



高等院校综合性研究型实验丛书

WEISHENGWU FAJIAO GONGCHENG ZONGHE SHIYAN CONGSHU

微生物发酵工程 综合实验原理与方法

宋存江 主编



南开大学出版社

微生物发酵工程

综合实验原理与方法

宋存江 主编

南开大学出版社
天津

图书在版编目(CIP)数据

微生物发酵综合实验原理与方法 / 宋存江主编. — 天津 : 南开大学出版社, 2012. 1

ISBN 978-7-310-03835-0

I. ①微… II. ①宋… III. ①发酵学: 微生物学
IV. ①TQ920.1

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2012) 第 006561 号

版权所有 侵权必究

南开大学出版社出版发行

出版人: 孙克强

地址: 天津市南开区卫津路 94 号 邮政编码: 300071

营销部电话: (022) 23508339 23500755

营销部传真: (022) 23508542 邮购部电话: (022) 23502200

*

天津泰宇印务有限公司印刷

全国各地新华书店经销

*

2012 年 1 月第 1 版 2012 年 1 月第 1 次印刷

787×1092 毫米 16 开本 12.375 印张 210 千字

定价: 25.00 元

如遇图书印装质量问题, 请与本社营销部联系调换, 电话: (022) 23507125

南开大学国家级微生物学类课程教学团队支持教材

本书编写人员

顾 问 刁虎欣 刘如林 梁凤来 邢来君 杨文博 蔡宝立 陈启民

主 编 宋存江

副 主 编 马 挺 李国强

编写人员 宋存江 马 挺 李国强 王淑芳 冯 露 蔡 峻 郭文斌

内 容 提 要

本书主要内容涉及五个综合性微生物发酵工程实验，包括生物降解材料聚羟基脂肪酸酯的微生物发酵合成、燃料油的微生物脱硫、谷氨酸的微生物发酵、黄原胶的微生物发酵和苏云金芽孢杆菌微生物杀虫剂的发酵制造。

为了使读者在使用中更深刻地理解微生物发酵工程的原理及规律，本书前半部分增加了微生物发酵工程理论知识与技术策略，内容包括：微生物发酵工程的共性问题、微生物发酵工程技术方法、微生物发酵工程下游分离纯化技术策略。

本书适合高等院校生物技术、生物科学、生物工程、制药工程等专业的本科生和研究生使用，也可供相关教师、科研和技术人员参考。

前 言

生物技术是一门迅速发展中的交叉学科，它是以生物学，特别是微生物学、遗传学、生物化学和细胞学的理论和技术为基础，结合化学工程等现代工程技术，运用分子生物学的最新研究手段操纵基因，定向改造物种，再通过适宜的生物反应器，对野生菌、“工程菌”或“工程细胞株”进行大规模的培养，以生产大量的有用代谢产物或发挥它们独特生理功能的一门新兴技术。生物技术包括四个部分，即基因工程、细胞工程、发酵工程和酶工程。基因工程和细胞工程的目的是获得工程菌或工程细胞株，发酵工程的目的是为野生菌株、工程菌或工程细胞株创造良好的培养条件，以充分发挥其内在潜力，为人们提供巨大的经济效益和社会效益。基因工程和细胞工程是生物工程的主导，发酵工程是生物工程的基础。所以发酵工程是生物技术专业和国家生命科学与技术人才培养基地班的必修课，掌握发酵工程的基本原理，熟悉发酵工程技术方法具有十分重要的意义。

作者所在单位南开大学的微生物学科是我国较早授予的国家重点学科之一，也是我国较早开设“微生物发酵工程”课程的理科院校之一。传统的实验教学模式包括：① 理论课教学内容的验证实验；② 理论课教学内容的延伸与拓展实验；③ 两者集成的综合性大实验。南开大学“微生物发酵工程”课程组在教学实践中，摒弃了传统的单元实验操作模式，以课程组老师的最新科研成果作为主要实验教学内容，探索开设了综合性研究型微生物发酵工程实验，包括：生物降解材料聚羟基脂肪酸酯的微生物发酵合成、燃料油的微生物脱硫、谷氨酸的微生物发酵、黄原胶的微生物发酵和苏云金芽孢杆菌微生物杀虫剂的发酵制造。本书的编写特点在于，每个综合实验由7~9个单元实验组成，使每个综合实验包含了多项实验训练内容。

参与编写本书的老师在教学和科研上都有着较为丰富的经验和研究成果，所以本书中的许多内容都有很强的可读性和可操作性，同时也是指导学生进行微生物发酵工程实验的参考资料。本书由南开大学生命科学学院微生物学系微生物发酵工程课程组的老师编写。“微生物发酵工程理论知识与技术策略”中“微生物发酵工程的共性问题”和“微生物发酵工程技术方法”由宋存江教授和冯露教授编写，“微生物发酵工程下游分离纯化技术策略”

由宋存江教授和王淑芳教授编写。“生物降解材料聚羟基脂肪酸酯的微生物发酵合成”由宋存江教授和郭文斌博士编写。“燃料油的微生物脱硫”和“谷氨酸的微生物发酵”由李国强副教授编写。“黄原胶的微生物发酵”由马挺副教授编写。“苏云金芽孢杆菌微生物杀虫剂的发酵制造”由蔡峻教授编写。本书由宋存江教授担任主编。

感谢南开大学微生物学类课程教学团队的大力支持！上海百仑生物科技有限公司朱连明先生提供了发酵系统管路和结构图。在此表示感谢！

限于编写人员的学识和水平，书中难免存在差错，敬请读者提出宝贵意见。我们的联系邮箱是：songcj@nankai.edu.cn。

编 者

2011 年 9 月于南开园

目 录

第一部分 微生物发酵工程理论知识与技术策略

一、微生物发酵工程的共性问题	3
(一) 菌种选育和优化技术	3
(二) 培养基的设计及其改良	4
(三) 发酵过程的优化与生物反应器	4
(四) 发酵行业清洁生产和废弃物资源化	6
二、微生物发酵工程技术方法	6
(一) 代谢产物的过量生产	7
(二) 提高初级代谢产物产量的方法	10
(三) 提高次级代谢产物产量的方法	11
三、微生物发酵工程下游分离纯化技术策略	12
(一) 微生物发酵产品的特点	12
(二) 分离纯化技术需满足的要求	12
(三) 下游工艺的技术特点	13
(四) 分离纯化方法应遵循的准则	18

第二部分 微生物发酵工程综合实验内容

综合实验一 生物降解材料聚羟基脂肪酸酯的微生物发酵合成	21
实验 1-1 PHA 合成细菌的分离与纯化	26

实验 1-2	利用计算机微生物分类鉴定系统进行微生物的分类鉴定	31
实验 1-3	微生物发酵法制备生物降解材料	
	聚羟基脂肪酸酯(摇瓶)	36
实验 1-4	发酵设备的工作原理及其使用方法	40
实验 1-5	微生物发酵法制备生物降解材料	
	聚羟基脂肪酸酯(发酵罐)	47
实验 1-6	发酵液中溶解氧和基质葡萄糖含量的测定	50
实验 1-7	发酵液的膜过滤和菌体的冷冻干燥	55
实验 1-8	PHA 的溶剂抽提和抽提液的浓缩	60
实验 1-9	PHA 样品沉淀、减压干燥、核磁共振检测样品管的准备	64
综合实验二	燃料油的微生物脱硫	68
实验 2-1	燃料油微生物脱硫菌种的制备	75
实验 2-2	红平红球菌对硫源的选择性	78
实验 2-3	DBT 微生物脱硫产物的定量分析	83
实验 2-4	30 L 自控发酵罐分批发酵法脱除 DBT 中的有机硫	85
实验 2-5	发酵液中 DBT 含量的测定	89
实验 2-6	DBT 脱硫产物在油/水两相中的分配系数测定	92
实验 2-7	利用休止细胞脱除模拟燃油中的有机硫	95
综合实验三	谷氨酸的微生物发酵	97
实验 3-1	谷氨酸摇瓶发酵	103
实验 3-2	发酵过程中还原糖的测定	105
实验 3-3	发酵过程中谷氨酸含量的测定	108
实验 3-4	谷氨酸发酵生产菌种的制备	112
实验 3-5	30 L 自控发酵罐分批发酵法生产谷氨酸	115
实验 3-6	谷氨酸发酵液超滤除菌体与离子交换回收	119
实验 3-7	谷氨酸含量及纯度的 HPLC 分析方法	122
综合实验四	黄原胶的微生物发酵	125
实验 4-1	野油菜黄单胞菌 NK-01 菌株摇瓶发酵黄原胶	133
实验 4-2	黄原胶高产菌株育种研究之一——紫外线诱变育种	135

实验 4-3 黄原胶高产菌株育种研究之二——高淀粉酶活性、 杆菌肽高抗性菌株筛选.....	138
实验 4-4 优化突变菌株的发酵培养基（单因素实验和正交实验） ...	142
实验 4-5 10 L 自控发酵罐分批发酵生产黄原胶	148
实验 4-6 从发酵液中分离提取工业级黄原胶	152
实验 4-7 黄原胶溶液性能测定	154
综合实验五 苏云金芽孢杆菌微生物杀虫剂的发酵制造	157
实验 5-1 苏云金芽孢杆菌菌株、伴孢晶体和芽孢的形态观察	158
实验 5-2 苏云金芽孢杆菌菌株分离及纯化	160
实验 5-3 苏云金芽孢杆菌 Total DNA 的提取、纯度测定和 定量分析	163
实验 5-4 PCR 检测杀虫基因	166
实验 5-5 苏云金芽孢杆菌 10 L 自控罐发酵	171
实验 5-6 苏云金芽孢杆菌毒力的生物测定	175
实验 5-7 SDS-PAGE 检测杀虫蛋白含量	178
参考文献	181

第一部分

微生物发酵工程理论知识与技术策略

生物技术是一门迅速发展中的交叉学科,它是以生物学,特别是微生物学、遗传学、生物化学和细胞学的理论和技术为基础,结合化学工程等现代工程技术,运用分子生物学的最新研究手段操纵基因,定向改造物种,再通过适宜的生物反应器,对野生菌、“工程菌”或“工程细胞株”进行大规模的培养,以生产大量的有用代谢产物或发挥它们独特生理功能的一门新兴技术。生物技术包括四个部分,即基因工程、细胞工程、发酵工程和酶工程。生物技术中凡利用微生物有机体及其代谢产物的技术,都称为微生物生物技术(Microbial Biotechnology)。

微生物生物技术是生物技术中重要的技术手段。它与化学工程技术紧密地交叉和结合,从而获得迅速发展,目前已广泛应用于生物化工原料的清洁生产、食品与饮料的制造、新药研制、生物燃料的开发、微生物燃料电池研发、石油开采、生物材料生产、微生物冶金、水体的微生物法净化、废弃物的资源化处理、持久性有机污染物(POPs)的治理、生物农药、生物菌肥、饲料及添加剂生产等诸多领域。

微生物发酵工程是微生物生物技术的主要组成部分,其理论知识与技术策略主要包括发酵工程中的共性技术、上游技术策略和下游技术策略等重要内容。所有这些内容是该领域工作者必须掌握的基本知识。

一、微生物发酵工程的共性问题

(一) 菌种选育和优化技术

当前发酵工业用微生物菌种发展的总趋势是从发酵菌转向氧化菌,从野生菌转向变异菌,从自然选育菌株转向代谢控制菌株、从诱发基因突变转向基因重组的定向育种。尽管工业菌种多种多样,但作为大规模商业化生产选择菌种应遵循以下原则:

- ① 可以在廉价原料制成的培养基上迅速生长,并生成所需的代谢产物,产量高;
- ② 可以在易于控制的培养条件下(糖浓度、pH 值、温度、溶解氧、渗透压等)迅速生长和发酵,且所需酶活力高;
- ③ 生长速度和反应速度较快,发酵周期短;
- ④ 根据代谢控制的要求,选择单产高的营养缺陷型突变株或调节突变菌种或野生菌种;
- ⑤ 选育抗噬菌体能力强的菌种,使其不易感染噬菌体;

⑥ 菌种不易变异退化, 保证发酵生产和产品质量的稳定;

⑦ 菌种不是病原菌, 不产生任何有害的生物活性物质和毒素(包括抗生素、激素、毒素等), 以保证生物安全性。

菌种的优化技术即菌种改良, 是微生物资源利用的关键步骤。为了生产目的产物, 一般要对选育的菌种进行改良, 以期提高产率和改善工艺性能。菌种改良的目的主要是: 提高产量、提高底物转化率、提高生产强度(以每升发酵液单位时间内所得到的产物表示)、提高产品性能、提高产品纯度、改变发酵途径获得新产品等。

菌种改良优化除了用传统的物理、化学、辐射诱变等方法外, 离子注入法也被广泛使用。目前, 分子微生物学方法是工业微生物菌种改良的最有效的手段之一。用DNA重组技术构建的工程菌株, 其中比较理想的并能用于工业化生产的基因工程菌应具备下列条件:

- ① 发酵产品要分泌型高浓度、高转化率和高产率;
- ② 菌株能利用常用的碳源(如糖蜜、淀粉等), 并可进行连续培养;
- ③ 菌株是非致病菌, 也不产生内毒素;
- ④ 发酵所产生的热量和需氧量都较低, 发酵温度适宜;
- ⑤ 容易进行代谢控制;
- ⑥ 目的基因最好为组成型并稳定表达, 重组的DNA不易丢失。

随着生命科学的不断发展, 合成生物学已渐渐得到人们的认可。采用合成生物学理念对菌株进行基因组精简也将成为工业菌种改良的方法之一。

(二) 培养基的设计及其改良

微生物培养基除了满足微生物的碳源、氮源、无机盐、微量元素、生长因子和水等营养之外, 必须遵循以下设计原则:

- ① 从培养的目的出发, 兼顾产物特征而配制培养基;
- ② 协调培养基的各个成分, 如: C/N;
- ③ 调整合适的理化环境, 如: pH值、渗透压、水活度、氧化还原电位等;
- ④ 力求经济节约, 牢记规模生产中的经济效益。

培养基的改良, 关键是考虑菌株在培养基中其功能是否发挥到了最大化。初期可以是生态型模拟配制, 随后可根据需要更换组分, 同时也可以采用多因素、多水平正交实验法或其他方法, 以提高工作效率。

(三) 发酵过程的优化与生物反应器

发酵过程优化是指在提供优良菌种的基础上, 在生物反应器中通过操作条件的研究或生物反应器的选型改造, 达到发酵产品生产的最优化(生产能

力最大、成本消耗最低、产品质量最高等)。

在工业发酵生产时,几吨或几十吨的生物反应器内的发酵原料被高温灭菌后,接入生产菌种,控制合适的温度、pH值、通入无菌空气,当控制不同的操作条件时,基本相同的接种量和投料量会得到完全不同的产量。足见过程优化的重要性。

为了发酵生产的需要,百种以上的发酵技术参数变化已被检测。耐温溶氧电极和pH电极的运用使得发酵全过程中的溶氧和pH值变化能够被检测。发酵全过程中的温度、通气量、罐压、生物量、中间代谢物、代谢途径中的酶和能量载体等通过各种原理的生物传感器实现了在线检测。这为计算机控制奠定了基础。人们将优化的发酵条件编程输入计算机,计算机根据发酵过程检测到的实时参数变化,进行自动控制调整。

采用恒化技术进行动力学研究,建立菌体生长、产物合成等的动力学模型是非常必要的。这样就可结合各种工程学技术,充分挖掘和利用生物菌种的潜力。以动力学为核心的研究方法,对于了解菌体细胞的生理特性是很有意义的。实际上,以动力学为基础和以最佳工艺控制点为依据的静态操作方法是化学工程动力学概念在发酵工程上的延伸。

发酵过程优化研究中,应考虑以下三个方面,即:

- ① 细胞代谢流的控制;
- ② 发酵过程的放大;
- ③ 发酵过程多尺度问题。

代谢流是处于一定环境条件下的微生物培养发酵体系中,参与代谢的物质在代谢网络的有关代谢途径中按一定规律流动,形成微生物代谢的物质流。代谢物质的流动过程是一种类似“流体流动”的过程,它具备流动的一切属性,诸如方向性、连续性、有序性、可调性等,并且可以接受疏导、阻塞、分流、汇流等的改造,也可能发生“干涸”和“泛滥”等现象。可以采用代谢工程提供的方法来推算代谢网络中代谢流的流量分布。

发酵过程的放大决不是简单的按比例关系的放大,至少包括有:

- ① 结合相似原理以及因次分析法的经验放大,提出单位体积功率相等、氧传递系数相等、剪切速率相等或混合时间相等的原则;
- ② 根据特征时间与速率成反比关系,通过基质消耗和生长、混合、流动、扩散、质量传递以及停留时间的比较,确定速率控制机制进行放大;

③ 对发酵过程进行深入研究,明确控制因素并作进一步局部相关研究,将研究的成果作为放大准则。

对于微生物菌种为主体的细胞大规模培养过程,实质上是在基因水平的分子尺度、代谢调节的细胞尺度和工艺控制的反应器尺度上相互关联而发生的。因此,细胞代谢物质流对于生物反应器物料流变化的相关性是多尺度问题的核心命题,是解决反应器多尺度问题的关键。

生物感应器是发酵工程的基本核心装备,它的设计、开发、制造是生物技术发展的共性和关键技术。结合发酵工程产品的特点和发酵工艺控制的特征,选择适当的生物反应器或者对生物反应器进行必要的结构改造也是发酵工程不容忽视的问题。

(四) 发酵行业清洁生产和废弃物资源化

清洁生产是指将综合预防的环境保护策略持续应用于发酵生产过程和发酵产品中,以期减少对人类和环境的污染风险。清洁生产从本质上来说,就是发酵生产在充分满足人类需要并使社会经济效益最大化的同时,又采取整体预防的环境策略,减少或消除其对人类及环境的危害。如:低能耗发酵生产工艺、结合废水处理回用的发酵生产工艺、采用CO₂低排生产菌种的发酵工艺、产品分离纯化避免使用氯仿等有机溶剂等。废弃物资源化已经被许多发酵企业所使用。如:谷氨酸生产产生的高浓度废水经浓缩后生产有机肥,非抗菌素发酵生产的废菌渣制备饲料添加剂,发酵生产副产物回收等,都是废弃物资源化利用的成功范例。

二、微生物发酵工程技术方法

在漫长的生物进化过程中,微生物细胞形成了完善的代谢调控机制,使细胞内错综复杂的代谢反应高度有序地进行;同时,还可对外界环境的迅速变化做出反应。在自然界,野生型微生物从不过量的合成或者积累自身所不需要的物质。然而,要想利用微生物发酵而“过量”生产人类所需的物质,就必须采用某些技术与方法打破或解除微生物细胞内正常的代谢调控机制,使微生物在“非正常病态”下产生并积累对人类有用的代谢产物,该技术称为代谢调控发酵。因此,在必须掌握微生物生长、繁殖和发育规律以及代谢产物合成积累和调控特征的基础上,才能使微生物尽其所能、造福人类。

适用的微生物发酵工艺应包括生产性能优良的菌株和合适的环境条件。从进化角度看,微生物代谢产物的过量生产,对细胞能量的利用和细胞物质