

河南省高等教育教学改革研究成果（2017SJGLX112）

# 发酵工程实验

主 编：赖颖 侯小歌 王永立

副主编：吕辉 李学思

周口师范学院

河南 周口

# 发酵工程实验

——周口师范院校企联合开发教材

**主 编：**赖 颖（周口师范学院）

侯小歌（周口师范学院）

王永立（周口师范学院）

**副主编：**吕 辉（莲花健康产业集团股份有限公司）

李学思（宋河酒业集团有限公司）

**编 委：**张 杰（周口师范学院）

朱 华（辅仁药业集团有限公司）

王俊丽（金丹乳酸科技股份有限公司）

李士伟（周口师范学院）

2019年10月

## 内容简介

《发酵工程实验》是生物工程专业重要的专业必修课之一。随着生物工程相关产业的发展，发酵工程处于越来越重要的地位。作为一门实验学科，生物技术领域所取得的每一个进步，都与实验技术的发展密切相关，细胞工程、酶工程、基因工程，最终都离不开菌种的发酵与产品的分离提取纯化。发酵工程实验既是生物工程的重要支撑课程之一，也是连接生物技术产业化的关键课程。

实验内容根据本校和相关发酵企业的具体实际进行安排。安排的思路是以最简洁有效的方式针对发酵过程的重要要素进行实验，便于学生对教学内容有个较好的认识，理顺学习思路，为进行社会科学实践打下良好基础。本书内容共包括四个方面的内容：第1篇，菌种的选育；第2篇，发酵工艺的优化；第3篇，发酵过程的放大；第4篇，功能性产品的生产。

通过发酵工程实验的学习，能够使学生掌握一定的发酵工程方面的实验基本原理、方法与技能，加深学生对理论知识的理解，并培养学生将理论与实践相结合，提高学生解决实际问题的能力；使学生掌握发酵工艺操作的具体过程、了解发酵行业的具体产品生产工艺，并能够对发酵生产和发酵过程进行分析，使学生进一步系统了解发酵工程从培养基配制到发酵生产的操作过程；使学生了解发酵罐（生物反应器）的基本结构，熟悉产品检测的方法、发酵条件的优化和特定菌种的分离和选育的过程。在授课过程中，融入思想政治教育内容，培养学生的科学精神、爱国情怀等。在发酵工程理论的指导下，培养学生协同合作和独立思考的能力，树立解决实际问题的思想，掌握简单的产品的发酵流程设计，同时也为后续专业课程的学习和应用奠定基础。通过实验任务设计，引导学生结合已掌握的书本知识，收集、整理相关资料，自主设计、积极创新，培养学生获取新知识的能力、创新意识以及独立学习的习惯。

## 前言

《发酵工程实验》是由周口师范学院生命科学与农学学院与实习就业单位宋河酒业、辅仁药业、金丹乳酸等企业联合，根据企业生产实际，在多年教学实践的基础上联合开发，在河南省高等教育教学改革研究实践项目《应用型人才培养综合改革的“六化、六制、六转变”探索实践——以地方高校为例》支持下完成的校本教材。教材由生科院校企联合实验室主要成员赖颖、侯小歌、王永立、张杰、李士伟等教师和企业 4 位工程师共同完成。最后由生科院教学副院长王红星审稿、主编和副主编共同协商统稿和定稿。在本书编写过程中得到学校教务处和学院领导的大力支持，在此特向这给位老师和领导表示感谢。

由于作者水平有限，书中遗漏错误或不妥之处在所难免，真诚欢迎专家、老师和同学们的批评指正，以便修订，并努力完善争取早日正式出版。

赖颖

2019年10月

# 目 录

<b>第 1 篇 菌种的选育</b> .....	<b>7</b>
实验一 菌种的初筛和复筛 .....	7
实验二 淀粉酶活力的测定 .....	17
实验三 蛋白酶活力的测定 .....	20
实验四 脂肪酶活力的测定 .....	23
实验五 抗生素效价的测定 .....	26
实验六 聚 $\gamma$ -谷氨酸含量的测定 .....	30
实验七 还原糖含量的测定 .....	32
实验八 紫外线诱变育种 .....	35
实验九 微波诱变育种 .....	38
实验十 超声波诱变育种 .....	41
实验十一 亚硝基胍诱变育种 .....	44
实验十二 菌种的保藏 .....	47
实验十三 菌种生长曲线和产物合成曲线的绘制 .....	49
<b>第 2 篇 发酵工艺的优化</b> .....	<b>52</b>
实验一 单因素实验 .....	52
实验二 正交优化试验 .....	55
实验三 相应法优化糖基化大豆分离蛋白制备工艺 .....	59
<b>第 3 篇 发酵过程的放大</b> .....	<b>64</b>
实验一 发酵罐的构造及操作 .....	64
实验二 发酵罐实罐灭菌操作 .....	67
实验三 利用 7 L 发酵罐对地衣芽孢杆菌进行补料分批发酵培养 .....	70
实验四 $K_La$ 的测定方法 .....	75
实验五 菌体生长动力学参数的求取 .....	78

<b>第4篇 功能性发酵产品的生产</b> .....	<b>81</b>
实验一 酸奶的制作与乳酸菌的活菌计数 .....	81
实验二 甜酒酿的制作 .....	84
实验三 低盐豆瓣酱的制作 .....	87
实验四 腐乳的制作 .....	90
实验六 中、西式泡菜的制作 .....	95
实验七 固态发酵实验—米曲霉的培养 .....	98
实验八 枯草芽孢杆菌固态发酵及活菌数测定 .....	101
实验九 淀粉糖化与酒精发酵 .....	104
实验十 米曲霉固体发酵生产纤维素酶及酶解底物反应 .....	107
实验十一 甘露聚糖酶液体发酵及酶解反应 .....	109
<b>参考文献</b> .....	<b>111</b>

# 第1篇 菌种的选育

## 实验一 菌种的初筛和复筛

### 一、实验目的与要求

1. 掌握培养基配置的具体过程和方法，使学生具备配置试剂和培养基的实验操作能力；
2. 掌握涂布平板法实验技术，使学生具备菌种分离纯化的基本实验技能；
3. 通过介绍我国工业产品的生产工艺从过去到现在的变化，增加学生的民族自豪感和爱国热情。

### 二、实验原理

工业微生物产生菌的筛选一般包括两大部分：一是从自然界分离所需要的菌株，二是把分离到的野生型菌株进一步纯化并进行代谢产物鉴别。在实验工作中，为使筛选达到事半功倍的效果，总的说来可从以下几个途径进行收集和筛选：

- (1) 向菌种保藏机构索取有关的菌株，从中筛选所需菌株。
- (2) 由自然界采集样品，如土壤、水、动植物体等，从中进行分离筛选。
- (3) 从一些发酵制品中分离目的菌株。

含微生物样品的采集：自然界含菌样品极其丰富，土壤、水、空气、枯枝烂叶、植物病株、烂水果等都含有众多微生物，种类数量十分可观。但总体来讲土壤样品的含菌量最多。典型的发酵产物来自微生物，土壤是微生物的大本营。生产菌株的选育源头都来自于自然界。如何从自然界中筛选目的微生物，可以根据目的微生物和产物的特性作为筛选条件，进行筛选提高筛选效率，从而有效的解决菌株从无到有的问题。通常可以将土壤稀释液涂在不同类型的培养基上，在适宜的环境中培养几天，细菌或者是其他的微生物便能在平板上生长繁殖，形成菌落。将初次筛选得到的微生物接到筛选培养基上培养，能够利用培养基中的特定成分来完成自身的生命活动，才能够生存。自然界含菌样品极其丰富，土壤、水、空气、枯枝烂叶、植物

病株、烂水果等都含有众多微生物，种类数量十分可观。但总体来讲土壤样品的含菌量最多。

土壤由于具备了微生物所需的营养、空气和水分，是微生物最集中的地方。从土壤中几乎可以分离到任何所需的菌株，空气、水中的微生物也都来源于土壤，所以土壤样品往往是首选的采集目标。一般情况下，土壤中含细菌数量最多，且每克土壤的含菌量大体有如下的递减规律：细菌（10<sup>8</sup>）>放线菌（10<sup>7</sup>）>霉菌（10<sup>6</sup>）>酵母菌（10<sup>5</sup>）>藻类（10<sup>4</sup>）>原生动物（10<sup>3</sup>），其中放线菌和霉菌指其孢子数。同时也可以从其他微生物富集地方（医院附近，废水等）采集样品。

淀粉酶是水解淀粉一类酶的统称，能将淀粉水解成糊精等小分子物质并进一步水解成麦芽糖或葡萄糖。淀粉酶分为  $\alpha$ -淀粉酶、淀粉 1, 4-麦芽糖苷酶（ $\beta$ -淀粉酶）、淀粉 1, 4-葡萄糖苷酶（糖化酶）和淀粉 1, 6-葡萄糖苷酶（异淀粉酶）等。主要来源于根霉、曲霉、青霉、芽孢等菌属。故在淀粉培养基上长出的菌便是淀粉产生菌。在培养基上滴碘液，淀粉被分解掉的部分不显现蓝色，出现透明圈，可以通过透明圈的大小来初步判断菌种产淀粉的能力。

产生胞外蛋白酶的菌株在牛奶平板上生长后，其菌落周围可形成明显的蛋白水解圈。水解圈与菌落直径的比值常被作为判断该菌株蛋白酶产生能力的初筛依据。不同类型的蛋白酶都能在牛奶平板上形成蛋白水解圈，细菌在平板上的生长条件和液体环境中生长的情况相差很大，因此在平板上产圈能力强的菌株不一定是碱性蛋白酶的高产菌株。

脂肪酶(Lipase)又名三酰甘油酯水解酶，能在油水界面催化三酰甘油酯水解，在有机相中催化酯化及转酯等反应。脂肪酶广泛存在于动物组织和微生物中，工业上主要采用微生物发酵制备和提取脂肪酶，并将其应用于食品加工、油脂水解、皮革绢纺原料脱脂、医药、化妆品、洗涤剂、生物柴油等领域。

抗生素是微生物的次生代谢产物，既不参与细胞结构，也不是细胞内的贮存性养料，对产生菌本身无害，但对某些微生物有拮抗作用，是微生物在种间竞争中战胜其他微生物保存自己的一种防卫机制。抗生素是一种生理活性物质。各种抗生素

一般都在很低浓度下对病原菌就发生作用，这是抗生素区别于其他化学杀菌剂的又一主要特点。各种抗生素对不同微生物的有效浓度各异，通常以抑制微生物生长的最低浓度作为抗生素的抗菌强度，简称有效浓度。有效浓度越低，表明抗菌作用越强。不同抗生素对不同病原菌的作用不一样。对某种抗生素敏感的病原菌种被称为此抗生素的抗菌谱。例如淡紫灰链霉菌（*Streptomyces lavadulae*）产生的卮立霉素只对少数病毒有医疗作用，对细菌、真菌和其他多数病毒都没有作用。广谱抗生素对多种病原菌有抗菌作用，例如青霉素对多种革兰氏阳性细菌都有良好药效，链霉素对多种革兰氏阳性和阴性细菌都有良好药效，对结核杆菌有特殊的疗效。青霉素是指从青霉菌培养液中提制的分子中含有青霉烷、能破坏细菌的细胞壁并在细菌细胞的繁殖期起杀菌作用的一类抗生素，青霉素在氢氧化钠介质中水解为具有还原性的青霉素噻唑酸后，在沸水加热的条件下，于 0.24mol/L 硫酸介质中，利用磷钼酸被还原为钼兰的水相显色反应，在 720nm 处测定其吸光值。青霉素为  $\beta$  内酰胺抗生素对革兰阳性菌及某些革兰阴性菌有较强的抗菌作用，金黄色葡萄球菌(金葡菌)、肺炎球菌、淋球菌及链球菌等对本品高度敏感；脑膜炎双球菌、白喉杆菌、破伤风杆菌及梅毒螺旋体也很敏感青霉素高活性的  $\beta$ -内酰胺环与敏感细菌胞浆膜上靶分子青霉素酶结合蛋白（penicillin binding protein,PBPs）结合，呈现抑制转肽酶的转肽作用，阻碍黏肽合成的交叉联结过程，造成细胞壁缺损，由于敏感菌体内渗透压高，使水分不断内渗以至菌体膨胀，促使细菌裂解而死。

由于石油资源的储量有限以及人类生存对环保、经济可持续发展的要求，来自生物质加工而成的生物可降解高分子材料的研究正成为当今世界各国竞相研究的热点。生物高分子材料不依赖于石油资源，不会产生传统化学合成高分子产生的高污染问题，是一类环境友好的新型高分子材料，在人们越来越关心自己生存环境的今天，它越来越受到人们的关注。聚氨基酸作为生物高分子材料的一个主要组成部分，在工农业生产中具有广阔的应用前景，如聚天冬氨酸（PASP）可作为防腐剂、阻垢剂、清洁剂、植物生长促进剂、矿物的分散剂、高吸水剂和药物载体，聚精氨酸（PAA）可用于农用保湿地膜、洗涤剂、废水处理剂，聚赖氨酸（ $\epsilon$ -PL）是新颖营

养型食品保鲜剂等。聚  $\gamma$ -谷氨酸 (Poly- $\gamma$ -glutamic acid;  $\gamma$ -PGA) 是微生物产生的一种胞外氨基酸聚合物, 是一种水溶性的新型生物高分子材料, 具有生物可降解性, 可食用且对人体和环境无毒害。可作为生物絮凝剂、增稠剂、加湿剂、药物载体、药物缓释剂、生物可降解纤维、高吸水性树脂、重金属吸收剂以及食品添加剂等广泛应用于食品工业、药物工业、化妆品工业及污水处理中, 是一种应用前景广阔的新型生物制品。微生物合成的聚  $\gamma$ -谷氨酸由于其多方面的优良性能和环保上的巨大优势, 近年来成为研究的热点。产  $\gamma$ -PGA 菌株在平板培养基上的菌落具有粘稠、可拉丝的特征, 因此, 可利用该特征筛选  $\gamma$ -PGA 产生菌株。从纳豆、豆瓣酱、豆豉、酱豆、腐乳等样品中, 经预处理、富集培养、平板筛选、共挑取粘稠有明显拉丝的菌株。对平板初筛得到的菌株, 进行摇瓶筛选, 一支接一瓶接种摇瓶发酵培养基, 装液量 30 mL/250 mL 三角瓶, 于 37 °C、180 r/min 振荡培养 48 h, 测定发酵液的外观粘度, 选择发酵液粘度大的菌株。经两轮摇瓶发酵初筛, 可以获得粘度相对较高聚  $\gamma$ -谷氨酸产生菌。

### 三、实验试剂、材料和仪器

#### (一) 培养基的配制

淀粉酶产生菌筛选培养基: 可溶性淀粉 2 g, NaCl 5 g, 牛肉膏 5 g, 蛋白胨 10 g, 琼脂 20 g, 水 1000 mL, 121 °C, 灭菌 20 min。

可溶性淀粉溶液配置问题: 0.2% 淀粉的配制: 用少量的 (20 mL) 蒸馏水将 2 g 的淀粉溶解, 加入已煮沸的 1000 mL 蒸馏水中。将其放在电炉上加热 1 min。冷却即可, 颜色为透明无色。

蛋白酶产生菌筛选培养基 (奶粉培养基): 牛肉膏 0.5 g, 蛋白胨 1 g, NaCl 0.5 g, 琼脂 2.0 g, 脱脂奶粉 3 g, 水 100 mL, pH 7.0~7.2。

脂肪酶产生菌筛选培养基: NaNO<sub>2</sub> 2.0 g、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.0 g、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5 g、FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.01 g、葡萄糖 30 g、蛋白胨 20 g、琼脂 20 g, 1000 mL 自然 pH 值。在固体培养基中加入 0.03 g/mL 的橄榄油, 灭菌后冷却至 50°C, 加入 0.01 g/L 灭菌的罗丹明 B 指示剂溶液, 制成平板。

种子培养基：在固体培养基中不加琼脂。

发酵液培养基：葡萄糖 20 g / L、橄榄油 30 g / L、 $K_2HPO_4$  1 g / L、NaCl 0.5 g / L、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.5 g / L、 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  0.5 g / L，自然 pH 值。

抗生素产生菌筛选培养基（高氏一号改良培养基）：可溶性淀粉 20 g，硝酸钾 1 g，氯化钠 0.5 g， $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$  0.5g， $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.5g， $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  0.01g，琼脂 20 g，水 1000 mL，终浓度为  $50 \times 10^{-5}$  重铬酸钾，pH7.2~7.4。配制时，先用冷水，将淀粉调成糊状，倒入煮沸的水中，在火上加热，边搅拌边加入其他成分，溶化后，补足水分至 1000 mL。112℃灭菌 20 分钟。改良高氏一号培养基（在原来配置的高氏一号琼脂培养基灭菌后，再分别加入青霉素终浓度为  $10^{-5}$ ， $10^{-4}$ ， $10^{-3}$  的药剂）。

聚  $\gamma$ -谷氨酸产生菌筛选培养基分离培养基 (g/L)：柠檬酸钠 16，谷氨酸钠 20，氯化铵 7，酵母膏 5， $K_2HPO_4$  0.5， $Mg SO_4 \cdot 7H_2O$  0.5， $Mn SO_4 \cdot H_2O$  0.1， $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  0.15， $FeCl_3 \cdot 6H_2O$  0.04，琼脂 18，pH 值 7.0。

斜面培养基 (g/L)：蛋白胨 10，酵母膏 5，氯化钠 10，琼脂 20，pH 值 7.0~7.2。

富集培养基 (g/L)：柠檬酸钠 16，谷氨酸钠 20，氯化铵 7，酵母膏 5， $K_2HPO_4$  0.5， $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.5， $MnSO_4 \cdot H_2O$  0.1， $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  0.15， $FeCl_3 \cdot 6H_2O$  0.04，pH 值 7.0。

摇瓶发酵培养基 (g/L)：柠檬酸钠 16，谷氨酸钠 20，氯化铵 7，豆粕粉 30， $K_2HPO_4$  0.5， $Mg SO_4 \cdot 7H_2O$  0.5， $Mn SO_4 \cdot H_2O$  0.1， $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  0.15， $Fe Cl_3 \cdot 6H_2O$  0.04，pH 值 7.0。

## (二) 试剂的配制

1. 卢氏碘液的配制：称取 KI，2.0 g，用 50 mL 去纯水溶解 KI，迅速称量 I<sub>2</sub>，0.5g 并加入 KI 溶液中，用纯水定容到 100 mL，搅拌溶解后保存在棕色瓶中，橡皮塞封口。

2. pH11 硼砂-NaOH 缓冲液：硼砂 19.08 g 溶于 1000 mL 水中；NaOH 4 g，溶于 1000 mL 水中，二液等量混合。

3. 2%酪蛋白：称取 2 g 干酪素，用少量 0.5 mol/L NaOH 润湿后适量加入 pH11

的硼砂-NaOH 缓冲液，加热溶解，定容至 100 mL，4 °C 冰箱中保存，使用期不超过一周。

### （三）实验材料

线绳，报纸，吸管，三角瓶，平皿，烧杯，量筒，酒精灯，火柴，记号笔，标签，吸耳球，铁架台，涂布器，封口膜，皮筋，玻璃球，试管架。

### （四）实验设备

培养箱，摇床，干燥箱，灭菌锅，超净工作台，冰箱，搅拌器。

## 四、实验内容

### （一）淀粉酶产生菌的初筛和复筛

1. 选定采土点后，铲去表土层 2-3 cm，取 3-10cm 深层土壤 10g，装进灭菌的牛皮纸袋内，封好袋口，并记录取样地点、环境及日期。土样采集后应及时分离，凡不能立即分离的样品，应保存在低温、干燥条件下。

2. 倒平板：点燃酒精灯，拿出 6 个培养皿平放于工作台上，用记号笔进行编号。将已消毒的溶解的培养基降温后，以无菌操作倒入有盖的培养皿，倒入 2/3 平皿。

3. 稀释涂布：以小组为单位进行稀释分离。每小组取土样 1 g，放入盛有 100 mL 蒸馏水并带有玻璃珠的锥形瓶中，摇振 20 min，使土样与水充分混合，使细胞分散。吸取 1 mL 于装有 9 mL 无菌水的试管中，逐步稀释至  $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$ 、进行涂布（用涂布器，每个梯度涂 2 个培养皿）。

4. 培养：30 °C 恒温培养 48 h 观察，进行复筛。

5. 产淀粉酶菌株的鉴定：挑选单菌落影印到无菌平板上，同时用签字笔对各单菌落在平板的底部标号。标记接种过的培养皿 30 °C 培养 24 h，取其中一个平板喷洒稀碘液，记录有水解圈的单菌落。与此对应找出合成淀粉酶的菌株。

6. 初筛结果分析：拿出培养好的平皿，喷洒卢氏碘液覆盖整个平皿，记录有水解圈的单菌落。数菌落的方法：菌落在平板上生长均匀而且数量较大的话，可以将平板平均分成四部分，计数其中一份面积内的菌落数 $\times 4$ ，便可估算整个平板上的

菌落总数。透明圈直径 (mm)，记录三个比透明圈较大的菌落并照相保存。用直尺画出十字，测量菌落和透明圈直径。

7. 接种：点燃酒精灯，挑取透明圈最大的菌落 1 环，接种于液体复筛培养基中。

8. 30 °C 恒温培养 48 h，摇床培养，140 r/min 进行复筛。培养好后，分离淀粉酶测定酶活。

### (二) 蛋白酶产生菌的初筛和复筛

将分离到的菌株分别接种到含脱脂奶粉的培养基上，置于 32 °C 培养 60 h，于室温下观察是否产生细胞外蛋白酶，分解培养基中的脱脂牛奶，进而产生肉眼可见的水解透明圈。结果表明，在接种的 23 株菌落中，共有 18 株产生胞外蛋白酶分解脱脂牛奶，形成肉眼可见的透明圈。从中筛选出 9 株水解圈与菌落直径比值较大的菌株。

### (三) 脂肪酶产生菌的初筛和复筛

土样：采自屠宰场含油脂较丰富的土壤，共 15 份。

初筛：采用稀释平板分离法进行初筛。取 1 g 土样装于有玻璃珠的 49 mL 无菌水三角瓶中，以 160 r / min 的转速振摇 30 min，用滤纸过滤到无菌空三角瓶中，制得悬液。然后依次梯度稀释至  $10^{-4}$ ，在无菌条件下，取 0.5 mL 稀释液涂布于固体培养基平板上，倒置于 29°C 培养箱中培养 48 h。

在固体培养基中加入 0.03 g / mL 的橄榄油，灭菌后冷却至 50°C，加入 0.01 g / L 灭菌的罗丹明 B 指示剂溶液，制成平板。用牙签将平板培养长出的单菌落分别转移至平板上，于 29°C 条件下培养 72 h，依据产生变色圈的先后和变色圈直径与菌落直径比值的大小分离筛选出脂肪酶活性高且产酶周期短的菌株，将这些单菌落接种于斜面培养基中培养，用于复筛。

复筛：挑取斜面孢子接种到种子培养基中，于 29 °C、160 r / min 摇床培养 48 h，再将种子液按 2% 接种量接种到发酵培养基中（250 mL 三角瓶中发酵液装液量为

50 mL)，经 29 °C、160 r / min 培养 72 h，离心，测上清液的酶活，根据酶活力大小确定出发高产菌株。

#### （四）抗生素产生菌的初筛和复筛

1. 分别从土壤中（将表层 5 cm 左右的浮土除去，取 5~25 处的土样 10~25，装入事先准备好的塑料袋内扎好，给塑料袋编号并记录地点、土壤质地、植被名称、时间及其他环境条件。一般样品取回后应马上分离，以免微生物死亡），废水（分别取流动处和静止处，并记录相关数据）

2. 称取土壤 1 g（或量取 1 ml 水样），放入 99 mL 无菌水的三角瓶中，振荡 10 min，即为稀释  $10^{-2}$  的土壤悬液。

3. 另取装有无菌试管 5 支，用记号笔编上  $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$ 、 $10^{-7}$ 。在每只试管中用无菌吸管加入 4.5mL 无菌水。

4. 取已稀释成  $10^{-2}$  的土壤液，振荡后静止 0.5 min，用无菌吸管吸取 0.5 mL 土壤悬液加入  $10^{-3}$  的无菌水的试管中，并在试管内轻轻吹吸数次，使之充分混匀，即成  $10^{-3}$  土壤稀释液。同法依次连续稀释至  $10^{-4}$ → $10^{-5}$ → $10^{-6}$  土壤稀释液。在土壤稀释过程中，应用一支吸管由浓到稀，稀释到底。

5. 平板涂抹：取无菌培养皿，将上述每种培养基平板底面标记稀释度，然后用无菌吸管从最后三种稀释度，即  $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$  和  $10^{-6}$  的试管中吸取 0.1 mL 对号放入平板上，用涂布器将稀释液在平板表面涂抹均匀。

6. 培养：将接种后的培养基静置 10 min 后，倒置于 28~30 °C 条件下培养 3~4 d，计数菌落，并计算出 1 g 土壤中放线菌的数量。（每毫升样品中微生物细胞数 = 每皿菌落平均数 \* 稀释倍数 \* 1 / 取样体积数）

7. 初筛：选取菌落生长良好，排布均匀的培养基，用接种环分别均匀（3 至 5 处）挑取培养基中的菌落，在无菌条件下分别接种于初筛培养基中，倒置于 28~30 °C 条件下培养 3~4 d。

8. 接种：选取经初筛后，生长状态良好的单菌落，在无菌条件下，用接种环挑取菌落接种于发酵培养基中，于 25 °C 培养 24 h。

9. 青霉素定性检测：标准样品制备：吸取青霉素标准溶液 1 mL 于试管中，加入 0.2 mol/L 的 Na(OH) 溶液 0.5 mL，1.0 mol/LH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 溶液 1.0 mL，5% 钼酸铵 2.0 mL，8%Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>1.0 mL，加入发酵培养基至 20 mL，摇匀，于沸水中加热 20 min。取出冷却，摇匀。

试验品制备：取出 0.2 mol/L 的 Na(OH)溶液 0.5 mL，1.0 mol/LH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 溶液 1.0mL，5% 钼酸铵 2.0 mL，8%Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.0 mL 于试管中，标号。加入经过发酵后的发酵培养基至 20 mL，摇匀，于沸水中加热 20 min。取出冷却，摇匀。

空白样品制备：取出加入 0.2 mol/L 的 Na(OH)溶液 0.5 mL，1.0 mol/LH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 溶液 1.0 mL，5% 钼酸铵 2.0 mL，8%Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>1.0 mL，加入发酵培养基至 20 mL，摇匀，于沸水中加热 20 min。取出冷却，摇匀。

分光检测：分别以空白样品和标准样品作为对照，在 720 nm 处测定吸光度。

#### （五）聚γ-谷氨酸产生菌的初筛和复筛

1. 样品预处理：取固体样品 2 g 放入装有 30 mL 无菌水的 250 mL 三角瓶中，震荡后静置 30 min，沸水浴煮沸 5 min。取上述样品 1 mL 接种到装有 30 mL 富集培养基的 250 mL 三角瓶中于 37 °C、180 r/min 摇床培养 24 h。

2. 平板筛选：将富集培养液，适当稀释后涂布平板，置恒温培养箱中 37 °C 恒温培养 24 h，挑取粘稠且有明显拉丝的单菌落。

3. 摇瓶初筛：30 mL 摇瓶发酵培养基装于 250 mL 三角瓶中，1 支接 1 瓶接入 1~2 环斜面菌种，37 °C、180 r/min 振荡培养 2 d 左右，测发酵液的粘度，选取粘度高的菌株进行复筛。

4. 摇瓶复筛：30 mL 摇瓶发酵培养基装于 250 mL 三角瓶中，1 支接 3 瓶接入 1~2 环斜面菌种，37 °C、180 r/min 振荡培养 2 d 左右，测发酵液的粘度，选取粘度高且稳定的菌株。

重点、难点：

筛选一株能够合成分解淀粉的微生物，菌株筛选的涂布平板法实验技术。

其他教学环节：

查阅资料：功能菌发酵生产工艺特性的研究的最新进展

## 五、实验结果

观察所有稀释倍数的菌落个数变化，是否出现单菌落和菌苔，选择三种淀粉酶产生菌的菌落特征写上。

表1-1 D/d值计算表

菌编号	菌落直径 (d)	透明圈直径 (D)	D/d 值
1			
2			
3			

## 六、作业和思考题

1. 倒平板过程中无菌操作需要注意什么？
2. 淀粉酶的可以分为几类？
3. 筛选过程中土样为什么要稀释几个不同梯度进行涂平板？
4. 在观察结果的过程中为什么要及时观察，否则会有什么的后果？
5. 总结在实验过程中你学到哪些知识？

## 实验二 淀粉酶活力的测定

### 一、实验目的与要求

1. 掌握淀粉酶定量测定的基本原理、方法和操作技能；
2. 掌握定量分析酶活力的实验技能，使学生具备分光光度计的使用技能；
3. 掌握标准曲线的绘制方法；
4. 通过介绍酶活力测定的改进策略，提高学生改革创新的新理念，并结合自身，做改革的创新的实践者。

### 二、实验原理

酶促反应速度大小可以作为酶活性的大小，也可以做为酶量的衡量标准，故可以从单位时间内一定条件酶促反应中底物的消耗量或产物的生成量来测定。本实验采用的快速比色法即利用一定量的淀粉被淀粉酶水解后，不能与碘显蓝色所需要的时间来确定其活性。该方法简单、快速、经济。该方法主要用于液化淀粉酶活力的测定。

### 三、实验试剂、材料和设备

#### （一）实验试剂的配制

##### 1. 原碘液

称取碘（I<sub>2</sub>）11 g，碘化钾（KI）22 g，用少量水使碘完全溶解，然后定容至500 mL，贮于棕色瓶中。

##### 2. 稀碘液

吸取原碘液2.00 mL，加碘化钾20 g，用水溶解并定容至500 mL，贮于棕色瓶中。

##### 3. 20g / L可溶性淀粉溶液

称取可溶性淀粉（以绝干计）2000 g。精确至0.001 g，用10 mL水调成浆状物。在搅动下缓缓倾入70 mL沸水中。然后，以20 mL水分几次冲洗装淀粉的烧杯，洗液并入其中，加热至完全透明，冷却，定容至100 mL。此溶液需要当天配制。

##### 4. 磷酸缓冲液（pH6.0）

称取磷酸氢二钠 ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ) 45.23 g、柠檬酸 ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) 8.07 g, 用水溶解并定容至1000 mL。配好后用pH计校正。

5. 乙酸的配置: 0.5 mol/L乙酸溶液

## (二) 仪器

分光光度计, 秒表, 恒温水浴 ( $60 \pm 0.2$ ), 试管25 mm $\times$ 2000 mm, 移液管 (1 mL, 2 mL, 5 mL, 10 mL)

## 四、实验内容

1. 标准曲线的制作:

(1) 将可溶性淀粉稀释成0.2%, 0.5%, 1%, 1.5%, 2%的稀释液;

(2) 取7支试管, 分别标号1-7, 在另外取7支试管对应标号, 备用。分别吸取0、0.2、0.5、1、1.5、2%浓度的淀粉稀释液2.0 mL加至试管中, 第7支试管加样品2 mL, 然后7支再加入磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液1.0 mL, 40℃水浴保温5 min;

(3) 加蒸馏水1 mL, 40℃保温30 min后加入0.5 mol/L乙酸10 mL;

(4) 吸取反应液1 mL, 加稀碘液10 mL, 混匀, 在660 nm下测得吸光度A;

(5) 以淀粉浓度为横坐标, 吸光度为纵坐标, 作标准曲线。

2. 酶活测定

测得7号吸光度 $A_{660}$ , 从标准曲线中查出相应的淀粉浓度, 求出被酶消耗的淀粉量。

## 五、实验结果

1. 绘制标准曲线并打印出来粘与实验报告纸上, 标准曲线上应该带有公式和 $R^2$ 。

2. 酶活力以每毫升粗酶液在40℃, pH6.0的条件下每小时所分解的淀粉毫克数来衡量。(包括计算过程)

## 六、作业和思考题

1. pH6缓冲液的作用? 每个试管于40℃水浴准确保温5 min的作用?

2. 40 °C 反应 30 分钟后为什么要加入乙酸?
3. 酶活力测定的方式方法有哪些?
4. 淀粉酶的有多少种类?
5. 分光光度计如何使用和保养?

表 1-2 液化性淀粉酶活力测定表

管号	1	2	3	4	5	6	7
淀粉稀释液/mL	2	2	2	2	2	2	2
磷酸缓冲液 ( pH6.0 ) /mL	1	1	1	1	1	1	1
	40 °C 水浴保温 5 min;						
蒸馏水/ mL	1	1	1	1	1	1	0
粗酶液/ mL	0	0	0	0	0	0	1
	40 °C 保温 30 min						
0.5mol/l 乙酸/ mL	10	10	10	10	10	10	10
	吸取上述反应液体 1 mL 加入对应编号的另外 7 支试管中						
稀碘液/ mL	10	10	10	10	10	10	10
吸光度 $A_{660}$							

## 实验三 蛋白酶活力的测定

### 一、实验目的与要求

1. 了解蛋白酶活力测定的原理;
2. 掌握蛋白酶活力测定的方法。

### 二、实验原理

福林-酚试剂在碱性条件下可被酚类化合物还原呈蓝色(钼蓝和钨蓝混合物), 由于蛋白质分子中有含酚基的氨基酸(如酪氨酸、色氨酸等), 可使蛋白质及其水解产物呈上述反应。因此可利用此原理测定蛋白酶活力。通常以酪蛋白为底物, 在一定 pH 值和温度条件下, 同酶液反应, 经一段时间后终止酶促反应, 经离心或过滤除去酪蛋白沉淀物后取上清液, 用  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  碱化, 再加入福林-酚试剂显色, 蓝色的深浅与滤液中生成产物酪氨酸量成正比;酪氨酸含量用分光光度计在 680 nm 波长处测定, 从而计算出蛋白酶的活力。

### 三、实验试剂、材料和设备

1. 福林-酚试剂: 向 2000mL 的磨口回流瓶中加入 100g 钨酸钠( $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )、25g 钼酸钠及 700mL 的去离子水, 再加入 50mL85%的磷酸及浓盐酸 100mL, 充分混合后, 接上回流冷凝管, 以文火回流 10h, 结束后再加入 150g 的硫酸锂( $\text{LiSO}_4$ )、50mL 去离子水及数滴溴水, 再继续沸腾 15min, 以驱除过量的溴, 冷却后滤液呈黄绿色(如仍呈绿色, 需再重复滴加溴水的步骤), 加去离子水定容至 1000mL 后, 过滤, 滤液置于棕色试剂瓶中, 贮于冰箱中可长期保存备用。此溶液使用时可按 1:3 比例用去离子水稀释。

2. 0.4mol/L 三氯乙酸(TCA)溶液

精确称取 TCA65.4 g, 加去离子水定容至 1000 mL。

3. 0.4mol/L 碳酸钠溶液

精确称取无水碳酸钠 42.4 g, 加去离子水溶解后, 定容至 1000 mL。

4. 氢氧化钠溶液  $c(\text{NaOH})=0.5 \text{ mol/L}$

5. 盐酸溶液  $c(\text{HCl})=1\text{mol/L}$  及  $0.1\text{mol/L}$

6. 磷酸缓冲液( $\text{pH}=7.5$ ), 适用于中性蛋白酶

称取磷酸氢二钠( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ) $6.02\text{g}$  和磷酸二氢钠( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) $0.5\text{g}$ , 加水溶解并定容至  $1000\text{mL}$

7.  $10\text{g/L}$  酪素溶液

称取酪素  $1.000\text{g}$ , 精确至  $0.001\text{g}$ , 用少量  $0.5\text{mol/L}$  氢氧化钠溶液湿润后, 加入适量的各种适宜  $\text{pH}$  的缓冲溶液约  $80\text{mL}$ , 在沸水浴中边加热边搅拌, 直至完全溶解, 冷却后, 转入  $100\text{mL}$  容量瓶中, 用适宜的  $\text{pH}$  缓冲溶液稀释至刻度。此溶液在冰箱内贮存, 有效期为三天。

8.  $100\text{ }\mu\text{g/mL}$  酪氨酸溶液:

精确称取  $0.100\text{g}$  酪氨酸, 逐步加入  $1\text{mol/L}$  盐酸  $6\text{mL}$  溶解后, 用  $0.1\text{mol/L}$  盐酸定容至  $100\text{mL}$  得  $1\text{mg/mL}$  酪氨酸溶液, 取此溶液  $10\text{mL}$ , 用  $0.1\text{mol/L}$  盐酸定容到  $100\text{mL}$ , 放入  $4$  度冰箱中保存。

9. 设备: UV1000 分光光度计、恒温水浴锅、量筒、容量瓶、漏斗、试剂瓶、移液枪、吸管、离心管、枪头、摇床。

#### 四、实验内容

1. 标准曲线的制作

表1-3 标准曲线的制作表

管号	酪氨酸标准溶液的浓度 $\mu\text{g/mL}$	取 $100\text{ }\mu\text{g/mL}$ 酪氨酸 $\text{mL}$	取去离子水 $\text{mL}$	加碳酸钠溶液 $\text{mL}$	加福尔马林 $\text{mL}$	测定 OD 值
0	0	0.0	1.0	5.00	1.00	0
1	10	0.1	0.9	5.00	1.00	
2	20	0.2	0.8	5.00	1.00	
3	30	0.3	0.7	5.00	1.00	
4	40	0.4	0.6	5.00	1.00	
5	50	0.5	0.5	5.00	1.00	

2. 加完之后, 置于  $40\text{ }^\circ\text{C}$  水浴中显色  $20\text{min}$ , 取出, 用分光光度计于波长  $680\text{nm}$ ,  $10\text{mm}$  比色皿, 以不含酪氨酸的对照管为空白, 分别测定其吸光度值。以吸光度值

A 为纵坐标，酪氨酸的浓度 C 为横坐标，绘制标准曲线，计算出 OD<sub>680</sub>=1 时的浓度，即为吸光常数 K 值。

## 五、实验结果

根据酶活力公式，计算蛋白酶的活力。

酶活力计算公式：

$$X=A \times K \times 4 / 10 \times n$$

式中：X——样品的酶活力，U/mL；

A——样品平行试验的平均吸光度；

K——吸光常数；

4——反应试剂的总体积，mL；

10——反应时间 10 min，以 1 min 计；

n——稀释倍数。所得结果为整数。

## 六、作业和思考题

1. 蛋白酶有哪几类？
2. 影响酶活力的因素有哪些？
3. 使用紫外分光光度计时应注意哪些问题？

## 实验四 脂肪酶活力的测定

### 一、实验目的与要求

1. 了解脂肪酶活力测定的原理；
2. 掌握脂肪酶活力测定的方法。

### 二、实验原理

碱性脂肪酶可将甘油酯（油、脂）水解，在不同阶段可释放出脂肪酸、甘油二酯、甘油单酯及甘油。水解生成的脂肪酸，可以用标准的碱溶液滴定，以滴定值表示酶活力。

反应式为： $\text{RCOOH} + \text{NaOH} \longrightarrow \text{RCOONa} + \text{H}_2\text{O}$

### 三、实验试剂、材料和设备

#### （一）试剂的配制

1. 0.05 mol/L Gly-NaOH 缓冲液（pH9.4）

A 液：0.2 mol/L NaOH，称取 NaOH（A.R）8.0 g，用蒸馏水定容至 1000 mL；

B 液：0.2 mol/L Gly，称取甘氨酸 15.014 g，用蒸馏水定容 1000 mL；

使用前取 A 液 16.8 mL + B 液 50 mL，加部分蒸馏水稀释，再用酸度计调节 pH 至 9.4，定容到 200 mL。

2. 橄榄油

分析纯。

3. 4% 聚乙烯醇（PVA）溶液

称取聚乙烯醇 40 g（聚合度 1750+50），加 1000 mL 0.05 mol/L pH 9.4 Gly - NaOH 缓冲液，沸水浴完全溶解后，冷却，必要时过滤，溶解过程中蒸发的水分要用蒸馏水补充，定容至 1000 mL。

4. 乙醇

含量在 95 % 以上，为分析纯。

## 5. 0.01 mol/L NaOH

称取0.40 g A.R的NaOH，溶于新制备的冷却蒸馏水中并定容至1000 mL，置冰箱。取分析纯邻苯二甲酸氢钾（A.R）少量于称量瓶中，105℃烘干至恒重（约2小时），然后称取4份，每份各0.600 g，分别放入4个100mL容量瓶中，加蒸馏水定容至刻线，溶解后，分别取10mL至4个250mL的三角瓶中，各取加入40 mL蒸馏水，摇允后，加三滴1 %酚酞，用待标定的NaOH溶液滴定至微红，即为终点。

## 6. 乳化液的制备

取4 % PVA 溶液 100 mL，加入橄榄油 50 mL，在5℃~10℃冰箱放置1~2小时，然后用均质机乳化（外包冰块），转速10000转/分，一次乳化3分钟，每次乳化间隔时间为3分钟，共4次12分钟，立即使用，如不马上使用，要立即放入冰箱（乳化液在冰箱保存，仅限当天使用），每次使用前必须乳化3分钟。

### （二）仪器设备

乳化容器，组织捣碎机，震荡恒温水浴锅，液晶式酸度计，多头磁力搅拌器

## 四、实验内容

称取固状酶粉1 g,精密称定,用50 mL20℃pH9.4Gly -NaOH 缓冲液浸提，摇10分钟，定容至100 mL，再浸提30分钟，每隔10分钟摇一次，静置取上清液。再进行下一步稀释，稀释倍数：以样品与对照消耗碱量之差在4.5 mL~6.5 mL 范围内。

测定：取100 mL三角瓶4只，其中2只是试样，2只是空白照，每杯中的组成液为：4.0 mL 缓冲液（pH9.4），5.0 mL 橄榄油乳化液，1.0 mL 酶液。以上除酶液以外的组成液置于36℃水浴锅预热5分钟，然后精确加入1 mL 酶液，精确计时，缓慢振荡（80次/分钟），保温10分钟，立即加入95 %酒精20 mL，取出，加入10mL30 %的氯化钠溶液，摇匀，使之破乳约1分钟。并同时做空白对照，对照同样品一样，先预热5分钟（不振荡），保温10分钟，立即加入20 mL，95 %酒精灭活过的1mL酶液。

用0.01 mol/LNaOH 滴定样品至空白溶液的pH。滴定前应将PH计的电极在测试液中浸泡待PH计读数稳定后测。反应后的样品应在半小时内完成滴定。

## 五、实验结果

同时做三份平行，结果取平均值，所得结果表示至整数，平行试验相对误差不得超过 5.0%。

$$X = V \times C(\text{NaOH}) \times 1/10 \times n \times W \times 1000 \text{----- (A2)}$$

式中：

X ——样品的酶活力，单位为（u/g 或 u/mL）；

V ——滴定样品时消耗标准 NaOH 溶液的体积，单位为（mL）；

C(NaOH)——氢氧化钠的浓度,单位为(mol/L)

1/10 ——反应时间 10min，以 1 min 计；

n ——稀释倍数；

W ——换算系数，值为 8.5；

## 六、作业和思考题

1. 什么是乳化？
2. 脂肪酶活力测定的过程有哪些关键步骤？

## 实验五 抗生素效价的测定

### 一、实验目的与要求

1. 了解抗生素效价测定的原理；
2. 掌握抗生素效价测定的方法。

### 二、实验原理

管碟法是利用抗生素在摊布特定试验菌的固体培养基内呈球面形扩散，形成含有一定浓度抗生素球形区，抑制了试验菌的繁殖而呈现出的透明抑菌圈。此法系根据抗生素在一定浓度范围内，对数剂量与抑菌圈面积呈线性关系，通过比较标准品与供试品产生抑菌圈的大小，计算出供试品的效价。

抑菌圈的形成：两种互动作用：一种是抗生素溶液向培养基内呈球面状扩散作用；另一种是试验菌的生长作用。当培养到一定时间，琼脂培养基中的两种互动作用达到动态平衡时，琼脂培养基中便形成透明的抑菌圈。即：在抑菌圈中因抗生素浓度高于抑菌浓度，试验菌生长受到抑制，此处琼脂培养基成透明状；在抑菌圈边缘抗生素浓度恰好等于抗生素最低抑菌浓度。

### 三、实验试剂、材料和设备

#### （一）试剂的配制

磷酸盐缓冲液（pH6.0）取磷酸氢二钾 2g 与磷酸二氢钾 8g，加水使成 1000mL，滤过。

磷酸盐缓冲液（pH7.0）取磷酸氢二钠（ $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ）9.39g 与磷酸二氢钾 3.5g，加水使成 1000mL，滤过。

磷酸盐缓冲液（pH7.8）取磷酸氢二钾 5.59g 与磷酸二氢钾 0.41g，加水使成 1000mL，滤过。

#### （二）仪器设备

牛津杯：内径（ $6.0 \pm 0.1$ ）mm，高（ $10.0 \pm 0.1$ ）mm，外径（ $7.8 \pm 0.1$ ）mm，重量差异不超过  $\pm 0.01\text{g}$ ，光洁平坦。



图 1-1 牛津杯图示

培养皿、钢管、刻度吸管清洗后 160℃干热灭菌 2 小时或 121℃高压蒸汽灭菌 30min，放置室温备用；陶瓷瓦盖要定期清洗干燥。

#### 四、实验内容

##### 1. 预试验

确定最佳的试验条件：调整试验菌的浓度、使用量、抗生素终浓度、培养基等，使抑菌圈的大小符合规定：高剂量浓度溶液所致的抑菌圈直径在 18~22mm。高剂量与低剂量的抑菌圈直径之差最好不小于 2mm。

高低剂量之比为 2:1（如高、低剂量所致的抑菌圈差别较小时，可用 4:1 的剂量比率）。

##### 2. 称量

称量前，将标准品从冰箱取出，使与温室平衡；供试品应放于干燥器内至少 30min 方可称取。供试品与标准品应用同一天平；吸湿性较强的抗生素，在称量前 1~2 h 更换天平内干燥剂。标准品与供试品的称量最好一次取样称取，不得将已取出的标准品或供试品倒回原容器内，标准品称量不可少于 20mg，取样后立即将称量瓶及被称物盖好，以免吸水。样品的称样量最好不少于 50mg。

##### 3. 稀释操作应遵照容量分析的操作规程

从冰箱中取出的标准溶液，必须先室温放置，使其温度达到室温后，方可量取。标准品与供试品溶液的稀释应采用容量瓶，每步稀释，取样量不得少于 2mL 为宜，稀释步骤一般不超过 3 步。举例：取浓溶液 1000u/mL。第一步取 5mL

(1000U/mL) →50mL 容量瓶→100U/mL; 第二步取 5mL (100u/mL) →50mL 容量瓶→10U/mL (H); 取 5mL (100U/mL) →100mL 容量瓶→5U/mL (L)。

每次吸取溶液用刻度吸管, 量取溶液前要用被量液流洗吸管 2~3 次, 吸取样品溶液后, 用滤纸将外壁多余液体擦去, 从起始刻度开始放溶液。稀释标准品与供试品用的缓冲液应同一批和同瓶, 以免因 pH 或浓度不同影响测定结果。稀释时, 每次加液至容量瓶近刻度前, 稍放置片刻, 待瓶壁的液体完全流下, 再准确补加至刻度。

4. 双碟的制备: 在半无菌室内进行, 应注意微生物及抗生素的污染, 培养基应在水浴中或微波炉中融化, 避免直火加热。

用灭菌大口吸管 (20mL) 或其他灭菌分装器, 吸取已融化的培养基 20mL 注入双碟内, 等凝固后更换干燥的陶瓦盖, 放于 35~37℃培养箱中保温, 使易于摊布菌层。

取出试验用菌悬液, 按已试验的菌量做为标准品溶液, 高浓度所致的抑菌圈直径在 18~22 mm; 用灭菌吸管吸取菌悬液加入已融化并保温在水中(一般细菌 48~50℃, 芽孢可至 60℃)的培养基内, 摇匀, 做为菌层用。用灭菌大口 10 mL 吸管或其他分装器, 吸取培养液 5 mL, 均匀摊在底层培养基上, 置于水平台上并用陶瓦圆盖覆盖, 放置 20~30 min, 待凝固, 备用。

## 五、实验结果

1. 试验记录: 应包括抗生素的品种、剂型、标示量、生产厂、批号、检查目的、检验依据、检验日期、温度、湿度, 标准品与供试品的称量、稀释步骤与核对人, 抑菌圈测量结果。当用游标卡尺测量抑菌圈直径时, 应将测试数据以框图方式顺双碟数记录。当用测量仪测量面积或直径时, 应将电脑测试、计算、统计分析的打印纸贴附于记录中。

### 2. 结果判断

可靠性测验结果认为可靠, 方可进行效价和可信限率计算。

可信限率 考核实验的精密度, 除药典各论另有规定外, 本法的可信限率不得超过

5%。上述各项规定都能符合者，试验结果成立。实验计算所得效价低于估计效价的90%或高于估计效价的110%，则检验结果仅作为初试，应调整供试品估计效价，予以重试。效价测定一般需双份样品，平行实验以便核对。对不符合规定的样品应至少有2次符合规定的结果，才能发出报告。

## 六、作业和思考题

1. 管碟法测定有哪些关键步骤？
2. 抗生素效价的测定还有哪些方法？

### 注意事项

1. 浓度比不等于 1.000 时，如标准品溶液 (S) 的浓度为 1005u/mL, 而供试品溶液(T)的浓度 995u/mL,  $D=S/T=1.0101$ ；也可将 D 值设为 1.000，而估计效价设为 101.01%。b、所测定的实际效价应在 D 值与估计效价乘积的 90% 和 110% 范围内，超出就应重新估计效价。如估计效价为 100%， $D=1.000$ ，而测得的效价为 115%，按 110% 重估效价再进行试验。

2. 原料及不合格供试品，进行平行试验，配置两份标准品和两份供试品，一份标准品与一份供试品为一组滴样。

## 实验六 聚 $\gamma$ -谷氨酸含量的测定

### 一、实验目的与要求

掌握聚 $\gamma$ -谷氨酸含量的测定的原理和方法

### 二、实验原理

聚 $\gamma$ -谷氨酸作为一种可生物降解、对环境和人体无害、可用微生物发酵生产的高分子聚合物,随着生产和应用的不断深入,愈来愈显现出广阔的应用前景,如在医药领域可作为药物载体、粘合剂、医药用高分子材料;食品领域可作为膳食纤维、保健食品、食品增稠剂、安定剂等;农业领域可作为高吸水树脂、肥料增效剂而用于改良土壤,促进农作物生长;工业领域则作为生物絮凝剂、重金属吸附剂、螯合剂而用于废水处理,还可作为滤膜材料、耐热塑料、保湿材料等。目前,聚 $\gamma$ -谷氨酸及其盐的测定,常用氨基酸分析仪、凝胶色谱法、柱前衍生高效液相色谱法等。笔者研究了将聚 $\gamma$ -谷氨酸酸水解成谷氨酸的水解条件,并研究了谷氨酸与四氯对苯醌(TCBQ)发生络合反应形成络合物的条件,建立了一种紫外分光光度法测定聚 $\gamma$ -谷氨酸含量的方法,结果令人满意。

### 三、实验试剂、材料和设备

#### (一) 溶液配制

四氯对苯醌(TCBQ)溶液:  $2.50 \times 10^{-3}$  mol/L。准确称取 0.0312 g TCBQ,加无水乙醇稀释定容至 50 mL。硼砂储备液: 硼酸根浓度为 0.20 mol/L。准确称取 1.9072 g 硼砂,加水稀释定容至 100 mL; NaOH 储备液: 0.20 mol/L。准确称取 0.4000 g NaOH,加水稀释至 50 mL。硼砂-NaOH 缓冲溶液: pH 9.6, 硼酸根浓度为 0.05 mol/L。量取 50 mL 硼砂储备液和 23 mL NaOH 储备液,加水稀释至 200 mL。所用水均为双蒸水。

#### (二) 试剂

四氯对苯醌(TCBQ)、硼砂、氢氧化钠、盐酸等均为分析纯

#### (三) 设备

FA1004 型电子分析天平(上海天平仪器总厂), DK-98 -1 型电热恒温水浴锅(天津市泰斯特仪器有限公司), TU-1810 型紫外可见分光光度计(北京谱析通用仪器有限公司), 聚谷氨酸对照品(Sigma 公司), 聚谷氨酸样品(台湾味丹企业股份有限公司)。

#### 四、实验内容

取聚  $\gamma$ -谷氨酸对照品, 准确称取 50 mg, 按样品处理和测定方法操作至精密量取 5 mL 于 50 mL 容量瓶中, 加水稀释至刻度, 混匀后, 精密量取 0.80, 0.90, 1.00, 1.10, 1.20 mL, 分别置于 10 mL 比色管中, 配制质量浓度分别为 8、9、10、11、12 g/mL, 在波长 350 nm 处测定吸光度 A, 并绘制工作曲线。

准确称取聚  $\gamma$ -谷氨酸样品约 50 mg, 置于 25 mL 蒸馏瓶中, 加 6 mol/L 盐酸 4 mL, 溶解后, 于 110 油浴中加热回流 12 h, 取出放冷后, 全部转移至 50 mL 容量瓶中, 用水稀释至刻度, 混匀。精密量取 5 mL 于 50 mL 容量瓶中, 加水稀释至刻度, 混匀。精密量取 1 mL 于 10 mL 比色管中, 加入硼砂溶液 4.0 mL, 加入 TCBQ 溶液 1 mL, 用水稀释至刻度, 摇匀, 置 60 水浴中 60 min, 流水冷却至室温, 以试剂空白为参比, 按紫外分光光度法在波长 350 nm 处测定吸光度 A。取聚  $\gamma$ -谷氨酸对照品同法测定, 利用对照品法计算聚  $\gamma$ -谷氨酸的含量。

#### 五、实验结果

计算聚  $\gamma$ -谷氨酸的含量。

#### 六、作业和思考题

简述本实验的络合反应过程。

## 实验七 还原糖含量的测定

### 一、实验目的与要求

1. 学习和掌握发酵过程中的取样操作。
2. 了解还原糖的各种测定方法；掌握 DNS 法测定的操作方法

### 二、实验原理

单糖和某些寡糖含有游离的醛基或酮基，有还原性，属于还原糖；而多糖和蔗糖等属于非还原性糖。还原糖在碱性条件下加热被氧化成糖酸及其他产物，3,5-二硝基水杨酸则被还原为棕红色的 3-氨基-5-硝基水杨酸。在过量的 NaOH 碱性溶液中此化合物在 540 nm 处有最大吸收，在一定浓度范围内还原糖的量与光吸收值呈线性关系，利用比色法可测定样品中还原糖的含量

### 三、实验试剂、材料和设备

#### （一）试剂的配置

标准葡萄糖溶液（1.0mg/mL）：准确称取干燥恒重的葡萄糖 100mg，溶于蒸馏水并定容至 100 mL，混匀，4 °C 冰箱中保存备用。

3,5-二硝基水杨酸（DNS）试剂：将 6.3g DNS 和 262mL 2mol/L NaOH 溶液，加到 500mL 含有 185g 酒石酸钾钠的热水溶液中，再加 5g 结晶酚和 5g 亚硫酸钠，搅拌溶解，冷却后加蒸馏水定容至 1000mL，存储于棕色瓶中备用。

#### （二）设备

分光光度计，水浴锅，电子分析天平，电炉，容量瓶（100mL×1），玻璃漏斗，量筒，研钵和三角烧瓶。

### 四、实验内容

#### 1. 葡萄糖标准曲线的绘制

取 9 只定糖管（有盖子，且用绳子系住），分别按照下表 1 的顺序加入各种试剂，沸水浴中加热 5min，后立即流动水冷却。

管内溶液混匀，用空白管溶液调零点，520nm 测定光密度值(O.D.)，以葡萄糖含量为横坐标，光密度值为纵坐标绘制葡萄糖溶液标准曲线。

表 1-4 制作葡萄糖标准曲线时各试剂用量

项目	CK	1	2	3	4	5	6	7	8
含糖总量(mg)	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	1.2	1.4	1.6
葡萄糖液(mL)	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	1.2	1.4	1.6
蒸馏水(mL)	2.0	1.8	1.6	1.4	1.2	1.0	0.8	0.6	0.4
DNS 试剂(ml)	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
加热	均在沸水浴中加热 5min								
冷却	立即用流动冷水冷却								
用蒸馏水补足到(mL)	10	10	10	10	10	10	10	10	10
光密度(540nm)									

## 2. 发酵液的取样

按照发酵罐取样的操作规程取样，并用洁净的三角瓶盛放。

## 3. 发酵液检测样品的制备

取一定体积的发酵液在 12000rpm 下离心去除产菌体。准确量取 5mL 发酵上清液（视含糖量高低而定，在发酵周期内不同时期取样数量应有所不同）于 100mL 容量瓶中，加入 10mL 10%ZnSO<sub>4</sub> 溶液，用碱液（NaOH 3mol/L）调节显碱性，以水稀释至刻度、摇匀；通过干燥滤纸过滤。按照表 2 加入相应试剂进行反应。520nm

表 1-5 发酵液所含还原糖的测定

项目	CK	1	2	3
发酵液(mL)	0	0.8	0.8	0.8
蒸馏水(mL)	2.0	1.2	1.2	1.2
DNS 试剂(ml)	1.5	1.5	1.5	1.5
加热	均在沸水浴中加热 5min			
冷却	立即用流动冷水冷却			
补足蒸馏水(mL)	10	10	10	10
光密度(540nm)				

测定光密度值，最后根据葡萄糖标准曲线算出发酵液所含还原糖的量。每管测定三次，求平均值。

## 五、实验结果

计算还原糖含量。

## 六、作业和思考题

1. 如果在测定过程中待测样的 OD 值超出标准曲线的范围，应该怎么办？
2. 如果样品中还含有其他的非还原糖，我们如果采用本方法测定非还原糖的总量？

## 实验八 紫外线诱变育种

### 一、实验目的与要求

1. 通过实验，观察紫外线对枯草芽孢杆菌的诱变效应
2. 学习物理因素诱变育种的方法。

### 二、实验原理

紫外线对微生物有诱变作用，主要引起的是 DNA 分子结构发生改变（同链 DNA 的相邻嘧啶间形成共价结合的胸腺嘧啶二聚体），从而引起菌体遗传性变异。

### 三、实验试剂、材料和设备

菌种：枯草芽孢杆菌；

仪器：血球计数板，显微镜，紫外线灯（15W），电磁搅拌器，离心机

### 四、实验内容

#### 1. 菌悬液的制备

A、取培养 48 小时的枯草芽孢杆菌的斜面 4—5 支，用无菌生理盐水将菌苔洗下，并倒入盛有玻璃珠的小三角烧瓶中，振荡 30 分钟，以打碎菌块。

B、将上述菌液离心（3000 r/min，离心 15 分钟），弃去上清液，将菌体用无菌生理盐水洗涤 2—3 次，最后制成菌悬液。

C、用显微镜直接计数法计数，调整细胞浓度为每毫升  $10^8$  个。

2. 平板制作将淀粉琼脂培养基溶化后，冷至 55℃ 左右时倒平板，凝固后待用。

#### 3. 紫外线处理

A、将紫外线灯开关打开预热约 20 分钟。

B、取直径 9 cm 无菌平皿 2 套，分别加入上述菌悬液 5 mL，并放入无菌搅拌棒于平皿中。

C、将盛有菌悬液的 2 平皿置于磁力搅拌器上，在距离为 30cm，功率为 15W 的紫外线灯下分别搅拌照射 1 分钟及 3 分钟。

4. 稀释在红灯下，将上述经诱变处理的菌悬液以 10 倍稀释法稀释成  $10^{-1}$ - $10^{-6}$ （具体可按估计的存活率进行稀释）。

5. 涂平板取  $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$  三个稀释度涂平板，每个稀释度涂平板 3 只，每只平板加稀释菌液 0.1 mL，用无菌玻璃刮棒涂匀。以同样操作，取未经紫外线处理的菌稀释液涂平板作对照。

#### 6. 培养

将上述涂匀的平板，用黑布（或黑纸）包好，置 37 °C 培养 48 小时。注意每个平皿背面要标明处理时间和稀释度。

7. 计数将培养 48 小时后的平板取出进行细菌计数，根据对照平板上菌落数，计算出每毫升菌液中的活菌数。同样计算出紫外线处理 1 分钟、3 分钟后的存活细胞数及其致死率。

$$\text{存活率} = \frac{\text{处理后每毫升活菌数}}{\text{对照每毫升活菌数}} \times 100$$

$$\text{致死率} = \frac{\text{对照每毫升活菌数} - \text{处理后每毫升活菌数}}{\text{对照每毫升活菌数}} \times 100$$

#### 8. 观察诱变效应

将细胞计数后的平板，分别向菌落数在 5—6 个左右的平板内加碘液数滴，在菌落周围将出现透明圈。分别测量透明圈直径与菌落直径并计算其比值（HC 值）。与对照平板进行比较，根据结果，说明诱变效应。并选取 HC 比值大的菌落移接到试管斜面上培养。此斜面可作复筛用。

### 五、实验结果

将实验结果填入下表。

### 六、作业和思考题

1. 用于诱变的菌悬液（或孢子悬液）为什么要充分振荡？
2. 经紫外线处理后的操作和培养为什么要在暗处或红光下进行？



## 实验九 微波诱变育种

### 一、实验目的与要求

1. 通过实验，观察微波对枯草芽孢杆菌的诱变效应；
2. 掌握微波诱变育种的方法。

### 二、实验原理

微波作为一种高频电磁波，能刺激水、蛋白质、核苷酸、脂肪和碳水化合物等极性分子快速震动。在 2450MHz 频率作用下，水分子能在 1s 内来回震动  $2.45 \times 10^8$  次。这种震动引起摩擦，使得单孢子悬液内 DNA 分子间强烈摩擦，孢子内 DNA 分子氢键和碱基堆积化学力受损，引起 DNA 结构发生变化，从而发生遗传变异；微波具有传导作用和极强的穿透力，在引起细胞壁分子间强烈震动和摩擦时，改变其通透性，使细胞内含物迅速向胞外渗透。在试验中，究竟是微波辐射直接作用于微生物 DNA 引起变异，还是其穿透力使细胞壁通透性增加，导致核质变换而引起突变，目前尚不明了，有待进一步研究。

### 三、实验试剂、材料和设备

生长至对数期 WH-2 菌液、生理盐水、6 个小瓶、7 个滚管、1mL 注射器 8 支、5mL 注射器 6 支、冰、水浴锅（80 度）。

### 四、实验内容

#### （一）确定诱变时所用的适宜出发菌的浓度

1. 分别称取 0.075g 琼脂加入到 7 个滚管中，再将按 40mL 培养基的量加的储液 A,B,C,F,葡萄糖和水的溶液分别吸取 4.8mL 加入到 7 个滚管中，压盖。
2. 分别吸取 9 mL 生理盐水加入到 6 个小瓶中，压盖。
3. 对小瓶和滚管除氧，除氧结束后分别向滚管中用注射器加入 0.1mL 的 D 液。
4. 对小瓶，滚管和注射器灭菌。
5. 灭菌结束后，将滚管放入水浴锅中保温。将小瓶、注射器和储液 E 放到无菌操作台内，打开紫外灯 20 分钟。

6. 杀菌结束后，关掉紫外灯打开风机和照明灯，放入 WH-2 菌种。给 6 个小瓶分别标上  $10^{-1}$  ~  $10^{-6}$ ，然后用 5mL 注射器吸取 1mL 菌液加入到  $10^{-1}$  中摇匀，再从  $10^{-1}$  中吸取 1mL 加入到  $10^{-2}$  中摇匀，以此类推配好  $10^{-1}$  ~  $10^{-6}$  浓度的菌悬液。

7. 在给滚管接菌前，待从水浴锅中取出的滚管温度不烫手时先吸取 0.1mL 储液 E 注入滚管，然后再接入 0.2mL 的菌液，摇匀后。再水平转几圈，除掉气泡，使培养基均匀摊开，迅速放到冰上快速滚动。以此类推做好  $10^{-1}$  ~  $10^{-6}$  浓度的菌悬液的滚管，贴上标签后放入培养箱中 37 度培养 2 天。

8. 观察不同浓度的菌的生长状况。

## (二) 确定最佳的微波诱变时间

1. 分别称取 0.075 g 琼脂加入到 8 个滚管中，再将按 45 mL 培养基的量加的储液 A, B, C, F, CMC 和水的溶液分别吸取 4.8 mL 加入到 8 个滚管中，压盖。

2. 分别吸取 9 mL 生理盐水加入到 4 个小瓶中，再吸取 45 mL 生理盐水加入到大瓶中，压盖，另外的 7 个小瓶直接压盖。

3. 对小瓶、大瓶和滚管除氧，除氧结束后分别向滚管中用注射器加入 0.1 mL 的 D 液。

4. 对小瓶，大瓶，滚管和注射器灭菌。

5. 灭菌结束后，将滚管放入水浴锅中保温。将小瓶、注射器和储液 E 放到无菌操作台内，打开紫外灯 20 分钟。

6. 杀菌结束后，关掉紫外灯打开风机和照明灯，放入 WH-2 菌种。给 4 个小瓶分别标上  $10^{-1}$  ~  $10^{-4}$ ，大瓶标上  $10^{-5}$ ，然后用 5 mL 注射器吸取 1 mL 菌液加入到  $10^{-1}$  中摇匀，再从  $10^{-1}$  中吸取 1mL 加入到  $10^{-2}$  中摇匀，以此类推将菌液稀释到  $10^{-4}$ ，再吸取 5 mL 的  $10^{-4}$  的菌悬液加入到大瓶中，制好 50 mL  $10^{-5}$  的菌悬液。最后分别吸取 5 mL 的  $10^{-5}$  的菌悬液加入到 7 个空的小瓶中做为诱变菌。

7. 将小瓶侵入盛冰水混合物的烧杯中，放到微波炉中开中低火分别诱变 30 s、60 s、90 s、120 s、150 s、180 s、300 s。诱变结束后标记后立即放入冰箱中。

8. 诱变结束后，在给滚管接菌前，待从水浴锅中取出的滚管温度不烫手时先吸取 0.1mL 储液 E 注入滚管，然后再接入 0.2 mL 的没经过诱变的菌悬液，摇匀后。再水平转几圈，除掉气泡，使培养基均匀摊开，迅速放到冰上快速滚动。以此类推做好诱变时间为 30 s、60 s、90 s、120 s、150 s、180 s、300 s 浓度的菌悬液的滚管，贴上标签后放入培养箱中 37 度培养 2 天。

## 五、实验结果

计算不同诱变时间菌的致死率。致死率=（对照菌落数-诱变菌落数）/对照菌落数。

计算不同诱变时间菌正突变率。正突变率=[（透明圈直径/菌落直径）大于对照（透明圈直径/菌落直径）的个数]/诱变菌落数。选择致死率适合时正突变率最大的。

## 六、作业和思考题

诱变过程中致死率有什么要求？

## 实验十 超声波诱变育种

### 一、实验目的与要求

1. 通过实验，观察超声波对枯草芽孢杆菌的诱变效应；
2. 掌握微波诱变育种的方法。

### 二、实验原理

超声波，有很强的生物学效应，其作用机理主要就是空化作用。空化作用是指在超声波作用下，液体中的微小气泡或空穴所发生的一系列振荡、扩大、收缩乃至崩溃。空化泡绝热收缩至崩溃瞬间，泡内可达到五千摄氏度以上的高温和几千个大气压，并伴有强大的冲击波或射流等，这足以改变细胞的壁膜结构，使细胞内外发生物质交换，甚至是发生突变。超声波作用于工业微生物并产生生物学效应已有一些报导。影响超声波诱变的因素主要包括功率、频率、作用时间等，因此研究利用超声波诱变时的这三种因素的水平是诱变育种的关键。

### 三、实验试剂、材料和设备

#### （一）培养基的配制

斜面培养基：1 %大豆蛋白胨，0.3 %牛肉膏（总氮 $\geq$ 13%），0.5 %氯化钠，0.1 %葡萄糖，2.0 %琼脂，pH 7.2。

种子培养基：3 %葡萄糖，2 %大豆蛋白胨（总氮 $\geq$ 9 %），0.2 %硫酸镁，0.1 %磷酸氢二钾，0.2 %磷酸二氢钾，0.03 %氯化钙，pH 6.0。

发酵培养基：4 %蔗糖，0.3 %酪蛋白，0.4 %磷酸氢二钾，0.4 %磷酸二氢钾，0.02 %氯化钙，4 %豆粕粉浸提液，pH 7.0。

酪蛋白平板培养基：酪蛋白 1%，酵母提取物 0.5 %，NaCl 0.9 %，琼脂 2.0 %，pH 7.4。

#### （二）试剂

大豆蛋白胨，可溶性淀粉，酪蛋白，琼脂，琼脂糖，凝血酶，纤维蛋白原。

#### （三）设备

JBT/C-YCL400/3P 可调式超声波药品处理机, SK-1 快速混匀器, BCN-1360 超级洁净工作台。

#### 四、实验内容

##### 1. 传代活化

将试管斜面菌种转接到传代培养基斜面上, 37 °C 培养 24 h, 取出, 4 °C 冰箱保存。

##### 2. 种子培养

在 250 mL 锥形瓶中分别装入无菌的 50 mL 种子培养基, 分别接入 1 环已活化的 T-3 纳豆杆菌菌种, 在 37 °C, 180 r/min 的条件下震荡培 9 h, 此为一级 T-3 纳豆杆菌种液; 再将一级菌种液按 3 % (V/V) 比例接种到分装有 50 mL 培养基的 250 mL 锥形瓶中, 继续培养 14 小时, 此时菌种的 OD600 达到 1.50, 菌种生长活力强, 可以作为二级菌种液备用。

##### 3. 产酶培养

在 250 mL 锥形瓶中分别装入无菌的 50 mL 发酵培养基, 再将二级菌种液按 3% (V/V) 比例接种到发酵培养基中, 37 °C, 180 r/min 的条件下震荡培养 3 d。超声波法诱变 T-3 纳豆杆菌 取菌悬液 2 mL, 于无菌离心管中, 进行超声波处理, 研究不同超声功率 (320 W 和 220 W)、频率 (24、38、46、52、68、70、72 KHz)、时间 (10、20、30、40、50 min) 条件下的诱变效果, 初步确定诱变条件, 再通过正交试验优化诱变条件, 根据优化得到的诱变条件, 处理菌悬液。将诱变处理后的菌悬液按照梯度稀释后, 将不同的稀释度分别涂布于酪蛋白平板培养基, 并以未经诱变处理的菌株作对照, 37 °C, 避光培养 48 h, 观察透明圈的大小, 选择透明圈直径与菌落直径比大且清晰的菌落进一步摇瓶复筛, 按照摇瓶发酵所得到的纳豆激酶活力大小选出产酶较高的突变菌株。

任何诱变剂都同时具有具有致死和诱变的双重效应, 因此需要测定出发菌株经诱变后的致死率曲线, 待诱变处理的菌液长出菌落后进行计数, 以未经诱变的菌液作对照, 计算致死率。

任何诱变剂的诱变效果都有正、反两方面，在诱变育种是研究中，只有正向的突变才是所需要是突变结果，因此诱变时需要测定产生有利性状的比例，即正突变率。

## 五、实验结果

按照如下公式计算致死率和突变率：

致死率=未被处理菌体长出的菌菌落数-菌体长出的菌落数/未被处理菌体长出的菌落数\*100%

正突变率=性状提高的菌落数/基本菌落数\*100%

## 六、作业和思考题

简述超声波诱变的原理。

## 实验十一 亚硝基胍诱变育种

### 一、实验目的与要求

### 二、实验原理

碱基类似物主要有嘧啶类似物、嘌呤类似物两大类。常用的嘧啶类似物有 5-溴尿嘧啶、5-氟尿嘧啶、6-氮杂尿嘧啶等。嘌呤类似物有 2-氨基嘌呤 6-巯基嘌呤等。烷化剂是诱发突变中一类有效的化学诱变剂，烷化剂分外单功能烷化剂和双功能烷化剂以及多功能烷化剂。烷化剂功能基团越多，对微生物毒性越大，诱变作用越强；但由于死亡率高，存活率低，总的突变率也相应降低，所以诱变效应也就较差。烷化剂的性质较活泼，不太稳定，在水中易分解，所以，一般要现用现配，保藏时要注意避光。常用的烷化剂主要是 1-甲基-3-硝基-1-亚硝基胍（简称亚硝基胍，NTG）、甲基磺酸乙酯（EMS）、硫酸二乙酯（DES）和乙烯亚氨。移码诱变剂系指能够引起分子中组成遗传密码的碱基发生移位、复制，致使遗传密码发生相应碱基位移重组的一类化学诱变物质，主要为吡啶类杂环化合物，常用的有吡啶橙和原黄素两种。

### 三、实验试剂、材料和设备

#### （一）培养基

斜面培养基：1%大豆蛋白胨，0.3%牛肉膏（总氮 $\geq$ 13%），0.5%氯化钠，0.1%葡萄糖，2.0%琼脂，pH 7.2。

种子培养基：3%葡萄糖，2%大豆蛋白胨（总氮 $\geq$ 9%），0.2%硫酸镁，0.1%磷酸氢二钾，0.2%磷酸二氢钾，0.03%氯化钙，pH6.0。

发酵培养基：4%蔗糖，0.3%酪蛋白，0.4%磷酸氢二钾，0.4%磷酸二氢钾，0.02%氯化钙，4%豆粕粉浸提液，pH 7.0。

酪蛋白平板培养基：酪蛋白 1%，酵母提取物 0.5%，NaCl 0.9%，琼脂 2.0%，pH 7.4。

#### （二）试剂

亚硝基胍（NTG），琼脂糖，凝血酶，纤维蛋白原。

### （三）仪器

SK-1 快速混匀器，HGCE-F160 恒温振荡培养箱，BCN-1360 超级洁净工作台。

## 四、实验内容

1. 菌种活化：将试管斜面菌种转接到传代培养基斜面上，37 °C 培养 24 h，取出，4 °C 冰箱保存。

2. 制备菌悬液：取新鲜的斜面菌，用 pH6.0 的 0.1 mol/L 磷酸缓冲液洗下菌体，经离心洗涤，用缓冲液制成菌悬液，浓度为 10<sup>6</sup> cfu/mL。

3 配制 NTG 溶液：由于 NTG 水溶性较差，所以在配制时先用少量的丙酮溶解，然后再加入缓冲溶液，其比例为 9：1，先取 9 mL 缓冲液和 1 mL 的亚硝基胍丙酮溶液配制成浓度为 1 mg/mL 的 NTG 母液溶液。使用时取母液 0.2 mL 加入菌悬液 1.8 mL，即为处理浓度为 0.1 mg/mL 的条件，同理配制处理浓度为 0.2、0.3、0.4、0.5 mg/mL 的溶液。

4. 将以上菌悬液和 NTG 溶液混合于一个试管内，研究不同亚硝基胍处理时间和不同浓度亚硝基胍诱变的效果。终止反应时用生理盐水稀释 50 倍，离心洗涤，重复 3 次，除去药物。加入种子培养基，在冰水浴 2 h。离心除去培养基，用无菌水使沉淀悬浮并按照十倍浓度梯度稀释法稀释之后涂布于酪蛋白平面培养基 37 °C 避光培养 48 h。并以相同的操作取未经诱变处理的菌液稀释涂布平板避光培养相同时间作为对照。挑取透明圈直径与菌落直径比大者转接到发酵培养基中进一步摇瓶复筛，选出产酶较高的突变菌株。

5 遗传稳定性试验：将诱变所得到的突变株进行连续 15 次转接斜面传代活化，分别取 3、6、9、12、15 次的传代菌体进行摇瓶发酵，检测酶活力，采用 SAS 8.2 统计软件对菌株产纳豆激酶活力进行 One-Way-ANOVA 分析以及 Duncan 分析，检验遗传稳定性。

## 五、实验结果

按照如下公式计算致死率和突变率：

致死率=未被处理菌体长出的菌菌落数-菌体长出的菌落数/未被处理菌体长出的菌落数\*100%

正突变率=性状提高的菌落数/基本菌落数\*100%

## 六、作业和思考题

简述亚硝基胍诱变的过程。

## 实验十二 菌种的保藏

### 一、实验目的与要求

1. 掌握细菌的一般保藏原理和方法
2. 掌握甘油保种技术；
3. 了解菌种衰退的原理

### 二、实验原理

菌种保藏是将微生物的菌种经长时间的保存，不污染其它杂菌，及可保持其形态特征和生理性状，减少变异，防止衰老，以便于将来使用。

菌种在传代过程中，原有的生产性状会逐渐下降，这就是菌种的衰退。衰退由菌株的自发突变引起，一旦发现衰退，就必须立即进行复壮。所谓复壮，就是通过纯种分离和性能测定等方法从衰退的群体中找到为衰退的个体，已达到回复该菌株原有形状的一种措施。要防止衰退，关键是做好菌种的保藏工作，即创造一定的物理和化学条件，如低温、干燥、缺氧或缺养料等，来降低微生物细胞内酶的活性，使微生物代谢作用缓慢，甚至处于休眠状态。所以保藏菌种一般是选用它的休眠体，如孢子；芽孢等等，并且要创造一个低温；干燥；缺氧；避光和缺少营养的环境条件，以利于休眠体能长期地处于休眠状态。对于不产孢子的微生物，应使其新陈代谢处于最低状态，又不会死亡，从而达到长期保存的目的。

### 三、实验试剂、材料和设备

#### （一）培养基的配制

培养基：PDA 培养基

#### （二）材料

30%甘油、接种环、试管斜面、酒精灯、超净工作台、移液管、1 mL 移液枪、5 mL 移液枪、1 mL/5 mL 枪头、恒温培养箱等

### 四、实验内容

1. 斜面低温保藏法：此法为最常用的一种。一般霉菌；放线菌和有芽孢的细菌可保存 2~4 个月，酵母菌可保存 2 个月，无芽孢的细菌最好每周移接一次。操作过程如下：

保藏：选取生长健壮的菌种，于其试管带棉塞的上半部用灭菌的塑料包扎好，以防棉塞受潮感染杂菌。置于 4℃ 冰箱中保藏。

2. 液体石蜡保藏法：此法可用不分解石蜡的菌种保藏。保存时间是半年至一年。放线菌；霉菌和产芽孢菌可保藏二年。液体石蜡可防止培养基水分的蒸发，而引起的菌种死亡。同时可阻止氧气进入，防止好氧菌的生长。从而延长菌种保藏的时间。但需注意的是试管必须直立放置，并且不便携带。操作过程如下：

液体石蜡的灭菌：将液体石蜡装入锥形瓶中，量不超出锥形瓶体积的 1/3，塞上棉塞，包扎好后，进行高压蒸汽灭菌二次（120℃，30 分钟）。再在 110~120℃ 干燥箱中蒸发掉蒸汽灭菌时带入的水分。此时石蜡透明清亮状。经检验确定无菌后备用。

菌种培养：挑取前一次纯化的健壮单菌落保藏

加石蜡油：用无菌管吸取石蜡油加入菌种试管中，以高出菌种斜面顶点 1 cm 为宜。少了会因培养基露出油面，而使培养基变干造成菌死亡。

收藏：试管上部用塑料包扎好，垂直立于冰箱中 4℃。

恢复使用：当要使用菌种时。倾出石蜡油。此石蜡油可再灭菌重复使用。接种培养。由于菌体外粘有油。第一次的菌生长缓慢，性状恢复不是很好。所以要再移植一次才能得到良好的菌种。

## 五、实验结果

分析保存情况，菌体活化情况。

## 六、作业和思考题

除了上述两种菌种保藏方法外还有那些保藏法，其各自的优点是什么？

## 实验十三 菌种生长曲线和产物合成曲线的绘制

### 一、实验目的与要求

1. 通过细菌数量的测量了解所筛选的菌种的生物特征和生长规律，使学生掌握基本的科研应用能力；
2. 通过学习生长线和产物合成曲线绘制，使学生具有熟练操作办公软件的数据处理和分析能力；
3. 通过讲解功能性高产菌的选育过程及其科学家的研发过程，引导大学生将远大的理想与对祖国的高度责任感、使命感结合起来，继承爱国主义的优良传统，弘扬中国精神，做一个忠诚的爱国者。

### 二、实验原理

将少量微生物接种到一定体积的新鲜培养基中，在适宜的条件下培养，定时测定培养液中微生物的生长量（吸光度或活菌数的对数），以生长量为纵坐标，培养时间为横坐标绘制的曲线就是生长曲线，它反映了微生物在一定环境条件下的群体生长规律。依据生长速率的不同，一般可把生长曲线分为延滞期、对数期、稳定期和衰亡期四个阶段。这四个时期的长短因菌种的遗传特性、接种量和培养条件而异。因此，通过微生物生长曲线的测定，可了解微生物的生长规律，对于科研和生产实践都具有重要的指导意义。

测定微生物的数量有多种方法，如血球计数法、平板活菌计数法、称重法、比浊法等，本实验采用比浊法来测定。由于菌悬液的浓度与吸光度(A)成正比也称光密度比浊法，只要用分光光度计测得菌液的 A 后与其对应的培养时间作图，即可绘出该菌株的生长曲线，此法快捷、简便。

产物形成曲线就是产物产量对培养时间的曲线。工业发酵的目的是为了收获产物，因此必须搞清产物积累最高时所需的发酵时间。如果提前终止发酵，营养物质还没有完全被利用，发酵液中的产物量偏低；如果发酵时间过长，一方面产物可能

会分解，另一方面也降低了设备利用率。因此，学会生长曲线和产物形成曲线的测定对工业发酵具有非常重要的指导意义。

### 三、实验试剂、材料和设备

#### (一) 菌种

酿酒酵母

#### (二) 培养基

基础培养基：葡萄糖 10%，蛋白胨 5%，酵母膏 2%

#### (二) 设备

高压蒸汽灭菌锅、超净工作台、分光光度计、恒温培养箱、酒精计

### 四、实验内容

#### 1. 生长曲线的测定

配制培养基，250mL 三角瓶装 100mL 培养基，一共 28 瓶，0.1MPa 灭菌 20min，备用；

菌种活化：活性干酵母 1 g，100 mL 2% 的蔗糖溶液中(35~38℃), 摇匀，置于 30~32℃ 恒温箱中活化 1~2 h，即得 1% 的 ADY 活化液。

吸取 2mL 活化液接入装有 100 mL YPD 培养基的三角瓶中；

将三角瓶放入恒温培养箱中，35℃ 培养 144 h；

每隔 12h 拿出 2 瓶（包括 0 h），以不接种的培养基作对照，在 560 nm 处测吸光度，离心测菌体浓度，填入表中，以培养时间为横坐标，吸光度为纵坐标，作生长曲线。

#### 2. 产物形成曲线的测定

24 h 后，每隔 12 h 取出 2 瓶，在进行生长量测定的同时，进行产物形成量的测定，以培养时间为横坐标，产物形成量为纵坐标，作出产物形成曲线；

### 五、实验结果

根据实验数据填写并计算。

表1-7 培养时间对菌体生长量和产物形成量的影响

培养时间/h	0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24
A <sub>560</sub>													
菌体浓度 /%													
酒精度/% 体积分数 (20℃)													

## 六、作业和思考题

1. 如果每次从同一摇瓶中取出 1mL 进行测定，会对结果产生怎样的影响？
2. 比较生长曲线与产物形成曲线，从中可以得出哪些结论？
3. 测定生长曲线时，除了本实验所用的分光光度计比浊法外，还有哪些方法？

它们各有哪些优缺点？

## 注意事项

1. 各瓶的接种量、培养条件应一致。
2. 若吸光度太高，可适当稀释后再测定。
3. 因培养液中含有较多的颗粒性物质（包括菌体），测吸光度时应马上读数，否则，颗粒沉淀，影响测定结果。稀释10倍后测定是可行的办法。若要精确测定，可用活菌计数法，在营养琼脂上观察生长的菌落数，但应掌握好稀释倍数。

## 第2篇 发酵工艺的优化

### 实验一 单因素实验

#### 一、实验目的与要求

1. 掌握淀粉酶产生菌营养条件单因素实验技术，让学生自己设计和选择因素和水平，使学生具备基本的实验设计能力；
2. 掌握发酵条件碳源和氮源优化过程，使学生具备自主实验能力；
3. 通过介绍华罗庚教授(1910~1985)在我国倡导与普及的“优选法”(国外称为“斐波那契法”)，就是单因素的最佳调试法，了解科学研究是各种思想各种领域的融合，培育学生的文化自信、文化认同，为实现建设中国特色社会主义的共同理想、实现中华民族的伟大复兴而努力奋斗。

#### 二、实验原理

单因素实验设计是指在实验中只有一个研究因素，即研究者只分析一个因素对效应指标的作用，但单因素实验设计并不是意味着该实验中只有一个因素与效应指标有关联。单因素实验设计的主要目标之一就是如何控制混杂因素对研究结果的影响。常用的控制混杂因素的方法有完全随机设计、随机区组设计和拉丁方设计等。

对于一个生物作用过程，其结果或产物的得到受到多种因素的影响。如发酵中，菌种接入量、酶的浓度、底物浓度、培养温度、pH 值、菌种生长环境中的氧气、二氧化碳浓度、各种营养成分种类及其比例等。对于这种多因素的实验，如何合理地设计实验，提高效率，以达到所预期的目的是需要进行认真考虑和周密准备的。

#### 三、实验试剂、材料和设备

##### (一) 样品

酵母菌，宋河集团有限公司提供。

##### (二) 培养基

YPD 固体培养基：葡萄糖 10 g，蛋白胨 10 g，酵母膏 5 g，琼脂 10 g，蒸馏水定容至 500 mL。

YPD 液体培养基：葡萄糖 10 g，蛋白胨 10 g，酵母膏 5 g，蒸馏水定容至 500 mL。

TTC 下层培养基：即 YPD 固体培养基。

TTC 上层培养基：葡萄糖 10 g，琼脂 10 g，蒸馏水 500 mL。

发酵培养基：葡萄糖 40 g，蛋白胨 10 g，酵母膏 5 g，蒸馏水定容至 500 mL。

培养基均在 121 °C 下灭菌 20 min。

## （二）试剂

蛋白胨，95%酒精，葡萄糖，蔗糖，酵母膏，重铬酸钾，琼脂，葱酮，浓硫酸，麦芽糖，TTC，甘油等，均为分析纯。

## （三）仪器

UV5100 紫外可见分光光度计，JJ CJ2FD 型超干净工作台，1011 型电热鼓风干燥箱，DHP9162 型电子恒温培养箱，ZHWHY2101C 型双层恒温培养振荡器，SYQ PSX280B 型手提式不锈钢压力蒸汽灭菌锅

## 四、实验内容

### 1. 最适发酵温度

取一环菌种接种于 YPD 液体培养基中，分别在 26 °C、28 °C、30 °C、32 °C 下培养 5 d，测定酒精得率。

### 2. 最适发酵 pH

分别挑取一环菌种接种于 pH 为 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0 的 YPD 液体培养基中。培养 5 d，测定酒精得率。

### 3. 最适发酵转速的测定

取一环菌种接种于 YPD 液体培养基中，分别在 70 r/min、80 r/min、90 r/min、100 r/min、110 r/min、120 r/min 转速下恒温培养 5 d，测定酒精得率。

### 4. 最适装液量的测定

分别配制体积为 50 mL、100 mL、150 mL、200 mL 的 YPD 液体培养基，依次接种已经培养 12 h 的菌种 1 mL、2 mL、3 mL、4 mL。在恒温摇床培养 5 d，测定酒精得率。

#### 5. 最适接种量测定

取一环菌种接种于 YPD 液体培养基中，在最适发酵条件下培养 18 h，分别取 1 mL、2 mL、3 mL、4 mL、5 mL、6 mL、7 mL、8 mL、9 mL、10 mL 接种于 100 mL 的 YPD 液体培养基中。恒温摇床培养 5 d，分别测定酒精转化率。

6. 最佳碳源：在其他条件不变的情况下，改变碳源。分别配制含有葡萄糖、蔗糖、甘油的液体培养基。接种后在最适发酵条件下培养 5 d 后，测定酒精得率。

7. 最佳氮源：在其他条件不变的情况下，改变氮源。分别配制含有蛋白胨、 $\text{KNO}_3$ 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  的液体培养基。接种后在最适发酵条件下培养 5 d，测定酒精得率。

### 五、实验结果

以菌体量为纵坐标，以发酵条件为横坐标，绘制折线图，找出最适的发酵条件。

### 六、作业和思考题

如何进行单因素实验设计？

## 实验二 正交优化试验

### 一、实验目的与要求

1. 了解发酵工艺培养条件变化的基本原理，使学生具备实验设计能力；
2. 掌握水平正交表的制作技术，具备数据处理软件的操作能力；
3. 通过团队协作完成实验操作过程，培育学生开拓进取、团队奉献的科学精神，增强爱国意识和家国情怀，增进民族向心力、凝聚力。

### 二、实验原理

对于一个生物作用过程，其结果或产物的得到受到多种因素的影响。如发酵中，菌种接入量、酶的浓度、底物浓度、培养温度、pH 值、菌种生长环境中的氧气、二氧化碳浓度、各种营养成分种类及其比例等。对于这种多因素的实验，如何合理地设计实验，提高效率，以达到所预期的目的是需要进行认真考虑和周密准备的。

正交实验法是安排多因素、多水平的一种实验方法，即借助正交表的表格来计划安排实验，并正确地分析结果，找到实验的最佳条件，分清因素和水平的主次，这就能通过比较少的实验次数达到好的实验效果。

影响试验指标的因素很多，由于试验条件的限制，不可能逐一或全面地加以研究，因此要根据已有的专业知识及有关文献资料和实际情况，固定一些因素于最佳水平，排除一些次要的因素，而挑选一些主要因素。正交试验设计法正是安排多因素试验的有利工具。当因素较多时，除非事先根据专业知识或经验等，能肯定某因素作用很小而不选取外，对于凡是可能起作用或情况不明或看法不一的因素，都应当选入进行考察。

因素的水平分为定性与定量两种，水平的确定包含两个含义，即水平个数的确定和各个水平数量的确定。对定性因素，要根据试验具体内容，赋予该因素每个水平以具体含义。定量因素的量大多是连续变化的，这就要求试验者根据相关知识或经验、或者文献资料首先确定该因素的数量变化范围，而后根据试验的目的及性质，并结合正交表的选用来确定因素的水平数和各水平的取值。每个因素的水平数可以



2. 按照试验设计方案，250 mL 三角瓶每瓶装量 100 mL、121 °C 灭菌 20 min。
3. 接种培养，按照正交表的条件要求进行接种培养。

4. 酶活力测定，测定 1-9 号培养液中提取出来的酶的活力，具体方法参考下表也就是实验三的酶活力的测定。测定出吸光度后，计算出酶活力，填写于表 3 中。每组依据自己的酶活力曲线方程进行求解，不能抄袭。以蒸馏水或者未接种的发酵液为对照样。

## 五、实验结果

数据记录及分析：把测定数据填入分析表的试验结果栏内，按表中数据计算出各因素的一水平试验结果总和、二水平试验结果总和、三水下试验结果总和，再取平均值（各自被 3 除）。最后计算极差。从极差的大小确定那个因素对酶活力影响最大，那个影响最小。找出在何种条件下酶活最高。最后进行正交方差法分析。也可以使用正交设计助手对于数据处理。将分析数据写于下面两个表中，可以打印也可以手写。并对结果进行文字分析。具体分析可以参考图书馆中国知网期刊中的文献进行分析。也可以参考其他文章资料。

表 2-3 结果分析表

行号\因素	温度 (°C)	转速	接种量	空项	酶活力
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>					
k <sub>1</sub>					
k <sub>2</sub>					
k <sub>3</sub>					
R					

表 2-4 方差分析

因素	偏差平方和	自由度	F 比	F 临界值	显著性
温度 (°C)					
pH					
接种量					
转速					
误差					

## 六、作业和思考题

正交表的设计的原理和方法？

## 实验三 相应法优化糖基化大豆分离蛋白制备工艺

### 一、实验目的与要求

1. 了解响应面实验设计的基本原理；
2. 掌握响应面设计的制作技术，具备响应面数据处理软件的操作能力；

### 二、实验原理

蛋白质的糖基化是指在糖基转移酶作用下将糖转移至蛋白质，和蛋白质上的氨基酸残基形成糖苷键的过程。为了拓宽大豆分离蛋白（soy protein isolate solution，简称 SPI）的应用范围，对其进行改性处理，糖基化改性之后，新合成的糖基化蛋白在乳化性、溶解性等功能特性方面都有不同程度的提高，就如溶解度而言，经过糖基化处理之后，等电点附近也呈现较好的溶解性。在改善大豆蛋白功能特征方面，它可以成为一种安全有用的处理方式，在食品行业中具有很大的发展空间。目前国内外学者的研究主要集中在改善大豆分离蛋白乳化性，以及其制备的乳化体系在外界环境因素 pH、离子强度、温度变化下的稳定性。夏秀芳等[8]利用湿热法制备葡萄糖-SPI 复合物，产物的溶解度、乳化活性和乳化稳定性均有明显提高。之前已有人研究了糖基化改性对蛋白质（包括 SPI）功能特性的影响，湿热法研究的较少，而对于糖基化大豆分离蛋白制备的优化工艺多为单因素试验。因此，本试验通过响应面法优化糖基化湿热法制备大豆分离蛋白的工艺，并测定大豆分离蛋白糖基化产物的溶解性、乳化性和凝胶强度等，系统分析糖基化对其功能性质的影响，寻找出可应用于多种食品中的高性能食品添加剂。

### 三、实验试剂、材料和设备

#### （一）样品

大豆分离蛋白、金龙油，购于周口万果园超市。

#### （二）试剂

盐酸、OPA、SDS、2-巯基乙醇、硼砂，葡萄糖。

#### （三）溶液配制

将葡萄糖与大豆分离蛋白按质量比 1:4 溶解在蒸馏水中配制成浓度为  $0.02 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$  的混合液。将葡萄糖与大豆分离蛋白按质量比 1:4 溶解在蒸馏水中配制成蛋白质质量浓度为  $0.01 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$  的混合液。称取 10 g 大豆分离蛋白溶解在蒸馏水中配制成蛋白质质量浓度为  $0.02 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$  的混合液。将上述混合液放在恒温振荡器中，温度调节为  $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ，条件下反应 5 h，得到糖基化产物。

OPA 试剂的配制：先准确称取邻苯二甲醛 50 mg，然后将其溶解在 1 mL 的甲醛溶液中，加入 5 mL 质量分数为 10% 的 SDS，100  $\mu\text{L}$  的 2-巯基乙醇和 25 mL 的  $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的硼砂，充分混均，最后定容至 100 mL，现配现用。

经过不同的条件改变，分析大豆蛋白和糖基化产物在性质上的差异。

#### （四）主要仪器

主要仪器有：E-201-9 PH 计，上海佑科仪器仪表有限公司；THZ-98AB 恒温振荡器，上海一恒科学仪器有限公司；BCD-215-KCM 冰箱，青岛海尔股份有限公司；JJ-2 组织捣碎机，常州华冠仪器制造有限公司；723 可见分光光度计，上海元析仪器有限公司；HWS24 电热恒温水浴锅，上海一恒科技有限公司；AL204 电子天平，梅特勒-托利多仪器（上海）有限公司；HH-S 型水浴锅，巩义市英峪予华仪器厂等。

### 四、实验内容

#### （一）糖基化大豆分离蛋白工艺优化

1. 最适反应温度的确定：将反应时间设置为 50 min，糖的添加量为 8%，在此基础上做温度梯度， $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $70 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $90 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ，然后得到不同反应温度的糖基化产物，然后利用 OPA 比色法测定凝胶强度。

2. 最适反应时间的确定：将反应温度设置为  $70 \text{ }^{\circ}\text{C}$  以及糖的添加量为 8%，在此基础上做时间梯度，20 min、30 min、40 min、50 min、60 min，然后得到不同反应时间的糖基化产物，然后利用 OPA 比色法测定凝胶强度。

3. 最适糖添加量的确定：将反应温度设置为  $70 \text{ }^{\circ}\text{C}$  和反应时间设置为 50 min，在此基础上依次添加 5%、10%、15%、20%、25% 的葡萄糖，得到糖基化产物，利用 OPA 比色法测定凝胶强度。

## (二) 响应面法的优化试验设计

根据单因素试验中确定的反应时间、反应温度的最佳配比范围，进行响应面试验的设计。按照软件设计的试验方案，进行试验研究。对于利用糖基化处理来改变大豆分离蛋白凝胶性的强度分析，采用OPA比色法，即是邻苯二甲醛比色法。用移液管量取OPA试剂5 mL置于试管中，然后用移液枪取200  $\mu\text{L}$ 的样品液（10  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ），充分混均后，在35  $^{\circ}\text{C}$ 水浴反应3 min，并对OPA试剂中加入200  $\mu\text{L}$ 的蒸馏水为试验对照，测量340 nm处吸光度。

$$\text{公式: } \text{DG}\% = (\text{A}-\text{B}) / \text{A} \times 100$$

其中 A 和 B 分别为 t 时刻样品溶液和试验对照样品的吸光度

## (三) 糖基化处理对大豆分离蛋白溶解性的影响

将 0.02  $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  大豆分离蛋白、0.02  $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  糖基化大豆分离蛋白、0.01  $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  糖基化大豆分离蛋白 3 种样品分别取 10 mL 于烧杯中，同样也将试验前配制好的 1.6  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  盐酸取 10 mL 倒入小烧杯中，然后用胶头滴管分别滴加 1000, 20, 300, 400  $\mu\text{L}$  盐酸调节 pH 分析糖基化大豆分离蛋白的溶解性。

## (四) 糖基化处理对大豆分离蛋白乳化程度的影响

根据 Pearce 和 Kinsella 的试验方法，进行改良研究。将 0.01  $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  大豆分离蛋白溶液和 0.01  $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  的糖基化大豆分离蛋白溶液，分别量取 25 mL，定容至 100 mL，得 5  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  的溶液，接着按金龙油：待测液=1：3 添加 66mL 待测液、22 mL 金龙油，倒入高速匀浆机中，10000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  搅拌 1 min，取 200 $\mu\text{L}$ ，用质量分数为 0.1% 的 SDS 稀释到 10 mL，用质量分数为 0.1% 的 SDS 作为试验对照，500 nm 下测吸光值，即为乳化值（EA），记作 A，5 min 后仍然使用相同的方法取出 200  $\mu\text{L}$ ，用 0.1% 的 SDS 稀释到 10 mL，用 0.1% 的 SDS 作为试验对照，500 nm 下测吸光值，记做 B。

$$\text{乳化稳定性公式为: } \text{Es} = \text{A}/\text{B} \times 100$$

按照上述方法，分别配制 0.01、0.03、0.05、0.07  $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  浓度的糖基化大豆分离蛋白溶液，按照上述方法分别处理 10、30、50、80、110 min，取出 200  $\mu\text{L}$ ，用 0.1% 的 SDS 稀释到 10 mL，用 0.1% 的 SDS 作为试验对照，500 nm 下测吸光值，分

析糖基化蛋白的浓度和处理时间对其乳化稳定性的影响。

(五) 糖基化处理对大豆分离蛋白热稳定性的影响

将  $0.02 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$  大豆分离蛋白溶液和  $0.02 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$  糖基化大豆分离蛋白溶液置于试管中，然后将分别有  $0.02 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$  大豆分离蛋白溶液和  $0.02 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$  糖基化大豆分离蛋白溶液的溶液放在水浴锅中， $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ，观察沉淀情况。

表2-5 实验方案设计

水平 level	因素 Factor		
	A 温度/ $^{\circ}\text{C}$ temperature	B 时间/min time	C 糖的添加量/% the amount of sugar added
-1	60	30	5
0	70	40	10
+1	80	50	15

表2-6 三因素三水平中心组合试验设计

试验号 Experiment numble	A	B	C	凝胶强度 the gel strength
1	1	0	-1	
2	0	0	0	
3	-1	1	0	
4	0	0	0	
5	0	1	1	
6	1	1	0	
7	-1	-1	0	
8	0	-1	1	
9	-1	0	-1	
10	0	0	0	
11	0	1	-1	
12	0	-1	-1	
13	0	0	0	
14	1	-1	0	
15	0	0	0	
16	1	0	1	
17	-1	0	1	

依据单因素试验结果，以温度、时间、糖的添加量为自变量，凝胶强度为响应值进行响应面试验，试验方案如表2-5，结果如表2-6。

## 五、实验结果

依据所得数据进行结果分析：

表2-7 回归系数显著性检验表

方差来源 sources of variation	自由度 degree of freedom	平方和 sum of squares	均方 mean square	F 值 F value	P 值 P value	显著性 statistical significance
回归模型 regression mode						
A						
B						
C						
A <sup>2</sup>						
B <sup>2</sup>						
C <sup>2</sup>						
AB						
AC						
BC						
残差 residual						
失拟项 Lack of fit						
净误差 net error						
总和 total						

## 六、作业和思考题

如何进行响应面实验的设计？

## 第3篇 发酵过程的放大

### 实验一 发酵罐的构造及操作

#### 一、实验目的与要求

1. 熟知发酵罐的结构和管路。
2. 学习空压机的使用。
3. 学习蒸汽发生器的使用。

#### 二、实验原理

按照生物反应器的类型，发酵罐可分为三大类。（1）敞口式发酵：属于繁殖速度快的好氧发酵，例如酵母工业；（2）半密闭式发酵：如酵母菌等的发酵，大多数情况下属于不是很严格的厌氧发酵；（3）密闭式发酵：主要是好气性的液体深层培养，要求复杂，但无菌程度高。

发酵罐的主要部件包括以下几部分。罐体：主要用来培养发酵各种菌体，密封性要好（防止菌体被污染）；罐体当中有搅拌浆，用于发酵过程当中不停的搅拌；空气处理系统，用来供给菌体生长所需要的空气或氧气；蒸汽净化系统以供给发酵罐空消及实效所需蒸汽；罐体上有控制传感器，最常用的有 pH 电极和容氧电极，用来监测发酵过程中发酵液 pH 和 DO 的变化。此外有些发酵罐还配备有电气控制系统，用来显示和控制发酵条件等等。

#### 三、实验试剂、材料和设备

保兴 Bio-tech2002 发酵罐，空气发生器，空气压缩机。

#### 四、实验内容

1. 认识发酵系统的构造，以及各个部分的功能：

（1）构造：发酵系统由三大组块构成：空气压缩机，蒸汽发生器，自控发酵罐体；

（2）空气压缩机：用来供给菌体生长所需要的空气或氧气蒸汽发生器：供给

发酵罐空消及实消所需蒸汽；

罐体：主要用来培养发酵各种菌体，密封性要好（防止菌体被污染）；罐体当中有搅拌浆，用于发酵过程当中不停的搅拌；罐体上还有控制传感器，最常用的有 pH 电极和溶氧电极，用来监测发酵过程中发酵液 pH 和 DO 的变化。

## 2. 空气压缩机的使用

- (1) 接通电源，将 K1 调整至 Auto 档位；
- (2) 待电机自动停止加压后，压力指针指为 6；
- (3) 将调节阀 F 轻轻上提，旋转，调整空气压力为 0.2；
- (4) 打开 K2；

空气压缩机开启完毕。开启完毕后，只需保证电源，在压力一切正常的条件下，不必有其他操作。

## 2. 蒸汽发生器的使用

- (1) 将进水口接好蒸馏水，保证蒸馏水水位正常，连通皮管内充满蒸馏水；
- (2) 听到蒸馏水不再流向蒸汽发生器时，接通电源，打开电源键 P。
- (3) 随着不断加热，一段时间后，锅炉内的温度和压力不断上升，压力上升至  $60\text{kg}/\text{cm}^2$ ，此时加热系统会自动关闭，压力和温度不再上升；

蒸汽发生器开启完毕。开启完毕后，需保证电源和蒸馏水的供应即可。

## 3. 认识发酵罐的结构，发酵罐空消的流程和具体操作步骤

(1) 压缩空气经净化器（外接）进入气源接口、减压稳压器、空气流量计、空气出口进入空气过滤器到达反应器内，经特制的空气分布器分散后，进入培养基，尾气经冷凝器、排气过滤器后排口排出，本管路具有减压、计量、净化作用；

(2) 自来水进盘管：自来水经阀 W3、电磁阀 W4、夹套盘管进水口、夹套内置盘管、盘管水出口及冷凝水阀 V1 排出；

(3) 自来水进冷凝器：自来水经 W2、冷凝器下部进水口进入冷凝器，冷凝器上部出口排出；

(4) 自来水夹套注水：自来水经 W1 进入夹套，经夹套排气阀 V2 排出；

(5) 蒸汽经蒸汽阀 S1 进入夹套内盘管对夹套内水加热，冷凝水经阀 V1 排出；

(6) 被加热的夹套水产生的蒸汽经夹套上法兰中的平衡口 N8 进入钟罩内，钟罩内的蒸汽冷却后的冷凝水回流进入夹套；

(7) 顶部取样阀口 K8 与 K6 连通；

(8) 过滤器侧口 K5 与排气过滤器 K2 口连通；

(9) 将溶氧电极和 pH 电极装入发酵罐内。

## 五、实验结果

实际操作整个过程。

## 六、作业和思考题

补料瓶如何连接？

## 实验二 发酵罐实罐灭菌操作

### 一、实验目的与要求

1. 学习pH电极的标定。
2. 学习溶氧电极的标定。
3. 熟悉蒸汽发生器和空压机的操作。
4. 掌握实罐灭菌的操作原理和方法。

### 二、实验原理

本实验用分批灭菌，即将培养基置于发酵罐中，用蒸汽加热，达到预定灭菌温度后维持一段

时间，再冷却到发酵温度，然后接种进行发酵，这种灭菌又叫实罐灭菌。其特点是原料的灭菌和微生物的发酵在同一罐中进行。优点：设备简单，不需要专门的灭菌设备；操作简单易行。缺点：加热和冷却所需的时间长，降低了发酵罐的利用率，是生产周期延长；无法采用高温短时间的灭菌方法。适用于规模较小的发酵罐。

pH 电极（溶氧电极也一样）标定的原理是通过标准的 pH 缓冲液来校正 pH 电极及信号变送放大过程中引起的测量误差，是控制器检测显示值与标准 pH 缓冲液保持一致，以提高测量精度。

### 三、实验试剂、材料和设备

1. 实验仪器：保兴 Bio-tech2002 发酵罐，空气发生器。
2. 实验试剂：pH 标准缓冲液。

### 四、实验内容

#### 1. 加料

将配好的培养基（教学可用自来水）通过加料口添加至发酵罐内，盖好加料口。

#### 2. pH 电极的标定

根据发酵过程的 pH 值变化范围偏酸还是偏碱，可以分为两种情况，偏酸性情况和偏碱性情况。现以偏酸性为例。

进入主菜单，按 F3 进入标定界面。再按 F1 进入 pH 电极标定功能模块。

按 F1：输入缓冲液的温度，一般情况缓冲液为 25℃，标定后测量显示值就是标定值。

取出 pH 电极，用蒸馏水冲洗干净，拿吸水纸吸干，然后插入 6.86 的零点缓冲液中。按 F2 输入标定 pH 零点的缓冲液值 6.86，待基本稳定不变后，根据操作步骤，确认 pH 零点“标定开始”；等到 pH 稳定后确认 pH 零点“标定结束”。此时测量值显示为输入的零点值。

将电极从 6.86 的零点缓冲液中取出，用蒸馏水冲洗干净，拿吸水纸吸干，然后插入 4.00 的零点缓冲液中。按 F3 输入标定斜率的缓冲液值 4.00，待基本稳定不变后，根据操作步骤，确认 pH 斜率“标定开始”；等到 pH 稳定后确认 pH 斜率“标定结束”。此时测量值显示为输入的斜率值。

为了使标定更加准确，可以重复步骤。

### 3. 连接管路

取下马达，罐顶盖上保护盖；取下 pH 电极电缆线，盖保护盖；取下消泡电缆；取下溶氧电极电缆，盖好保护盖。

拆下冷凝器上的进出水管。（注意出水管中残留的水溅出）

所有滤器两端均用夹子封闭。

用夹子封闭取样管

### 4. 开始灭菌

开夹套排气阀 V2,开夹套进水阀 W1，当阀 V2 出口有水流出关夹套进水阀 W1，再关阀 V2。

移去夹套蒸汽平衡阀 V3，用保护罩盖住发酵罐，并用倾倒螺钉锁紧法兰，开保护罩顶部排气阀 V4。

启动蒸汽发生器。

关进水阀 W3，开冷凝水阀 V1，开蒸汽发生器出口阀、缓缓开蒸汽阀 S1，蒸汽进入夹套内盘管。升温过程中调整阀 V1，节约蒸汽提高效率。

当罩顶部 V4 口有蒸汽排出时，2 分钟后关闭 V4，当罐温接近 120 摄氏度或保温温度时，微开阀 V4 适量排气，并调整蒸汽阀 S1 维持罐温。

保温过程应根据罐温及时调整蒸汽阀 S1。

#### 5. 灭菌结束

保温结束后，关蒸汽阀 S1，全开冷凝阀 V1，开水阀 W3，并将温度控制设定为自动。

微开阀 V2 排出夹套内过多的水。

将温度降至 100℃ 以下，缓缓开排气阀 V4（排气过大会损坏排气过滤器），使保护罩顶部的压力表指示为零，移去保护罩。

将进气过滤器 K7 口，与控制箱左侧空气出口连通，开弹簧夹，对发酵罐进行通气，调整空气流量 3~5L/min。

将阀 V3 装入 N8 口。消毒结束。

灭菌完毕，请关闭蒸汽发生器并排去蒸汽发生器内的残汽。

### 五、实验结果

### 六、作业和思考题

## 实验三 利用7 L发酵罐对地衣芽孢杆菌进行补料分批发酵培养

### 一、实验目的与要求

1. 熟悉利用小型发酵罐进行发酵培养的基本操作；
2. 掌握相关参数的设置及控制方式的设定；
3. 补料速度的校正；
4. 高密度培养地衣芽孢杆菌。

### 二、实验原理

地衣芽孢杆菌细胞形态为杆状，呈单生排列，其活菌形式进入人或动物肠道后，对葡萄球菌、酵母菌等致病菌有拮抗作用，而对双歧杆菌、乳酸菌、笑话链球菌等有促进生长作用，可促使机体产生抗菌活性物质，杀灭致病菌。此外，地衣芽孢杆菌通过夺氧生物效应可以使肠道缺氧从而有利于大量厌氧菌生长，是一种重要的微生物调剂剂，目前已大规模应用于“整肠生”等药品及其他保健制剂的制造生产。

由于地衣芽孢杆菌的代谢会受到营养基质、pH、温度、溶解氧等一系列外界条件的影响，因此选择合适的发酵条件对于菌剂的生产时非常必要的。本实验要求同学结合发酵工程的基本知识，对该菌进行发酵罐发酵，并记录其发酵罐参数。

培养条件控制：培养基是菌体生长和代谢的基质，其组成对菌体的生长和代谢起着重要的作用。在整个发酵过程中所消耗的物料按添加的形式来看有两大类，一是在接种前加入培养基中的，一是在发酵过程中流加的。流加的这一部分，或多或少地也起到一定的代谢调节作用。

碳源碳源是构成菌体和产物的碳架来源及能量来源。

氮源 氮源是菌体蛋白质等含氮物质和谷氨酸中氮的来源。氮源分为无机氮源和有机氮源。菌体利用有机氮源比较缓慢，利用无机氮源比较迅速，无机氮源有氨水、尿素、液氨、硫酸铵、碳酸铵、氯化铵、硝酸铵等。氨氮和尿素氮较硝基氮优越，因为硝基氮要先经过还原才能被利用。因此，要根据菌种和发酵特点合理选择氮源。采用不同的氮源，其使用方法也不同，尿素使用方便，但发酵液 pH 响应较

慢，同时，pH 的响应程度还受菌种尿酶活性、搅拌速度、罐压及风量的影响，多因素造成了 pH 的波动较大，对菌体的后期（产酸期）活性影响较大。

**温度对发酵的影响** 发酵过程从本质上来讲是一个发热过程，是一个放热反应，再加上机械搅拌所产生的热量，是整个发酵过程呈现温度上升的现象，发酵中生物热的产生有一定的规律。在发酵初期，菌体处在适应期，菌数少，呼吸作用缓慢，产生热量较少。当菌体处在对数生长期时，菌体繁殖旺盛，呼吸作用激烈，菌体数量急剧增加，大量产热，温度上升快，这一点在大种量工艺中尤为明显，因此必须控制温度。发酵后期，菌体的生长已经基本停止，主要靠体内的酶系进行发酵作用，产生热量不多，温度上升不大，且有逐渐降低的趋势。温度对发酵的影响是多方面的，从酶学动力学方面来看，温度升高，反应速度加快，菌体生长加快，产生生成期提前到来。但酶较易受热失活，温度升高，失活越快，菌体衰老越快，这使得发酵周期延长，残糖消耗不尽，也给产物分离带来不便。

**pH 对发酵的影响** pH 对微生物的生长和代谢产物积累都有很大的影响。不同种类的微生物对 pH 的要求不同，大多数细菌的最适 pH 为 6.5~7.5，霉菌一般为 pH 4.8~5.8，酵母为 pH 3.8~6.0，谷氨酸产生菌的最适 pH 为 6.5~8.0，各个不同的菌种又略有不同。

pH 对微生物的生长繁殖和代谢产物形成的影响有以下几个方面，①pH 影响菌的活性，当 pH 抑制菌体中某些酶的活性时，使菌体的新陈代谢受阻；②pH 影响微生物细胞膜所带的电荷，从而改变细胞膜的渗透性，影响微生物对营养物质的吸收及代谢产物的排泄，因此影响新陈代谢的正常进行；③pH 影响培养基某些组分和中间代谢产物的离解，从而影响微生物对这些物质的利用；④pH 不同，往往引起菌体代谢过程的不同，使代谢产物的质量和比例发生改变。

**通风和搅拌对发酵的影响：**发酵的不同阶段对氧的要求不同，一般在菌体生长繁殖期比谷氨酸生成期对溶解氧的要求低一些，发酵罐中溶氧程度主要有搅拌速度、通风量和罐压三者协同决定。

**罐压：**在整个发酵过程中，发酵罐处于带压状态，这主要是基于两个方面的考虑，一是正压可以防止杂菌通过空气系统以外的任何渠道进入发酵罐，较少环境对发酵的污染概率。二是增加发酵罐中的氧分压，提高发酵液中的氧浓度。发酵罐的设计压力一般是 0.3MPa，一般使用压力是 0.1MPa，建议使用压力 0.05MPa。

**搅拌：**搅拌与搅拌器的型式、叶片直径、转速和搅拌器在发酵罐中的相对位置等有关因素决定。一般搅拌器直径越大，速度越快，则溶氧系数约高，反之则溶氧系数小。

**风量：**在罐压一定的情况下，风量的增加可以增加发酵罐培养基中的氧分压，通风的计算，一般采用每分钟发酵液体积与所通的空气体积之比来确定，如风量 1:0.5 表示每分钟每立方米发酵液中通入 0.5m<sup>3</sup> 的空气。罐压恒定时，尾风风量与进风风量相同，因此，在实际操作中，我们用安装在发酵罐尾气排放口上的空气流量计来读取数据。

泡沫是发酵过程中必然会出现的现象，泡沫对发酵液的特性（如组分、黏度等）相关，也与发酵控制参数（如罐压、搅拌、风量等）相关。正常的发酵泡沫可完全处在控制之下。泡沫的失控，往往意味着有意外的情况发生。泡沫过多，会影响到发酵的正常进行。如会引起发酵罐内大量溢出而造成浪费和环境污染。泡沫上升到罐顶，可能从轴封渗出，造成染菌。为了避免发生这种现象，当泡沫过多时，必须减少发酵罐的装填系数，但这样也就减少了设备的利用率。泡沫过多，还影响氧的传递，影响通风与搅拌的效果。当泡沫稳定时，若代谢气体不能及时排除就会妨碍菌体的呼吸作用，使代谢不正常，甚至使菌体自溶。因此，在发酵过程中如何避免泡沫的过多产生是需要重视的问题。

发酵工业上消除泡沫的方法常用的有两种，机械消泡和化学消泡剂消泡。生产以及实验中，要根据消泡原理和发酵液的性质、要求选择不同的消泡剂。

### 三、实验试剂、材料和设备

#### （一）培养基的配制

按工艺要求配制发酵培养基，7L 发酵罐定容 5L，实际配料时，定容到预定体

积的 75%左右（即 7L 发酵罐定容 3.7L），另 25%体积为蒸汽冷凝水和种子液预留。

种子培养基( $\text{g L}^{-1}$ ): 蛋白胨 10g/L, 牛肉膏 10g/L, 氯化钠 5g/L。

发酵培养基( $\text{g L}^{-1}$ ): 可溶性淀粉 15g/L, 酵母膏 0.2g/L, 蛋白胨 5g/L, 硫酸铵 2.5g/L, 磷酸二氢钾 2.5g/L, 七水和硫酸镁 0.025g/L, 碳酸钙 0.05g/L 初始 pH7.2

## （二）设备

蒸汽发生器、发酵罐、空压机。

## 四、实验内容

### 1. 实销

### 2. 接种

火焰封口法：将前次实验准备的种子接入发酵罐。接种时，先缓慢将罐压降低到 0.01MPa，关小进气阀，在接种口上用火焰封口，并将盖放置在装有 75%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。

压差接种法：为发酵工业常用的接种方法。①将罐顶流加口在火焰封口下连接到装有菌种的抽滤瓶侧口管道上；②将发酵罐压力加大到 0.1MPa，打开流加口阀，使发酵罐和菌种瓶压力平衡后，关闭流加阀；③打开发酵罐排气阀，使压力下降到 0.01~0.02MPa（不能降为零），关闭排气阀，是发酵罐和菌种瓶间形成压力差；④打开流加口阀，依靠压力差将菌种液压入发酵罐；⑤重复②~④步骤，直到所有菌种都压入发酵罐为止；注意：由于抽滤瓶带压作业，为安全起见，要选用优质的抽滤瓶，并在瓶外加上帆布瓶套，防止意外炸瓶伤人。

### 3. 发酵过程的控制

发酵过程的温度控制：谷氨酸发酵 0~12h 为长菌期，最适温度在 30~32℃，发酵 12h 后，进入产酸期，控制温度为 34~36℃。由于发酵期代谢活跃，发酵罐要注意冷却，防止温度过高引起发酵迟缓；

发酵过程中的 pH 控制：发酵过程中的产物积累导致 pH 下降，而氮源的流加导致 pH 的升高，发酵中，当 pH 下降至 7.0~7.1 左右时，应及时流加氮源。长菌期（0~12h）控制 pH 不大于 8.2（由尿素流加量、风量和搅拌速度来调节）产酸期

(12h 以后) 控制 pH 在 7.1~7.2 左右。控制 pH 的手段主要①控制风量；②控制流加氮源。放罐：达到放罐标准或，及时放罐。放罐标准：残糖在 1% 以下且糖耗缓慢 ( $<0.15\%/h$ ) 或残糖  $<0.5\%$ 。

#### 4. 发酵过程的分析

发酵过程中，按以下频次测定、记录以下指标：pH、风量、还原糖、A<sub>600</sub>、温度、DO。

### 五、实验结果

1. 将各小组的数据填入下表

表 3-1 结果分析表

时间	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	...	32
pH																	
T																	
DO																	
A <sub>600</sub>																	
通气量																	

2. 绘制 pH、T、DO、A<sub>600</sub> 时间变化曲线图。

### 六、作业和思考题

工业上除了分批补料发酵之外还有哪些发酵方法？

## 实验四 KLa的测定方法

### 一、实验目的与要求

1. 掌握利用亚硫酸盐测定容积氧体积传递系数的方法；
2. 了解氧传递在好氧发酵过程中的重要作用。

### 二、实验原理

氧是难溶气体，在 25 °C 和 1 个大气压下，纯水中溶解度为 0.25 mol/m<sup>3</sup> 左右。在好氧发酵过程中，氧气由气相传递到液相，为微生物消耗。氧的传递过程限速阻力位液膜阶段，此时 K<sub>La</sub> 是描述氧的传递性能的重要参数。

以 Cu 离子为催化剂，溶解于水中的 O<sub>2</sub> 能立即将水中的 SO<sub>3</sub><sup>2-</sup> 氧化为 SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>，其氧化反应的速度几乎与 SO<sub>3</sub><sup>2-</sup> 浓度无关。实际上是 O<sub>2</sub> 一经溶入液相，立即就被还原掉。这种反应特性使溶氧速率成为控制氧化反应的因素。

每溶解 1 mol O<sub>2</sub>，将消耗 2 mol Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>，将少消耗 2 mol I<sub>2</sub>，将多消耗 4 mol Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>。因此可根据两次取样滴定消耗 Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 的摩尔数之差，计算体积溶氧速率。公式如下：

$$N_V = \frac{\Delta VM}{4\Delta t V_0} \times 3600 = \frac{900\Delta VM}{\Delta t V_0}$$

式中 NV：两次取样滴定消耗 Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 体积之差，

M：Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 浓度，

t：两次取样时间间隔，h

V<sub>0</sub>：取样分析液体积。

将上述 NV 值代入公式  $k_L a = \frac{N_V}{C^* - C}$  即可计算出 kLa

由于溶液中 SO<sub>3</sub><sup>2-</sup> 在 Cu<sup>2+</sup> 催化下瞬即把溶解氧还原掉，所以在搅拌作用充分的条件下整个实验过程中溶液中的溶氧浓度 C=0。

在 0.1 Mpa (1 atm) 下，25 °C 时空气中氧的分压为 0.021 MPa，根据亨利定律，可计算出 C\*=0.24 mmol/L，但由于亚硫酸盐的存在，C\* 的实际值低于 0.24 mmol/L，因此

一般规定 $C^*=0.21$  mmol/L。所以 $kLa=NV/0.21$

亚硫酸钠氧化法的优点是不需专用的仪器，适用于摇瓶及小型试验设备中 $kLa$ 的测定。缺点是：测定的是亚硫酸钠溶液的体积溶氧系数 $kLa$ ，而不是真实的发酵液中的 $kLa$ 。

### 三、实验试剂、材料和设备

#### (一) 试剂

1. 0.1 mol/L  $Na_2S_2O_3$  溶液（需要标定），在使用前 1-2 周配置。
2. 淀粉溶液：称取 1 g 淀粉，放入 100 mL 的水中加热搅拌煮沸 2-3 min。
3. 0.05 mol/L 的  $I_2$  溶液：称取 30 g  $KI$ ，加入 10mL,溶解，再称取 19.5 g 碘搅拌充分溶解，定容 1.5 L（根据实验用量调节），避光保存。
4. 0.1 mol/L 硫酸铜溶液。

#### (二) 设备

吸管，50mL三角瓶、酸式滴定管、300-500mL三角瓶。

### 四、实验内容

测定 $Kla$ 的反应装置，加入适当浓度，如 $x$  mol/L（0.05~0.45mol/L） $Na_2SO_3$ 溶液，每升 $Na_2SO_3$ 溶液加入1 mL 0.1mol/L硫酸铜溶液。

在通风搅拌后开始计时（准确秒表）及间隔准确时间取样时，取样量略少于 $2.5/x$ ，以便于取样为准。取样时注意，迅速取样10mL  $Na_2SO_3$ 溶液加入0.05mol/L的 $I_2$ 溶液25mL溶液中。吸管一定要尽可能的靠近碘液液面。然后用标准的0.1mol/L $Na_2S_2O_3$ 溶液进行滴定。

### 五、实验结果

将实验数据填入下表并计算。

### 六、作业和思考题

1. 实际发酵过程中能否用此法进行测定容积氧传递系数？
2. 对于几十立方的发酵罐该法是否可行？
3. 为什么要吸管一定要尽可能的靠近碘液液面？

表3-2 结果分析表

反应液组成	$\text{Na}_2\text{SO}_3$ : mol/L			
实验条件	反应器名称及规格	反应液体积	反应温度	转速、绝对气压
两次取样间隔 t/s				
两次滴定 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 溶液体 积差				
Kla (1/h)				
Kla (1/h) 平均 值				

## 实验五 菌体生长动力学参数的求取

### 一、实验目的与要求

掌握 DNS 法测定还原糖和多糖的方法，绘制出标准曲线。

### 二、实验原理

自20世纪40年代至今，微生物生理学者和生物化学工程学者提出了许多关于微生物生长的动力学模型。这些生长模型根据Tsuchiya理论可分为。

确定论的非结构模型，是一种理想状况，不考虑细胞内部结构，每个细胞之间无差别。确定论的结构模型，每个细胞之间无差别，细胞内部有多个组分存在。概率论的非结构模型，不考虑细胞内部结构，每个细胞之间有差别。概率论的结构模型，考虑细胞内部结构，每个细胞之间有差别。

从工程角度看，理想的微生物生长模型应具备下列4个条件：要明确建立模型的目的。明确地给出建立模型的假定条件，这样才能明确模型的适用范围。希望所含有的参数，能够通过实验逐个确定。模型应尽可能简单。

目前，常使用确定论的非结构模型是Monod方程。

莫诺方程（Monod方程）

$$\mu = \frac{\mu_{\max} S}{K_s + S}, \text{ 式中: } \mu: \text{ 生长比速(h-1)}$$

$\mu_{\max}$ : 最大生长比速(h-1)

S: 单一限制性基质浓度(mol/L)

$K_s$ : 微生物对基质的半饱和常数(mol/L)。

### 三、实验试剂、材料和设备

#### （一）材料

葡萄糖（分析纯）、蒸馏水

#### （二）试剂

DNS液：以称取3,5-二硝基水杨酸（ $C_7H_4N_2O_7$ ）6.3 g，氢氧化钠 21.0 g充分

溶解于500 mL蒸馏水中（水先煮沸10分钟后冷却）。

加入酒石酸钾钠（ $C_4H_4O_6KNa \cdot 4H_2O$ ）182.0g，苯酚（在50℃水中融化）5.0g，偏重亚硫酸钠（ $NaS_2O_5$ ）5.0g，搅拌至全溶，定容至1000 mL。

充分溶解后盛于棕色瓶中，放置10天后便可使用。平时盛一小瓶放在外面使用，其它储于冰箱中。此溶液每月配制一次。

### （三）材料和设备

容量瓶、吸管（1mL,5mL,25mL）、烘箱、试管架、吸耳球、称量纸、分光光度计、烧杯、恒温水浴锅、离心机、记号笔、电炉、搪瓷缸。

## 四、实验内容

1. 培养基配置：葡萄糖 30 g，NaCl 5g，牛肉膏 5g，蛋白胨 10g，水 1000mL；分装值500 mL三角瓶中装瓶量为200 mL，0.1 Mpa蒸汽灭菌25 min.
2. 待培养基降至室温，无菌接入种子10 mL，放置于37 °C恒温摇床振荡培养；
- 3.按照以下方法取样进行测定

表3-3 时间分布表

时间 t	发酵液中葡萄糖浓度 S	菌体吸光度 $OD_{600nm}$
8h		
9h		
10h		
11h		
12h		

## 五、实验结果

根据结果进行数据分析，以  $\bar{x} / \bar{r}_x \sim 1 / \bar{S}$  作图，符合monod方程，通过斜率和截距可求取动力参数 $K_s$ 与 $r_{max}$ 。实验结果填入下表。

表3-4 结果分析表

序号	$\Delta t$	$\bar{S}$	X	$\Delta X$	$\bar{X}$	$1 / \bar{S}$	$\bar{r}$	$\bar{X} / \bar{r}_x$	
1	1	$(S_{8h} + S_{9h}) / 2$	8h时—9h时的 $OD_{600nm}$	9h时—8h时的 $D_{600nm}$	$(9h时 + 8h时的 D_{600nm}) / 2$		求 取 方 法 见 上		例 如
2									
3									
4									

## 六、作业和思考题

菌体生长动力学获取的方法有哪些？

### 注意事项

葡萄糖浓度较高稀释后，（具体稀释倍数以吸光度测定值在0.2~0.8之间为准）测定的吸光度乘以稀释倍数根据标准曲线进行换算为浓度。

同样当菌体浓度吸光度大于1时，要适当稀释（具体稀释倍数以吸光度测定值在0.2~0.8之间为准）测定的吸光度乘以稀释倍数。

## 第4篇 功能性发酵产品的生产

### 实验一 酸奶的制作与乳酸菌的活菌计数

#### 一、实验目的与要求

1. 了解乳酸菌的生长特性和乳酸发酵的基本原理；
2. 学习酸乳的制作方法；
3. 通过学习酸乳发酵的原理了解发酵的本质，培育学生实事求是、求真务实、开拓创新的科学精神。

#### 二、实验原理

乳酸菌在乳中生长繁殖，发酵分解乳糖产生乳酸等有机酸，导致乳的 pH 值下降，使乳酪蛋白在其等电点附近发生凝集。

乳酸菌属于兼性厌氧微生物，其在无氧条件下生长繁殖较好，实验室条件下利用混菌培养的方法，尽可能让乳酸菌在无氧条件下生长，每个单菌落代表一个微生物细胞。

#### 三、实验试剂、材料和设备

菌种：市售酸奶

试剂：白糖 奶粉 培养基各成分

器材：培养箱、电炉、铝锅 5L，培养皿、酸奶发酵瓶

#### 四、实验内容

##### （一）酸奶制作

1. 10%脱脂奶粉溶解于热水（80℃左右）中，充分搅拌均匀，配成调制乳；
2. 添加蔗糖：为了缓和酸奶的酸味，改善酸奶的口味，在调制乳中加入4-8%的蔗糖。
3. 灭菌：方法有两种：将乳加热至90℃，保温5 min；
4. 接种：往冷却到43-45℃灭过菌的乳中加入乳酸菌，接种量为2%-5%。

5. 分装：酸奶受到振动，乳凝状态易被破坏，因此，不能在发酵罐容器中先发酵然后再进行分装，须是将含有乳酸菌的牛乳培养基先分装到小容器中，加盖后送入恒温室培养，在小容器中发酵制成酸奶。

6. 发酵：发酵的温度保持在 40-43 °C，一般发酵时间为 3-6 h。

发酵终点的确定有两种方法：

检测发酵奶的酸度，达到 65-70 T°。

倾斜观察，瓶内酸奶流动性差，而且瓶中部有细微颗粒出现。

7. 冷却：发酵结束，将酸奶从发酵室取出，用冷风迅速将其冷印到 10 °C 以下，一般 2 h，使酸奶中的乳酸菌停止生长，防止酸奶酸度过高而影响口感。

8. 冷藏和后熟：经冷却处理的酸奶，贮藏在 2-5 °C 的冷藏室中保存。

9. 感官指标：

色泽：色泽均匀一致，呈乳白色，或稍带微黄色。

组织状态：凝块稠密结实均匀细腻，无气泡，允许少量乳清析出。

气味、味道：具有清香纯净的乳酸味，无酒精发酵味，无霉味和其他外来不良气味。

## （二）乳酸菌活菌检测

1. 检测培养基：蛋白胨 15 g，牛肉膏 5 g，葡萄糖 20 g，氯化钠 5 g，碳酸钙 10 g，琼脂粉 10 g，水 1000 mL，115~121 °C 灭菌 20 min，灭菌后放置水浴 52 °C 保温备用。

2. 稀释：取 10 克样品放入添加 90mL 无菌水的带玻璃珠的 250mL 三角瓶中，摇床 180rpm 震荡 30min，即为  $10^{-1}$  样品溶液；再从中取 1mL 至添加 9.0mL 无菌生理盐水的三角瓶中，稀释至  $10^{-2}$ ，.....以此类推稀释至  $10^{-8}$ ，即稀释了 1 亿倍；

3. 倒制培养平板，从上述已稀释了 1 亿倍的乳酸菌悬液中取 1 mL，在无菌操作台上注入 9.0 cm 培养皿中，再将已经灭了菌的保持在 52 °C 水浴锅中的呈溶解状态的培养基，倒入 15 毫升左右于培养皿中，全部浸到培养皿，与菌悬液充分混合均匀（倒入培养基后，马上用手转动培养皿，转动几下，让其混合均匀），然后等

其凝固再移入培养箱中培养，注意最后一步倒平皿必须在超净台无菌操作，以免杂菌污染。每次稀释均要换灭好菌的移液管。

4. 培养条件：37 °C 恒温培养箱培养 48~72 h

5. 培养完毕后，取出进行计数，因为是稀释了 1 亿倍，所以一个透明圈菌落代表 1 亿/克，如果有 200 个透明圈，则是 200 亿/克。

## 五、实验结果

1. 感官评定。
2. 测定酸奶 PH。
3. 记录个人酸奶中各平行数据，计算最终平均值。

## 六、作业和思考题

乳酸菌的保藏通常为低温条件，这给运输带来很大的成本，请问可采用什么方法使乳酸菌在常温条件下有很高的存活率以减少运输成本？

## 实验二 甜酒酿的制作

### 一、实验目的与要求

1. 通过甜酒酿的制作工艺进一步了解酿酒的原理，同时使学生具备基本食品发酵工艺过程在实际生产生活中的应用能力；
2. 掌握甜酒酿的制作技术，并要求学生在生活中制备甜酒并品评；
3. 通过学习甜酒的酿造过程，并独立完成整个实验，加强学生独立思考、自由进取、创新探索的科学理念，进一步提高的爱国情怀。

### 二、实验原理

将蒸熟的米饭经接种根霉曲后，在适宜的培养条件下，让种曲中的根霉孢子萌发菌丝体，繁殖后产生大量的淀粉酶和糖化酶等复合酶系，通过该酶系的催化作用，将淀粉转化为单糖，从而使甜酒酿具有独特的甜醇口味。从微生物的观点来看，酿制的关键在于：要有优质的酒酿种曲，即种曲中应含有糖化率很高的优质根霉孢子或菌丝体；应选择优质的糯米作原料；严格无菌操作规程，尽量避免杂菌污染；制作甜酒酿的器具都要清洗干净，不能含有油脂类物质；合理控制酿制条件等。

### 三、实验试剂、材料和设备

固体曲培养基：米粉40 g，麸皮10 g，加入水20 g，拌料均匀，包扎，灭菌60 min。

### 四、实验内容

#### （一）甜白酒曲的生产

##### 1. 接种

液体接种，接种量 5% (2.5 mL), 无菌操作条件下进行接种，摇匀后，在瓶壁上写上姓名、接种日期。

##### 2. 培养

接种后的三角瓶倾斜平放，在 28℃ 条件下的培养箱中培养 16hr，对生长出现菌丝的培养物扣瓶，继续培养约 10h 后，全部取出，放在烘盘中烘干，粉碎制成甜白

酒曲。

## （二）糯米甜白酒的酿制

### 1. 选择原料和称量（2人一组）

酿制甜酒酿的原料常用糯米，选择时要用品质好、米质新鲜的糯米。每小组用一次性杯子称量 70g 糯米，倒入烧杯中。

### 2. 淘洗和浸泡

将米淘洗干净后浸泡过夜，自来水没过 5-10cm，使米粒充分吸水，以利蒸煮时米粒分散和熟透均匀。

### 3. 蒸煮米饭

领取纱布

将浸泡吸足水分的糯米捞起，用纱布沥干，放在蒸锅内搁架上隔水蒸煮，圆汽后，蒸 30min，至米饭完全熟透时为止。（切记每一个蒸锅统一放入统一计时）

### 4. 米饭降温

将蒸熟的米饭从锅内取出，在室温下摊开冷却至 30℃左右接种。

### 5. 接入种曲

按干糯米重量换算接种量。称量酒曲。

将凉好的米饭置于干净的一次性杯子内，再将酒曲粉末（3/4）拌入米饭中，搅拌均匀后。

### 6. 落缸搭窝：

将塑料碗中拌好酒曲的米饭稍稍压紧，并使表面平整光滑，再将其搭成 U 字形窝，以利散热和出酒，表面撒上少许酒曲（1/4），最后用保鲜膜将杯口封好（注意不要漏气）。

### 7. 保温发酵

温度可控制在 30℃左右，发酵初期可见米饭表面产生大量纵横交错的菌丝体，同时糯米饭的粘度逐渐下降，糖化液渐渐溢出和增多。若发酵中米饭出现干燥，可在培养 18~24 h 补加一些凉开水。

## 8. 后熟发酵

酿制 48h 后的甜酒酿已初步成熟，但往往略带酸味。如在 8℃~10℃ 条件下将它放置 2~3d 或更长一段时间进行后发酵，则可去除酸味。

## 9. 质量评估

酿成的甜酒应是酒香浓郁、醪液充沛、清澈半透明和甜醇爽口的。

## 五、实验结果

感官评定。

## 六、作业和思考题

1. 甜酒曲中主要有哪些微生物菌群？在整个发酵过程中分别起到什么作用？
2. 制作甜酒酿的关键操作是什么？

## 注意事项

1. 糯米甜白酒的酿制时，米饭一定要熟透，不能太硬或夹生；
2. 米饭一定要凉透到 35℃ 以下才能拌酒药，否则会影响正常发酵。
3. 甜酒酿制作过程中切忌沾油，沾污水，因此所有器具必须事先彻底清洗消毒。
4. 拌曲之前应先将曲块捣碎，便于接种时与米饭搅拌均匀。
5. 封口时务必不要漏气。

## 实验三 低盐豆瓣酱的制作

### 一、实验目的与要求

1. 了解低盐豆瓣酱的制作的原理；
2. 掌握低盐豆瓣酱的制作技术。

### 二、实验原理

豆瓣酱是以蚕豆或黄豆为主要原料、经制曲、发酵而酿造出来的调味酱。豆瓣酱的发酵过程是利用微生物的代谢作用，将原料分解，产生酸、醇、酯等风味物质，进而形成豆瓣酱的独特风味，能助消化开口味，用来带菜佐餐是一种深受消费者欢迎的方便食品。

### 三、实验试剂、材料和设备

#### （一）实验材料

黄豆、面粉、曲精（米曲霉）、食盐、辣椒酱、香料（花椒、胡椒、八角、干姜、三奈、小茴、桂皮等）、米酒、植物油。

#### （二）设备

发酵罐、蒸锅、筐、灭菌锅。

### 四、实验内容

#### 1. 工艺流程

黄豆→去杂清洗→浸泡→蒸煮淋干→拌入面粉混合→接种制曲→加盐发酵→加入辣椒酱→灭菌→包装→成品。

#### 2. 原料的预处理

去杂：选择颗粒饱满、均匀、新鲜、无霉烂、无虫蛀、蛋白质含量高的大豆。

清洗：将大豆洗净，去除泥土杂物及上浮物。

浸泡：将大豆放入容器中，加水浸泡，以豆内无白心，用手捏容易成两瓣为适度。

蒸煮：目前常用常压和分压两种蒸煮方法，蒸熟的程度与大豆全部均匀熟透，

既软又不烂，保持整粒又无夹心为最佳状态。

### 3. 制曲

按干豆瓣重称取40%的标准面粉和0.3%-0.5%的沪酿3.042中曲孢子，与冷却的豆瓣拌和，使面粉和菌种吸附在豆瓣表面。

### 4. 发酵

按每100 kg豆瓣曲，加水100 kg，食盐25 kg的比例配制发酵盐水，先将盐水烧开，再放入装有少量花椒、胡椒、八角、干姜、小茴香、桂皮、陈皮等香料的小白布袋煮沸3-5 min后取出布袋，将煮沸的溶液倒入配制溶解食盐水的缸中，把成曲倒入发酵缸中，曲料入缸后很快会升温为40左右，此时要注意每隔2h左右将面层与缸底层的豆瓣酱搅翻均匀，待自然晒露发酵1 d后，每周翻倒酱2-3次。

### 5. 调风味——辣豆瓣酱

混合：辣豆瓣酱是以1:1的比例在发酵成熟的原汁豆瓣酱中加入熟辣椒酱，在加入2%的米酒充分搅拌均匀。

灭菌：装入已经蒸汽灭菌冷却的消毒瓶内，装至离瓶口3-5cm高度为止，随即注入精制植物油于瓶内2-3cm。

包装：然后排气加盖旋紧，检验，贴商标。

## 五、实验结果

### 1. 感官指标

色泽：酱体赤红色或红褐色，鲜艳，有光泽，表面允许有部分油脂析出

香气：有浓郁的酱香味和芬芳的酯香味

滋味：味鲜醇厚，

状态：黏稠适度，无杂质，料质均匀，黏稠适中，乳化效果好。

### 2. 理化指标

固形物含量：红曲香菇豆瓣酱 (%)  $\geq 30$ ；卫生指标；食盐7%-12.5%；砷 mg/kg  $\leq 0.5$ ；铅mg/kg  $\leq 1.0$

微生物指标：大肠菌群MPN/dL  $\leq 30$ ；致病菌（系指肠道致病菌）不得检出

卫生指标：符合GB2718-81<酱卫生标准>

## 六、作业和思考题

1. 影响豆瓣酱质量的因素有哪些？
2. 如何防止豆瓣酱在制曲发酵过程中发生腐烂变质？

## 实验四 腐乳的制作

### 一、实验目的与要求

1. 以制作腐乳为例，了解传统发酵技术的应用，说明腐乳制作过程的科学原理。
2. 说出腐乳制作的流程，知道影响发酵的因素。
3. 根据实验流程示意图和提供的资料，设计实验步骤，尝试腐乳制作的过程。
4. 理解实验变量的控制，分析影响腐乳品质的条件

### 二、实验原理

腐乳是中华民族独特的传统调味品，具有悠久的历史：它是我国古代劳动人民创造出的一种微生物发酵大豆制品，品质细腻、营养丰富、鲜香可口，深受广大群众喜爱，其营养价值可与奶酪相比，具有东方奶酪之称。

毛霉是一种丝状真菌，具有发达的白色菌丝。它的菌丝可分为直立菌丝和匍匐菌丝。繁殖方式为孢子生殖，新陈代谢类型为异养需氧型。应用于腐乳等发酵工艺。

毛霉在腐乳制作中的作用：在豆腐的发酵过程中，毛霉等微生物产生的蛋白酶能将豆腐的蛋白质分解成小分子的肽和氨基酸，脂肪酶可将脂肪水解为甘油和脂肪酸。

传统腐乳的生产中，豆腐块上生长的毛霉来自空气中的毛霉孢子，而现代的腐乳生产是在无菌条件下，将优良毛霉菌种直接接种在豆腐上，这样可以避免其他菌种的污染，保证产品质量。

优良菌种的选择：不产生毒素；生长繁殖快，且抗杂菌力强；生长的温度范围大，不受季节的限制；有蛋白酶、脂肪酶、肽酶等酶系；使产品气味正常良好。

小结：豆腐乳是我国独特的传统发酵食品，是用豆腐发酵制成，多种微生物参与发酵，其中起主要作用的是毛霉。毛霉是一种丝状真菌，具发达的白色菌丝。毛霉等微生物产生的以蛋白酶为主各种酶能将豆腐中的蛋白质分解成小分子的肽和氨基酸；脂肪酶可将脂肪水解为甘油和脂肪酸，与醇类作用生成酯，形成细腻、鲜香

等豆腐乳特色。发酵的温度为15~18℃。

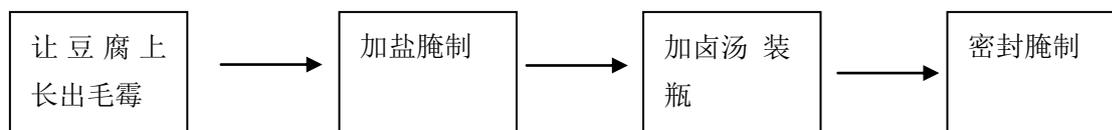
### 三、实验试剂、材料和设备

材料：粽叶、北方豆腐、调料

设备：瓦罐或有盖玻璃瓶、保温容器、小刀、摇床、250mL三角瓶、超净台及接种设备、灭菌锅

### 四、实验内容

#### 1. 腐乳制作的流程图



将豆腐切成3 cm×3 cm×1cm的若干块。所用豆腐的含水量为70%左右，水分过多则腐乳不易成形。

那么，怎样豆腐测定水分含量呢？

豆腐中水分测定方法：

精确称取经研钵研磨成糊状的样品5~10 g (精确到0.02mg，设为Bg)，置于已知重量 (Ag) 的蒸发皿中，均匀摊平后，在100~105℃电热干燥箱内干燥4 h，取出后置于干燥器内冷却至室温后称重 (为Cg)，然后再烘30 min，直至所称重量不变为止 (设最终所有重量为Dg)。

请你写出计算豆腐中含水量的表达式。

所以，样品水分含量 (%) 计算公式如下：

$$\frac{(\text{烘干前容器和样品质量} - \text{烘干后容器和样品质量})}{\text{烘干前样品质量}}$$

将豆腐块平放在铺有干粽叶的盘内，粽叶可以提供菌种，并能起到保温的作用。每块豆腐等距离排放，周围留有一定的空隙。豆腐上面再铺上干净的粽叶。气候干燥时，将平盘用保鲜膜包裹，但不要封严，以免湿度太高，不利于毛霉的生长。

将平盘放入温度保持在15~18℃的地方。毛霉逐渐生长，大约5 d后豆腐表面丛生着直立菌丝 (即长白毛)。

将温度保持在15-18℃的原因是什么？这说明了什么？

当毛霉生长旺盛，并呈淡黄色时，去除包裹平盘的保鲜膜以及铺在上面的粽叶，使豆腐块的热量和水分能够迅速散失，同时散去霉味。这一过程一般持续36 h以上。

当豆腐凉透后，将豆腐间连接在一起的菌丝拉断，并整齐排列在容器内，准备腌制。

长满毛霉的豆腐块（以下称毛坯）与盐的质量分数比为5：1。

盐能否过多或过少，为什么？

将培养毛坯时靠近平盘没长直立菌丝的一面统一朝向玻璃瓶边，将毛坯分层盘立摆放在容器中。分层加盐，并随层加高而增加盐量，在瓶口表面铺盐厚些。约腌制8 d。

为什么要随层数的增加而增加盐的用量，且瓶口用的盐最多？

你认为腌制作用有哪些？腌制的时间可以变化吗？为什么？你能设计实验来探究腌制时间对腐乳质量的影响吗？

实验过程：

将黄酒、米酒和糖，按口味不同而配以各种香辛料（如胡椒、花椒、八角茴香、桂皮、姜、辣椒等）混合制成卤汤。卤汤酒精含量控制在12%左右为宜。酒精含量的高低与腐乳后期发酵时间的长短有很大关系。酒精含量越高，对蛋白酶的抑制作用也越大，使腐乳成熟期延长；酒精含量过低，蛋白酶的活性高，加快蛋白质的水解，杂菌繁殖快，豆腐易腐败，难以成块。

卤汤中有哪些成分可以抑制杂菌的生长？

将广口玻璃瓶刷干净后，用高压锅在100℃蒸汽灭菌30 min。将腐乳咸坯摆入瓶中，加入卤汤和辅料后，将瓶口用酒精灯加热灭菌，用胶条密封。在常温情况下，一般六个月可以成熟。

你认为在整个的操作过程中，有哪些操作可以抑制杂菌的污染？

长毛时的温度，加盐腌制，卤汤中的酒精、辛香料，对用具的消毒灭菌，密封。

#### 4. 腐乳的主要生产工序

酿造腐乳的主要生产工序是将豆腐进行前期发酵和后期发酵。

前期发酵所发生的主要变化是毛霉在豆腐（白坯）上的生长。

发酵的温度为15~18℃，此温度不适于细菌、酵母菌和曲霉的生长，而适于毛霉慢慢生长。毛霉生长大约5d后使白坯变成毛坯。

前期发酵的作用有：

使豆腐表面有一层菌膜包住，形成腐乳的“体”；毛霉分泌以蛋白酶为主的各种酶，有利于豆腐所含有的蛋白质水解为多肽和各种氨基酸，脂肪酶可以将脂肪分解成甘油和脂肪酸。

后期发酵主要是酶与微生物协同参与生化反应的过程。

通过腌制并配入各种辅料（红曲、面曲、酒酿），使蛋白酶作用缓慢，促进其他生化反应，生成腐乳的香气。

## 五、实验结果

### 1. 感官指标

色泽基本一致、味道鲜美、咸淡适口、无异味、块形整齐、厚薄均匀、质地细腻、无杂质。

### 2. 理化指标

固形物含量：红曲香菇豆瓣酱（%） $\geq 30$ ；卫生指标；食盐7%-12.5%；砷 $\text{mg/kg} \leq 0.5$ ；铅 $\text{mg/kg} \leq 1.0$

微生物指标：大肠菌群 $\text{MPN/dL} \leq 30$ ；致病菌（系指肠道致病菌）不得检出

### 3. 卫生指标：符合GB2718-81<酱卫生标准>

## 六、作业和思考题

1. 豆腐长白毛是什么原因？
2. 王致和为什么要撒许多盐，将长毛的豆腐腌起来？
3. 豆腐长的毛是什么生物？
4. 你认为毛霉的细胞结构有什么特点？
5. 毛霉的繁殖方式是什么？
6. 毛霉中起作用的酶有哪些？

7. 制作腐乳的原料是什么？腐乳是如何制作的？
8. 为什么腐乳的味道比较鲜美？

## 实验六 中、西式泡菜的制作

### 一、实验目的与要求

1. 掌握泡菜制作的基本原理
2. 学会中西式泡菜制作的方法

### 二、实验原理

泡菜是民间最为广泛和大众化的蔬菜加工方法，将洗净的蔬菜浸渍在盐水中，经乳酸菌、醋酸菌、酵母等微生物自然发酵而成。西式泡菜的制作方法和我国的泡菜基本相同，区别在于西式泡菜中的蔬菜需经沸水烫过，再入坛加料泡制。

### 三、实验试剂、材料和设备

各种新鲜蔬菜和辅料（食盐、白糖、辣椒粉、白胡椒粉、丁香、桂皮和白醋等）、冷开水等；发酵坛（1个/组）、刀、砧板等。

### 四、实验内容

#### （一）制作工艺

中式：原辅料配方—原料整理和清洗—泡坛发酵—成品

西式：原辅料配方—原料整理和清洗—热水烫煮—加料煮汤汁—泡坛发酵—成品

#### （二）详细操作

1. 原料整理：蔬菜剥除老叶、黄叶，洗净后撕成片状，黄瓜、萝卜等切块状，芹菜折成段，番茄切成片。

#### 2. 西式泡菜制作（1组）

（1）热水烫煮：在锅中倒入清水煮沸后，将洗净的蔬菜依次在沸水中浸烫翻煮两次，取出后迅速用凉开水冲洗并沥干水分。

（2）加料煮汤汁：在锅内倒入适量清水，煮沸后加入食盐、白糖、辣椒粉、桂皮、丁香、白胡椒粉和白醋等，用文火煮30分钟。断火后冷却，用多层纱布过滤除去汤汁中的辅料残渣，然后倒入泡菜坛内备用。

(3) 浸泡发酵：将沥净水分的各种蔬菜原料混合放入坛内汤汁中，使汤汁淹没蔬菜表面，盖上坛盖，泡约一天左右即可食用。

### 3. 中式泡菜制作

(1) 配制辅料：在适量的冷开水中加入适量的食盐、白糖、辣椒粉、花椒、红干辣椒、白胡椒粉、白醋、白酒、嫩姜和蒜等。

(2) 浸泡发酵：将沥净水分的各种蔬菜原料混合放入坛内汤汁中，使汤汁淹没蔬菜表面，在表面滴几滴白酒后盖上坛盖，泡约一周左右即可食用（下周取，自带餐具）。

### 4. 质量要求

泡菜要色泽鲜艳，香气浓郁无异味，质地清脆，咸酸适度，入口清爽。

### 5. 注意事项

(1) 操作中严防油污原料和用具，开坛取食时，须使用洁净的筷；

(2) 发酵坛放置清洁阴凉处，并随泡随吃；泡菜吃完后，只需在原汤中添加适量的盐、白糖、白醋即可添加另一批新菜。

### (三) 泡鸡脚的制作

(1) 鸡脚的处理：沸水煮沸20min，捞起后用冷水充分冲洗干净，用开水再烫一次后在纱布上滤干水分；

(2) 浸泡发酵：加入适量的食盐、白糖、红糖、辣椒粉、红干辣椒、白醋、白酒、嫩姜、蒜（捣碎）、芹菜、胡萝卜；以及泡过的小米辣、姜和糟辣子等拌匀。泡约两天左右即可食用。

## 五、实验结果

### 1. 感官指标

### 2. 理化指标

固形物含量：红曲香菇豆瓣酱（%） $\geq 30$ ；卫生指标；食盐7%-12.5%；砷 $\text{mg/kg} \leq 0.5$ ；铅 $\text{mg/kg} \leq 1.0$

微生物指标：大肠菌群 $\text{MPN/dL} \leq 30$ ；致病菌（系指肠道致病菌）不得检出

3. 卫生指标：符合GB2718-81<酱卫生标准>

## 六、作业和思考题

1. 腌制好的泡菜为什么会有一种特别的香味？
2. 腌制泡菜时是如何抑制杂菌生长的？

## 实验七 固态发酵实验—米曲霉的培养

### 一、实验目的与要求

通过三角瓶固态培养米曲霉，使学生掌握固态培养微生物原理和技术，学会对微生物工艺条件进行初步的实验设计

### 二、实验原理

固态培养微生物，是我国传统发酵工业的特色之一，具有悠久的历史，在白酒、黄酒、酱油、酱类等领域中广泛应用。固态培养微生物，主要用于霉菌的培养，是细菌和酵母菌也可采用此法。其主要优点是节能，无废水污染，单位体积的生产效率较高。实验室固态培养主要采用三角瓶培养。固态培养方法主要有散曲法和块曲法，酱油米曲霉培养属散曲法。本实验采用的米曲霉属曲霉菌，菌落初为白色，黄色，继而变为黄褐色或淡绿褐色，反面无色。

### 三、实验试剂、材料和设备

器材：试管、纱布、牛皮纸、250mL三角瓶、高压灭菌锅、恒温培养箱、超净工作台、恒温摇床

原料和试剂：马铃薯、葡萄糖、琼脂、豆饼粉、麸皮、面粉

菌种：实验室保存的米曲霉菌种

### 四、实验内容

米曲霉的培养：本实验分为斜面种子培养及三角瓶培养两个阶段。三角瓶培养物在工厂常作为一级种子。

#### （一）米曲霉试管斜面菌种的制作

1. PDA培养基：先将马铃薯洗涤、去皮、切碎，称取200 g和500 mL蒸馏水混合后煮开，然后缓缓煮1小时，单层纱布过滤后滤液与其他成分（葡萄糖20 g，琼脂15-20 g）混合并加水至 1000 mL，自然pH。制好培养基，灌装入试管中，塞好棉塞，包扎好牛皮纸，在121 ℃高压蒸汽灭菌15分钟。摆成斜面，经培养检查灭菌彻底，即可接种培养。

2. 用无菌操作法将砂管菌种中的含孢子砂土铲取少量放入经灭菌的装有2~3mL的无菌水试管中，摇匀制成菌种悬液，再将菌种悬液用接种环涂抹在斜面培养基上。

3. 将接种后的斜面放置在恒温箱内培养，30度培养3 d，查无杂菌，黄绿色孢子旺盛则可作为菌种，再转接几次，使菌种充分活化，二是菌种量在试管培养的过程中有所扩大。

## （二）孢子悬液制备

用无菌水洗下出发菌株的斜面孢子，置摇床上150 rpm/min振荡分散30 min，经四层无菌纸过滤，制成孢子浓度约为 $10^6$ 个/mL的单孢子悬浮液。

## （三）三角瓶菌种培养

1. 按豆饼粉20 g，麸皮60 g，面粉20 g，水65~70 mL的配方混合均匀，分装入250 mL的三角瓶中，每瓶20g，混匀，并用四层纱布盖在瓶口，上面再用牛皮纸包扎好。将包扎好的三角瓶放入灭菌锅中，121 °C高压蒸汽灭菌30 min，灭菌后趁热摇松备用。

2. 在超净台内，将3~5mL米曲霉孢子悬浮液接入三角瓶中，并摇匀。

3. 接种的三角瓶，置于恒温箱中30度培养18~20 h后，见白色菌丝生长，将欲结块，摇瓶一次，充分摇散。继续培养6 h，菌丝大量生长又结成饼，再摇瓶一次，并将瓶横放培养，约经3天培养基颗粒表面布满黄绿色孢子，即立即使用，或放入冰箱中，4度下可保藏10d。

## （四）种曲质量检查

1. 观察种曲的颜色，鲜黄绿色为最好，淡黄色为培养过嫩，黄褐色为过老。有白色、黑色等异色显示有其他霉菌污染。孢子产量少，意味曲菌生长繁殖不良，多则是温度控制不合理。

2. 种曲应有曲香，如有酸气或氨味表示细菌污染严重。

3. 取少量种曲放入50 mL无菌水中，25~30度培养2~3 d，产生恶臭，表示种曲严重不纯，不能采用。

## 五、实验结果

描述米曲霉种曲的颜色、种曲应有曲香以及种曲的生长情况等。

## 六、作业和思考题

根据状态分类，培养基有哪些？

## 实验八 枯草芽孢杆菌固态发酵及活菌数测定

### 一、实验目的与要求

1. 学习了解固态发酵原理；
2. 以枯草芽孢杆菌为对象，了解固态发酵的控制技术；
3. 掌握枯草芽孢杆菌活菌计数方法与操作。

### 二、实验原理

作为抗生素的替代品，益生菌和酶制剂等的研究与开发近几年成为绿色饲料添加剂的热点，其中益生菌倍受关注。作为益生菌的一种，芽孢杆菌制剂在动物生产中的研究和应用一直都是畜牧业科研和生产人员关注的焦点。目前芽孢杆菌多采用液体深层发酵技术，再经喷雾干燥进行生产，对设备要求高，生产工艺复杂；而固体发酵采用的原料一般是廉价的农副产品(如草粉、麸皮等)，采用的设备也较液体发酵简单，生产成本大大低于液体发酵。所以近年来各生产厂家都在积极探索芽孢杆菌的固体发酵技术，以求简化生产工艺，提高产量，降低生产成本。

**固态发酵定义：**指没有或几乎没有自由水存在下，在有一定湿度的水不溶性固态基质中，培养一种或多种微生物的生物反应过程，其是以气相为连续相的生物反应过程。

枯草芽孢杆菌属于好氧微生物，实验室条件下利用稀释涂布培养的方法，让菌在有氧条件下生长，每个单菌落代表一个微生物细胞。

### 三、实验试剂、材料和设备

1. 液体种子培养基配制：

葡萄糖0.2%，NaCl 0.5%，酵母膏0.5%，蛋白胨1%，pH 7.0。

2. 液体种子培养：

每300 mL三角瓶装量50 mL液体种子培养基，在115℃条件下灭菌30 min。降温后从斜面接一环菌苔至种子培养基。置37℃控温摇床培养。转速200 r min<sup>-1</sup>，至芽孢率达90%以上时停止，约需24 h。

3. 固体发酵培养基：麸皮60%，稻壳10%，玉米粉5%，豆粕25%，硫酸镁0.05%，硫酸铵0.5%，料水比为1:1.1。

4. 三角瓶固体发酵培养：

每250 mL三角瓶装量20-30 g（湿重），固体发酵培养基原料试剂混合料，加水，料水比为1:1.1，搅拌均匀，培养基经121℃灭菌30 min，降温后接种量为2%(V/M：V—液体菌种体积数，M—固体发酵培养基的质量)，然后置37℃培养箱中静止培养，间时拍打，使其均匀生长。至脱落芽孢率为80%以上时，停止发酵，约需48 h。然后于60℃烘干、粉碎、计活菌数。

菌种：枯草芽孢杆菌

试剂：培养基成分

器材：培养箱、灭菌锅，培养皿

#### 四、实验内容

检测培养基：葡萄糖0.2%，NaCl 0.5%，酵母膏0.5%，蛋白胨1%，琼脂粉2%，pH 7.0。115℃灭菌20min，灭菌后放置水浴52℃保温备用。

稀释：取10克样品放入添加90 mL无菌水的带玻璃珠的250 mL三角瓶中，摇床180 rpm震荡30 min，即为 $10^{-1}$ 样品溶液；再从中取1mL至添加9.0 mL无菌生理盐水的三角瓶中，稀释至 $10^{-2}$ ，……以此类推稀释至 $10^{-8}$ ，即稀释了1亿倍；

倒制培养平板，将已经灭了菌的保持在52℃水浴锅中的呈溶解状态的培养基，倒入15毫升左右于培养皿中，全部浸到培养皿，待培养基凝固；从上述已稀释了1亿倍的菌悬液中取0.2 mL于已凝固的培养基表面，用玻璃刮铲涂布均匀，静止10 min，然后再移入培养箱中培养。

培养条件：37℃恒温培养箱培养24~48 h；

培养完毕后，取出进行计数，因为是稀释了5亿倍，所以一个透明圈菌落代表5亿/克，如果有200个透明圈，则是1000亿/克。

#### 五、实验结果

详细描述枯草芽孢杆菌固态培养物（外观、气味、培养物状态等）：

记录个人活菌测定中各平行数据，计算最终平均值。

## 六、作业和思考题

在枯草芽孢杆菌固态培养过程中，为了防止霉菌与酵母的污染，可采用什么方法？

## 实验九 淀粉糖化与酒精发酵

### 一、实验目的与要求

1. 了解酒精发酵的主要类型、工艺原理及其控制条件
2. 熟悉酒精生产的工艺流程、掌握酒精发酵的操作方法
3. 掌握用酶法从淀粉原料到水解糖的制备原理及方法
4. 掌握在实验室中模拟酒精发酵的工艺流程

### 二、实验原理

玉米粉、大米粉中可供发酵的物质主要是淀粉，而酿酒酵母由于缺乏相应的酶，所以不能直接利用淀粉进行酒精发酵，因此必须对原料进行预处理，包括蒸煮（液化）、糖化等，蒸煮可使淀粉糊化，并破坏细胞，形成均一的醪液，能更好的接受糖化酶的作用，并转化为可发酵性糖，以便酵母进行酒精发酵。

在无氧条件下酵母菌利用可发酵性糖转化为酒精和二氧化碳的作用，称为酒精发酵，是生产酒精及各种酒类的基础，可通过测定发酵过程中产生CO<sub>2</sub>的量和最终产物酒精的量得知酵母的发酵能力。

### 三、实验试剂、材料和设备

菌种：活性干酵母

试剂：培养基各成分、大米粉、活性干酵母、淀粉酶、糖化酶、大可乐瓶（学生自备）

溶液：10% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、1% K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>、10% NaOH

器材：试管、培养箱、灭菌锅、三角瓶、水浴锅、粉碎机、离心机

### 四、实验内容

#### 1. 原料的粉碎

将玉米、大米用粉碎机粉碎到一定程度，玉米淀粉含量为70%，大米淀粉含量为75%。

#### 2. 蒸煮糊化

称取一定量的粉碎后淀粉质原料，按照一定的料水比（100g：200mL），调制淀粉乳，90-100℃条件下恒温水浴加热，淀粉乳受热后，在一定温度范围内，淀粉粒开始破坏，晶体结构消失，体积膨大，粘度急剧上升，呈粘稠的糊状，即成为非结晶性的淀粉。

### 3. 糖化

经蒸煮糊化后的醪液，经过淀粉酶的糖化作用，将原料中的淀粉转化为可发酵性糖，供酵母利用。

为加快糖化速度，可以提高酶用量，缩短糖化时间，但酶用量太高，反而使复合反应严重，最终导致葡萄糖值降低，在实际生产中，应充分利用糖化罐的容量，尽量延长糖化时间，减少糖化酶用量。

酶参考用量：淀粉乳33%，60℃，pH4.5，酶240U/g绝干淀粉，糖化时间16h。

糊化醪液调整pH4.5，往其中加入一定量的淀粉酶（120U/g）、糖化酶（120U/g），60℃恒温下不断搅拌，直至粘度下降到一定程度，淀粉完全糖化（如何简易快速判断？）。

### 4. 发酵

#### （1）干酵母活化

将干酵母按1:20的比例投放于37℃的温水中复水20min。目的：恢复酵母细胞的正常功能。

（2）淀粉醪液糖化后，取400mL上清液于洁净的大可乐瓶中，加相同体积的水稀释，加入活化好的酵母种液5mL，混匀，28度培养箱中静止培养36h左右。

### 5. 二氧化碳生成的检验

（1）观察三角瓶中的发酵液有无气泡溢出；

（2）滴入10%氢氧化钠1mL于发酵液试管中，观察，如气体逐渐消失，则说明有二氧化碳的存在；

### 6. 二氧化碳生产量的测定

（1）接种完，擦干瓶外壁，于天平上称量，记为W1；

(2) 实验结束，取出瓶轻轻摇动，使二氧化碳尽量溢出，在同一天平上称量，记为W2；

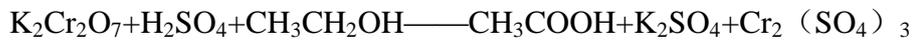
(3) 二氧化碳生成量= W1-W2

#### 7. 酒精生成的检验

(1) 打开瓶塞，嗅闻有无酒精气味；

(2) 取发酵液5mL，加10%硫酸2mL；

(3) 再加入1%  $K_2Cr_2O_7$ 溶液10-20滴，如颜色由黄色变为黄绿色，则说明有酒精产生。



### 五、实验结果

1. 详细记录实验过程中各参数及数据。
2. 对实验结果的判断与分析。

### 六、作业和思考题

现有3株不同来源的酒精酵母，请设计实验判断哪株酵母发酵酒精能力最强？

# 实验十 米曲霉固体发酵生产纤维素酶及酶解底物反应

## 一、实验目的与要求

1. 了解米曲霉固体发酵产酶情况
2. 掌握微生物固体发酵操作技术
3. 了解纤维素酶提取方法及酶活性定性测定方法

## 二、实验原理

纤维素酶是降解纤维素的一组酶的总称，是起协同作用的多组分酶系，属于诱导酶，其产生需要纤维素类物质的诱导。实验中以米曲霉为发酵菌株，稻草作为产酶诱导物。

## 三、实验试剂、材料和设备

菌种：米曲霉

试剂：土豆、稻草、麸皮、硫酸铵、羧甲基纤维素钠（CMC）

器材：培养箱、灭菌锅、三角瓶、摇床、离心机、天平、三角瓶

## 四、实验内容

### 1. 米曲霉菌种活化

（1）配制PDA培养基：称取200g马铃薯，洗净去皮切碎，加水1000 mL煮沸半个小时，纱布过滤，再加20g葡萄糖和20g琼脂，充分溶解后趁热纱布过滤，分装试管，每试管约5-10 mL（视试管大小而定），15磅蒸气（121 °C）灭菌20分钟左右后取出试管摆斜面，冷却后贮存备用。

（2）在无菌超净台上接种保藏的米曲霉于PDA斜面，28 °C培养5-7天，斜面上长满孢子。

2. 配制发酵培养基：15g麸皮+10g稻草粉，0.5%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ，0.5%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ，加15mL水（加水量40%~60%），拌匀，装瓶；

3. 灭菌：121 °C 灭菌30min，冷却至室温。

4. 米曲霉孢子悬浮液制备

已培养好的米曲霉孢子斜面一支，加入约10 mL无菌水，洗下孢子，制成孢子悬液。

#### 5. 接种

用移液管在无菌条件下吸取一定量的悬液，移入灭菌好的固体培养基中，于30度条件下培养96 h，期间每隔12 h摇动三角瓶一次。

#### 6. 提取粗酶液

向瓶中加入无菌水约50 mL，浸泡固体曲30 min-1 h；过滤得粗酶液。

#### 7. 酶活性测定

##### (1) 配制1%CMC底物平板：

配方：1 g羧甲基纤维素钠，1.8 g琼脂，100 mL，琼脂完全溶解后，加入0.03 g曲利本蓝，倒平板，每皿约15 mL。

##### (2) 打孔：

打孔器经酒精燃烧灭菌后，每平板打4孔，并在酒精灯火焰上稍稍加热打孔处，使孔周围的培养基微融，然后平放冷却。

##### (3) 加样：

往孔内加入粗酶液适量（约100 uL），同时需设对照。

##### (4) 培养（反应）：

将加样后的平板小心平端放入30℃培养箱，放置20小时左右。

##### (5) 观察结果：

可直接观察透明圈有无、测定透明圈直径。

### 五、实验结果

1. 仔细观察固体培养基发酵前后的状态，并描述；
2. 仔细观察底物平板酶解前后的现象，并测量水解圈大小。

### 六、作业和思考题

纤维素是自然界最丰富的资源，从理论角度分析如何最大限度地通过酶法利用该资源？而现实存在什么问题？

## 实验十一 甘露聚糖酶液体发酵及酶解反应

### 一、实验目的与要求

- 1.了解并掌握液体发酵产酶操作及酶反应条件的控制
- 2.与固体发酵产酶进行比较分析

### 二、实验原理

甘露聚糖是植物半纤维素的重要组分，其主链是由吡喃甘露糖残基以1,4- $\beta$ -D糖苷键连接而成。当主链的某些残基被葡萄糖取代，或半乳糖通过1,6- $\alpha$ -糖苷键与甘露糖残基相连形成分枝，则称之为异甘露聚糖，主要有半乳甘露聚糖、葡萄甘露聚糖和半乳葡萄甘露聚糖。甘露聚糖是半纤维素的第二大组分，在自然界中分布广泛，且多以异甘露聚糖的形式存在，同型甘露聚糖十分少见。 $\beta$ -甘露聚糖酶以内切方式降解甘露聚糖主链产生不同聚合度的甘露寡糖和少量甘露糖，是甘露聚糖降解酶中最关键的酶。

甘露聚糖酶可广泛应用于食品、造纸、纺织印染等行业。利用 $\beta$ -甘露聚糖酶可以制取有特殊保健作用的甘露寡糖。在纸浆制造业，可用于代替碱法进行脱色、漂白。在纺织印染方面，利用 $\beta$ -甘露聚糖酶与其它酶联合作用，能有效去除产品上粘附的多余染料，降低能耗和对环境的污染等。甘露聚糖酶的工业化生产将在许多行业产生很大的经济和社会效益。因此，近年来甘露聚糖酶逐渐成为国内外关注和研究的热点之一。

甘露聚糖酶是一种半纤维素酶，其产生需要一定的诱导物存在。本实验以枯草芽孢杆菌为菌株，以魔芋粉为诱导物。

### 三、实验试剂、材料和设备

菌种：枯草芽孢杆菌

试剂：蛋白胨、酵母粉、氯化钠、魔芋粉

器材：培养箱、灭菌锅、三角瓶、摇床、离心机、天平、三角瓶

### 四、实验内容

## 1. 菌种活化

(1) 配制LB固体培养基：蛋白胨10 g/L，酵母提取物5 g/L，氯化钠10 g/L，琼脂20 g/L，待琼脂充分溶解后趁热纱布过滤，分装试管，每试管约5-10 mL（视试管大小而定），15磅蒸气（121 °C）灭菌20分钟左右后取出试管摆斜面，冷却后贮存备用。

(2) 在无菌超净台上接种保藏的枯草芽孢杆菌于LB斜面，28 °C培养2天。

2. 配制产酶培养基：蛋白胨10 g/L，酵母提取物5 g/L，氯化钠10 g/L，魔芋粉30g/L。

3. 以10%的体积量分装于三角瓶中（25 mL液体培养基/250 mL三角瓶），121 °C灭菌20分钟。

4. 菌悬液的制备：已培养好的枯草杆菌斜面一支，加入约10mL无菌水，洗下菌体，制成菌悬液。

5. 接种：用移液管在无菌条件下吸取一定量的悬液，移入灭菌好的固体培养基中，于37度200 rpm条件下培养72 h。

6. 粗酶液提取：3000 rpm离心收集得到粗酶液。

7. 酶解底物分析：准备两三角瓶，分别加入50 mL自来水，46度水浴保温。

8. 往两三角瓶中各加入1 g魔芋粉，然后其中一个加入粗酶液1mL，另一个加入1mL蒸馏水（做空白对照）。以后每隔5-10 min往两三角瓶中各加入1g魔芋粉，前后共加5 g。

9. 酶解反应30-60 min，期间观察反应现象。

## 五、实验结果

1. 仔细观察液体培养基发酵前后的状态，并描述；
2. 仔细观察底物水解前后的现象。

## 六、作业和思考题

以液体发酵产酶为例，请详细介绍甘露聚糖酶定量测定的原理与方法。

## 参考文献

- [1] 《发酵工程实验（第一版）》. 陈长华. 北京：高等教育出版社，2009年.
- [2] 《现代发酵微生物实验技术（第二版）》. 诸葛斌. 北京：化学工业出版社，2011年.
- [3] 《发酵工程实验技术（第三版）》. 陈坚. 北京：化学工业出版社，2013年.
- [4] 《发酵工程实验简明教程》. 张祥胜. 南京大学出版社，2014年.
- [5] 《发酵工程实验教程》. 姜伟、曹云鹤. 科学出版社，2014年.
- [6] 《发酵工程与设备实验》. 邱立友. 中国农业出版社，2009年.
- [7] 《发酵食品工艺实验与检验技术》. 高文庚、郭延成. 中国林业出版社，2017年.
- [8] 《发酵工程实验》. 李江华. 高等教育出版社，2011年.
- [9] 《发酵工程实验》. 邓开野. 广州：暨南大学出版社，2010年.
- [10] 《发酵工程实验指导（第二版）》. 吴根福. 北京：高等教育出版社，2013年.



