



普通高等教育“十一五”国家级规划教材

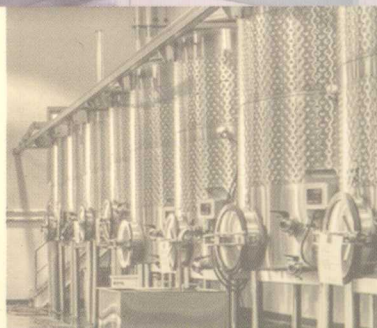
发酵工程实验

主 编 陈长华

副主编 宫 衡 高淑红



高等教育出版社





普通高等教育“十一五”国家级规划教材

发酵工程实验

主 编 陈长华

副 主 编 宫 衡 高淑红

编写人员 陈长华 宫 衡 高淑红

李友元 夏 杰 王永红



高等教育出版社

内容简介

本书是与发酵工程理论课相配套的实验教材。内容包括 3 部分:绪论、发酵工程基本实验和综合实验。绪论部分主要介绍发酵实验室的基本要求和设备,统计学方法的实验设计和数据处理。基本实验包括 6 部分:①菌种选育,介绍了 4 类常用的菌种选育方法:物理诱变、化学诱变、原生质体融合和基因工程方法。②培养基配制与灭菌,介绍了微生物对营养的要求及常用的营养成分,培养基配制方法和注意事项。③摇瓶发酵,介绍了摇瓶发酵的基本操作,包括接种、移种、种子制备、发酵的单元操作技术。④发酵生化参数的检测,介绍了发酵过程常规的参数检测方法,如菌浓、基质、产物浓度的检测方法,同时还介绍了核酸、酶活、蛋白质等反应代谢的参数。⑤仪器分析,介绍了用气相色谱仪、液相色谱仪等检测代谢中间物的原理与方法。⑥过程工程参数检测,主要是介绍反应器中 K_La 、搅拌转速、氧传递速率的检测方法。综合实验是在基本实验基础上的提高,实验既有发酵全过程的训练如培养、参数检测、过程动力学分析的组合,也有内容的拓展,如酶反应、动物细胞培养等。

本教材可作为生物工程专业、发酵工程专业本科生的实验教材,也可以作为硕士和博士研究生实验的参考教材。

图书在版编目(CIP)数据

发酵工程实验/陈长华主编. —北京:高等教育出版社,
2009.7

ISBN 978 - 7 - 04 - 026718 - 1

I. 发… II. 陈… III. 发酵工程 - 实验 IV. TQ92 - 33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2009)第 067969 号

出版发行	高等教育出版社	购书热线	010 - 58581118
社 址	北京市西城区德外大街 4 号	咨询电话	400 - 810 - 0598
邮政编码	100120	网 址	http://www.hep.edu.cn
总 机	010 - 58581000		http://www.hep.com.cn
		网上订购	http://www.landracom.com
经 销	蓝色畅想图书发行有限公司		http://www.landracom.com.cn
印 刷	北京人卫印刷厂	畅想教育	http://www.widedu.com
开 本	787 × 1092 1/16	版 次	2009 年 7 月第 1 版
印 张	19.5	印 次	2009 年 7 月第 1 次印刷
字 数	470 000	定 价	25.10 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 26718 - 00

前 言

发酵工程既是传统的技术,又是长盛不衰的技术,随着生物技术的发展,人们对环境治理的重视和生物能源的开发,发酵工程的应用越来越广泛。随着电子技术、信息技术、化学分析技术的进展,发酵过程的研究也由传统的胞外环境优化发展到细胞水平、基因水平、工程水平的多参数多尺度研究。华东理工大学自 1955 年以来就开设了发酵工程实验(当时是抗生素专业实验),历经几十年的实践,实验内容不断更新,特别是 1990 年以后,我校承担了大量的国家科研项目和企业委托的科研项目,积累了研究技术,所以我们一直打算写一本关于实验的书,一方面总结我们已有的实验方法,为相关科研提供参考,另一方面也为需要寻找实验内容的学校提供方便。近年来设立生物工程、生物技术专业的学校越来越多,从 20 世纪 90 年代的 30 多所学校到现在的 200 多所学校,发酵工程实验成为必修的实验,我们希望这本书能为大家开设实验提供素材,各校可以根据自己的专业特色选做其中合适的实验。

本教材包括 3 个部分:绪论、发酵工程基本实验和综合实验。绪论部分主要介绍发酵实验室的基本要求和设备(官衡),统计学方法的实验设计和数据处理(李友元);基本实验包括菌种改造(高淑红),培养基配制与灭菌(官衡),摇瓶发酵实验(陈长华),发酵生化参数测定(陈长华),色谱分析在发酵工程中的应用(李友元)及过程工程参数测定(夏杰)。基本实验选择的产品是一些典型的产品如抗生素、有机酸、氨基酸、重组蛋白表达产品等,检测的参数有培养基中基质、产物、酶,以及溶氧、 K_La 等动力学参数。综合实验部分选择了 13 个实验,涉及传统微生物、重组微生物和动物细胞的培养。通过选做基本实验培养学生的基本实验技能,通过综合实验对学生进行实验设计和实验全过程的训练。

本书每一章都是首先讲述原理,然后配有实验,书中共有基本实验 70 多个,综合实验 13 个。这些实验都是我校几十年来为本科生开设的实验,以及研究生做论文时建立的实验方法,有些是自己实践的结果,少数是参考了兄弟院校的研究论文。实验操作描述详尽,便于学者实践。不同的学校可以根据自身的要求选做实验,研究生在进行课题研究时也可以应用书中方法来检测很多代谢参数。我校很多老师参与了综合实验的编写,如王永红、蔡海波、徐国谦等,在此对他们表示感谢。

我们希望这本书能对读者的科研或教学有所帮助,如有建议或问题欢迎指正。

主 编

2009 年 2 月

目 录

绪论	1	三、发酵工程实验设计(方案)的基本步骤	5
一、发酵工程实验的特点	1	(一) 实验设计(方案)的内容及要求	5
(一) 发酵工程实验的目的和要求	1	(二) 实验设计(方案)的拟定步骤	6
(二) 实验室的一般要求	2	(三) 数据回归分析	22
二、发酵工程实验室的特点与要求	3	四、发酵工程实验常用的设备	22
(一) 发酵工程实验的特点	3	(一) 摇瓶	22
(二) 发酵工程实验的要求	3	(二) 摇床	23
(三) 发酵工程实验室的安排	5	(三) 发酵罐	26

第一部分 基本技能实验

第一章 菌种改造	31	实验八 大肠杆菌营养缺陷型的筛选	63
第一节 菌种分离纯化和自然选育	31	实验九 原生质体制备及再生	65
第二节 微生物的诱变育种	32	实验十 原生质体融合	68
(一) 诱变育种步骤	32	第五节 基因组改组技术	69
(二) 物理诱变与化学诱变	34	第六节 微生物基因工程技术及其在微生物 育种中的应用	70
第三节 富集培养技术在育种中的应用	37	(一) 目的基因的获取	70
(一) 抗性突变株的富集	37	(二) 克隆载体的选择与构建	71
(二) 营养缺陷型的富集	38	(三) 外源基因与载体的连接	71
第四节 原生质体育种	41	(四) 重组 DNA 导入受体细胞	72
(一) 标记菌株的筛选	41	(五) 重组体的筛选	72
(二) 原生质体的制备	42	(六) 克隆基因的表达	72
(三) 原生质体的再生	43	(七) PCR 技术扩增目的基因	73
(四) 原生质体的融合	44	实验十一 基因组改组技术筛选蛋白酶高产 菌株	77
(五) 融合子的选择	45	实验十二 基因组 DNA 的提取	80
实验一 菌种的分离纯化	45	实验十三 煮沸法快速提取质粒 DNA	83
实验二 紫外诱变	48	实验十四 碱裂解法抽提质粒 DNA 与鉴定	85
实验三 微波诱变	51	实验十五 DNA 的限制性内切酶消化	88
实验四 亚硝基胍诱变	53	实验十六 琼脂糖电泳检测 DNA	89
实验五 噬菌体的分离和测定	54	实验十七 PCR 技术扩增枯草杆菌 <i>deoD</i>	
实验六 抗噬菌体菌种选育	57		
实验七 氨基酸抗反馈调节突变株的选育	60		

基因	91	实验三十二 比浊法测定发酵液中大肠杆菌 浓度	154
实验十八 重组 T 质粒的构建	93	实验三十三 测定菌体干重	155
实验十九 感受态的制备和转化	94	实验三十四 紫外分光光度法定量测定细胞 总核酸	156
实验二十 重组质粒的鉴定——菌落 PCR	97	实验三十五 红霉素效价的化学法测定一	157
第二章 培养基配制与灭菌	99	实验三十六 红霉素效价的化学法测定二	158
第一节 培养基的配制	99	实验三十七 红霉素生物效价的测定	159
(一) 微生物的营养需求及对物质的 吸收	99	实验三十八 二剂量法测定林可霉素生物 效价	161
(二) 培养基	102	实验三十九 利福霉素化学效价的测定	164
(三) 培养基的配制	107	实验四十 柠檬酸含量测定一	165
第二节 高压蒸汽灭菌	111	实验四十一 柠檬酸含量测定二	167
(一) 灭菌与消毒的基本概念	111	实验四十二 衣康酸含量测定	168
(二) 高压蒸汽灭菌的原理	113	实验四十三 丙酮酸含量测定	170
(三) 高压灭菌设备	116	实验四十四 用 SBA-40C 型生物传感分析 仪测定谷氨酸和谷氨酰胺	172
实验二十一 培养基的配制	118	实验四十五 华勃氏呼吸仪测定谷氨酸的 含量	174
实验二十二 高压灭菌锅的使用	121	实验四十六 双缩脲法测定蛋白质含量	177
第三章 摇瓶发酵	124	实验四十七 Folin-酚法测定蛋白质浓度	178
第一节 发酵原理	124	实验四十八 考马斯亮蓝法测定蛋白质 浓度	180
(一) 营养	124	实验四十九 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 检测蛋白表达和测定 蛋白质相对分子质量	181
(二) 温度	126	实验五十 发酵液中糖含量的测定	184
(三) pH	126	实验五十一 DNS 法测定还原糖浓度	187
(四) 溶氧	127	实验五十二 酶试剂盒法测定葡萄糖含量	188
第二节 摇瓶发酵实验	128	实验五十三 SBA-40 型谷氨酸(乳酸)-葡 萄糖双功能分析仪测定葡萄糖 含量	189
实验二十三 接种工具的认识与灭菌	128	实验五十四 发酵液氮含量的测定	192
实验二十四 接种和移种	130	实验五十五 靛酚蓝法测定铵离子	193
实验二十五 枯草芽孢杆菌生产腺苷	132	实验五十六 钼酸铵法测定无机磷	195
实验二十六 重组大肠杆菌羧肽酶的表达	135	实验五十七 还原法测定无机磷	196
实验二十七 洛伐他汀发酵	137	实验五十八 钼钒法测定无机磷	198
实验二十八 林可霉素发酵	140	实验五十九 无细胞抽提液的制备	199
实验二十九 四环素类抗生素定向发酵	142	实验六十 葡萄糖激酶的酶活测定	200
实验三十 β -半乳糖苷酶生成的调节	145		
实验三十一 芽孢杆菌发酵产碱性蛋白酶	148		
第四章 发酵生化参数的测定	151		
第一节 生化参数测定原理	151		
第二节 生化参数分析方法	154		

绪 论

一、发酵工程实验的特点

(一) 发酵工程实验的目的和要求

发酵工程是工程型课程,它不仅要培养学生实验室的基本技能,而且要培养学生生物反应器操作技能、发酵过程参数检测和分析技能及综合应用基本知识解决实际问题的能力。所以实验开设可分为两个阶段:

第一阶段,以单元操作为模块,产品流程为主线的实验教学阶段

为了便于学时安排,实验内容可分为若干模块:① 菌种的诱变与高产菌株的获得。② 培养基的制备与种子的培养。③ 发酵过程与参数检测。④ 产物测定。这4个部分的实验用一个具体产品衔接起来,学生操作的层次是在摇瓶发酵水平,实验安排是随课程同步开设,教学目标是通过对这4个内容的实验,使学生对从菌种到产品发酵整个流程有一个感性认识,加深对理论课程知识的理解。

第二阶段,综合实验的教学阶段

学生完成模块实验后进入综合性实验阶段,每个综合性实验一般在一周内完成,实现一个完整的生物产品全流程实验。实验内容涵盖动物细胞培养、基因工程菌发酵、参数相关分析,以及酶工程实验等。

实验课程安排是模块实验与理论课程同步开设,综合实验在课程结束后安排整时间段(通常是一个月)集中开设。在内容编排上模块实验相对固定,综合实验同时安排数个,供学生根据兴趣选取,综合实验内容可以每年有更新。

发酵工程是一门实验科学,通过实验课程的实践与认识加深对理论知识的理解,它是发酵工程教学的一个重要的必不可少的环节,一般来讲发酵工程实验教学目标可分为这样三个层次:

(1) 了解与认识发酵过程的流程

一般发酵的完整流程应该包括以下几个方面:① 菌种的获得。② 培养基的选择与配制。③ 纯培养控制(培养基及其相关设备与管道的灭菌与系统的无菌控制)。④ 种子的扩大培养。⑤ 发酵过程及其工艺控制(包括参数检测)。⑥ 产品的分离与提取以及副产物的分离与三废治理。其中前5个部分可以概括为发酵产品的实现,一般意义上发酵工程实验的教学范围主要针对这5个部分的内容。

所以发酵工程实验的第一个教学目标就是了解与认识发酵工程的流程,对发酵产品的生产过程形成一个完整的实践认识,在实验过程中了解各环节在发酵过程中的作用,以及基本要求。实验设置时可以通过单元模块的串联,也可以在一个大型的综合实验中让学生进行完整的体验。

(2) 认识与理解发酵工程的生物学与工程学基础

发酵首先是一种生物现象,但是作为产品的实现,最终解决的又是一个工程问题,生物学与工程学基础是发酵工程学科发展的重要支撑。发酵工程实验的第二个层次的教学目标是通过实

验加强学生的生物学基础,培养学生的工程学概念。

发酵工程的生物学、工程学发展很快。生物学方面:从生物学、生物化学的研究深入到各种组学乃至信号转导、系统生物学的注入;工程学方面:从灭菌设计、经典化学工程三传一反的引入到计算流体力学、复杂系统多尺度控制理论的出现以及现代装备制造技术等。所有这些都彰显出发酵工程是一门既传统又现代,并充满蓬勃生机的学科。因而发酵工程实验在设置知识点时要兼顾发酵工程的生物学与工程学基础。在设置生物学基础实验时要强调在发酵过程中的应用;在设置工程基础实验时要强调工程学的基本原理,以及基本原理解决问题的方法与思路。实验安排时可通过单元模块实验体现知识点,如果再能通过综合实验加以重复与灵活应用,将对培养学生的基本能力起到事半功倍的作用。

(3) 了解发酵产品生产的特性,培养解决问题的能力

发酵产品生产包含的范围很广,从传统的微生物制品到基因工程菌表达产物,目前一些产品的实现也有通过动、植物细胞表达的。所以发酵工程实验的另一个目标,就是让学习者了解发酵产品的多样性,在此基础上感性认识发酵产品的个性特点。此外发酵过程是一个复杂的多系统过程,特别是涉及生物过程,影响因素复杂,不可控因素多,根据过程的特点,灵活地解决问题,是发酵工程技术人员要具备的素养,也是发酵工程实验一个非常重要的教学目标。

在实验安排上,可通过一系列的综合实验来完成,综合实验安排时,应做到兼顾各种发酵类型。

(二) 实验室的一般要求

1. 实验室照明

发酵工程实验室需要良好的照明,如有可能在建筑设计时就要选择正确的朝向,比如建筑物应有朝南的窗户,东西墙应避免开窗户或减小到最低限度,为了避免光线直射到仪器上,可以在窗户上安装窗帘。实验室的灯光设计也应以保证足够的照明为原则。

2. 实验室位置

在选择发酵工程实验室的位置时应考虑环境的干净和卫生程度。一般来讲对于多层的建筑物,应将发酵工程实验室设置在较上的楼层,这不但可以使实验室所处的环境相对卫生,也会使实验室的采光更为良好。但是对于要安装大型发酵设备的实验室,考虑到设备的搬运可选择建筑物的底层。

3. 实验室大小

(1) 实验室长度

实验室设计时一般推荐采用 3 m 为一个长度单元(模数),这是指两个实验台之间的中心距离(基于实验台的宽度为 1.5 m,实验台间距为 1.5 m)。一般 3 m 的模数可以排出一个完全令人满意和整齐的平面布置。例如在单一模数的实验室 3 m 指的是隔墙中心到中心的距离,它是基于墙壁厚为 0.12 m,一边为宽 0.69 m 的实验台,一边为 0.78 m 的桌子,实验台的间距为 1.41 m。

模数取决于实验台的宽度和实验台的间距。一般来讲对带有试剂架的实验台宽度,靠墙的实验台一般为 0.78 m,中间实验台一般为 1.5 m。在有些场合下靠墙的实验台宽度可以为 0.6~0.7 m。实验台之间合理的间距应保证一个人方便通过时不影响正在工作的另一个人,经

验表明 1.38 ~ 1.5 m 是较为理想的,1.2 m 以下就显得拥挤了。在学生大实验室里由于每个人的实验台位置较小,经常是两个人背对背的工作,这时实验台的间距可考虑大于 1.5 m。

(2) 实验室跨度

随着建筑结构的发展,实验室的跨度已从 4.8 m 增加到 7.2 m 或 7.5 m,甚至于 8.1 ~ 9 m。实验室跨度的增加,可以提高建筑物的使用面积,而且也使得实验室面积能更好地利用,特别对于大规模学生实验,实验室的跨度应大于 7.2 m。

二、发酵工程实验室的特点与要求

(一) 发酵工程实验的特点

1. 基本微生物学实验的特点

虽然发酵工程包含的范围很广,除了通常的微生物发酵外,也应包含动(植物)培养的产品,但是一般来讲发酵工程实验的设置是基于微生物发酵基础上的。所以发酵工程实验室首先就是一个基本微生物实验室,应该能满足微生物学的基本实验,如微生物的纯培养、菌种的分离、纯化、鉴定等,如有可能也应考虑微生物的保藏。

2. 工程实验的特点

发酵工程实验有摇瓶和反应器两个不同层次。如果发酵工程实验室仅仅定位于摇瓶层次的发酵工程实验,那么发酵工程实验室和一般的微生物学实验室就没有太大的区别,仅仅是在摇床设备上要进行一些补充。对于摇床可以建立固定的摇床间,也可以购买移动式的箱式摇床。

如果发酵工程实验室定位于反应器水平的发酵工程实验,发酵工程实验室就要比一般的微生物实验室复杂得多。目前 2 L 到 300 L 以上的反应器都可用于发酵工程实验室中,其中 5 ~ 50 L 的反应器最常采用。在选用反应器规模时,对于大规模学生实验,台套数是一个重要的考虑因素,一般来讲一次实验 5 ~ 6 人一套反应器是比较理想的。如果考虑到资金以及实验室面积,选用大型的反应器会是困难的。在反应器的形式上也有多种选择,一般最常选用的是带通气搅拌的通用反应器,以及针对特定发酵产品开发的专门反应器。

3. 满足发酵过程分析的要求

发酵过程分析如果仅仅是一些简单生化指标,如菌体观察、菌浓、过程糖、氮指标等,一般在发酵工程实验室再配一些简单的仪器如分光光度计就可以胜任。但是如果要进行代谢过程的分析,气相、液相以及蛋白分析的相关仪器和设备就是必须的,这在发酵工程实验室的建立时,就要考虑专门的仪器分析室。

(二) 发酵工程实验的要求

前面已经提过,如果发酵工程实验室仅仅定位于摇瓶水平的发酵过程实验,一般的微生物学实验室基本可以胜任。但是如果定位于反应器水平的发酵过程实验,发酵工程实验室就要复杂得多。

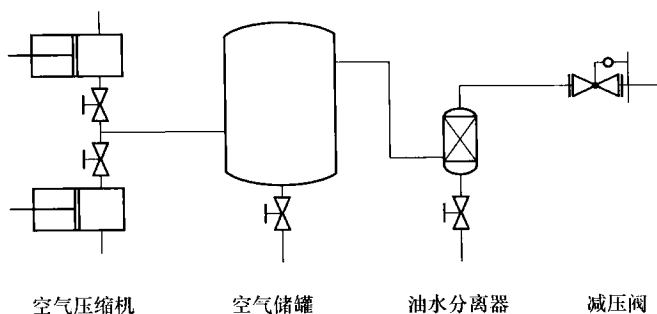
1. 干区和湿区

发酵工程实验室在设计时可以分为干区和湿区两个部分:干区指的是进行一般的微生物学实验(包括培养基配制等)以及分析实验所处的区域等;湿区主要指安装发酵罐以及蒸汽发生器所处的区域,如果实验室灭菌锅较多也应该集中安排在湿区。干区的地平同一般微生物实验室要进行防水处理,湿区的地平考虑到经常用水进行冲洗,需要严格的防水处理,所有的地平应防滑和易于清洗。在实验室整体布置时,仪器分析区域应当设置在最远离湿区的区域。

2. 公用设施

发酵工程实验室的公用设施不同于一般微生物学实验室,当有发酵罐运行时,除了通常的水、电、煤气外,还需要压缩空气、蒸汽甚至冷冻水等公用系统。对有一定台数和规模发酵罐的实验室,在公用工程设计时就要有统一的考虑,要为每个安装发酵罐的位置预留空气、上水(冷冻水)、蒸汽管路以及回水口。

① 压缩空气。发酵罐的运行需要不断通入无菌空气,对于有一定规模的发酵罐的实验室,必须设置一个专门的空气供应系统。空气供应系统最基本应包含:空气压缩机、空气储罐、油水分离器、减压阀,如有可能再加一个总过滤器。空压机运行时会有很大的噪声,空气系统应当尽可能单独设置在远离人员操作的区域,制备好的压缩空气由空气管路输送至安装发酵罐的实验室。发酵过程中空压机要能保持可靠的运行,所以选型时要对压缩机的容量留足余量,而且最好同时准备两台,以便一台有故障时,另一台可以立刻使用。



图绪-1 空气系统示意图

② 蒸汽。发酵罐的灭菌、移种以及在取样过程中都需要蒸汽进行灭菌。如果建筑物附近有蒸汽源,那么只要将蒸汽接进发酵工程实验室就可以了,对于一般发酵工程实验室 0.4 mPa 以上的蒸汽就足够了,由于发酵工程实验室反应器规模一般不大,所需蒸汽量很少,所以连接实验室裸露的蒸汽管路一定要加上隔热套,以减少热量的损失、保持蒸汽干燥和保护操作人员。

但是一般的发酵工程实验室,很少能有外部蒸汽源。这时可以选用一台连续蒸汽发生器来提供蒸汽,对于一般 $5\sim 6$ 台 50 L 以下发酵罐的发酵工程实验室,考虑到发酵罐灭菌时可以错开,一台每小时出 20 kg 蒸汽的发生器就足够了。事实上即使有外接蒸汽源的场合,对于发酵工程实验室也推荐使用蒸汽发生器,这样蒸汽质量便于控制,实验操作会更稳定。

③ 冷冻水。目前夏季的温度越来越高,且高温持续的时间也越来越长,这段时期依靠一般的自来水降温可能不能控制发酵温度。为了在高温时期发酵工程实验室能够正常运行,冷冻水的供应就显得比较重要。

对于实验室规模的小型反应器,发酵罐的表面传热会占据发酵过程热交换总量的相当份额,小型的反应器,可以利用发酵工程实验室的比较大功率的空调系统,使发酵过程的温度低于室外环境温度。但对于一定要在炎热夏季运行的发酵工程实验室,由于环境温度远高于发酵温度,再加上产生的发酵热,即使有空调系统也不足以维持所要求的发酵温度,则应配备冷冻水供应系统。对于 $5\sim 6$ 台 50 L 以下发酵罐的发酵工程实验室,一台 2.25 kW (3匹)以上的冷水机一般就能胜任。冷水机运行过程中,压缩机会有噪声,且频繁启动也有电磁干扰,所以应当远离发酵罐,

安排在相对独立的空间比较适宜。

(三) 发酵工程实验室的安排

发酵工程实验室的大小和房间的数目是由实验的需求、工作的性质以及承担的教学目标所决定的。实验室应当考虑以下几个特点:

① 发酵实验进行的微生物接种等操作过程都必须无菌的环境中进行,因此在发酵实验室中必须有一个无菌的空间或单独的无菌室。

② 发酵实验需要对微生物进行培养。少量的培养工作有时可以在培养箱中进行,大批量的培养则必须有专门的培养室。

③ 摇瓶水平的发酵研究需要进行摇瓶培养,因此要有专门的摇床间。

④ 发酵罐要集中安排和整体布局,实验室空间不但要满足常规的实验操作,还要便于发酵罐的清理、拆卸和维修,最好能为每个发酵罐分配一个柜子,专门放置其备件和附属用品。

⑤ 发酵实验需要经常进行灭菌操作,由于灭菌设备需要大量煤气(或电),灭菌操作时又会产生大量的蒸汽,因此有时在规模较大的发酵工程实验室,专门设置一个灭菌室,将灭菌设备集中起来使用是非常合理的做法。

⑥ 发酵工程实验过程中使用大量的玻璃器皿,工作结束后则需要足够的空间和设备来进行洗涤和干燥。

⑦ 在发酵工程实验室中,培养基的制备是必不可少的操作,对不同的发酵实验其培养基的制备过程有共同之处,在规模较大的实验室中,专门设立一个培养基制备的工作室可以避免与其他实验工作相互干扰。

⑧ 发酵的样品等必须保存在较低的温度下,因此发酵实验室必须有足够的冰箱容量(或冷库),来保存这些样品。有时对于特殊的要求必须有冷冻的环境来保存样品。

⑨ 仪器分析应该有专门的分析室,室内要保持洁净和通风条件,如有易燃气体要放置在仪器室外的专门房间,以保证仪器的使用寿命和操作人员的安全。

在发酵工程实验室设计时必须使各个房间及仪器等的布局合理,从而保证在整个实验过程中用于物品传输等所花费的时间最少。实验室设计还需考虑为实验室工作人员提供办公室等,特别对于大规模学生实验室也应根据教学班的安排设置大实验室。

三、发酵工程实验设计(方案)的基本步骤

在研究微生物生长和代谢中由于微生物受环境条件的直接和巨大影响以及代谢活动的多样性和调节控制的复杂性,经常需要通过大量的实验来探索一个生化过程的规律,确定最佳工艺配方或最佳发酵条件,使菌株的生产潜力得到最大限度的发挥。

如何安排实验,使实验次数尽量少,而又能达到好的实验效果呢?这是科学研究者经常碰到的问题。解决这个问题有一专门的方法,称为“实验设计”。所谓实验设计,是指运用数理统计的理论和方法来经济地合理地安排实验方案和分析实验结果。采用好的实验设计方法,可以减少实验次数,缩短实验周期,降低实验成本,事半功倍地迅速得到最佳的结果。

(一) 实验设计(方案)的内容及要求(明道绪, 2002)

进行任何一项科学实验,在实验前必须制定一个科学的、全面的实验计划,以便使该项研究工作能够顺利开展,从而保证实验任务的完成。虽然科研项目的级别、种类等有所不同,但基本要求是一致的。实验计划的内容一般应包括以下几个方面:

1. 课题名称与实验目的

课题的选择是整个研究工作的第一步。课题选择正确,此项研究工作就有了很好的开端。一般来说,实验课题通常来自两个方面:一是国家或企业指定的实验课题,这些实验课题不仅确定了科研选题的方向,而且也为研究人员选题提供了依据,并以此为基础提出最终的目标和题目。二是研究人员自己选定的实验课题。研究人员自选课题时,首先应该明确为什么要进行这项科学研究,也就是说,应明确研究的目的是什么,解决什么问题,以及在科研和生产中的作用、效果如何等。

2. 研究依据、内容及预期达到的经济技术指标

课题确定后,通过查阅国内外有关文献资料,阐明项目的研究意义和应用前景,国内外在该领域的研究概况、水平和发展趋势,理论依据、特色与创新之处。详细说明项目的具体研究内容和重点解决的问题,以及取得成果后的应用推广计划,预期达到的经济技术指标及预期的技术水平等。

3. 实验方案和实验设计方法

实验方案是全部实验工作的核心部分,主要包括研究的因素、水平的确定等,具体内容详述于后。方案确定后,结合实验条件选择合适的实验设计方法。

4. 实验记录的项目与要求

为了收集分析结果所需要的各个方面资料,应事先以表格的形式列出需观测的指标与要求。

5. 实验结果分析与效益估算

实验结束后,对各阶段所取得的资料要进行整理与分析,所以应明确采用统计分析的方法,如 t -检验,方差分析,回归与相关分析等。每一种实验设计都有相应的统计分析方法,统计方法应用不恰当,就不能获得正确的结论。如果实验效果显著,同时应计算经济效益。

6. 已具备的条件和研究进度安排

已具备的条件主要包括过去的研究工作基础或预试情况,现有的主要仪器设备,研究技术人员及协作条件,从其他渠道已得到的经费情况等。研究进度安排可根据实验的不同内容按日期、分阶段进行安排,定期写出总结报告。

(二) 实验设计(方案)的拟定步骤

一个周密、完善的实验方案,不仅可以节省人力、物力,多快好省地完成实验任务,而且可以获得正确的实验结论。如果方案拟订不合理,如因素、水平选择不当,部分实验方案所包含的水平组合针对性或代表性差,实验将得不出应有的结果,甚至导致实验的失败。因此,实验方案的拟订在整个实验中占着极其重要的位置。

1. 因素和水平的选择

实验者必须选择在实验中要考察的因素,这些因素变化的范围,以及在做实验时这些因素的水平。还必须考虑如何将这些因素控制在所希望的数值上以及如何测量这些数据。

(1) 根据实验的目的、任务和条件挑选实验因素

拟订方案时,在正确掌握生产中存在的问题后,对实验目的、任务进行仔细分析,抓住关键,突出重点。首先要挑选对实验指标影响较大的关键因素。若只考察一个因素,则可采用单因素实验。若是考察两个以上因素,则应采用多因素实验。如进行培养基添加某种微量元素的发酵实验,在拟定实验方案时,设置一个添加一定剂量微量元素的处理和不添加微量元素的对照,得

到一个包含两个处理的单因素实验方案;或设置几个添加不同剂量微量元素的处理和一个不添加微量元素的对照,得到一个包含多个处理的单因素实验方案。进行微量元素不同添加剂量与不同添加时间的实验,则安排一个两因素实验方案。应该注意,一个实验中研究的因素不宜过多,否则处理数太多,实验过于庞大,实验干扰因素难以控制。凡是能用简单方案的实验,就不用复杂方案。

(2) 根据各实验因素的性质分清水平间差异

各因素水平可根据不同课题、因素的特点来确定,以使处理的效应容易表现出来。

① 水平的数目要适当。水平数目过多,不仅难以反映出各水平间的差异,而且加大了处理数;水平数太少又容易漏掉一些好的信息,致使结果分析不全面。

② 水平间的差异要合理。有些因素在数量等级上只需少量的差异就反映出不同处理的效应。如培养基中微量元素的添加等。而有些则需较大的差异才能反映出不同处理效应来,如添加时间等。

③ 实验方案中各因素水平的排列要灵活掌握。一般可采用等差法(即等间距法)、等比法和随机法3种。结合培养基中添加微量元素为例说明。

等差法是指各相邻两个水平数量之差相等,如微量元素各水平的排列为:5 mg/L、10 mg/L、15 mg/L,其中10 mg/L为中心水平,向上向下都相隔5 mg。

等比法是指各相邻两个水平的数量比值相同,如微量元素各水平的排列为2 mg/L、4 mg/L、8 mg/L、16 mg/L,相邻两水平之比为1:2。

随机法是指因素各水平随机排列,如微量元素各水平排列为15 mg/L、10 mg/L、40 mg/L、30 mg/L,各水平的数量无一定关系。

2. 响应变量的选择

在选择响应变量(实验指标)时,实验者应该确信这一个变量真正会对所研究的过程提供有用的信息。多重响应变量不常用。仪表性能(或测量误差)也是一个重要因素。如果仪表性能差,则只有相对大的因素效应才能通过实验检测出来,或者需要做附加的重复实验。

3. 实验设计的选择

选择设计需要考虑样本量(重复次数),并对实验选择合适的实验次序,确定是否划分区组或是涉及其他随机化约束。

(1) 实验方案中必须设立作为比较标准的对照

实验的目的就是通过比较来鉴别处理效应大小、好坏等。为了达到这一目的,实验方案应当包括各实验处理,以及作为比较的对照。任何实验都不能缺少对照,否则就不能显示出实验的处理效果。根据研究的目的与内容,可选择不同的对照形式。例如,进行添加微量元素的发酵实验时,添加微量元素为处理,不添加微量元素为对照,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,各个处理可互为对照,不必再设对照。

(2) 实验处理(包括对照)之间应遵循唯一差异原则

这是指在进行处理间比较时,除了实验处理不同外,其他所有条件应当尽量一致或相同,使其具有可比性,才能使处理间的比较结果可靠。

4. 进行实验

当进行实验时,谨慎监视实验的过程以确保每个步骤按计划做。这个阶段中实验方法的错

误通常会破坏实验的有效性。

5. 数据分析

分析数据应该用统计学方法,使结果和结论是客观的,而不是主观臆断。如果实验正确设计了,并且按设计实施了,则不需要运用繁琐的人工方法进行统计分析。有很多精美的软件包可以用来分析数据,在数据的解释中,简单的图解法起重要的作用。

统计方法并不能证明一个因素(或几个因素)有特殊的效应。它们为实验结果的可靠性和有效性提供准则。从本质上说,统计学方法不允许利用实验来证明任何事情,但是,统计学方法允许我们去度量结论中可能出现的或者对一个命题附加置信水平。统计学方法的基本优点是它对作出判断的过程增进了客观性。统计学方法与好的科学知识以及常识结合在一起,通常会导致正确的结论。

6. 结论和建议

一旦数据分析完成了,实验者必须写出有关实验结论并推荐行动的路线。在这一阶段,常常可采用图解法,特别是给其他人介绍成果时更是如此。还需进行跟踪实验与确认实验以证实实验所得结论的正确性。

在发酵工程实验中,影响最终结果的因素众多,各种因素发挥的作用又往往不同,通常只有少数因素起着决定性的作用。如何找到此类决定性因素,是发酵工程实验,准确地说是发酵工艺优化实验的主要目标之一。根据这个特点,一般将此类实验分为三个步骤见表绪-1(曲音波, 2005)。

表绪-1 发酵工艺优化的主要步骤

步骤	特 征	目 标
筛选	因素多,较广泛的范围	找出重要的影响因素
优化	因素少,在较适范围内	建立预测模型
确证	使用预测的最优化条件	验证结果

由于发酵问题的复杂性,优化过程很难一次性完成,需要反复实验,不断地向最优条件接近,类似于振荡收敛的过程:首先提出要研究的问题,选择高效率的实验设计,收集能解决问题的数据,利用有效的统计分析和作图来分析数据,寻找答案并提出新的更加明确的问题,重新设计新的实验,重复以上过程,以便不断接近最优条件。

通过实验研究,通常要明确回答下面的几个问题:① 因素的主次。比如所有考察的因素中哪些是影响指标的主要因素,哪些是次要的,哪些是影响很小的。② 因素水平与指标的关系。比如每个因素各取不同水平时指标是怎样变化的。③ 什么是较好的生产条件。也就是预期最好指标下各因素的水平是什么。④ 进一步实验的方向。得到的结论应该能指导下一步实验的安排。

目前实验室很常用的优化方法仍然是单因子法(one at a time approach),或称为单维搜索法。这种方法是在假设各因素间不存在交互作用的前提下,固定所有其他条件,每次只改变一个因素的水平,逐个因素进行考察的优化方法。但是,由于微生物发酵条件研究中要考察的各因素间存在交互作用,因此,用该方法获得的所谓最佳条件往往不是真正最优的。此方法一般只应用

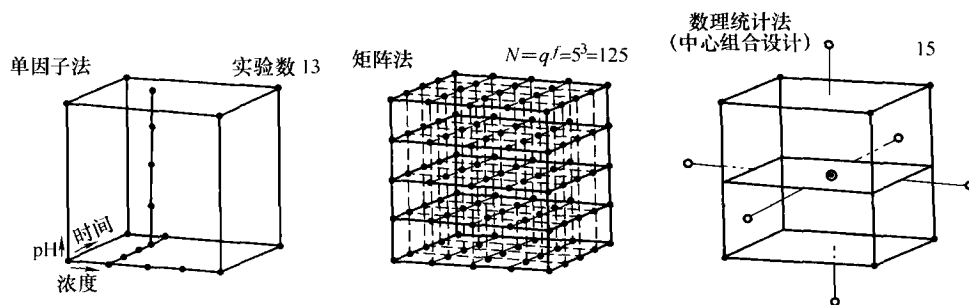
于影响较大,而可能的交互作用较小的影响因子的研究。

当考察的因素较多时,如果对每一种可能的实验条件组合都要进行研究,即采用所谓的矩阵法时,则需要非常多的实验次数和很长的实验周期。在矩阵法中,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,甚至是不可能完成的任务。这就要求采用数理统计的原理,在可能的实验空间里选择少量有代表性的实验点先进行研究,即采用所谓的数理统计法。

表绪-2和图绪-2对主要实验设计方法的优缺点进行了比较和分析。

表绪-2 主要实验设计方法的比较

方 法	特 征	优 缺 点
单因子法	每次检验一个因素	方便简单,但耗时费力,不能检验交互作用
矩阵法	多变量多水平的所有组合	考察所有可能点,但工作量极大,难以实施
数理统计法	选取少量有代表性的实验点,统计分析整体规律	高效率、较准确,但需要较多的数理统计知识



图绪-2 3种可能的实验设计方法的比较

从图绪-2中可以清楚地看出,当要对3种实验因子进行5个水平的优化研究时,单因子法不需要很多的测定数(13个),但如果没有充分地探索实验空间,则很可能会错过最优的实验点。图绪-2中3因素5水平矩阵法(全面实验)的测定个数是 $5^3 = 125$ 次,这种方法是有效的,但是没有效率。第三种方法(中心组合设计)有规律地选择了少数有代表性的实验点,对整个实验空间进行了全面探索,只使用15个测定就可能找出因子与效应之间的关系,这是最有效率的研究方法。

如何使用数理统计方法来精心设计实验,争取通过尽可能少的实验样本,搜集到尽可能多的富含信息的实验数据。

数理统计法实验设计的具体方法很多,常用有部分因子设计、正交设计、均匀设计(uniform design)、中心组合设计等。常用实验设计的主要特点和用途归纳在表绪-3中。

尽管不同的实验设计方法形式、特点有所不同,但其原理都是在众多影响因素不同水平的组合中,选取少数有代表性的组合进行实验,进而通过计算来推论整体的变化规律,只是因其特点各不相同,所以应该认真选择,以用于不同的目的。数学家已经设计了各种各样的表格供选择使

用,只要能理解其各自的特点和用途,应用起来并不太困难。下面就几种常用的数理统计方法作一个简要介绍。

表绪-3 常用数理统计实验设计方法主要特点和用途

实验设计法	特 点	用 途
部分因子设计	较多因素,较少水平(常 2~3 水平)	粗筛主要影响因素
正交设计	实验点均匀分散,整齐可比,易分析	因素筛选和优化
均匀设计	只求实验点均匀分散,但难分析	优化
中心组合设计	围绕预测的最佳点均匀分散	交互影响因素间的优化

7. 几种常用的方法

(1) 部分因子设计法

部分因子设计(fractional factorial design, FFD)是国外较重视的实验设计法,适用于因素筛选实验,用来确定在可能的众多影响因子中,快速有效地筛选出最为重要的几种因素,以供进一步研究,进而确定哪种实验因子能影响工艺的运行,以及怎样设定重要因子的组合才能改进工艺效能。

部分因子设计的特点是每个因素一般只取高(+1)和低(-1)两种水平,部分设计中可以增加中心点(0)。高低水平的差值不能过大,以防掩盖了其他因素的作用。一般每组实验可研究 3~11 种因子的效应。依据对实验精度(resolution)要求的不同,标准的部分因子设计要做 8、16、32 个实验,也可以改为 12 个或 24 个实验。根据实验的水平数及设计原理,部分因子设计可以分为二水平部分因子(two-level fractional factorial, FF),混合二-三水平部分因子(mixed two-level and three-level fractional factorial, MF),不规则部分因子(irregular two-level fractional factorial design, IF),Plackett-Burman(PB)设计等。常见的设计见表绪-4。

表绪-4 部分常见的部分因子设计

因子数	实 验 数				
	8	12	16	24	32
3	FF0308	MF0312			
4	FF0408	IF0412 或 MF0412	FF0416	MF0424	
5	FF0508	IF0512 或 MF0512	FF0516	MF0524	FF0532
6	FF0608	IF0612	FF0616	IF0624	FF0632
7	FF0708	PB0712	FF0716	PB0724	FF0732
8		PB0812	FF0816	PB0824	
9		PB0912	FF0916	PB0924	
10		PB1012	FF1016	PB1024	
11		PB1112	FF1116	PB1124	

注:设计名的前两位为分类名,中间两位为因子数,后两位为实验数。