**8.1生产菌株发酵条件优化**

发酵条件对产物的形成有着非常重要的影响，其中培养基PH、培养温度和通气状况是三类最主要的发酵条件。培养基PH一般指灭菌前的，可通过酸碱调节来控制，由于发酵过程中PH会不断改变，所以最好用缓冲溶液来调节；通气状况可用培养基装量和摇床转速来衡量，另外，瓶口布的厚薄也会影响到氧气的传递，为了防止杂菌污染，瓶口布以8层纱布为好。

发酵培养基是指大生产时所用的培养基，由于发酵产物中一般含有较高比例的碳元素，因此培养基中的碳源含量也应该比种子培养基中高，如果产物的含氮量高，还应增加培养基中的氮源比例。但必须注意培养基的渗透压，如果渗透压太高，又会反过来抑制微生物的生长，在这种情况下可考虑用流加的方法逐步加入碳氮源。

培养基组分对发酵起着关键性的影响作用。工业发酵培养基与菌种筛选时所用的培养基不同，一般以经济节约为主要原则，因此常用廉价的农副产品为原料。选择碳源时常用山芋粉、麸皮、玉米粉等代替淀粉，而用豆饼粉、黄豆粉等作为氮源；此外，还应考虑所选原料不至于影响下游的分离提取工作。由于这些天然原料的组分复杂，不同批次的原料成分各不相同，在进行发酵前必须进行培养基的优化试验。

**1实验器材与试剂**

**1.1**种子培养基：（YPD）

葡萄糖 3g

酵母粉 0.5g

蛋白胨 0.2g

KH2PO4  0.2g

MgSO4 7H2O 0.1g

蒸馏水 100ml

琼脂 2g

pH 自然

分装于250ml三角瓶中，每瓶装量为50ml，以8层纱布作为瓶口布，报纸包扎，121℃灭菌25min。培养基冷却后接种，在28℃恒温静置培养7-10天，备用。

**1.2发酵培养基：（YPD）**

葡萄糖 5g

酵母粉 0.5g

蛋白胨 0.2g

KH2PO4  0.2g

MgSO4 7H2O 0.1g

蒸馏水 100ml

pH 自然

**2 实验方案**

**2.1培养基初始PH对产物积累的影响**

将YPD发酵培养基PH分别调至3、4、5、6、7、8，分装于250ml三角瓶中，装量分别为50ml，以8层纱布作为瓶口布，121℃灭菌25min，冷却。

将含有玻璃珠的无菌水倒入固体培养基种子瓶，轻摇，制备孢子悬液，接种（接种量5%-10%），在28℃恒温摇床上以180r/min转速培养5—7天。测定发酵液中生物量及产量，找出最佳培养基PH。

**2.2培养温度对产物积累的影响**

YPD发酵培养基，将接种后的三角瓶在15、20、25、30、35、40℃下 摇床（180r/min）培养5—7天，测定发酵液中产物量，找出最佳发酵温度。

**2.3培养基装量对产物积累的影响**

YPD发酵培养基，在250ml三角瓶中分装培养基，装量分别为20ml、30ml、40ml、50ml、60ml、70ml、80ml、90ml、100ml、以8层纱布作为瓶口布，121C灭菌25min。接种后28℃恒温摇床上以180r/min转速培养5—7天，测定发酵液中产物量，确定最适培养基装量。

4. 最适培养基配方的正交试验

将葡萄糖、酵母粉、蛋白胨和KH2PO4 作为培养基的4个主要影响因素，每一因素设定3个水平，按下表配制9组培养基（W/V），另加入MgSO4 7H2O 0.5g/L,分装于250 ml三角瓶中，每瓶50ml。以8层纱布作为瓶口布，121℃灭菌25min。

表一 发酵培养基优化用四因素三水平正交试验表

组号 因素A 因素B 因素C 因素D 生物量（g/L） 产量(mg/L)

葡萄糖 酵母粉 蛋白胨 KH2PO4

1 1 2% 1 0.2% 1 0.1% 1 0.1%

2 1 2% 2 0.5% 2 0.2% 2 0.2%

3 1 2% 3 0.8% 3 0.3% 3 0.3%

4 2 5% 1 0.2% 2 0.2% 3 0.3%

5 2 5% 2 0.5% 3 0.3% 1 0.1%

6 2 5% 3 0.8% 1 0.1% 2 0.2%

7 3 8% 1 0.2% 3 0.3% 2 0.2%

8 3 8% 2 0.5% 1 0.1% 3 0.3%

9 3 8% 3 0.8% 2 0.2% 1 0.1%

**3 结果与讨论**

**3.1发酵过程中生物及产量的测定**

收获菌丝，抽滤，蒸馏水洗1遍。80℃烘干至恒重，称干重。

用研钵把菌丝研成粉末，称取1 g菌粉置于10 ml离心管中，用3 ml乙酸乙酯抽提2次，蒸干溶剂，HPLC法测定含量。

**3.2HPLC方法产物的测定**

HPLC分析中使用的色谱柱为C18反向柱（5×300 mm, Agilent）。流动相为甲醇：H2O=70:30, v/v，流速为1 ml/min，紫外波长设定为227 nm，柱温为25°C。，进样量20 μl，标准品溶于氯仿。HPLC色谱仪：Agilent 1200 HPLC System。