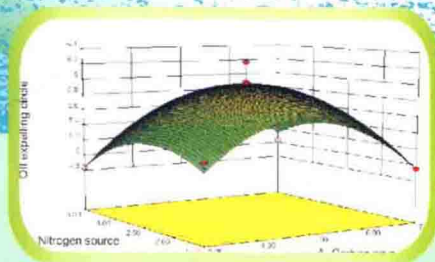


发酵工程实验简明教程

主 编 张祥胜



南京大学出版社

江苏省重点建设学科——生物工程学科
江苏省级特色专业——生物科学
盐城师范学院校级重点教材立项

资助出版

发酵工程实验简明教程

主 编 张祥胜

副主编 薛 菲 胡化广



南京大学出版社

图书在版编目(CIP)数据

发酵工程实验简明教程 / 张祥胜主编. — 南京:
南京大学出版社, 2014. 10

ISBN 978-7-305-14039-6

I. ①发… II. ①张… III. ①发酵工程—实验—教材
IV. ①TQ92-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2014)第 226010 号

出版发行 南京大学出版社

社 址 南京市汉口路 22 号 邮 编 210093

出 版 人 金鑫荣

书 名 发酵工程实验简明教程

主 编 张祥胜

责任编辑 贾 辉 蔡文彬

编辑热线 025-83686531

照 排 南京南琳图文制作有限公司

印 刷 扬州市江扬印务有限公司

开 本 787×960 1/16 印张 10.5 字数 200 千

版 次 2014 年 10 月第 1 版 2014 年 10 月第 1 次印刷

ISBN 978-7-305-14039-6

定 价 28.00 元

网址: <http://www.njupco.com>

官方微博: <http://weibo.com/njupco>

官方微信号: njupress

销售咨询热线: (025) 83594756

* 版权所有, 侵权必究

* 凡购买南大版图书, 如有印装质量问题, 请与所购
图书销售部门联系调换

张祥胜曾是我的博士研究生,专业方向侧重于离子束生物工程学,毕业后从事微生物学及发酵工程学等方面的教学和科研。这种跨专业的教研实践需要扎实的基础和较宽的知识面,他做到了。

欣闻他主编的发酵工程实验教材即将出版,值得肯定和祝贺!望继续努力,勇于探索,在发酵工程实验教学中取得更大成绩。

金增亮

2014年9月8日

代 序

近年来,部分普通地方高校也开设了发酵工程类的实验课程,这对同学们加强实践动手能力的培养很有必要。但是,这类实验课程与通常的工科院校的专业教育课程相比,在相关要求方面往往有较大差别,因而不适合采用通用的教材。本书的作者张祥胜等老师结合自己长期从事相关教学的经验,编写了这本《发酵工程实验简明教程》,满足了这方面的需求,很有意义。这本书突出了实用性,对实验条件要求不高,但内容涵盖了发酵工程上、中、下游的基本知识,详细具体,具有较强的可操作性,既可以用作普通地方高校工程实验教学的教材,也可以用于企业技术人员的培训。教材中还通过增加选做实验,并结合实用性较强的附表、附图等方式,使教材具有了一定参考书和自学书的作用。相信通过此书的初步推广和使用,将会进一步推动普通高校发酵工程实验课程的开设,推动我国生物工程技术和相关行业的发展进步。感谢作者们做出的积极努力和贡献!相信学生们和读者们会从中受益匪浅。



2014年4月7日

前 言

发酵工程实验是生物工程专业重要的必修课和生物科学、生物技术等专业的选修课,对于培养学生的专业技能和动手能力,提高专业素质具有举足轻重的作用。

2011年我校开始开设发酵工程实验课,由于各种原因,现行的发酵工艺教材无法满足教学要求。而现行的一些已出版的发酵工程实验指导书与在实验设计、培养目标上与实际教学实践又有较大差异,因此联合相关专业教师,根据自身的教学经验和历年讲义编写一本适合本单位或同类高校的发酵工程实验简明教程是非常必要的。在编写计划中,教材内容涵盖发酵工程上游、中游和下游技术,并结合教学实际,增加了一些内容。与现行教材相比,突出简明和实用,切合本校教学实际,从而方便教学和学生自学。同时我们注意以下几点:

一是按发酵工程生产实际,按上游、中游和下游的顺序有序地编写,即涵盖菌种筛选、菌种改良、摇瓶发酵条件优化、液体发酵罐和固体发酵罐操作、发酵产物提取、定性分析和定量分析,最后介绍几个发酵工艺实例,这样学生便于全面掌握发酵工程的基本操作。

二是增加了紧密结合教学实践,面向普通本科院校的教学条件,所有的实验均可在本单位开设,避免了形式主义和教材缺乏指导意义的现象。标明必做实验和选做实验,选做实验供学有余力的学生在课余进行。

三是结合本单位教师在发酵工程方面的有代表性的课题,以“生物表面活性剂产生菌”(细菌)和“产漆酶菌”(真菌)为主,编写教材内容,实现科研为教学服务,教学巩固科研成果的目的。兄弟单位如使用本教材,可对实验内容根据教师自身的课题进行适当调整,实验设计原则是一样的。

四是增加了丰富的插图和照片,以方便学生自学。

五是增加了实用性较强的附录,服务于学生的课余课题和考研工作。

山东大学微生物技术国家重点实验室主任曲音波教授审阅书稿并欣然序,中国科学院合肥物质科学研究院研究员余增亮先生也题词以表鼓励,在此对老前辈的鼓励表示衷心的感谢!

本书由盐城师范学院生命科学与技术学院组织编写,分工如下:薛菲编写

食品发酵实验;胡化广编写固体发酵罐实验,通读书稿并提出修改意见;张祥胜完成大纲,编写其他部分,并统稿。

教材是为教学服务的,离不开学生的参与。盐城师范学院生物工程专业104班张飞、陶冰洁、周冲、苗丽平等同学参与了书稿的校对和部分照片的拍摄。

标*者为选做实验,供学有余力的学生在教师指导下自主进行。本书在编写过程中,也引用了前辈的一些资料,未能一一注明引用,在此一并致谢!

尽管我们已经尽力,错误在所难免,甚至有贻笑大方之处,还请专家和同行不吝赐教指正,使之更加完善,更有利于教学。

编者电子信箱:yctu_shengwu@163.com

编者

2014年7月

目 录

第一篇 菌种分离筛选、改良和保藏	1
实验 1 种子培养基和发酵培养基的配制和灭菌	3
实验 2 产表面活性剂菌株的筛选	8
实验 3 产漆酶真菌菌株的筛选*	12
实验 4 工业微生物的紫外诱变	16
实验 5 工业微生物的离子束诱变*	20
实验 6 发酵菌种的保藏*	23
第二篇 摇瓶发酵	27
实验 7 发酵菌株生长曲线的测定	29
实验 8 摇瓶发酵工艺优化实验——单因素实验	32
实验 9 摇瓶发酵工艺优化实验——正交实验	35
实验 10 苯酚-硫酸比色法测定发酵液中鼠李糖脂的含量	39
实验 11 摇瓶发酵工艺优化实验——响应面实验*	42
第三篇 发酵设备	47
实验 12 液体发酵罐的操作	49
实验 13 固体发酵罐的操作	54
实验 14 啤酒发酵设备的操作	59
第四篇 发酵工程下游技术	67
实验 15 发酵产物的提取	69
实验 16 发酵产物红外光谱分析*	72
实验 17 发酵产物薄层色谱分析	76
第五篇 发酵工艺实例	79
实验 18 果酒的发酵	81

实验 19	酸奶的制作及乳酸菌的分离纯化	85
实验 20	泡菜制作与亚硝酸盐的测定 *	90
实验 21	毛霉的分离与腐乳的制作 *	94
实验 22	青霉素发酵及效价评价	97
附 录		101
附录 1	发酵工程实验室学生守则	101
附录 2	发酵工程实验室安全守则	102
附录 3	发酵工程实验室仪器使用安全说明	103
附录 4	发酵工程实验课的组织 and 实施建议	104
附录 5	实验方案参考样式	106
附录 6	实验报告参考样式	107
附录 7	值日生自查表	108
附录 8	本书中的培养基配方	110
附录 9	发酵工程相关的微生物实验常用操作	111
附录 10	微型啤酒发酵操作书	114
附录 11	编者已发表的代表性教研论文	118
附录 12	实验报告(样本)	126
附录 13	发酵工程实验设计常用软件操作要点	134
附录 14	常用学术网站	158
参考文献		159

第一篇

菌种分离筛选、改良和保藏

任何发酵工程的研究往往从发酵菌种的分离筛选、改良和保藏做起。本篇以表面活性剂和漆酶产生菌种的分离、筛选及保藏为例介绍工业生产中菌种获得的基本过程。

菌种的筛选又分为初筛和复筛两个阶段。

初筛是指从大量变异的微生物菌株中,将具有较强目的产物合成能力(或目标菌株性状优良)的微生物筛选出来的过程。

复筛是指在初筛的基础上对选出的高产菌株进行再次筛选,进一步淘汰不良菌株的过程。因此,对于初筛,要力求快速、简便,常用的初筛方法有平板筛选法和摇瓶筛选法,其中常见的平板筛选法有生长圈法、变色圈法、透明圈法、抑菌圈等;对于复筛,应做到精确,该过程一般在摇瓶上进行,复筛主要考察菌种的生产性能稳定性和遗传稳定性,一般复筛的条件已较接近发酵生产工艺,因此经复筛后的菌种在生产上可表现出相近的生产水平。

生物表面活性剂一般是指由微生物产生的两性分子,如糖脂、脂肽、磷脂和聚合物等,其已在石油、食品、化妆品、药学和环境修复等领域获得广泛的应用。

漆酶是一种重要的生物表面活性剂,它是一种含铜的多酚氧化酶,广泛分布于动植物和微生物中,目前广泛研究和使用的漆酶主要是微生物源的漆酶。漆酶在制浆造纸、木材加工、饮料食品、煤炭等行业用途广泛,还可用于水体和土壤污染的修复。

菌种的改良即育种,有物理法、化学法和生物法等。本教程主要侧重于紫外线和低能离子束注入两种物理诱变育种方法。紫外线诱变效率高,成本低,应用广泛,是经典的工业微生物诱变育种手段之一,紫外线的波长在 200~380 nm 之间,但对诱变最有效的波长仅仅在 253~265 nm,一般紫外线杀菌灯所发射的紫外线大约有 80% 是 254 nm。低能离子束的生物学效应于 20 世纪 80 年代由中国科学院余增亮研究员首先发现,现已形成“离子束生物工程学”一门新的交叉学科,其中离子束诱变育种技术是该学科的重要分支。在该技术实施过程中,通常使用的是一些能量低于 100 eV 的阳离子,如 H^+ 、 N^+ 和 He^+ 等,因此也称为低能离子诱变育种。

在工业生产中,菌种是发酵中最核心的问题之一,然而因为保藏不当或菌种本身的原因时常出现优良菌株的退化等,因此菌种优良性状的保持和安全保藏在发酵生产中显得极为重要。在本书中主要讨论斜面冷藏法、甘油封存法、甘油冻存法和脱脂牛奶冻干法的实验操作。

实验 1 种子培养基和发酵培养基的配制和灭菌

1. 实验原理

培养基是发酵的物质基础。配制培养基是发酵工程实验的第一步,也是发酵生产的第一步。在发酵工程中,发酵培养基可分为孢子培养基、种子培养基和发酵培养基。在细菌发酵中只用种子培养基和发酵培养基,其中种子培养基可用肉胨培养基,即牛肉膏蛋白胨培养基。肉胨培养基为细菌通用培养基,液体肉胨培养基称营养肉汤(Nutrient Broth, NB),固体肉胨培养基称营养琼脂(Nutrient Agar, NA);发酵培养基在本实验中为产表面活性剂培养基,采用植物油脂作为碳源。

灭菌是指用理化方法杀死一定范围内所有微生物的操作。在本实验中采用了两种方法进行灭菌:一种是干热空气灭菌,即将待灭菌的物品置于干热灭菌烘箱内 160℃保持 2 h;另一种是湿热灭菌,即在高压灭菌锅内,将待灭菌样品在 121℃下保温 20~30 min。

本次实验的目的:① 复习巩固培养基配制和灭菌等基本操作;② 为后续实验做准备。

本次实验需 6 个课时。

2. 实验材料

2.1 仪器设备

纯水机、电子天平、磁力搅拌器、高压灭菌锅、干热灭菌器(或鼓风干燥箱)、冰箱、5 mL 移液枪等。

2.2 试剂耗材

牛肉膏、蛋白胨、氯化钠、琼脂粉(或琼脂条)、 NaNO_3 、 K_2HPO_4 、 CaCl_2 、 KH_2PO_4 、 MgSO_4 、 KCl 、酵母粉、大豆油、脱纤维无菌羊血等。

90 mm 培养皿、锥形瓶(150 mL、250 mL)、配套封口膜(配棉绳或橡皮筋)或硅胶塞、牛皮纸或报纸、15 mL 试管及配套硅胶塞、玻棒、标签纸、记号笔(蓝、黑)、烧杯(500 mL、100 mL、50 mL)、药匙、称量纸、pH 试纸(5.8~9.0)、滴瓶(加 1 mol/L NaOH 溶液)、5 mL 刻度吸管等。

2.3 培养基

(1) 肉胨培养基(g/L): 蛋白胨 10, 牛肉膏 5, NaCl 5, pH 7.4。

(2) 发酵培养基(g/L): NaNO_3 2.5, K_2HPO_4 4, KH_2PO_4 4, MgSO_4 0.2, CaCl_2 0.02, KCl 1, NaCl 1, 酵母粉 1, 大豆油 30 mL, pH6.5~7.0。

3. 实验方法

3.1 实验准备

实验前一天, 各组要收拾实验台, 根据实验方案, 进行器皿耗材准备。如配制肉胨培养基需要材料如图 1-1 所示。

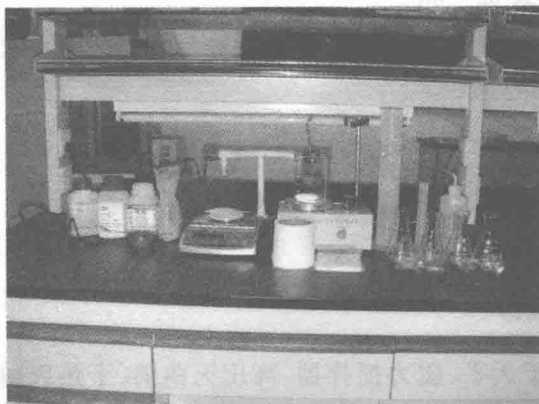


图 1-1 配制肉胨培养基所需仪器、试剂和耗材

3.2 培养皿包扎和灭菌

以牛皮纸(或报纸)包扎,一般4开报纸可包12个90 mm培养皿(便于计算,如200 mL培养基大约可倒12个培养皿,正好一包),注意尽量包紧,包好后以手握住一端时,可水平悬空。

培养皿灭菌一般以湿热效果更好,可以和培养基一起灭菌。但在灭菌锅空间有限的情况下,可以干热灭菌。将包扎后的培养皿放入干热灭菌器(或鼓风干燥箱)中,设置温度和时间,开启加热,160℃保持2 h,自然冷却后取出用于倒平板。

3.3 无菌水制备

在150 mL锥形瓶中,加入45 mL去离子水,并加入少量玻璃珠,封口膜扎口。另取150 mL锥形瓶,加入50 mL水,扎口,与培养基一起灭菌后即得无菌水。

3.4 培养基配制

3.4.1 肉胨培养基配制

每组配制500 mL肉汤培养基,取其中50 mL做斜面,50 mL做种子培养基,剩余400 mL做固体培养基。

(1)称取牛肉膏:用量筒量取500 mL去离子水,取50 mL小烧杯,用玻棒蘸取牛肉膏,称取2.5 g于小烧杯中,加水后用玻棒搅拌后静置备用。

(2)称取其他药品:向500 mL烧杯中加约300 mL水,烧杯中放入搅拌子,置于磁力搅拌器上,适当加热。称取5 g蛋白胨和2.5 g NaCl,边加边搅拌溶解。

(3)调pH:再加水至约400 mL(烧杯上有刻度,可粗略估计体积),加入小烧杯中的牛肉膏溶液,必要时冲洗几次,全部转移到大烧杯中。以精密pH试纸测定pH,并用NaOH溶液调节pH至7.4左右。

(4)配成肉汤培养基:将量筒中水加入大烧杯中,并继续搅拌,使所有成分全部溶解,并最终定容到500 mL,此时肉汤培养基应呈透明的黄褐色。

(5)做斜面:取50 mL水置于100 mL烧杯中,加入1 g琼脂粉,置磁力搅拌器上搅拌,使琼脂粉悬浮起来,5 mL枪头剪去尖端,用移液枪移取此悬浮液4 mL于15 mL试管中,硅胶塞封口,每7个试管一捆,用报纸包扎。

(6)种子培养基制备:取150 mL锥形瓶,加入50 mL肉汤培养基,封口膜

封口。

(7) 固体培养基制备:取 2 个 250 mL 锥形瓶,各加入 200 mL 肉汤培养基,在锥形瓶中加入 3~4 g 琼脂粉后封口。

3.4.2 发酵培养基配制

取 500 mL 大烧杯,置于磁力搅拌器上,加 400 mL 水,依次加入 1.25 g NaNO_3 , 2 g K_2HPO_4 , 2 g KH_2PO_4 , 0.1 g MgSO_4 , 0.5 g KCl , 1 g NaCl 和 0.5 g 酵母粉,混匀溶解后,加入 0.01 g CaCl_2 ,再加入 100 mL 水分装于 150 mL 锥形瓶中,装液量为 30 mL。分装后,用刻度吸管转移 0.9 mL 大豆油至锥形瓶中,扎口。

3.5 培养基灭菌

检查灭菌锅内水是否浑浊(如已浑浊,应换新的去离子水),水位是否正常,水量是否足量(一般以刚好淹没加热圈为宜),密封圈是否完好,将装有待灭菌耗材的不锈钢灭菌筐(图 1-2(a))放入灭菌锅中,关上灭菌锅,打开电源,设置温度为 121°C ,时间为 20 min,启动开关开始加热灭菌(图 1-2(b))。灭菌结束后,关闭灭菌锅电源,压力降为零后,开启排空阀让灭菌锅内外压力平衡后,开启锅盖,待锅内热量散尽后再取出灭菌的物品。



(a) 灭菌筐



(b) 工作中的灭菌锅

图 1-2 高压蒸气灭菌

3.6 斜面制作

试管在灭菌锅内应保持竖直,冷却至不烫手时,由灭菌锅内取出,用书本或玻棒垫起,冷却凝固后收起置冰箱中备用,注意斜面长度不要超过试管

的 1/2。

3.7 肉胨平板制作

将灭菌培养皿和装有肉胨培养基的锥形瓶置超净工作台上,开紫外灯消毒后吹无菌风,培养基不烫手(约 50℃)后倾倒入培养皿中,每个培养皿倾倒 15~20 mL,200 mL 肉胨培养基可倒 12 个左右平板。凝固后倒置于冰箱中备用。

3.8 血平板制作

基本操作同上,不同之处是事先用尖嘴钳或开瓶器打开装有羊血的血清瓶的瓶塞,在培养基不烫手时,用 5 mL 移液枪按培养基体积 5% 的量加入至肉胨培养基中(200 mL 培养基加入 10 mL 羊血),混匀后倒平板。

注意事项

(1) 装培养基的锥形瓶可用硅胶塞、封口膜或多层纱布扎口,尽管纱布可保证透气性,但操作不便,易染菌,因此推荐使用硅胶塞或封口膜。种子培养基可用植物组培瓶,直接用瓶盖封口,简便实用。装有固体培养基的锥形瓶扎口建议用棉绳扎紧,如只用橡皮筋,灭菌或融化加热时培养基易喷出。

(2) 血平板制作时要掌握好培养基的温度,过热过冷均不可。羊血可 37℃ 预热。加入后羊血继续保持鲜红,倒出的平板也应是鲜红色,半浑浊,不透明,以确保形成易于观察的透明圈。取羊血在不开瓶的情况可以直接用无菌注射器抽取,但对操作技术要求较高。

(3) 配制发酵培养基有两个要点:① 注意防止形成 CaSO_4 沉淀,因此 CaCl_2 最后加入;② 大豆油为疏水性碳源,必须在摇瓶中分别添加。

(4) 发酵培养基的配制:如果事先配好母液,则按稀释倍数分别加入即可。由于培养基中有磷酸缓冲液,自然 pH6.5 左右,因此不用人工调节 pH。

(5) 植物油往往非常黏稠,使用移液枪吸取,易污染移液枪,甚至造成损坏。因此,严禁使用移液枪吸取植物油,应采用刻度吸管(移液管)吸取。

(6) 灭菌时,为节省时间,可以在即将配好培养基时,开启高压灭菌锅加热。灭菌耗材较多且塞得很满时,可适当延长灭菌时间。操作过程中要戴棉手套,以防烫伤。

实验2 产表面活性剂菌株的筛选

1. 实验原理

菌种筛选包括富集、分离、初筛和复筛等几个步骤,挑选具有某种能力的有用菌种,根据不同的筛选目的,采用不同的筛选路线。

一般而言,产表面活性剂的铜绿假单胞菌由于其在土壤中广泛存在,且生长迅速、糖脂产量高,因此非常容易分离出来。但由于铜绿假单胞菌是条件致病菌,因此筛选该类菌有一定的生物安全性隐患,而产表面芽孢杆菌具有很多优良特性,故有意识地筛选芽孢杆菌更为可行。芽孢耐热性好,在沸水浴中10 min 仍然能够存活,因此可以利用这一特性对芽孢杆菌进行初筛。

表面活性剂可使红细胞破裂。产表面活性剂的菌株在血琼脂平板上培养时,会形成溶血圈,溶血圈的大小与表面活性剂的产量往往成正相关。因此,可以利用血琼脂平板对产表面活性剂菌株进行初筛。

摇瓶发酵的微生物表面活性剂产量评价方法一般有排油圈法、表面张力法、比色法、液滴崩塌法等。排油圈法比较简便,但不准确,可以进行初步评价筛选,然后再用表面张力法重新评价、确认。在对培养基成分进行鉴定后,可用比色法进行精确的测定。

本次实验需6~9个课时,其中3个课时在课堂上配制培养基,进行分离操作。

2. 实验材料

2.1 仪器设备

电子天平、磁力搅拌器、高压灭菌锅、超净工作台、恒温摇床、表面张力仪、培养箱、恒温摇床、显微镜、冰箱、纯水机、移液枪等。