

国家级实验示范中心配套教材

微生物工程实验

Microbial
Engineering
ExperimentS

陈必链 王明兹 主编



科学出版社

国家级实验示范中心配套教材

微生物工程实验

陈必链 王明兹 主编

图在副题目(CIP)编

微生物工程实验\陈必链、王明兹主编. —北京: 科学出版社, 2013.7

国家级实验示范中心配套教材

ISBN 978-7-03-035071-8

I. ①微… II. ①陈… ②王… III. 微生物—工程—实验—高等学校—教材

陈必链 王明兹 主编

科学出版社

北京

定价: 19.00元

TA.P2-33
C363

内 容 简 介

本书与《微生物工程》理论教材(陈必链, 2010)配套, 基本依照微生物工程工业生产流程编写, 并注重对学生实验能力和素质的培养与训练。

全书共分4部分, 包括微生物工程常用理化分析, 微生物工程菌株分离、选育及保藏, 微生物工程工艺过程及优化, 微生物工程产品实验; 具体实验涉及发酵生产原材料分析, 菌株分离, 菌株选育和保藏, 培养基配制和灭菌, 小型发酵罐使用, 发酵过程分析, 发酵工艺优化, 氨基酸、抗生素及酶制剂发酵和产物测定, 微藻和动物细胞培养等31个实验。

本书适于高等院校生物科学、生物技术、生物工程、环境科学、食品科学等专业本科生和硕士生的学习使用, 也可供其他相关科技人员查阅参考。

图书在版编目(CIP)数据

微生物工程实验 / 陈必链, 王明兹主编. —北京: 科学出版社, 2012.7
国家级实验示范中心配套教材
ISBN 978-7-03-035071-8

I. ①微… II. ①陈… ②王… III. 微生物-物工程-实验-高等学校-教材④IV. ①TQ92-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2012)第 148078 号

责任编辑: 陈 露 封 婷 贺窑青 / 责任校对: 何艳萍
责任印制: 刘 学 / 封面设计: 殷 颀

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>

江苏省句容市排印厂印刷

科学出版社编务公司排版制作

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2012 年 7 月第 一 版 开本: B5 (720 × 1000)

2012 年 7 月第一次印刷 印张: 8 3/4

字数: 159 000

定价: 19.00 元

(如有印装质量问题, 我社负责调换)

《微生物工程实验》编辑委员会

主 编 陈必链 王明兹

编 委 (按姓氏笔画排序)

王明兹 车程川 刘 峰 张明凤

杨 革 陈必链 周颖越 欧 杰

柯崇榕 黄鹭强 舒正玉 戴美学

前 言

生物工程是以现代工程技术手段,改造和利用微生物(包括动、植物细胞)的某些特定功能,为人类生产有用的产品,或直接应用于工业生产过程的技术,涉及食品、医药、化工、能源、材料、环境保护和冶金采矿等众多领域。它既是现代生物工程的核心技术之一,也是基因工程、酶工程、细胞工程等生物高技术实现产业化的桥梁和关键环节。随着现代基因组学、代谢组学、进化工程和人工生命等学科的发展,以及信息学和工程学的不断融合渗透,其内涵的扩充和对生物技术产业化的推动日益加强,在国民经济中占有重要地位。

2010年,在科学出版社上海分社和高等师范院校生命科学规划教材编委会的指导倡议下,我们约请全国有关大学的老师编写了《生物工程》理论教材(陈必链,2010),此书深受国内相关院校师生的喜欢。生物工程是一门应用性学科,在阐明基本原理的基础上,更应该侧重于培养学生的实践动手能力和分析运用能力,因此在理论教学的同时,配合以相应的实验教学将有利于提高人才培养效率,也将有利于促进理论学习效果。为此,我们再次约请国内相关院校在生物工程一线教学的中、青年教师编写《生物工程实验》,与理论教材配套,以期对读者的学习或教学有所帮助。

本实验教材基本与理论教材在内容上相互配套,教学进度和编排也相仿,基本依照微生物工程工业生产流程进行编写,注意强调对学生实验能力和素质的培养与训练。每个实验在阐明原理基础上,列出实验操作步骤及所需的计划学时数,强调实验注意事项,在各实验后还附有思考题并且教材最后还附有参考文献,便于学生扩展相关知识和能力。全书由4部分组成,即微生物工程常用理化分析,微生物工程菌株分离、选育及保藏,微生物工程工艺过程及优化,微生物工程产品实验;具体实验内容有发酵生产原材料分析,菌株分离,菌株选育和保藏,培养基配制和灭菌,小型发酵罐使用,发酵过程分析,发酵工艺优化,氨基酸、抗生素及酶制剂发酵和产物测定,微藻和动物细胞培养等31个实验,供不同学校、不同专业相关人员选择使用。

本实验教材编写人员的具体分工如下:实验1、实验2、实验3、实验4、实验5、实验21由福建师范大学黄鹭强编写,实验6、实验7、实验9、实验20由山东师范大学戴美学编写,实验8由上海海洋大学周颖越编写,实验10、实验11、实验12由福建师范大学王明兹编写,实验13、实验14、实验15、实验16、实验17由曲阜师范大学车程川和杨革编写,实验18、实验19由福建师范大学柯崇榕

编写,实验 22、实验 23 由福建师范大学舒正玉编写,实验 24、实验 25、实验 26 福建师范大学刘峰编写,实验 27 由福建师范大学陈必链编写,实验 28 上海海洋大学欧杰编写,实验 29、实验 30、实验 31 由福建师范大学张明凤。全书由陈必链、王明兹负责统稿和定稿。

本实验教材由多人共同编写,在写作风格、语言习惯等上难免存在差异,且编者的水平有限,不可避免存在疏漏和不足之处,欢迎专家、同行以及使用本教材的教师、学生和其他读者提供宝贵的批评、建议与具体的修改意见,以便再版时加以修改和补充。在编写本实验教材过程中,参考了许多国内外相关的教材和文献资料,引用了一些图表,在此向有关作者表示感谢!向为本教材的编写和出版提供指导、支持和帮助的各级领导、同行表达衷心的感谢!再次感谢科学出版社的大力支持!

陈必链 王明兹

2012年2月20日

陈必链 王明兹

陈必链 王明兹

陈必链 王明兹

陈必链 王明兹

陈必链 王明兹

陈必链 王明兹

陈必链 王明兹

陈必链 王明兹

陈必链 王明兹

陈必链 王明兹

陈必链 王明兹

陈必链 王明兹

陈必链 王明兹

陈必链 王明兹

陈必链 王明兹

陈必链 王明兹

陈必链 王明兹

微生物工程实验指导书 第四版

目 录

前言

第 1 部分 微生物工程常用理化分析

实验 1 含水量的测定	1
实验 2 蛋白质含量的测定	3
实验 3 碳水化合物含量的测定	6
实验 4 脂肪测定	9
实验 5 灰分测定	11
实验 6 生化指标糖、氮的分析测定	13
实验 7 生物量分析测定	18
实验 8 黏度的测定	22
实验 9 产物分析测定	26

第 2 部分 微生物工程菌株分离、选育及保藏

实验 10 产脂肪酶细菌分离	37
实验 11 放线菌分离及其生物活性测定	41
实验 12 植物内生真菌分离与分子鉴定	45
实验 13 淀粉酶产生菌的诱变育种	49
实验 14 酵母菌原生质体融合育种	53
实验 15 内切葡聚糖酶 III 基因的克隆及在毕赤酵母 SMD1168 中的表达	56
实验 16 产植酸酶酵母菌的基因组改组育种	64
实验 17 微生物工程菌种的保藏	66

第 3 部分 微生物工程工艺过程及优化

实验 18 发酵培养基制备	70
实验 19 发酵培养基优化	74
实验 20 实验室小型生物反应器的使用与培养基灭菌	81
实验 21 体积溶氧系数 $K_L\alpha$ 的测量	85

第 4 部分 微生物工程产品实验

实验 22	细菌脂肪酶发酵	88
实验 23	基因工程菌的发酵培养	92
实验 24	液体发酵法生产 L-色氨酸	96
实验 25	液体发酵法生产庆大霉素	103
实验 26	单细胞蛋白的生产	107
实验 27	紫球藻细胞的培养	110
实验 28	黄原胶的发酵、提取和测定	113
实验 29	动物细胞的传代培养和生长曲线的绘制(MTT 比色法)	117
实验 30	动物细胞的形态观察和计数	121
实验 31	动物细胞的冻存和复苏	124
参考文献		126
附录 I	盐酸标准溶液[$c(\text{HCl}) = 1 \text{ mol/L}$]	128
附录 II	兰-埃农法菲林试剂糖量表(兰-埃农法)	129

第 1 部分 微生物工程常用理化分析

实验 1 含水量的测定

【实验目的】

学习利用加热干燥法测定发酵原料的含水量。

【实验原理】

在 95~105℃下，发酵原料因不含有挥发性物质或含有其他挥发性物质，使得直接干燥失去物质的总量主要是水分。通过测定烘干前后样品的质量差异，即可获得样品含水量。

【实验仪器与材料】

玻璃称量瓶(铝盘)，玻璃棒，电热干燥箱，恒温水浴锅，电子天平。

石英砂，纯净水。

【实验步骤】

1. 样品质量

样品干燥后的残留物质量一般控制在 2~4 g。称样范围：固体、半固体样品，2~10 g；液体样品，10~20 g。

2. 样品制备

固体样品先磨碎、过筛，饼粉、淀粉等样品过 18 目筛；玉米浆、糖蜜等浓稠样品需加水稀释，或加入干燥助剂(如石英砂等)，糖浆稀释液的固形物质量分数应控制在 20%~30%。石英砂加量约为样品质量的 1~2 倍。

3. 样品测定

固体样品：将处理好的样品放入预先干燥至恒重的玻璃或铝制称量皿中，置于 95~105℃干燥箱，打开皿盖并斜支于瓶边，干燥 2~4 h 后，盖好皿盖取出，置于干燥器中冷却 0.5 h 后称重，再放入同温度的烘箱中干燥 1 h 左右，然后冷却、称重，并重复干燥至恒重。

半固体或液体样品：将 10 g 洁净干燥的石英砂及一根小玻璃棒放入蒸发皿中，在 95~105℃下干燥至恒重。然后准确称取适量样品，置于蒸发皿中，用小玻璃棒搅匀后放在沸水浴中蒸干(注意中间要不时搅拌)，擦干皿底后置于 95~105℃干燥箱中干燥 4 h，按上述操作反复干燥至恒重。

4. 计算

$$X = \frac{m_1 - m_2}{m_1 - m_0} \times 100$$

式中, X 为样品中水分的质量分数, %; m_1 为称量皿(或蒸发皿加海砂、玻璃棒)和样品的质量, g; m_2 为称量皿(或蒸发皿加海砂、玻璃棒)和样品干燥后的质量, g; m_0 为称量皿(或蒸发皿加海砂、玻璃棒)的质量, g。

【注意事项】

1. 干燥温度为 $100(\pm 5)^\circ\text{C}$, 干燥时间以干燥至恒重为准, 一般为 $4\sim 5\text{ h}$ 。水分测定的称重恒重是指前后两次称量样品的质量差不超过 2 mg 。

2. 物理栅是物料表面收缩和封闭的一种特殊现象。在烘干过程中, 有时样品内部的水分还来不及转移至物料表面, 表面便形成一层干燥薄膜, 以至于大部分水分留在物料内不能排除。加入石英砂可使样品分散、水分容易出去, 如无石英砂, 可用玻璃碎末代替。

3. 玻璃称量瓶适用于各种样品, 铝质称量皿不耐酸碱, 使用时应根据测定样品加以选择。称量皿的规格: 以样品置于其中, 平铺开后厚度不超过称量皿高度的 $1/3$ 为宜。

【思考题】

样品中的水分存在形式有哪些? 干燥过程主要除去哪一类水分?

(本实验建议 3 学时)

实验2 蛋白质含量的测定

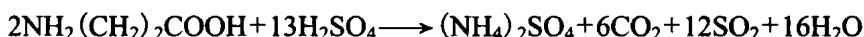
【实验目的】

学习利用微量凯氏定氮法测定发酵原料中的蛋白质含量。

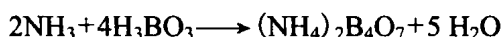
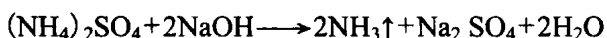
【实验原理】

含蛋白质样品用浓硫酸消化后,使有机氮转变为氨并与硫酸结合生成硫酸铵。然后加碱蒸馏使氨游离,用硼酸吸收游离氨后再以盐酸标准溶液滴定,根据酸的消耗量乘以换算系数,即为蛋白质含量。三步反应的反应式如下。

1. 消化



2. 蒸馏和吸收



3. 滴定



【实验仪器与材料】

硫酸铜,硫酸钾,硫酸,硼酸溶液(20 g/L),NaOH溶液($\rho=40\%$)。

混合指示剂:1份1 g/L甲基红乙醇溶液与5份1 g/L溴甲酚绿乙醇溶液用时混合。

盐酸标准溶液($c=0.05\text{ mol/L}$):用无水碳酸钠进行标定,参见附录I。

定氮蒸馏装置如图2-1所示。

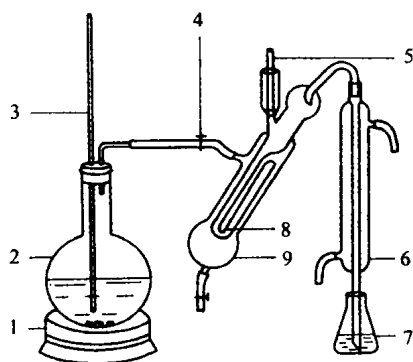


图 2-1 凯氏定氮蒸馏吸收装置示意图(刘长虹, 2006)

1.电炉;2.水蒸气发生器;3.安全管;4.弹簧夹;5.加样口及玻塞;6.冷凝管;7.氨吸收瓶;8.反应室;9.反应室夹层

【实验步骤】**1. 消化**

在通风橱中进行。准确称取 0.2~2 g 固体样品或吸取 10~20 ml 液体样品(约相当于含氮 30~40 mg)移入干燥的 500 ml 凯氏烧瓶中,加入 0.2 g 硫酸铜、3 g 硫酸钾及 20 ml 浓硫酸,摇匀后在瓶口放一小漏斗,并将瓶以 45°斜支于有小孔的石棉网上。先用文火小心加热,待内容物完全炭化、泡沫停止后逐渐加大火力,保持瓶内液体微沸,至瓶内液体呈蓝绿色澄清透明后再继续加热 0.5 h。

取下凯氏烧瓶,放冷后小心加入 20 ml 水。冷却至室温后,移入 100 ml 容量瓶中,用少量水分 2 次或 3 次,将烧瓶洗涤干净,洗液合并于容量瓶中,并用水稀释至 100 ml,摇匀备用。同样条件下做一试剂空白试验。

2. 蒸馏

按图 2-1 连接好定氮蒸馏装置,水蒸气发生器内装水至约 2/3 处,加甲基红指示剂数滴及数毫升硫酸,以保持水呈酸性,加玻璃珠数粒以防暴沸。调节好火力,煮沸水蒸气发生器内的水。取 10 ml 硼酸溶液(20 g/L)置于 100 ml 吸收瓶中,加混合指示剂 1 滴,将吸收瓶置于冷凝管下端,并用冷凝管下端插入液面下。吸取 10.0 ml 样品消化稀释液沿小玻璃杯流入反应室中,并用少量水冲洗小玻璃杯使流入反应室内。塞紧棒状玻璃塞,向小玻璃杯内加入 10 ml 氢氧化钠溶液($\rho=40\%$),提起玻璃塞,使氢氧化钠溶液缓慢流入反应室,立即塞紧玻璃塞,并在小玻璃杯中加水,使之密封,夹紧螺旋夹,通入蒸汽,蒸馏 5 min。移动接受瓶使冷凝管下端离开液面,再蒸馏 1 min,用少量水冲洗冷凝管下端外部,取下接收瓶。

3. 滴定

馏出液立即用盐酸标准溶液滴定至灰色(用甲基红-溴甲酚绿为指示剂时)或紫红色即为终点。滴定结果用空白实验校正。

4. 计算

$$X = \frac{(V_1 - V_0)c \times 0.014}{m \times (10/100)} \times F \times 100$$

式中, X 为样品中蛋白质的质量分数, % (或质量浓度, g/100 ml); V_1 为样品消耗盐酸标准溶液的体积, ml; V_0 为试剂空白消耗盐酸标准溶液的体积, ml; c 为盐酸标准溶液的浓度, mol/L; 0.014 为 1 ml 盐酸标准溶液($c=1$ mol/L)相当于氮的质量, g; F 为氮换算为蛋白质的系数, 根据所测样品, 花生饼粉为 5.5、大豆饼粉为 5.7、玉米粉为 6.2; m 为样品质量(或体积), g(或 ml)。

【注意事项】

1. 所用试剂配制均用不含氮的蒸馏水。
2. 消化时如不易得到澄清透明的溶液, 可将烧瓶放冷后缓缓加入过氧化氢

($\omega=30\%$) 2~3 滴, 以加速反应。

3. 若样品中含脂肪或糖分较多时, 消化的时间要长一些, 开始时温度不要太高, 消化过程中须时时摇动。

4. 实验前必须仔细检查蒸馏装置的各个连接处, 保证不漏气。所用橡皮管、塞需浸在氢氧化钠溶液(100 g/L)中, 煮沸 10 min, 然后水洗、水煮, 再用水洗数次以保证洁净。

5. 蒸馏过程切记火力稳定, 防止倒吸现象。

【思考题】

消化时加入硫酸钾和硫酸铜的作用是什么? 消化前加入氢氧化钠的作用是什么?

(本实验建议 6 学时)

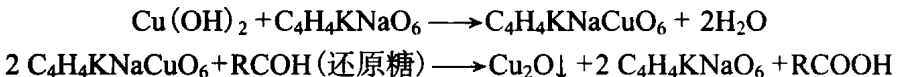
实验3 碳水化合物含量的测定

【实验目的】

学习用兰-埃农(Lane Eynon)法测定发酵原料中的糖含量。

【实验原理】

发酵原料样品除去蛋白质后，以亚甲蓝为指示剂，用样液直接滴定标定过的费林试液，达到终点时，稍微过量的还原糖即可将蓝色的亚甲蓝指示剂还原成无色，而显出氧化亚铜的鲜红色。反应式如下：



【实验仪器与材料】

1. 费林甲液

称取 34.639 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ，加适量水溶解，加 0.5 ml 硫酸，用水稀释至 500 ml，用精制石棉过滤。

2. 费林乙液

称取 173 g 酒石酸钾钠和 50 g NaOH 于适量水中溶解，用水稀释至 500 ml，用精制石棉过滤。

3. 精制石棉

石棉先用盐酸 $[\text{c}(\text{HCl})=3\text{ mol/L}]$ 浸泡 2~3 天，用水洗净，再用 NaOH 溶液(100 g/L)浸泡 2~3 天，倾去溶液，再用热的费林乙液浸泡数小时，以水洗至不呈酸性。然后加水振摇，使成细微的浆状纤维，用水浸泡并储存于玻璃瓶中。处理后的石棉用于填充古氏坩埚。

4. 甲基蓝(次甲基蓝)指示剂

称取 1 g 次甲基蓝，溶于 100 ml 纯水中。

5. 标准葡萄糖溶液

准确称取经 105℃干燥过的葡萄糖 0.5 g，置于小烧杯中，加水溶解后，转入 100 ml 容量瓶中，用水稀释至刻度。此标准溶液浓度为 5.0 mg/ml。

【实验步骤】

1. 标定费林试液

吸取费林甲液、乙液各 5 ml，置于 150 ml 锥形瓶中，加 10 ml 水，加入玻璃珠 2 粒，从滴定管加入标准葡萄糖液约 9.5 ml，用电炉加热使 2 min 内沸腾，加

亚甲蓝指示剂 2~3 滴, 趁沸以每 2 s 一滴的速度继续滴定至蓝色刚好褪去出现淡黄色为终点。记录消耗葡萄糖标准溶液的体积 (V_0), 平行操作三份, 取平均值。

每 10 ml 费林试液相当于还原糖的量 $f(\text{mg})$: $f=5V_0$ 。

2. 粗滴定

吸取费林甲液、乙液各 5 ml, 置于 150 ml 锥形瓶中, 加入 10 ml 水, 加入玻璃珠 2 粒, 加热在 2 min 内沸腾, 趁沸以先快后慢的速度滴加样品溶液, 待颜色变浅时, 加入亚甲蓝指示剂 2~3 滴, 趁沸以每 2 s 一滴的速度继续滴定至蓝色刚好褪去出现明亮颜色(如亮红色)为止。记录样液消耗体积。

3. 精密滴定

吸取费林甲液、乙液各 5 ml, 置于 150 ml 锥形瓶中, 加入 10 ml 水, 加入玻璃珠 2 粒, 从滴定管加入比粗滴定少 0.5~1 ml 的样品溶液, 加热使之在 2 min 内沸腾, 并维持沸腾 2 min。加入亚甲蓝指示剂 2~3 滴, 趁沸以每 2 s 一滴的速度继续滴定至蓝色刚好褪去为止, 记录样液消耗的体积, 平行操作三份取平均值。

4. 计算

$$X = \frac{f \times 250}{mV \times 1000} \times 100$$

式中, X 为样品中还原糖(以葡萄糖汁)的质量分数, % (或质量浓度, g/100 ml); f 为还原糖因素, 即与 10 ml 费林试液相当的还原糖量, mg; 250 为样品处理后的总体积, ml; V 为样品试液滴定量, ml; m 为样品质量(或体积), g(或 ml)。

【注意事项】

1. 实验要求控制在 2 min 内至沸, 可使用调压电炉先调节好火力, 同时注意控制总沸腾时间为 3 min。

2. 滴定过程中, 当亚甲蓝被还原糖还原至无色时, 表示到达终点。但当无色的亚甲蓝隐色体与空气接触后又会恢复原来的蓝色, 因此整个滴定过程必须在沸腾的溶液中进行, 液面覆盖着水蒸气, 以避免亚甲蓝与空气接触。

3. 费林试液宜采用标准葡萄糖液加以标定, 但若允许有 1%左右的误差, 则可省去标定步骤, 从专用的还原糖检索表中查出相应的还原糖因素 f 值(参见附录 II)。

4. 单糖在碱性条件下不稳定, 易发生异构化和分解反应, 因此调整样品提取液的酸度时, 若加入碱溶液过量, 应立即用盐酸回调至微酸性。糖提取液应除尽蛋白质。

5. 费林甲液、乙液需分开储存, 使用时再等量混合, 以免酒石酸钾钠铜络合物在碱性条件下慢慢分解析出氧化亚铜沉淀, 使有效浓度降低。

【思考题】

影响兰-埃农法测定糖的因素有哪些？滴定过程为何要在沸腾的溶液中进行？

(本实验建议 3 学时)

实验4 脂肪测定

【实验目的】

学习用索氏抽提法测定发酵原料中的脂肪含量。

【实验原理】

利用脂肪能溶于有机溶剂的性质，在索氏提取器中将样品用无水乙醚或石油醚等溶剂反复萃取，提取样品中的脂肪后，蒸去溶剂所得的物质即为脂肪或称粗脂肪。索氏抽提法所测得的脂肪为游离态脂肪。

【实验仪器与材料】

无水乙醚或石油醚，石英砂，滤纸筒，黄豆饼粉。

电热鼓风干燥箱。索氏抽提器，如图4-1所示。

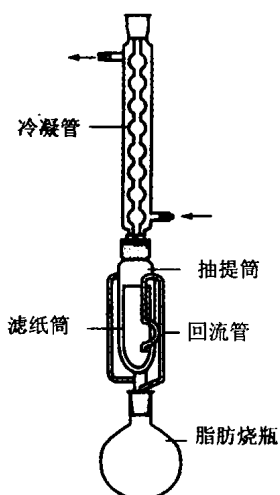


图4-1 索氏抽提器示意图(张水华, 2006)

【实验步骤】

1. 准确称取 2.0~5.0 g 颗粒均匀的黄豆饼粉(可取测定水分后的样品)，必要时拌以石英砂，装入滤纸筒内。
2. 索氏提取器的清洗。将索氏提取器各部位充分洗涤并用蒸馏水清洗后烘干。脂肪烧瓶在 $103(\pm 2)$ °C 的烘箱内干燥至恒重(前后两次称量差不超过 2.0 mg)。
3. 将滤纸筒放入索氏提取器的抽提筒内，连接已干燥至恒重的脂肪烧瓶，由