



发酵生产原理 及实训技术

韩文清 程立坤 孙 霞 主编

发酵生产原理及实训技术

主 编 韩文清 程立坤 孙 霞



内蒙古大学出版社

图书在版编目(CIP)数据

发酵生产原理及实训技术 / 韩文清,程立坤,孙霞主编. —呼和浩特 :
内蒙古大学出版社, 2016. 12
ISBN 978 - 7 - 5665 - 1112 - 6
I. ①发… II. ①韩… ②程… ③孙… III. ①发酵工程 - 高等学校 -
教材 IV. ①TQ92
中国版本图书馆 CIP 数据核字(2016)第 299639 号

发酵生产原理及实训技术

主 编	韩文清 程立坤 孙 霞
责任编辑	王晓俊
封面设计	张燕红
出版发行	内蒙古大学出版社
社 址	呼和浩特市昭乌达路 88 号(邮编:010010)
联系电话	发行部:0471 - 4993154/4990092
	编务部:0471 - 4990533
网 址	http://www.imupress.com
电子邮箱	imupress@163.com
经 销	内蒙古新华书店
印 刷	内蒙古地矿印刷厂
开 本	787mm × 1092mm 1/16
印 张	10.75
字 数	261 千
版 次	2016 年 12 月第 1 版
印 次	2016 年 12 月第 1 次印刷
标准书号	ISBN 978 - 7 - 5665 - 1112 - 6
定 价	55.00 元

《发酵生产原理及实训技术》编委会

主 编:韩文清 程立坤 孙 霞

副主编:耿艳红 张记霞 栾丽杰 李书光

编 委:韩文清(包头轻工职业技术学院)

程立坤(山东滨州畜牧兽医研究院,山东绿都生物科技有限公司)

孙 霞(莱芜职业技术学院)

耿艳红(滨州职业学院)

李书光(山东滨州畜牧兽医研究院,山东绿都生物科技有限公司)

张记霞(包头轻工职业技术学院)

王彩英(包头轻工职业技术学院)

王 涵(包头轻工职业技术学院)

栾丽杰(济宁职业技术学院)

付石军(山东滨州畜牧兽医研究院)

王倩倩(包头轻工职业技术学院)

侯成林(包头轻工职业技术学院)

张松林(山东滨州畜牧兽医研究院)

张 晶(三门峡职业技术学院)

前 言

发酵技术作为现代生物技术的一门重要的分支学科,已成为现代食品工业、制药工业的重要组成部分。能熟练、准确地进行相关发酵产品的发酵生产,也成为发酵行业的生产技术人员应必备的职业技能。本教材以工作过程为导向,通过带领学生完成菌种扩培、发酵系统认知与操作、小型发酵、生产启动、发酵生产动态监控及补料调节、终点判断及发酵终止等众多任务和项目,使学生掌握具体相关产品的发酵生产方法,并具备实际动手能力。本教材是培养发酵生产培菌工、发酵工程制药工技师岗位的核心课程。

本教材根据发酵生产企业进行氨基酸、青霉素等相关产品的发酵生产为典型工作任务,结合发酵生产的工艺流程及特点,按照由简到难、由浅入深的原则,共划分了5个学习情境,一共260课时,其中理论80课时、实操180课时,内容包括发酵系统的学习与认识、菌种的培养、发酵罐的启动与常见发酵产品发酵生产实训、发酵动态监测及调控、发酵终点的确定及发酵生产的终止、产品效价的测定等,分成15个任务、19个项目来讲授。课程以菌种活化、扩培为切入点,合理划分和安排各个任务及项目,在教学中提倡理论与实操同步进行,按照实际生产流程,每个生产单元都能实际操作,彼此连接,体现了生产与实训的一致性。

本教材不但包括了相关发酵产品的生产工艺流程,还涵盖了发酵系统的部件组成、工作原理及操作使用,如小型发酵罐温控部分水循环水流路线及操控方法。目前,高职发酵类教材还未曾有对实训室小型发酵系统组成及操作使用作详细介绍的内容。由于各院校所采用的发酵设备的生产厂家、型号不尽相同,所以我们尽力编写一个可以共同参照学习的范本,这样在教材内容识读、学习后,大家可以结合自己的设备情况举一反三、触类旁通。

本教材通过情境导入、知识链接、制定方案、实施、检查与评估、课后作业等教学环节完成教学内容。其中,知识链接为后续的制定方案、实施、评估等环节的开展奠定了理论基础,做好了相应的知识储备;制定方案是根据知识链接中的理论指导,对需要完成的项目进行整体规划和安排,并给学生布置相应的任务;实施环节则是整个教学过程的核心,是让学生根据制定的方案一步步完成实际操作,并记录操作过程和操作结果;检查与评估等环节是在整个任务完成后,先由学生对自己所完成的实施过程和结果进行自我检



查,以发现和认识实施过程中的不足和漏洞,然后由教师对学生的实施情况进行综合评估;最后通过课后作业的形式,让学生对课堂上所制定并实施的方案进行进一步完善,以达到查漏补缺、举一反三和拓宽知识面的教学目的。

本书用于高等职业院校生物技术、生物制药类专业学生课堂教学。本书的特色是设计了较为具体的实训操作方案和实训过程,突出实训操作为教学中心,简化理论,符合高职院校的教学特点和使用要求。书中还配套有较为齐全的设备插图及实训内容配图,直观易懂,可供广大师生教学及企业技术人员培训学习时使用。

教材编写分工,学习情境1任务一项目1~3,学习情境3任务二项目2由莱芜职业技术学院孙霞完成;学习情境1任务二项目1~4由三门峡职业技术学院张晶编写;学习情境2任务一项目1~2与任务二项目1~3、学习情境3任务一项目1~2与任务二项目2由包头轻工职业技术学院韩文清编写;学习情境4任务一与学习情境5任务一、任务二由包头轻工职业技术学院张记霞编写;学习情境4任务二项目1与任务三、任务四由包头轻工职业技术学院王倩倩编写;学习情境4任务二项目2、任务五、任务六与学习情境5任务三由山东省滨州畜牧兽医研究院程立坤、李书光编写。

目 录

学习情境 1 菌种的扩大培养	1
任务一 谷氨酸生产菌的扩大培养	1
项目 1 斜面菌种培养	2
项目 2 摇瓶一级种子培养	10
项目 3 种子罐二级种子培养	16
任务二 产黄青霉菌种的扩大培养	21
项目 1 固体斜面菌种的制备	21
项目 2 平皿培养及菌种检测	30
项目 3 大米孢子的制备	35
项目 4 摇瓶种子的制备	39
学习情境 2 发酵系统认识及操作	42
任务一 发酵系统整体结构的认识	42
项目 1 罐体结构及发酵系统整体的认识	43
项目 2 控制面板的认识	49
任务二 发酵系统单元结构的认识与操作	55
项目 1 无菌空气的制备	55
项目 2 蒸汽制备及输送	65
项目 3 温控系统工作过程	72
学习情境 3 发酵罐的启动与发酵生产实训	79
任务一 发酵罐的启动	79
项目 1 发酵设备及物料的灭菌	80
项目 2 种子罐的种子制备	93
任务二 常见产品发酵生产实训	104
项目 1 谷氨酸发酵生产实训	104
项目 2 青霉素发酵生产实训	112



学习情境4 发酵动态监测与调控	117
任务一 还原糖动态监测与控制	117
任务二 发酵过程中菌体浓度检测与控制	122
项目1 青霉素发酵过程中菌体浓度检测与控制	122
项目2 谷氨酸发酵过程中的菌体浓度检测及控制	126
任务三 发酵过程中氮含量检测与控制	130
任务四 发酵过程中溶解氧的检测与控制	134
任务五 发酵过程中 pH 值的检测与控制	141
任务六 溶解氧反馈补料方式的应用	148
学习情境5 发酵终点的确定及发酵生产的终止	154
任务一 青霉素发酵生产的终止	154
任务二 青霉素效价的测定	157
任务三 发酵液中谷氨酸含量的测定	162

学习情境 1 菌种的扩大培养

任务一 谷氨酸生产菌的扩大培养



学习目标

1. 掌握谷氨酸生产菌的种类及特性
2. 掌握谷氨酸生产菌斜面、摇瓶及种子罐培养基的配方及接种方法
3. 熟悉影响一级、二级种子质量的因素
4. 能通过检测、分析确定种子的质量
5. 熟悉发酵法生成谷氨酸的机理
6. 了解谷氨酸的性质及应用



学习内容

1. 制备谷氨酸生产菌的斜面培养基及接种、培养
2. 制备摇瓶培养基及接种、培养
3. 制定种子罐培养基及接种、培养
4. 检测分析种子的质量
5. 分析影响谷氨酸生物合成的因素



项目1 斜面菌种培养

一、知识链接

(一) 谷氨酸基础知识

谷氨酸是构成蛋白质的氨基酸之一。它是一种酸性氨基酸,分子内含两个羧基,化学名称为 α -氨基戊二酸。其化学结构如图1-1-1所示。谷氨酸为无色晶体,有鲜味,微溶于水,可溶于盐酸溶液,等电点3.22。谷氨酸在生物体内的蛋白质代谢过程中占重要地位,参与动物、植物和微生物体内的许多重要化学反应。

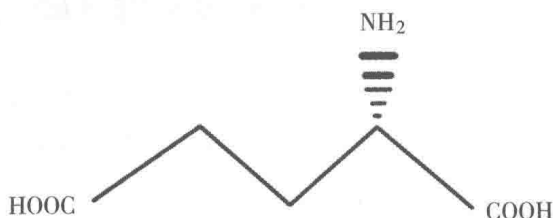


图1-1-1 谷氨酸化学结构

1. 谷氨酸的用途

谷氨酸是世界上氨基酸产量最大的一个品种,其用途广泛。

(1) 下游产品:谷氨酸可生产许多重要的下游产品,如L-谷氨酸钠、L-苏氨酸、聚谷氨酸等。

(2) 食品业:谷氨酸是制造味精的前体物质。味精即谷氨酸钠,是重要的鲜味剂。谷氨酸作为风味增强剂可用于增强饮料和食品的味道,不仅能增强食品风味,对动物性食品也有保鲜作用。

(3) 日用化妆品:谷氨酸作为营养药物可用于皮肤和毛发。用于皮肤,对治疗皱纹有疗效;用于生发剂,能被头皮吸收,可预防脱发并使头发新生,有生发、防脱之功效。

(4) 医药业:谷氨酸还可用于医药,由于脑组织只能氧化谷氨酸,而不能氧化其他氨基酸,故谷氨酸作为脑组织的能量物质可改进维持大脑机能。谷氨酸作为神经中枢及大脑皮质的补剂,对于治疗脑震荡或神经损伤、癫痫以及对弱智儿童均有一定疗效。长期适当地服用谷氨酸,可提高神经有缺陷儿童的智力。

(5) 工业:用D-谷氨酸合成的聚谷氨酸其性质接近于天然皮革,具有良好的透气性、较强的抗水性和耐老化性,是一种出色的可降解塑料,也是环境友好材料。

2. 谷氨酸的发展状况

1866年,德国化学家Ritthausen利用硫酸水解小麦面筋,分离到一酸性氨基酸,根据原料的取材,将此氨基酸命名为“谷氨酸”。1908年,日本池田菊苗在探究海带汁鲜味时,提取了谷氨酸,并开始制造商品——味之素。1910年,日本味之素公司用水解法生产谷氨酸。1954年,多田、中山两博士报告了采用微生物直接发酵谷氨酸的研究成果。

1956年,日本协和发酵公司的木下祝郎分离选育出一种新的细菌——谷氨酸棒杆菌。



菌,能同化利用 100g 葡萄糖,可直接发酵并积累 40g 以上的谷氨酸。随后,研究人员又进行了工业化研究,从 1957 年起发酵法制取味精正式商业化生产。20 世纪 60 年代后,世界各国兴起了用发酵法生产味精的热潮,从而使谷氨酸在发酵方面的研究飞速发展,并渐入繁盛时代。

谷氨酸的生产方法有水解提取法、合成法和发酵法三大类。目前,水解提取法和合成法已经停用,现在主要采用发酵法生产。

(二) 谷氨酸的发酵生产

1. 谷氨酸生产菌

谷氨酸生产菌主要是棒杆菌属、短杆菌属、小杆菌属及节杆菌属中的细菌。这些菌在形态及生理方面有许多共同的特征:(1)细胞形态为球状、棒状或短杆状;(2)都是革兰氏阳性菌,无芽孢,无鞭毛,不能运动;(3)都是需氧性微生物,在通气条件下生成谷氨酸;(4)都是生物素缺陷型,需要以生物素为生长因子;(5)不分解淀粉、纤维素、油脂、酪蛋白以及明胶,能利用醋酸,不能利用石蜡;(6)不分解利用谷氨酸,并能耐高浓度的谷氨酸。

我国谷氨酸发酵生产所用的菌种主要有北京棒杆菌 AS1.229、钝齿棒杆菌 AS1.542、天津短杆菌 T6-13 等以及它们的突变株。

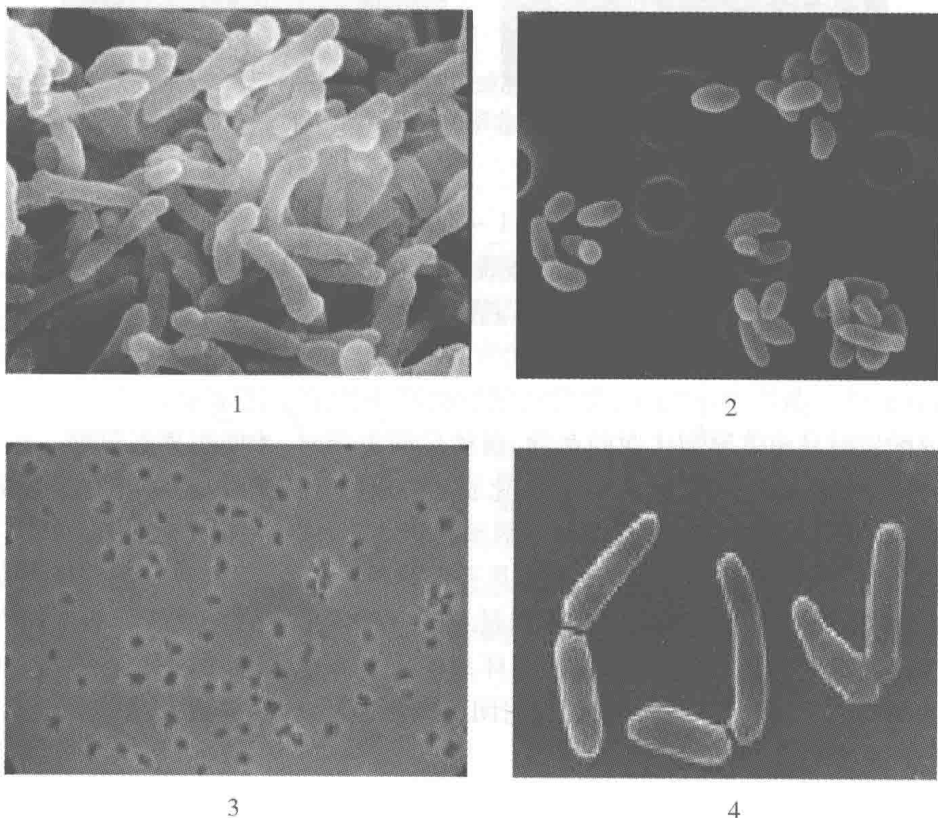


图 1-1-2 常见谷氨酸生产菌

1—棒杆菌; 2—短杆菌; 3—小杆菌; 4—节杆菌

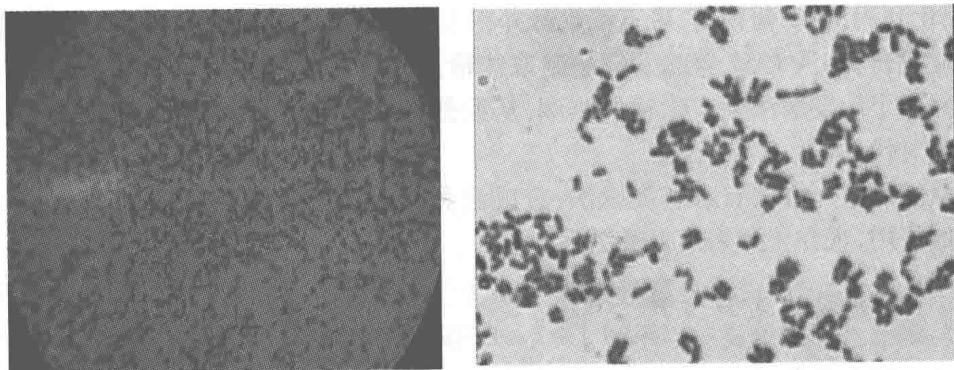


图 1-1-3 北京棒杆菌形态

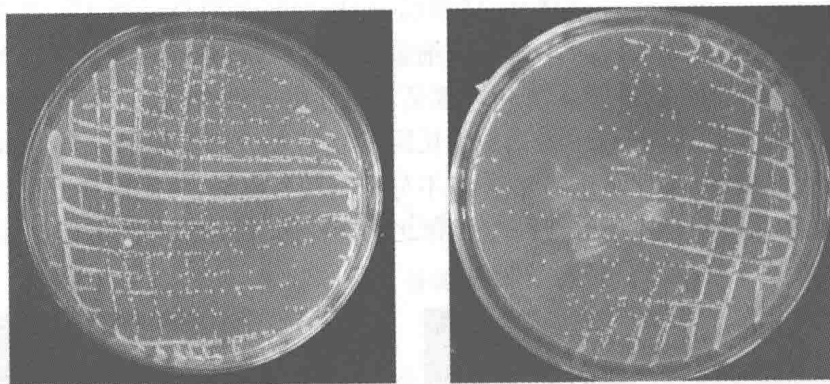


图 1-1-4 北京棒杆菌菌落形态

2. 谷氨酸的生物合成

谷氨酸的生物合成途径大致如图 1-1-5 所示:葡萄糖由糖酵解(EMP 途径)和磷酸己糖支路(HMP 途径)生成丙酮酸;丙酮酸脱羧生成乙酰辅酶 A(乙酰 COA),然后进入三羧酸循环,乙酰辅酶 A 在醛缩酶的催化下,草酰乙酸和乙酰辅酶 A 合成柠檬酸,进一步生成异柠檬酸和 α -酮戊二酸; α -酮戊二酸在谷氨酸脱氢酶的催化及有 NH_4^+ 存在的条件下,生成谷氨酸。菌体内合成的谷氨酸透过细胞膜,便能在发酵液中大量积累。

谷氨酸发酵是菌体异常代谢的产物,菌体代谢失调时,才能积累谷氨酸。在正常的代谢途径上,柠檬酸由三羧酸循环逐次氧化脱羧生成异柠檬酸、 α -酮戊二酸、琥珀酸等。可是谷氨酸生产菌,由于 α -酮戊二酸脱氢酶相当缺乏,使 α -酮戊二酸不再往下继续氧化生成琥珀酸;同时又由于谷氨酸生产菌具有强的谷氨酸脱氢酶,在足量的氨存在时,使 α -酮戊二酸转化为谷氨酸。为了获得能量和产生菌体蛋白质合成所需的中间产物,在谷氨酸发酵的菌体生长期,需要乙醛酸循环途径处于开启状态,但是在谷氨酸发酵的谷氨酸生成期,为了大量积累谷氨酸,需要封闭乙醛酸循环,因而需要在菌体生长期和产酸期控制不同的条件。

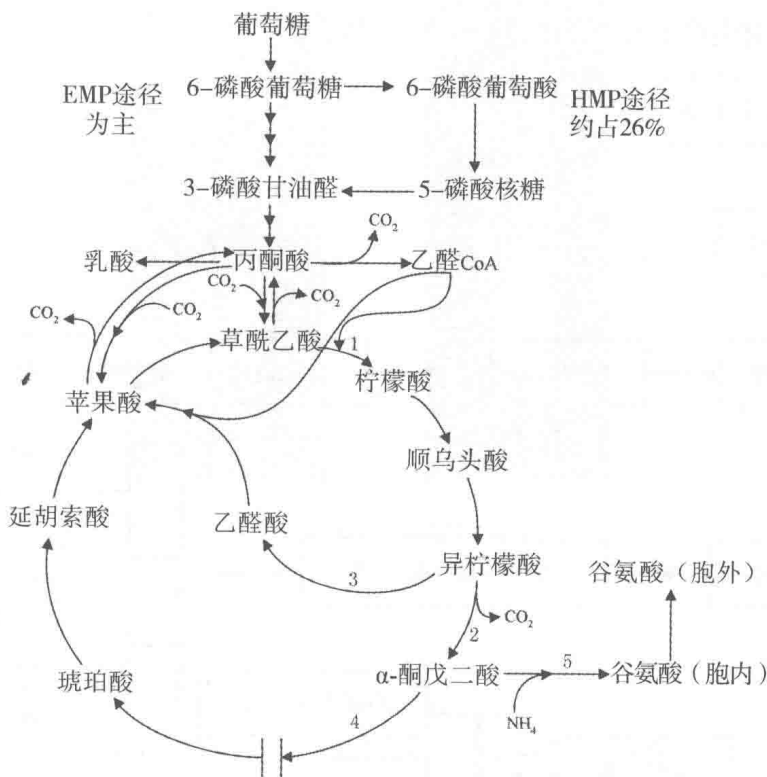


图 1-1-5 谷氨酸的生物合成途径

1—柠檬酸合成酶;2—异柠檬酸脱氢酶;3—异柠檬酸裂解酶;4— α -酮戊二酸脱氢酶;5—谷氨酸脱氢酶

3. 谷氨酸发酵生产流程

谷氨酸发酵同其他发酵一样,在发酵前必须先培养好一定数量健壮、均匀、活力旺盛的种子。国内谷氨酸发酵种子扩大培养普遍采用二级种子扩大培养的流程,如图 1-1-6 所示。

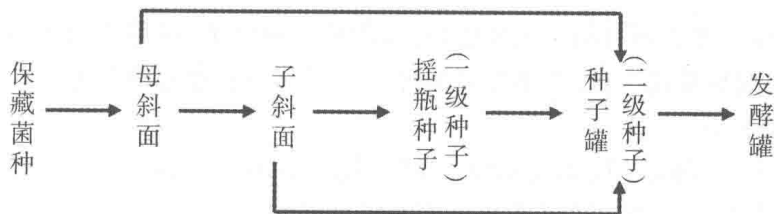


图 1-1-6 二级种子扩大培养流程



谷氨酸发酵生产工艺流程图,如 1-1-7 所示。

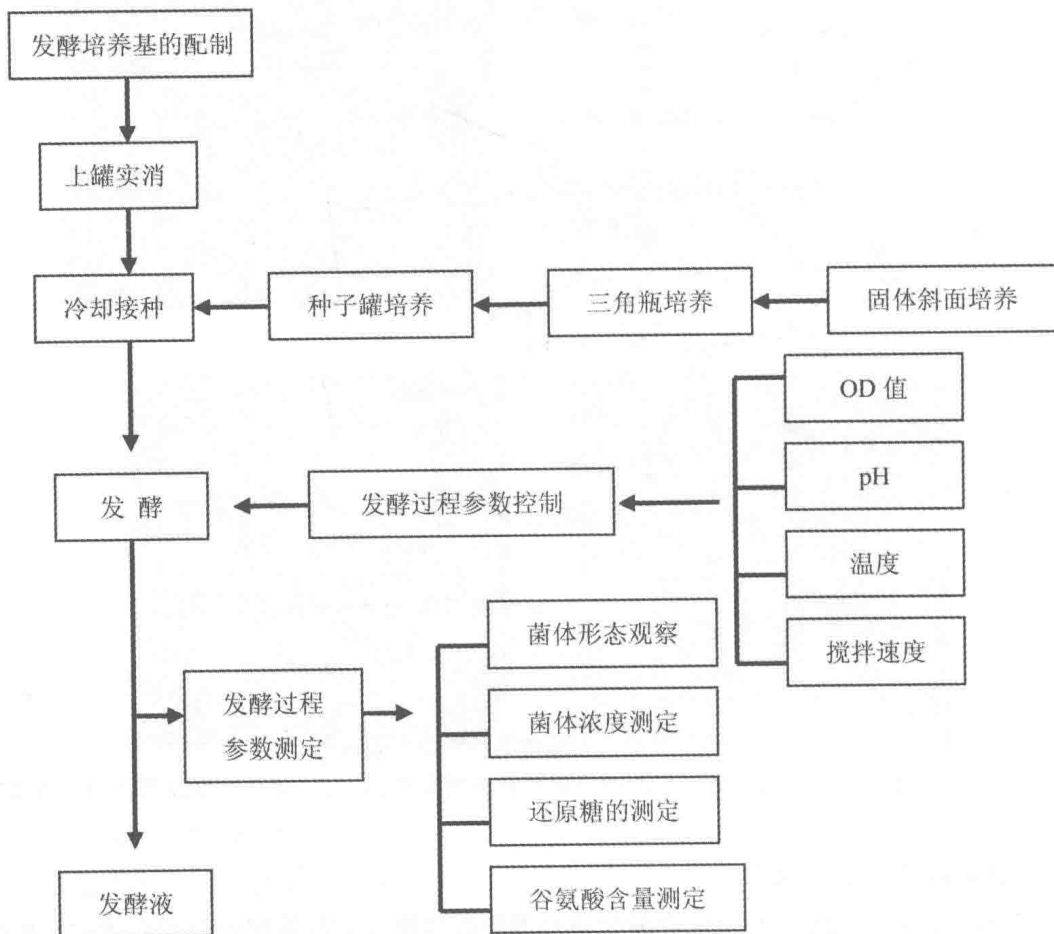


图 1-1-7 谷氨酸发酵生产工艺流程图

4. 斜面菌种培养

菌种的斜面培养必须有利于菌种生长,且菌种绝对要纯,不得有杂菌和噬菌体污染。菌种的移接,一般只传代三次,否则会因菌种自然变异而引起菌种退化。

(1) 培养基组成

牛肉膏 1.0%, 蛋白胨 1.0%, NaCl 0.5%, 葡萄糖 0.5%, 琼脂粉 2%, pH 7.0 ~ 7.2, 分装, 121℃ 灭菌 20min (配制方法参照培养基的制备和灭菌)。

待培养基灭菌后摊成斜面,然后置于 37℃ 恒温箱中空培 18 ~ 24h, 检查无菌合格后, 放冰箱保存备用。

(2) 培养条件

按无菌操作规程,用接种环刮取菌种划线接种于新制斜面上,置于 32℃ 培养箱中培养 18 ~ 24h。培养完成后,仔细观察菌苔的颜色和边缘等特征是否正常,有无感染杂菌和噬菌体的征兆。若经观察后菌苔正常,即完成斜面菌种制备,然后置于 4℃ 冰箱中保存待用。其斜面培养特征如图 1-1-8 所示。

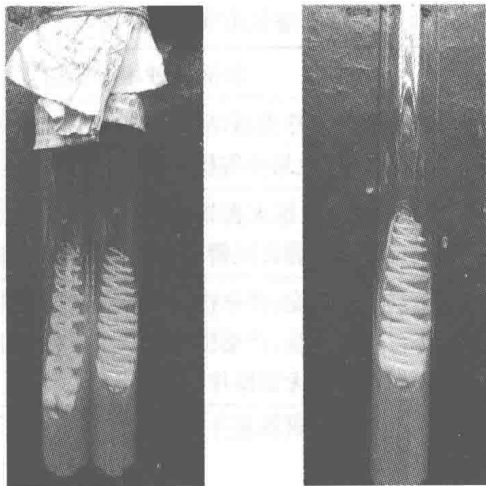


图 1-1-8 北京棒杆菌斜面培养特征

二、制订方案

根据工艺流程的需要,制订产谷氨酸菌种的扩大培养方案。

教师对学生分组,每组选出一个组长,再由组长根据小组成员任务分工的不同,确定不同任务的负责人。小组成员任务的划分可以参考下面的小组任务分配表。

表 1-1-1 显微观察北京棒杆菌操作方案

显微观察北京棒杆菌操作方案	
任务描述	以北京棒杆菌的形态观察作为活动载体,熟悉革兰氏染色法操作规程,并能运用该方法完成对细菌菌株的形态鉴别
设备/工具/耗材	显微镜、结晶紫染液、卢戈氏碘液、番红染液、95% 乙醇、酒精灯、滴管、香柏油、二甲苯、擦镜纸、载玻片、废液缸、接种环
安全要求及注意事项	1. 涂片厚度:涂片过厚,细胞重叠,无法较好地观察单个细菌的细胞形态;涂片过薄,细胞数量少,也不利于观察 2. 染色时间:染色时间过长,结晶紫与细胞结合,脱色不易;染色不够,结晶紫难与细胞结合 3. 乙醇脱色的程度:如脱色过度,则阳性菌被误染为阴性菌;若脱色不够,则阴性菌被误染为阳性菌
操作步骤	1. 涂片 2. 干燥 3. 固定 4. 初染 5. 媒染 6. 脱色 7. 复染 8. 镜检



表 1-1-2 斜面培养北京棒杆菌操作方案表

	斜面菌种培养操作方案
任务描述	以试管斜面菌种培养作为活动载体,根据斜面菌种扩培要求,学习斜面培养基的制备、试管接种及培养等操作技能
设备/工具/耗材	天平、超净工作台、高压灭菌锅、恒温培养箱、称量纸、钥匙、pH 计、量筒、漏斗、玻璃棒、烧杯、酒精灯、试管、三角瓶、培养皿、接种环、培养基组成药品
安全要求及注意事项	1. 高压灭菌锅使用安全,严格按照高压灭菌锅使用规程操作 2. 超净工作台使用安全,严格按照超净工作台使用规程操作 3. 接种过程严格进行无菌操作
操作步骤	1. 按培养基组成配制培养基并灭菌 2. 培养基无菌检验 3. 斜面接种 4. 培养

表 1-1-3 小组任务分配表

	小组任务	个人职责(任务)	小组成员
1	北京棒杆菌形态鉴别	根据革兰氏染色法操作步骤,对试管斜面菌种进行初染、媒染、洗脱、复染后,用油镜进行观察,并能根据菌体颜色判断该菌种是革兰氏阳性菌还是革兰氏阴性菌。	
2	制备培养基	根据培养基组成以及实际配制情况计算每种成分的量,选择合适的称量仪器进行称量,溶解,调节 pH 值,根据情况分装,塞棉塞、包扎、做标签,最后灭菌	
3	培养基无菌检验	试管及三角瓶内的培养基灭菌冷却后,按 5% 的样品量抽样置于 $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱内空培 12 ~ 24h。经仔细观察,若未有菌落,则置于 4°C 冰箱保存备用;若有菌落产生,则重新配置培养基并彻底灭菌	
4	接种	接种过程严格按照无菌操作规程操作,避免杂菌污染	

三、实施

依据制定的操作方案和小组任务分配表实施,并填写项目实施情况表。

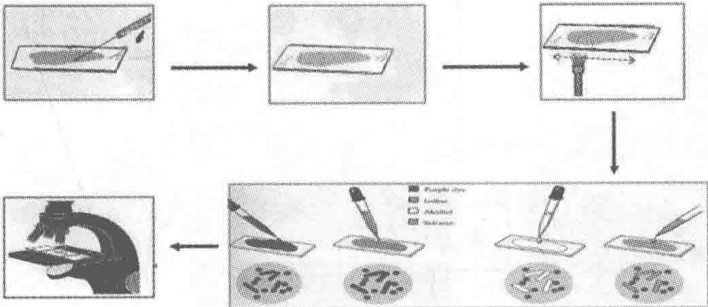
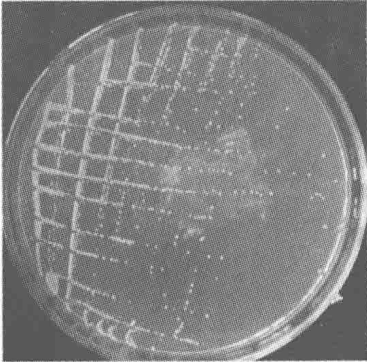
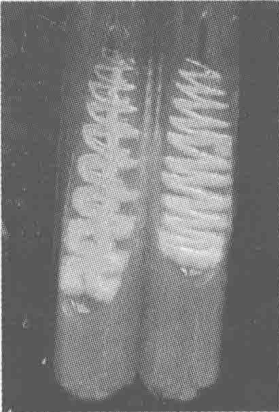
表 1-1-4 项目实施情况表

	小组任务	完成情况	完成人员	检查人员及情况说明
1	菌种形态鉴别			
2	制备斜面培养基			
3	培养基无菌检查			
4	接种			

四、作业

1. 通过实训后完善本任务的实施方案。
2. 请组长带领组员完成实训报告。

表 1-1-5 谷氨酸发酵菌种斜面培养

请描述革兰氏染色的原理及操作步骤,并记录显微镜观察结果	
	1. _____ 2. _____
请描述平板及斜面培养 24h 后菌落特征	
 	1. _____ 2. _____