的版式设计和内容编排，方便学生学习和使用；数字课程对纸质教材内容起到巩固、补充和拓展作用，形成以纸质教材为核心，数字教学资源配合的综合知识体系。

2. 创新教学理念，引导自主学习。通过适当的教学设计，鼓励学生拓展知识面和针对某些重要问题进行深入探讨，增强其独立获取知识的意识和能力，为学生自主学习和教师创新教学方法提供支撑。

3. 强调基础与技术、工程应用之间的紧密联系，注重学生应用能力培养。在讲述理论的同时，通过数字课程对学科前沿进展和工程应用案例进行延伸，在概念引入和知识点讲授上也尽量从实际问题出发，这不仅有助于提高学生的学习兴趣，也有助于加强他们的创新意识和创新能力。

4. 教材建设与资源共享课建设紧密结合。本系列教材是对各校精品资源共享课和教学改革成果的集成和升华，通过参与院校共建共享课程资源，更可支持各级精品资源共享课的持续建设。

本系列教材以服务于生物技术、生物工程专业课程教学为核心,汇集了各高校学科专家与一线教师的智慧、经验和积累,实现了内容与形式、教学理念与教学设计、教学基本要求与个性化教学需求,以及资源共享课与教材建设的一体化设计,以期对我国生物技术与生物工程专业教学改革和人才培养产生积极影响。

建设切实满足高等教育教学需求、反映教改成果和学科发展、纸质出版与资源共享课紧密结合的新形态教材和优质教学资源,实现“校际联合共建,课程协同共享”是我们的宗旨和目标。将课程建设及教材出版紧密结合,采用“纸质教材+数字课程”的出版形式,是一种行之有效的方法和创新,得到了高校师生的高度认可。尽管我们在出版本系列教材的工作中力求尽善尽美,但难免存在不足和遗憾,恳请广大专家、教师和学生提出宝贵意见与建议。

高等教育出版社

2015年6月

序

2016年8月国务院印发了《“十三五”国家科技创新规划》，明确了“十三五”时期科技创新的总体思路、发展目标、主要任务和重大举措。规划中提及的多个领域和若干重大专项均涉及生物技术。发酵工程是生物技术体系中五大工程之一，培养学生掌握好发酵工程实验技能，对于推动生物技术专业人才的培养，促进我国生物产业的发展具有重要意义。

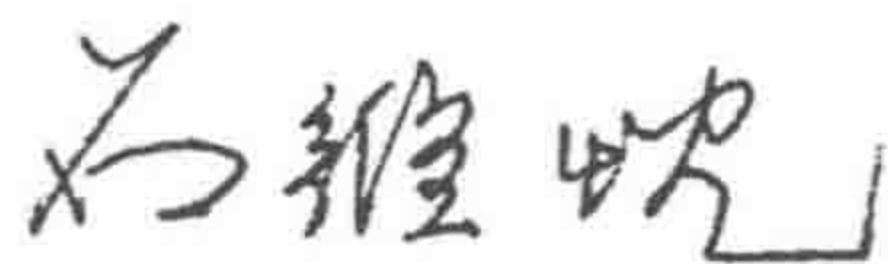
高等教育出版社出版的《发酵工程实验教程》由天津科技大学贾士儒教授和南开大学宋存江教授担任主编，参编单位包括国内十六所知名高校。编写人员具有丰富的教学和科研经验，充分把握发酵工程实验原理和技术特点，教材内容表述可谓深入浅出。第一篇精心设计的35个单元实验，涵盖了发酵实验准备、中间检测、发酵控制及产物分离纯化等发酵工程的各个环节；第二篇选取了发酵方式和发酵产品类型具有代表性的7个综合实验。全书既体现出对于发酵工程实验基本理论、基本技术和基本规律的强化，也体现出该领域的最新科研成果和产业应用在教学中的拓展。教材兼顾了基础性、前沿性和应用性，突出了理论、技术与应用之间的联系，有利于加深学生对发酵工程的理解，培养学生的创新思维和综合能力。

该书的出版形式新颖，全书包括纸质教材和数字课程。学生以纸质教材为参考完成实验操作，通过网络学习数字课程中与实验理论和操作相关的知识拓展、延伸阅读、视频录像等。这样的新形态教材使教学内容更加丰富，教学形式更加灵活，也便于学生的自主学习。数字课程中的选修实验提供了进一步开展发酵研究实验的空间，使实验的系统性进一步完善和提升。相信该教材一定会受到广大教师和学生的欢迎和认可。

高质量的实验教学是发酵产业培养创新人才的重要途径。促进人才培养，提升全行业创新能力也是中国生物发酵产业协会长期致力的目标。中国生物发酵产业协会将按照国家产业政策，积极为政府、行业服务，为大专院校提供科研成果转化平台。让我们共同努力，推动我国从生物发酵产业大国向着生物发酵产业强国迈进！

值此书出版之际，特书此以为序。

中国生物发酵产业协会
理事长



2016年8月12日

前言

《发酵工程实验教程》是在教育部生物技术与生物工程教学指导委员会指导下,以“高等学校生物技术与生物工程专业精品资源共享课及系列教材”建设项目要求为指南,按照高等教育出版社规划的“高等学校生物技术与生物工程专业课程系列教材”编写工作要点,结合近年发酵工程科学领域的发展以及发酵工程实验课的特点,由国内16所高校发酵工程一线的理论 and 实验课教师编写而成。

《发酵工程实验教程》的出版形式以纸质教材与数字课程相结合,兼顾基础性、前沿性和应用性,突出体现发酵工程实验教学的实用性。全书共分3部分,分别是:“绪论”,介绍实验室组成、安全性、实验室守则、实验方案设计以及实验用菌种;第一篇“单元实验”(共35个单元实验),包括发酵工程的前期准备和中间检测以及产物发酵与分离纯化实验;第二篇“综合实验”,包括7个有代表性的发酵工程综合实验——生物降解材料聚羟基脂肪酸酯的微生物发酵合成、利用厌氧杆菌高密度发酵生产短链脂肪酸、重组毕赤酵母高密度发酵生产 β -半乳糖苷酶、发状念珠藻细胞的培养、红霉素的微生物发酵生产、燃料油的微生物脱硫和啤酒发酵实验。

本书将部分实验设计为选修实验,以“数字课程”形式出版(在纸质教材的目录及正文中以 $\textcircled{e}$ 标识),便于有条件的学校根据自身情况拓展开设。同时数字课程还包括了与纸质教材相配套的知识拓展、深入学习、教学课件、视频资料、延伸阅读、电子表格、图片和参考文献等(资源类型及编号在正文边栏标出),为教师教学和学生提供了更多资源。

结合许多兄弟院校开设发酵实验所用微生物菌种的具体情况,编者联合“中国微生物菌种资源平台”所属的“高等学校实验教学用微生物菌种资源子平台”和“中国典型培养物保藏中心(CCTCC)”,承诺为开设本书所列发酵实验的学校提供菌种服务,即使用本教材便可低价获得相关的菌种。

本书由天津科技大学贾士儒教授、南开大学宋存江教授担任主编,西北农林科技大学杨淑慎教授和天津科技大学钟成教授担任副主编。参编单位包括南开大学、天津科技大学、西北农林科技大学、江南大学、武汉大学、浙江大学、华中农业大学、湖北大学、吉林大学、中山大学、华南理工大学、华东理工大学、北京师范大学、南京工业大学、齐鲁工业大学和陕西中医药大学等。

发酵工程技术发展日新月异。由于编者水平及时间所限,错误和不足在所难免,恳请广大读者予以批评指正,以便再版时更正。

编者

2015年12月

目 录

绪 论	1	四、发酵工程实验室守则	3
一、发酵工程和发酵工程实验	1	五、发酵工程实验中的发酵规模	4
二、发酵工程实验室的组成	2	六、发酵工程实验方案的设计	4
三、发酵工程实验室的安全性	2	七、发酵工程实验用菌种	9

第一篇 单元实验

第一单元 发酵工程实验前期准备	13	实验 11 发酵液的化学性质	
实验 1 玉米淀粉液化与糖化	13	分析 (二) ①	41
实验 2 淀粉质原料的水分测定	16	实验 11-1 邻菲咯啉比色法测定发酵	
实验 3 原料中粗淀粉 (总糖) 的		液中铁离子的含量	41
测定	17	实验 11-2 二乙基二硫代氨基甲酸钠	
实验 4 还原糖的测定	20	比色法测定发酵液中铜离	
实验 5 营养缺陷型的获得实验	21	子的含量	41
实验 6 发酵菌种的诱变育种实验	24	实验 11-3 邻甲酚酞比色法测定发酵	
实验 6-1 发酵菌种的物理诱变	24	液中钙离子的含量	41
实验 6-2 发酵菌种的化学诱变	26	实验 11-4 原子吸收分光光度计法测	
实验 7 发酵培养基的单因素和正交		定发酵液中金属元素 (钠、	
实验优化	27	钾、铁、铜) 的含量	42
实验 8 发酵罐原理与操作实验	32	实验 12 亚硫酸盐氧化法测定溶氧体积	
第二单元 发酵工程过程检测实验	36	传递系数 $K_L a$	42
实验 9 发酵液物理性质分析	36	实验 13 α -淀粉酶酶促反应动力学	
实验 9-1 毛细管法测定发酵液的		参数的测定	45
黏度	36	实验 14 发酵液中菌体浓度、还原糖的	
实验 9-2 旋转式黏度计测定发酵液的		含量测定	47
黏度	38	实验 14-1 发酵液中菌体浓度测定	47
实验 10 发酵液的化学性质		实验 14-2 发酵液中还原糖的含量	
分析 (一)	39	测定	49
实验 10-1 Folin-酚法	39	实验 15 发酵过程中有机酸和氨基酸的	
实验 10-2 考马斯亮蓝染色法	40	含量测定	51
		实验 16 发酵过程中产物的 HPLC 法	
		测定	55

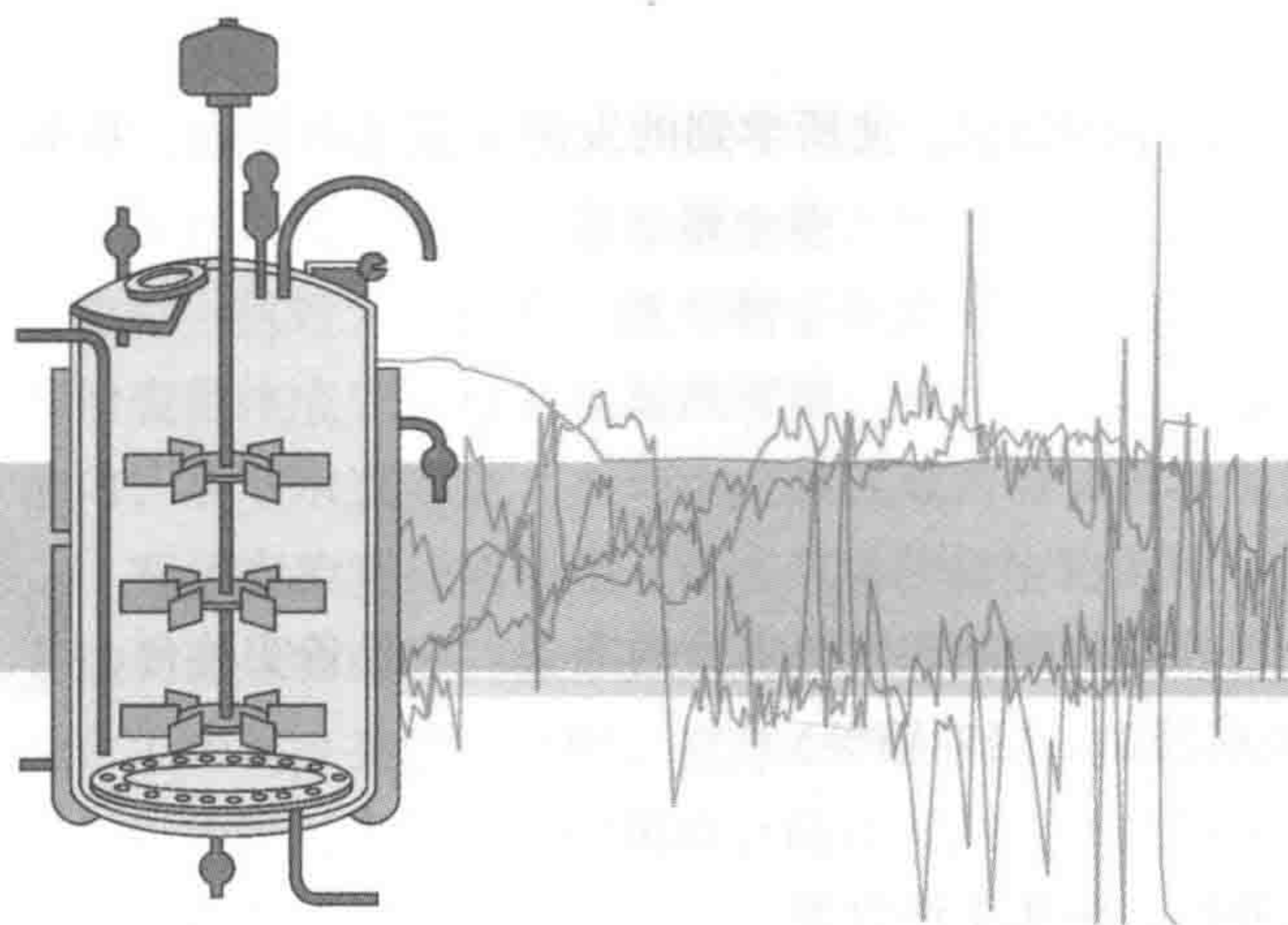
实验 17	SDS - PAGE 检测发酵液中杀虫蛋白含量	58	实验 24	黄原胶的发酵工艺实验	74
实验 18	红曲的生物学功能测定		实验 25	L - 缬氨酸的发酵工艺实验	79
	实验 ①	60	实验 26	酒精的发酵工艺实验	81
实验 18 - 1	红曲粗提物的自由基清除活性测定	60	实验 27	细菌黑色素的发酵工艺实验	84
实验 18 - 2	红曲中 Monacolin K 含量的测定	60	实验 28	红葡萄酒发酵工艺实验	86
实验 18 - 3	红曲淀粉酶活力的测定	60	实验 29	类胡萝卜素的 pH - stat 流加高密度发酵工艺实验	88
实验 18 - 4	红曲过氧化氢酶活力测定	60	实验 30	红曲菌的固态发酵	90
第三单元 发酵工程产物发酵实验	61		第四单元 发酵工程下游技术实验	95	
实验 19	面包酵母分批培养实验	61	实验 31	从发酵液中采用膜法分离提取 L - 色氨酸工艺实验	95
实验 20	微生物杀虫剂的发酵工艺实验	64	实验 32	超临界流体萃取发酵产物	98
实验 21	丝状真菌发酵生产糖化酶工艺实验	66	实验 33	采用离子交换法进行产物分离实验	99
实验 22	透明质酸发酵工艺实验	69	实验 34	采用蒸馏法进行产物分离的实验	102
实验 23	出芽短梗霉紫外诱变高产普鲁兰多糖低产色素菌株的发酵与产物提取	73	实验 35	采用喷雾干燥技术制备发酵产品实验	105

第二篇 综合实验

综合实验 I	生物降解材料聚羟基脂肪		实验 I - 9	PHA 样品沉淀、减压干燥、	
	酸酯的合成	111		核磁共振检测样品管的	
实验 I - 1	PHA 合成细菌的分离与			准备	123
	BIOLOG 分类鉴定	112	综合实验 II	利用厌氧杆菌高密度发酵	
实验 I - 2	微生物发酵法合成 PHA			生产短链脂肪酸	125
	(摇瓶)	117	实验 II - 1	合成短链脂肪酸的厌氧杆菌	
实验 I - 3	发酵罐的工作原理及			的分离与纯化——丁酸梭菌	
	操作方法	118		的分离及纯化	127
实验 I - 4	微生物发酵合成 PHA		实验 II - 2	厌氧杆菌高密度发酵的培养	
	(发酵罐)	119		基选择——丁酸梭菌的培养	
实验 I - 5	发酵液中基质葡萄糖的			基优化	129
	含量测定	120	实验 II - 3	纤维床固定化厌氧杆菌生物	
实验 I - 6	亚硫酸盐法测定溶氧体积			反应器的设计与构建	131
	传递系数	120	实验 II - 4	固定化厌氧杆菌发酵过程参	
实验 I - 7	发酵液固液分离及菌体			数的检测及控制——丁酸梭	
	冷冻干燥	120		菌的固定化批次发酵	132
实验 I - 8	PHA 的溶剂抽提和抽提液的		实验 II - 5	固定化厌氧杆菌的补料分批	
	浓缩	121		培养生产短链脂肪酸——丁	
				酸梭菌的固定化补料分批	
				发酵	134

实验 II - 6	适应性进化策略选育高产短链脂肪酸驯化菌——高产丁酸的丁酸梭菌适应性进化选育	135	实验 V - 2	红霉素产生菌摇瓶培养及培养条件优化实验	165
综合实验 III	重组毕赤酵母高密度发酵生产 β - 半乳糖苷酶	137	实验 V - 3	红霉素分批发酵及发酵动力学实验	168
实验 III - 1	产 β - 半乳糖苷酶菌株 <i>P. pastoris</i> GIHL 的种子培养	138	实验 V - 4	红霉素发酵中试生产工艺实验	172
实验 III - 2	全自动发酵罐发酵生产 β - 半乳糖苷酶	140	实验 V - 5	大孔吸附树脂分离提取红霉素碱实验	176
实验 III - 3	发酵过程中还原糖浓度的测定	142	综合实验 VI	燃料油的微生物脱硫	179
实验 III - 4	发酵液中残余甲醇的测定	142	实验 VI - 1	生物脱硫菌种的制备	180
实验 III - 5	β - 半乳糖苷酶活性的测定	143	实验 VI - 2	红平红球菌对硫源的选择性	182
实验 III - 6	β - 半乳糖苷酶发酵过程在线参数的检测与控制	146	实验 VI - 3	DBT 生物脱硫产物的定量分析	184
实验 III - 7	发酵生产 β - 半乳糖苷酶的多尺度参数相关分析	148	实验 VI - 4	30 L 自控发酵罐分批发酵法脱除 DBT 中的有机硫	185
综合实验 IV	使用光照生物反应器的发酵——发状念珠藻细胞的培养	152	实验 VI - 5	发酵液中 DBT 含量的测定	187
实验 IV - 1	发状念珠藻单体细胞的制备与保存	153	实验 VI - 6	DBT 脱硫产物在油/水两相中的分配系数测定	188
实验 IV - 2	液体发状念珠藻种子的制备	154	实验 VI - 7	利用休止细胞脱除模拟燃油中的有机硫	190
实验 IV - 3	光照生物反应器原理和使用	155	综合实验 VII	啤酒发酵实验	192
实验 IV - 4	藻细胞的采收与保存	156	实验 VII - 1	水的理化分析 ①	192
实验 IV - 5	发状念珠藻多糖的提取与纯化	157	实验 VII - 2	麦芽的理化指标分析 ①	193
综合实验 V	微生物的医药生产制造——红霉素的微生物发酵生产	160	实验 VII - 3	酒花的理化分析 ①	193
实验 V - 1	分离与纯化红霉素高产菌株的诱变选育实验	162	实验 VII - 4	麦汁的分析与检验 ①	193
			实验 VII - 5	啤酒酿造的上面发酵实验	193
			实验 VII - 6	上面发酵啤酒中试实验	196
			实验 VII - 7	发酵液和成品啤酒的分析	199
			主要参考文献 ①		





绪论

以生物农业、生物医药、生物能源、生物环境和生物制造为代表的现代生物技术产业在国民经济中发挥着越来越重要的作用。《国家中长期发展科学和技术发展纲要》把生物技术作为科技发展的五个战略重点之一。2012年12月国务院又颁布了《生物产业发展规划》要求进一步推动生物产业发展。培养生物工程专业人才是发展生物产业的前提。

为实现生物产业生产过程的高效率，人们使用基因工程、细胞工程、酶工程或蛋白质工程对细菌、动、植物细胞或者酶分子进行改造，其结果必须通过发酵过程得以实现。因此，发酵工程在生物技术体系中具有基础地位，发挥着不可替代的作用。

一、发酵工程和发酵工程实验

发酵工程是利用微生物或动、植物细胞的生长繁殖和代谢活动，获得有用物质的技术体系；是将传统发酵与现代的DNA重组、细胞融合、分子修饰和改造、基因组精简与优化等新技术结合并逐步完善而发展起来的现代发酵理论与技术。发酵工程的产品种类包括：抗生素、维生素、细菌素、氨基酸、核苷酸、酶制剂、酶抑制剂、有机酸、有机溶剂、菌体制剂、生物农药、生物材料和生物菌肥等。

发酵产品种类繁多，发酵菌种多种多样。但是，所有发酵工程都具有下列共性，即：发酵生产过程必须选择和优化培养基的组成；严格防止杂菌污染；合理设计种子培养系统，使之与生产过程合理配套；合理设计发酵系统，使之既能保证供气和节能，又能防止细胞或代谢物失活；选择合适分离方法，高效率低成本的从细胞或发酵液中分离、纯化、精制等。

发酵工程技术获得目的产物的前提条件是具有合适的生产菌种或细胞系、具备适合微生物或细胞生长、繁殖和代谢的工艺条件以及工业过程控制。

目前许多有重要价值的蛋白质等生物活性物质，必须借助动、植物细胞培养才能获得，例如病毒疫苗、干扰素、单克隆抗体等。已实现工业化和正在研究开发的产品有疫苗、单克隆抗体、酶、激素、长春花碱、紫草宁、可卡因等。市场的需要推动了动、植物细胞培养新工艺和新技术的发展，并成为现代生物技术中重要的组成部分。

发酵工程实验是为操作者或实施人员预先设计好的典型单元技术操作或典型综合发酵实验操作

的技术规范。通过发酵工程实验可以验证理论教学所学的知识,使所学到的发酵工程基本原理、基本理论和基本规律得到升华。

二、发酵工程实验室的组成

发酵工程实验室应包括以下工作室或工作区。

1. 准备室或准备操作区

配备有微生物实验室的基本设施,主要进行培养基的配制和发酵实验的准备。应具备实验台、电子天平、pH计、试剂架和试剂、玻璃器皿架和玻璃器皿、培养箱等。

2. 菌种室或菌种操作区

符合无菌技术要求的工作室,其内配备有紫外灯,净化工作台等。

3. 发酵室或发酵操作区

安装有蒸汽发生器、空气压缩机(为防噪音,有时安装于室外)、种子罐和发酵罐(一般两者体积比例可选择1:10)。

4. 分析室或分析操作区

具备相关分析仪器设备,如:显微镜、黏度计、离心机、紫外分光光度仪、气相色谱仪、高效液相色谱仪等。

5. 分离纯化室或分离纯化操作区

配备有分离纯化设备的相对独立空间,主要设备包括:离心机(配有大体积离心管)、超滤装置、微滤装置、实验型喷雾干燥装置、干燥箱等。

有些单位的发酵工程实验室是由通用实验室改造而成。这种情况下,可将实验室分成不同的操作区。值得注意的是:①所有的发酵罐、蒸馏装置和高压蒸汽灭菌器等应布局于远离分析仪器设备的区域;②对于大体积发酵罐的安装应考虑楼层的承重能力。

三、发酵工程实验室的安全性

发酵工程实验室的安全工作至关重要。实验室所有工作人员(教师和学生)应严格按照规章制度进行实验室操作。需要在以下方面加以注意。

1. 用电的安全性

发酵工程实验室安装有大量的用电设备,存在触电或失火的危险。实验操作人员由于接近水、发酵液及电力设备而具有潜在危险,需要专业人员定期检修电力设备、接地线、插座、电线等,使实验室潜在危险降到最低程度。应在发酵设备的适当位置安装剩余电流或接地泄漏断路器。实验室电路总闸应有明显标识,一旦发生事故,首先切断电源。

2. 化学品的安全性

有毒有害化学品的存放和使用应严格遵守有毒有害化学品存储和使用的方法规定,尤其是配制含有苯乙酸、苯氧基乙酸、苯酚等有毒或有腐蚀性的培养基组分时。操作人员应熟知安全操作、安全存储和安全移动的方法。室内的氮气瓶、氢气瓶和氧气瓶等都应严格按照压缩气体钢瓶的存放规范和使用规范进行操作。

进行发酵液pH调节的酸或碱也是应加以注意的化学药品。进行酸或碱操作时,需戴手套和保护镜。将酸或碱存储于防腐性容器内。勿将容器直接放在发酵罐表面,以防酸或碱液泄漏进入发酵系统的危险。酸或碱不使用时应存储于实验室通风橱的角落。

对酸或碱滴定液管路进行高压蒸汽灭菌时,需将贮罐及管路置于可进行高压蒸汽灭菌的防腐容器内,贮罐酸或碱装量不得超过总容积的2/3。一般不对滴定用的酸或碱液进行高压蒸汽灭菌,稀释时使用无菌水。注意应将酸或碱液加入至无菌水中。

3. 微生物的安全性

操作人员需穿实验服或微生物工作的专用服。普通工业微生物菌种对操作者、操作环境的危害可以忽略,执行无菌操作,既有利于发酵实验也有利于操作者和操作环境。但是,对于实验结束后,所剩的废菌体应先进行高压蒸汽灭菌,再行丢弃。可弃于便池中冲走。切忌未灭菌的废菌体直接倒入水池内,从下水道冲走(久而久之该区域内有该菌株噬菌体爆发的风险)。

有些实验室长期使用有潜在风险的微生物菌种,但也未见有操作人员感染,如铜绿假单胞菌。对于这类微生物菌种的操作除了严格执行无菌操作之外,还应选择垂直供风的净化工作台。在敞开的实验台上操作该类微生物时,应该在操作面上铺满一整块浸有消毒剂的纱布或其他有吸附性能的纺织品,以便及时吸收溢出的菌液,防止飞溅。一旦溢出,应立即消毒。进行接种操作时,严禁人员进出,工作区严格进行消毒等。

20世纪80年代,人们对于基因工程菌发酵生产的安全性有过激烈的争论。迄今还未见基因工程菌发酵生产造成安全问题的报道。其实,对于野生微生物菌种克隆或敲除一个或数个基因并不影响噬菌体对该菌株的侵入。不会在环境中造成不可控繁殖而出现生物安全性问题。但是,随着合成生物学的发展,人工构建的全新生命体、小基因组工业生产菌将会逐渐应用于发酵生产实践。对于这类微生物的发酵实验,依然要遵循严格的防泄漏准则,严禁这类微生物在环境中扩散,因为,对环境中是否存在针对全新的生命体的“噬菌体”不可知,小基因组工业生产菌株的噬菌体结合位点已被敲除,这类微生物扩散于环境中将会造成安全问题。

通常发酵罐需进行通气和搅拌,这样发酵液体的小微滴(0.01~10 nm)极易分散并悬浮于气体介质中,形成胶体分散体系——气溶胶。因此,需要在排气口安装防细菌扩散的过滤器。发酵罐正压运行时,微生物可从任何泄漏点向外扩散。为避免此类情况发生,应定期检查发酵系统的管路和罐体,对于损坏、磨损和泄漏的部件应及时更换。

4. 其他

所用的流通蒸汽及压缩气体也具危险性,应加以防范。所有实验室工作人员必须牢记:“在你开始操作前,确认你熟知如何安全的进行操作!”每一名新的实验室工作者必须进行安全教育之后,才可进入实验室。

四、发酵工程实验室守则

- (1) 实验人员应穿实验工作服进入实验室,按指定位置入座。
- (2) 室内禁止饮食、吸烟、嚼口香糖、含咽喉片等,实验中学生不用手触摸面部、揉眼等,尽量减少室内活动,无关人员禁入。
- (3) 非必需物品严禁带入实验室,必要的资料和书籍带入后,应远离操作台。
- (4) 实验开始前,学生应清点仪器、药品和用具,不得随意调换。如发现问题,及时报告。
- (5) 实验必须按步骤有序进行,仔细观察,详细记录,课后及时撰写实验报告。
- (6) 实验进行时,要爱护仪器、设备,节约试剂与药品。操作时,不清楚处及时与实验教师联系,严禁“先试试再说”的行为。
- (7) 严禁使用已被液体打湿的棉塞,硅胶塞通气处沾水后也严禁使用,以保证锥形瓶培养中的氧供给。
- (8) 实验结束后,检查各类电器、酒精灯等是否关闭,观察记录培养箱、冰箱温度及工作情况。将玻璃器皿清洗干净,置于指定位置。保持桌面、室内的整洁,实验老师宣布结束后方可离去。
- (9) 发酵罐取样值守人员,从种子液接入发酵罐开始,就进入工作状态,按规定取样观察发酵罐的运行情况,做好记录;值守人员夜班排班务必一个班次两人以上,分前、后半夜进行排班,避免事故隐患。

五、发酵工程实验中的发酵规模

发酵工程实验室区别于一般微生物实验室的特征在于配备有反应器,即发酵罐。发酵方式主要包括:分批发酵、补料分批发酵、连续发酵、固态发酵、高细胞密度发酵等。而发酵工程实验主要分为摇瓶发酵与反应器发酵两个层次。

1. 摇瓶(三角瓶、锥形瓶)发酵

摇瓶培养是发酵过程研究的基础,也是菌种制备不可缺少的步骤。发酵实验常用的摇瓶规格为250 mL、500 mL和1 000 mL等。

摇瓶可用于厌氧发酵(加盖橡胶塞,条件严格的可充氮后加盖橡胶塞,静置培养)。用于好氧发酵过程时,加盖棉塞或配有空气过滤器的硅胶塞,满足好氧需求,为了增加空气与发酵液的接触表面积,需将摇瓶置于摇床培养箱上进行培养,摇床培养箱也能使发酵液保持良好的混合状态。

对于需氧旺盛的发酵过程,可使用市售的带有挡板的摇瓶,也可以采用自行加工的带挡板的摇瓶来进行研究。自行加工摇瓶时,在瓶中烧接两个挡板就可以了,有时可在烧瓶底部烧结突起,同样可以起到挡板的作用。

摇瓶发酵过程中,需要在不断运动条件下才能保证氧的供给和良好的混合状态,需要特定的设备——摇床培养箱。在发酵过程中,摇瓶被固定于摇床上,通过摇床提供往复式或偏心旋转式的运动,摇瓶中的发酵液与空气充分接触,从而使氧的供给得到保证。

目前应用于发酵过程的摇床多种多样,从运动方式来讲有往复和旋转之分,从规模来讲有小型移动式与大型固定式等,从功能上区分有普通摇床和带参数检测及补料控制的摇床等。

2. 发酵罐发酵

微生物发酵是在发酵罐中进行。事实上,发酵的类型很多,从对氧的需求来讲有好氧与厌氧之分,从生物体反应来讲有微生物或动、植物细胞等,针对不同的发酵特点选用不同的发酵罐。一般来讲,对于发酵过程的研究,通气搅拌式发酵罐是最典型的,也是实验室首选的类型。

通用发酵罐系统包括:蒸汽发生器、空气压缩机(对于大于200 L的发酵罐还配有空气储罐)、发酵罐罐体(配有搅拌器和电机)、补料罐及其配套数字磅秤以及计算机控制机箱或上位机。不同制造商的发酵罐各有特点,采购时应根据实际使用进行选择。

在实验室建设时,建议根据学生数量,进行仪器分配使用。有些学校在建设发酵工程实验室时,一次性建立了种子罐(50 L)、发酵罐(500 L),相对完备的发酵生产线。总之,根据经费、各单位具体情况做好发酵罐的选型是非常重要的。

六、发酵工程实验方案的设计

发酵工程属实验性科学技术。欲高效的获得发酵实验结果,就必须进行缜密科学的实验设计,制订实验方案。

1. 选择研究的因素和水平

操作者必须选择需要研究的因素,包括因素的变化范围以及实施中这些因素的水平。在确立了检测方法后,需要控制这些因素在所希望的数值范围内。

首先,必须选择影响实验指标的关键因素。只有一个因素时,采用单因素实验。如具有两个以上的因素需要考察,就采用多因素实验。如对细菌进行培养基成分优化研究时,就可先采用单因素实验,分别确立最佳碳源、氮源、无机盐等,然后再使用多因素实验方法,确立各成分添加量。

因素水平的确定是依据不同的研究内容和因素特点来进行。水平过多时难以反映出各水平间的差异,也将加大工作量;水平数过少,将会使结果分析不全面。所以,水平数一定要在适当的范围内并保证水平间差异合理。如培养基中无机盐的添加,在数量上只有少量的差异就产生不同的效果,而培

养周期较长的微生物的培养时间水平间差异就会更显著。

2. 选择响应变量 (实验指标)

操作者应该确信所选响应变量能真正反映发酵过程变化的有效信息。这些响应变量最好是操作者亲自测定, 这样就可避免仪器测量误差只能显示相对大的效应因素的情况。

3. 设置对照实验

应考虑所研究的样本量、各实验的顺序、实验重复次数以及检测实验条件的阳性对照试验等。对照实验是科学研究常用的一种实验方法, 目的是通过对比实验的结果获得所研究因素对实验的影响作用, 从而为科学研究提供事实依据和直接证据。事实上, 在生物学领域有“没有对照就没有试验”的说法, 因此, 是否有适当的对照试验, 在许多情况下会影响研究的成果。

根据研究的目的与内容不同, 可选择不同的对照形式。例如, 进行发酵法生产聚羟基脂肪酸酯添加微量元素的发酵实验时, 添加微量元素为实验组, 不添加微量元素为对照组, 这样的对照为空白对照。进行几种微量元素添加量的比较实验时, 各个处理可相互对照, 不必另设对照组。这样就可较好的平衡和抵消无关变量的影响, 使实验结果更具有说服力。试验组和对照组进行处理间比较时, 除了实验处理之处不同外, 其他所有的条件应当尽量保持一致, 具有可比性。这样才能使处理间的比较结果具有可靠性。

4. 发酵过程的优化步骤

在发酵工程实验中, 影响最终结果的因素很多, 各种因素发挥的作用又不相同, 通常仅有个别因素起着决定性的作用。发现这些决定性因素是发酵工程实验的主要目标。

发酵过程的优化就是将影响发酵过程的所有因素最佳化, 使发酵产率达到最大。发酵过程的优化通常涉及普通微生物学、细胞工程、生物化学、生理、数学及计算机等。进行发酵过程的优化主要包括以下步骤: ①全部影响因素的确认; ②影响因素的筛选, 以确定各个因素的影响程度; ③根据影响因素和过程优化的要求, 选择优化策略; ④实验结果的数学或统计学分析, 以确定最佳条件; ⑤最佳条件的验证。

5. 常用的实验设计方法

发酵工程实验复杂, 影响因素种类众多, 如果对每种因素构成的可能实验条件组合全部进行实验研究, 那就需要进行很多次实验和耗费很长的时间。

通常实验设计方法包括非统计实验设计法和统计实验设计法。前者包括①单因子法, 方便简单, 但耗时费力, 不能检验交互作用, 每次实验只能检验一个因素; ②穷举法, 可考察所有可能点, 即多变量多水平的所有组合。但工作量极大, 难以实施。在穷举法中, 实验次数与因素、水平之间的关系呈指数函数的关系, 在因素和水平较大时, 发酵工艺实验将是一个非常复杂、耗时, 有时甚至是无法完成的任务。统计实验设计法具有高效率、较准确, 但需要较多数理统计知识。可选取少量有代表性的实验点, 统计分析整体规律, 在可能的实验空间里选择少量有代表性的实验点进行研究。

使用上述实验设计方法, 对一个3因素5水平的优化实验进行研究时, 非统计单因子法需要进行13次实验, 因为没有充分地探索实验空间, 很可能错过最优的实验点。穷举法(全面实验)需要进行 $5^3 = 125$ 次实验, 这种方法是有效的, 但是没有效率。采用统计实验设计法中的中心组合设计法, 有规律地选择少数有代表性的实验点, 对整个实验空间进行了全面探索, 仅需要进行15次实验, 就可能探寻出因子与效应之间的关系。显然, 该法是最有效率的研究方法。即通过较少的实验次数, 获得尽可能多的实验数据, 这是实验设计的“最高境界”。统计实验设计法主要包括: ①Plackett-Burman设计法; ②部分因子设计(fractional factorial design, FFD)法; ③中心组合设计法; ④Box-Behnken设计法等。

(1) Plackett-Burman 设计法

Plackett-Burman设计法是一种两水平的实验设计方法, 采用最少的实验次数, 评估因子的主效

果，适于从多个考察因子中快速筛选出重要的几个因子，为进一步优化研究提供便利。然而，该方法不能考察各因子的交互作用。通常作为过程优化的初步实验，用于确定影响过程的重要因子。本方法采用 Hadamard 矩阵。设计的准则为：

- ① 对 k 个因子，需要进行 $N = k + 1$ 个实验，为了进行方差分析，往往要求 k 至少包括 1~3 个虚构变量，即空项，且 k 为奇数。
- ② 每个因子取两个水平，用“+”“-”分别代表高和低水平，低水平为原始培养条件，高水平约取低水平的 1.25 倍，为避免掩盖其他因子的重要性，因子的高低水平差值不能过大，应依据实验条件而定。
- ③ 矩阵每行含“+”的数目为 $(k + 1) / 2$ ，含“-”的数目为 $(k - 1) / 2$ ，而每列含“+”、“-”的数目相等。
- ④ 矩阵第一行任意排列，但必须符合上述要求，最后一行全部为“-”；其余行以上一行的最后一列为该行的第一列，上一行的第一列为该行的第二列，以此类推。根据所设计的实验方案进行实验，分析实验结果，采用下面的一次方程描述各因子对目标 y 的影响：

$$y = a + E_{x_1}x_1 + E_{x_2}x_2 + \cdots + E_{x_i}x_i$$

每个因子对目标的影响 E_{x_i} 由下式计算：

$$E_{x_i} = \frac{\sum M_{i+} - \sum M_{i-}}{N}$$

式中， M_{i+} 为因子 x_i 在“+”水平上的目标实验值； M_{i-} 为因子 x_i 在“-”水平上的目标实验值。一般当 $E_{x_i} > 0$ 时，表明该因子在高水平时对目标的影响大；当 $E_{x_i} < 0$ 时，表明该因子在低水平时对目标的影响大。根据实验结果，计算出各因子的 t 值和显著水平。一般选择显著水平大于 90% 或 80% 以上的因素作为重要因素。 t 值由下列方程计算：

$$V_{\text{eff}} = \frac{\sum (E_d)^2}{n}$$
$$SE = \sqrt{V_{\text{eff}}}$$
$$t_i = \frac{E_{x_i}}{SE}$$

式中， E_d 是虚构因子对目标的影响，其值大小按前述的 E_{x_i} 的方程计算； n 是虚构因子的数量； V_{eff} 是实验误差；SE 是标准偏差。

表 1 是 Pujari 和 Chandra 采用 Plackett-Burman 设计方法，研究以 *Eremothecium ashbyii* 发酵生产核黄素过程中重要的影响因子。培养基中糖蜜、脱脂芝麻饼、 KH_2PO_4 和 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 对核黄素发酵的影响显著水平都大于 80%。所以，这些因子都是影响核黄素发酵生产的重要因子。

表 1 核黄素发酵的培养基优化 Plackett-Burman 设计方案与结果

	变量/水平*						
	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6	X_7
1	+	+	+	-	+	-	-
2	-	+	+	+	-	+	-
3	-	-	+	+	+	-	+
4	+	-	-	+	+	+	-
5	-	+	-	-	+	+	+