

SHENGWU
GONGCHENG
ZHUANYE
SHIYAN ZHIDAO

主编 潘训海 罗惠波

生物工程 专业实验指导



西南交通大学出版社

[Http://press.swjtu.edu.cn](http://press.swjtu.edu.cn)

013029835

Q81-33
20

生物工程专业实验指导

主 编 潘训海 罗惠波
副主编 邓 静 宗绪岩



Q81-33
20

西南交通大学出版社



北航

C1635533

008820010

图书在版编目 (C I P) 数据

生物工程专业实验指导 / 潘训海, 罗惠波主编. —
成都: 西南交通大学出版社, 2012.9
ISBN 978-7-5643-1943-4

I. ①生… II. ①潘…②罗… III. ①生物工程—实
验—高等学校—教材 IV. ①Q81-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2012) 第 207423 号

生物工程专业实验指导

主编 潘训海 罗惠波

责任编辑	牛 君
封面设计	原谋书装
出版发行	西南交通大学出版社 (成都二环路北一段 111 号)
发行部电话	028-87600564 87600533
邮 编	610031
网 址	http://press.swjtu.edu.cn
印 刷	成都蓉军广告印务有限责任公司
成品尺寸	170 mm×230 mm
印 张	7
字 数	125 千字
版 次	2012 年 9 月第 1 版
印 次	2012 年 9 月第 1 次
书 号	ISBN 978-7-5643-1943-4
定 价	15.00 元

图书如有印装质量问题 本社负责退换
版权所有 盗版必究 举报电话: 028-87600562

《生物工程专业实验指导》

编委会

主 编 潘训海 罗惠波

副主编 邓 静 宗绪岩

编 委 (按姓氏笔画为序)

邓 静 左 勇 边名鸿 李 丽 吴华昌

张 静 明红梅 周 健 宗绪岩 赵长青

前 言

生物工程是一门新兴的综合性应用学科,被视为 21 世纪三大前沿学科之一。生物工程专业的学生必须具备良好的工程素质,即学生在掌握多学科知识的基础上,必须具备在生产实践中独立分析问题和解决问题的综合能力。专业实验教学是培养学生掌握专业技能的重要实践环节,生物工程专业开设专业实验是培养、提高学生动手能力和工程素质的有效手段之一。

四川理工学院自 1983 年开设发酵工程专业(后更名为生物工程专业),近 30 年来,该专业立足四川,面向全国,结合特殊地域经济形成了以传统酿造为特色,特别是以白酒为特色的生物工程研究领域。由于生物工程发展迅速,本书是编者在四川理工学院生物工程专业所开设实验的基础上,结合其他高校的情况整理编写的一本实验指导教材。本书涵盖了菌种制备、发酵过程代谢调控、提取分离、分析检测四部分内容,书后摘编了与实验相关的附录与参考文献。

本书可作为高等院校生物工程专业实验教学用书,也可作为高等院校和师范院校生物科学、生物技术和食品科学等相关专业本、专科学习用书,还可供从事生物工程、微生物发酵行业的企业和研究所人员参考。

由于编者水平有限,书中难免有不妥之处,衷心希望读者批评指正。

编 者

2012 年 6 月

目 录

第一部分 生物工程专业实验基础知识	1
第一节 实验规则	1
第二节 实验室的安全	2
第二部分 生物工程实验	5
实验一 细菌生长曲线的测定	5
实验二 霉菌的固态培养	8
实验三 酵母流加培养实验	13
实验四 麦芽汁的制备	16
实验五 淀粉水解糖的制备	18
实验六 L-谷氨酸的发酵与提取	21
实验七 酒精发酵	25
实验八 柠檬酸发酵	32
实验九 醋酸发酵	36
实验十 食醋酿造	39
实验十一 酱油酿造	45
实验十二 青霉素的发酵实验	51
实验十三 溶媒萃取法分离纯化青霉素	55
实验十四 红豆杉细胞培养	57
实验十五 小曲酒的酿造	62
实验十六 葡萄酒酿造	64
实验十七 啤酒工艺综合实验	74
实验十八 大蒜细胞 SOD 的提取和分离	78
实验十九 从黄连中提取黄连素	83
实验二十 离子交换法提取溶菌酶	86
实验二十一 白酒的品评	89
实验二十二 啤酒的品评	93

附 录	98
附录 A 常用培养基的配制	98
附录 B 常用有机溶剂沸点、相对密度表	100
附录 C 化学试剂的规格	101
附录 D 葡萄酒感官要求	102
附录 E 葡萄酒理化要求	103
参考文献	104

第一部分

生物工程专业实验基础知识

第一节 实验规则

生物工程专业实验是生物工程专业学生必修的一门实践课程，为保证实验教学顺利进行，培养学生良好的实验习惯和工作作风，要求学生遵守以下实验规则：

- (1) 实验前必须认真预习有关实验的全部内容，明确实验目的和要求，掌握实验原理，了解实验中的注意事项，写好实验预习报告。
- (2) 实验预习报告须经实验指导教师检查通过后方可进入实验室。
- (3) 备齐实验记录本及与实验有关的其他用品后方能进行实验。
- (4) 必须遵守实验室的纪律和各项规章制度。实验时保持安静，不大声说笑和喧哗，不乱拿乱放，损坏东西应如实登记，出了问题必须及时报告。
- (5) 实验进行中要听从指导教师安排，严格按照实验步骤和操作规程进行实验。仔细观察，积极思考，认真动手，如实记录、整理实验数据，按时上交实验报告。
- (6) 保持实验室整洁，做到实验台面、地面、水池及各种实验仪器洁净。
- (7) 公用药品、仪器和工具应在指定地点使用，用后立即归还原处并保持其整洁，严禁药品瓶盖及药勺混杂。
- (8) 注意节约原则，配制试剂按实验实际使用量配制，可回收、重复利用的药品及器材用后应及时回收，不得丢弃。
- (9) 使用贵重精密仪器应严格遵守操作规程。仪器发生故障应立即报告教师，未经许可不得自己随意检修。

(10) 实验室内严禁吸烟、饮水和进食。

(11) 实验完毕必须及时做好后处理工作，洗净并放好各种玻璃仪器，处理废物、检查安全，并将实验记录交指导教师审阅，通过后方可离开实验室。

(12) 实验完毕，值日生主要负责整理公用仪器、药品，认真做好实验室的卫生值日工作。协助实验室工作人员检查并关好水、电、门、窗。

第二节 实验室的安全

在生物工程专业实验中，经常使用各种易燃、易爆、有毒药品，同时，实验中还会接触各种微生物，在操作中还要进行高温、高压等操作，因此，实验室潜在各种危险因素。如不注意，这些危险因素可能引发各种事故，造成环境污染和人身伤害，甚至危及人的生命安全。只要我们熟悉各种药品、仪器、设备的性能，提高警惕，严格按照操作规程进行实验，加大安全防护措施，事故是可以避免的。

一、化学药品的正确使用和安全防护

实验过程中可能会用到的易燃、易爆及有毒物质有：可燃气体，如氢气、甲烷、乙烯、液化石油气等；可燃液体，如乙醚、丙酮、苯、乙醇等；可燃性固体，如石蜡、合成纤维、五硫化磷、三硫化磷等；爆炸性物质，如过氧化物、硝基或亚硝基化合物、乙炔类化合物等；有毒物质，如酸类蒸气、氯气、苯胺类等。

1. 防火与防爆

防火、防爆措施应针对易燃、易爆物的用量和蒸气浓度进行有效控制。当发生火灾时必须根据火灾的大小、燃烧物的类别及环境情况选用合适的灭火器材。当电器发生火灾时，应立即切断电源，再进行灭火，如不能切断电源，切忌用水灭火，以防二次事故发生，应立即报火警，并说明情况。

2. 防灼伤

在实验室，高温、液氮、强酸、强碱、强氧化剂、苯酚等物质都会灼伤

皮肤，应注意避免与皮肤直接接触，尤其应防止化学药品溅入眼中。

3. 防 毒

大多数化学药品都有一定的毒性，在使用有毒物质时，首先要了解所用药品的毒性、性能及防护措施。采用通风、排毒、隔离等安全防范措施。尽可能用无毒或低毒物质替代高毒物质。发生中毒事件时，应在现场做一些必要的处理，同时应尽快送医。

二、设备的正确使用

生物工程实验中制备培养基、接种、发酵及提取分离过程都会用到大量设备，在使用相关设备前一定要认真阅读设备的操作规程，并严格按照操作规程进行操作，确保设备使用过程中水、电、气的正确使用，如小型发酵罐的供水压力在 0.1 MPa，而中试规模发酵罐的供水压力在 0.5 MPa。另外，生物实验中会产生大量废水，冷却水可以直接排放，有毒废水应按照有关规定进行处理后排放。电气设备要接地线，要安装漏电保护装置，严禁用潮湿的手接触电器按钮。修理或安装电器时，应先切断电源，不带电操作。实验室内严禁随意拖拉电线，使用马弗炉等电热设备时，应由专人负责看守，不得离开现场。实验室中使用蒸气的地方主要有发酵罐的杀菌、培养基的高压蒸气灭菌和大型发酵罐的温度控制等。实验室内的蒸气管路系统应具有防护套，在实验操作时应该熟悉蒸气管路，正确开启或关闭蒸气阀门，确保灭菌或温度控制效果。

当发生触电事故时，应迅速切断电源，如不能及时切断电源，应立即用绝缘的东西使触电者脱离电源。在将触电者移至适当地方后，及时解开衣服，使全身舒展，并立即找医生进行处理。如触电者已处于休克状态等危急情况下，应立即实施人工呼吸及心脏按压，直至救护医生到现场。

三、生物安全性

生物工程实验往往涉及各类微生物，而有一部分微生物会对人体健康造成危害。生物危害可分为四类，第 I 类微生物为已经确定，并且有特征表明

不一定使健康成人致病的活菌株，对实验人员和周围环境影响极小，如蜡状芽孢杆菌、家禽阿米巴原虫以及犬温热病毒等。第Ⅱ类微生物为天生具有中等危险的广谱病原学因子，存在于公众之间，并与人类多种严重疾病有着联系，如肝炎病毒（甲型、乙型、丙型）、沙门菌属和弓形虫属以及常见的葡萄球菌、链球菌和麻疹、骨髓灰质炎、肠炎等的病原体。在敞开的实验工作台操作这类因子时，即使具备熟练的微生物实验技巧，也会导致潜在的生物危害。第Ⅲ类微生物为能够引起严重或致命性感染的病原体，不管它是天生的还是外来的，如结核分枝杆菌、圣路易型脑炎病毒以及贝纳立克次体（Q热病原体）等。第Ⅳ类微生物为能够引起高度危险甚至威胁生命的疾病的病原体，不管它是天生的还是外来的，如 Marburg（青猴热）或 Congo-crimean（刚果-克里米亚）出血热病毒等的病原体。

因此，在进行生物工程实验时，要注意生物安全性，实验室产生的废液、废气和废渣都必须经过处理才能排放。同时在实验过程中还要注意以下内容：

- （1）禁止在实验室内喝水、吸烟、吃东西。
- （2）微生物必须在封闭的容器中培养，接种环使用后必须灼烧，移液器头和其他污染物必须放在专用容器内。
- （3）如果微生物沾染衣服、工作设备或工作地点，必须用消毒液消毒。
- （4）移液操作时，不能用嘴吸吸液管，可使用移液枪。
- （5）使用各种塞、盖时，不允许沾上培养物。
- （6）结束工作后，清理并清洁工作台。在工作台上应只有必需材料和设备，使用后的废物容器须在指定地点及时清理。

第二部分

生物工程实验

实验一 细菌生长曲线的测定

一、实验目的

- (1) 了解细菌生长曲线的特点及测定原理。
- (2) 学习用比浊法测定细菌的生长曲线。

二、实验原理

大多数细菌的繁殖速率很快，在合适的条件下，一定时期的大肠杆菌细胞每 20 min 分裂一次。将一定量的细菌转入新鲜液体培养基中，在适宜的条件下培养细胞要经历延迟期、对数期、稳定期和衰亡期四个阶段。以培养时间为横坐标，以细菌数目的对数或生长速率为纵坐标作图，所绘制的曲线称为该细菌的生长曲线。不同的细菌在相同的培养条件下其生长曲线不同，同样的细菌在不同的培养条件下所绘制的生长曲线也不相同。

测定微生物的数量有多种不同的方法，可根据要求和实验室条件选用。本实验采用比浊法测定，在一定的范围内，微生物细胞浓度与透光度成反比，与光密度（OD 值）成正比。因此可利用分光光度计测定菌悬液的光密度来推知菌液的浓度，并将所测的 OD 值与其对应的培养时间作图，即可绘出该菌在一定条件下的生长曲线，此法快捷、简便。

三、实验器材

1. 菌 种

大肠杆菌。

2. 培养基

LB 液体培养基、牛肉膏蛋白胨液体培养基。

3. 仪器和器具

721 分光光度计、比色杯 (1 cm)、恒温摇床、无菌吸管 (5 mL)、大试管、三角瓶 (250 mL)。

四、实验步骤

实验流程为：

标记→接种→培养→测定

1. 标 记

取 11 支无菌大试管，用记号笔分别标明培养时间，即 0, 1.5, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 和 20 h。

2. 接 种

分别用 5 mL 无菌吸管吸取 2.5 mL 大肠杆菌过夜培养液(培养 10~12 h)转入盛有 50 mL 液体培养基的三角瓶内，混合均匀后分别取 5 mL 混合液加至上述标记的 11 支无菌大试管中。

3. 培 养

将已接种的试管置摇床 37 °C 振荡培养 (振荡频率 200~250 r/min)，分别培养 0, 1.5, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 和 20 h，将标有相应时间的试管取出，测定其光密度值。

4. 比浊测定

用未接种的液体培养基作空白对照，选用 600 nm 波长进行光电比浊测

定。对细胞密度大的培养液用液体培养基适当稀释后测定，使其 OD_{600} 在 0.1 ~ 0.65（测定 OD 值前，将待测定的培养液振荡，使细胞均匀分布）。

五、实验结果

（1）将测定的 OD 值填入表 1.1（保留至小数点后两位）。

表 1.1 细菌的 OD 值测定结果

培养时间/h	0	1.5	3	4	6	8	10	12	14	16	20
OD_{600}											

（2）以表 1.1 中的时间为横坐标， OD_{600} 值为纵坐标，绘制大肠杆菌的生长曲线。

六、注意事项

- （1）测定 OD 值时，要求从低浓度到高浓度测定。
- （2）严格控制培养时间。

思考题

- （1）根据实验数据画出生长曲线，并说明细菌生长特征。
- （2）若同时用平板计数法测定，所绘出的生长曲线与用比浊法测定绘出的生长曲线有何差异？为什么？
- （3）次生代谢产物的大量积累在哪个时期？根据细菌生长繁殖的规律，采用哪些措施可使次生代谢产物积累更多？

实验二 霉菌的固态培养

一、实验目的

- (1) 学习掌握米曲霉固态培养的方法。
- (2) 掌握蛋白酶测定方法

二、实验原理

1. 米曲霉固态培养原理

霉菌是多细胞真菌的代表，是典型的好氧微生物。在酶制剂、柠檬酸、调味品等发酵工业中应用极为广泛。米曲霉是霉菌的一种，能产蛋白酶、淀粉酶、脂酶等多种酶，广泛用于酱油、酱类产品的制作，形成酱油和酱类物质独特的色、香、味、体。将纯种的米曲霉接种在麸皮培养基上，在适宜的温度和湿度下，米曲霉利用空气中的氧和麸皮中的营养成分生长繁殖，并分泌各种酶。

2. 蛋白酶活力测定原理

蛋白质或多肽水解后生成的含苯环氨基酸对 275 nm 波长紫外光具有最大的吸收值。利用蛋白酶催化酪蛋白前后在三氯醋酸可溶物中紫外线光密度的变化，可测定酶活力的高低。

三、实验器材

1. 材 料

麸皮、面粉、豆饼粉。

2. 试 剂

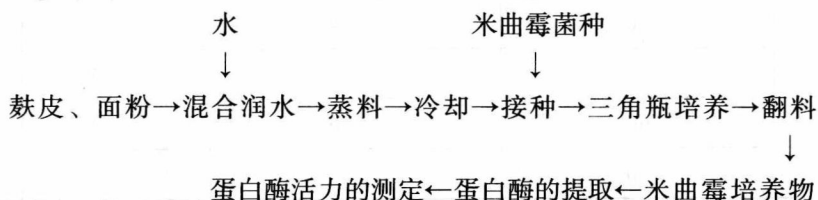
米曲霉菌种，2%酪蛋白，0.4 mol/L 三氯醋酸，4%氯化钠等。

3. 仪 器

三角瓶、恒温培养箱、恒温水浴锅、751 分光光度计、高压灭菌锅。

四、实验步骤

(一) 工艺流程



(二) 操作方法

1. 米曲霉固态培养的操作方法

(1) 配料：称取一定量的麸皮和面粉 (4 : 1)，加入 50% 的自来水，装入 250 mL 三角瓶中，用玻璃棒充分混合均匀，并用四层纱布盖在瓶口，上面再用牛皮纸包扎好。

(2) 灭菌：将包扎好的三角瓶放入灭菌锅中，在 121 °C 下灭菌 30 ~ 40 min，然后取出冷却到 40 °C 左右。

(3) 接种：将 3 ~ 5 mL 米曲霉孢子悬浮液接入三角瓶中，摇匀。

(4) 培养：将三角瓶放入恒温培养箱中，控制温度在 30 °C 左右进行培养。培养 72 h 后结束。

(5) 观察并记录不同时期米曲霉生长的现象。

2. 酶活力的测定方法

(1) 标准曲线的绘制。

根据表 2.1 配制不同浓度的酪氨酸标准溶液，然后在 275 nm 测定其吸光度 (A)。以吸光度 A 为纵坐标，酪氨酸的浓度为横坐标，绘制标准曲线，找出回归方程，并计算出当吸光度为 1 时酪氨酸的量，即为吸光常数 K 值。

表 2.1 酪氨酸标准溶液配制表

管号	酪氨酸标准溶液的浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	取 100 $\mu\text{g/mL}$ 的酪氨酸 标准溶液的体积/mL	取水的体积 /mL	吸光值
0	0	0	10	
1	10	1	9	
2	20	2	8	
3	30	3	7	
4	40	4	6	
5	50	5	5	
6	60	6	4	
7	70	7	3	

(2) 酶液的制备。

精确称取米曲霉成曲 (5 g), 加入 100 mL 4% 的 NaCl 溶液, 在 40 °C 中恒温 40 min 提取酶液, 用纱布过滤除去固形物。取酶液 1 mL 用缓冲液稀释到一定的浓度, 再取稀释的酶液 1 mL 进行酶活力的测定。

(3) 酶活力的测定。

取试管 2 只, 每只试管加入样品稀释液 1 mL, 置于 40 °C 水浴中预热 2 min, 再各加入经同样预热的酪蛋白 5 mL, 精确保温 10 min。时间到后, 各管立即加入 0.4 mol/L 三氯醋酸 5 mL, 以终止反应。继续在水浴中保温 20 min, 使残余蛋白质沉淀后离心分离或过滤。取滤液用 751 分光光度计在 275 nm 处测定其吸光度。

空白实验: 测定方法同上, 仅在加酪蛋白之前先加 0.4 mol/L 三氯醋酸 5 mL, 使酶失活, 再加酪蛋白。

计算: 在 40 °C 每 1 min 水解酪蛋白产生 1 μg 酪氨酸, 定义为一个蛋白酶活力单位。

$$\text{酶活力 (单位)} = \frac{\Delta A \times k \times V}{t} \times \frac{N}{m} \quad (\text{U/g})$$

式中 ΔA —— 在 275 nm 波长下, 样品测定与空白实验的吸光值差;

k —— 常数, 由标准曲线得出, 数值上等于 A 为 1 时所相当的酪氨酸的质量;