

The background is a collage of four images: top-left shows a stack of books in blue; top-right shows a clock face in purple; bottom-left shows a stack of books in green; bottom-right shows a clock face in yellow. A white horizontal bar spans the middle of the image, containing the title and authors.

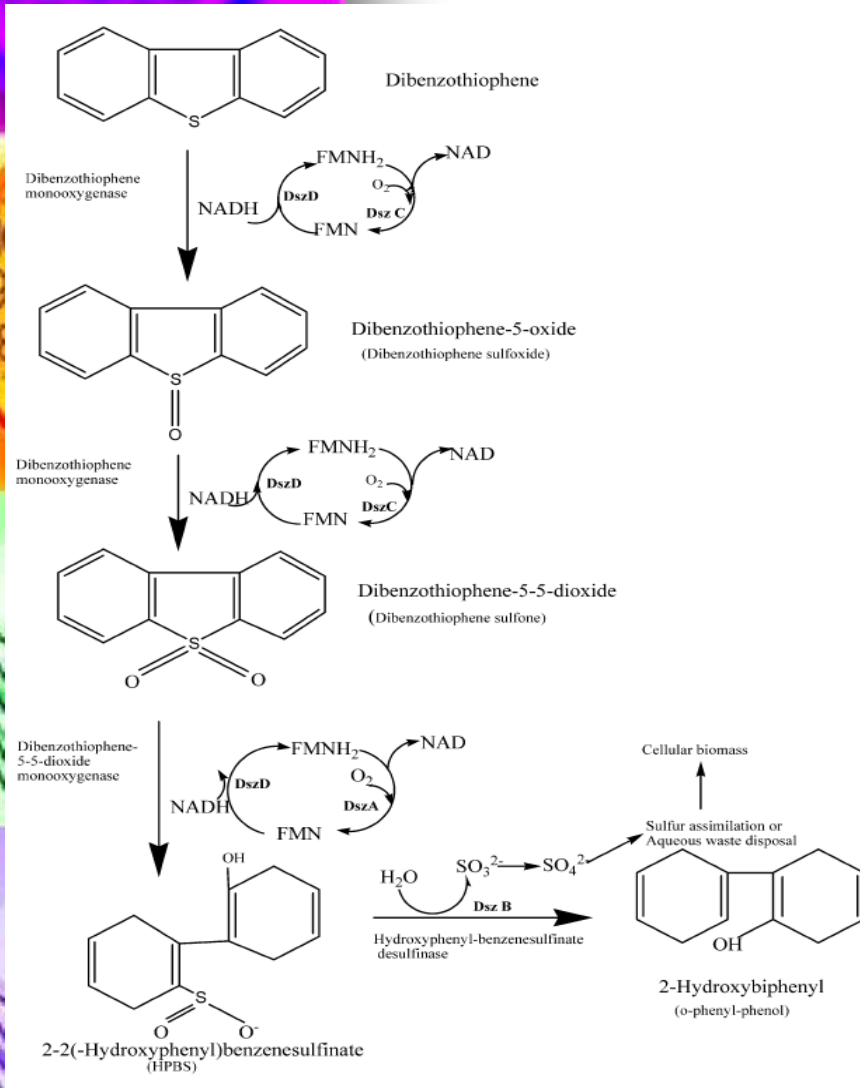
分批发酵法脱除**DBT**中的有机硫

李国强，魏东盛，邓飞

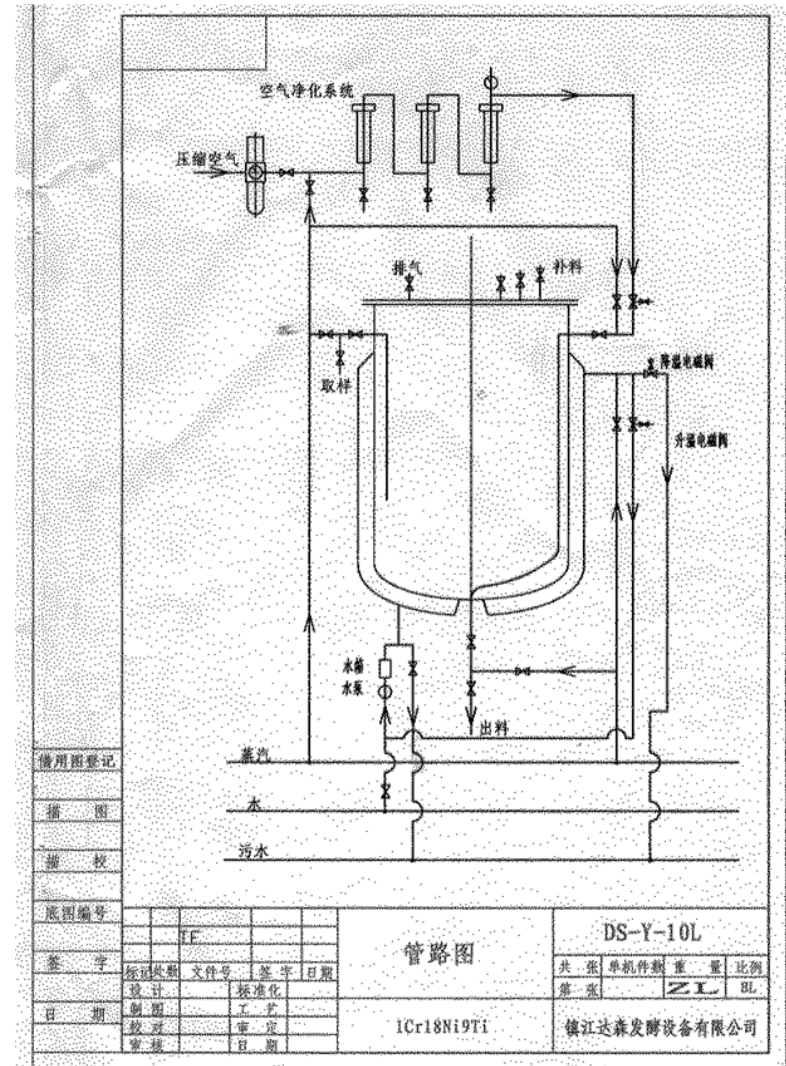
一、实验目的

- (1) 掌握机械搅拌式发酵罐的操作，完成DBT分批发酵脱硫的全过程操作。
- (2) 为休止细胞法脱除模拟燃油中的有机硫准备活性细胞。

二、实验原理



Rhodococcus erythropolis DS-3 的4S脱硫途径



机械搅拌式发酵罐的结构



三、实验材料

➤ (1) 实验药品

葡萄糖、DBT、盐酸、磷酸二氢钾、磷酸氢二钠、氯化铵、氯化镁、氯化钙、三氯化铁、氯化锰、消泡剂。

➤ (2) 实验仪器

蒸汽发生器、发酵罐、空压机、蠕动泵。



四、实验步骤

➤ 准备阶段

培养基配方：	磷酸二氢钾	0.244%
	磷酸氢二钠	0.557 %
	氯化铵	0.2%
	氯化镁	0.02%
	氯化钙	0.0001%
	三氯化铁	0.0001%
	氯化锰	0.0004%
	葡萄糖	0.5%
	V _{B1}	0.0001%
	DBT	0.3mmol/L
	pH	7.4

灭菌条件：121℃，30min。

葡萄糖配成25%的母液，单独灭菌，121℃，30min。

V_{B1}配成1mg/mL的母液，过滤灭菌。

注意：配料时，只能先定容到预定体积的75%，为什么？

四、实验步骤

➤ 实消

1. 室温~90℃：打开夹套进汽阀和夹套排水阀，并开启搅拌。

目的？

2. 90℃~灭菌温度：关闭夹套进汽阀，开启罐体内进汽阀，升温到预定值。

3. 灭菌温度维持：通过控制罐压维持灭菌温度，罐压调节由排气阀实现。

4. 实消结束：关闭进汽阀，用冷却水对罐体进行冷却。

5. 罐压 $\leq 0.03\text{MPa}$ 时：开启进气阀，使罐压保持在 $0.03\sim 0.05\text{MPa}$ 。

6. 罐温 $\leq 70^\circ\text{C}$ 时：调节排气阀，使罐压保持在 $0.03\sim 0.05\text{MPa}$ 。

7. 罐温 $\leq 40^\circ\text{C}$ 时：补加葡萄糖（终浓度0.5%）、 V_{B1} （终浓度0.0001%）



四、实验步骤

➤ 接种

火焰封口法：将前次试验制备的二级种接入发酵罐。接种时，先缓慢将罐压降至0.01MPa，关小进排气阀，在接种口上绕上酒精棉点燃，用钳子逐步打开灌顶接种口，并将盖放置在有75度酒精的培养皿内，防止污染。将菌种液在火焰封口下倒入发酵罐内，盖上接种阀，旋紧。



四、实验步骤

➤ 发酵过程的控制

(1) 发酵过程的温度控制

Rhodococcus erythropolis DS-3的最适生长温度为30℃，在30~37℃菌体的生长和代谢速率较快。因此在整个发酵过程中要将发酵温度控制在30~32℃，已获得最佳生长和代谢速率。

(2) 发酵过程中的pH控制

发酵过程中要将pH控制在7.2~8.0之间。

(3) 发酵过程中的溶氧控制

调整通风量(10L/min)和搅拌转速(200r/min)，使发酵过程中溶氧不低于40%。

(4) 放罐标准

菌浓在4小时内基本不变化（对数生长期刚结束时，目的是为后续实验提高大量高活性细胞）。



四、实验步骤

► 发酵过程的分析

pH: 实时

溶氧: 实时

2-HBP: 1次/4小时(取样后用2N盐酸调pH5.0以下, 终止反应)

DBT: 1次/6小时(取样后用2N盐酸调pH5.0以下, 终止反应)

温度: 实时

OD: 1次/4小时, 560nm。



五、思考题

- 1、4S生物脱硫途径的原理是什么？
- 2、在发酵过程中如何控制各种发酵参数？
- 3、绘制发酵动态曲线，计算最大脱硫速率。