

# 第六局部 发酵、酿造工艺实验

## 第一篇 发酵工程设备

发酵工程设备实验工程及其各专业必修、选修表

实验序号	实验工程	实验学时	实验类型	实验类别	面向专业 (以下打“√”为必修, “*”为选修, 数字为开课学期)			
					生科	生技	生工	食品
1	小型生物反响器的安装与拆卸	2	验证				√ (6)	√ (5)
2	小型连续培养实验装置的设计组建	3	综合				√ (6)	√ (5)
3	体积溶氧传递系数的测定	3	综合				√ (6)	√ (5)
4	摇床培养确定酵母菌体培养条件	8	综合				√ (6)	√ (5)
5	反响器培养液的灭菌与接种培养	8	综合				√ (7)	
6	pH 电极、溶氧电极的校正	2	验证				√ (7)	
7	生物制品的冷冻枯燥	6	综合				√ (7)	
8	3M <sup>3</sup> 机械搅拌通风发酵罐结构的认识	4	验证				√ (7)	
9	1M <sup>3</sup> 中试发酵设备的操作方法	12	综合				√ (7)	
10	面包酵母流加培养与分批培养试验	24	综合				√ (7)	
学时合计		72					72	16

# 第二篇 酿造工艺学实验

酿造工艺学实验工程及其各专业必修、选修表

实验序号	实验工程	实验学时	实验类型	实验类别	面向专业 (以下打“√”为必修,“*”为选修,数字为开课学期)			
					生科	生技	生工	食品
1	葡萄酒酿造过程	24/14	综合				√(6)	√(4)
2	葡萄酒结束理化指标的测定	8/0	综合				√(6)	√(4)
3	葡萄酒感官品评	4/2	综合				√(6)	√(4)
4	乳酸发酵工艺	10/8	综合				√(6)	√(4)
5	醋酸发酵工艺	10/8	综合				√(6)	√(4)
学时合计		56/32					56	32

## 第一篇 发酵工程设备

### 实验一 小型生物反响器的安装与拆卸

机械搅拌式生物反响器, 又称发酵罐, 是生物工程设备的重要组成局部, 在微生物工程、酶工程、细胞工程(细胞培养)、基因工程(基因工程菌)等科学研究领域, 生物反响器均为生物技术转化为产品必要的设备。由于小型生物反响器进料、出料、清洗、电极校正等过程都不同于大型发酵罐, 需要拆卸之后进行, 因此熟悉生物反响器结构及安装与拆卸操作是正确使用反响器的前提。

一、实验目的 掌握生物反响器安装和拆卸的操作规程, 认识和了解生物反响器的结构与功能。

#### 二、根本原理

生物反响器装置分两大局部: 1.罐体及内部的各传感器、检测电极; 2.罐外检测控制装置, 蒸汽及无菌空气系统。

反响器罐体具有可卸上盖, 与罐体是通过橡皮垫圈和螺栓密封。盖上设有接种口、空气进口、尾气出口、各种检测仪表的插孔、温度传感器及溶氧电极和 pH 电极插口、消泡剂和酸碱液注入口、取样口、备用口、压力表、平安阀等; 罐底部设有夹套层, 用以热交换, 罐内有搅拌桨叶、挡板、空气分布器;

罐外: 连接各种传感器及电极相应的控制器, 可以自动地调控试验所需的培养条件; 连接无菌空气系统, 并配备一台自动调控装置; 连接蒸汽发生器, 供灭菌使用。

#### 三、实验装置

3 L 园柱形机械搅拌式生物反响器



图 1 机械通风式搅拌生物反应器

#### 四、实验步骤

1. 首先断开所有电源。
2. 卸下可移动的所有检测电极和探头。
3. 拧下螺栓，翻开上盖，检查培养罐内部是否清洗干净。
4. 插入校正完毕的 pH 电极和氧电极于罐侧面相关位置，并与放大器连接。
5. 参加配置好的培养液，加盖（由于盖上的零件较多，必须对准位置后再盖上去），并对称拧紧螺母，直至上盖被密封固定。
6. 将事先清洗干净并开启的尾气过滤器装于盖上，安装平安阀、泡沫传感器、观察灯、压力计、取样管，以及灭过菌的无菌空气过滤器进气管等，剩余的孔洞须用硅胶塞和瞎塞拧紧备用。
7. 检查检测系统的连接，调试密闭。
8. 作出 3 L 机械通风搅拌式生物反应器的结构示意图，注明各装置名称。
9. 标注检测系统的连接。

**五、思考题** 1.小型生物反应器的安装和拆卸应该注意那些问题？ 2. pH 电极、溶氧电极如何校正？

## 实验二 小型连续培养实验装置的设计组建

连续培养是在培养器中不断补充新鲜营养物质，并及时不断地以同样速度排出培养物，理论上对数生长期可无限延长。不同于分批培养发酵周期受培养基消耗殆尽的影响，连续培养使微生物在特定的环境中持续保持旺盛生长状态，随着培养基不断参加，产物不断生成排出，减少了非发酵时间，可提高发酵工业的生产效益和自动化水平。常用的连续培养方法有恒浊法与恒化法两类，恒化连续培养在研究微生物利用某种底物进行代谢的规律方面被广泛采用。本实验设计组建实验室恒化法培养装置，有助于对恒化法连续培养及装置特性加深理解。

**一、实验目的** 设计组建小型微生物连续发酵装置，掌握连续发酵的操作原理和方法。

**二、实验原理** 恒化法是通过控制培养基中营养物主要是生长限制因子的浓度来调控微生物生长繁殖与代谢速度的连续培养方式。由于培养基参加流量与产物流出的流量保持恒定，随着培养时间的推移，培养器中各物质浓度不随时间改变，称为恒化法，设计恒化器培养装置除满足液体深层培养所必须的条件外，着重在于满足上述条件。

**三、实验仪器与材料** 三角瓶、玻璃槽、玻璃管、棉花、蠕动泵、橡胶管、磁力搅拌器、温度计、酒精喷灯

#### 四、实验步骤

1. 用实验室仪器设计一套恒化法连续培养装置（厌氧培养），并组建安装。
2. 画出你所组建的简单连续培养装置示意图并注明各装置的作用。
3. 设计出求算单级连续培养比生长速率的实验步骤及求算  $\mu$  的过程。

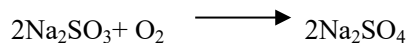
**五、思考题** 1.在你组建的装置中如何实现培养器中基质浓度的恒定？如何保证培养过程无污染？2.连续发酵培养在工业生产与科研上的意义？

### 实验三 体积溶氧传递系数的测定

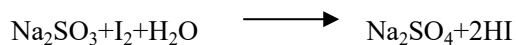
单位体积发酵液氧传递系数  $k_L a$  可称为“通气效率”，不同类型的发酵罐由于供氧装置的不同其体积溶氧传递系数不同， $k_L a$  大意味着反应器供应单位发酵液的氧的能力强。通过  $k_L a$  的测定，可了解发酵过程中氧的传递效果的好坏，对提高氧的利用率和增产节能都有着重要意义。

**一、实验目的** 学习运用亚硫酸盐法测定小型生物反应器的  $k_L a$  值。

**二、根本原理** 用  $\text{Cu}^{2+}$  为催化剂，溶解在水中的氧能立即将水中的  $\text{SO}_3^{2-}$  氧化成为  $\text{SO}_4^{2-}$ ，其氧化反响的速度在很大范围内与  $\text{SO}_3^{2-}$  的浓度几乎无关。因此氧化速率是控制氧化反响的因素。其反响式如下：



剩余的  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  与过量的碘作用



剩余的  $\text{I}_2$  用标定的  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  溶液滴定。

标准  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  溶液的用量取决于溶解氧的量。

每 1 ml 溶氧可氧化 2 mol  $\text{Na}_2\text{SO}_3$ ，也就消耗掉 4 mol  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 。因此每消耗 1 mol  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ （与比照样的体积差）必有 1/4 mol 溶氧在通氧过程中参与反响。

$$\text{那么：溶氧当量 } N_V = \frac{\Delta V \cdot N \cdot 60}{m \cdot t \cdot 4} \text{ mol} / (\text{L} \cdot \text{h})$$

$$N_V = K_L a (c^* - c)$$

$$K_L a = N_V / 0.21$$

**三、实验仪器与材料** 3 L 生物反应器、250 ml 三角瓶、25 ml 移液管、滴定台、滴定管、 $\text{Na}_2\text{SO}_3$ 、

CuSO<sub>4</sub>、碘溶液、Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

#### 四、实验方法与步骤

1. 称取 12.6 g Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> 和 0.072 g CuSO<sub>4</sub>。按实验一方法翻开发酵罐，将 1 L 自来水参加到发酵罐中，开始搅拌，依次参加 Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> 晶体和 CuSO<sub>4</sub>，搅拌使完全溶解。取样 10 ml，作为未通气的对照组，注入预先准备好的过量的碘溶液中。
2. 安装好发酵罐，检查使密闭。开阀通气，翻开搅拌器到常用转速。气阀开启迅速调至预定空气流量。当罐内溶液中有气泡冒出时，开始计时，作为通氧时间的开始。
3. 氧化时间持续 10-20 min，到预定时间停止通气和搅拌，准确记录通氧时间。
4. 取样 10 ml 作为样液，注入预先准备好的过量的与对照组所注入的相同量的碘溶液中。
5. 在对照组与样液中分别参加淀粉溶液 3 滴作为指示剂，分别用标定的 Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 溶液滴定，至碘溶液中蓝色消失。
6. 分别记录对照组与样液滴定所消耗 Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 溶液的量。

#### 五、实验结果

	滴定前读数	滴定后读数	滴定消耗量	$\Delta V$
对照液滴定			V <sub>1</sub> =	
样液滴定			V <sub>2</sub> =	

六、思考题 1.k<sub>L</sub>a 的大小受哪些因素的影响？2.测定 k<sub>L</sub>a 值其他方法有哪些？

### 实验四 摇床培养确定酵母菌体培养条件

正交试验(Orthogonal experimental)是研究多因素多水平的试验方法，它是根据正交性从全面试验中挑选出局部有代表性的点进行试验，这些有代表性的点具备了“均匀分散，齐整可比”的特点，是一种高效率、快速、经济的实验设计方法，可大幅度减少试验工作量，因而正交试验在很多领域的研究中已经得到广泛应用。本实验即是利用正交试验的方法选择酵母最正确培养基以掌握正交试验的方法。

一、实验目的 通过摇瓶法确定发酵周期，学习应用正交法确定发酵培养基最正确配比。

二、实验原理 1.培养周期确实定。生物量的测定方法有比浊法和直接称重法等。由于酵母在液体深层通气发酵过程中是以均一混浊液的状态存在的，可采用直接比浊法进行测定。摇瓶培养中通过定期取样测定酵母浓度，找出对数生长末期确定为培养终点。2.最正确培养基确实定。在碳源、氮源、无机盐初步确定的前提下，通过四因素三水平正交试验，可判断四因素组合时各因素的最正确浓度，从而确定最正确培养基。

三、实验仪器与材料 1. 实验仪器：全恒温振荡培养箱，分光光度计、电热恒温水浴槽、超净工作台、高压灭菌锅、天平；250 ml 三角瓶、50 ml 三角瓶、移液管（移液枪）。2. 试验材料：葡萄糖、蔗糖、酵母膏、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>。

#### 四、实验方法与步骤

1. 培养基的配制(见表 1, 2)

表 1 正交表试验设计 (100 ml)

因素水平	葡萄糖	蔗糖	酵母膏	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
1	1.0	0.0	0.5	0.5
2	2.0	1.0	1.0	1.0
3	3.0	2.0	2.0	2.0

表 2 正交表实验方案

编号	葡萄糖 (A)	蔗糖 (B)	酵母膏 (C)	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (D)	生物量 (OD)					
					0h	12h	24h	36h	48h	60h
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)						
K <sub>1</sub>										
K <sub>2</sub>										
K <sub>3</sub>										
极差 R										

2. 取 250ml 三角瓶将上述培养基配制 200 ml, 取 6 个 50 ml 三角瓶各装入培养基 10 ml, 及剩余的培养基 (用于测定时稀释, 当 OD 值小于或大于) 于 121 °C 下灭菌 30 min, 冷却。(制备无菌水)

3. 冷却后接种 0.5 ml (接种量为 5%), 置于 28 °C 培养箱进行培养。

4. 测 OD 值: 将接种 0 h、12 h、24 h、36 h、48 h、60 h 不同时间的菌悬液摇均匀后于 560 nm 波长、1 cm 比色皿中测定 OD 值。比色测定时, 用以未接种的培养基作空白对照, 并将 OD 值填入表中, 最终确定最正确培养基的组成及发酵时间。

5. 作各因素水平的 K 图。

6. 根据试验数据判定发酵时间及最正确培养基配比。

**五、思考题** 1. 为什么要作 K 图? 如果实验继续深入, 应该改变那些因素水平, 为什么? 2.R 值反映的是什么? 有何意义?

## 实验五 反应器培养液的灭菌与接种培养

小型台式玻璃生物反应器置于高压锅中灭菌, 而金属制生物反应器的灭菌是采用夹套层蒸汽加热灭菌的方式进行的。由于结构的差异小型生物反应器灭菌与大型发酵罐灭菌操作有一定的差异, 小型生物反应器的上盖上有众多的电极接口, 需防止蒸汽打湿, 蒸汽的进出口路线也有所不同, 需保证蒸汽进出

畅通。通过实际操作熟悉灭菌的过程。

**一、实验目的** 学习和掌握生物反应器灭菌与接种培养的操作，认识和掌握运用现代化反应器的操作规程及方法。

**二、实验原理** 将反应器内培养液的温度升至 121 °C，以到达灭菌的效果，灭菌后的培养基冷却至培养温度后，即可接种培养。接种时，严格按照无菌操作进行，防止杂菌污染。

**三、实验仪器与材料** 1.实验仪器 5L 升生物反应器、蒸汽发生器、反应器控制台、三角瓶；2.实验材料 菌种：酵母菌；培养基：葡萄糖，酵母膏，蛋白胨，无机盐。

#### 四、实验步骤与方法

1.灭菌：在反应器安装就序后，接通电源，翻开控制台总开关，开启冷却水阀，分别按下温度、pH、溶解氧、搅拌器开关键，调节搅拌器转速约 120 rpm，调整灭菌时间（30 min），设置灭菌温度（121 °C），同时，按下灭菌开关键。使电加热器对罐底夹套层进行加热，罐内温度逐渐上升，待温度升至 105 °C左右时，关闭废气出口阀。温度继续上升至灭菌温度，自动保温至设定时间后，由冷却水自动冷却至设置的发酵温度。

2.培养条件确实定：通入反应器的空气是从空压机经空气过滤器而成无菌空气，再由空气分布管送入灭过菌的培养罐内。在控制台上，设定所需的搅拌转速、发酵温度、pH 值，并将空气流量计的流量调至确定值。

3.接种与培养：将事先培养好的培养液（在三角瓶中进行摇床培养，处于对数生长期的细胞，以无菌操作方式倒入已灭过菌的带有插在保险管套筒内的注射针及软管的三角瓶内）由接种口接入罐内，接种时，要在接种口的隔膜周围放上浸有酒精的棉花或用 1-3 ml 乙醇覆盖，点燃，以产生上升的气流来防止杂菌污染。接种塞从无菌筒内取出，然后将接种针穿过火焰和隔膜，慢慢插入中心部位，拧紧连接螺帽，直至插入局部固定。接种量大体上是培养液的百分之几。如调节 pH 值和泡沫时，可将酸液和碱液及消泡剂装入三角瓶，灭菌后，分别经蠕动泵与反应器连接，与罐体连接的方法与接种相同。这样，通过控制台的自动控制，就可以自动地连接流加，使罐内保持所需 pH 值和泡层状态。

4.取样：为了了解培养过程中反应物的变化情况，必须定时地进行取样，取样时，要关闭排气口，使罐内处于正压状态，翻开取样口，培养液即可自动流出。但是，在第二次取样时，必须注意将残液放净后再取样。

**五、思考题** 1. 本实验是采用何种方式灭菌的？你所了解的反应器灭菌方式有哪几种？2. 如何保证接种过程中不使反应器内部发生杂菌污染？

## 实验六 pH 电极、溶氧电极的校正

为了准确测定发酵液的 pH 值和 OD 值，每发酵周期需对 pH 电极和溶氧电极进行校正。特别是 a) 长期未用的电极和新换的电极；b)被测溶液温度与标定时温度相差过大时尤需校正。

### pH 电极的校正

**一、实验目的** 了解 pH 电极、溶氧电极的根本原理，掌握其校正方法及步骤。

**二、实验原理** 待校正的 pH 电极是由氯化银参比电极和玻璃电极组合在一起的复合玻璃电极。复合电极的内层玻璃管与玻璃球泡相通，内充以恒定 pH 值的标准缓冲溶液，从中引出氯化银电极导线，组成玻璃电极（即指示电极）。在外层玻璃管引入银丝，其外表覆盖一层 AgCl 薄膜。从上部扩大局部边上的注液口参加饱和氯化钾溶液，就形成氯化银电极，在外玻璃管的下部，开有一小口，装有多孔陶瓷芯，使 KCl 溶液可稍许向外溶液渗漏，即所谓液络部。复合电极的根本性能参数有电极转换系数（也称 Nernst 斜率），电极零电位，电极内阻，参比电阻，电极响应时间，耐高温冲击的次数等等，它们都有一定的要求和测试方法，对新使用的电极或已经发酵运行一段时间的电极，其性能参数要发生变化，对某些性能参数要进行测定，决定是否可投入使用。

**三、实验仪器与材料** 复合玻璃电极、pH 操纵器、标准 pH 试剂、蒸馏水、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、柠檬酸

#### 四、实验方法与步骤

翻开 pH 操纵器、测量范围和温度开关，将 pH 电极的电插头插入放大器插孔。首先测标准 pH 试剂的温度，然后记下缓冲液瓶子标签上的温度条件下所得到 pH 值。缓冲液和电极组件应该是在同样的温度，如果不是，那么允许 2~3 分钟时间到达热平衡。温度恒定后，调节温度。

将电极浸入缓冲液 pH7.0（0.2 mol/LNa<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 16.47mL，0.1 mol/L 柠檬酸 3.53 mL）中，获得稳定读数就立即将 pH 表（asymmetry）设定到缓冲液的值。

将蒸馏水漂洗电极玻璃球泡部位，然后用软纸轻轻擦干，再浸入第二种缓冲液 pH9.2（1/15 mol/LNa<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>）或 pH 4.0（0.2 mol/LNa<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 7.71mL，0.1 mol/L 柠檬酸 12.29 mL）中，获得稳定读数后，用斜率电位计（mV/pH）纠正 pH 值。如此反复 2-3 次，直至读数与被测试剂相同并稳定。以上程序不得颠倒，否那么不能获得有效的校准。

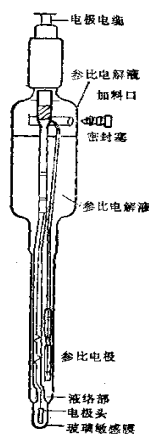


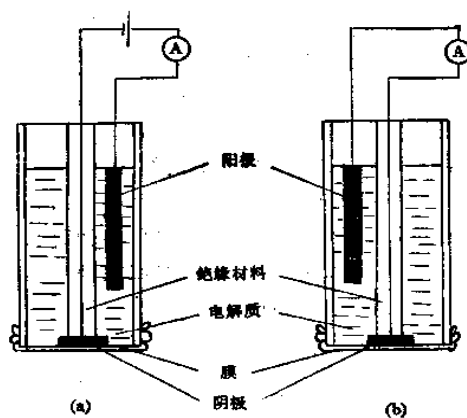
图 2 复合玻璃电极的构造

**五、思考题** 1.在 pH 电极的校正操作过程中应注意哪些事项？

#### 溶氧电极的校正

**一、实验目的** 了解溶解溶氧（DO）电极的根本原理，掌握其校正方法。

#### 二、实验原理



a 电解型电极      b 原电池型电极

图3 氧电极的类型

### 1. (极谱型)电解型电极

电解型电极是由一个阴极（贵金属如铂或金）、一个阳极（Ag/AgCl）和一种电解质，如中性 NaCl 溶液组成的。在某一溶氧浓度一定的溶液系统中，通过电极之间约 0.6-0.8 的电压，使溶解氧在阴极上被复原，从电极的电流~电压极谱图（图 6）可以看出，OA 为极谱剩余电流；A 点为氧的分解电压，当外加电压大于分解电压 A，这时电极输出电流 I 随着电压增大而增加，当达 B 点后，电极电流就不再随着外加电压而增加，即电极电压进入恒

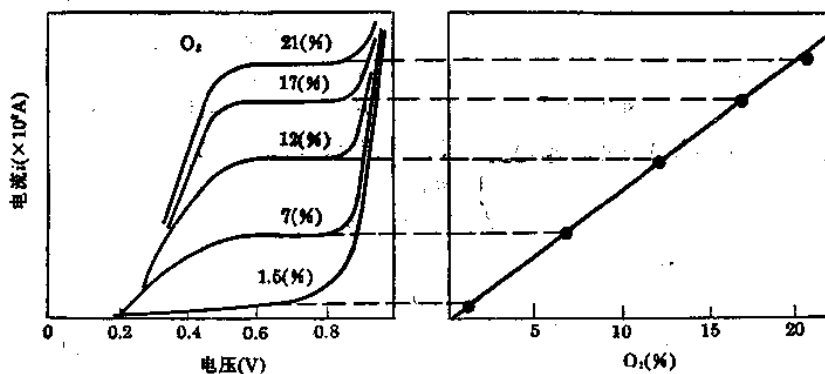
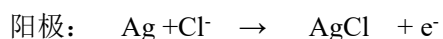
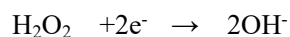
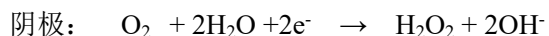


图4 扩散电流与氧浓度的关系

定区，这时称为饱和电流或扩散电流。当外加电压继续增至 C 点时，电极输出电流迅速增加，这是由于水被复原成氧所造成的。从图中也可看出饱和电流与溶氧浓度成正比关系。因此，只要把外加电压固定在电流电压图中的平坦局部，电极输出电流就可以校正测量溶解氧，这个固定电压常选在 0.6~0.8 V 之间。

反响式为：



总反响： $4\text{Ag} + \text{O}_2 + 2\text{H}_2\text{O} + 4\text{Cl}^- \rightarrow 4\text{AgCl} + 4\text{OH}^-$

用 NaCl 或 KCl 作为电解质，电解质在使用过程中被消耗，必须在一段时间后补充。

## 2. 原电池型电极

原电池型电极不采用外电压，而是选用参比电位比阴极电位高的碱性金属（锌、铝或镉）作阳极，以贵金属（银或金）作阴极，这是氧就在阴极自发地被复原，产生电动势。

银—铅电池型电极的电子反响为：

阴极： $\text{O}_2 + 2\text{H}_2\text{O} + 4\text{e}^- \rightarrow 4\text{OH}^-$

阳极： $\text{Pb} \rightarrow \text{Pb}^{2+} + 2\text{e}^-$

总反响： $\text{O}_2 + 2\text{Pb} + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow 2\text{Pb}(\text{OH})_2$

随着时间的推移，这一反响也会氧化电极。

为了校正氧电极，使液体被空气中的氧饱和，假定饱和度被扩大至 100% 显示。电极的零点适宜用氧气调节，因为电极显示是氧分压而不是氧浓度，显然在 1 M KCl 溶液中饱和时氧的实际浓度只有其在水中浓度的 73%，但还是假定空气饱和时，在 1 M KCl 溶液中得到与在水中相等的数值显示。

**三、实验仪器与材料** 溶氧电极、DO 测量放大器（指示组件）、压缩空气、水浴锅、铁架台、 $\text{Na}_2\text{SO}_3$ 。

## 四、实验方法与步骤

1. 将氧电极置于与恒温水浴（温度调至与被测发酵液相等）相连接的内部盛有水的带夹套烧杯中，并置于气体分布管的上方，电极的连线与放大器连接并将放大器开关翻开。
2. 设置 0：将电极置于饱和  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  溶液中，待 DO 测量放大器显示电压值稳定，调节零电位器，使数字显示器到达 0 值。
3. 设置满量程：将空气通入气体分布管，使带夹套烧杯中的水被空气饱和，使其到达充分搅拌。设置压力选择器至三档中的任何一档（即 100, 200, 800 mmHg），使数字显示器指向约 95%，再操作斜度电位器，仔细调节指示值，至 95% 显示。
4. 精度检查：用惰性气体  $\text{N}_2$  通入气体分布管，使水饱和。显示器将指向 0，而在此操作期间，压力选择器 0 和斜度电位器不再调节。

**五、思考题** 1.在校正溶氧电极时为何要待 DO 测量放大器显示电压值稳定？2.溶氧电极如何保养？

## 实验七、生物制品的冷冻枯燥

冷冻枯燥是利用升华的原理进行枯燥的一种技术，将被枯燥的物质在低温下快速冻结，然后在适当的真空环境下使冻结的水分子直接升华成为水蒸气逸出的过程。在众多的枯燥方法中最能保证热不稳定性生物制品的质量，即生物活性不变、外观色泽均匀、形态饱满、结构牢固、溶解速度快，剩余水分低。应用于疫苗、抗生素、菌种保藏等。要获得高质量的生物制品（包括局部发酵制品），对冻干的理论和工艺应有一个比拟全面的了解。

**一、实验目的** 学习和掌握冷冻干燥设备的工作原理、应用范围和操作要点;掌握应用冻干法干燥生物活性物质的方法和要求。

**二、实验原理** 物质在干燥前始终处于低温(冻结状态),同时冰晶均匀分布于物质中,升华过程不会因脱水而发生浓缩现象,防止了由水蒸气产生泡沫、氧化等副作用。干燥物质呈干海绵多孔状,体积根本不变,极易溶于水而恢复原状。在最大程度上防止干燥物质的理化和生物学方面的变性。

**三、实验仪器与材料** ALPHA1-2 冻干机、超低温冰箱、生物酶制剂、圆底烧瓶。

#### 四、实验方法与步骤

1. 预冷冻。将已测酶活性的酶溶液置于冷冻容器中,于-80℃超低温冰箱2h进行预冻。
2. 启动冷冻干燥机,当温度下降至-54℃以下时,翻开冷冻机盖快速放入需要冻干的材料(注意戴手套操作,并翻开瓶塞),密封冻干器。
3. 抽真空,使真空度到达20Pa,维持36h左右。
4. 待冻干材料呈粉状或膜状后,关闭真空泵及冻干机,待真空撤去后,先封好瓶盖,再取出冻干材料。
5. 将已冻干的酶测定活性,比拟冻干前活性。

#### 五、考前须知

1. 制备样品应尽可能扩大其外表积,厚度不超过1cm,其中不得含有酸碱物质和挥发性有机溶剂;
2. 样品必须完全冻结成冰,如有残留液体会造成气化喷射;
3. 注意冷阱约为-65℃,可以做低温冰箱使用,但必须戴保温手套操作防止冻伤;
4. 启动真空泵以前,检查出水阀是否拧紧,充气阀是否关闭,有机玻璃罩与橡胶圈的接触面是否清洁无污物,良好密封;
5. 一般情况下,该机不得连续使用超过48小时;
6. 样品在冷冻过程中,温度逐渐降低,可以将样品取出回暖一段时间后(仍处于冰冻状态),继续干燥,以缩短干燥时间。

**六、思考题** 1. 采用冻干法制备生物发酵剂中应注意哪些问题?

## 实验八 3 M<sup>3</sup> 机械搅拌通风发酵罐结构的认识

机械搅拌通风发酵罐在制药、生物制品的生产开发中起着特别重要的作用。在众多类型的发酵设备中,兼具通气又带机械搅拌的标准式发酵罐用途最为普遍,广泛使用于抗生素、氨基酸、有机酸、酶制剂等领域,在生物制品工厂广泛使用。据不完全统计,占发酵罐总数的70%-80%,故又称通用式发酵罐。

**一、实验目的** 通过实地观察,了解机械搅拌式发酵罐的内部结构组成,各装置的配备安装及功能。

**二、实验原理** 机械搅拌式发酵罐主体包括罐身、搅拌器、轴封、消泡器、中间轴承,空气分布器、挡

板、冷却装置、人孔等，配套装置：各工艺参数监测系统、空气除菌系统、蒸汽热力系统等。发酵罐主体各装置依据设计标准到达各自设置的作用。

### 三、实验设备 3M<sup>3</sup> 机械搅拌通风发酵罐。

### 四、实验方法与步骤

1. 翻开人孔及内视灯观察以下各装置。

1.1 罐体的材料、高径比、封头形式。

1.2 搅拌器组数、叶轮类型。

1.3 挡板的组数及安装。

1.4 空气分布装置的形式。

1.5 轴封的类型和结构。

1.6 消泡装置类型和安装。

1.7 冷却装置的类型。

1.8 进料、进气、排料、出料、取样装置。

1.9 加热、冷却装置。

1.10 压力、温度、pH、溶氧控制接口。

2. 作出 3 M<sup>3</sup> 机械通风搅拌式生物反响器的结构示意图，标注以上各装置名称。

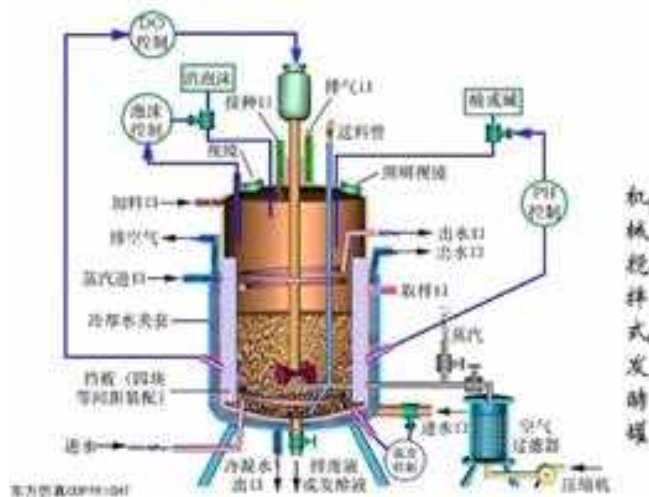


图 5 机械搅拌通风发酵罐参考示意图

3. 考察本设备配备的蒸汽系统组成。

4. 考察本设备所配备的空气除菌系统组成，并作出空气除菌流程示意图。

五、思考题 1. 小型和大型生物反响器设计上有什么不同点？ 2. 本设备所选用的搅拌叶轮、机械消泡装

置、冷却装置分别为何种形？除此之外分别还有哪些类型？3.本设备配备的蒸汽系统蒸汽生产量多大？4.本设备所配备的空气除菌系统为几级？分别采用何种过滤器？

## 实验九 1 M<sup>3</sup> 中试发酵设备的操作方法

发酵车间实地训练是培养技能型人才，增强工程意识的必要途径。通过中试发酵设备全方位的直接操作真正提高学生的适应能力和实战技能。

**一、实验目的** 1.通过发酵中试车间实训，体验上罐操作的全过程。2.熟悉车间管路布置及各设备性能。3.掌握空气过滤系统操作、冷却系统操作、工艺参数控制。4.加深对分批培养的根本原理及过程的理解。

**二、实验原理** 微生物技术产品从实验室到工业生产的开发过程中，需要进行小试、中试、生产逐级放大培养，中试培养已经近似于生产发酵。其工艺环节包括：空消、实消、空气除菌、接种、移种、消泡、进料、取样、出料等；工艺参数控制包括：温度、pH值、溶氧、压力等。

**三、实验设备与材料** 1M<sup>3</sup> 机械搅拌通风发酵罐、食用菌。

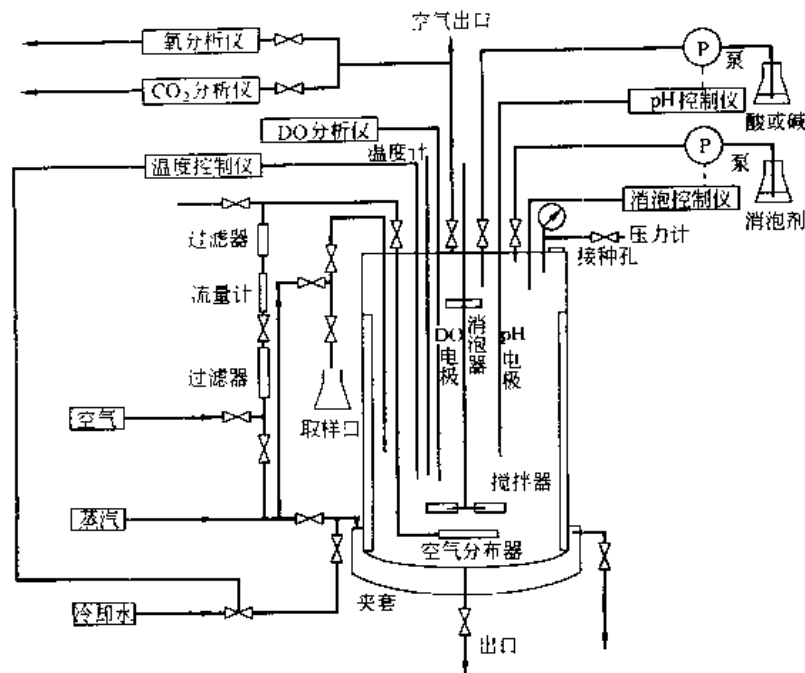


图6 发酵罐检测装置配备示意图

### 四、实验操作步骤

1. **空消**：首先，清洗培养罐内部，特别要注意在空气分布或取样管导出残留污物。罐内参加 20%~30% 的水后，通入加热蒸汽（蒸汽需经过滤膜过滤），在 121 °C 下杀菌 15 min。杀菌过程中不断地翻开阀门，确保彻底杀菌。杀菌完成后，从取样管将罐内液体排出。

2. **培养基制备**：培养基的参加量一般为罐容积的 50%~60%。将称量好的培养基组分，经溶解后参加到发酵罐中。此时培养液的体积为实际所需培养基容积的 80%。由于蒸汽杀菌过程中有大量的蒸汽转变为水，使发酵液体积增大。对于合成培养基的灭菌操作，葡萄糖与磷酸盐应分别灭菌后，在开始培养

前参加以防止在杀菌过程中，葡萄糖与氮化合物之间发生美拉德反应，以及磷酸盐与其他金属离子形成沉淀。

3. 安装控制装置：安装调试好 PH 电极、溶氧电极。

4. 实消与冷却：夹套内通入加热蒸汽，是培养液温度到达 80℃以上。随后将蒸汽直接通入发酵罐，在 121℃下杀菌 15 min。杀菌过程中，间断翻开各阀门，排出内部空气，以保证各出管内杀菌完全。此时如果不采用夹套预热至一定温度，直接通入蒸汽杀菌的话，培养基装置内冷凝水增加，将增加培养液体积调节的难度。

杀菌完全后，夹套内通入冷却水，进行培养基的冷却。为保证罐内正压，应通入适量无菌空气。

5. 操作条件的设定：在无菌条件下连接好酸、碱消泡剂等流入管线。设定好通风量（一般为 0.5~2L/min.L）、温度和 pH 值。

6. 接种、培养：将浸有酒精的脱脂棉围绕在接种口周围，点火后翻开接种口，参加无菌水，调节好罐内培养液量（必要时应参加葡萄糖、磷酸盐等溶液），进而将种子培养液注入。接种量一般为 1%~10%，盖好接种口后，调节搅拌转数至所需值，培养开始。

7. 取样：为了解培养过程中的变化，需定时取样进行样品分析。由于罐内为正压，翻开取样管时，样品自然流出。取样时应将上一次取样时残留在取样管中的培养液去除后在取样。另外，取样后应通入加热蒸汽，以防取样管路污染杂菌。

8. 培养结束：将电极与培养液全部取出，培养液在 121℃下杀菌 15 min 后，排出到指定地点。罐内应冲洗干净。

**五. 思考题** 1.发酵罐的放大有哪些方法？国内常用的方法有哪些？

## 实验十 面包酵母流加培养与分批培养试验

流加培养又称补料分批培养，是在分批培养的过程中，间歇或连续地补加新鲜培养基的培养方法。其优点可使发酵系统中维持很低的限制性底物浓度，减少底物的抑制或其分解代谢物的阻遏作用，防止出现限制性底物浓度过高影响菌体得率和代谢产物生成速率的现象。本实验通过面包酵母流加培养与分批培养的结果加以验证。

**一、实验目的** 1. 以斜面菌种活化为起始，经实验室菌种扩大、车间菌种扩大至发酵罐培养，熟悉发酵培养的全过程；2. 比照分批培养与流加培养面包酵母菌生长过程及菌体得率；3. 稳固灭菌、空气过滤、冷却、发酵罐工艺参数控制等操作过程；4. 加深补料分批续培养的根本原理的理解，熟悉流加补料过程的控制方法；5. 熟悉菌体离心别离及真空枯燥过程的操作。

**二、实验原理** 面包酵母在通风供氧充足的前提下，培养基中葡萄糖为限制性基质，葡萄糖的浓度对于提高酵母得率是至关重要的。本实验面包酵母培养的目的是获得最大酵母浓度，因此采用葡萄糖流加培养，并比拟同样条件下分批培养的效果。

### 三、菌种与培养基

1. 菌种：面包酵母

2. 培养基 酵母斜面培养基 10°麦芽汁固体斜面, pH5.0; 酵母摇瓶种子培养基 10°麦芽汁, pH5.0 或葡萄糖 10%, 玉米浆 1%, 尿素 0.2%, pH5.0; 酵母分批发酵培养基 玉米粉经液化、糖化, 折合葡萄糖浓度为 10%, 玉米浆 1%, 硫酸铵 0.4%, pH5.5。

#### 四、实验设备与材料

1. 30L、300L 种子罐; 3M<sup>3</sup> 全自动发酵罐;
2. 摇床;
3. 超净工作台;
4. 离心机;
5. 显微镜;
6. 分光光度计
7. 灭菌锅
8. 培养箱
9. 真空干燥箱
10. 试管, 棉塞, 500ml 三角瓶, 5L 三角瓶, 分口膜。

#### 五、实验方法与步骤

##### 1. 分批培养

###### 1.1 总流程

斜面培养 (斜面培养基配制、灭菌, 接种, 培养) → 摇瓶种子培养 → 种子罐培养 (糖化液稀释至 10% 浓度, 添加辅料, 灭菌, 接种。) → 发酵罐培养 → 菌体别离。

1.2 斜面种子制备 自保藏斜面中挑取一环酵母菌体接入新鲜的斜面试管中, 于 28°C 培养箱中培养 24h。

1.3 摇瓶种子的制备 将上述培养好的斜面种子接入 500ml 三角瓶装的灭过菌的 100ml 摇瓶种子培养基中, 在 28°C, 200rpm 震荡培养 15-20h。

1.4 种子罐培养 于 30L 发酵罐装入 20L 发酵培养基, 121°C 灭菌 20min, 冷却至 30°C, 将培养好的摇瓶种子接入发酵罐 (接种量 2-3%) 进行发酵。培养条件为: 温度 28°C, 搅拌转速 200rpm, 通风量 1vvm。

1.5 发酵罐培养 按实验八中步骤, 进行空罐灭菌 (包括空气过滤器灭菌)、实罐灭菌操作。消泡剂灭菌。将种子罐中的酵母菌种压送至发酵罐, 通气量在 3—5 L/min, 搅拌转数 200rpm, 接种量 10%。发酵条件 1.4 同种子罐培养。

1.6 过程监控 0 小时: 取样测定总糖和复原糖; 4-24 小时: 每隔 4 小时取样镜检、测定复原糖、菌体浓度。

##### 2. 流加培养

2.1 种子制备 同分批培养种子制备过程。

2.2 流加培养前的准备工作 葡萄糖于流加储罐灭菌。

2.3 流加培养 通气量 3—5 L/min，搅拌转数 200 rpm，接种量 10%。控制流加储罐压力使到达流加 25g/100mL 葡萄糖，当发酵罐内葡萄糖浓度到达 20—30g/L，滴加 0.1 mol/L 氨液，控制培养液 pH 值为 5.0。通过调节风量和搅拌转数控制溶氧浓度在 10% 左右。

2.4 过程监控 同 1.6 步骤。

3. 菌体离心别离 将分批培养与流加培养发酵液用布袋初步过滤，放入离心机，转速 1000r/min，10min。

4. 菌体枯燥

4.1 将离心别离后的菌体置于不锈钢托盘放入真空枯燥箱，将箱门关上，并关闭放气阀，开启真空阀，再开启真空泵电源开始抽气，使箱内到达所需真空度，关闭真空阀，再关闭真空泵电源开关。

4.2 把真空枯燥箱电源开关拨至“1”处，设定温度 60°C，箱内温度开始上升，当箱内温度接近设定温度时，加热指示灯突亮突熄，反复屡次，一般 120min 以内搁板层面进入恒温状态。

4.3 当所需工作温度较底时，可采用二次设定方式，如所需工作温度 60°C，第一次可以设定 50°C，等温度过冲开始回落后，再第二次设定 60°C，这样可降低甚至杜绝温度过冲现象，尽快进入恒温状态。（注意：智能型仪表请参照操作方法）

4.4 枯燥时间 12h.当枯燥时间较长，真空度下降，需再次抽气恢复真空度，应先开启真空泵电机开关，再开启真空阀。

4.5 枯燥结束后，先关闭电源，旋动放气阀，解除箱内真空状态，再翻开箱门取出物品。（解除真空后，因密封圈与箱门吸紧变形不易立即翻开箱门，经过一段时间后，等密封圈恢复原形后，才能方便开启箱门。）

5. 称重 枯燥结束后取出菌体，计算菌体总得率。

## 六、分析方法

1. 菌体量(X) 生物量的测定

生物量的测定方法有比浊法和直接称重法等。比浊法。以空白培养基为对照，在 550 nm 处测定发酵液的吸光值。酵母浓度测定(湿重法)：吸取 5ml 菌液，2500rpm 离心 5min，去上清液，称量菌体湿重。

2. 复原糖的测定 斐林试剂法

3. 发酵活力的测定(选做)：称取 0.26g 鲜酵母，加 5g 在 30°C 下恒稳 1h 的面粉制成面团。置于 30°C 水中。测定面团从水底浮出的时间。浮起时间在 15min 内认为样品合格。

4. 分析决定初始体积  $V_0$ ，比生长速率  $\mu$  及菌体浓度  $X$  的测量，补料速度  $F$  与补料浓度  $SF$  的计算与控制。

七、实验结果 1. 分别画出分批培养与流加培养过程中，培养液中葡萄糖(g/L)、酵母菌体量(g/L)随流

加培养时间的变化曲线；2. 分别计算酵母产率(质量分数，葡萄糖)。

八、讨论 1. 流加培养与分批培养菌体浓度的区别何在及原理分析；2. 推导理想状况下准稳态恒速流加与与时间参数的方程。

## 第二篇 酿造工艺学实验

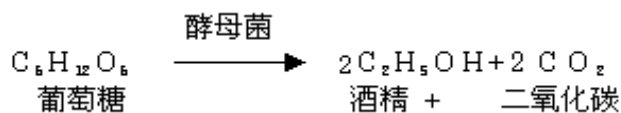
### 实验一 葡萄酒的酿造

#### 一、目的与要求

1. 确定葡萄酒酿造的最正确工艺条件，同时简单了解葡萄酒酿制的工艺原理。
2. 掌握干红葡萄酒酿造中发酵的监控方法及相关的操作要求。
3. 了解如何确定葡萄酒酒精发酵的结束，同时对葡萄酒进行别离和封装，转入后发酵阶段。
4. 熟悉各个理化指标的测定方法。

#### 二、实验原理

葡萄酒酿造就是将葡萄转化为葡萄酒。它包括两个阶段：第一阶段为物理化学或物理学阶段，即在酿造红葡萄酒时，葡萄浆果中的固体成分通过浸渍进入葡萄汁，在酿造白葡萄酒时，通过压榨获得葡萄汁；第二阶段为生物学阶段，即酒精发酵和苹果-酸乳酸发酵阶段。葡萄酒酿造的目标就是，实现对葡萄酒感官平衡及其风格至关重要的这些口感物质和芳香物质之间的平衡，然后保证发酵的正常进行。



葡萄的糖分，全部由葡萄糖与果糖构成，这两种糖在酵母作用下，直接发酵生成乙醇和二氧化碳及种种副产物，同时放出热量。

#### 二、实验仪器与材料

1. pH计、手持糖量计、温度计、天平、量筒、烧杯、比重计、水浴锅、电炉、移液管、锥形瓶、容量瓶、5L玻璃瓶、塑料盆，纱布。
2. 斐林试剂A、B液，1%次甲基兰，0.1mol/L氢氧化钠溶液、1%酚酞指示剂、邻苯二甲酸氢钾，95%酒精，盐酸、亚硫酸、白砂糖、酵母、KHCO<sub>3</sub>。

#### 三、实验方法与步骤

(一) 原料筛选 选择新鲜、无腐烂、充分成熟的葡萄酿造葡萄酒。选好原料后注意除去残枝败叶和青果，尽量防止接触水分和长期存放。无论生产白葡萄酒还是红葡萄酒，都要选用含糖量高的原料，含糖多那么产酒精多，如果100毫升的葡萄汁中能够含17克糖，也就是17%的含糖量，发酵后酒精度可以到达10度。此外，含酸量最好是0.6-1.0克/毫升葡萄汁，以造成酸性环境，便于酵母菌的生长繁

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：<https://d.book118.com/095312211143011132>