



全国普通高等院校生物实验
教学示范中心“十三五”规划教材

生物工程实验模块 指导教程

郭小华 梁晓声 汪文俊◎主编



华中科技大学出版社

<http://www.hustp.com>



全国普通高等院校生物实验
教学示范中心“十三五”规划教材

生物工程实验模块 指导教程

主 编 郭小华 梁晓声 汪文俊

副主编 张 莉 王海英 熊海容

编 委 (以姓氏笔画为序)

王海英 中南民族大学

吴元喜 华中科技大学

汪文俊 中南民族大学

张 莉 中南民族大学

张华山 湖北工业大学

陈 悟 武汉纺织大学

钟方旭 武汉轻工大学

郭小华 中南民族大学

梁建军 中南民族大学

梁晓声 中南民族大学

熊海容 中南民族大学



华中科技大学出版社

<http://www.hustp.com>

中国·武汉

内 容 简 介

本书是生物工程相关专业模块化实验教学的指导教材,强调实验教学中本科生探究能力和实践技能综合能力的训练和提高。全书涉及面广,根据生物工程模块化教学体系的需要包括了多门核心课程的实验教学内容。

全书共分四篇:酶工程实验、发酵工程实验、生物分离工程实验、生物工程综合大实验。每个实验都配备了思考题,可以帮助学生分析总结相关实验内容。附录部分为生物工程方面的常用数据,便于学生根据实验需要查找使用。

本书适合作为高等院校生物工程相关专业本、专科学生的教材或参考用书,也可供相关实验技术工作者参考。

图书在版编目(CIP)数据

生物工程实验模块指导教程/郭小华,梁晓声,汪文俊主编. —武汉:华中科技大学出版社,2016.8
国家级实验教学示范中心系列规划教材
ISBN 978-7-5680-2042-8

I. ①生… II. ①郭… ②梁… ③汪… 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(2016)第 155545 号

生物工程实验模块指导教程

郭小华 梁晓声 汪文俊 主编

Shengwu Gongcheng Shiyān Mokuāi Zhidào Jiāochéng

策划编辑:罗 伟

责任编辑:罗 伟

封面设计:原色设计

责任校对:张 琳

责任监印:周治超

出版发行:华中科技大学出版社(中国·武汉)

武昌喻家山 邮编:430074 电话:(027)81321913

录 排:华中科技大学惠友文印中心

印 刷:武汉鑫昶文化有限公司

开 本:787mm×1092mm 1/16

印 张:10

字 数:235 千字

版 次:2016 年 8 月第 1 版第 1 次印刷

定 价:28.00 元



本书若有印装质量问题,请向出版社营销中心调换
全国免费服务热线:400-6679-118 竭诚为您服务
版权所有 侵权必究

前言

QIANYAN

生物工程在当前高新技术产业中占据有重要地位,是生物技术领域的重要分支,生物工程产业在我国已经形成了具有一定规模的现代产业,并在不久的将来有望成为国家支柱产业之一。生物工程专业的学生在专业学习过程中,缺乏对生物工程产业链的系统认识,知识点较为分散,难以将生物工程的相关知识内容有机融合,因而对相关知识的实训学习感觉困难。本书与生物工程专业的教学要求相结合,整合了编写人员的相关课题成果,并且根据生物工程的知识模块教学需要针对性地安排实验内容。编写过程中,强化学生的实践和实训教学,培养学生理论联系实际、实事求是的学风以及分析和解决专业实际问题的能力,帮助学生掌握基本的专业实验技术和操作技能,提高学生的自学能力和创新能力。

本书涵盖了生物工程专业多门核心课题,如酶工程、发酵工程、生物分离工程等实验教学内容。在上一版本《生物工程专业实验教程》的基础上,由中南民族大学、湖北工业大学等长期从事实践教学的一线专业教师进行了进一步的修订和完善。全书共分为四篇:酶工程实验、发酵工程实验、生物分离工程实验、生物工程综合大实验。在实验内容上突出重难点,对实验方法进行了比较细致的叙述,有些内容还补充了简明实验流程,帮助学生整体把握实验操作要点。每个实验都配备有相关思考题,帮助学生复习总结。

本书的编写得到了相关院校及有关部门的关心和支持,得到了中南民族大学湖北省立项博士点建设专项(102406)资助,也是相关教师教改项目(JYX12036;JYX12027)的结晶,同时得到了华中科技大学出版社的支持和编辑的悉心指导,在此一并表示感谢。

由于编者水平有限,时间仓促,书中如有疏漏和不妥之处,敬请专家、同行及广大读者不吝批评指正。

编 者

目录

MULU

第一篇 酶工程实验

实验一	动物血中超氧化物歧化酶的分离和纯化	/ 3
实验二	超氧化物歧化酶的酶活力测定	/ 5
实验三	α -淀粉酶的固定化及其酶学性质的研究	/ 7
实验四	半纤维素酶的热稳定性和半衰期	/ 9
实验五	溶菌酶的制备	/ 12
实验六	溶菌酶活力的测定	/ 14
实验七	脲酶 K_m 值简易测定	/ 16

第二篇 发酵工程实验

实验一	微生物发酵培养基的正交优化	/ 21
实验二	机械搅拌罐培养粘红酵母的动力学模型的建立	/ 24
实验三	发酵罐中的补料分批发酵	/ 30
实验四	紫外线诱变育种	/ 33
实验五	北京棒状杆菌固定化循环发酵生产谷氨酸	/ 37
实验六	淀粉液化及糖化	/ 41
实验七	制作甜米酒	/ 44
发酵工程实验测定方法		/ 46

第三篇 生物分离工程实验

实验一	壳聚糖絮凝法沉淀微生物菌体	/ 51
实验二	反胶束萃取法中 pH 值对萃取率的影响	/ 54
实验三	大网格吸附树脂吸附等温线的制作	/ 57
实验四	双水相系统分离蛋白质的相图及分配系数	/ 61
实验五	超滤技术浓缩木聚糖酶	/ 66
实验六	微波萃取和常规萃取提取茶多酚的工艺比较	/ 70



实验七	破碎酵母菌细胞不同方法的比较	/ 74
实验八	木聚糖酶的分级沉淀提取 ——硫酸铵分级沉淀法	/ 77
实验九	木聚糖酶的分级沉淀提取 ——有机溶剂分级沉淀法	/ 81
生物分离工程实验测定方法		/ 84

第四篇 生物工程综合大实验

实验一	红法夫酵母发酵生产虾青素	/ 91
实验二	土霉素摇瓶发酵实验	/ 95
实验三	高温木聚糖酶的基因重组、发酵、纯化及 酶学性质研究	/ 102
实验四	啤酒的发酵生产	/ 109
实验五	木聚糖酶全细胞催化剂的制备及检测	/ 114
生物工程综合实验测定方法		/ 119

附录

附录 A	实验中的常用数据及其换算关系	/ 127
附录 B	微生物培养基和抗生素	/ 129
附录 C	微生物保存方法及保藏机构	/ 133
附录 D	实验室常用试剂的特性及配制方法	/ 138
附录 E	硫酸铵溶液饱和度计算表	/ 140
附录 F	缓冲液	/ 143

参考文献	/ 152
------	-------

第一篇 酶工程实验



.....

.....

实验一

动物血中超氧化物歧化酶的分离和纯化



实验目的

通过实验,学习动物血中超氧化物歧化酶的分离和纯化的步骤,了解酶的分离和纯化的思路。



实验原理

1969年,McCord和Fridovich第一次从牛血中提纯到超氧化物歧化酶(SOD)。自然界中SOD分布极广,其含量随生物体的不同而不同,即使同一种生物的不同组织或同一组织的不同部位,其SOD的种类和含量也有很大差别。迄今为止人们已从细菌、真菌、原生动物、藻类、昆虫、鱼类、植物和动物等中分离到SOD。

国内多采用McCord和Fridovich法分离和纯化SOD,其主要工艺过程为:①用乙醇-氯仿除去血红蛋白;②用有机溶剂和硫酸铵分级沉淀;③用离子交换柱层析精制。



实验仪器与试剂

1. 仪器

恒温水浴锅、离心机、50 mL离心管、布氏漏斗、抽滤瓶、烧杯、量筒、玻璃棒、透析袋等。

2. 试剂

3.8%(质量分数)柠檬酸三钠、0.9%(质量分数)氯化钠、95%(体积分数)乙醇、氯仿、丙酮、2.5 mmol/L K_2HPO_4 - KH_2PO_4 缓冲液(pH7.6)。



实验方法

1. 分离红细胞

取新鲜猪血30 mL,加入到10 mL 3.8%柠檬酸三钠抗凝液中,轻轻搅拌均匀,4000 r/min离心20 min,收集红细胞。



2. 除去血红蛋白

红细胞用 3 倍体积的生理盐水洗涤, 4000 r/min 离心 20 min, 重复三次, 然后向洗净的红细胞液中加入 1~1.1 倍体积的去离子水, 搅拌溶血 30 min, 再向溶血液分别缓慢加入 0.4 倍体积的预冷乙醇-氯仿混合溶液(乙醇和氯仿的体积比为 5:3), 剧烈搅拌 15 min 左右, 静置 1 h, 然后以 4000 r/min 离心 20 min 除去变性血红蛋白沉淀, 取上清液(测酶活力)。

3. 热变性

上清液加热到 65 °C, 保温 10 min, 然后迅速冷却到室温, 3000 r/min 离心 20 min, 弃去沉淀物, 收集上清液(测酶活力)。

4. 沉淀

上清液在盐冰浴中冷却, 然后在 -5 °C 以下的操作温度下, 加入 1.5 倍体积的预冷丙酮, 边加边搅拌均匀, 即有白色沉淀产生, 静置 2~3 min, 4000 r/min 离心 20 min, 弃去上清液得到肉色沉淀物。沉淀物用少量蒸馏水溶解, 4000 r/min 离心 20 min, 除去不溶物, 用 2.5 mmol/L K_2HPO_4 - KH_2PO_4 缓冲液(pH7.6)透析, 即得粗 SOD 溶液(测酶活力)。



思考题

在 SOD 的分离过程中应该注意哪些事项?

(张华山)

实验二

超氧化物歧化酶的 酶活力测定



实验目的

学习超氧化物歧化酶(SOD)的酶活力测定的方法。



实验原理

邻苯三酚在碱性条件下,能迅速自氧化,释放出 $O_2^{\cdot -}$,生成带色的中间产物。反应开始后反应液先变成黄棕色,几分钟后转绿,几小时后又转变成黄色,这是生成的中间产物不断氧化的结果。本实验测定的是在邻苯三酚自氧化过程的初始阶段,中间产物的积累在滞留 30~45 s 后,与时间呈线性关系,一般线性关系维持时间在 4 min 的范围内,中间产物在 420 nm 波长处有强烈光吸收。当有 SOD 存在时,由于它能催化 $O_2^{\cdot -}$ 与 H^+ 结合生成 O_2 和 H_2O_2 ,从而阻止了中间产物的积累,因此,通过计算即可求出 SOD 的酶活力。



实验仪器与试剂

1. 仪器

分光光度计等。

2. 试剂

缓冲液:100 mmol/L, pH8.2, Tris-HCl 缓冲液(内含 0.4% 氯化钙溶液)。邻苯三酚溶液:6 mmol/L, 用 10 mmol/L 盐酸配制。



实验方法

1. 邻苯三酚自氧化反应速度的测定

测定实验在 25 °C 下进行,按下面酶活力测定加样表(表 1-2-1)中的顺序和用量向 1 cm 厚度的比色池中加入预热至 25 °C 的缓冲液、SOD 酶样液、重蒸水和邻苯三酚溶液(以 10 mmol/L 盐酸代替邻苯三酚作为测定对照),加入邻苯三酚溶液后立即启动秒表计时,采用分光光度计于 420 nm 波长处每隔 30 s 测定 1 次吸光度($A_{420\text{ nm}}$),共测 10 个数



据。以吸光度为纵坐标、时间为横坐标作图,根据线性关系部分的斜率求出自氧化反应速度($\Delta A_{420\text{ nm}}/\text{min}$)。适当改变邻苯三酚溶液的用量,使自氧化反应速度为 0.02 IU/min。

表 1-2-1 酶活力测定加样表

试 剂	加样量/mL	
	邻苯三酚自氧化	酶抑制下自氧化
缓冲液	1.50	1.50
SOD 酶样液	—	0.10
重蒸水	1.40	1.30
邻苯三酚溶液	0.10	0.10
总体积	3.00	3.00

2. 酶抑制下自氧化反应速度的测定

测定过程与测定邻苯三酚自氧化反应速度的相同,只是在此反应系统中加入待测的 SOD 酶样液。适当增减 SOD 酶样液的稀释度或用量,使酶抑制下的自氧化反应速度($\Delta A_{420\text{ nm}}/\text{min}$)为 0.007~0.013 IU/min,也即只能抑制自氧化反应的 35%~65%(超出此范围,抑制自氧化反应的程度与酶量不成比例)。



实验结果

在本实验条件下,单位体积的酶活力按下列公式计算:

$$\begin{aligned} \text{SOD 的酶活力(IU)} = & \frac{0.02 \text{ IU/min} - \Delta A_{420\text{ nm}}/\text{min}}{0.02 \text{ IU/min}} \times 100\% \\ & \times \frac{\text{SOD 酶样液稀释倍数}}{\text{SOD 酶样液体积(mL)}} \times 3(\text{mL}) \end{aligned}$$



思考题

在 SOD 的酶活力测定过程中应该注意哪些事项?

(张华山)

实验三

α -淀粉酶的固定化及其酶学性质的研究



实验目的

学习固定化酶的制备,对固定化酶的酶学性质进行研究。



实验原理

α -淀粉酶是大宗的工业酶制剂,被广泛应用在发酵、食品、医药等领域。但天然酶稳定性差,对高温、有机溶剂极其敏感,易失活,不能重复使用,反应后混入产品,使产品难以纯化。而通过物理或化学的方法,将酶固定于载体上,所得的酶不仅保留了酶原有的高活性、高选择性,并且克服了天然酶的缺点,还有利于反应的连续化和自动化。

α -淀粉酶能将淀粉水解为长短不一的短链糊精和少量的还原糖,从而使淀粉对碘呈蓝紫色的特异性反应逐渐消失,可以用这种显色消失的速度来衡量酶活力。



实验仪器与试剂

1. 仪器

注射器(带7号平针头)、恒温水浴锅、分光光度计等。

2. 试剂

α -淀粉酶、海藻酸钠、氯化钙等。

0.5%可溶性淀粉溶液(测酶活力当天现配):称取可溶性淀粉0.5 g,用少量蒸馏水调成浆状物,边搅动边缓缓倒入沸水中,然后用少许蒸馏水分几次冲洗装淀粉的烧杯,洗液一并倒入沸水中,加热煮沸20 min直至液体变完全透明,冷却至室温,加入pH6.0的磷酸缓冲液定容至100 mL。

磷酸-柠檬酸缓冲液(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,用蒸馏水溶解定容至1000 mL,配好后应以酸度计调整pH值为6.0。

原碘液(储存液):称取0.5 g碘和5.0 g碘化钾研磨并溶于少量蒸馏水中,然后定容



至 100 mL, 储存于棕色瓶中备用。

稀碘液(工作液): 取 1 mL 原碘液用蒸馏水稀释 100 倍(实验当天制备)。

反应终止液: 0.1 mol/L 硫酸。



实验方法

1. 固定化酶的制备(包埋法)

(1) 称取海藻酸钠 0.75 g 置于 100 mL 烧杯中, 加 25 mL 蒸馏水搅匀, 在沸水浴中溶胀 15 min, 得 A 液。

(2) 取一个 50 mL 烧杯, 加入 25 mL 的 α -淀粉酶(酶活力 20000 IU/mL) 溶液, 得 B 液。

(3) 待 A 液冷却后, 将 B 液与 A 液混合, 用尼龙布过滤, 得 C 液。

(4) 称取 2.2 g 无水氯化钙, 溶解于 200 mL 蒸馏水中。

(5) 用注射器(带 7 号平针头)吸取 C 液垂直注入氯化钙溶液中制备固定化细胞, 固定化 30 min, 于 4 °C 条件下过夜, 用去离子水冲洗几次, 吸去表面水分, 即得到固定化酶颗粒。

2. 固定化酶的操作稳定性

以 0.5% 可溶性淀粉溶液为底物分别在相同条件下连续进行三批次的操作, 测定 α -淀粉酶的酶活力。



实验结果

α -淀粉酶的酶活力测定采用 Young J. Yoo 改良法。

取 5 mL 0.5% 的可溶性淀粉溶液, 在 40 °C 水浴中预热 10 min, 然后加入适当浓度的酶液 0.5 mL 和适当的固定化酶, 反应 5 min 后, 立即取出 1 mL 反应液用 5 mL 的 0.1 mol/L 硫酸终止反应, 然后取出 0.5 mL 溶液置于 5 mL 碘液中混匀显色, 用分光光度计在 620 nm 波长处测吸光度。以 0.5 mL 水代替 0.5 mL 反应液的一组作为空白组, 以不加酶液(加相同量的水)的一组作为对照组。求出吸光度的差值 ΔA 和相对酶活力。

相对酶活力根据下式计算:

$$\text{相对酶活力} = (A_0 - A) / A_0$$

式中, A_0 、 A 分别表示对照组和反应液的吸光度。



思考题

固定化酶的优势与局限性有哪些?

(陈 悟)

实验四

半纤维素酶的热稳定性和半衰期



实验目的

了解高温对酶活力的影响；熟悉运用 Arrhenius 公式计算酶的热致死半衰期的方法。



实验原理

半纤维素酶(本实验采用木聚糖酶)水解木聚糖生成低分子木糖寡聚物,用 3,5-二硝基水杨酸(DNS)比色法检测半纤维素酶水解木聚糖产物中的还原糖可以确定酶活力。半纤维素酶在高温下处理一定时间后酶活力将逐渐丧失,温度越高,处理时间越长,酶活力损失越严重。酶活力的损失速率与温度的关联性遵循 Arrhenius 公式:

$$k = Ae^{-E/(RT)}$$

同时,在高温下酶活力的损失量与时间的关联性遵循对数致死规律:

$$N = N_0 e^{-kt}$$

检测半纤维素酶在 60 °C、65 °C、70 °C、75 °C 条件下分别处理 0 min、5 min、10 min、15 min、20 min 后的残余酶活力,即可以得出该酶在相应温度下的半衰期。



实验仪器与试剂

1. 仪器

恒温水浴锅 4 个(60 °C、65 °C、70 °C、75 °C)、数字计时器、1.5 mL 小塑料管、玻璃试管若干、分光光度计等。

2. 试剂

木聚糖:纯度大于 90%。

木聚糖酶溶液:酶活力单位为 1000 IU/mL 左右。

0.5%木聚糖溶液:用 pH6.5 的 50 mmol/L 柠檬酸-磷酸缓冲液配制。

0.25 mg/mL 木糖溶液。

DNS 溶液:称取 6.3 g DNS 和 262 mL 2.0 mol/L 氢氧化钠溶液,加入 500 mL 含有



182 g 酒石酸钾钠的热水溶液中,再加入 5 g 重蒸酚和 5 g 亚硫酸钠,搅拌溶解,冷却后加蒸馏水定容至 1 L。

50 mmol/L 磷酸盐-柠檬酸缓冲液(pH6.5)。



实验方法

1. 酶的热处理

取木聚糖酶溶液,按每管 1 mL 的量加入 1.5 mL 小塑料管中,按表 1-4-1 编号后将其放入不同温度的水浴中进行热处理。经准确时间完成热处理后移入冷水中止热处理,摇匀后准备进行酶活力分析。

表 1-4-1 酶的热处理

不同热处理条件下的 酶活力(IU/mL) 不同处理时间/min	60 °C	65 °C	70 °C	75 °C
0				
5				
10				
15				
20				

2. 酶活力的测定方法

(1) 标准曲线的绘制

试管按表 1-4-2 编号后,加入相应的试剂。

表 1-4-2 酶活力的测定

试 管 编 号	0	1	2	3	4	5	6
0.25 mg/mL 木糖溶液/mL	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	1.2
蒸馏水/mL	2	1.8	1.6	1.4	1.2	1.0	0.8
DNS 溶液/mL	3	3	3	3	3	3	3

每支具塞的试管加入 DNS 溶液后,充分混合,置沸水浴中煮沸 5 min,迅速用冷水将其冷却至室温,以零浓度作为参比,在 540 nm 波长下测定各管反应液的吸光度(A)。以木糖量 X(mg)作横坐标,吸光度(A)作纵坐标,绘制标准曲线,并求出回归方程。

(2) 酶活力测定

空白对照:准确吸取 1.8 mL 0.5%木聚糖溶液加入到试管中,先加入 3 mL DNS 溶液,混匀后再加入 0.2 mL 木聚糖酶溶液,混匀,在 60 °C 恒温下准确反应 10 min,冷却,置沸水中煮沸 5 min,迅速用冷水将其冷却至室温。

样品测定:准确吸取 1.8 mL 0.5%木聚糖溶液加入到试管中,在 60 °C 水浴中预热 5 min,加入 0.2 mL 木聚糖酶溶液,混匀后在 60 °C 水浴中反应 10 min,再加入 3 mL DNS

溶液,充分混匀,中止酶反应。将在同一温度条件下经热处理后的试管集中,在 100 °C 水浴中加热 5 min,移入冷水中冷却。试管摇匀后,以空白对照样为基准校正 540 nm 波长下的零吸光度,在 540 nm 波长下测吸光度。

(3) 酶活力单位定义

1 个国际酶活力单位(1 IU):在 60 °C 和 pH6.5 条件下,每分钟水解木聚糖产生 1 μmol 还原糖所需要的酶量。在本实验中,还原糖以木糖为标准。

(4) 酶活力计算方法

$$\text{酶活力 (IU/g)} = \frac{W \times D_i \times 1000}{150.13 \times 10 \times 0.2}$$

式中:W 表示酶水解产生的木糖质量(mg),可由标准曲线得到;

D_i 表示稀释倍数;

150.13 表示木糖的相对分子质量;

1000 表示将 mmol 转化成 μmol 换算的系数;

10 表示在 60 °C 下酶解反应的准确时间(min);

0.2 表示经适当稀释后的粗酶液体积(mL)。



实验结果

应用对数致死规律计算出木聚糖酶在 60 °C、65 °C、70 °C、75 °C 条件下的半衰期,并应用 Arrhenius 公式推算出木聚糖酶在 80 °C 下的半衰期。



思考题

按照你对本实验的理解,怎样设计不同温度下的热处理时间才能使结果更真实、更有代表性?

(熊海容)