



普通高等教育“十一五”国家级规划教材

发酵工程实验

主编 李江华

发酵工程实验

FAJIAO GONGCHENG SHIYAN

主 编 李江华

参编人员 (按姓氏拼音排序)

陈 蕴 丁重阳 段作营 孙军勇

张东旭 张 梁 郑飞云 周景文



 高等教育出版社·北京
HIGHER EDUCATION PRESS BEIJING

内容提要

为了与目前高校所设“发酵工程实验”课程相适应,本教材在编排上打破实验分属各门课(生物化学、微生物学和发酵分析)的现状,按学科进行实验内容分类。

本教材包括三部分内容。第一部分为发酵工程实验基本知识,其中包括发酵工程实验室规范、发酵工程实验室常用仪器、实验中常见的操作技术和分析方法(第1~3章)。第二部分为发酵工程实验选编,所编实验既体现了生物工程的多学科特长,又结合了发酵工程的工程学特点,能使学生得到全面的锻炼。实验内容包括发酵微生物菌种的选育、传统的厌氧发酵产品(如酒精、黄酒、啤酒和葡萄酒等)、通风发酵产品(如酶制剂、氨基酸、有机酸、微生物药物等)、生物转化产品、基因工程产品和发酵产品的提取精制(第4~15章)。第三部分为发酵工程设计性实验,内容包括设计性实验的组织与实施和发酵设计性实验实例(第16章)。

本书可供从事生物工程、发酵工程、生化工程、环境工程和微生物制药工程的广大高校师生作为实验技术教材使用,也可供上述领域的企业生产、技术和管理人员参考。

图书在版编目(CIP)数据

发酵工程实验/李江华主编. —北京:高等教育出版社,2011.6

ISBN 978-7-04-032174-6

I. ①发… II. ①李… 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(2011)第128806号

策划编辑 王 莉

责任编辑 孟 丽

封面设计 于文燕

插图绘制 尹 莉

责任校对 刘 莉

责任印制 毛斯璐

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 北京北苑印刷有限责任公司

开 本 787×1092 1/16

印 张 15.5

字 数 370 000

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.landaco.com>

<http://www.landaco.com.cn>

版 次 2011年6月第1版

印 次 2011年6月第1次印刷

定 价 26.00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 32174-00

数字课程

发酵工程实验

登录以获取更多学习资源!

登录方法:

1. 访问 <http://res.hep.com.cn/32174>
2. 输入数字课程账号(见封底明码)、密码
3. 点击“LOGIN”、“进入4A”
4. 进入学习中心, 选择课程

账号自登录之日起一年内有效, 过期作废。

使用本账号如有任何问题,

请发邮件至: life@pub.hep.cn

发酵工程实验

内容介绍 | 纸质教材 | 相关资源 | 版权信息 | 联系方式

4A

学习中心

欢迎登录

账号

密码

LOGIN

内容介绍

本数字课程是普通高等教育“十一五”国家级规划教材《发酵工程实验》的配套资源, 共选编了20多项实验, 涉及实验基本知识、发酵酒及其感官评价、厌氧发酵产品、酶制剂、氨基酸、有机酸、微生物药物、基因工程产品、微生物转化、固态发酵等相关实验内容。作为一个开放式的网络教学平台, 本资源是教材内容的有力补充, 可供学有余力的学生和教师参考。

高等教育出版社版权所有 2011

<http://res.hep.com.cn/32174>

4A

序

发酵工程是现代生物技术的重要领域和组成部分,是生物技术在农业、医药、化工、食品和环保等领域应用发展的支撑点,是当今工业生物技术产业化的关键。20世纪90年代以来,随着生命科学和生物技术的飞速发展,作为工业生物技术核心的发酵技术本身发展迅速,内涵更加丰富、应用更加广阔,在社会经济中发挥着越来越重要的作用,同时行业对人才的需求也更为全面和完整。

自江南大学(原无锡轻工大学)建立国内首个发酵工程专业以来,半个多世纪过去了,在几代人的辛勤耕耘下,培养出一大批优秀的发酵工程学术带头人和高校的教师,成为我国发酵工业高级人才的摇篮,为我国国民经济和社会发展输送了大量的优秀人才,并建立了国内唯一的以发酵工程为主要内涵的国家生命科学与技术人才培养基地。本学科也成为国内发酵工程学科中第一个国家重点学科和江苏省“重中之重”学科。

《发酵工程实验》是由江南大学生物工程学院活跃在教学、科研一线的青年教师,总结发酵工程实验教学的需求而编写的实验指导书。本书既可供生物工程、发酵工程、生化工程、环境工程和微生物制药工程的学生作为实验技术教材使用,也可为上述领域企业的生产、技术和管理人员提供指导和借鉴。

伦世仪

中国工程院院士

江南大学生物工程学院教授

2010年12月

前 言

发酵生产已有数千年的历史,然而对发酵本质的认识和现代发酵工业的建立却只是近百年来发生的事情。随着微生物学、生物化学、遗传学、生物工程学、机械工程学等多学科领域的发展,发酵工业也取得了飞速的发展。目前,发酵工业涉及医药、食品、轻化工、饲料、环境治理、石油开采、贵金属冶炼等多种工业部门,在国民经济中的地位日趋重要。

发酵工程是发酵工业的支撑学科,也是生物技术产业化的关键,同时发酵工程又是一门实践性很强的学科。与课堂理论教学相比,其实验教学环节不仅是培养学生综合素质的重要方面,而且是培养学生动手能力和创新能力的重要环节。本教材以培养学生的基本素质、实验技能和实际工程意识为目标,在编排上打破实验分属各门课(生物化学、微生物学和发酵分析)的现状,按学科进行实验内容分类,以引导学生掌握发酵工程基础实验的基本原理、基本知识、基本技能和实验方法。本教材在保留必要的传统实验基础上,增加创新设计实验内容,能让学生真正掌握现有的和最新的发酵工程实验技能,并提高学生的综合动手能力和实验素质。此外,本教材特将发酵工程最新实验技术和国内现有的实验材料有机结合,具有较好的实践性和系统性。

本教材各章节的主要编写人员如下:第1、2、8、9章由李江华编写;第3章由陈蕴编写;第4章和第6章的啤酒部分由郑飞云编写;第5章由段作营编写;第6章黄酒和葡萄酒部分由孙军勇编写;第7、10、13、15章由丁重阳编写;第11、14、16章由张梁编写;第12章由周景文编写;第17章由张东旭编写。

江南大学生物工程学院堵国成教授对本书的初稿进行了严谨、细致的修改和审定,在此表示诚挚的谢意。

承蒙中国工程院院士、江南大学生物工程学院伦世仪教授为本书作序,谨代表全体编写人员表示衷心的感谢。

由于参编的老师众多,教学和科研任务繁忙,书中难免存在错误,敬请读者批评指正。

李江华
2010年12月

目 录

1	绪论	1
1.1	发酵工程的基本概念和范畴	1
1.2	国外发展趋势	1
1.3	国内发酵工业的现状	3
1.4	发酵工业发展的趋势	3
2	发酵工程实验的基本知识	4
2.1	发酵工程实验室规范	4
2.2	发酵工程实验室的常用仪器	9
	实验 2-1 高速冷冻离心机的使用方法 ^⑥	
2.3	发酵工程实验的常规操作技术	22
	实验 2-2 常用培养基的制备、灭菌与消毒 ^⑥	
	实验 2-3 用亚硫酸钠氧化法测定气液接触过程的体积传质系数 $k_L a$	34
	实验 2-4 微生物反应器的反应性能试验	36
	实验 2-5 停留时间分布的测定	38
3	发酵工程实验中常见的分析技术	42
3.1	化学分析法	42
	实验 3-1 原料粗淀粉含量的测定(旋光法)	42
	实验 3-2 还原糖的测定(费林法)	43
	实验 3-3 总蛋白含量的测定(Folin-酚试剂法)	45
	实验 3-4 总氨基酸(氨态氮)含量的测定(甲醛滴定法)	47
	实验 3-5 α -淀粉酶活力的测定(目视比色法)	48
	实验 3-6 糖化酶活力的测定	49
	实验 3-7 蛋白酶活力的测定	51
3.2	仪器分析法	53
	实验 3-8 紫外分光光度计法测定核酸含量	56
	实验 3-9 薄层层析法测定果品制品中的红曲色素	60
	实验 3-10 原子吸收法测定铅含量	64
	实验 3-11 高效液相色谱法测定功能性红曲中的麦角甾醇	70
	实验 3-12 气相色谱法测定山梨酸、苯甲酸含量	76
4	发酵微生物的菌种选育	77
4.1	自然选育技术	77

4.2	诱变育种技术	77
4.3	代谢调控育种技术	78
4.4	杂交育种技术	78
4.5	基因工程育种技术	78
实验 4-1	土壤样品中细菌的分离	79
实验 4-2	大肠杆菌紫外诱变及抗性突变菌株的筛选	81
实验 4-3	亚硝基胍诱变与细菌营养缺陷型突变株的筛选	84
实验 4-4	酵母原生质体融合育种	86
实验 4-5	质粒 DNA 的小量制备及电泳检测	88
实验 4-6	大肠杆菌感受态的制备与质粒转化实验	91
5	发酵酒及其感官评定	93
5.1	啤酒的发展历史	93
5.2	啤酒的分类及其风味特点	94
实验 5-1	啤酒辅料酿造特性的研究	95
实验 5-2	啤酒大麦小型制麦实验	97
实验 5-3	协定糖化法及麦芽指标分析	98
实验 5-4	糖化工艺及外加酶糖化法研究	101
实验 5-5	50 L 小型糖化设备麦汁制造实验 ^⑤	
实验 5-6	1 000 L 酿造设备啤酒酿造实验	102
实验 5-7	E. B. C 管式发酵实验 ^⑤	
实验 5-8	啤酒酵母小滴分离实验	105
实验 5-9	啤酒酵母极限发酵度的测定与比较	106
实验 5-10	啤酒酵母凝聚性的测定	107
实验 5-11	啤酒保质期的预测	109
实验 5-12	硫代巴比妥酸法(TBA)测定羰基化合物	111
实验 5-13	啤酒风味保鲜期的预测	113
实验 5-14	高级醇酯静态顶空气相色谱检测方法	114
实验 5-15	啤酒感官鉴定和啤酒风味品尝实验	115
5.3	黄酒	121
实验 5-16	黄酒中酒精度含量的测定 ^⑤	
实验 5-17	廉爱农法检测甜型和半甜型黄酒的总糖含量	122
实验 5-18	铁氰化钾滴定法测定干型和半干型黄酒中的总糖含量	123
实验 5-19	黄酒非糖固形物含量的测定	125
实验 5-20	黄酒中总酸和氨基酸态氮的测定 ^⑤	
实验 5-21	酵母细胞数、芽生率和死亡率的测定	126
实验 5-22	实验室规模的黄酒酿造实验	128
实验 5-23	甜酒酿的制作 ^⑤	
实验 5-24	从发酵醪液中分离优良的黄酒酵母菌	130

实验 5-25	黄酒的品评	131
5.4	葡萄酒	133
实验 5-26	酒精计法测定葡萄酒的酒精度	133
实验 5-27	费林滴定法测定葡萄酒和葡萄汁中总糖和还原糖 ^⑤	
实验 5-28	电位滴定法测定葡萄汁和葡萄酒中的总酸含量 ^⑤	
实验 5-29	实验室规模的葡萄酒酿造实验	133
实验 5-30	直接碘量法测定葡萄酒中的游离二氧化硫含量	135
实验 5-31	直接碘量法测定葡萄酒中的总二氧化硫含量	137
实验 5-32	葡萄酒的品评 ^⑤	
6	厌氧发酵产品	139
6.1	厌氧发酵主要产品及其应用	139
6.2	厌氧发酵工艺	140
实验 6-1	酵母菌的形态结构观察及测微技术 ^⑤	
实验 6-2	酒精发酵液中酵母菌数量的测定 ^⑤	
实验 6-3	接种技术 ^⑤	
实验 6-4	常规酒精发酵的过程观察	141
实验 6-5	酒精发酵的常规检测	142
实验 6-6	不同原料酒精发酵的比较	143
实验 6-7	不同料水比酒精发酵	144
实验 6-8	30 L 发酵罐酒精发酵	145
实验 6-9	丙酮丁醇发酵实验	146
7	酶制剂	148
7.1	酶制剂的发展概况	148
7.2	酶制剂的分类	148
7.3	酶制剂的应用	149
实验 7-1	α -淀粉酶产生菌的筛选 ^⑤	
实验 7-2	中温 α -淀粉酶的摇瓶发酵实验	150
实验 7-3	紫外线诱变选育 α -淀粉酶高产菌株 ^⑤	
实验 7-4	黑曲糖化酶产生菌的分离 ^⑤	
实验 7-5	糖化酶的发酵和提取实验 ^⑤	
实验 7-6	双酶法制备淀粉糖	151
实验 7-7	真菌 α -淀粉酶固态发酵实验 ^⑤	
实验 7-8	吸附法制备固定化脂肪酶	154
实验 7-9	固定化脂肪酶催化非水相合成己酸乙酯	156
实验 7-10	纤维素酶降解壳聚糖	157
8	氨基酸	159
8.1	氨基酸工业的概况	159
8.2	氨基酸的分类	159

8.3 氨基酸的生产方法	160
实验 8-1 谷氨酸产生菌的分离 ^⑤	
实验 8-2 L-赖氨酸摇瓶发酵	160
实验 8-3 抗反馈调节突变型——赖氨酸高产菌株的选育 ^⑤	
实验 8-4 固定化细胞法生产 L-丙氨酸	162
实验 8-5 离子交换法制备 γ -氨基丁酸	165
实验 8-6 ϵ -聚赖氨酸生产菌的筛选 ^⑤	
9 有机酸	168
9.1 有机酸的分类	168
9.2 有机酸的发展概况	168
9.3 有机酸的生产方法	169
实验 9-1 乳酸摇瓶发酵实验 ^⑤	
实验 9-2 L-乳酸 5 L 发酵罐发酵实验	169
实验 9-3 柠檬酸摇瓶发酵实验 ^⑤	
实验 9-4 柠檬酸 25 L 罐发酵实验	172
实验 9-5 苹果酸发酵实验	173
10 微生物药物	175
10.1 微生物制药的概论	175
10.2 微生物药物的分类	176
实验 10-1 乳酸链球菌素产生菌的筛选 ^⑤	
实验 10-2 紫外线诱变原生质体筛选四环素高产菌株	177
实验 10-3 微生物发酵法产 L-精氨酸 ^⑤	
实验 10-4 发酵法制备维生素 B ₂	179
实验 10-5 发酵法制备硫酸庆大霉素	181
实验 10-6 微生物法生产肌苷酸 ^⑤	
11 基因工程产品	184
11.1 基因工程产品发展的概况	184
11.2 基因工程产品的主要种类	185
11.3 基因工程产品的应用	185
实验 11-1 芽孢杆菌植酸酶基因在毕赤酵母中的表达	185
实验 11-2 植酸酶基因工程菌毕赤酵母 GS115 phyc 发酵条件的优化 ^⑤	
实验 11-3 重组毕赤酵母生产植酸酶的流加策略	192
实验 11-4 人白细胞介素 7 重组蛋白基因在大肠杆菌中的克隆与表达 ^⑤	
实验 11-5 异源表达人白细胞介素 7 重组蛋白基因大肠杆菌发酵的优化 ^⑤	
实验 11-6 少根根霉脂肪酶在枯草芽孢杆菌中的表达	194
实验 11-7 少根根霉脂肪酶基因在重组枯草芽孢杆菌表达条件的优化 ^⑤	
12 其他新型发酵产品	199
12.1 功能性糖及其衍生物	199

12.2	新型发酵饲料	199
12.3	新型发酵饮料	200
	实验 12-1 灵芝发酵生产灵芝多糖	200
	实验 12-2 秸秆饲料的制备方法	201
	实验 12-3 南瓜乳酸发酵饮料的制备方法	202
13	微生物转化	204
13.1	微生物转化的概述	204
13.2	微生物转化的方法	204
13.3	微生物转化的应用	205
	实验 13-1 微生物转化葡萄糖生产乳酸 ^⑤	
	实验 13-2 酿酒酵母固定化法生产乙醇 ^⑤	
	实验 13-3 两相体系中微生物转化法制备依西美坦	206
	实验 13-4 固定化黄色短杆菌生产苹果酸 ^⑤	
	实验 13-5 静息细胞转化法合成天麻素	208
	实验 13-6 嗜麦芽黄单胞菌渗透细胞生物转化生产熊果苷	209
	实验 13-7 羧基还原酶的生物转化反应实验	211
14	固态发酵	213
	实验 14-1 固态发酵中的微生物生长	213
	实验 14-2 固态发酵的生物量的测定	214
	实验 14-3 α -淀粉酶固态发酵生产	215
	实验 14-4 固态发酵蛋白酶	216
	实验 14-5 纤维素原料的固态酒精发酵	217
15	发酵产品的提取与精制	219
15.1	发酵工程下游技术的概述	219
15.2	发酵产品提取与精制的单元操作	219
	实验 15-1 淀粉脱支酶的分离精制	220
	实验 15-2 从发酵液中制备高纯乳酸	223
	实验 15-3 冬虫夏草菌丝体发酵液中多糖的分离纯化	224
	实验 15-4 链霉素的分离纯化	226
	实验 15-5 红霉素的分离纯化	227
16	发酵设计性实验	229
16.1	设计性实验的组织与实施	229
16.2	发酵设计性实验的实例	230
	实验 16-1 支链氨基酸转氨酶产酶微生物的筛选、鉴定和发酵	232
	实验 16-2 α -酮戊二酸的发酵、提取和产品检测	233
	实验 16-3 天然生物活性物质的分离纯化和检测	234

1 绪 论

发酵工业是我国生物产业的重要组成部分,年产值超过 6 600 亿元,其中氨基酸、抗生素、维生素、有机酸、酶制剂、发酵食品等在全球占有举足轻重的地位。

国务院在“国家中长期科学和技术发展规划纲要”中已明确将工业生物技术的流程绿色化、自动化及装备现代化列为今后发展的重点,并在《促进生物产业加快发展的若干政策》中指出,要大力发展发酵工业产品,促进生物技术向工业领域渗透,实现大幅节能减排与经济增长。

1.1 发酵工程的基本概念和范畴

工业发酵是现代生物学、化学与工程科学的完美交叉。它是利用一切微生物的代谢作用,通过现代工程技术手段把微生物细胞或其酶直接应用于生物反应器中,利用再生资源进行有用物质生产和社会服务的技术。多年以来,由发酵工程理论主导的发酵工业几乎是我国工业生物技术产业的代名词。随着基因组学、蛋白质组学等生物技术的飞速发展,工业发酵作为生物技术的一个重要分支,已经渗透到农业、食品、医药、化学品、能源、材料等许多领域。人们普遍认为发酵工程与基因工程、酶工程、细胞工程一样,是生物工程的重要组成部分。工业发酵是以可再生生物资源为原料,以微生物或酶为催化剂进行物质转化,大规模生产人类所需的产品的一个很大的产业,因而被认为是解决人类目前面临的资源与能源、食品与营养、环境与健康等重大问题的关键技术之一,是实现人类社会可持续发展的有效手段。

1.2 国外发展趋势

发酵工程技术是建立在 21 世纪发展最快的前沿科学生物科学基础上的生物技术的重要研究方向,也是生物技术的第三次浪潮“工业生物技术”的核心技术。国际上现代生物技术日新月异,生命科学基础研究的巨大成就加速了工业发酵产业的发展。目前,国外工业发酵技术的发展概况如下:

1.2.1 工业发酵与生命科学前沿技术紧密结合,促进了工业发酵技术水平的现代化

人类基因组计划(human genome project, HGP)的成功,使得生命科学研究已进入后基因组时代(post-genome era),研究的重点由结构基因过渡到功能基因研究。基因组学、功能基因组学、蛋白质组学、生化代谢网络、系统生物技术等突飞猛进的发展,大大提升了工业发酵技术的研究水平。微生物资源库和微生物功能基因组学技术的应用,工业发酵菌种与酶蛋白的快速定

向改造新技术的应用,对微生物代谢网络深入研究及 DNA 重组技术、基因克隆技术、改变微生物代谢途径等前沿与关键技术研究是该领域的主要发展趋势。

近年来,大量采用基因重组技术改造原有菌种,大幅度提高了工业发酵的产量,特别是在酶制剂产品方面。国外在非食品领域已有 80% 左右的产品使用基因工程和蛋白质工程技术改造生产菌种和产品,不仅产量获得了大幅度提高,而且产品性能也明显改善。基因重组技术在氨基酸工业、有机酸工业、抗生素工业领域等的应用也取得了很好的进展。如采用基因工程菌,苏氨酸和苯丙氨酸的产酸水平分别提高了好几倍。

1.2.2 发酵技术与化学化工以及过程工程的技术集成发展模式,使得工业发酵产业快速发展,已成为新的经济增长点

发酵代谢过程中的酶催化反应(即生物催化)及其机理,从细胞及基因水平上研究发酵过程,从分子水平上研究发酵过程中的化学反应,体现了生物学科与化学学科的交叉。发酵生产的生物催化剂(酶或细胞),用于催化生物化学反应过程,生物催化剂固定化,能像化学催化剂固相化一样反复多次使用,发酵罐也能制造成化学反应器那样进行操作与调控。同时,生物催化剂的高度立体选择性极大地促进了酶在手性化合物合成中的应用。目前,已有近百个生物催化的手性产品成功实现产业化,产值超过 150 亿美元,并且以每年 10% 以上的速度在迅猛增长。

近百年来化学化工的成就令人瞩目,应用生物催化工艺可以逐步地部分解决发酵工业的升级改造问题,有利于将传统的发酵技术与近代的化学化工单元操作结合,变得可连续运转、可自动操作、可计算机控制,有利于发酵行业走新型工业化道路。应用生物催化工艺还可以使一些化工产品的生产用生物方法替代,采用生物催化剂的生产过程可在常温常压下进行,节约资源能源,环境友好,并能利用可再生资源,是一种绿色化学工艺。美国一份 21 世纪发展规划提出,到 2020 年,通过生物催化技术,将实现化学工业的原料、水资源及能量的消耗降低 30%,污染物排放和污染扩散减少 30%。

目前,发酵技术与化学化工以及过程工程的技术集成已出现一些认可的示范模式。特别是一些发酵产品与下游衍生产品或终端产品的结合,如美国杜邦公司通过构建基因工程菌一步法直接从葡萄糖发酵生产 1,3-丙二醇,准备替代原有的化学合成方法,并与原有生产 PTT 新型聚酯纤维制造联合,形成新的发酵化工生产模式,这成为 21 世纪初生物技术产业的两大标志性成果之一。另外,美国卡吉尔-陶化学公司开发和生产的乳酸-聚乳酸装置,使用发酵生产的 L-乳酸,使用二步聚合技术,生产可降解塑料聚乳酸,年产 13.6 万吨,产品的商品名为 NatureWork™,产品已被可口可乐公司、太平洋邓禄普公司等用于生产杯子、高尔夫球包装及食品包装等。在美国建成投产的这套乳酸-聚乳酸装置是迄今为止世界上最大的聚乳酸生产装置。

1.2.3 工业发酵技术产业发展迅猛,许多国际大公司纷纷加盟到以发酵为主题的生物技术行业

传统的发酵行业主要是指抗生素(如青霉素等)、食品(如饮料酒、味精等)等行业,而现代工业发酵几乎渗透到人民生活的方方面面,如医药、食品、农业、环境、能源、材料等几乎所有的工业领域。目前,全球工业发酵年销售额超过 1 000 亿美元,每年以 7%~8% 的速率增长。美国在大规模工业发酵技术生产化学品如农用化学品、精细化学品、大宗化学品、药物及高分子材

料等行业的产值已达 200 亿美元,超过了生物医药行业。从产品结构来看,工业发酵领域生产规模范围极广,有市场年需求量仅为千克级的重组蛋白发酵干扰素、促红细胞生长素等昂贵产品(价格可达数万美元/g),也有年需求量逾万吨的抗生素、酶、食品与饲料添加剂、精细与大宗化学品等低价位产品(有些价格不到 1 美元/kg),两者的市场份额几乎平分秋色。

包括工业发酵在内的工业生物技术,如生物塑料、生物橡胶、生物饲料、生物肥料、生物增塑(韧)剂、生物防腐剂、生物乳化剂、生物降解剂、生物化妆品、生物基化学品,以及生物制药、生物采油、生物冶金、生物监测和生物降解等一系列新的工业发酵产品和技术形成了一个庞大的现代生物技术工业体系,其产值已经在全球总 GDP 中占据了近 10% 的份额,并且呈现出强劲的增长势头。

现代工业发酵经过半个多世纪的发展,已形成了一个完整的工业技术体系。据报道,美国生物化工企业有 1 000 多家,西欧有 580 多家,日本有 300 多家。工业发酵行业企业既有诺华、捷利康等从事生命科学的跨国大公司,也有帝斯曼、诺维信、杰能科等大型的发酶和酶生产公司。世界上许多大型的化学工业公司正纷纷把注意力转向生命科学与生物技术,工业发酵行业的发展态势将在很长一段时间内不会有什么改变。一些国际著名的大公司如杜邦、嘉吉-陶化学、巴斯夫、德固塞、帝斯曼、三菱、住友等都已进入或开始进入工业生物技术领域,例如嘉吉-陶的发酵乳酸与 13 万吨聚乳酸装置,杜邦的发酵葡萄糖生产 1,3-丙二醇技术已经被美誉为全球工业生物技术的标志性成果。

1.3 国内发酵工业的现状

近 20 年来,我国的发酵工业一直持续快速发展。不同产品虽然发展速度不一,但大都呈几倍乃至数十倍的增长。

通过工业发酵技术,微生物(细菌、酵母和真菌)被培养并高效地将可再生碳水化合物(糖类)转化为各种有用产品,如柠檬酸、维生素、氨基酸、抗生素、酶制剂、生物杀虫剂、生物染色剂、生物表面活性剂、生物碱、类固醇等。工业发酵技术在食品、医药、精细化学品、生物能源、生物材料以及生物质资源化方面发挥着重要作用,对国民经济所作的贡献令人瞩目。

1.4 发酵工业发展的趋势

最近几十年来,以基因工程技术、细胞大量培养技术和生物反应器技术等为基础的工业发酵技术,已经成为农业、食品、医药、化工等国民经济行业的关键技术之一。在全球能源和资源日益紧缺的今天,利用我国丰富的生物可再生资源(尤其是秸秆等农副产品),采用发酵工程技术生产甲烷、乙醇、甘油、丙二醇、丙酮、丁醇等基础化学品,以及氨基酸、有机酸等替代化工原料,可缓解石油资源的压力,保障我国经济的可持续发展。进行与此有关的发酵工程技术的研究对我国实施能源替代战略和资源替代战略,实现我国工业发酵技术领域由“跟踪”到“自主创新”的历史性跨越,对建立起较为完善的具有自主知识产权的工业发酵技术和产品及设备的质量标准体系与监测控制体系,对推动我国工业发酵技术和产品的升级换代,初步建立起以高新技术为主体的工业发酵技术创新体系和产业体系,以及对迎接生物经济世纪具有重要意义。

2 发酵工程实验的基本知识

2.1 发酵工程实验室规范

2.1.1 发酵工程实验室的基本条件

发酵工程实验室主要是安装了一些先进装置的微生物学实验室,应该设计成在维持高安全标准的同时具有最大效率的实验室。实验室应提供舒适的研究环境,具有设计合理的操作区。实验室的总体设计取决于所分配空间的形状和尺寸,设计时实验室人员应与建筑师及工程师进行密切合作,以使设计方案经济上可行,而且能够满足研究人员的需求。

实验室的位置很重要,因为发酵实验室需安装较重的设备装置,这就要求实验室地板能承载一定的重荷。此外,还要便于实验室所需设备及大批化学药品的运送。实验室要求宽敞、明亮和通风良好,后者尤为重要,因为发酵实验室易于变得潮湿而使研究人员感到不适,最好安装空调以控制温度及改善空气质量。实验室所需空间不仅要便于常规的实验操作,还要便于发酵罐的清洁、拆卸及维修。同时,在实验室中需安装足够多的橱柜及架子,用以放置常用的玻璃容器、实验室用塑料制品以及发酵罐的附属设备。最好为每一发酵罐分配一个橱柜,专用于放置其备件及附属设备。对于发酵罐的通用备件如 O 形环、探头和连接管等,需设置一个中心仓库。实验室内所有器具需易于清洗、不易被溶剂溶解,且与所用的去污剂溶液不发生作用。

实验室一般分成两个或三个不同区域:① 湿地板区,这里安装所有的发酵罐、蒸馏装置、高压灭菌锅;② 通用实验区,用于培养基的配制、细胞干重以及黏度的测定等操作;③ 分析区,用于发酵液的分析,在一个装备良好的实验室中,分析区应具备如气液色谱(GLC)、高效液相色谱(HPLC)、分光光度计等。分析区应尽可能地远离湿地板区,以防止损坏精密的分析仪器。如有可能,所有分析仪器应分别安装在相邻的实验室内。发酵区所产生的湿度会严重影响分析仪器,导致测量不准确甚至完全失灵。发酵罐和离心机等辅助设备产生的振动,也有可能引起读数不准确,这对于天平尤为明显。如不能隔间放置,天平须置于石制工作台上,并尽可能地远离发酵区以减轻振动的影响。

发酵实验室的湿地板区:所有的发酵罐(包括台式发酵罐的其他类型)应置于湿地板区,以使喷溅或溢出的发酵液不会对实验室、操作人员或位于地板下面的装置造成损害。湿地板应符合两个主要标准:防滑(无论湿地板还是干地板)和易于清洗。但这两者是不易兼顾的,即防滑所需的粗糙表面较光滑表面易于存留污垢。在许多大城市具有专业的地板制造商,应该咨询最新的地板材料信息。所建造的湿地板应向中心的排水槽倾斜(但发酵罐应水平安装);排水槽本身应该向实验室的排水出口倾斜,排水槽上面需安装不锈钢或高强度塑料格栅以防止堵塞。

发酵实验室的干地板区:实验室的干地板区应该用表面光滑、不粘灰尘的无缝乙烯基薄板覆盖。实验室湿地板及干地板区的连接区是一潜在的危险区域,原因是乙烯基薄板遇水后变滑,因而在连接区设置一个可以干燥鞋子的区域是必要的。须对地板区进行定期清洁,可以根据所需的无菌程度来购买去污剂及消毒剂。由于装置及发酵罐内容物的性质,需要受过训练的操作人员来清洁湿地板。如果湿地板区较大,可使用消防水龙带进行清洁及冲洗。

2.1.2 发酵工程实验室的公用设施

发酵实验室的有效运转需要许多必要的公用设施来供应空气、蒸汽、水、电、煤气等。所需设施的先进程度取决于发酵研究的规模及其对设施的要求。对于专用的发酵实验室,所有的设施应能全天供应;对于较小的或多用途实验室,由于一般仅安装少数几个简单的发酵罐,则无须要求很高的公用设施。

2.1.2.1 空气

空气在发酵实验室中具有多种用途,例如用于发酵罐的通风、水力高压灭菌锅的操作和气体分析仪器的校准。

实验室发酵罐如果没有直接安装空气供应装置,而且置于没有空气供应的实验室中,则可购买与发酵罐相配套的空气泵以向罐中供应空气。隔膜泵是一种较为理想的泵,其容量变化很大,应根据罐的需求来购置。泵必须是无油的,并适合长期连续的使用。隔膜泵较便宜,如果仅需要对1~2个罐供气是可选用的。较大的发酵罐需要更先进的空气供应装置,这种情况下应购买空气压缩机。所选压缩机的类型及尺寸取决于实验室的情况。压缩机应能满足实验室当前和未来发展的需要。

发酵过程需向发酵罐中不断供给无杂质无菌的洁净空气,因此所用的空气压缩机必须是无油装置。但应注意有些声称产生无油空气的压缩机,并不是真正的无油压缩机。即使在正常运转时,也要防止油进入系统而导致管路及发酵液的污染。如果已安装了这类系统,在压缩机下游的空气管路必须有可靠的保护性过滤器,过滤器应该定期清洗、维修。

为了确保空气的连续、恒定供应,建议实验室中准备有两个空气压缩机,以便在一个失灵或出现故障后可由另一个来替代而保证空气的连续供给。注意应经常交替使用每一空气压缩机,以使压缩机均保持良好和防止因过度使用而迅速损坏。在供气管中安装空气贮罐(图2-1)可减少对压缩机的需求,也可从供气中去除冷凝液。使用两个压缩机的好处还包括可以在不中断空气供应的情况下对压缩机进行维护。对于压缩机安装于室内时,需安装消音装置以降低噪声污染。最好将压缩机安装在位于邻近发酵实验室的其他房间内。空气从压缩机出来后,经管路供应给发酵罐。管路可采用具有光滑内表面的非腐蚀性材料制成,以防止污垢的停留,也可以使用12.7 mm(0.5 in)的钢管,价格也较便宜。从空气压缩机出来的空气,通常以比所需压力高得多的压力输送到发酵罐中,因此需在压缩机的下游安装减压阀以及油水分离器(由于压缩空气在管路内的膨胀会形成少量的水,25℃下每升空气产生0.025 g水),所有的减压阀及油水分离器应定期清洗和维修。管路内所有的接头需能耐受空气输送的压力(通常为 $1 \times 10^5 \sim 2 \times 10^5$ Pa,这取决于所用的发酵罐),管路系统的安装需专业的水管工安装。

2.1.2.2 蒸汽

发酵实验室中需用蒸汽来对发酵罐进行灭菌、控制大型发酵罐的温度、对培养基进行高温

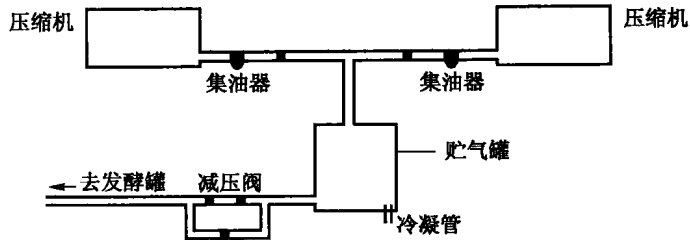


图 2-1 供气管中安装空气贮罐

高压灭菌等。每个发酵罐均需有其各自的蒸汽供应,可借助于闸门阀对蒸汽进行分离并控制。当发酵罐使用蒸汽用于温度控制时,或者高压灭菌锅负荷过重时,需要全天(24 h)供应蒸汽。如果实验室所在的建筑物本身能提供必要的蒸汽供应设施,那么只要将蒸汽接进发酵实验室或实验系统中。如果实验大楼中没有蒸汽供应系统,就需要向有关工厂购买配套的装置。

供应的蒸汽应尽可能干燥,实验室内所有的管路应加上防护套以防止形成冷凝水,套封对于保护实验室人员的安全也是重要的。套封最好以铝套覆盖以使其美观、易于清洗并防止套封材料变湿。对于空气供应,在管路中很有必要安装减压阀,应对其定期进行检测并清洗,蒸汽管路应由专业技术人员进行安装。

2.1.2.3 水

发酵实验室需要恒定供水,用于维持发酵罐的运行、发酵产品的下游处理、高压灭菌锅操作以及样品的分析等。主干线的水通常连接到发酵罐底盘的装置进口。一般发酵罐制造商会标明特定类型发酵罐可承受的最大入口压力,不同的发酵罐此压力是不同的,如小的实验室规模的发酵罐通常供水压力为 1×10^5 Pa,而小型的中试规模发酵罐则可达到 3×10^5 Pa。主干线水入口压力要满足实验室的需求;如果必要,可在每一容器的管路上安装减压阀,以便提供各种不同压力的供水。来自冷却或冷凝系统的废水需通过在底盘上的废水出管而流入排水管。废水出管一般用聚酯树脂、强化 PVC 材料或各种耐压管,也可通过安装的管(通常为铜管)直接进入排水管。实验室需要供应高质量的水,用于配制培养基及分析工作。有多种蒸馏装置可用于生产蒸馏水,蒸馏装置的大小取决于实验室的条件。如 HPLC、离子色谱等需要超高质量的水,因而需安装去离子系统。去离子系统有多种形式可供选择,每一系统装配有反渗透、吸附和去离子单元,以生产超纯净水。这类系统运行昂贵,每一单元的筒体需定期更换。其他一些基本的实验操作,如清洗玻璃容器及洗手等也需要水。发酵实验室也需要有一废水处理单元,尤其是当实验室处理菌丝体培养液时,如果没有前处理,废水则容易堵塞水槽。需设计一些小的实验台规模的水槽和水龙头,因为这些设备有多种用途,例如可进行真空过滤。

2.1.2.4 电

实验室需要电来照明和向各种机械装置及设备提供能量。照明设备的价格应适中,具有高功率的扩散器,尽可能减少噪声。实验室的电力供应要能满足所有装置及未来发展所需的容量。实验室许多装置耗能量较大,如小型的中试规模的发酵罐、高压灭菌锅及下游处理装置。因此专业的发酵实验室需供应三相电,三相电装置的安装可能较为昂贵,但这是必要的。实验室的每个发酵罐需要多个电源插座,用以向罐、泵及其他装置(如便携式 pH 计和溶氧计)供电,每一发酵罐最好使用具有 6 个插口的插座。在并非专门用于发酵的实验室里,可使用插座板,