

发酵工程与设备实验 指导

主 编：双宝

东北农业大学教务处

课程名称：发酵工程实验指导

课程编号：09144

适用专业：生物技术、生物学、生物工程、制药工程

实习学时：36

目 录

实验一、生物发酵罐的构造与使用·····	1
实验二、基因工程大肠杆菌的高密度发酵·····	9
系列实验（一） 大肠杆菌感受态制备及转化·····	12
系列实验（二）：细菌生长曲线的测定·····	12
系列实验（三） SDS—PAGE 测定蛋白质相对分子量·····	14
实验三 乳酸发酵与酸奶制作·····	18
实验四 谷氨酸发酵·····	21

实验一、生物发酵罐的构造与使用

一、实验目的和要求

本实验了解小型生物发酵罐基本构造及辅助设施；

掌握小型生物发酵罐装料、放料、空消、实消、接种、取样等基本操作；

掌握发酵罐酸碱控制、消泡控制、溶解氧控制、补料控制等系统的结构和控制机理及操作方法。

二、实验原理

本实验使用 BIOF-2005 型发酵罐进行全部操作。

BIOF-2005 型发酵罐是一个精心设计加工制造的生物反应系统。最新设计的在位灭菌消毒装置可避免把玻璃罐放入高压锅消毒的繁重工作,也提高了设备安全性与可靠性。微电脑控制系统能稳定、准确地自动控制温度、转速、pH、溶解氧、泡沫等各项参数指标。广泛适用于食品、抗生素、酶制剂、氨基酸、有机酸、食用菌、疫苗、微生态制剂、生物农药、环保等领域,是科研、生产、教学的理想设备。

1、使用环境和工作条件:

环境温度: 5 — 35℃

冷却水压力 0.1 — 0.3 Mpa

冷却水温度: 5 — 30℃ (自来水), 如果发酵温度较低可以加冷水机。

输入空气压力: 小于 0.2 Mpa (须经干燥、预过滤)

输入空气流量: 0-20 L/min (根据发酵工艺决定)

输入蒸汽压力: 0.2-0.35Mpa

蒸汽发生器功率: $\geq 3\text{kW}$

电源电压及容量: AC 220V $\pm 10\%$ 、50Hz $\pm 2\%$ 、2.5KW (不含蒸汽发生器的消耗功率)

2、主要技术性能指标:

罐体总容积: 5 升, 最大工作容积: 3.5 升;

温控范围: 冷却水+6 — 65 $\pm 0.6^\circ\text{C}$

灭菌温度: 105 — 130℃

搅拌转速: 50 — 950rpm $\pm 1\%$

pH 控制: 2 — 12 $\pm 0.1\text{PH}$

溶氧测量: 0 — 120% $\pm 1\%$

工作罐压: 0 — 0.08 Mpa

搅拌功率: 100-300 W

加热功率: 1.5KW

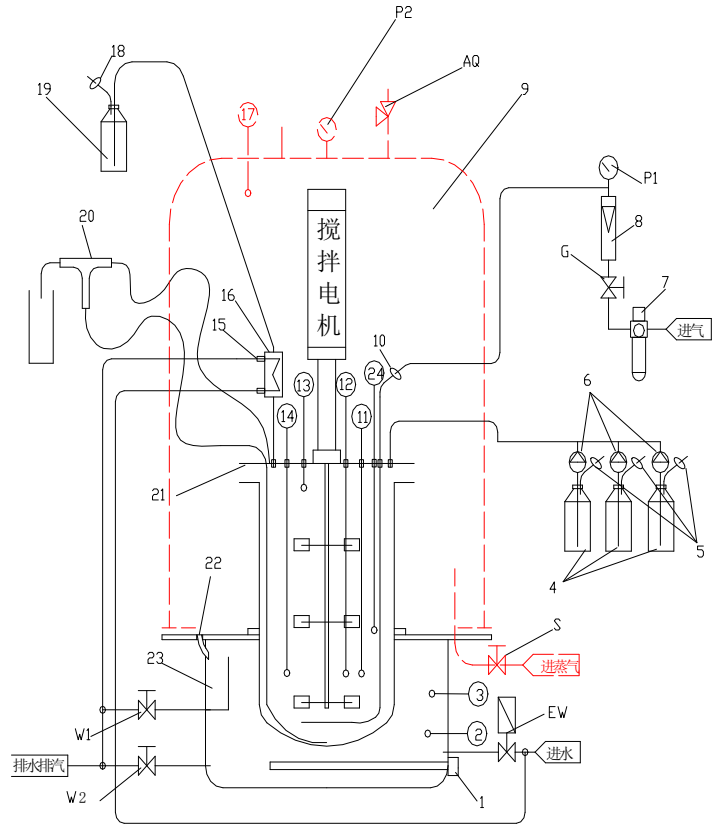
其他功率: 300W

自动消泡泵开启量: 20 — 100%

自动加液泵开启量: 20 — 100%

3、BIOF 生物发酵罐系统

BIOF 生物发酵罐系统如下图所示。



1	电加热器	12	测温电极 (2)	23	恒温水槽
2	测温电极 (1)	13	泡沫电极	24	液位电极
3	水位电极	14	PH 电极		
4	补料瓶	15	快速接头	AQ	安全阀
5	呼吸过滤器	16	排气冷凝器	W1	溢水阀
6	补料蠕动泵	17	测温电极 (3)	W2	排水排汽阀
7	气体稳压阀	18	尾气过滤器	S	进蒸汽阀
8	进气流量计	19	尾气滤水器	EW	冷却水电磁阀
9	灭菌罩	20	取样放料装置	G	气路调节阀
10	进气过滤器	21	罐盖	P ₁ P ₂	压力表
11	DO 电极	22	回水管		

试剂和器材

试剂：(1) pH 电极校对标准溶液

(2) 蒸馏水

器材：(1) BIOF-2005 型发酵罐

(2) 蒸汽发生器

- (3) 无油空压机
- (4) 恒温水浴系统

操作方法

灭菌

灭菌准备工作（见原理 3 附图）

- 将排水硅胶软管装在排水排气口上。
- 打开排水排汽阀 W2，放尽恒温座内的剩余水。
- 关闭溢水阀 W1 和罐体上其它阀门。
- 取出 pH、DO 电极校验，备用。
- 拔下 13—泡沫电极、24—液位电极、搅拌电机、顶盖接地线的**连接插头**。

注意：拔下的连接插头不可互相缠绕接触，不可与罐体接触，不可受潮，应放在干燥的机箱上。

- 取出 12—测温电极(2)，放置在干燥的机箱上。
- 拧下冷凝器进、出水接头。
- 用专用内六角扳手旋松搅拌电机固定螺栓，取下电机，横放在柔软、干燥桌面上。
- 将密封固定架安装于轴套上，将瓶架安装于密封固定架上。
- 将 10—进气过滤器、18—尾气过滤器、19—尾气滤水瓶安装到位。
- 取样放料装置安装就位。
- 将 4—补料瓶安装上呼吸过滤器。
- 拧下 22—回水管堵头。
- 打开蒸汽发生器准备提供蒸汽（按照蒸汽发生器的使用说明书操作）。

注意：蒸汽发生器所提供的蒸汽压力应 $\leq 0.25\text{Mpa}$ 。所有电机、电极的插头严禁与水或其他污染物接触，防止由此造成的电路故障。

(2) 空罐灭菌

第一步	装上 PH 电极孔、DO 电极孔、三针补料口的堵头。
第二步	将密封固定架安装于轴套上，将瓶架安装于密封固定架上，将进气口、取样口、补料口各胶管弯曲并用专用夹夹紧，将 19—尾气过滤瓶安装于瓶架上。注意：尾气口必须敞开。
第三步	盖上灭菌罩，拧紧固定螺丝，插上 17—测温电极(3) 的插头。
第四步	打开面板控制开关，选择灭菌辅助程序，设置灭菌温度 STEMP(105~130℃) 与灭菌时间 STIMER，将搅拌转速设置为 0rpm，将中间温度 MTIME 设置为 0℃，并进入程序运行（见 3.8）。 注意：此时仪器的电源总开关应为关闭状态。

第五步	提供蒸汽源，打开 S—进蒸汽阀，打开 W2-排水排气阀，让蒸气不断进入罐内，使罐体温度不断升高。当灭菌罩温度和恒温槽温度升至 100℃左右后，逐渐关小 W2，使温度继续上升，直到升到所需温度（注意对应压力）。当温度达到设定的灭菌温度时，计时开始。这时应不断调节 S 和 W2 使得温度稳定在设置温度上。操作时应密切注意灭菌罩上的压力表指示和控制箱上的温度指示，保证压力不超过 0.2Mpa，温度不超过 130℃。
第六步	当设定的灭菌时间到时，仪器发出鸣叫报警，此时将 S—进蒸汽阀和蒸汽源关闭。此时 W2 可略开大一些，使罐压逐渐释放。
第七步	当罐压到常压状态时，将 W2-排水排汽阀全打开，放尽冷凝水。
第八步	小心取下灭菌罩，空消完成。注意防止内部的瓶子掉下。

（3）实罐灭菌

空罐灭菌后，应尽快进行实罐灭菌。

第一步	装上已校正好的 PH、DO 电极并旋上保护盖（或者用牛皮纸包扎也可以），以防止灭菌时电极被蒸汽弄潮而损坏。
第二步	按工艺要求在罐内放入发酵培养液。
第三步	将密封固定架安装于轴套上，将瓶架安装于密封固定架上，将 4—补料瓶、19—尾气过滤瓶安装固定在瓶架上。
第四步	将进气口、取样口、补料口各胶管弯曲夹紧。注意：尾气口必须敞开。
第五步	盖上灭菌罩，拧紧固定螺丝，插上 17—测温电极(3) 的插头。
第六步	打开面板控制开关，选择灭菌辅助程序，设置灭菌温度 STEMP(105~130℃) 与灭菌时间 STIME，将搅拌转速设置为 0rpm，将中间温度 MTIME 设置为 0℃，并进入程序运行（见 3.8）。注意：此时仪器的电源总开关应为关闭状态。
第七步	提供蒸汽源，打开 S—进蒸汽阀，打开 W2-排水排气阀，让蒸气不断进入罐内，使罐体温度不断升高。当灭菌罩温度和恒温槽温度升至 100℃左右后，逐渐关小 W2，使温度继续上升，直到升到所需温度（注意对应压力）。当温度达到设定的灭菌温度时，计时开始。这时应不断调节 S 和 W2 使得温度稳定在设置温度上。操作时应密切注意灭菌罩上的压力表指示和控制箱上的温度指示，保证压力不超过 0.2Mpa，温度不超过 130℃。
第八步	当设定的灭菌时间到时，仪器发出鸣叫报警，此时将蒸汽源关闭，将 S 阀关闭，W2 微开，让罐体自然冷却。
第九步	当罐内温度降到 50℃以下，罐内压力达到常压状态时，小心取下灭菌罩，将 W2-排水排汽阀关闭，实消完成。实消完成后，应尽快通入空气，保证罐内不处于负压状态。

（4）灭菌过程注意事项

- 发酵罐灭菌应在完成试车、保压密封试验后进行。保压密封试验：使罐内增压到

0.08Mpa，闭罐后 1 小时内泄压小于 0.01Mpa，12 小时内泄压小于 0.02Mpa，24 小时内泄压小于 0.03Mpa 均属于合格。

- 灭菌时要注意各阀门的状态。
- 灭菌过程中要时刻观察灭菌罩上的压力表，通过控制进蒸汽阀和排水排汽阀，将灭菌压力保持在 0.10~0.2Mpa 之间，严禁超压！
- 必须拧下 22 一回水管堵头，否则不能保持蒸汽气路的畅通。
- 空消与实消时要保证玻璃罐出气过滤器及出气通道不能堵塞，否则罐内压力增高，易产生危险。
- 灭菌时，灭菌罩、恒温座、管阀等温度较高，要防止烫伤，应有安全措施，如：警示牌、栅栏、防护手套等等。
- 灭菌后要及时检查各接口，紧固罗丝，对已松动的部分重新紧固，以防止泄漏。

电极和泵的校正

电极的校正

进入 PH 校正后，显示界面如下图所示

pH:	**.**	CALIB
TEMP:	***℃	AUTO
SLOPE:	*.**	+/-
ZERO:	***	+/-

校正时，温度补偿是自动的，校正温度应选择于发酵液工作温度附近。操作人员须将随机提供的温度电极和 PH 电极一同插入中性标准溶液，如 PH=6.86，通过面板调整零位 ZERO(用箭头键移动光标到 ZERO 行的+/-上,按 ENTER 键即可)，使屏幕上 PH 指示值接近 6.86，再将 PH 计和温度电极一起插入标准的酸性或碱性溶液，如 PH=4.0，调整斜率 SLOPE (用箭头键移动光标到 SLOPE 行的+/-上,按 ENTER 键即可)，使 PH 指示接近 4，再重复上述过程 1—2 次，使 PH 指示达到标准溶液的 PH 值即可。斜率 SLOPE 的变化范围：0.39—1.89，零位 ZERO 的变化范围 122—143，校正完毕用 ESC 键退出。

实罐灭菌后及发酵过程中应对 PH 电极进行在线校正。从罐内取出样品后，即用标准 PH 计检测样品的 PH 值，再进入 CALIB 程序，调整零位 ZERO，使液晶显示器显示的 PH 值与标准 PH 计显示值相同。显然，你应保证这标准 PH 计是正确的。

(2) DO2 电极的校正

进入 DO2 电极校正后，显示界面如下图所示。

DO2:	*** %	CALIB
TEMP:	*** °C	AUTO
SLOPE:	*.**	+/-
ZERO:	****	+/-

校正时，温度补偿是自动的，校正温度应选择于发酵工作温度附近。操作员将溶氧

电极放入亚硫酸钠饱和溶液,调整零位 ZERO,使 DO2 指示接近于 0%,最好为 1%—2%,再将溶氧电极取出,以湿度饱和的空气作为 100% 溶氧量来标定,调整斜率 SLOPE 使 DO2 达到 100%,再重复上述过程 1—2 次即可。SLOPE 的调整范围: 0.5—2.0, ZERO 的调整范围: 1—25。校正完毕用 ESC 键退出。**实罐灭菌后,当发酵罐的温度、通气量、罐压都已达到所需值并已稳定时,应对 DO2 电极进行在线校正。**进入 CALIB 程序,调整斜率 SLOPE,使液晶显示器显示的 DO2 值达到 90-100%。

(3) 泡沫电极 (ELECTRODE) 的校正

进入泡沫电极校正后,显示界面如下图所示

FOAM	LIQUID	CALIB
80	250	
ELECTRODE: ***		
DJK: ***		

将泡沫电极插入发酵液,使它刚好同泡沫接触而不碰到液体。调整 DJK,使 ELECTRODE 指示达到 110~130。这时“FOAM”会停止闪动;再将泡沫电极插入碰到液体,这时 ELECTRODE 指示值应超过 150。并且“LIQUID”不再闪动。拔起电极使电极离开泡沫,ELECTRODE 指示应接近于零。

(4) 液位电极 (LEV) 的校正

方法基本同上,只要将液位电极插入液体中,调节 DJK,使 ELECTRODE 指示达 180 左右即可。再拔出电极时,ELECTRODE 指示应接近于零。

(5) PUMP1 (ACID PUMP 酸泵的校正)

进入酸泵校正,界面如下图所示。

	CALIB
ACID PUMP	ON/OFF
FLOW RATE	***ML/M
SET RATE	**%SE

ON/OFF 命令用于 ACID PUMP 的开启、关闭。开启 ACID PUMP(当光标在 ON/OFF 上时,按 ENTER 键)时,第一行有酸泵开启时间记录,以便计算每分钟的流量。将测出的流量值键入第三行内,单位是毫升/每分钟。当光标移到第四行 SE 上时,用 ENTER 键设置酸泵的运行占空比,以达到调节流量的目的(流量的大小不仅同占空比有关还同胶管的粗细有关)。

PUMP2(BASE PUMP 碱泵的校正); PUMP3(AT FOAM PUMP 消泡泵的校正); PUMP4(SUB PUMP 液泵的校正)方法同 PUMP1

3、开车与培养

(1) 开车运行准备工作

第一步	安装上 22—回水管堵头,关闭 W2-排水排汽阀,打开 W1—溢流水阀,打开冷
-----	---

	却水源。
第二步	关闭 G—气路调节阀，连接空气压缩机与发酵罐的进气端。
第三步	打开空压机，检查空压机出口端、7—减压除水过滤器的压力，将压力调整至 0.1-0.15MPa。注意：发酵罐内空气压力必须小于 0.1MPa。当发现压力难以调整时，应关闭 7—减压除水过滤器，将 G—气路调节阀打开，然后重新进行调整。
第四步	将 10—进气过滤器与 P1—压力表用硅胶管连接。
第五步	先打开 G—气路调节阀，然后松开进气、尾气口胶管夹头，将气量调节至工艺所需的流量。注意：必须检查 10—进气过滤器、18—尾气过滤器、19—尾气过滤瓶及气路是否堵塞。玻璃罐内压力必须小于 0.1Mpa。
第六步	安装好搅拌电机和顶盖接地线。
第七步	插入 12—测温电极(2)。
第八步	取下 DO、PH 电极上的保护盖或防护牛皮纸。
第九步	连接 11-DO 电极、12—测温电极(2)、13—泡沫电极、14-PH 电极和电机的插头。
第十一步	将补料瓶的输液胶管安装在对应蠕动泵上，然后松开补料口胶管夹头。注意：蠕动泵运转方向与胶管安装方向。
第十二步	在非运行（即非 RUN）状态下，打开总电源开关。设置较低的罐体温度，进入 RUN，使罐体温度较快下降。

（2）控制参数设置与运行

• 按工艺要求设置搅拌转速、培养温度、PH、DO 参数、消泡加液量，以及相应的报警上、下限参数（方法见有关章节）。灭菌完毕后，由于开始时搅拌轴、机械密封及顶盖的温度较高，水汽不易凝聚到机械密封系统，高速搅拌会造成机械密封尖叫，导致降低机械密封寿命，为此要求在一小时内先进行低速运行（100 转以下），等顶盖温度降至常温时再设置到要求的速度。

- 投入运行，观察各控制参数显示情况是否正常。
- 按工艺要求调整罐压与空气流量。

注意：在罐内温度、转速、进气量等参数达到发酵工艺所需数值并刚接种后，必须对 PH 电极进行在线校正和 DO 电极的 100%满度值调定。

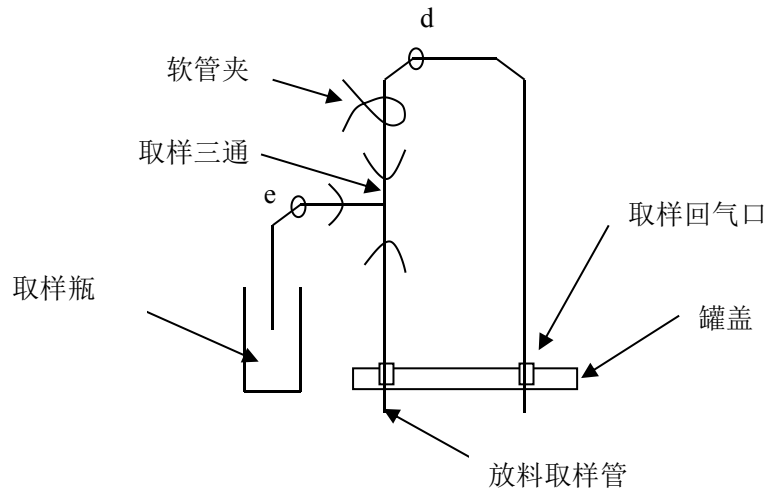
（3）接种培养

• 当各测量参数显示正常稳定时，就可进行接种（接种时应确保实验室空气相对静止，如关掉电扇等。）

- 准备好合格的摇床菌种。
- 酒精盘内放入无水酒精或酒精棉，点燃后安放于接种口，适当加大通气量或减小尾气流量。
- 打开接种盖，将其放入干净器皿中。
- 将菌种瓶口放在火焰上烧一下，并在火焰上拔下瓶塞将菌种倒入发酵罐。
- 将接种盖放在火焰上烧一下，盖上接种盖。
- 按工艺要求恢复罐压和通气量。

注意：在进行接种时，请佩戴手套以防止烧、烫伤。

(4) 取样与放料（见下图）



- 夹紧尾气胶管（使罐内适当增压，但罐压不得大于 0.10MPa）。
- 弯曲夹紧胶管的“d”部位；调节“e”部位胶管压板，放去少量培养液后夹紧胶管。
- 把无菌取样瓶置于酒精焰上，拔去瓶塞对准取料口，调节“e”点压板，从取料胶管取出所需样品后再夹紧“e”点夹子，盖上取样瓶盖，夹紧取样管口的胶管。
- 松开 d 部位和“e”部位的夹子，放去胶管内的残料。
- 取样前后应用 75% 酒精对取料口消毒。
- 放料方法与取料方法类同。

附录：蒸汽发生器的使用操作

- 打开加水阀门和蒸汽阀门，将水（蒸馏水或纯水等）加到指定的最低水平线。
- 按下组合按钮开关，电源指示灯及加热指示灯闪亮，本机即正常开始工作，继续加水至最高水位，关闭所有阀门。
- 当蒸汽压力上升到 **0.2MPa** 时，机器进入供气状态，达到 **0.32MPa** 时，在压力控制器的作用下，停止加热，气压低于 **0.2MPa** 时，又开始加热。
- 当水位低于最低水位时，机器停止加热，同时加水灯亮，加水报警响，此时应立即关机，放掉剩余蒸汽，待无压力时，重复上述方法，加水重新加热使用（一般加水一次可使用 **2.5~3** 小时）。
- 使用注意：
 - 1) 本机使用时应配备专用配电板，并有可靠的保护接电装置以确保安全使用。
 - 2) 使用中请经常试验报警系统，如发现报警系统失灵应及时修理，方可使用。
 - 3) 使用前就测试发生器金属外壳任何部件至接地螺钉间的电阻应小于 **0.5Ω**，并应测试主回路和非常电部门之间的冷态绝缘电阻应不低于 **2MΩ**。
 - 4) 停机一段时间后，应重新测试安全用电各项指标，取保安全后方可使用。
 - 5) 本机有压力控制和安全阀作防范结构，但压力控制器及安全阀应每年到当地标准计量单位检验校正，以确保用户使用的绝对安全。

实验二、基因工程大肠杆菌的高密度发酵

一、实验目的和要求

学习和掌握目前基因工程药品和生物制品生产中常用的大肠杆菌工程菌的发酵过程及相关的检测验证实验方法。

二、实验原理

工业发酵的基本目标是以最小的代价获得最大的产值和利润，而实现这一目标的工程手段是针对每个特定过程建立相应的高效发酵模式。因此重组异源蛋白的工业化生产，除了需要构建出高效稳定表达外源基因产物工程菌外，大规模培养工程菌的技术和工艺显得日趋重要。大肠杆菌工程菌的高密度发酵技术就是为满足这一需要而发展起来的一门新兴技术。

大肠杆菌工程菌的高密度培养是个相对概念，一般指培养液中工程菌浓度在 $50\text{g (DCW) / L}^{-1}$ 以上。在工程菌的大规模发酵过程中重组异源蛋白产物的宏观合成产量取决于最高的外源基因表达水平以及菌体密度。从理论上说，在维持外源基因表达水平不变的前提下，提高工程菌的发酵密度可以大幅度提高外源重组蛋白的产量，降低成本。但是要达到高密度培养并非易事，限制大肠杆菌工程菌高密度培养的因素主要表现在：培养基成分对工程菌生长的抑制；培养系统氧传递能力受限；培养过程中抑制性代谢产物的积累等方面。

三、仪器及试剂

仪器设备

BIOF—2005 型生物发酵罐

恒温摇床

恒温培养箱

超净工作台

蛋白电泳系统

紫外分光光度计

分析天平、普通天平

高压灭菌锅

凝胶成像仪

恒温水浴

型冷冻离心机、小型台式离心机

微量取液器、微量加样器

试剂

培养基原料：酵母浸出粉 (Yeast Extract)、蛋白胨 (Tryptone)、NaCl、葡萄糖、甘油 (Glycerol)、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、HCl、 $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、琼脂粉、氨苄青霉素 (Amp)

转化试剂：0.1M MgSO_4 、0.1M CaCl_2 、1×SSC (含 0.15M NaCl、15mM 柠檬酸钠；

pH7.0)

诱导用试剂: IPTG

蛋白电泳试剂:

30%丙烯酰胺 (Acr): 称 Acr30g, 甲叉双丙烯酰胺 (Bis) 0.8g, 加蒸馏水至 100ml 过滤后置棕色瓶中, 4℃贮存可用 1-2 月。

10%SDS (十二烷基磺酸钠)

1.5mol/L pH8.8 Tris-HCl 缓冲液: 称取 Tris18.2g, 加入 50ml 水, 用 1mol/L 盐酸调 pH8.8, 最后用蒸馏水定容至 100ml。

1.0mol/L pH6.8 Tris-HCl 缓冲液: 称取 Tris12.1g, 加入 50ml 水, 用 1mol/L 盐酸调 pH6.8, 最后用蒸馏水定容至 100ml。

0.05mol/L pH8.0 Tris-HCl 缓冲液: 称取 Tris0.6g, 加入 50ml 水, 用 1mol/L 盐酸调 pH8.0, 最后用蒸馏水定容至 100ml。

10%过硫酸铵(AP)

TEMED (四甲基乙二胺)

样品溶解液: SDS (100mg)+巯基乙醇(0.1ml)+溴酚蓝(2mg)+甘油(2g) +0.05mol/L pH8.0 Tris-HCl (2ml), 最后定容至 10ml。

固定液: 取 50%甲醇 454ml, 冰乙酸 46ml 混匀。

染色液: 称取考马斯亮蓝 R250 0.125g, 加上述固定液 250ml, 过滤后备用。

脱色液: 冰乙酸 75ml, 甲醇 50ml, 加蒸馏水定容至 1000ml。

电极缓冲液 (内含 0.1%SDS, 0.05mol/L Tris- 0.384mol/L 甘氨酸缓冲液 pH8.3): 称 Tris6.0g, 甘氨酸 28.8g, 加入 SDS1g, 加蒸馏水使其溶解后定容至 1000ml。

(4) 转化用试剂:

3、实验材料: 重组质粒 pET32a-Leptin、大肠杆菌菌株 BL21(DE3)

实验操作

菌种制备

工程菌的转化: 用 pET32a-Leptin 质粒转化大肠杆菌菌株 BL21(DE3) 感受态细胞, 操作步骤按照系列实验 (一) 进行。

筛选高表达菌种: 转化板上挑取 8 个单菌落, 分别接种于 2ml 加氨苄青霉素的 LB 培养基 (试管) 中, 37℃、280rpm 振荡培养 4-6 个小时, 至菌密度为 0.7OD₆₀₀ 左右。分别取出 300 μl 加入 80% 灭菌甘油至终浓度为 15%, 放于 -20℃ 保存。剩余的加入终浓度为 0.1-1mM 的 IPTG 继续振荡培养 4 小时。每个管分别取样, 做 SDS-PAGE 分析, 将目的蛋白含量较高的甘油菌种用于进一步培养。

种子液的制备: 取上述筛选保存菌种, 按 0.08-0.12%(V/V) 接种于含 100ml 加氨苄青霉素的 LB 培养基的 500ml 三角瓶中 (共 3 瓶), 37℃、220rpm 振荡培养 12 小时。

配制发酵培养基 (以 Yeast Extract 24g/L, Tryptone 12g/L, Glycerol 4ml/L, Na₂HPO₄ · 12H₂O 15.4g/L 浓度配制 3L 加入几滴消泡剂)、补料 (50g Yeast Extract+125ml Glycerol+10g MgSO₄ · 7H₂O/L), 装罐, 发酵罐实消。补料及后补的消泡剂需要单独灭菌。

接种: 当实消发酵罐温度降到 37℃ 时 (灭菌结束后已开始通气), 接上酸碱瓶子 (30% HCl 和 30% NH₃ · H₂O) 设定培养温度 (37℃)、pH 值 (7.15)、初始搅拌速度 (200rpm) 溶氧 (40%, 接种前溶氧值设为 95% 或 100%); 然后将种子液和溶在 5ml 无菌水中的

0.5g 氨苄青霉素一起接种到发酵罐中，开始发酵。

发酵过程控制、记录及检测：

发酵开始后每隔 1 小时，观察并记录各显示参数，如温度、溶氧、搅拌速度等，并取样分析菌密度[方法见系列实验（二）]，用显微镜观察菌型，检查是否污染杂菌。

溶氧控制：当溶氧低于设定值 40% 时，可以通过增加搅拌速度或（和）增加空气流量来增加供氧量，最后可通入空气和纯氧混合气体。

补料控制：培养至适当菌密度（1—2OD₆₀₀）后，开始补入补料培养基，初始速度为 20ml/小时。加入补料速度随着菌生长速度和菌密度可线性增加（生长较慢时）或倍数增加（生长较快）。诱导后若菌生长速度减慢，补料速度改为维持当时值或在当时值的基础上小幅度增加。

pH 控制：加入补料前可不调 pH，任其变化。加入补料后 pH 值高于 7.4 或低于 7.0 时开始调节 pH 值，维持在 7.15 左右。

诱导重组蛋白表达：

诱导：发酵菌密度达到一定值（对数生长中期，OD₆₀₀ 约 15—20）时，对工程菌进行诱导，加入 IPTG 至终浓度 1mM。

外源基因表达检测：开始诱导后，每隔 1 小时，取样、记录和测定如步骤 4（1），还留样做 SDS-PAGE，分析外源蛋白的表达量，方法见系列实验（三）。

发酵结束及停罐放料：诱导培养 4 小时候，终止培养，停止发酵罐控制系统，放料，在 4—10℃、8000rpm、10min 条件离心收集菌体，在 -20℃ 保存。

关闭发酵罐系统总电源、冷却水、压缩空气等的进出阀门。取出 pH 电极和溶氧电极，用蒸馏水冲洗后保存。洗刷发酵罐并加入 2—3L 去离子水放置，备下次使用。

系列实验（一） 大肠杆菌感受态制备及转化

一、实验目的

掌握一种简单的大肠杆菌感受态制备方法和快速转化方法。

二、实验原理

大肠杆菌细胞在有一定浓度的钙离子存在下，其细胞壁和细胞膜会对对外源高分子物质的通透性增强，质粒可以进入其细胞内。

三、仪器和材料

1、菌种及质粒：大肠杆菌 BL21(DE3)、pET32-Leptin 质粒

2、试剂：0.1M MgSO_4 、0.1M CaCl_2 、1×SSC（含 0.15M NaCl、15mM 柠檬酸钠；pH7.0）、无菌 80% 甘油

3、仪器及其他用品：冰浴、恒温水浴、恒温培养箱、LB 固体平板培养基（加氨苄青霉素和没加氨苄青霉素两种）

四、实验方法（所有操作都需要无菌环境）

感受态细胞制备

取保存的 BL21（DE3）菌种接种于 LB 固体培养基，37℃ 培养过夜；

挑取单菌落至 5ml LB 培养基，37℃、200rpm 培养过夜；

按 1: 100 取 1ml 培养菌液转入 100ml LB 液体培养基中，37℃、250rpm 培养至 OD_{600} 为 0.3 左右；

4℃、4000rpm 离心 5 分钟，去上清，加入 2.5ml 0.1M MgSO_4 溶液，悬浮沉淀，冰浴 15 分钟；

4℃、4000rpm 离心 5 分钟，去上清，加入 2.5ml 0.1M CaCl_2 及终浓度 15% 的甘油，悬浮沉淀；

以每管 200 μl 分装，-70℃ 保存备用；

以标准质粒确定感受态细胞的转化率。

感受态细胞的转化：

取 pET32-Leptin 质粒 5 μl （2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ）与 50 μl 新鲜配制的 1×SSC：0.1M CaCl_2 （体积比）=1:2，于冰上混匀放置 90 秒，然后迅速放回冰浴上 1 分钟，取所有转化混合物均匀涂布于 LB 平板（含 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的氨苄青霉素），37℃ 培养 12—16 小时。

系列实验（二）：细菌生长曲线的测定

一、实验目的

了解细菌生长曲线特点及测定原理
学习用比浊法测定细菌的生长曲线。

二、实验原理

将少量细菌接种到一定体积的适合的新鲜培养基中，在适宜的条件下进行培养，定时测定培养液中的菌量，以菌量的对数作纵坐标，生长时间作横坐标，绘制的曲线叫生长曲线。它反映了单细胞微生物在一定环境条件下于液体培养时所表现出的群体生长规律。依据其生长速率的不同，一般可把生长曲线分为延缓期，对数期，稳定期，和衰亡期。这四个时期的长短因菌种的遗传特性，接种量和培养条件的不同而有所改变。因此通过测定微生物的生长曲线，可了解个菌的生长规律，对于科研和生产都具有重要的指导意义。

测定微生物的数量有多种不同的方法，可根据要求和实验条件选用。本实验采用比浊法测定，由于细菌悬液的浓度与光密度成正比，因此可利用分光光度计测定细菌悬液的光密度来推知菌液的浓度，并将所测定的 OD 值与其对应的培养时间作图，即可绘制出该细菌在一定条件下生长曲线，此法快捷简便。

三、仪器和材料

- 1、菌种
大肠杆菌 BL21(DE3)
- 2、培养基
发酵培养基（见主实验）
- 3、仪器及其他用品
721 分光光度计、比色杯、坐标纸

四、实验方法

- (1) 样品：主实验中的样品（见主实验）
- (2) 菌生长量的测定

将未接种的发酵培养基倾倒入比色杯中，选用 600nm 波长分光光度计上调节零点，作为空白对照，并对不同时间取的样品依次进行测定，对浓度大的菌悬液用未接种的发酵培养基适当稀释后测定，使其 OD 值在 0.10~0.65 之间，经稀释后测得的 OD 值要乘以稀释倍数，才是培养液实际的 OD 值。

五、结果

将测定的 OD 值列表，以上述表格的时间为横坐标，OD₆₀₀ 值为纵坐标，在坐标纸上绘制大肠杆菌生长曲线。

系列实验（三）SDS—PAGE 测定蛋白质相对分子量

一、实验目的

学习和巩固 SDS—PAGE 技术操作，对工程菌目的蛋白表达量进行相对定量

二、实验原理

聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)：根据其有无浓缩效应，分为连续系统和不连续系统两大类，连续系统电泳体系中缓冲液 pH 值及凝胶浓度相同，带电颗粒在电场作用下，主要靠电荷和分子筛效应。不连续系统中由于缓冲液离子成分、pH、凝胶浓度及电位梯度的不连续性，带电颗粒在电场中泳动不仅有电荷效应，分子筛效应，还具有浓缩效应，因而其分离条带清晰度及分辨率均较前者佳。

SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳，是在聚丙烯酰胺凝胶系统中引进 SDS（十二烷基磺酸钠），SDS 能断裂分子内和分子间氢键，破坏蛋白质的二级和三级结构，强还原剂能使半胱氨酸之间的二硫键断裂，蛋白质在一定浓度的含有强还原剂的 SDS 溶液中，与 SDS 分子按比例结合，形成带负电荷的 SDS-蛋白质复合物，这种复合物由于结合大量的 SDS，使蛋白质丧失了原有的电荷状态形成仅保持原有分子大小为特征的负离子团块，从而降低或消除了各种蛋白质分子之间天然的电荷差异，由于 SDS 与蛋白质的结合是按重量成比例的，因此在进行电泳时，蛋白质分子的迁移速度取决于分子大小。当分子量在 15KD 到 200KD 之间时，蛋白质的迁移率和分子量的对数呈线性关系，符合下式： $\log MW = K - bX$ ，式中：MW 为分子量，X 为迁移率，k、b 均为常数，若将已知分子量的标准蛋白质的迁移率对分子量对数作图，可获得一条标准曲线，未知蛋白质在相同条件下进行电泳，根据它的电泳迁移率即可在标准曲线上求得分子量。

SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳的成功关键之一是电泳过程中，特别是样品制备过程中蛋白质与 SDS 的结合程度。影响它们结合的因素主要有三个：

液中 SDS 单体的浓度，当单体浓度大于 1mmol/L 时大多数蛋白质与 SDS 结合的重量比为 1:1.4，如果单体浓度降到 0.5 mmol/L 以下时，两者的结合比仅为 1: 0.4 这样就不能消除蛋白质原有的电荷差别，为保证蛋白质与 SDS 的充分结合，它们的重量比应该为 1:4 或 1:3

品缓冲液的离子强度。SDS 电泳的样品缓冲液离子强度较低，通常是 10~100mmol/L 硫键是否完全被还原，采用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法测蛋白质分子量时，只有完全打开二硫键，蛋白质分子才能被解聚，SDS 才能定量地结合到亚基上而给出相对迁移率和分子量对数的线性关系。因此在用 SDS 处理样品同时往往用巯基乙醇处理，巯基乙醇是一种强还原剂，它使被还原的二硫键不易再氧化，从而使很多不溶性蛋白质溶解而与 SDS 定量结合。

许多蛋白质是由亚基（如血红蛋白）或两条以上肽链（如胰凝乳蛋白酶）组成的，它们在 SDS 和巯基乙醇作用下，解离成亚基或单条肽链，因此这一类蛋白质，测定时只是它们的亚基或单条肽链的 MW。

已发现有些蛋白质不能用 SDS-PAGE 测定分子量。如电荷异常或构象异常的蛋白质，带有较大辅基的蛋白质（某些糖蛋白）以及一些结构蛋白，如胶原蛋白等。

采用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法测蛋白质分子量时,往往采取 2 种以上测定方法结合使用。目前其他常用测定相对分子量的方法有:

聚丙烯酰胺梯度凝胶电泳法测定蛋白质的相对分子量(有浓缩样品特点,可分次加样;不需解离亚基,适宜测定球蛋白,而对纤维蛋白有误差。电泳需 2000 伏特小时)

胶层析法测定蛋白质相对分子量(特点方法简单,样品用量少,而且有时不需纯物质,一般不引起生物活性物质的变化。局限性是 pH6-8 的范围内,线性关系比较好,但在极端 pH 时,蛋白质有可能因变性而偏离。

三、实验材料、仪器和试剂

1、实验材料

标准蛋白样品的制备:目前国内外均有厂商生产低相对分子质量(14400~97400)及高相对分子质量(67000~669000)标准蛋白质试剂盒,用于 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)测定未知蛋白质相对分子量,按相对分子质量标准蛋白试剂盒的要求加样品溶解液处理。

未知蛋白样品的制备:将未知蛋白样品按 0.5~1mg/mL 溶液的比例加入样品溶解液中,然后转移到带塞小离心管中,轻轻盖上盖子(不要塞紧,以免加热时迸出),在 100℃沸水浴中保温 3min,取出冷却后加样。如果处理好的样品暂时不用,可放在-20℃冰箱中保存较长时间,使用前在 100℃沸水浴中保温 3min,以除去亚稳聚合态物质。

2、实验器材

- (1) 垂直板电泳装置
- (2) 微量注射器
- (3) 真空抽气泵
- (4) 恒温水浴锅
- (5) 直流稳压电源
- (6) 凝胶成像仪

3、实验试剂

(1) 30%丙烯酰胺(Acr):称 Acr30g,甲叉双丙烯酰胺(Bis) 0.8g,加蒸馏水至 100ml 过滤后置棕色瓶中,4℃贮存可用 1-2 月。

(2) 10%SDS(十二烷基磺酸钠)

(3) 1.5mol/L pH8.8 Tris-HCl 缓冲液:称取 Tris18.2g,加入 50ml 水,用 1mol/L 盐酸调 pH8.8,最后用蒸馏水定容至 100ml。

(4) 1.0mol/L pH6.8 Tris-HCl 缓冲液:称取 Tris12.1g,加入 50ml 水,用 1mol/L 盐酸调 pH6.8,最后用蒸馏水定容至 100ml。

0.05mol/L pH8.0 Tris-HCl 缓冲液:称取 Tris0.6g,加入 50ml 水,用 1mol/L 盐酸调 pH8.0,最后用蒸馏水定容至 100ml。

0%过硫酸铵(AP)

TEMED(四甲基乙二胺)

样品溶解液:SDS(100mg)+巯基乙醇(0.1ml)+溴酚蓝(2mg)+甘油(2g) +0.05mol/L pH8.0 Tris-HCl (2ml),最后定容至 10ml。

固定液:取 50%甲醇 454ml,冰乙酸 46ml 混匀。

染色液：称取考马斯亮蓝 R250 0.125g，加上述固定液 250ml，过滤后备用。

脱色液：冰乙酸 75ml，甲醇 50ml，加蒸馏水定容至 1000ml。

电极缓冲液（内含 0.1%SDS，0.05mol/LTris- 0.384mol/L 甘氨酸缓冲液 pH8.3）：称 Tris6.0g，甘氨酸 28.8g，加入 SDS1g，加蒸馏水使其溶解后定容至 1000ml。

四、操作步骤

1、安装夹心式垂直板电泳槽

夹心式垂直板电泳槽操作简单，不易渗漏。这种电泳槽两侧为有机玻璃制成的电极槽，两个电极中间夹有一个凝胶模，该模由一个凹形硅胶框，长、短玻璃板及样品槽模板（梳子）组成。电泳槽由上贮槽（白金电极在上或面对玻璃板）、下贮槽（白金电极在下或面对玻璃板）和回纹状冷凝管组成。两个电极槽与凝胶模间靠贮液槽螺丝固定。各部分依下列顺序组装：

贮槽和固定螺丝销钉，仰放在桌面上。

将长、短玻璃分别插到硅胶框的凹形槽中。注意勿用手接触灌胶面的玻璃，以保持玻璃洁净。

将已插好玻璃板的凝胶模平放在贮槽，短玻璃板应面对上贮槽。

将下贮槽的销孔对准已装好螺丝销钉的上贮槽，双手以对角线的方式旋紧螺丝帽。竖置电泳槽，在长玻璃板下端与硅胶框交界的缝隙内加入以融化的 2%琼脂液。其目的是封住空隙，凝固后的琼脂中应避免有气泡。

2、凝胶及凝胶板的制备

根据所测定的蛋白质相对分子质量的范围，选择适宜的分离胶，本实验易选用 10% 分离凝胶、5%的浓缩凝胶进行电泳分离。

3、分离胶的制备

去两只小烧杯，一只装水 2.5mL、分离胶缓冲液 2.5mL、分离胶贮液 5.0mL，另一只装过硫酸铵 10.0mL，只真空干燥器中减压除气。将两杯溶液混合后，立即将胶沿玻璃板缓缓注入已准备好的凝胶模子中，注胶过程中应防止气泡产生，胶加到距离玻璃板顶部 3cm 处，立即覆盖 3~5mm 的水层，静置聚合 30~60min，凝胶聚合好的标志是胶与水层之间形成清晰的界面。

4、浓缩胶的制备

分离胶聚合好后，除去水层，并用滤纸吸干。另取两只小烧杯，一只装浓缩胶缓冲溶液 1mL、浓缩胶贮液 5.0mL，另一只装过硫酸铵 6.0mL，抽气混匀后迅速倒在分离胶上层，并插入样品槽模板梳子，静置聚合约 40min。聚合好后，加上电极缓冲液，小心取出样品模板，整理好样品槽备用。

5、加样

用微量加样器按号向凝胶样品槽中加标准蛋白样品和未知蛋白样品，加样的体积根据凝胶的厚度及样品的浓度灵活掌握，一般加样体积为 10~30μL，如样品比较稀可加到 100μL。

6、电泳

加样完毕，上槽接负极，下槽接正极，打开直流稳压电源，开始可用 20~40mA 电流，过了浓缩胶可用 60~80mA 电流进行电泳，待指示剂迁移至距凝胶下端 1cm 处，停

止电泳。

7、染色、脱色

电泳结束后，去玻璃板，取出凝胶平板，将凝胶浸没于染色液中 1h 左右，倾出染色液，用水洗凝胶数次后加入脱色液，数小时换液一次，直至背景清晰。

五、分析计算

1、绘制标准曲线：

2、按下式计算相对迁移率：

相对迁移率 (m) = 样品迁移距离(cm) / 指示剂迁移距离(cm)

以每个蛋白标准的分子量对数对它的相对迁移率作图得标准曲线，量出未知蛋白的迁移率即可测出其分子量，这样的标准曲线只对同一块凝胶上的样品的分子量测定才具有可靠性。

六、注意事项

在 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳中，需要高纯度的 SDS，市售化学纯度的 SDS 需要重结晶一次或两次方可使用。Acr、Bis 凝胶贮液最好经过滤后再使用，所用的水最好为双蒸水。

SDS 于蛋白质的结合：SDS 用量约为样品量的 10 倍以上，样品溶解液应采用低离子浓度，最高不超过 0.26mol/kg，以保证样品溶解液中有较多的 SDS 单体。在处理蛋白样品时，每次都应在沸水浴中保温 3~5min，以免有亚稳聚合态存在。

凝胶浓度：应根据未知样品估计的相对分子质量选择凝胶浓度，不同凝胶浓度适用于不同的相对分子质量范围，在此范围内样品相对分子质量的对数与迁移率呈直线关系。以上各种凝胶浓度其交联度都应是 2.6%。标准蛋白质的相对迁移率最好在 0.2~0.8 之间均匀分布。每次测定相对分子质量只是蛋白质亚基或单条肽链的相对分子质量，而不是完整的相对分子质量。

对样品的要求：应采用低离子强度的样品，如果样品中离子强度高，则应通过透析或离子交换除盐。

由于凝胶中含有 SDS，直接制备干胶板会产生龟裂现象，为了方便，常采用凝胶成像仪照相法保存胶片。

实验三 乳酸发酵与酸奶制作

一、实验目的和要求

学习发酵剂的调制及酸乳的制作方法。

(一) 发酵剂的制备

1、仪器及材料

2~5mL 灭菌吸管 2 支、铂耳 1 支、50~100mL 灭菌量筒 2 个、酒精灯 1 盏、脱脂乳培养基（20mL 试管装 2 支，200~300mL 三角瓶装 2 瓶）、恒温箱（共用）。

2、操作过程

(1) 菌种的选择与活化：制作酸乳制品用发酵剂之菌种一般由专门实验室保存，使用者应根据生产之酸乳制品种类进行选择（参阅表 4—1）并活化。

活化按无菌操作进行，菌种为液体状时，用灭菌吸管吸 1~2mL 接种于灭菌脱脂乳的试管中，菌种为粉状的用铂耳取少量接种混合，然后置于恒温箱中根据不同菌种的特性（参见表 4—1）选择培养温度与时间，培养活化，活化可进行 1 至数次，依菌种活力确定。

(2) 调制母发酵剂：取制备母发酵剂用脱脂乳量 1% 的充分活化的菌种，接种于盛有灭菌脱脂乳的三角烧瓶中，充分混匀后，置于恒温箱中培养。供制生产发酵剂用。

(3) 调制生产发酵剂：取制备生产发酵剂用脱脂乳量 1~2% 的母发酵剂接种于盛有灭菌脱脂乳的三角烧瓶中，充分混合后置于恒温箱中培养。供生产酸乳制品时使用。

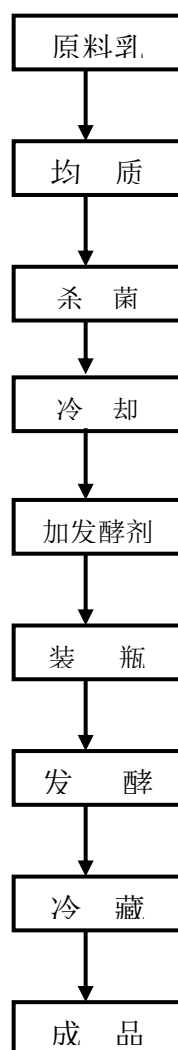
表 4—1 酸乳制品发酵剂种类及菌种特性

发酵种类	菌种	主要机能	发育最适温度 (°C)	最适温度下凝乳时间 (h)	极限酸度 (°T)	适应的酸乳制品
乳酸杆菌	L.bulgaricus	产酸生香	45~50	12	300 ~ 400	酸凝乳、牛乳酒 马乳酒
	L.helveticus	产酸生香	40~42			
	L.acidophilus	产酸	45~50	12	300 ~ 400	嗜酸菌乳
	L.casei	产酸	45~50	12	300 ~ 400	液状酸凝乳
乳酸球菌	Str.thermophilus	产酸	50			酸凝乳
	Str.lactis	产酸	30~35	12	120	人工酪乳酸稀奶油
	Str.cremoris	产酸	30	12—14	110 ~	人工酪乳酸稀奶油
	Str.diacetilactis	产酸生香	30	18—48	115	人工酪乳酸稀奶油
	Stu.cremoris	生香	30	—	100 ~ 105	人工酪乳酸稀奶油

					—	
酵 母	Candida reffyr Kluyveromyces fragilis	生 醇 醇 及 CO ₂	16~20	15—18		牛 乳 酒

(4) 发酵剂质量检查：质量合格的发酵剂凝块硬度适宜，均匀而细滑，有弹性，无龟裂、气泡及乳清分离。酸味及风味与活力等均符合菌种特性要求。达到上述质量之生产发酵剂准予用于生产酸乳制品。调制好之发酵剂不立即使用时应置于冰箱中保存。

二、酸奶（Yoghurt）的制作



1、仪器材料

500~1000mL 三角瓶或小奶桶 1 个，50~100mL 灭菌量筒 2 个，灭菌的酸奶瓶若干个，灭菌勺 1 个，温度计、玻璃棒各 1 支，酸奶发酵剂 1 瓶，原料乳 500mL。

2、工艺流程

全乳或脱脂乳

一般压力为 18~20Mpa

90~95℃，5~10min

37~45℃（接种温度）

2~3%(*L.bulgaricus* 和 *thermophilus* 1:1 组成混合发酵剂) 适量

至规定容量（一般距瓶口 1~2cm）

42~45℃，最佳 42.5℃ 3~4h 酸度达 0.65~0.80%（发酵时间和温度视菌种而不同）

后熟 12~24h，0~5℃。

酸度 0.85~0.90%，无气泡和乳清

3、制作方法

（1）将原料乳滤入大三角瓶或小奶桶中，置于水浴上加热杀菌，90~95℃，5min。

（2）取出冷水冷却至 45℃。

（3）先用洁净之灭菌勺，将发酵剂表层 2~3cm 除掉，再用灭菌玻棒搅成稀奶油状。

（4）灭菌量筒量取乳量 3% 的生产发酵剂，先用等量灭菌乳混匀后倒入冷却乳中，充分混匀。

（5）装瓶 加发酵剂混匀后尽快分装于灭菌的酸乳瓶中，再用纸包好瓶口。

（6）置于 42℃ 恒温箱中培养发酵 3~4h。发酵结束后 5℃ 下贮存 12h。

4、注意事项

（1）本法采用先加发酵剂后分装的发酵方法，故加发酵剂后应尽快分装完毕。做到无菌操作，防止二次污染。

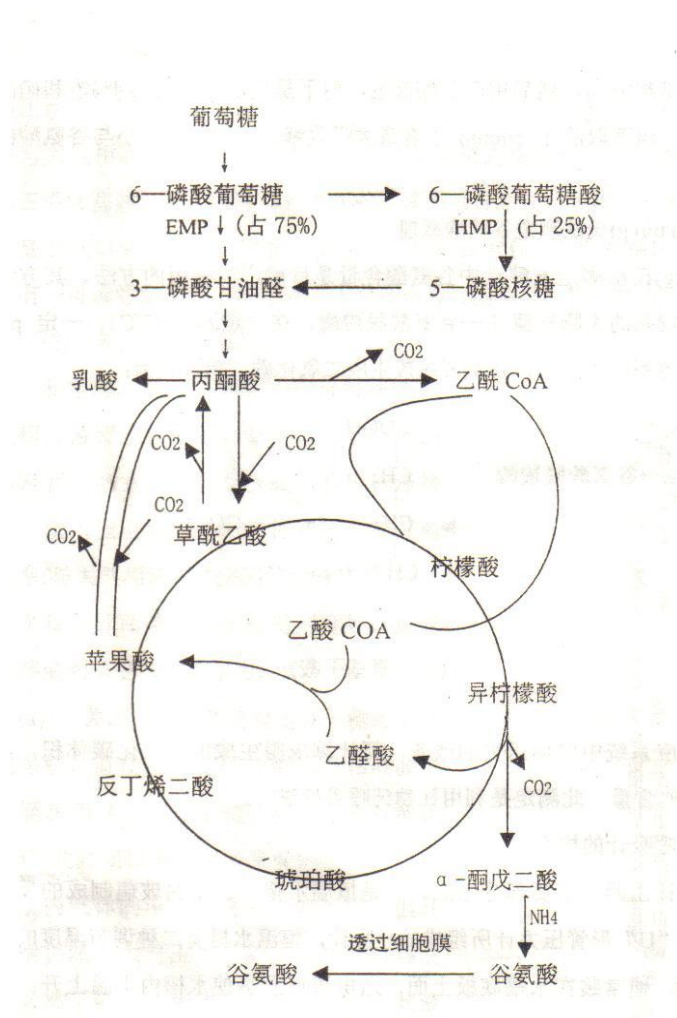
实验四 谷氨酸发酵

一、目的与要求

- 1、了解谷氨酸发酵的一般工艺过程
- 2、考察生物素对谷氨酸发酵的影响
- 3、掌握发酵液中谷氨酸的定量测定方法

二、实验原理

1、谷氨酸发酵 谷氨酸产生菌利用培养基中葡萄糖或其他碳源，经过糖的酵解途径（EMP 途径）、磷酸己糖途径（HMP 途径）、三羧酸循环、乙醛酸循环、伍德-沃克曼反应（CO₂ 的固定反应）等先合成 α-酮戊二酸，然后在铵离子存在下，经过还原性氨基化合转氨作用合成谷氨酸。其过程如下图所示。



谷氨酸发酵是一个复杂的生化过程，受菌体本身的生理特性和环境条件的调节，如溶解氧、温度、pH、NH₄⁺浓度等因素的影响，尤其是生物素，它是谷氨酸发酵的限制

因子。如果培养基中生物素含量高，菌的生长旺盛，但谷氨酸的积累迅速降低，且生成乳酸。更主要的是过量生物素的存在，引起细胞膜脂肪酸组成的改变，特别是油酸和磷脂含量的增多，减少了细胞膜透性，影响谷氨酸释放，进而抑制谷氨酸生产。但生物素含量又不能过少，因它是谷氨酸产生菌正常生长代谢所必需的营养物质。所以控制生物素在亚适量情况下，使细胞膜对谷氨酸的渗透性增大，谷氨酸才能大量分泌，从而提高谷氨酸的产量。

2、纸层析定量法测定谷氨酸原理

纸层析定量法是将发酵液中的谷氨酸定量的点样在层析滤纸上进行层析，使谷氨酸与其它氨基酸分离，然后用茚三酮显色，剪下呈色部分，用 0.4% 饱和硝酸酮甲醇溶液萃取，该萃取液在 506nm 下有最大吸收峰。消光值的大小与谷氨酸的含量成正比。

三、材料及试剂

1、菌种

谷氨酸产生菌 T0—13 普通琼脂斜面菌种

2、培养基

斜面培养基(%) 葡萄糖 0.5, 蛋白胨 1.0, 酵母膏 0.5, NaCl 0.25, 琼脂粉 1.2, pH7.0~7.2

种子培养基(%) 葡萄糖 2.2, 玉米浆 3.3, 尿素 0.5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.04, K_2HPO_4 0.1, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 7ppm, $\text{FeSO}_4 \cdot \text{XH}_2\text{O}$ 7ppm, pH6.7。250ml 三角瓶装量 20ml.

发酵培养基(%) 葡萄糖 13, 尿素 1.2 (分消), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.06, K_2HPO_4 0.16, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 2ppm, $\text{FeSO}_4 \cdot \text{XH}_2\text{O}$ 2ppm, pH7.0。250ml 三角瓶装量 20ml.

为考察生物素对发酵的影响，发酵培养基中玉米浆按以下三种情况配制：

1# 不加玉米浆 2# 加 1%玉米浆(湿重) 3# 加 6%玉米浆(湿重)

以上培养基采用蒸汽灭菌：0.1Mpa, 30min。

3、其它试剂

- (1) 2%硫酸镁溶液
- (2) 0.4%饱和硝酸铜甲醇溶液
- (3) 茚三酮显色剂
- (4) 展层剂
- (5) 压力计液
- (6) 6mg/ml 谷氨酸标准品溶液
- (7) 5%硝酸
- (8) 0.85%生理盐水
- (9) 2M pH4.2 乙酸—乙酸钠缓冲液
- (10) 2%酶悬浮液
- (11) 洗液
- (12) 水银
- (13) 丙酮

4、器材

接种环	10ml 离心管
5ml 大口移液管	12X120mm 试管

250ml 三角瓶	30X15cm 层析纸
纱布盖	Φ40cm 高 19cm 层析缸
牛皮纸	喉头喷雾器
线绳	10 μl 微量注射器
铅笔、尺	吹风机
针、线	烘箱
721 分光光度计	电磁搅拌器
布氏漏斗	真空泵

四、实验步骤

1、谷氨酸发酵

将冰箱保藏的谷氨酸产生菌 T0—13 取一环接种于普通琼脂斜面上，32℃恒温培养 20~24h。取斜面菌苔接入种子瓶（18X180mm 试管斜面，每支可接 5 瓶），于 30~32℃摇床，培养 24h。吸取培养好的种子液 1ml 接入发酵瓶中（接种前将消后的尿素混合到发酵培养基中），30~32℃摇床，培养 48h（发酵 19h 左右补 24%尿素 1ml）。

2、发酵液的预处理

将发酵液经 3000rpm 离心 20min，取上清液稀释 5 倍。

注：上清液一定要澄清，否则要重新离心，以免影响含量测定。

3、谷氨酸含量的测定

纸层析定量分析法

点样

在层析滤纸下端 3cm 处画一横线，等分四点，用微量注射器分别取标准品和样品各 10 μl 点样。

注：谷氨酸标准品溶液浓度为 6mg/ml

展层

将层析滤纸固定成圆柱形，放入层析缸中，展层约 18h，取出自然风干。

显色

用茚三酮显色剂均匀喷雾，立即放入 60℃烘箱中反应 15min。

抽提

将显色部分快速剪下，放入装有 8ml 0.4%饱和硝酸铜的甲醇溶液的试管中，抽提 30min 并适当振荡。

比色测定

以 0.4%饱和硝酸铜的甲醇溶液作对照，在 506nm 波长下，分别测定上述溶液的消光值，然后查谷氨酸标准曲线，所得的值乘以稀释倍数，即为发酵液中谷氨酸含量（mg/ml）。

标准曲线的绘制：

标准样品溶液浓度分别为 0.5，1，2，4，6mg/ml，点样 20 μl，操作同上，以谷氨酸浓度为横坐标，以消光值为纵坐标，绘制标准曲线。