

高等学校卓越工程师教育培养计划系列实验教材

发酵工艺学实验

杨慧林 主编



科学出版社

高等学校卓越工程师教育培养计划系列实验教材

发酵工艺学实验

杨慧林 主编

图书在版编目(CIP)数据

发酵工艺学实验 / 杨慧林主编. — 北京: 科学出版社, 2012.11

Ⅰ. 发… Ⅱ. 杨… Ⅲ. 发酵工艺学—实验—高等学校—教材

ISBN 978-7-03-031973-4

Ⅰ. 发—Ⅱ. 杨—Ⅲ. 发酵工艺学—实验—高等学校—教材

IV. Q782.4-33

中国版

科学出版社

北京

内 容 简 介

本教材内容涵盖发酵工艺学实验基础、发酵菌种选育及保藏工艺、发酵生化参数测定、发酵产品实验、发酵工艺的控制及优化等方面。各实验章节内容分基础实验及综合性实验两类展开。期望读者通过本教材,在较好掌握基础发酵实验技能的同时,也能够对探究性实验及前沿科学进行了解及掌握。

本教材可作为发酵工程、生物工程、食品科学、生物技术等专业本(专)科生的实验指导书,也可作为硕士研究生及本领域技术人员实验的参考书。

图书在版编目(CIP)数据

发酵工艺学实验 / 杨慧林主编. - 北京: 科学出版社, 2018.11

(高等学校卓越工程师教育培养计划系列实验教材)

ISBN 978-7-03-059152-4

I. ①发… II. ①杨… III. ①发酵—生产工艺—实验—高等学校—教材
IV. ①TQ920.6-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2018) 第 240981 号

责任编辑: 张静秋 马程迪 / 责任校对: 严 娜
责任印制: 吴兆东 / 封面设计: 铭轩堂

科学出版社 出版

北京东黄城根北街16号

邮政编码: 100717

<http://www.sciencep.com>

北京中石油彩色印刷有限责任公司 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2018年11月第 一 版 开本: 720×1000 1/16

2019年1月第二次印刷 印张: 10 1/4

字数: 210 000

定价: 39.00 元

(如有印装质量问题, 我社负责调换)

《发酵工艺学实验》编写委员会

主 编 杨慧林

副 主 编 王筱兰 涂宗财 赵文鹏

编写人员 颜日明 张志斌 廖焰焰 张 菊

前 言

“发酵工程”是基于微生物基础知识、应用于生产实际的课程之一，是研究利用微生物大量生产各种有用物质的一门现代工业学科。与此同时，该学科也是一个由多学科交叉、融合而形成的技术性和应用性较强的开放性学科，自诞生以来就在生物技术产业化过程中扮演着关键角色。为了配合发酵工程模块的教学，当前全国很多生物类专业都开设了“发酵工艺学实验”课程，该实验课程通常是生物工程专业重要的必修课，也常作为生物科学、生物技术等专业的选修课。因发酵工程学科实践性很强，仅进行课堂理论的教学远远不够，还需要学生锻炼动手能力与创新能力，而这些能力往往需要实验教学环境才能得以培养，学生自身专业素质需通过理论与实践的结合才能够在一定程度上得以提升。

自江西师范大学开设“发酵工艺学实验”课程以来，由于各种原因，现行的发酵工艺学实验教材还无法满足教学要求，一些已出版的发酵工程实验指导教材在实验设计、培养目标上与实际的教学实践存在较大差异，在许多普通高校都存在适用性不强的现象。因此，编写一本适用性强、重基础、覆盖较全面的实验简明教程就显得很有必要。本教材正是从这几方面入手，内容囊括发酵工程上游、中游和下游实验技术，并结合教学实际及科技发展，增加高通量筛选、响应面设计等内容。与现有教材相比，本教材重点突出简明性与实用性，切合江西师范大学实际，考虑到生物专业本（专）科阶段仍以通识性教育为主，故本教材选取的实验大部分为基础实验，并结合了部分专业性较强的综合实验、交叉学科实验，大大方便了实验教学的展开，同时也方便学生课外自学。本教材在编写的过程中主要注意了以下几点。

(1) 按发酵工程实验基础知识、发酵上游、生化参数分析、发酵中下游等顺序对全书主要内容进行编排。内容涵盖发酵工艺学实验基础、发酵菌种筛选及保藏工艺、发酵生化参数测定、发酵产品实验、发酵工艺的控制及优化等方面。全书遵循内容由浅入深及让学生能够以夯实基础为主、适当提高为辅的原则，使不同学习能力读者的相关实验技能在学习后得到较大的基础性提升。

(2) 教材内容与教学实践紧密结合。当前许多普通高校的实验教学条件或多或少都存在一些短板，针对这个问题，本教材大部分基础实验方法、实验内容对实验条件要求较低，大部分实验在普通高校均可开展，由此避免了形式主义与教材缺乏指导意义的现象。

(3) 实验内容结合编者近年来在发酵工程及相关交叉学科领域的代表性课题进行编写, 从而真正实现科研为教学服务、教学巩固科研成果的目的。从某个角度来看, 也有利于培养学生的科研兴趣, 吸引学生进入实验室参与科研工作。因本教材实验设计的原则具有较强的通用性, 其余各单位如使用本教材, 可根据教师现有(过去)课题对实验进行调整, 以便于实验教学工作的开展。

本教材的主要分工如下: 第一章由杨慧林编写; 第二章由王筱兰编写; 第三章由赵文鹏编写; 第四章由杨慧林与涂宗财共同编写; 第五章由杨慧林与赵文鹏共同编写; 附录的编写、初稿的校对由颜日明及其余参编人员完成; 杨慧林完成全文统稿。

本教材获得“江西省普通本科高校卓越工程师教育培养计划”资助。本教材在编写过程中, 得到了许多专家、学者的指导与支持, 提出了许多建设性意见, 同时编写过程中参考了前人的一些资料, 未能一一注明引用, 在此一并表示感谢!

尽管编者力求注重本教材的系统性、实践性与简明性, 但由于发酵工程是一门全方面发展的交叉学科, 限于编者的水平, 加上时间仓促, 书中仍存在许多疏漏之处, 敬请广大读者不吝赐教, 使本教材更完善、更有利于教学。

编者

2018年3月

目 录

第一章 导 言	1
第一节 发酵工艺学实验守则与安全制度	1
第二节 发酵工艺学实验设计的基本方法	4
第三节 发酵工艺学实验操作的基础知识	11
第二章 菌种选育及保藏工艺实验	25
第一节 自然选育	25
实验2-1-1 培养基的配制与灭菌	26
实验2-1-2 洁霉菌的分离纯化	29
实验2-1-3 乳酸细菌的分离与初步鉴定	32
实验2-1-4 小单孢菌的分离纯化	35
实验2-1-5 豆豉中高产蛋白酶菌株的筛选	37
实验2-1-6 产漆酶真菌菌株的筛选	39
第二节 诱变育种	41
实验2-2-1 洁霉菌的紫外线诱变	41
实验2-2-2 芽孢杆菌的微波诱变	43
实验2-2-3 曲霉菌的亚硝基胍诱变	45
实验2-2-4 多黏杆菌的高通量诱变筛选	46
实验2-2-5 营养缺陷型大肠杆菌的诱变筛选	48
第三节 其他常见育种技术	50
实验2-3-1 芽孢杆菌的原生质体融合育种	50
实验2-3-2 小单孢菌的原生质体融合育种	53
实验2-3-3 谷氨酸生产菌的原生质体诱变育种	55
实验2-3-4 毕赤酵母表达酶工程菌株的构建	57
第四节 菌种的保藏与复壮	62
实验2-4-1 发酵工程菌种的保藏	62
实验2-4-2 发酵工程菌种的复壮	64
第三章 发酵生化参数的测定实验	66
第一节 无机盐离子含量的测定	67

实验3-1-1 发酵液中无机磷含量的测定	67
实验3-1-2 发酵液中铵根离子的测定	69
实验3-1-3 发酵液中钙离子含量的测定	70
实验3-1-4 发酵液中钠、钾含量的测定	71
第二节 发酵液有机成分含量的测定	73
实验3-2-1 α -氨基氮含量的测定	73
实验3-2-2 蛋白质浓度的测定	74
实验3-2-3 总糖及还原糖含量的测定	76
实验3-2-4 乙醇浓度的测定	78
实验3-2-5 谷氨酸含量的测定	79
实验3-2-6 双乙酰含量的测定	81
实验3-2-7 苦味质含量的测定	83
第三节 其他常见发酵参数的测定	84
实验3-3-1 菌体浓度的测定	84
实验3-3-2 发酵菌株生长曲线的测定	86
实验3-3-3 体积溶氧系数的测定	87
实验3-3-4 效价的化学法测定	89
实验3-3-5 生物效价的测定	90
第四章 发酵产品实验	95
第一节 基础发酵产品的制作	95
实验4-1-1 酸奶的制作	95
实验4-1-2 甜酒酿的发酵	97
实验4-1-3 淡啤酒的酿制	99
实验4-1-4 食醋的酿制	100
实验4-1-5 豆腐乳的制作	101
实验4-1-6 酱油的酿制	103
第二节 典型发酵工业产品的生产	106
实验4-2-1 谷氨酸发酵	107
实验4-2-2 L-乳酸的发酵罐生产	109
实验4-2-3 固态发酵产纤维素酶	111
实验4-2-4 苏云金芽孢杆菌杀虫剂的深层发酵	112
实验4-2-5 基因工程菌的发酵生产	115
第五章 发酵工艺的控制及优化	118
实验5-1 发酵污染的控制与检测	119

实验5-2 分批补料发酵的控制与检测	121
实验5-3 发酵罐培养酵母动力学模型的建立	123
实验5-4 发酵液中溶解氧量的控制与检测	125
实验5-5 发酵工艺的优化设计	128
主要参考文献	137
附录 I 缩略词表	138
附录 II 常用培养基的配制	138
附录 III 常用试(指示)剂、染色液及缓冲液的配制	149

第一章 导 言

第一节 发酵工艺学实验守则与安全制度

(一) 发酵工艺学实验守则

(1) 自觉遵守课堂纪律,不迟到,不早退;完成实验后将实验记录本(表)交给指导教师签字后,方可离开。

(2) 实验室保持肃静,不许喧哗、打闹,营造整洁、安静、有序的实验环境。

(3) 实验台面保持整洁,书包等物品不可放在实验台上,按规定的位置放置。药品摆放整齐、有序,公用试剂用毕应立即盖严,物归原处,勿将试剂、药品洒在实验台面和地上。取出的试剂和标准溶液,如未用尽,切勿倒回瓶内,以免带入杂质。吸头、滴管专用专放,要保证一种溶液换一支新的,防止交叉污染。使用微量移液器时,必须熟读“使用方法”,玻璃器皿轻拿轻放。

(4) 课前认真预习,切忌盲目,做好准备,提高效率。实验过程中要听从指导教师的安排,严肃认真地按操作规程进行实验,并把实验结果和数据及时、如实记录在实验记录本(表)上,文字要简练、准确。

(5) 注意节约药品、试剂、各种耗材和水电。洗涤和使用玻璃等耗材时,应小心仔细,防止损坏。如意外损坏时,应如实向指导教师报告,并填写损坏登记表,然后补领。

(6) 爱护器材、设备,面对未知仪器,须在教师的指导下使用;使用仪器,特别是贵重精密仪器时,应严格遵守操作规程,发现故障或损坏须立即报告指导教师,不得擅自检修。凡非正常使用造成的实验设备损坏按有关规定赔偿。

(7) 鼓励学生对实验内容和安排提出改进,对实验现象进行讨论;倡导在教学计划外做探索性、研究性实验,但需事先提出申请,经批准同意后方可进行。

(8) 实验用品一律不得擅自带出实验室。实验完毕,应将使用过的仪器洗净,并整齐地放回实验柜内。实验废弃物(如滤纸、一次性手套等),毒害性实验材料应倾倒在指定地点,统一处理,不得随意乱丢。清理好实验台,关好电闸、水龙头和煤气开关,经指导教师检查合格后才能离开实验室。

(9) 每次实验结束后由学生轮流值勤, 负责打扫和整理实验室, 并检查水龙头、煤气开关、门、窗是否关紧, 电闸是否拉掉, 以保持实验室的整洁和安全。

(二) 发酵工艺学实验安全制度

1. 安全用电

(1) 注意仪器的电压和电流要符合仪器的负载要求。

(2) 严格按照电器使用规程操作, 不能随意拆卸和玩弄电器。

(3) 严防触电。绝不可用湿手触碰已开电闸和电器开关, 检查电器设备是否漏电时, 应使用试电笔; 凡是漏电仪器一律不能使用。

2. 防止火灾

(1) 实验室起火的原因有电流短路, 不安全地使用电炉、煤气灯和易燃易爆药物等。为防患于未然, 实验室必须配备一定数量的消防器材, 并按消防规定保管使用。最重要的是每个实验者都应有实验室安全观念, 时刻保持警惕。

(2) 实验室内严禁吸烟。

(3) 使用煤气灯时应先将火种点燃, 一手执火种靠近灯口, 一手慢慢打开煤气灯, 火焰大小和火力强弱应根据实验的需要来调节。煤气灯应随用随关, 严防煤气泄漏; 用火时应做到火着人在, 人走火灭。

(4) 乙醇、丙酮、乙醚等易燃品不能直接加热, 并要远离火源操作和放置。

(5) 实验室内严禁贮存大量的易燃物(如乙醚、丙酮、乙醇、苯等)。应在远离火源处或将火焰熄灭后, 才可大量倾倒这些液体。低沸点的有机溶剂不可在火焰上直接加热, 只能利用带回流冷凝管的装置在水浴上加热或蒸馏。

(6) 离开实验室前应认真、负责地进行安全检查, 关好煤气开关和水龙头, 拉下电闸。

3. 严防中毒

(1) 化学试剂有相对无毒、中度毒性和剧毒之分, 在处理剧毒药物时要特别谨慎、小心。国际上常用某些标志表示不同毒性的实验化学药品。对生物危险品或放射性物质进行存放或操作的实验室也要有指定的标志。理化实验中会用到溴化乙锭、三氯甲烷(氯仿)、酚、丙烯酰胺等致癌、有毒和有害物质。

(2) 使用毒性物质或致癌物时必须根据试剂瓶上的标签说明严格操作, 安全称量、转移和保管。操作戴手套, 必要时戴口罩, 并在通风橱中进行。沾过毒性物质或致癌物的容器应单独清洗和处理。

(3) 水银温度计、气量计等汞金属设备破损时必须立即采取措施回收汞, 并在污染处撒上一层硫黄粉以防汞蒸气中毒。

(4) 所有实验用废弃物如琼脂糖凝胶、滤纸、玻璃碎片等, 都要收集在废物桶里, 不能倒在水槽内或到处乱扔。

4. 避免烧伤和创伤

(1) 使用玻璃、金属器材时注意防止割伤及机械创伤。

(2) 浓酸、浓碱腐蚀性很强, 必须极为小心地操作, 用吸量管量取这些试剂(包括有毒物)时, 必须使用橡皮球, 绝对不能用口吸取。

5. 预防生物危害

(1) 生物材料如微生物、动物的组织、细胞培养液、血液和分泌物都可能存在细菌和病毒感染的潜在危险, 如通过血液感染的血清性肝炎就属于严重的生物危害传染性疾病, 主要传递途径除血液外, 还包括通过其他体液传递。因此, 处理各种生物材料必须谨慎、小心。在操作潜在致病性病原微生物时应该佩戴双层手套, 做完实验必须立刻用肥皂、洗涤剂或消毒液充分洗净双手。

(2) 使用微生物作为实验材料时, 尤其要注意安全和清洁卫生。被污染的物品必须进行高压消毒或烧成灰烬。被污染的玻璃用具应在清洗和高压灭菌之前立即浸泡在适当的消毒液中。

(3) 操作时应根据实验环境中生物因子的危害程度, 采取不同级别的防护措施 [生物安全防护水平 (BSL) 分为 4 级, I 级防护水平最低, IV 级防护水平最高], 如张贴警示标志及配备保护性实验服、各级别生物安全柜、过滤器、消毒系统、气流循环系统, 并设立单独隔离区等。

(三) 实验事故处理

实验过程中不慎发生受伤事故, 应立即采取适当的急救措施。

(1) 受玻璃割伤及其他机械损伤, 首先必须检查伤口内有无玻璃或金属等物碎片, 然后用硼酸水洗净, 再擦碘酒或紫药水, 必要时用纱布包扎。若伤口较大或过深而大量出血, 应迅速在伤口上部和下部扎紧血管止血, 并立即到医院诊治。

(2) 对于烫伤, 一般先用乙醇溶液 (90%~95%) 消毒, 然后涂上烫伤膏。如果伤处红痛、微肿且无水泡 (一级灼伤), 可用橄榄油或用棉花蘸乙醇溶液敷盖伤处; 若皮肤起泡 (二级灼伤), 不要弄破水泡以免感染; 烫伤处皮肤呈棕色或黑色 (三级灼伤) 时, 应用干燥、无菌的消毒纱布轻轻包扎好, 急送医院治疗。

(3) 强碱 (如氢氧化钠、氢氧化钾)、钠、钾等触及皮肤而引起灼伤时, 要先用大量自来水冲洗, 再用 2% 或 5% 乙酸溶液洗涤。

(4) 强酸、溴等触及皮肤而致灼伤时, 应立即用大量自来水冲洗, 再以 5% 碳酸氢钠溶液或 5% 氢氧化铵溶液洗涤。

(5) 如酚触及皮肤引起灼伤, 应该用大量自来水清洗, 并用肥皂和水洗涤, 忌用乙醇。

(6) 当煤气中毒时, 应到室外呼吸新鲜空气, 若严重时应立即到医院诊治。

(7) 微生物实验中, 若感染性液体 (致病菌液或培养物) 外溢到皮肤应立即停止工作, 脱掉手套, 随后用 75% 乙醇溶液进行皮肤消毒, 再用大量自来水冲洗。而当



图 1-1 便携式洗眼盒

感染性液体溅入眼睛后，也应立即停止工作，脱掉手套，迅速到缓冲区用便携式洗眼盒（图 1-1）冲洗，而后用生理盐水冲洗（注意动作要轻柔，勿损伤眼睛）。

发酵工艺学实验室应备有急救药品，如生理盐水、医用酒精、红药水、1%~2%的乙酸或硼酸溶液、1%碳酸氢钠溶液、2%硫代硫酸钠溶液、甘油、止血粉、凡士林等，还应备有镊子、剪刀、纱布、药棉、绷带等急救用具。

实验过程中一旦发生火灾，应沉着、冷静，不要惊慌失措；应立即切断电源，熄灭附近所有火源，迅速移开着火现场周围的易燃物。特别是有机溶剂着火时，一般不能用水扑灭，否则会使火焰蔓延；小火可用湿布或石棉布盖熄，若火势较大时应根据具体情况采用相应的灭火器材。

第二节 发酵工艺学实验设计的基本方法

发酵工艺学是利用微生物的生长代谢活动来生产商业产品的一门学科，而在研究微生物生长和代谢的试验中，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，经常需要通过大量实验来探索一个生化过程的规律，进而确定最佳工艺配方或最佳试验条件，使得微生物的生产潜力得到最大限度的发挥。如何安排实验，使实验次数尽量少又能达到预期理想的效果，是科学实验环节经常碰到的问题。“实验设计”则是一种专门解决该问题的方法，其通过运用数理统计的理论和方法经济、合理地安排实验方案和分析实验结果，进而减少实验次数、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

虽然本（专）科阶段的发酵工艺学实验教学仍以验证性实验为主，与科学实验的级别、种类等存在一定的差异，但基本要求是一致的。进行任何一项科学实验，在实验前必须制订一个科学、全面的实验计划，使得该项研究工作得以顺利开展，实验任务能够按时完成。科学的实验计划的内容一般应包括以下几方面。

1. 实验名称与目的

实验课题的选择是整个研究工作的第一步，一个合理的选题往往意味着研究工作具有一个良好的开端。总的来看，实验课题通常来自两个渠道：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，也为研究人员

最终的目标和题目的确定提供了重要参考；二是研究人员自己选定的实验课题，研究人员自选课题时，应明确研究目的是什么，要解决什么问题，以及在科研和生产中的作用效果如何等。

2. 研究依据、内容及预期成果

确定研究对象后，可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。还应详细说明项目的具体研究内容和需重点解决的问题，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，再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的资料，应事先以表格的形式列出需观测的指标，并明确实验操作中的各项具体要求。

5. 实验结果分析及效益评估

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，而不恰当的统计方法往往会导致错误的实验结论。需要指出的是，如实验效果显著，同时应计算经济效益。

6. 已具备的条件和实验进度安排

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、研究技术人员协作条件、从其他渠道已得到的经费情况等。研究进度可根据实验内容的差异分阶段进行合理安排，定期写出总结报告。

(二) 实验设计的基本原则

1. 重复性原则

重复就是将一个基本实验重复多次，根据一次实验的结果就下结论往往不一定准确，缺乏必要的科学严谨性及说服力。实验条件在每次实验时往往存在波动，而总体平均值波动较小，所以重复有助于减弱因波动而产生的误差，主要表现在：①估计实验误差，判断样本之间差异的显著性往往是通过误差估计值来获得的，而误差估计值则是从重复实验中得到的。②更精确地估计处理效应，减少实验误差。例如，要比较两种不同抗生素对某类病原体繁殖的抑制效果，若每种抗生素只做一次抗菌实验，抗生素 a 作用 24 h 后有效抑制率达到 92%，抗生素 b 作用相同时间后有效抑制率则为 91%。这时我们难以正确判断两种抗生素抑菌效果有无显著差异，因为造成这种差异的原因可能是抗生素本身，也有可能是实验中的统计误差，故不能轻易下结论。若通过 n 个培养样本并进行多批次实验进行

平均抑制率的比较, 由于平均数方差为样本方差的 $1/n$, 当 n 足够大时, 两种抗生素抑菌效果之间的差异就可以被认为是专一效应间的差异。

2. 随机化原则

随机化是指实验材料的分配和各实验点的实验次序都要随机确定。在多样本实验中随机化选取及分组实验较为普遍。按照随机的原则进行选取及分组是实验设计中保证非处理因素均衡的一个重要手段。只有通过随机分组, 才能避免出现各种人为的客观因素和主观因素的偏性, 使不可控因子的影响部分“抵消”, 不致积累, 进而提高统计检验效能。传统上常用的随机化分组方法有随机数字表法和随机排列表法, 大规模样本的随机化处理则常常采用操作性较强的专业数理统计软件。

3. 局部控制原则

局部控制是指在实验时采取一定的技术措施或方法来控制或降低非实验因素对实验结果的影响。实验时, 当实验环境或单位差异较大时, 仅根据重复和随机化两原则进行设计, 不能将实验环境或单位差异所引起的变异从误差中分离出来, 进而导致实验误差较大, 结果精确性及检验的灵敏度都较低。为了解决这一问题, 在实验环境或单位差异大的情况下, 可依据局部控制的原则, 将整个实验环境或单位分成若干个小环境或小组, 在小环境或小组内使非处理因素尽量一致。相对一致的每个小环境或小组, 则为区组。例如, 某个园艺实验中要用到一定面积的果园, 但整片果园土壤的肥沃程度、水分、微生物丰度要达到完全相同或近似相同难度很大。若把连片果园分成若干个区块, 使区块内部保持较低的差异水平, 而区组间则允许存在一定差异, 如此一来, 各果园区块土壤环境之间的差异即可在方差分析时从实验误差中分离出来, 一定程度上降低了实验总误差。

上述重复性、随机化和局部控制三个基本原则统称为费希尔 (Fisher) 三原则, 是实验设计中必须遵循的原则, 再采用相应的统计分析方法就能够最大限度地降低误差, 提高实验精度, 从而得出可靠的结论。

(三) 实验设计的基本方法

实验设计是在已确定实验内容的基础上, 拟定一个具体的实验安排表, 指导实验的进程。生物学实验通常涉及多变量、多水平的设计内容, 不同变量、不同水平所构成的实验点在操作可行域中的位置不同, 对实验结果的影响也不一样。因此, 如何安排和组织实验, 用最少的实验获取最有价值的实验结果, 成为实验设计的核心内容。实验设计方法主要可分为三类: 网格法 (单因子法)、矩阵法、数理统计法。

网格法即每次只能检验一个元素, 方法简便, 但不能检验交互作用, 同时存在耗时费力的问题。而矩阵法则是多变量、多水平的所有可能组合, 实验次数与因素、水平之间呈指数函数关系。虽然矩阵法考察十分全面, 但由于发酵工艺学

实验的因素和水平往往较多，导致实验十分耗时、完成难度极大，在科学实验中因该法效率极低也较少采用，同时限于篇幅的原因，故下文不再赘述。而数理统计法则是利用数理统计的原理，选取少量有代表性的实验点，进而统计分析其整体规律，具有高效率及较准确两大优势。数理统计实验设计的具体方法很多，其中两种常用的数理统计实验设计法为正交设计法和均匀设计法。

1. 网格法

网格法又称为析因法，特点是以各因素各水平的全面搭配来组织实验，逐一考察各因素的影响规律。通常采用单因素变更法，即每次实验只改变一个因素的水平，其他因素保持不变，以考察该因素的影响。当实验次数为 n ，因素数为 N ，因素水平数为 K 时， $n=K^N$ ，如对一个 3 因素 4 水平的实验，实验次数为 $4^3=64$ 。

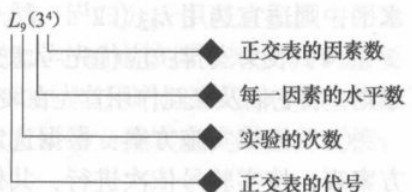
由于发酵工艺学实验中要考察的各因素间存在一定的相互作用，因此用该方法获得的最佳条件往往不是实际最优条件，故此方法一般只应用于影响较大而可能的交互作用较小的因子研究。

2. 正交设计法

正交设计法是根据正交配置的原则，从各因素、各水平的可行域中选择最有代表性的搭配来组织实验的一种比较科学的数理统计方法，综合考察各因素的影响。正交设计是研究多因素、多水平的一种设计方法，它是根据正交性从全面实验中挑选出部分有代表性的点进行实验，这些有代表性的点具备“均匀分散、整齐可比”的特点。均匀分散性使各实验点均匀地分布在实验范围内，使每个实验点都有充分的代表性；整齐可比性使得实验结果的分析更方便，易于估计各因素的主效应和部分交互效应，从而分析各因素对指标影响的大小和变化规律。日本统计学家田口玄一将正交实验选择的水平组合列成表格，称为正交表。正交表是具有正交性、代表性和综合可比性的一种数学表格，正交表名称写法为 $L_n(K^N)$ ，其中各参数的具体含义如右例“ $L_9(3^4)$ ”中所示。

1) 正交表主要性质

(1) 每一列中，不同的数字出现的次数相等。例如，在 2 水平正交表中，任何一列都有数码“1”与“2”，且任何一列中它们出现的次数是相等的；在 3 水平正交表中，任何一列都有“1”“2”“3”，且其在任一列的出现数均相等。



(2) 任意两列中数字的排列方式齐全且均衡。例如，在 3 水平正交表中，任何两列（同一横行内）都有 9 种序对：(1, 1)、(1, 2)、(1, 3)、(2, 1)、(2, 2)、(2, 3)、(3, 1)、(3, 2)、(3, 3)，且每对出现次数也均相等（表 1-1）。而在 4 水平情况下，任何两列（同一横行内）则有 16 种序对。

(3) 绝大多数正交表中各等式等价，可以任意取用。

表 1-1 $L_9(3^4)$ 正交实验表

实验序号	因素			
	A	B	C	D
1	1	1	1	1
2	1	2	2	2
3	1	3	3	3
4	2	1	2	3
5	2	2	3	1
6	2	3	1	2
7	3	1	3	2
8	3	2	1	3
9	3	3	2	1

2) 正交实验的表头设计 正交实验的表头设计是正交设计的关键, 它承担着将各因素及交互作用合理安排到正交表的各列中的重要任务, 因此一个表头设计就是一个设计方案。表头设计的主要步骤如下。

(1) 确定列数 (c): 根据实验目的, 选择处理因素与不可忽略的交互作用, 明确其个数。如果对研究中的某些问题尚不太了解, 可多列一些, 但一般不宜过多。当每个实验号无重复、只有 1 个实验数据时, 可设 2 个或多个空白列, 作为计算误差项之用。

(2) 确定各因素的水平数 (t): 根据研究目的, 一般 2 水平 (有、无) 可作因素筛选用, 也适用于实验次数少、分批进行的研究。3 水平可观察变化趋势, 选择最佳搭配。多水平则能以一次实验即满足实验要求。

(3) 选定正交表: 根据确定的列数 (c) 与水平数 (t) 选择相应的正交表。例如, 观察 4 个因素与 6 个一级交互作用, 则可留一个空白列, 且每个因素取 2 水平, 则适宜选用 $L_{12}(2^{11})$ 表。

(4) 表头安排: 应优先考虑交互作用不可忽略的处理因素, 按照不可混杂的原则, 将它们及交互作用首先在表头排妥, 而后再将剩余各因素任意安排在各列上。

(5) 组织实施方案: 根据选定正交表中各因素占有列的水平数列, 构成实施方案表, 按实验号依次进行, 共做 n 次实验, 每次按表中横行的各水平的组合进行实验。例如, $L_9(3^4)$ 表 (表 1-1), 若安排 4 个因素, 第 1 次实验 A 、 B 、 C 、 D 4 因素均取 1 水平, 第 2 次实验 A 因素取 1 水平, B 、 C 、 D 取 2 水平, 至第 9 次实验时, A 、 B 因素取 3 水平, C 因素取 2 水平, D 因素取 1 水平。实验数据记录在该行的末尾。

所以, 整个正交设计用一句话则可归纳为: “因素顺序上列, 水平对号入座, 实验横着做”。