

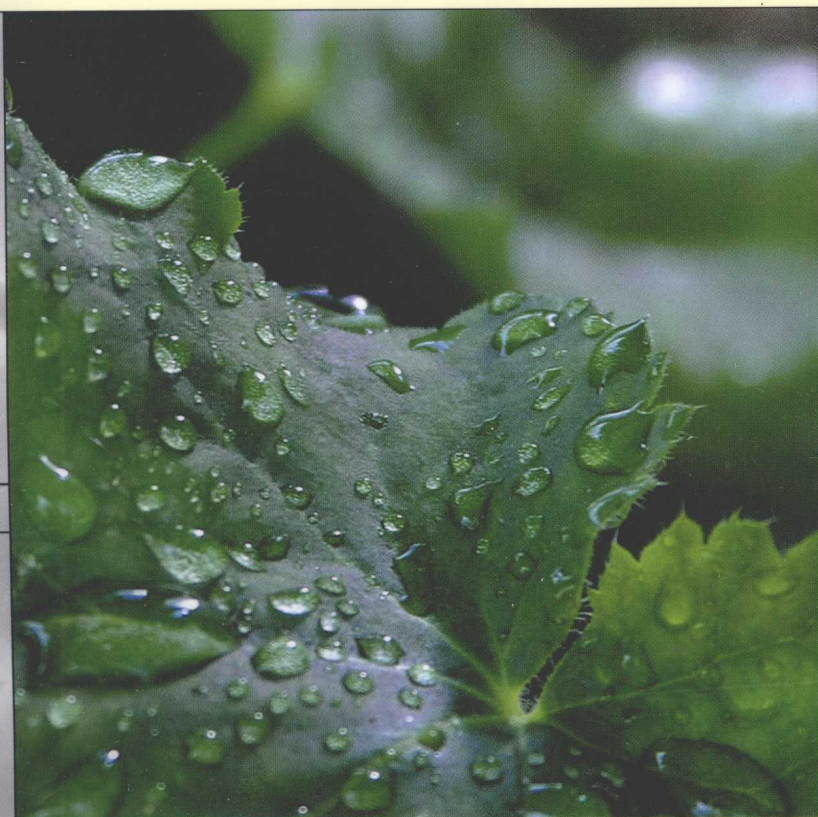


生物技术与生物工程专业
能力培养型系列教材

Comprehensive
Experiment of Bioengineering

生物工程综合实验

蒋 群 李志勇 主编
刘喜朋 何丽明 参编



科学出版社
www.sciencep.com

生物技术与生物工程专业能力培养型系列教材

生物工程综合实验

蒋 群 李志勇 主编
刘喜朋 何丽明 参编

科学出版社

北 京

内 容 简 介

本教材主要由 13 个综合实验组成。在实验设计上,每个综合实验都以产品生产为主线,综合利用多种实验技术,力争使学生得到多方面的综合训练;内容上,涵盖了发酵工程、基因工程、酶工程、细胞工程、生物分离工程及生物信息学等;应用上,包括了医药、能源、食品等,特别是生物柴油、燃料乙醇、纤维素的利用等目前生物工程领域的研究热点。教材突出生物工程实验的综合性与现代性,适合作为生物工程(技术)专业高年级本科实验教学的教科书。

图书在版编目(CIP)数据

生物工程综合实验/蒋群,李志勇主编. —北京:科学出版社, 2010. 7

生物技术与生物工程专业能力培养型系列教材

ISBN 978-7-03-022055-4

I. ①生… II. ①蒋… ②李… III. ①生物工程-实验-高等学校-教材

IV. ①Q81-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2010)第 116482 号

责任编辑:单冉东 李晶晶 周 辉/责任校对:邹慧卿

责任印制:张克忠/封面设计:耕者设计工作室

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>

北京市农林印务有限公司印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2010 年 7 月第 一 版 开本: B5(720×1000)

2010 年 7 月第一次印刷 印张: 16 1/2

印数: 1—3 500 字数: 330 000

定价: 30.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

生物技术与生物工程专业能力培养型系列教材编委会

主 任

李志勇 上海交通大学

委 员 (按姓名汉语拼音排序)

陈 峰 上海交通大学

冯 雁 上海交通大学

黄志伟 东华大学

蒋 群 上海交通大学

马 伟 上海交通大学

乔中东 上海交通大学

肖凯军 华南理工大学

由德林 上海交通大学

张兴群 东华大学

系列教材书目

细胞工程(第二版)	李志勇	编著	
酶工程	由德林	主编	
微生物工程	陈 峰	主编	
基因工程原理	乔中东	主编	
生物工程设备	张兴群	主编	
生物反应工程	张兴群	主编	
生物分离工程	肖凯军	主编	
代谢工程	黄志伟	主编	
蛋白质工程	冯 雁	主编	
实用生物信息学技术	马 伟	主编	
生物工程原理与技术(第二版)	李志勇	蒋 群	主编
生物工程综合实验	蒋 群	李志勇	主编

丛 书 序

一般认为,生物技术的发展经历了传统生物技术(酿造)、近代生物技术(微生物发酵)、现代生物技术(生物工程)三个阶段。生物工程(bioengineering)是运用生物学、化学和工程学等学科相结合的方法,利用生物体制造人类所需产品、改造环境的一门多学科交叉的应用技术。生物工程已经在食品、医药、轻工、农业、环境保护、能源等领域发挥了重要作用,已经产生了巨大的经济效益与社会效益。20世纪70年代开始,转基因技术、系统生物学、生物信息学、化学生物学、基因组学、转录组学、蛋白质组学、代谢组学等学科或技术的建立与发展极大地推动了生物工程的快速发展。研究对象从微生物扩展到动植物细胞、微藻,研究领域从陆地扩展到海洋、太空。在微生物工程(发酵工程)、酶工程、基因工程、细胞工程、生物反应工程、生物分离工程等经典生物工程技术基础上,诞生了代谢工程、蛋白质工程、组织工程等新型生物工程技术。目前,生物工程已经成为与微电子技术、新材料技术和新能源技术并列的重要科学技术,对于解决人类面临的粮食、健康、环境、能源等重大问题将发挥越来越重要的作用。

生物工程专业是我国众多高校优先和重点发展的学科专业之一,生物工程专业教材的系统化建设是培养高质量生物工程专业人才的前提。目前生物工程一体化的系列教材相对欠缺。为满足我国普通高等教育的需要,上海交通大学受科学出版社委托,组织上海交通大学、华南理工大学、东华大学等一批工作在生物技术、生物工程教学、科研第一线的教师编写本套“生物技术与生物工程专业能力培养型系列教材”。全套计划由12部教材组成,其中2部是在第一版基础上的修订版,《细胞工程》(第二版)入选普通高等教育“十一五”国家级规划教材。本套教材具有以下特点:

(1)系统全面。不仅包括《微生物工程》、《酶工程》、《基因工程原理》、《细胞工程》(第二版)、《生物工程设备》、《生物反应工程》、《生物分离工程》、《生物工程综合实验》,而且包括了具有前沿性的《代谢工程》、《蛋白质工程》以及与生物工程研发关系日益紧密的《实用生物信息学技术》。

(2)适用面广。除了包括可以满足生物技术、生物工程专业教学的专业教材外,还编写了供通识教育选用的《生物工程原理与技术》(第二版)教材。

(3)注重经典与前沿、理论与技术、科研与教学、课堂与课外紧密结合。在传授知识的同时,注重学生能力的培养。

希望系列教材能为我国高等院校的生物工程技术人才培养发挥积极作用。不妥之处敬请各位同仁、老师、同学批评指正!

李志勇

2010年5月于上海交通大学

前 言

实验教学是培养学生掌握专业技能的重要环节。相对于单元实验而言,综合型、设计型实验更有利于培养学生分析问题、解决问题的能力以及创新意识,在培养高综合素质的复合型人才中具有重要意义。

编者所在的上海交通大学自 2001 年起开设生物工程综合实验,面向高年级学生,强调以产品生产为主线,综合利用多种实验技术,使学生巩固理论知识和专业实验技能,深入理解实验技术的相互联系、加强对理论知识的融会贯通,并培养学生的团队协作精神等综合素质。实验教学内容大多是结合教师的科研实践,并查阅专业文献资料,整理设计出来的。通过多年的教学实践,我们整理编写了本实验教材,突出生物工程实验的综合性与现代性。本书包括 13 个综合大实验,每个综合实验由若干个相对独立的小实验组成,教师可根据实际情况,自行安排教学。综合实验 1~12 涵盖了发酵工程、基因工程、酶工程、细胞工程及生物分离工程等技术;应用范围也十分广泛,包括医药、能源、食品等,特别是涉及生物工程领域目前的研究热点,如生物柴油、燃料乙醇、纤维素的利用等。每个综合实验的“实验简介”部分概括了实验路线、主要内容,以及所用到的技术。生物信息学技术目前已经成为与生物工程技术关系紧密的一门核心技术。另外本书中也安排了相关实验(综合实验 13),进行细菌的系统发育关系的分析。

考虑到实验的可行性,实验所用菌种均可从菌种保藏机构购得。此外我们也设计了从自然界筛选菌种的探究型实验,供有兴趣的学生选做,有助于培养学生的科研兴趣和科研技能。另外,为方便教学,本书附录部分列出了实验中用到的培养基、试剂和缓冲液,方便查阅。

本书由长期工作在教学和科研一线的教师编写,由蒋群副教授、李志勇教授主编、主审。刘喜朋副教授编写了综合实验 7,何丽明老师编写了综合实验 13。另外,硕士研究生李珊和本科生孙小玲参与了文稿的文字录入工作,在此表示感谢。

本书适合作为生物工程(技术)专业高年级本科实验教学的教科书。由于生物工程技术的飞速发展以及编写者自身水平的限制,恳请同行对书中的不妥之处提出宝贵意见。

编 者

2010 年 1 月

目 录

丛书序

前言

综合实验 1 青霉素的发酵生产及半合成抗生素的制备	1
实验 1-1 青霉素的发酵生产	3
实验 1-2 发酵体系中氨态氮含量的测定	6
实验 1-3 青霉素效价的测定	8
实验 1-4 青霉素酰化酶产生菌的筛选	11
实验 1-5 青霉素酰化酶的酶活测定	13
实验 1-6 青霉素酰化酶的发酵生产与分离纯化	15
实验 1-7 青霉素酰化酶的固定化	30
实验 1-8 固定化青霉素酰化酶催化制备 7-ADCA	34
综合实验 2 微生物发酵生产油脂及生物柴油的制备	36
实验 2-1 微生物发酵产油脂	38
实验 2-2 油脂的提取与成分分析	39
实验 2-3 酶法转化生成生物柴油	43
综合实验 3 玉米超氧化物歧化酶提取与固定化酵母乙醇发酵	46
实验 3-1 玉米超氧化物歧化酶的提取	48
实验 3-2 超氧化物歧化酶(SOD)活力测定	50
实验 3-3 玉米粉的液化、糖化	52
实验 3-4 固定化酵母乙醇发酵	54
实验 3-5 乙醇发酵分析	58
综合实验 4 乳酸发酵及猕猴桃汁乳酸发酵饮料的制备	61
实验 4-1 乳酸菌的分离与筛选	63
实验 4-2 猕猴桃汁乳酸发酵饮料的制备	65
实验 4-3 细菌 L-乳酸发酵	68
综合实验 5 黑曲霉发酵生产柠檬酸	73
实验 5-1 黑曲霉孢子的制备	75
实验 5-2 种子培养	78
实验 5-3 发酵罐的构造认识及空消	82
实验 5-4 薯干粉/玉米粉液体深层发酵	85

实验 5-5 柠檬酸发酵分析	90
实验 5-6 发酵液的中和、酸解	95
实验 5-7 粗柠檬酸溶液的脱色及离子交换净化	96
实验 5-8 柠檬酸溶液的浓缩、结晶及干燥	99
综合实验 6 纤维素酶的固态发酵生产和分离纯化	102
实验 6-1 纤维素酶产生菌的选育	104
实验 6-2 纤维素酶的活性测定	107
实验 6-3 固态发酵产纤维素酶	111
实验 6-4 纤维素酶的分离纯化	114
实验 6-5 纤维素酶糖化玉米芯发酵生产乙醇	123
综合实验 7 基因工程菌发酵生产重组核糖核酸酶 A	128
实验 7-1 重组核糖核酸酶 A 表达载体构建	129
实验 7-2 重组核糖核酸酶 A 诱导表达	136
实验 7-3 重组核糖核酸酶 A 亲和纯化	138
实验 7-4 重组核糖核酸酶 A 活性鉴定	141
综合实验 8 几丁质酶的发酵生产及异源表达	143
实验 8-1 几丁质酶产生菌的筛选	144
实验 8-2 产几丁质酶培养基的统计学优化	148
实验 8-3 几丁质酶的分离纯化	153
实验 8-4 几丁质酶的酶学性质	156
实验 8-5 几丁质酶基因的克隆与异源表达	158
综合实验 9 木瓜蛋白酶的提取制备及壳聚糖的酶法水解	165
实验 9-1 木瓜蛋白酶的提取	166
实验 9-2 木瓜蛋白酶活力测定	169
实验 9-3 木瓜蛋白酶的分离纯化	171
实验 9-4 木瓜蛋白酶水解壳聚糖	177
实验 9-5 设计实验	180
综合实验 10 利用固定化酵母细胞生产 1,6-二磷酸果糖	181
实验 10-1 酵母细胞的固定化	182
实验 10-2 固定化酵母催化磷酸化反应	185
实验 10-3 固定化酵母细胞连续制备 1,6-二磷酸果糖	188
实验 10-4 离子交换法提取 1,6-二磷酸果糖	189
综合实验 11 螺旋藻气升式光生物反应器培养及藻蓝蛋白的提取纯化	193
实验 11-1 螺旋藻气升式光生物反应器培养	194
实验 11-2 螺旋藻藻蓝蛋白的提取	197

实验 11-3 螺旋藻藻蓝蛋白的纯化	200
实验 11-4 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳测定藻蓝蛋白的相对分子质量 ...	204
综合实验 12 红豆杉细胞培养及次级代谢产物的检测分析	208
实验 12-1 红豆杉细胞培养	210
实验 12-2 红豆杉细胞培养物中紫杉烷的分离鉴定	215
实验 12-3 红豆杉细胞提取物对肿瘤细胞的作用	218
综合实验 13 不同来源细菌的系统发育关系分析	221
实验 13-1 细菌总 DNA 提取与琼脂糖凝胶电泳检测	222
实验 13-2 16S rDNA 的 PCR 扩增与琼脂糖凝胶电泳	226
实验 13-3 16S rDNA 序列的克隆	229
实验 13-4 阳性克隆的筛选	232
实验 13-5 系统发育树分析	234
参考文献	238
附录 1 培养基和试剂、溶液的配制	242
附录 2 缓冲液的配制	248
附录 3 硫酸铵饱和度的常用表	253

综合实验 1 青霉素的发酵生产及半合成 抗生素的制备

一、背景知识

(一) β -内酰胺类抗生素

抗生素是生物在其生命活动过程中产生的，并能在低浓度下有选择性地抑制或杀灭其他微生物或肿瘤细胞的有机物质。 β -内酰胺类抗生素是一类重要的抗生素，包括青霉素、头孢菌素、头霉素等，主要特征是在分子结构中有一个具有抗菌活性的四元的 β -内酰胺环结构，即其母核结构。此类抗生素具有杀菌活性强、毒性低、适应证广及临床疗效好的优点。

青霉素族抗菌素的化学结构如图 1-1 所示。

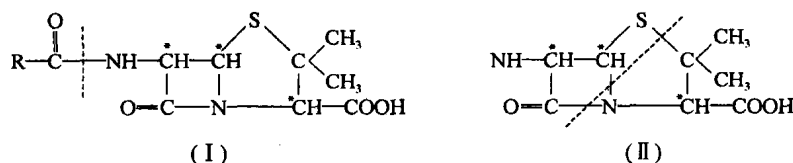


图 1-1 青霉素族抗菌素的化学结构

青霉素分子是由侧链酰基与母核 [图 1-1 (II)] 两大部分组成。母核为 6-氨基青霉烷酸 (6-amine penicillanic acid, 6-APA)，它是由四氢噻唑环和 β -内酰胺环稠合而成，也可看作是由半胱氨酸 [图 1-1 (II) 中虚线的左上方所示] 和缬氨酸 [图 1-1 (II) 中虚线的右下方所示] 结合而成的二肽。青霉素分子中含有 3 个手性碳原子 (图中标有 * 号的碳原子)，故具有旋光性。不同的侧链 R 构成不同类型的青霉素。若 R 为苄基即为苄基青霉素或称为青霉素 G，这是青霉素族抗生素中疗效最好、应用最为广泛的。如不特别注明，通常所说的青霉素即指苄青霉素。目前，已知的天然青霉素 (通过发酵而产生的青霉素) 有 8 种，如青霉素 G、青霉素 V 等。

头孢菌素 C (cephalosporin C，简称头 C 或 CPC) 是第二大类 β -内酰胺抗生素，目前也广泛应用于临床。头孢菌素 C 化学结构的母核是 7-氨基头孢霉烷酸 (7-ACA)，是由四元 β -内酰胺环与含有双键的六元二氢噻嗪环稠合而成。

(二) 半合成抗生素及青霉素酰化酶的应用

目前, 由于抗生素的大量而广泛的利用, 细菌的耐药性现象日趋严重。抗生素改性——半合成青霉素及半合成头孢菌素等的开发是解决这一问题的主要途径。

半合成青霉素的基本原理是通过微生物发酵生产青霉素 G 或青霉素 V, 接着利用不同微生物来源的酰基转移酶, 在不同 pH 条件下催化青霉素的侧链酰基水解获得母核 6-氨基青霉烷酸 (6-APA); 然后通过化学合成的方法制备新的酰基侧链, 在一定的条件下将此侧链与 6-APA 再进行酰化缩合反应形成各种半合成新青霉素产品, 如苯唑青霉素、氨苄青霉素、氧哌嗪青霉素、羧氨苄青霉素 (阿莫西林)、羧苄青霉素等。

头孢菌素 C 的分子结构中 3 位双键与 5 位 N 原子的未共享电子对形成共轭, 而且四/六元稠环系统中 β -内酰胺环的张力比四/五元稠环系统小, 故头孢菌素比青霉素稳定, 更有利于进行化学改造。7-氨基头孢霉烷酸 (7-ACA) 是头孢菌素 C 的母核, 是半合成头孢菌素的重要中间体, 将其在 3 位消除了药代上不稳定的乙酰氧基得到 7-氨基-3-去乙酰氧头孢霉烷酸 (7-aminodeacetoxycephalosporanic acid, 7-ADCA), 后者是制造头孢氨苄、头孢羟氨苄等半合成头孢菌素的中间体。

青霉素酰化酶是半合成 β -内酰胺抗生素工业中有重要应用价值的工具酶。它既能催化青霉素及其扩环酸水解去侧链, 又能催化 6-APA 和 7-ADCA 与侧链缩合, 生产多种半合成 β -内酰胺抗生素。一般来说, 该酶在偏碱性环境下可催化青霉素 G 和头孢菌素 G (苯乙酰-7-ADCA) 水解, 制备半合成抗生素的中间体 6-APA 和 7-ADCA。在酸性或中性条件下, 青霉素酰化酶可催化 6-APA、7-ADCA 发生酰基化反应制备半合成抗生素。

酶法生产 6-APA、7-ADCA 和 7-ACA 等半合成抗生素中间体, 经历了两次大的突破。第一次突破是在 20 世纪 70 年代, PGA (优先水解青霉素 G 的青霉素 G 酰化酶) 特别是固定化 PGA 在水解青霉素 G 生产 6-APA 中的应用取代了传统的化学裂解法。酶法的高效安全和低成本为化学合成提供了大量的 6-APA, 促使化学法合成一系列新青霉素的迅猛发展。不久, 青霉素扩环所得的头孢霉素 G 又用固定化 PGA 催化裂解生产 7-ADCA, 从而为 80 年代从 7-ADCA 与酰基供体合成新侧链的化学缩合工艺的产生打下了基础, 使头孢霉素成为临床抗炎二线药物。第二次大突破是在 90 年代中期, 各国制药行业不惜花费大量人力物力, 对固定化青霉素酰化酶进行研究, 使固定化酶的技术水平不断提高。

利用青霉素酰化酶生产 6-APA 和 7-ADCA 的生产工艺包括青霉素的生产技术、扩环酸的制备、青霉素酰化酶的生产、酶的固定化以及青霉素的酶解技术等。

二、实验简介

本系列实验包括青霉素的发酵生产、青霉素酰化酶产生菌的筛选和发酵产酶、青霉素酰化酶的分离纯化、青霉素酰化酶的固定化、固定化青霉素酰化酶催化制备 7-ADCA, 以及相关的测定方法, 如发酵体系中氨态氮含量的测定、青霉素效价的测定、青霉素酰化酶的酶活测定等, 内容十分丰富。本系列实验综合了抗生素发酵、产酶菌的分离筛选、发酵产酶、酶的分离纯化、酶的固定化、固定化酶反应等发酵工程、酶工程和生物分离工程重要技术, 涉及发酵工程、酶工程在抗生素和半合成抗生素工业中的重要应用。

实验 1-1 青霉素的发酵生产

一、实验内容与目的

产黄青霉经活化培养后, 摇瓶发酵产青霉素。通过本实验, 掌握微生物培养、发酵等实验技术, 以及补料、发酵终点判断等原理和技术。

二、实验原理

(一) 青霉素生产菌种

青霉素是产黄青霉菌株在一定的培养条件下发酵生产的。最早发现产生青霉素的原始菌种是 1928 年由 Fleming 分离的点青霉 (*Penicillium notatum*), 生产能力很低, 1943 年, 从一发霉甜瓜上分离到一株产黄青霉 (*Penicillium chrysogenum* NRRL 1951), 产青霉素的能力是 100U/mL。多次 X 射线、紫外线等一系列诱变处理得到了生产能力较高的菌株。对青霉素产生菌持续的定性突变和理性改良, 结合发酵工艺的改进, 使当今世界青霉素工业发酵水平已高达约 85 000U/mL, 我国的青霉素发酵水平已达 66 000~70 000U/mL。

在液体深层培养中, 青霉素产生菌在生长发育过程中, 其细胞会发生明显的变化, 按其生长特征可划分为 6 个生长期。

第 I 期——分生孢子发芽, 孢子先膨胀, 再形成小的芽管, 原生质未分化, 有小空胞;

第 II 期——菌丝繁殖, 原生质的嗜碱性很强, 末期有类脂肪小颗粒产生;

第 III 期——原生质嗜碱性仍很强, 形成脂肪粒, 积累储藏物, 没有空胞;

第 IV 期——原生质嗜碱性很弱, 脂肪粒减少, 形成中、小空胞;

第 V 期——脂肪粒消失, 形成大的空胞;

第Ⅵ期——细胞内看不到颗粒，并出现个别自溶的细胞。

其中第Ⅰ～Ⅳ期是菌丝生长期，菌丝的浓度增加很多，一般不合成青霉素或合成的青霉素较少，适于作发酵种子。第Ⅳ～Ⅴ期合成青霉素的能力最强，大量生产青霉素，此时菌丝体生长缓慢。第Ⅵ期是菌丝体自溶期。

(二) 青霉素的发酵生产

青霉素发酵生产的一般流程包括孢子培养、种子培养、发酵和提取。

孢子培养以产生丰富的孢子为目的，而种子培养以繁殖大量健壮的菌丝体为主要目的。孢子和菌丝的质量对青霉素的产量有直接的影响。种子质量要求是菌丝稠密，菌丝团很少，菌丝粗壮，有中小空胞，处在第Ⅲ或Ⅳ期产黄青霉菌可利用的碳源有乳糖、蔗糖、葡萄糖、淀粉及天然油脂等。

氮源常选用玉米浆、精制棉籽饼粉、麸皮，并补加无机氮源（硫酸铵、氨水或尿素）。玉米浆是玉米淀粉生产的副产品，含有多种氨基酸，如精氨酸、谷氨酸、苯丙氨酸以及青霉素合成的前体苯乙酸及其衍生物，是青霉素发酵的最好氮源。

在发酵过程中会产生大量泡沫，因此我们可以用豆油、玉米油等天然油脂或用化学合成消沫剂“泡敌”来消泡。应当控制消沫剂的用量并少量多次地加入，尤其在发酵前期不宜多用，以免影响菌的呼吸代谢。

发酵生产中取样后可用显微镜观察菌丝形态的变化。根据“镜检”中菌丝形态变化和代谢变化的其他指标来调节发酵温度，通过追加糖或补加前体等各种措施来延长发酵时间，以获得更多青霉素。菌丝中空胞扩大、增多或延伸，并出现个别自溶细胞即表示菌丝正趋向衰老，青霉素分泌逐渐停止，菌丝形态上即将进入自溶期，应迅速停止发酵。

发酵水平的高低一般用发酵单位来表示。发酵单位即抗生素在发酵液中的浓度，一般用 U/mL 或 $\mu\text{g/mL}$ 表示。U 为抗菌活性单位，又称为效价。青霉素效价单位定义为能在 50mL 肉汤培养基中完全抑制金黄色葡萄球菌标准菌株发育的最小青霉素剂量。

根据青霉素盐易溶于水而青霉素游离酸易溶于有机溶剂的性质，可采用溶剂法从发酵液中提取青霉素，将发酵液经过滤、乙酸丁酯萃取、结晶等分离纯化过程得到产品。由于青霉素的性质不稳定，故整个提取和精制过程应保持低温，在严格控制 pH 的条件下快速进行。

三、实验材料

1. 菌种

青霉素产生菌产黄青霉。

2. 培养基

(1) 查氏培养基：蔗糖 30.0g，硝酸钠 2.0g，磷酸氢二钾 1.0g，硫酸镁 0.5g，氯化钾 0.5g，硫酸亚铁 0.01g，琼脂 20g，水 1000mL。

(2) 种子培养基 (%)：玉米浆 4.0 (以干物质计)，蔗糖 2.4，硫酸铵 0.4，碳酸钙 0.4，消沫剂 0.06，pH 6.2~6.5。

(3) 发酵培养基 (%)：玉米浆 3.8 (以干物质计)，蔗糖 2.4，磷酸二氢钾 0.54，无水硫酸钠 0.54，碳酸钙 0.07，硫酸亚铁 0.018，硫酸锰 0.0025，消沫剂 0.01，pH 6.5。

3. 试剂

硫酸铵。

4. 主要仪器设备

高压蒸汽灭菌锅、超净工作台、电子天平、恒温培养箱、控温摇床、高速离心机、显微镜。

四、实验步骤

(1) 配制 5mL 查氏琼脂培养基，装于试管中，进行高压蒸汽灭菌，摆斜面，待冷却后，将产黄青霉接种到查氏琼脂斜面上，置于恒温培养箱中 26℃ 培养 5~6 天。

(2) 从查氏斜面培养基上移种一环青霉菌孢子，接种到 100mL 种子培养基中，26℃，120r/min 振荡培养，培养至对数生长期。

(3) 菌丝浓度的测定：取培养液 10mL，3000r/min 离心 5min，测得沉淀在培养液中的体积比即为菌丝浓度。

(4) 按 15% 接种量将种子液接入 100mL 发酵培养基中，26℃ 下进行振荡培养。当发酵液中氨态氮含量 (测定方法见实验 1-2) 降至 450μg/mL 以下时，开始补加硫酸铵。在后续发酵过程中控制发酵液氨氮含量为 300~500μg/mL。

(5) 取发酵液，用显微镜直接观察菌丝形态。选择菌丝内大空胞较多、菌丝开始自溶时放罐。

(6) 取发酵液，按实验 1-3 中的方法测发酵效价。

五、实验讨论与注意事项

(1) 发酵周期长短由菌丝状态决定，一般选择菌丝内大空胞较多、菌丝开始自溶时放罐，即完成了一个发酵周期。

(2) 发酵液中含氮量的变化是微生物发酵过程中的重要生理指标。发酵过程中，氨氮代谢包含前期的有机氮代谢和无机氮源补加后的无机氮代谢。

六、实验结果记录与数据处理

- (1) 记录发酵过程中氨氮含量的变化以及硫酸铵的补加量。
- (2) 记录发酵液效价。

实验 1-2 发酵体系中氨态氮含量的测定

一、实验内容与目的

采用靛酚蓝法,测定发酵体系中的氨态氮含量。通过本实验,掌握发酵体系中氨态氮含量的一种常用测定方法。

二、实验原理

在微生物发酵过程中,无机氨态氮是一种重要的氮源物质,其浓度可影响发酵过程中菌体的生长和产物的合成。在发酵过程中,对于氨态氮的检测非常重要。目前,氨态氮检测的方法主要有滴定法(甲醛滴定、蒸馏法)、电位滴定法、氨选择性电极法和分光光度法(靛酚蓝法和纳氏试剂法)等。

使用靛酚蓝法时,氨会在高 pH 条件下和酚以及次氯酸盐发生反应而产生出一种靛酚蓝的蓝色化合物,颜色的深浅与铵离子的浓度具有很好的相关性,因此可以利用分光光度法来检测氨态氮的含量。

三、实验材料

1. 试剂

硫酸铵、苯酚、氢氧化钠、柠檬酸三钠、次氯酸钠、亚硝基铁氰化钠。

2. 主要仪器设备

电热恒温水浴锅、分光光度计、电子天平、电热干燥箱。

四、实验步骤

(一) 绘制标准曲线

(1) 配制硫酸铵标准溶液(50mg/L):准确称取 0.2358g 已烘至恒重的硫酸铵,用蒸馏水溶解并定容至 100mL。使用时将此溶液再稀释 10 倍,则其含氨态氮质量浓度为 50mg/L。

(2) 配制检测试剂。溶液 A:精确称取 5.00g 的苯酚,溶于 400mL 的水中,加入 2.0mL 的亚硝基铁氰化钠溶液,定容至 500mL,棕色瓶 4℃ 保存。若溶液