

普通高中课程标准实验教科书

经全国中小学教材审定  
委员会2004年初审通过

# 生物

选修

1

## 生物技术实践

■ 主编 刘植义 付尊英



北京师范大学出版集团  
BEIJING NORMAL UNIVERSITY PUBLISHING GROUP  
北京师范大学出版社

# 目 录

《生物技术实践》模块学习目标 .....	1
----------------------	---

<b>第 1 章 微生物技术 .....</b>	<b>2</b>
--------------------------	----------

第 1 节 培养基对微生物的选择作用 .....	4
--------------------------	---

【实验】 培养基的配制和灭菌 .....	4
----------------------	---

【探究】 探究不同培养基中生长的优势菌群 .....	8
----------------------------	---

第 2 节 微生物的纯培养 .....	11
---------------------	----

【实验】 微生物的分离与纯化 .....	11
----------------------	----

第 3 节 微生物数量的测定 .....	14
----------------------	----

【实验】 测定土壤中微生物的数量 .....	15
------------------------	----

第 4 节 微生物的利用 .....	19
--------------------	----

【实验】 从土壤中分离纤维素分解菌 .....	19
-------------------------	----

【探究】 探究纤维素分解菌是否只能分解纤维素 .....	21
------------------------------	----

【实验】 利用微生物制作豆豉 .....	22
----------------------	----

<b>第 2 章 酶技术 .....</b>	<b>26</b>
------------------------	-----------

第 1 节 果胶酶的制作方法及其作用 .....	28
--------------------------	----

【实验】 果胶酶的制作及对苹果匀浆的作用 .....	28
----------------------------	----

第 2 节 酶活力的测定 .....	32
--------------------	----

【实验】 检测果胶酶的活力 .....	32
---------------------	----

【探究】 探究果胶酶作用的最佳条件 .....	34
-------------------------	----

第 3 节 酶在食品制作和洗涤方面的应用 .....	36
----------------------------	----

【实验】 蛋液发酵饮料的制作 .....	36
----------------------	----

【探究】 探究带有不同污渍衣物的洗净方法 .....	38
----------------------------	----

【探究】 探究加酶洗衣粉的最佳使用条件 .....	39
---------------------------	----

第 4 节 固定化酶的制备和应用 .....	40
------------------------	----

【实验】 固定化乳糖酶的制备 .....	40
----------------------	----

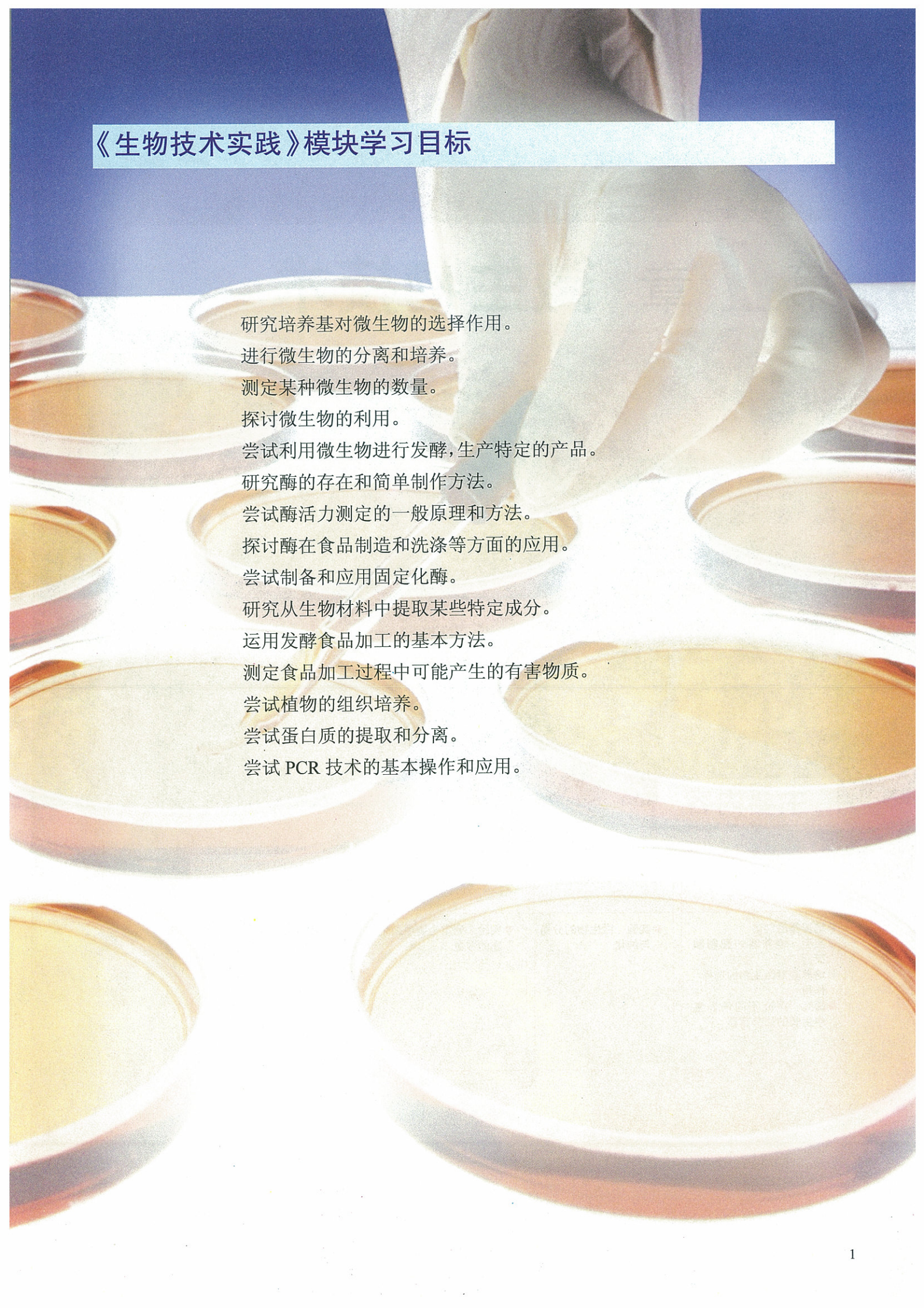
【实验】 检测牛奶中乳糖的分解 .....	42
-----------------------	----

<b>第 3 章 食品加工技术 .....</b>	<b>46</b>
---------------------------	-----------

第 1 节 发酵食品加工 .....	48
--------------------	----

【实验】 利用发酵法以果汁制作酒和醋 .....	48
【实验】 制作豆腐乳 .....	52
第2节 天然食品添加剂的制备 .....	55
【实验】 用蒸馏法从柑橘皮中提取芳香油 .....	56
第3节 食品加工过程中产生的有害物质的测定 .....	60
【实验】 制作泡菜并测定亚硝酸盐含量的变化 .....	60
<b>第4章 现代生物技术 .....</b>	<b>66</b>
第1节 植物的组织培养 .....	68
【实验】 胡萝卜的组织培养 .....	68
第2节 蛋白质的提取和分离 .....	73
【实验】 乳酸脱氢酶同工酶的提取和分离 .....	73
第3节 聚合酶链式反应技术 .....	77
【实验】 DNA片段的扩增和琼脂糖凝胶电泳检测 .....	77
附录 I 中英文词汇对照表 .....	83
附录 II 书海拾贝 .....	83

## 《生物技术实践》模块学习目标

- 
- 研究培养基对微生物的选择作用。
- 进行微生物的分离和培养。
- 测定某种微生物的数量。
- 探讨微生物的利用。
- 尝试利用微生物进行发酵,生产特定的产品。
- 研究酶的存在和简单制作方法。
- 尝试酶活力测定的一般原理和方法。
- 探讨酶在食品制造和洗涤等方面的应用。
- 尝试制备和应用固定化酶。
- 研究从生物材料中提取某些特定成分。
- 运用发酵食品加工的基本方法。
- 测定食品加工过程中可能产生的有害物质。
- 尝试植物的组织培养。
- 尝试蛋白质的提取和分离。
- 尝试 PCR 技术的基本操作和应用。

# 第 1 章 微生物技术

## 主要内容

### 1. 培养基对微生物的选择作用

- 培养基的制备
- 实验 培养基的配制和灭菌
- 培养基对微生物的选择作用
- 探究 探究不同培养基中生长的优势菌群

### 2. 微生物的纯培养

- 实验 微生物的分离与纯化

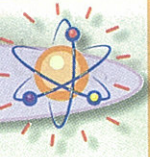
### 3. 微生物数量的测定

- 实验 测定土壤中微生物的数量

### 4. 微生物的利用

- 从土壤中分离有益微生物
- 实验 从土壤中分离纤维素分解菌
- 微生物对有机物质的分解
- 探究 探究纤维素分解菌是否只能分解纤维素
- 利用微生物制作食品
- 实验 利用微生物制作豆豉

## 技术发展历程



从史前时代起,微生物技术就一直为人们所开发和利用,以造福人类。古人虽未观察到微生物,却早已将微生物学知识应用于工农业生产和疾病防治中。我国人民早在石器时代后期就会利用谷物造酒;周代后期,就能制造酱和醋;公元10世纪,我国就有了预防天花的活疫苗;到了明代,种痘预防天花的方法被广泛应用。在西方,苏美尔人和巴比伦人公元前6000年开始利用发酵方法酿制啤酒;埃及人在公元前4000年就开始制作面包。

1676年,荷兰人列文虎克(A. von Leewenhoek, 1632—1723)首先观察到了微生物。19世纪60年代,法国科学家巴斯德(L. Pasteur, 1822—1895)发明了巴氏消毒法和一系列研究微生物所必需的独特方法和技术,证实了发酵是由微生物引起的,并将病原菌减毒后转化为疫苗,为人类防病、治病作出了巨大贡献。英国外科医生李斯特(J. Lister, 1827—1912)首先利用石炭酸喷洒手术室和煮沸手术用具,为防腐、消毒以及无菌操作打下基础。德国学者科赫(R. Koch, 1843—1910)成功设计了固体培养基,从而建立了微生物的纯培养技术,为微生物技术的发展提供了理论基础,将其纳入了科学的轨道。20世纪20年代,工业生产中开始采用大规模的纯培养技术发酵生产化工原料,如丙酮和丁醇。50年代,在青霉素大规模发酵生产的带动下,发酵工业和酶制剂工业大量涌现,发酵技术和酶技术被广泛应用于医药、食品、化工、制革和农产品加工等部门。从70年代开始,以微生物技术为基础、基因工程为核心的现代发酵工程、酶工程、细胞工程以及蛋白质工程得到了长足的发展,它们共同组成了具有划时代意义和战略价值的现代生物技术。

# 第 1 节 培养基对微生物的选择作用

形形色色的微生物与人类关系非常密切。预防疾病的疫苗,如白百破、卡介苗等;治疗疾病的抗生素,如青霉素和红霉素等;许多可口的食品和调味品,如酸奶、奶酪、味精和醋等;各种酒类产品,如白酒、啤酒和葡萄酒等,都是利用微生物制作的。在实验室条件下进行科学研究或在工业生产上大规模制造微生物产品都需要用到培养基(图 1-1)。那么,什么是培养基呢?培养基是如何制备的?不同微生物对培养基的要求有哪些不同呢?



图 1-1 配制培养基的试剂

## ● 培养基的制备



### 实验

## 培养基的配制和灭菌

### 活动目标

1. 尝试培养基的制备。
2. 使用高压蒸汽灭菌法灭菌。

### 实验原理

培养基是人工配制的适合微生物生长繁殖或积累代谢产物的营养基质,用以培养、分离、鉴定和保存各种微生物。为了满足微生物的生长,培养基的营养成分一般包括水分、碳源、氮源、微量元素和无机盐等。不同种类微生物的生长繁殖对营养的要求不同,通过选择不同的培养基,人为控制培养基的 pH、碳源、氮源、渗透压等条件,使选择的培养基利于某类或某种微生物的生长,而不利于其他微生物的生存,可以达到分离、培养不同微生物的目的。

由于配制培养基的各类营养物质和容器等含有多种不同的微生物,配制好的培养基必须立即灭菌,及时杀灭培养基中的微生物,同时防止微生物大量繁殖造成的培养基营养成分的改变。

常用的灭菌方法是高压蒸汽灭菌。高压蒸汽灭菌是将待灭菌的物品放在一个密

闭的加压灭菌锅内,通过加热,使灭菌锅隔套间的水沸腾而产生蒸汽。待水蒸气急剧地将锅内的冷空气从排气阀中排尽后,关闭排气阀,继续加热。此时蒸汽不能排出,灭菌锅内的压力增加,水的沸点增高,从而使蒸汽温度高于 $100^{\circ}\text{C}$ ,导致菌体蛋白质凝固变性而达到灭菌的目的。

因为高压蒸汽属于湿热蒸汽,其穿透力大,而且蒸汽由气态变为液态时可放出大量的热,所以能迅速提高被灭菌物品的温度,从而增加了灭菌的效果。同时,灭菌时还需要一定的压力,保证灭菌温度达到要求。灭菌物品中一般的菌体在 $60^{\circ}\text{C}$ 下保温10min就可全部杀死,但嗜热细菌在 $120^{\circ}\text{C}$ ,可耐受20~30min,因此,为彻底杀死灭菌物品中的微生物,一般将灭菌温度、压力和时间定为 $121^{\circ}\text{C}$ , $0.11\text{MPa}$ ,20~30min。用家用高压锅灭菌时,由于压力和温度达不到以上要求,需要延长灭菌时间。

### 材料用具

牛肉膏,蛋白胨,马铃薯;葡萄糖,琼脂, $\text{NaCl}$ , $1\text{mol/L NaOH}$ , $1\text{mol/L HCl}$ ;试管,锥形瓶,培养皿,烧杯,量筒,玻璃棒,铁架台,漏斗,天平,药匙,高压蒸汽灭菌锅,酸度计或精密pH试纸(pH 5.5~9.0),棉花,牛皮纸,记号笔,麻绳,纱布等。

### 方法步骤

参照技能卡分组选择并制作一种培养基。培养基的制作流程为:称量→溶化→调pH→分装→加塞和包扎→灭菌→摆斜面及倒平板。

#### 1. 配制培养基

参照技能卡,配制相应的培养基。

#### 2. 分装、加塞和包扎

将配制的培养基分装入试管内或锥形瓶内(图1-2),试管和锥形瓶的装量均为其容积的 $1/5$ 。然后将分装好的试管和锥形瓶加塞和包扎(图1-3),并用记号笔注明培养基名称、组别和配制日期。

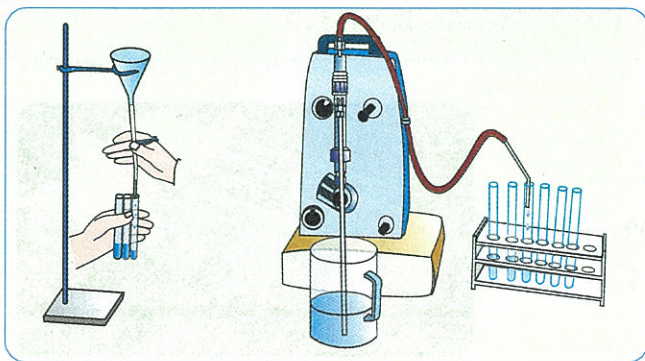


图 1-2 分装试管培养基



### 技能卡

#### 培养基的配制

##### 1. 培养细菌用培养基的配制

###### (1) 牛肉膏蛋白胨培养基

称取牛肉膏3g、蛋白胨10g、 $\text{NaCl}$ 5g和琼脂20g,依次加入盛有900mL蒸馏水的烧杯中,加热使其溶解,用 $1\text{mol/L NaOH}$ 溶液调pH至7.4~7.6,最后将溶液倒入量筒中,加蒸馏水至1000mL。

###### (2) 简易制备细菌用培养基

取已去筋膜和脂肪的新鲜瘦牛肉300g,充分绞碎后,加入900mL蒸馏水,于冰箱中 $0^{\circ}\text{C}$ ~ $4^{\circ}\text{C}$ 浸泡过夜,再煮沸30min,用4层纱布过滤,在滤液中加入 $\text{NaCl}$ 5g、琼脂20g,加热溶化后用 $1\text{mol/L NaOH}$ 溶液调pH至7.4~7.6,再补充蒸馏水至1000mL。

##### 2. 培养真菌用培养基的配制

取去皮切成块的马铃薯200g,放入盛有900mL蒸馏水的烧杯中,加热煮沸20min,用4层纱布过滤,向滤液中加入葡萄糖20g和琼脂20g,加热溶解后再补充蒸馏水至1000mL。



### 3. 灭菌

参照技能卡,将上述培养基和实验所需的培养皿等以  $121^{\circ}\text{C}$  20 min 高压蒸汽灭菌(图 1-4)。若没有手提式高压蒸汽消毒器,可采取以下替代措施:(1)采用家庭用高压锅代替,自大量冒蒸汽开始维持 40 min。(2)使用家用蒸锅,常温常压下  $100^{\circ}\text{C}$  维持 1~2 h。

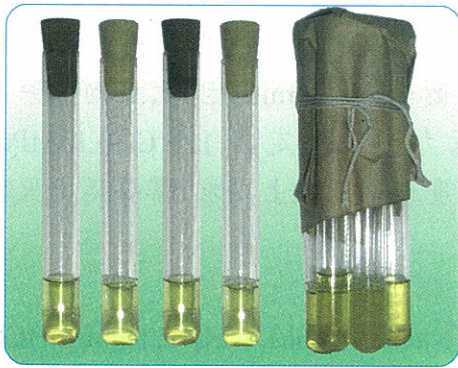


图 1-3 加塞试管和包装好的试管



图 1-4 手提式高压蒸汽消毒器



#### 技能卡

##### 手提式高压蒸汽消毒器的使用

1. 加水:按说明书往锅内加适量的水。
2. 装料:装入待灭菌的物品,不能太满。
3. 加盖:摆正锅盖,使螺口对齐,然后采用对角螺丝同时拧的方式,逐一拧紧螺丝,密闭灭菌锅,并打开排气阀。
4. 排气:加热待水煮沸后,使蒸汽和空气一起从排气孔排出。
5. 升压:当锅内空气排尽时,即关闭排气阀,使压力上升。
6. 保压:当压力表指针指到  $121^{\circ}\text{C}$  时,调节热源,使压力维持不变,并开始计算灭菌时间,根据灭菌的物品确定灭菌时间。
7. 降压:达到规定的灭菌时间后,立即关闭热源,当压力表指针指到零刻度后,打开排气阀,放空剩余的蒸汽。再打开锅盖,取出灭菌物品。
8. 灭菌后处理:每次灭菌完毕,必须倒掉锅内剩水,然后按原样放置。

#### 4. 摆斜面或倒平板

取出培养基,待培养基冷却至  $50^{\circ}\text{C}$ ~ $60^{\circ}\text{C}$  后,制成斜面或平板后备用(图 1-5,图 1-6)。

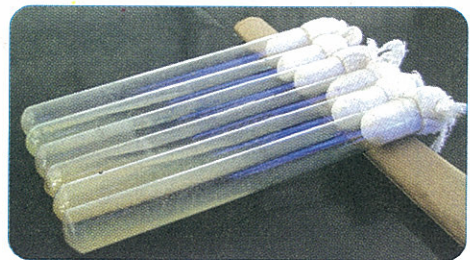


图 1-5 摆斜面示意图

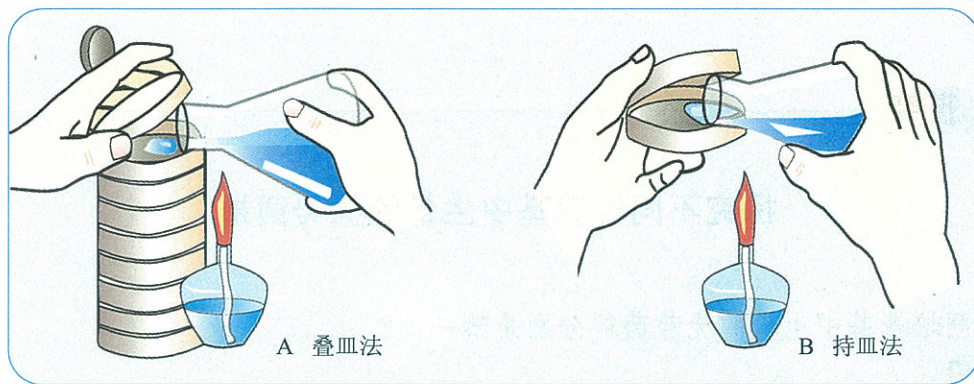


图 1-6 倒平板示意图

### 总结与讨论

根据实验操作过程写出实验报告,讨论以下问题:

1. 在配制培养基的操作过程中易出现哪些差错? 如何防止?
2. 进行加压蒸汽灭菌操作有哪几个步骤? 升压前为什么要排尽锅内空气?
3. 培养基配好后必须立即灭菌,为什么? 如何检查灭菌后的培养基是无菌的?
4. 采用高压蒸汽灭菌时,利用的是温度还是压力? 为什么?
5. 配制培养基时为什么要调 pH? 调 pH 时应注意什么?
6. 棉塞的作用是什么?

培养基 (medium) 的种类繁多,培养不同类型的微生物需要不同的培养基。培养基按物理状态可分为液体培养基和固体培养基。液体培养基是在微生物学研究和生产中应用极其广泛的一种培养基,主要用于各种生理、代谢研究和获得大量菌体。绝大多数发酵工业生产都采用液体培养基。固体培养基常用琼脂做凝固剂,应用于微生物的分离、纯化、培养、保存和鉴定等。另外,一些由天然固体基质制成的培养基也属于固体培养基,例如,由马铃薯块、胡萝卜条、小米、大米、麸皮、米糠和稻草粉等制成固体状态的培养基,可用于培养各种真菌;生产食用菌的棉籽壳等也属于固体培养基。

培养基的制备是研究和利用微生物的最基本技术之一。配制培养基包括配制和灭菌两大步骤,关键要准确称量、调准 pH、规范制作棉塞、彻底灭菌。而且,在配制培养基时应尽量利用廉价且易于获得的原料作为培养基成分,特别是发酵工业中,培养基用量很大,利用低成本的原料更体现出其经济价值。例如,在酵母菌单细胞蛋白的工业生产过程中,常常利用制糖工业中含有蔗糖的废液、乳制品工业中含有乳糖的废液、豆制品工业废液及造纸工业中含有糖类的纸浆等作为培养基的原料,以实现废物利用,降低生产成本。

## ●培养基对微生物的选择作用



### 探究

#### 探究不同培养基中生长的优势菌群

##### 问题

不同培养基中生长的优势菌群分别是哪一类？

##### 作出假设

采用\_\_\_\_\_培养基时,细菌为优势菌;采用\_\_\_\_\_培养基时,酵母菌和霉菌为优势菌。

##### 设计实验

参照技能卡,分组设计实验方案,用同一种培养基检测不同类群的微生物,或者用不同培养基检测同一类群的微生物。在设计实验时要注意设置对照实验和实验重复等。



### 技能卡

#### 环境中微生物的接种方法

可采用下列方法接种不同环境中的微生物:

1. 空气 打开无菌平板,让其在空气中暴露 30~60min。
  2. 桌面 用一根无菌棉签,先在无菌平板的一个区域润湿,然后用其擦抹桌面,再用此棉签在平板的另一区域内来回划线。
  3. 头发 打开无菌平板的皿盖,将几根头发放在平板培养基上,再盖上皿盖。
  4. 手指 用未洗的手在无菌平板一侧按手印,用清洁剂洗手后,在另一侧按手印。
  5. 口腔 打开无菌平板的皿盖,用嘴对准平板培养基表面,咳嗽或打喷嚏,再盖上皿盖。
- 将检测平板倒置于培养箱中 28℃培养。

#### 实施实验

根据实验设计,认真进行实验,将实验结果填入下面的表格中。

培养基	优势菌落数/皿	优势菌落形态特征			优势菌类型
		颜色	大小	形状	

## 得出结论

根据实验过程分析实验结果,得出结论。

## 表达交流

分组汇报探究结果和实验中存在的问题,然后讨论以下问题。

1. 同种培养基上生长的微生物类群有几种? 优势菌是哪一类?
2. 不同培养基上的优势菌分别是哪一类?
3. 在科研或工业生产中如果想获得一种微生物应采取哪些措施?

通过本实验可以看出,微生物通过某种方法接种到适于生长的固体培养基表面上,在适宜的温度下培养一段时间后,单个的菌体或孢子就可以生长繁殖成一个个肉眼可见的细胞群体,称为菌落(colony)。不同种微生物对营养要求不一样,在相应的培养基上可形成大小、形态各异的菌落(图 1-7)。细菌菌落的共同特征为:湿润、黏稠、易用接种环挑起,菌落各部位颜色一致。酵母菌菌落外形上与细菌极为相似,但比细菌菌落大而厚,颜色也较单调。霉菌菌落较疏松,常呈绒毛状、絮状或蜘蛛网状,一般比细菌菌落大几倍到几十倍。细菌生长需要的氮源高(C/N 为 4:1),pH 中性或微碱性(pH 7.2~7.6),因此培养细菌常采用牛肉膏蛋白胨培养基。酵母菌和霉菌生长所需的碳源含量高(C/N 为 16:1),pH 偏酸性(pH 5~6),因此分离真菌常采用马铃薯葡萄糖琼脂培养基(简称 PDA)。

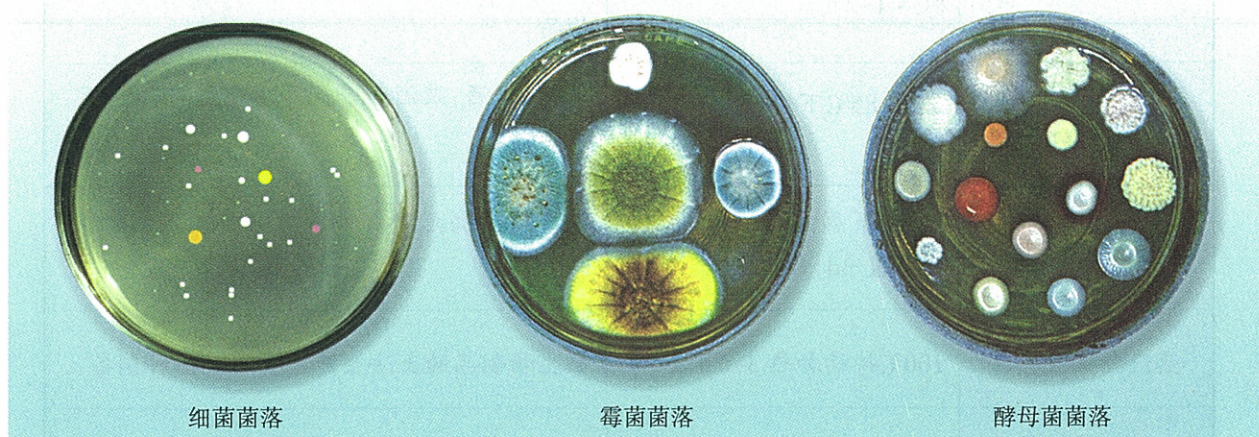


图 1-7 不同微生物的菌落

微生物学实验一般都要求无菌条件下进行,为此,实验用的材料、器皿、培养基、移液管和滴管等都要经过灭菌后才可使用。实验室最常用的灭菌方法是高温处理。

不同培养基对微生物的选择作用在科研和生产实践中具有重要意义,它是分离和纯化不同类型微生物的基础,因此微生物科技工作者们在长期的科研和生产实践中得到了很多实验用和生产用的培养基,这些都是微生物工作者的财富。但在培养不同种或株的微生物时,培养基的配方还需要改变,这就需要我们不断地探索高效的、能够适应新的微生物种类的培养基,以更好地为人类造福。



### 自我检测

1. 简述制作细菌培养基的操作程序。
2. 培养基对微生物的选择作用有什么意义？



### 开阔眼界

#### 常用的灭菌和消毒方法

灭菌和消毒种类	主要方法	应用范围
火焰灭菌	酒精灯火焰灼烧	微生物接种工具如接种环、接种针或其他金属用具等，接种过程中试管口或三角瓶口等
干热灭菌	电热鼓风干燥箱 160℃~170℃ 加热 1~2 h	玻璃器皿(如吸管、培养皿等)、金属用具等凡不适宜用其他方法灭菌而又能耐高温的物品
巴氏消毒法	60℃~85℃下处理 15~30min	牛奶、啤酒、果酒和酱油等不宜进行高温灭菌的液体
间歇灭菌法	100℃下蒸煮 30~60min 连续重复 3d, 每天 1 次	含有葡萄糖或氨基酸等不耐高温药品的培养基等
蒸汽持续灭菌法	100℃持续加热 3~6 h	微生物制品的土法生产或食用菌菌种制备
高压蒸汽灭菌法	121℃维持 15~30min	培养基及多种器材、物品
紫外线消毒	30W紫外灯照射 30min	接种室空气
化学药物消毒	用体积分数为 70%~75% 的乙醇、碘酒涂抹, 来苏儿喷洒等	用于皮肤、伤口、动植物组织表面消毒, 空气、手术器械、塑料或玻璃器皿等

## 第 2 节 微生物的纯培养

自然界中各种微生物几乎都是混杂在一起生活,即使取很少量的样品也是许多微生物共存的群体。但人们要研究某种微生物的特性,就要从混杂的样品中取得所需的纯种,或者把受污染的菌种重新分离出来,使该微生物处于纯培养状态。也就是说培养物中所有细胞只是微生物的某一个种或株,它们有着共同的来源,是同一细胞的后代。那么,如何才能分离并得到一个微生物的纯种呢?



### 微生物的分离与纯化

#### 活动目标

进行微生物分离和纯化的基本操作。

#### 实验原理

微生物的分离与纯化就是将待检测微生物样品通过划线或涂布接种在固体培养基上,样品中的每一个细胞或孢子都可以生长繁殖形成单个菌落。将单个菌落接种到斜面培养基上,经培养后,即可得到一个微生物的纯种。

#### 材料用具

培养 16~24 h 的大肠杆菌(*E. coli*)培养液;灭菌的牛肉膏蛋白胨琼脂培养基斜面和平板,盛有 9mL 无菌水的试管;无菌玻璃涂棒,无菌吸管,接种环等。

#### 方法步骤

##### 1. 微生物的分离

微生物的分离包括样品稀释、划线或涂布及培养三个步骤(图 1-8)。

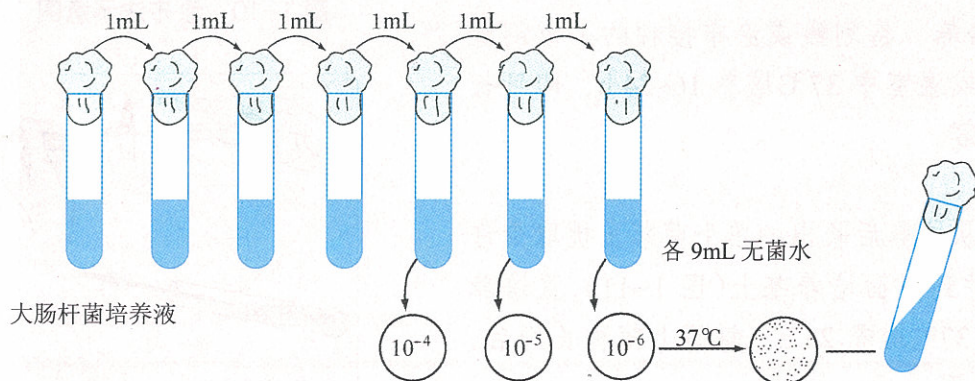


图 1-8 微生物分离操作流程图

(1)稀释 用 1mL 无菌吸管吸取 1mL 大肠杆菌培养液,加入到盛有 9mL 无菌水的大试管中,充分混匀,然后用无菌吸管从此试管中吸取 1mL 加入另一支盛有 9mL 无菌水的试管中,混和均匀,依次类推制成  $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$  系列稀释度的大肠杆菌稀释液。

### (2)划线或涂布

**平板划线分离法** 在近火焰处,左手拿皿底,右手拿接种环,挑取大肠杆菌培养液一环在平板上划线,常用的划线方法有平行划线和连续划线两种(图 1-9)。平行划线时,每转一个角度烧一次接种环。划线完毕后,盖上培养皿盖,做好标记。



思考

划线时应注意什么?

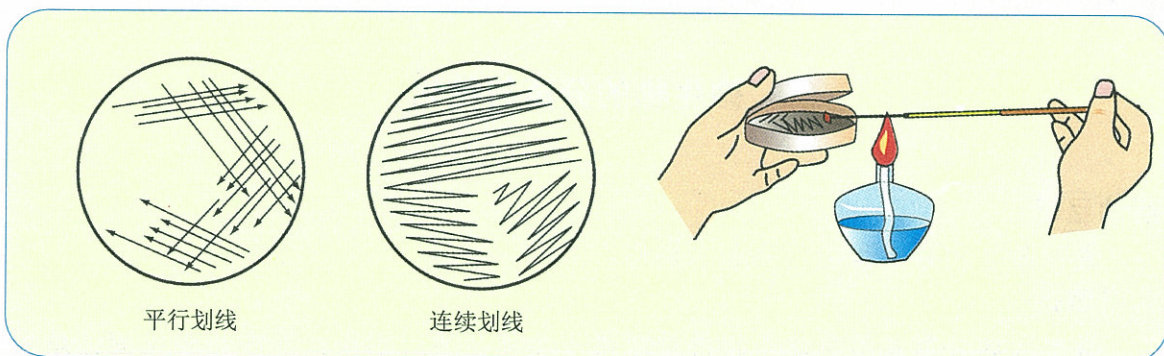


图 1-9 划线示意图

**涂布分离法** 取 3 个平板,底面分别用记号笔写上  $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$  和  $10^{-6}$  三种稀释度,然后用无菌吸管分别吸取相应稀释度的稀释液各 0.1mL,放入已标记好的平板上,用无菌玻璃涂棒在培养基表面轻轻地涂布均匀,室温下静置 5~10min,使菌液吸附进培养基(图 1-10)。

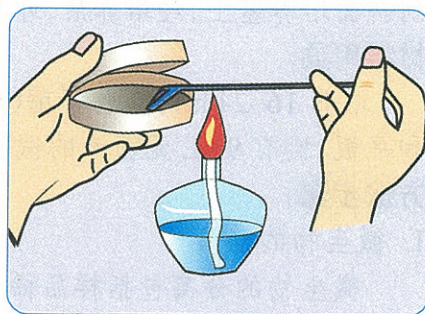


图 1-10 涂布法示意图

(3)培养 将划线或涂布接种的平板倒置于培养箱或温室中  $37^{\circ}\text{C}$  培养 16~24 h,即可长出单个菌落。

### 2. 接斜面

分别从培养后长出的单个菌落上挑取少许细胞,接种到斜面培养基上(图 1-11),置培养箱或温室  $37^{\circ}\text{C}$  培养 24 h,斜面上菌种长好后,  $4^{\circ}\text{C}$  保存备用。

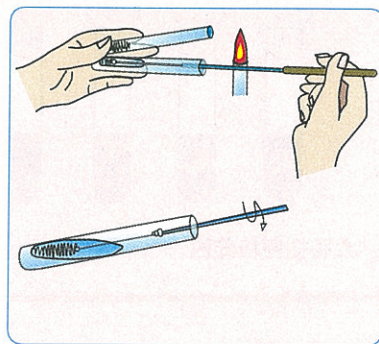


图 1-11 斜面接种法

## 总结与讨论

根据实验操作过程写出实验报告,讨论以下问题:

1. 你所做的平板划线分离法或涂布分离法是否较好地得到了单菌落?如果不是,请分析原因。
2. 平行划线时,每转一个角度烧一次接种环,为什么要这样做?
3. 如果用牛肉膏蛋白胨培养基分离一种对青霉素具有抗性的细菌,你认为应如何做?

分离和纯化微生物是微生物技术的重要操作方法。微生物种类不同,对培养基和生长条件等要求也不一样。一般根据微生物对营养物质、pH、氧气等要求的不同,供给它们适宜的生活条件,或加入某种抑制剂,造成只利于要分离的微生物生长、不利于其他微生物生长的环境,从而淘汰不需要的微生物,分离得到需要的微生物纯种。微生物工作者在长期科研和生产实践中积累了宝贵的经验,创造了很多适合分离和纯化不同类群微生物的方法。

自1880年科赫发明微生物的分离与纯化技术以来,该技术在获得丰富的微生物资源以及在工、农、医、环境和动植物细胞培养等方面作出了巨大的贡献。由此可见,一项微生物学新实验新技术的建立,会对整个生命科学带来革命性的变化。随着分子生物学的发展和其他学科的相互渗透,微生物的分离鉴定技术将获得新的突破。



## 自我检测

1. 什么是纯培养技术?这一技术在实践中有何重要意义?
2. 在科研和生产中,一个优良的菌种有可能被污染,请设计一个实验将优良的菌种分离出来。



## 课外实践

1. 练习用马铃薯葡萄糖琼脂培养基分离酵母菌或霉菌。
2. 练习液体接种法:(1)由斜面培养物接种至液体培养基;(2)由液体培养物接种至液体培养基。





### 微生物纯培养技术的重大贡献

在微生物学发展历史上,纯培养技术可谓功不可没。在纯培养技术出现之前,对微生物的利用还是自然发酵或天然发酵的时代,使用的微生物往往是混合菌种。而在纯培养技术出现之后,纯培养技术在多种发酵工业中发挥了重要作用。

如丙酮、丁醇的厌氧发酵,前期易受好氧菌的污染,后期又易受产酸的厌氧菌的污染,所以需要有良好的设备和严格的技术消除这些杂菌的污染。正是由于科学家建造了用低碳钢制造的圆柱形发酵罐(图 1-12),并采用高压蒸汽灭菌和无菌接种技术,保证了微生物的纯种培养,才最终解决了丙酮、丁醇发酵过程中杂菌污染的问题。

青霉素生产属于需氧发酵,很容易受到杂菌的污染。科学家借鉴了丙酮、丁醇的纯种厌氧发酵技术,成功地创造出深层通气培养法和一整套的纯培养技术,包括向发酵罐中通入大量无菌空气、通过搅拌使空气均匀分布、培养基的灭菌和无菌接种等。这些技术的应用使得微生物培养过程中的温度、pH、通气量、营养的供给等都得到了严格的控制,生产出了大批量的青霉素,挽救了数以万计的生命。

日益完善的微生物纯培养技术,为微生物工业提供了新的概念和模式,成为现代微生物产业兴旺发达的开端。

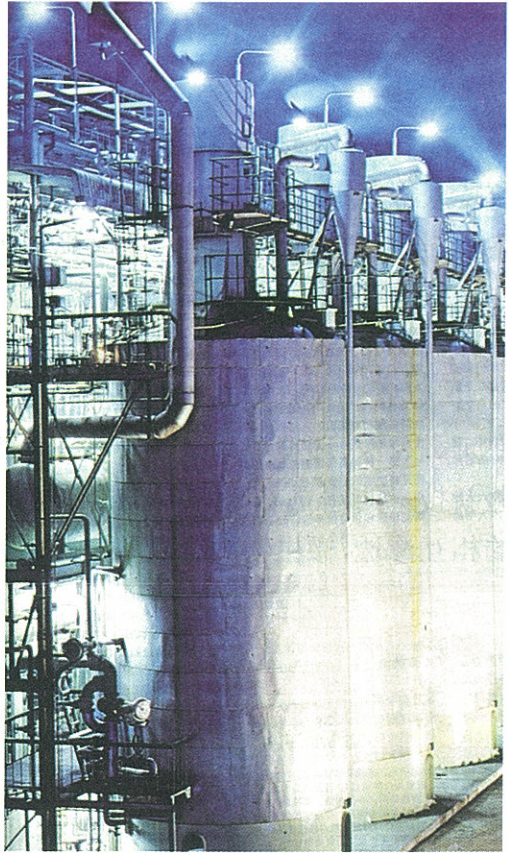


图 1-12 发酵罐

## 第 3 节 微生物数量的测定

在日常生活中,人们非常关心食品、饮料和饮用水的卫生问题,其中微生物的数量就是一个非常重要的卫生指标。在做食品和饮用水的卫生学检查时,必须测定其中的细菌总数和大肠菌群数。另外,微生物又是自然界中强大的分解者,土壤中的生物残骸、肥料等是否被转化为植物可直接利用的物质,也跟土壤中微生物的数量密切相关。那么,我们如何测定微生物的数量呢?



## 测定土壤中微生物的数量

### 活动目标

使用平板菌落计数法测定土壤中微生物的数量。

### 实验原理

平板菌落计数法是将待测定的微生物样品按比例作一系列稀释后，将其中的微生物充分分散成单个细胞，吸取一定量某几个稀释度的菌液接种到平板上，培养一段时间后，每个单细胞生长繁殖形成单个菌落，根据稀释倍数、取样接种量和菌落数即可换算出样品的含菌数。

### 材料用具

土壤样品；尿素，酵母粉，磷酸二氢钾，磷酸氢二钠，酚红，琼脂，1mol/L NaOH 溶液；无菌吸管，盛有 9mL 无菌水的试管，盛有 90mL 无菌水并带有玻璃珠的锥形瓶，试管架，无菌培养皿，记号笔，烧杯等。

### 方法步骤

#### 1. 制备尿素固体培养基

依据技能卡配制尿素固体培养基。

#### 2. 制备土壤样品稀释液

称取土样 10g，放入盛有 90mL 无菌水并带有玻璃珠的锥形瓶中，振摇约 20min，使土样和水充分混和，将土壤悬液制成  $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$  不同稀释度的稀释液。

#### 3. 加样

取 10 套无菌培养皿，取  $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$  和  $10^{-6}$  每种稀释度做 3 个重复平板，留下一个平板作空白对照。分别用 1mL 无菌移液管精确吸取  $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$  3 个稀释菌液各 0.2mL，加至相应编号的无菌培养皿中(图 1-13)。



制备土壤样品稀释液时应注意每个吸管只能接触一个浓度的稀释液，且取样前需充分摇匀。



### 技能卡

#### 尿素培养基的配制方法

准确称取尿素 20g，酵母粉 0.1g，磷酸二氢钾 9.1g，磷酸氢二钠 9.5g，酚红 0.01g，琼脂 20g，依次加入盛有 900mL 蒸馏水的烧杯中，加热溶解后，用 1mol/L NaOH 溶液调 pH 至 7.2~7.4，补加蒸馏水至 1 000 mL。

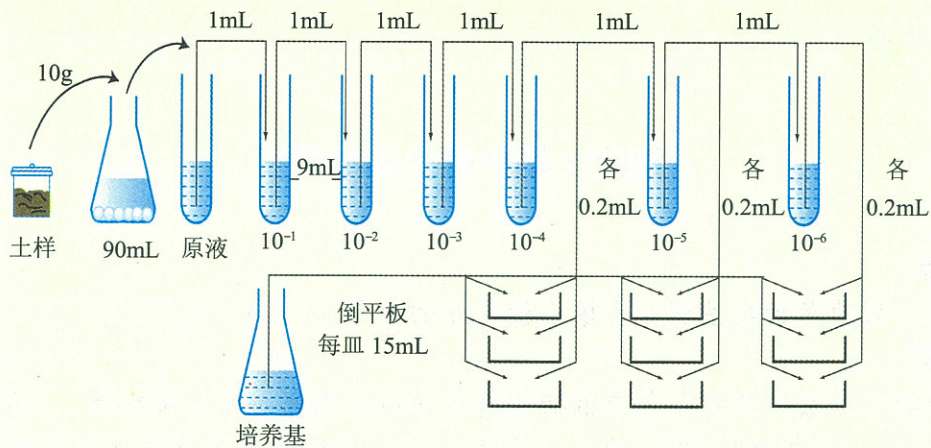


图 1-13 微生物数量测定的流程图

#### 4. 倒平板

将菌液移入培养皿后立即倒入溶化并冷却至 45℃ 左右的尿素培养基 (倒入量约 15mL), 随即快速晃动培养皿, 使菌液和培养基充分混匀后平置, 待凝。

#### 5. 培养

待平板完全凝固后, 倒置于恒温箱中 37℃ 培养。

#### 6. 统计菌落数

培养 48h 后取出平板, 统计各皿中的菌落数, 将结果记录在下面的表格中。计算结果时, 应选取每皿菌落数在 30~300 (图 1-14) 的一组平板为代表进行统计。



将计数后的平板在沸水中煮 30min 后, 清洗晾干。

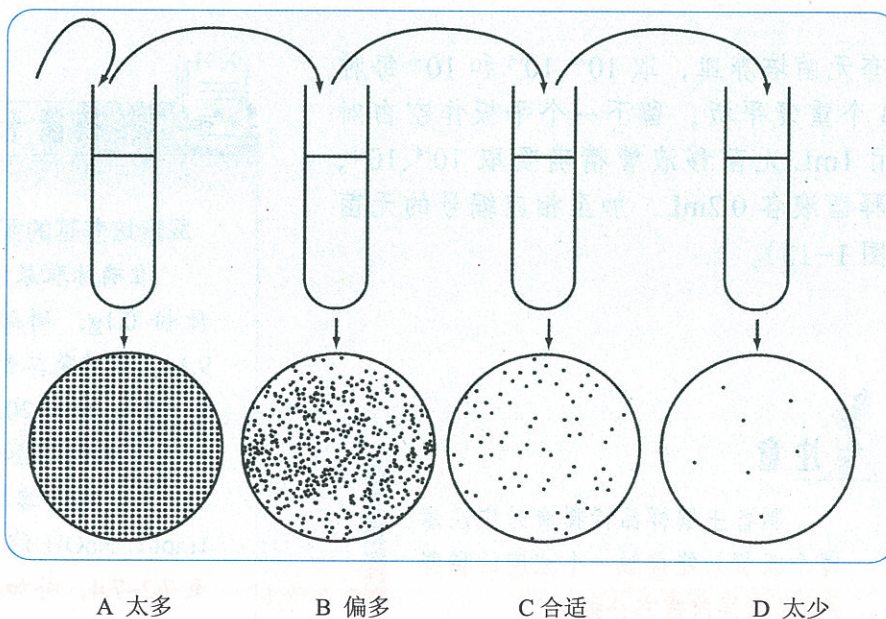


图 1-14 每皿菌落数示意图

## 7. 计算样品中的菌数

计算公式是：

每克样品的菌数 = 同一稀释度的菌落平均数  $\div$  0.2  $\div$  稀释度  $\times$  10

稀释度	$10^{-4}$				$10^{-5}$				$10^{-6}$			
	1	2	3	平均值	1	2	3	平均值	1	2	3	平均值
菌落数 / 平板												
菌数 / 克土壤												

### 总结与讨论

1. 要使平板菌落计数法准确, 需要掌握哪几个关键步骤? 为什么?
2. 平板菌落计数法的原理是什么? 适用于哪些微生物?

通过实验可以看出, 在严格执行无菌操作、准确稀释和定量接种的条件下, 接种不同稀释倍数的菌液, 在平板上长出的菌落数量, 会随着稀释倍数的增加而相应地递减。但在实际操作中总有一些误差, 因此, 统计菌落时, 一般选择在同一稀释度的 3 个培养皿中的菌落数目相近者, 并且要求菌落数目在一定的范围内, 若测定细菌和放线菌, 要求每皿以 30~300 个菌落为宜, 若是霉菌则以每皿 10~100 个菌落为宜。

微生物数量的测定也是重要的微生物技术之一, 微生物数量的测定方法很多, 平板菌落计数法 (plate colony count method) 是一种应用广泛的微生物数量测定方法。这种计数法最主要的优点是能测出样品中的活菌数, 因此又称活菌计数法。此外, 该方法还常用于微生物的选种与育种、分离纯化及其他方面的测定。平板菌落计数法的缺点是操作手续较烦琐, 时间较长, 测定值常受各种因素的影响。为便于实际应用, 近年来平板菌落计数技术已在向简便、快速、微型和商品化的方向发展。

土壤是微生物生存的大本营, 土壤中微生物的数量和种类很多, 包括细菌、放线菌、真菌等类群, 其中细菌数量最多, 约占土壤微生物总量的 70%~90%, 其次为放线菌和真菌。这些微生物的种类、数量和代谢活性直接影响土壤肥力, 并且许多有益的微生物都是从土壤中分离得到的。因此, 土壤是人类利用微生物的巨大资源宝库。



### 自我检测

1. 如果平板上长出的菌落不是均匀分散的而是集中在一起, 你认为问题出在哪里?
2. 菌液样品移入培养皿后, 若不尽快地倒入培养基并充分摇匀, 将会出现什么结果? 为什么?
3. 比较同一稀释度的 3 个平板上长出的菌落数是否相近, 如果不是, 请分析原因。



### 食品、饮料和调味品的微生物指标

在日常生活中,大家非常重视食品安全问题。因为食品容易受微生物的污染,食用后对人体健康有一定影响,所以,在食品检测中,微生物指标是非常重要的检测内容。在检测时,所有食品不得检出致病菌(沙门氏菌、志贺氏菌、金黄色葡萄球菌等),同时,还对大肠杆菌和霉菌有更严格的要求。大肠杆菌为肠杆菌科的细菌,抵抗力强,在水和土壤中可存活数月。大肠杆菌大量存在于人和动物的肠道中,一般情况下能合成维生素B和维生素K,对身体有利。但当食品中的大肠杆菌数目超过某一限定值之后,就表明该食品已被污染,特别是有些大肠杆菌是致病菌,如大肠杆菌O<sub>157</sub>,食用后会对人体造成严重危害。因此,大肠杆菌被列为重要的微生物检测指标。霉菌数量的检测主要是因为一些食品易被黄曲霉、寄生曲霉、杂色曲霉等可产生毒素的霉菌污染,因此,要求霉菌在这些食品中不得检出;而对一些不易被上述霉菌污染的食品,霉菌数要求不是很严格,如面包和糕点等。

一些食品、饮料和调味品的微生物指标见下表。

种类	菌落总数 个/g或mL ≤	大肠菌群 个/100g或100mL ≤	霉菌计数 个/g或mL ≤
瓶装饮用水	30	3	不得检出
生活饮用水	20	3	不得检出
乳酸菌饮料	100	3	30
碳酸饮料	100	6	10
蛋白质饮料	100	3	20
酱油	30 000	30	不得检出
食醋	10 000	3	不得检出
方便面	1 000	30	不得检出
面包、糕点	1 500	30	100

## 第4节 微生物的利用

微生物广泛分布于土壤、空气和水等自然环境中,动植物和人体表面以及某些与外界相通的腔道中。微生物与人类生产、生活密切相关,许多有益的微生物通过其强大的分解作用有益于人类。例如,秸秆是最丰富的自然资源,其主要成分是纤维素和半纤维素。秸秆埋在土壤中,很难被植物直接吸收和利用,利用土壤中的微生物就能解决这一农业上的难题。那么,我们应该怎样利用有益微生物呢?



### ●从土壤中分离有益微生物



实验

### 从土壤中分离纤维素分解菌

#### 活动目标

尝试从土壤中分离纤维素分解菌的基本实验操作技术。

#### 实验原理

土壤中存在大量纤维素分解菌,包括真菌、细菌和放线菌等,它们可以产生纤维素酶,分解和利用纤维素和半纤维素。因此在用纤维素作为唯一碳源的培养基中,纤维素分解菌能很好地生长,并产生黄色或棕绿色色素,其他微生物则不能生长。

#### 材料用具

菜园或稻田土样; $K_2HPO_4$ ,  $FeCl_3 \cdot 5H_2O$ ,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ,  $CaCl_2$ ,  $NaNO_3$ ,  $NaCl$ , 蒸馏水,琼脂,1mol/L NaOH,1mol/L HCl;盛有9mL 无菌水的试管,灭菌培养皿,镊子,无淀粉新华一号滤纸,1mL 灭菌吸管,天平,恒温培养箱等。

#### 方法步骤

##### 方法一

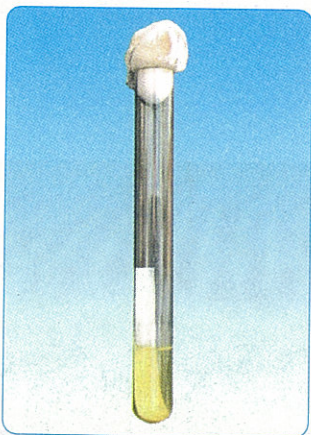
(1)制备培养基 依据小辞典,配制依姆歌涅茨基液体培养基。

(2)分装 按每试管5mL分装,然后加入7cm×1cm滤纸条,滤纸条紧贴内壁,且一半浸入培养基中,121℃灭菌20min。



#### 小辞典

依姆歌涅茨基液体培养基	
$K_2HPO_4$	1.0g
$FeCl_3 \cdot 5H_2O$	0.1g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.3g
$CaCl_2$	0.1g
$NaNO_3$	2.5g
$NaCl$	0.1g
加蒸馏水到	1 000mL
pH	7.2~7.4



(3) 制备土壤稀释液 制备  $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$  和  $10^{-5}$  的土壤稀释液。

(4) 接种培养 分别吸取各稀释度的土壤稀释液 1mL 接种到滤纸条上,每个稀释度重复 4 次,置培养箱中  $28^{\circ}\text{C}$  培养 14d。



(5) 观察 检查各试管中滤纸条上出现的菌落和滤纸颜色变化情况。

方法二

(1) 制备培养基 制备依姆歇涅茨基培养基平板,在平板上铺一张直径略小于平板的滤纸,用少量上述液体培养基润湿。

(2) 接种培养 在滤纸上等距放 8 个直径约 10mm 的土粒,盖上培养皿盖以保持湿度,置恒温培养箱中  $28^{\circ}\text{C}\sim 30^{\circ}\text{C}$  培养。

(3) 观察 每隔 2d 观察土粒周围滤纸变色情况,直到滤纸颜色变化,长成菌落,于  $4^{\circ}\text{C}$  冰箱中保存备用。



### 总结与讨论

根据实验结果判断同一试管(或培养皿)中的滤纸上生长的微生物类群有几种? 优势菌是哪一类?

土壤中能够分解纤维素的微生物很多,包括细菌、放线菌和真菌等。这些微生物能分泌纤维素酶,将纤维素分解为自身可利用的小分子糖类物质,因此能在无淀粉的滤纸上生长。此外,土壤中还存在着许多其他有益的微生物类群,它们也像纤维素分解菌一样,可以通过自身分泌的一些酶类来分解土壤中的大分子物质,提高土壤肥力。

由于能源紧张、环境污染和人口剧增等世界性问题日趋严重,那些至今还没有被很

好利用的作物秸秆引起人们极大的关注。世界上每年约生成  $1.5 \times 10^{14} \sim 2.0 \times 10^{14} \text{kg}$  植物性有机物,其中约一半为纤维素物质。我国每年秸秆产量约  $5.8 \times 10^{11} \text{kg}$ , 45%~47%作为燃料补充农村能源的不足。近年来,部分地区的农民贪图自己方便,在田间地头大量焚烧秸秆,严重地污染了周围环境。如何将纤维素物质降解转化为糖、乙醇、甲烷等容易利用的小分子有机物,又不对环境造成污染,是当前国际上的重大课题之一。目前对纤维素的降解利用主要采用生物手段,即利用纤维素分解菌或其产生的酶来分解纤维素(图 1-15)。这项技术在碳素循环、提高土壤肥力及解决人类食物问题等方面具有重大意义。



图 1-15 秸秆还田

## ● 微生物对有机物质的分解



### 探究

#### 探究纤维素分解菌是否只能分解纤维素

##### 问题

分解纤维素的微生物能否分解其他物质呢?

##### 作出假设

假设分解纤维素的微生物还能分解其他物质,包括淀粉、木质素、果胶等大分子含碳有机物。

##### 设计实验

分组设计实验方案,用同一种分解纤维素的微生物分解不同的其他物质(淀粉、果胶和木质素等),或者用不同分解纤维素的微生物分解同一种物质,在实验设计中注意设置对照实验和实验重复等。

##### 实施实验

根据实验设计,认真进行实验,记录观察到的实验结果。

##### 得出结论

根据实验过程分析实验结果,得出结论。

##### 表达交流

分组汇报探究结果和实验中存在的问题,讨论以下问题:

1. 如何判定分解纤维素的微生物也能分解木质素?
2. 同一微生物类群对纤维素、木质素、淀粉和果胶的作用有什么不同?



不同培养基中,同一菌株或菌群表现出的活力不一致,这可能是由于测定的时间不一致以及培养基中所含酶的浓度、活力不同而造成的。另外,不同的培养基中,底物不同,诱导产物也可能有差异。这是因为不同类型的物质的结构不一样。纤维素的分解比较困难,木质素的分解比纤维素更难,淀粉和果胶的分解比纤维素容易。纤维素分解菌之所以还能分解其他物质是因为它们还能分泌淀粉酶、蛋白酶、果胶酶和木质素酶等。

分解纤维素的微生物在自然界碳素循环中具有重要意义。据估计,90%以上的二氧化碳是由微生物的活动产生的,微生物使碳元素从有机物转移到无机物中,再通过植物的光合作用,形成有机物,保证了自然界中碳元素的相对稳定。微生物的种类繁多、分布广、数量大,而且所起的作用也多种多样。例如,分解果胶的微生物可用于果汁澄清和麻类脱胶;分解淀粉的微生物可用于织物脱浆和酒类酿造等;分解木质素的微生物参与植物枯枝落叶的分解等。另一方面,食品、药品和生活用品的腐败、霉烂,某些人类和动植物病害等多是由微生物引起的。但大多数微生物对人体和动植物是有益或无害的,只要人为控制,充分开发利用,就能很好地造福于人类。

## ● 利用微生物制作食品



### 利用微生物制作豆豉

#### 活动目标

1. 简述制作豆豉的原理。
2. 探讨豆豉的制作过程。

#### 实验原理

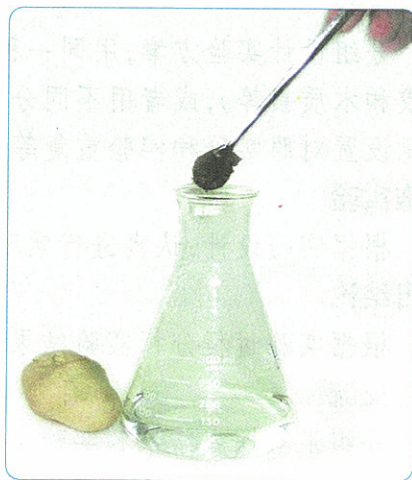
豆豉是用煮熟的大豆经过纳豆菌(*Bacillus natto*,一种带芽孢的枯草杆菌)发酵制成的。纳豆菌分泌的蛋白酶能够分解大豆中的蛋白质,产生小分子多肽及多种氨基酸,制成风味独特的发酵食品。在制备过程中,根据纳豆菌的芽孢对热不敏感的特性,可采用高温控制杂菌污染。

#### 材料用具

黄豆,市售豆豉;用开水消毒的屉布或双层纱布2块,烧杯,玻璃棒,勺子,250mL的锥形瓶,塑料容器。

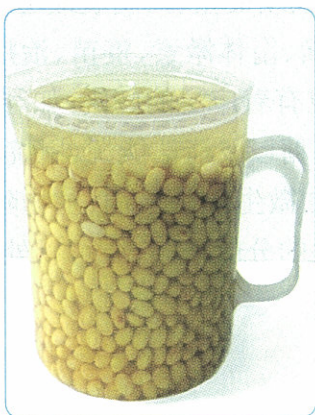
#### 方法步骤

1. 制备豆豉菌悬液  
在锥形瓶中倒入30~40mL开水,加入新鲜的豆豉5~6粒,摇匀,备用。



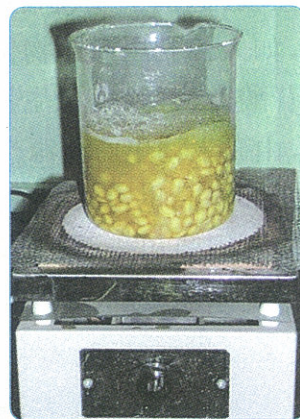
## 2. 浸泡

将黄豆装入杯中加水浸泡15h左右。



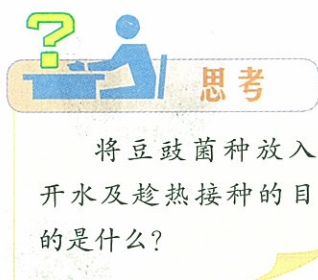
## 3. 煮豆

将浸泡过的黄豆煮20~30min,直到黄豆用手轻轻一掐就破即可。



## 4. 接种

在容器内铺上一块双层纱布,将煮好的黄豆趁热捞入容器内,将豆豉菌悬液洒在豆子表面,用消过毒的玻璃棒快速搅拌均匀。



将豆豉菌种放入开水及趁热接种的目的是什么?

## 5. 发酵

用另一块双层纱布盖在豆子表面,40℃发酵15h左右。当黄豆表面长出一层菌膜时,根据口味加入盐或酱密封保存。



## 总结与讨论

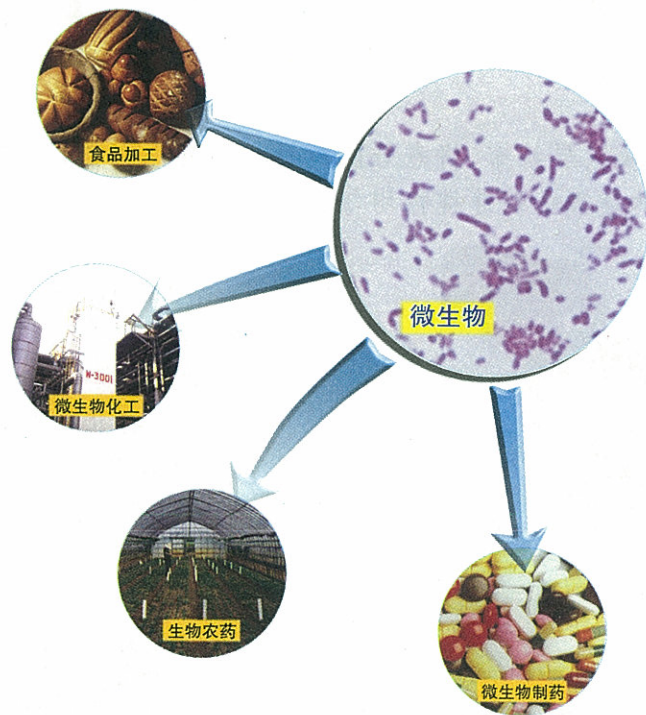
根据实验结果,写出实验报告,并讨论下列问题:

1. 豆豉制作过程中,怎样控制杂菌的污染?
2. 如何保证豆豉发酵过程中的湿度?
3. 总结食品微生物的主要作用。

发酵食品是微生物技术最早开发应用的领域。目前,人们已经广泛利用细菌、酵母菌和霉菌等生产发酵食品,主要包括酿造各种酒类,如葡萄酒、白酒和啤酒等;制作发酵食品和调味品,如酸奶和奶酪、味精、酱油和醋、豆豉、豆腐乳和泡菜等。

目前,微生物技术应用的范围进一步扩大,已深入到工农业生产、医疗保健、环境保护等

诸多领域。医药卫生领域是微生物技术应用最广泛、成绩最显著、发展最迅速、潜力也最大的领域,如人们利用微生物生产抗生素、氨基酸、维生素、甾体激素、疫苗、治疗用酶、酶抑制剂和核苷酸类药物等。微生物技术在轻工和化工领域也有着广泛的应用,如利用微生物生产酶制剂,由微生物生产能源产品如有机溶剂、有机酸、多糖以及清洁能源(甲烷和氢气)等。微生物技术和产品也为农业的发展提供了有力的支持,如微生物杀虫剂、生物除草剂、生物增产剂以及食用菌和药用真菌等。此外,利用微生物强大的分解作用,还可以处理各行业和人们生活中产生的废水、废气和废渣等。



总之,微生物技术的应用十分广泛,它的进步推动了其他生物技术的快速发展。同时,随着基因工程、蛋白质工程、细胞工程等研究的深入,微生物技术的应用范围进一步扩大,必将为工农业生产和人类的健康作出更大的贡献。



### 自我检测

1. 试举出生活实践中利用纤维素分解菌的实例。
2. 制作豆豉时,利用纳豆菌芽孢耐热的特点来控制杂菌的污染,对于没有芽孢的微生物应采取什么措施来控制杂菌污染?



## 课外实践

调查生活中利用微生物的实例。

## 本章小结

微生物技术是生物技术中最基本也是最重要的操作技术。微生物技术包括培养基的制备和灭菌、微生物的分离与纯化、微生物数量的测定等,这些技术为充分利用微生物提供了条件,同时也为其他生物工程技术奠定了基础。

用于科学研究和工业生产的微生物一般都用培养基培养。培养基是人工配制的适合微生物生长、繁殖或积累代谢产物的营养物质。不同培养基有不同的配方和不同的 pH。培养基配制后应立即灭菌,不能及时灭菌时,应在冰箱中冷藏保存。高压蒸汽灭菌法是培养基灭菌最常用的方法。

不同种的微生物对营养物质要求不同,因此,可利用培养基对微生物的选择作用获得不同的微生物种群。纯种的微生物可以通过划线法、涂布法等技术,在固体培养基上得到单个菌落,再利用接种技术进一步纯化获得。平板菌落计数法是一种广泛应用的活菌计数法,其过程包括样品稀释、培养、计数等步骤。严格的无菌操作是得到准确数据的关键。

微生物与人类的生产生活密切相关,分离、纯化和培养微生物的目的是为了更好地利用微生物。目前微生物在工农业生产、医疗保健和环境保护等方面发挥着越来越重要的作用。

# 第2章 酶技术

## 主要内容

### 1. 果胶酶的制作方法及其作用

- 实验 果胶酶的制作及对苹果匀浆的作用

### 2. 酶活力的测定

- 实验 检测果胶酶的活力
- 探究 探究果胶酶作用的最佳条件

### 3. 酶在食品制作和洗涤方面的应用

- 酶在食品制作中的应用
- 实验 蛋液发酵饮料的制作
- 酶在洗涤方面的应用
- 探究 探究带有不同污渍衣物的洗净方法
- 探究 探究加酶洗衣粉的最佳使用条件

### 4. 固定化酶的制备和应用

- 固定化酶的制备
- 实验 固定化乳糖酶的制备
- 固定化酶的应用
- 实验 检测牛奶中乳糖的分解

## 技术发展历程



酶技术又叫酶工程,主要是研究酶应用的技术。酶的应用在 4 000 多年前随着酿酒技术的出现就已经开始了,但是人们对酶的真正认识却只有不到 200 年的历史。1684 年,比利时医生赫尔蒙特(J. B. van Helmont)把在酿酒过程中引起物质变化的因素称为酵素,也就是我们现在所说的酶。1810 年, 药物学家普朗切(Planche)在植物根中分离出一种物质, 虽然他没指明此物质是酶, 但人们还是认为他是酶的发现者。1833 年, 帕耶恩(Payen)和珀索兹(Persoz) 等人用酒精从麦芽浸出液中沉淀出淀粉酶, 发现淀粉酶可以使 2 000 倍的淀粉分解, 不久, 淀粉酶便被用于棉布退浆。1897 年, 德国的布希纳兄弟(H. Buchner 和 E. Buchner)成功地用酵母的无细胞抽提液实现了乙醇发酵, 这是酶应用发展史上的一个里程碑, 这一重大发现促进了酶的分离纯化、理化性质及酶促动力学的研究。20 世纪 50 年代, 随着人们对酶认识的逐渐深入, 酶制剂的大规模生产逐渐兴起。60 年代, 固定化酶的出现是酶技术上的又一里程碑。1969 年, 日本人千畑一郎首次应用固定化氨基酰化酶大规模生产 L-氨基酸, 这一技术的出现不仅改变了以往酶不能连续使用的状况, 而且提高了酶在使用过程中的稳定性。70 年代初期, 酶技术的发展可以总结为两个方面, 一是人们相继发现了限制性内切酶和 DNA 连接酶, 为基因工程的诞生铺平了道路; 二是人们在固定化酶的基础上对微生物、动植物细胞的固定化进行了广泛的研究, 并相继开发出了各种生物反应器。80 年代初, 核酶的发现打破了酶是蛋白质的传统概念, 开辟了酶学研究的新领域。

未来酶技术的主要任务是设计出高性能的生物反应器, 与细胞工程、发酵工程以及基因工程技术相结合, 创造出自然界原来不存在的超自然酶, 造福于人类。

## 第 1 节 果胶酶的制作方法及应用

随着酶技术的深入发展,酶制剂(图 2-1)的应用越来越广泛。如利用糖化酶和淀粉酶生产葡萄糖;利用木瓜蛋白酶生产澄清透明的啤酒;利用醛脱氢酶和醛氧化酶消除大豆的豆腥味;利用果胶酶制作清澈的果汁。绝大多数的酶是有活性的蛋白质,那么怎样才能得到这些有活性的酶呢?



图 2-1 各种酶制剂



### 果胶酶的制作及对苹果匀浆的作用

#### 活动目标

1. 概述果胶酶的作用。
2. 尝试从植物组织中提取粗酶液的方法。

#### 实验原理

果胶酶是能够分解果胶的多种酶的总称,广泛存在于植物果实和微生物中。由于酶是有活性的蛋白质,其活性受到许多因素如温度、pH、激活剂等的影响,所以酶的提取要在低温、合适的 pH 下进行。为了提高酶的活性有时还要加入酶的激活剂,果胶酶可被盐类抽提并激活。

果胶广泛存在于高等植物特别是水果和蔬菜的组织中,是植物细胞胞间层和初生壁的重要成分,在植物的细胞组织中起着黏合的作用,它的分解会引起细胞的离散。果胶溶于水形成黏稠状液体,新鲜苹果汁由于含果胶而混浊,在果胶酶的作用下,苹果汁中的果胶会被分解而使果汁变得澄清。

#### 材料用具

新鲜水果或蔬菜;质量分数为 10% 的 NaCl 溶液,0.1mol/L 冰乙酸;研钵,剪刀,漏斗,纱布或滤纸,烧杯,精密 pH 试纸,试管,酒精灯,离心机,榨汁机等。

## 方法步骤

### 1. 果胶酶的制作

(1)取约 50g 新鲜水果或蔬菜,洗净后在预冷的研钵内用剪刀剪碎,迅速边研磨边逐次加入质量分数为 10%的 NaCl 溶液,共计 100mL,使之成浆状。



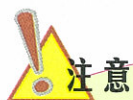
(2)将研磨好的匀浆用滤纸或 5 层纱布过滤,收集滤液于烧杯中。



(3)将滤液倒入离心管中,在 4 000 rpm 下离心 15min。



(4)离心完毕后,将上清液迅速倒入干净的烧杯内,用 0.1mol/L 的冰乙酸调其 pH 为 3~4,0℃~4℃保存备用。



离心前盛有样品的离心管要等重对称放置。



## 2. 观察果胶酶对苹果匀浆的作用

(1)用榨汁机制作苹果匀浆,在恒温水浴锅中,90℃水浴条件下保温4min,冷却后经3层纱布过滤,收集滤液。



(2) 分别取滤液 40mL, 装在两支试管中。



(3) 向两支试管中分别加入已制备好的和煮沸 4min 后的酶液各 40mL, 振荡摇匀。



(4)观察两试管中苹果匀浆的澄清度,并将结果记录在下表中。

管号	项目	苹果匀浆 / mL	酶液 / mL	煮沸 4min 后的酶液 / mL	现象	澄清时间
试管 1 (样品管)		40	40			
试管 2 (对照管)		40		40		

注:如果澄清现象不明显或澄清时间过长,可用 721 分光光度计测波长为 660nm 时的透光率,以透光率大小表示澄清程度。

### 总结与讨论

根据实际操作过程写出实验报告,并讨论以下问题:

1. 实验过程中用 NaCl 溶液抽提的目的是什么?
2. 酶提取过程中的注意事项有哪些?

果胶酶是果蔬深加工生产中的主要用酶，是一种复合酶制剂，它除了含有果胶分解酶外，还含有少量的纤维素酶、半纤维素酶、淀粉酶和蛋白酶等。在果蔬汁生产中，使用果胶酶的主要目的是提高果汁产量，降低果汁的黏度，有利于果汁的浓缩，同时还可改进果汁的透明度、可过滤性和稳定性。工业上生产的果胶酶全部是复合酶。国产果胶酶多是利用黑曲霉菌种，经深层液体培养发酵后制得，含有酯酶、水解酶和裂解酶 3 个组分。

酶的分离提纯及大批量生产是酶技术中的重要内容之一。把酶从生物体中提取出来，并使之达到与使用目的相适应的纯度，是酶的提取及分离纯化的基本任务。由于使用的目的、环境不同，对酶的纯度要求差异很大。一般工业上用的酶制剂，用量大，要求纯度不高，如纺织业上的织物退浆、皮革业中的动物皮脱毛等使用粗酶制剂即可(图 2-2)。而有一些工业，如食品工业，对酶制剂纯度有一定的特殊要求。在一些特定情况下，如鉴定酶、研究用酶和静脉注射用酶等，需要用纯化的酶。

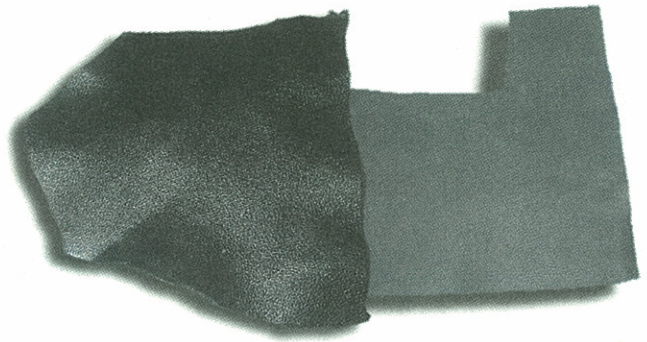


图 2-2 加工后的动物皮



### 自我检测

1. 果胶酶制备时为什么要调 pH 为 3~4?
2. 观察果胶酶对苹果匀浆作用时，为什么要设置对照管？对照管与样品管有何区别？对照管用蒸馏水代替可以吗？
3. 观察果胶酶对苹果匀浆作用时，将苹果汁在 90℃ 水浴条件下保温 4min 的目的是什么？



### 课外实践

观察果胶酶对其他果蔬组织匀浆的作用。

## 第 2 节 酶活力的测定

根据果胶酶对苹果匀浆作用的实验结果,可以看到,各组同学制作的果胶酶使苹果匀浆变澄清的时间有一定差别,这就是说不同组的果胶酶对苹果匀浆的作用能力不同,这种能力在酶学研究中称做酶活力,要定量地比较它们这种能力的差别就要进行酶活力的测定,那么如何进行酶活力的测定呢?



### 检测果胶酶的活力

#### 活动目标

尝试测定果胶酶活力的方法。

#### 实验原理

果胶酶可将果胶水解生成  $\beta$ -半乳糖醛酸, $\beta$ -半乳糖醛酸可用次碘酸钠法进行定量测定。根据测定得到的  $\beta$ -半乳糖醛酸的量可以计算出果胶酶的活力。

#### 材料用具

果胶酶提取液;质量分数为 1% 的果胶溶液, 0.1mol/L 的碘液, 0.05mol/L 的硫代硫酸钠溶液,质量分数为 0.5% 的淀粉溶液, 1mol/L 的碳酸钠溶液, 1mol/L 硫酸, 0.1mol/L 的冰乙酸;碘量瓶,恒温水浴锅,微量滴定管。

#### 方法步骤

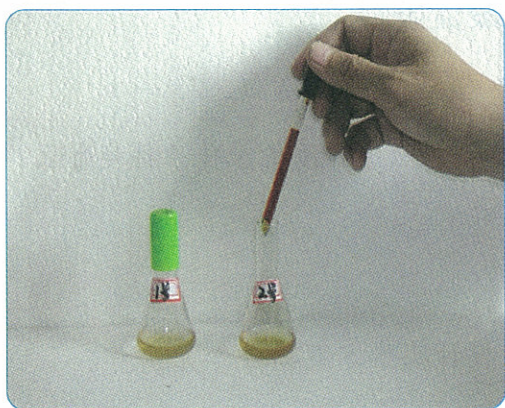
##### 1. 保温

取两个 100mL 的锥形瓶,1 号瓶中加入质量分数为 1% 果胶溶液 10mL,果胶酶液 5mL,蒸馏水 5mL。2 号瓶中以 5mL 蒸馏水代替酶液,均用 0.1mol/L 的冰乙酸调 pH 至 3.5,在恒温水浴锅内 50℃ 保温。



## 2. 加碘氧化

保温 2h 后,分别从 1 号瓶和 2 号瓶中取 5mL 反应液放入两个 100mL 的碘量瓶中,加热煮沸 2min,冷却后分别加 1mL 1mol/L 的碳酸钠溶液、5mL 0.1mol/L 的碘液,混合均匀,加塞后室温放置 20min。



## 3. 滴定

向上述碘量瓶中分别加入 2mL 1mol/L 硫酸,用 0.05mol/L 硫代硫酸钠滴定至溶液呈淡黄色,再加入质量分数为 0.5% 的淀粉指示剂 1mL,继续滴定至蓝色消失为止,记录所用硫代硫酸钠毫升数,分别用 A 和 B 表示。



## 4. 计算

在本实验中,一个酶活力单位指:每小时催化果胶水解生成 1mmol  $\beta$ -半乳糖醛酸的酶量。根据下式计算果胶酶的酶活力:

$$\text{酶活力(单位)} = (B - A) \times M \times 1 \div 2 \times 20 \div 5$$

式中: B 表示空白滴定所消耗的硫代硫酸钠毫升数; A 表示样品滴定所消耗的硫代硫酸钠毫升数; M 表示硫代硫酸钠的摩尔浓度; 1 表示 1mol 硫代硫酸钠相当于 1mol  $\beta$ -半乳糖醛酸; 2 表示作用时间; 20 表示反应液总体积; 5 表示检测时所取反应液的毫升数。

## 总结与讨论

1. 本实验中加碘氧化的作用是什么?
2. 为什么各组测出的酶活力不完全一样?

酶活力的测定贯穿于酶的抽提、分离、纯化和浓缩等每一个过程,是酶学研究中的重要内容之一。这是因为,为了得到一种高纯度、高活力的酶制剂,往往要经过一系列复杂的分离纯化过程,而各个过程中所采取的手段可能很温和,也可能很激烈,这些手段都或多或少地影响到酶的活性。为了掌握了解每一个过程中酶活力的损失程度以及所采取的手段是否合适,以决定是否进行下一步操作,就必须在完成了每一步操作后都要对酶活力进行测定。为了表示酶活力的大小,人们规定了酶活力单位。但是,由于不同的实验室或操作者所用的测定方法不同,往往会造成结果差异较大,不方便比较。为了统一酶活力单位,国际生化协会酶学委员会于 1961 年给出了如下建议:在一定条件下,1min 内能转化 1 $\mu$ mol 底物的酶量称为

一个酶活力单位。温度保持在25℃,其他条件如 pH 和底物浓度等均应采用最适条件。

酶对底物的作用是在一定的条件下进行的,条件不同,酶促反应速度不同,这些条件包括温度、pH、酶浓度、底物浓度等。那么,在什么条件下才能达到酶作用的最佳效果呢?



## 探究

### 探究果胶酶作用的最佳条件

#### 问题

温度、pH 和酶浓度对酶促反应速度有何影响? 果胶酶作用的最佳条件是什么?

#### 作出假设

根据已有知识作出假设。

#### 设计实验

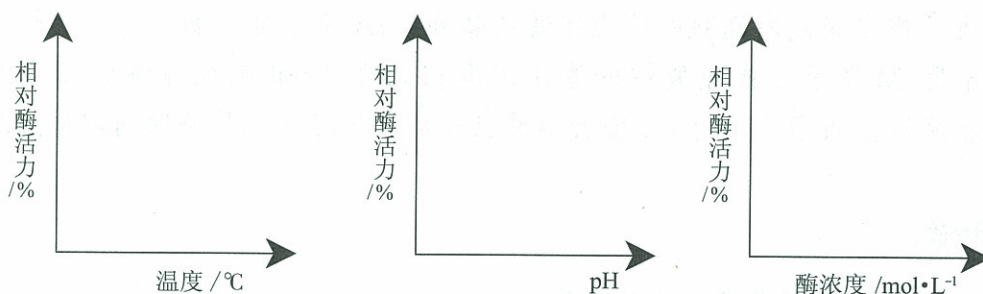
根据问题和假设,按照单因子变量原则分组设计实验方案。

#### 实施实验

按照实验设计,完成实验。

#### 得出结论

分别以温度、pH 和酶浓度为横坐标、相对酶活力为纵坐标,画出温度—酶活力、pH—酶活力和酶浓度—酶活力曲线图,从图中你能得出什么结论?



#### 表达交流

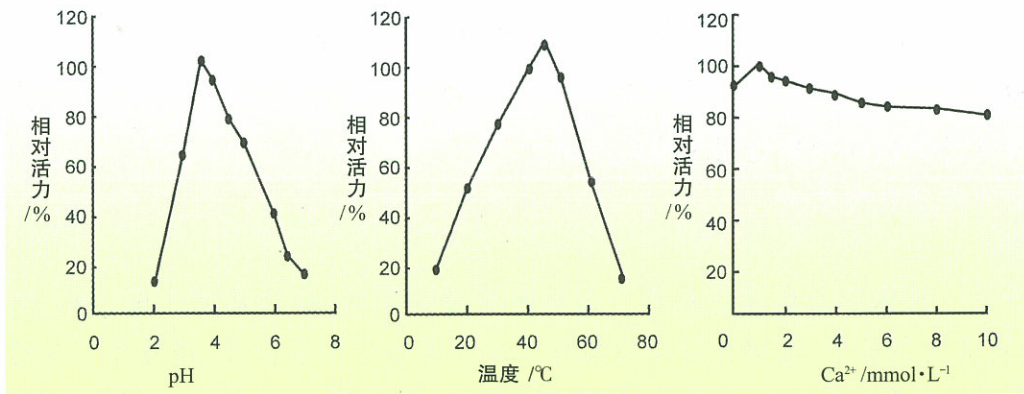
1. 测定果胶酶活力时,有哪些注意事项?
2. 果胶酶的最佳作用条件是什么?
3. 你能够确定温度和 pH 哪个因素对酶活力影响更大吗? 为什么?
4. 除温度、pH 和酶浓度外,可能影响到酶活力的因素还有哪些?

绝大多数酶是有活性的蛋白质,酶活力测定就是对其所催化的化学反应速度的测定。酶对底物的作用是在一定环境条件下进行的,这些环境条件包括底物浓度、酶浓度、环境温度、环境 pH、激活剂和抑制剂等,所以影响酶活力的因素很多,实际应用中为了最大限度地利用酶,使酶表现出最大活力,可以先通过实验确定酶的最佳作用条件,以便酶制剂在应用过程中最大限度地发挥效益。



### 自我检测

1. 如何测定酶活力? 酶活力与酶促反应速度有何关系?
2. 下面 3 个图是研究人员对黑曲霉 A<sub>1</sub> 果胶酶性质的研究结果,据图分析温度、pH 和 Ca<sup>2+</sup> 浓度等与酶活力的关系。
  - (1) 酶的最适温度是多少?
  - (2) 酶的最适 pH 是多少?
  - (3) Ca<sup>2+</sup> 浓度变化对酶活力有何影响?



pH对 A<sub>1</sub> 果胶酶活力影响曲线

温度对 A<sub>1</sub> 果胶酶活力影响曲线

Ca<sup>2+</sup> 对 A<sub>1</sub> 果胶酶活力影响曲线



### 课外实践

研究唾液淀粉酶的最佳作用条件。

## 第 3 节 酶在食品制作和洗涤方面的应用

酸甜味美的酸奶,香脆可口的曲奇饼干,五颜六色的果汁饮品,口感鲜嫩的肉类制品,这些食品不但丰富了我们的日常饮食生活,而且也体现了酶在食品制造业中的重要作用。另外,酶在洗涤剂的使用中也发挥着重要作用。加酶洗涤剂的出现,使人们可以很方便地清洁被血渍、油污、果汁等污渍弄脏了的衣物。一些洗涤剂生产商还特意在其产品的外包装上注明“加酶”两个字,以示与非加酶洗涤剂的区别。食品制作和洗涤剂工业是酶制剂两个重要的应用领域。那么,在这两个领域中酶是如何发挥作用的呢?

### ● 酶在食品制作中的应用



#### 蛋液发酵饮料的制作

##### 活动目标

1. 简述发酵饮料制作过程中酶的作用。
2. 制作蛋液发酵饮料。

##### 实验原理

鸡蛋是一种高蛋白的营养食品。以新鲜蛋液为原料,经过消毒灭菌,加入乳酸菌,在一定温度条件下,乳酸菌分泌的酶可以分解蛋液中的蛋白质、脂质等。分解后的产物利于机体吸收利用。由于蛋液的主要成分是蛋白质,经加热后易凝固变性,向蛋液中加入一定量的白砂糖可以提高蛋液的热凝固温度。又由于蛋液具有特殊的腥味,影响产品的口感,可适当添加各种香精。

##### 材料用具

新鲜鸡蛋,乳酸菌,新鲜牛奶,白砂糖;体积分数为 75% 的酒精,0.1mol/L 冰乙酸,香精;烧杯,恒温培养箱,电炉等。

##### 方法步骤

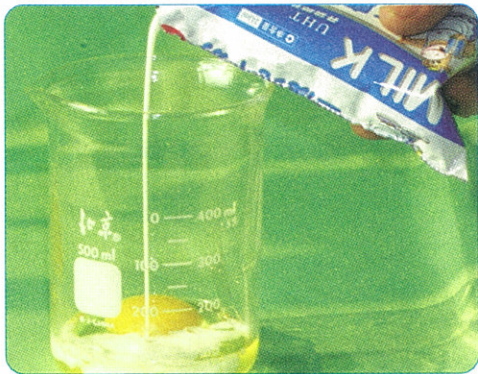
##### 1. 取蛋液

将新鲜鸡蛋洗净,用质量分数为 75% 的酒精消毒后,取出蛋液置于消过毒的烧杯内。



## 2. 加料

加入约蛋液量 40% 的新鲜牛奶 (也可用奶粉代替), 缓缓搅拌均匀, 以免起泡。再加入蛋液量 3% 的白砂糖, 搅拌均匀。



## 3. 消毒

将上述蛋液置于恒温水浴锅中, 70℃~80℃ 消毒 30min, 冷却后, 用 0.1mol/L 冰乙酸调节 pH 至 6.5~7.0。



## 4. 接种培养

取蛋液量 10% 的乳酸菌接种, 置于恒温培养箱中, 在 40℃ 环境条件下发酵培养 18~20h。



## 5. 分装

根据发酵后的蛋液酸度, 加入适量的糖及各种香精, 搅拌均匀后装瓶, 在 70℃~80℃ 条件下消毒 30min, 冷却后即成蛋液发酵饮料。



## 总结与讨论

1. 本实验中消毒时为何不在 100℃ 条件下进行?
2. 接种培养前调节 pH 为 6.5~7.0 的目的是什么?

鸡蛋发酵饮料是以新鲜蛋液为原料, 在一定条件下, 经乳酸菌发酵而成的一种新型饮料, 也是一种比较理想的营养食品。发酵后的产品不仅有与鲜蛋同样丰富的营养成分, 而且还增加了 B 族维生素的含量, 具有易于吸收、治疗多种胃肠道疾病的效果。食品工业是酶制剂应用的重要领域之一, 如在食品烘焙加工时, 酶制剂主要用于淀粉和蛋白质的改良。利用淀粉酶



可增加面团体积,改善表皮颜色,松软面团结构。利用蛋白酶可改变面筋的特性,降低面团黏度,改进面团的机械性能。

## ● 酶在洗涤方面的应用



### 探究

#### 探究带有不同污渍衣物的洗净方法

##### 问题

带有不同污渍的衣物如何洗净?

##### 作出假设

根据洗涤衣物的生活常识作出假设。

##### 设计实验

根据问题和假设设计实验步骤,注意污布的制作和选择。

##### 实施实验

根据实验设计实施实验。

##### 得出结论

认真分析实验结果,得出结论。

##### 表达交流

不同组别的同学之间交流实验设计和实验结果,并互相分析实验设计是否合理,实验结果是否可靠。

在洗涤剂中添加适当的酶可以大大缩短洗涤时间,提高洗涤效果。根据洗涤对象的不同,所添加的酶也不完全一样,其中用量最大、应用最广泛的是碱性蛋白酶。目前全世界生产的酶量中,三分之一是碱性蛋白酶。碱性蛋白酶的大部分用于加酶洗涤剂中。蛋白酶的添加量一般为洗涤剂的0.1%~1%。为了使酶与固体洗涤剂能够混合均匀,使用多种型号的造粒机,将酶制剂加工成一定形状、一定相对密度的颗粒。另外,酶也可以加到肥皂中,制成加酶肥皂等。



## 探究

### 探究加酶洗衣粉的最佳使用条件

#### 问题

某种加酶洗衣粉的最佳使用条件是什么？

#### 作出假设

根据问题作出假设。

#### 设计实验

根据问题和作出的假设进行实验设计,注意考虑实际生活中的条件对酶作用的影响。

#### 实施实验

根据实验设计实施实验。

#### 得出结论

根据实验过程分析实验结果,得出结论。

#### 表达交流

1. 实际生活中影响加酶洗衣粉使用效果的主要因素有哪些？
2. 根据你的实验结果,不同厂家生产的加酶洗衣粉哪个质量更好？

考察加酶洗衣粉的最佳使用条件,实际上就是要了解加酶洗衣粉在什么条件下去污力最强的问题。去污力是衡量洗涤剂性能的一项主要指标。洗涤剂产品的开发和研制都需要测定该产品的去污力,研制者和质检人员大多采用实验室测试的评价办法。一般以人工制作的污布进行测试,测试时应与实际生活中的条件(如温度、时间、洗涤剂浓度、水硬度等)相近,测试的污布是一个重要因素,选择不同的污布可能导致不同的实验结果。由于实际生活中污垢的多样性及布料的差异性,所以在选择若干种类的污布进行测定后作出综合评价,才能使结果更为全面可靠。

洗涤剂中的主要成分是表面活性剂,而酶和漂白活性剂的加入能普遍提高洗涤的性能。蛋白酶和淀粉酶通常用于粉状和液体洗涤剂的配方中,以改善对蛋白质和淀粉污垢的去污力。随着酶技术的不断发展,更多的酶已经或正在成为洗涤剂中不可或缺的重要成员,如洗涤剂中加入脂肪酶可以提高去除油脂污渍的能力,加入纤维素酶可以改善棉织物外观。



### 自我检测

1. 制作蛋液饮料时,对蛋液灭菌消毒的温度是 ( )  
A. 40℃~50℃                      B. 50℃~60℃  
C. 60℃~70℃                      D. 70℃~80℃
2. 制作蛋液饮料时,向蛋液中加大白砂糖用量的目的是 ( )  
A. 去腥味                              B. 提高蛋液热凝固温度  
C. 增加甜度                            D. 有利于菌体发酵
3. 用自制的污布作为实验材料与直接使用有污渍的衣物作为实验材料相比,前者有什么优点?
4. 使用加酶洗衣粉时应注意哪些问题?

## 第 4 节 固定化酶的制备和应用

通常情况下酶都是在水溶液中与底物进行反应,因此酶在反应系统中是与底物、产物混合在一起的,反应结束后,即使酶仍有较高活力,也很难再回收利用。另外,在水溶液中起作用的酶也给产物的进一步分离纯化带来了困难。为了解决这些问题,从 20 世纪 50 年代开始,人们进行了固定化酶的研究,实现了酶应用史上的一大变革,现在已有数十种酶实现了固定化并应用于工业化生产。固定化酶(immobilized enzyme)又叫固相化酶,是指固定在载体上并在一定的空间范围内进行催化反应的酶。酶的固定化过程是通过化学或物理的手段,将酶束缚在一定的区间内,固定酶分子在此区间内进行催化作用。那么,如何使酶固定在载体上呢?

### ● 固定化酶的制备



### 实验

#### 固定化乳糖酶的制备

##### 活动目标

尝试制备固定化乳糖酶。

##### 实验原理

固定化酶的制备方法很多,凝胶包埋法是常见的方法之一。凝胶是一种不溶于水的高分子聚合物,由两种化合物丙烯酰胺(Arc)和 N,N-甲叉双丙烯酰胺(Bis)在

催化剂的作用下形成的三维网状结构的高聚化合物。将酶与凝胶混合,酶即包埋在凝胶内部的微孔中,这样酶分子被“网”在凝胶内部不易泄露,而底物和产物易通过凝胶孔与酶接触,从而达到将酶固定的目的。

### 材料用具

酵母乳糖酶;0.05mol/L 磷酸缓冲液(pH 7.3), Arc, Bis, N,N,N',N'-四甲基乙二胺(TEMED),过硫酸铵(AP);培养皿,冰箱等。

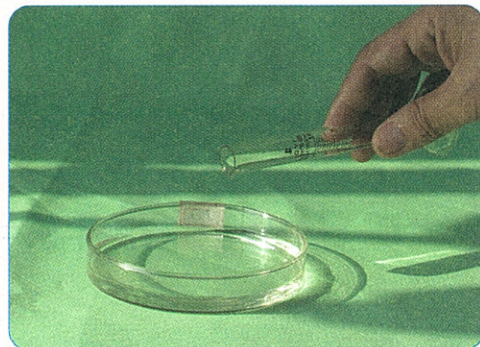
### 方法步骤

#### 1. 乳糖酶的溶解

准确称取乳糖酶 100mg,然后将其溶解在 56mL 0.05mol/L pH7.3 的磷酸缓冲液中,其中单体 Arc 浓度为质量分数 20%,交联剂 Bis 浓度为质量分数 5%(其中含 Arc 和 Bis 的磷酸缓冲液要过滤,除去不溶物)。

#### 2. 聚合

将含有 0.6mL N,N,N',N'-四甲基乙二胺和 200mg 过硫酸铵的 4mL 磷酸缓冲液迅速倒入乳糖酶的溶解液中,缓慢搅拌混匀,4℃条件下进行聚合反应 30min。



#### 3. 漂洗

聚合反应完成后形成凝胶,将凝胶用小刀切成小块,用缓冲液洗涤 4~6 次,0℃~4℃保存备用。



### 总结与讨论

1. 制备固定化乳糖酶时为什么用缓冲液配制凝胶单体?
2. 漂洗凝胶的目的是什么?
3. 制备固定化酶的方法和原理有哪些?
4. 制备固定化乳糖酶时有哪些注意事项?

乳糖酶学名为  $\beta$ -D-半乳糖苷水解酶,它能将乳糖分解为半乳糖和葡萄糖。乳糖酶广泛分布在自然界,不但存在于动植物的组织内,也作为胞内酶或胞外酶存在于不同种类的微生物体内,商品用酶基本来源于微生物。近年来应用乳糖酶治疗乳糖不耐症和处理加工牛乳

及其乳制品取得了明显的效果,但是由于直接加入乳糖酶制剂成本过高,且不易去除混入的酶制剂,使其应用受到限制,于是乳糖酶的固定化日益受到人们的重视。固定化的乳糖酶不仅对酸、碱耐受力增强,而且热稳定性大大提高,同时可以反复使用,缩短了生产周期,使成本显著降低,体现了固定化酶的优越性。

酶的固定化是酶技术研究的重要内容之一,固定化方法由酶的性质和载体特性所决定,主要包括吸附法、载体偶联法、交联法和包埋法。目前已有数十种固定化酶应用于工业化生产,如利用固定化氨基酰化酶生产 L-氨基酸,利用固定化青霉素酰化酶生产 6-氨基青霉烷酸,利用固定化葡萄糖异构酶生产高果糖浆等。除此之外,固定化酶还可以和测试仪器相结合用于自动化分析,在医学方面,可以提供临床化验参数及治疗酶缺乏症或由酶引起的代谢异常疾病。

## ● 固定化酶的应用



### 检测牛奶中乳糖的分解

#### 活动目标

1. 说出固定化乳糖酶的作用。
2. 研究还原糖的简单测定方法。

#### 实验原理

牛奶含有多种营养成分,是一种营养素比较完善的食品,其中含有约 5% 的乳糖。乳糖是一种由半乳糖和葡萄糖通过  $\beta$ -1,4 糖苷键构成的二糖,它的甜度在甜味糖中最小,溶解度也最低。乳糖酶可以将乳糖分解为半乳糖和葡萄糖,还原糖可和斐林试剂反应产生砖红色化合物,根据化合物颜色的深浅变化,可以了解乳糖酶的作用活性。

#### 材料用具

新鲜牛奶,固定化乳糖酶;斐林试剂,体积分数为 0.05% 的双氧水;漏斗,1 000mL 烧杯,滤纸,玻璃棒,电炉,温度计,移液管,试管等。

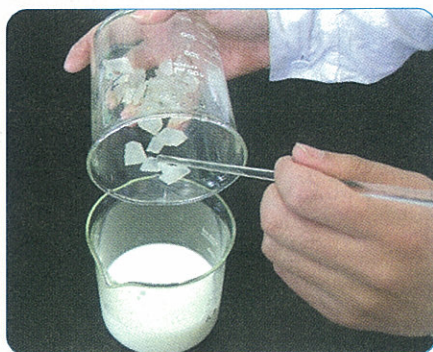
#### 方法步骤

##### 1. 鲜牛奶处理

取新鲜牛奶 0.5kg 放入 1 000mL 干净烧杯中,85℃~90℃巴氏灭菌。将灭完菌后的牛奶冷却至 45℃~50℃,过滤后平均分为两部分,一部分放入 A 烧杯,另一部分放到 B 烧杯内作对照。

## 2. 加酶分解

向 A 烧杯内加入适量的固定化酶制剂,45℃~50℃条件下保温 45min,保温过程中要用预先灭过菌的玻璃棒每隔一段时间轻轻搅拌。



## 3. 检测乳糖的分解

保温到时时,将牛奶过滤。用移液管分别取 A 烧杯和 B 烧杯内的牛奶滤液各 2mL,放到两支试管中,用移液管取斐林试剂各 2mL,分别放入被检试管中,然后把试管放入装有热水的烧杯中,摇动试管,观察试管中溶液颜色的变化。



## 4. 固定化酶的回收

实验完成后,用缓冲液反复洗涤固定化酶,再用体积分数为 0.05%的双氧水洗涤,以防固定化酶被微生物污染,然后于 0℃~4℃下保存。

## 总结与讨论

1. 检测固定化乳糖酶对牛奶的作用时,有哪些注意事项?
2. 利用斐林试剂测定还原糖的原理是什么?

固定化乳糖酶的应用除了考虑固定化酶本身的特点以外,更要考虑乳糖酶的来源和性质。乳糖酶的性质随来源不同而异,如霉菌乳糖酶的最适 pH 偏酸性(pH 2.5~5.0),酵母菌和细菌乳糖酶的最适 pH 近中性(pH 分别为 6~7 和 6.5~7.5),而不同的性质决定了每种乳糖酶或固定化乳糖酶的特殊用途,如霉菌乳糖酶适用于酸性乳清的水解,酵母和细菌乳糖酶适用于牛奶和鲜乳清的水解。乳糖酶主要用做乳制品的助消化处理剂。用乳糖酶分解乳糖,可以提高牛奶的可消化性。由于乳糖溶解度较低,用乳糖酶处理乳制品,可以避免乳糖在乳制品中结晶并增加了甜度,改善乳制品的外观和口感。

在固定化酶应用方面,固定化酶与游离酶相比不但稳定性好,而且与底物和产物容易分离。因此,固定化酶在工业、医学和生化分析等方面的应用发展较快。现在发现的酶有几千种,若把这些酶分别固定化后,采用间歇式(即在每次反应完毕,经离心或过滤法收回的酶可以重复使用)或连续式(即用固定化酶制成的反应柱进行不间断的重复使用)反应,即可得到

各种需要的产物,因此固定化酶在工业上颇受重视。临床上可以把血液引到体外,使其与固定化酶直接作用,进行体外循环。新型的人工肾脏便是按此原理制造的,即将微型胶囊脲酶和微型胶囊吸附剂——离子交换树脂或活性炭装入体外血管分流器内,并与循环系统连接,可随身携带,此法在治疗肾脏疾病方面与目前采用的半透膜法相比,具有效率高、成本低和使用方便等优点。



### 自我检测

1. 酵母乳糖酶的最适 pH 为 ( )  
A. 3~4      B. 4.5~5.5      C. 5.5~6.5      D. 6.5~7.5
2. 乳糖酶是一种二糖酶,它的作用底物和产物分别是 ( )  
A. 乳糖和葡萄糖      B. 半乳糖和葡萄糖  
C. 乳糖、半乳糖和葡萄糖      D. 乳糖和半乳糖
3. 什么是固定化酶? 固定化酶与游离酶相比有哪些优点?
4. 乳糖有还原性,乳糖在乳糖酶的作用下其水解产物也有还原性,如何鉴定乳糖的水解情况?



### 课外实践

探究固定化乳糖酶的最适作用条件。



### 开阔眼界

## 乳糖酶缺乏和乳糖不耐受

人体小肠中分解乳糖的酶有乳糖酶和 $\beta$ -半乳糖苷酶。乳糖酶缺乏可分为三类:(1)先天性乳糖酶缺乏,是指自出生时机体乳糖酶活性低下或缺乏。这是由于常染色体上的隐性基因所致,这一类型很少见。(2)继发性乳糖酶缺乏,是指由于各种原因使小肠上皮损伤而导致的短暂性乳糖酶活性低下,常见病因如:感染性腹泻、免疫球蛋白缺乏症、营养不良等,一般机体康复后恢复正常。(3)原发性乳糖酶缺乏(又叫成人型乳糖酶缺乏),是由于乳糖酶活性随年龄增长逐渐降低而引起的,无其他疾病影响,是最常见的一种,发生时间因种族和地区不同而不同,有的婴儿断乳后便开始发生,有的20岁以后才开始出现,我国多于7~8岁时发生。乳糖进入小肠后,由于乳糖酶的缺乏,乳糖不能被分解为单糖(葡萄糖和半乳糖)被吸收入血,称为乳糖消化不良和乳糖吸收不良。当乳糖进入结肠后,被细菌利用发酵生成短链有机酸(如醋酸、丙酸、丁酸等)和甲烷、二氧化碳等气体,大部分产物可被结肠重吸收。乳糖发酵过程可引起肠鸣、腹痛和渗透性腹泻,存在这些

症状时称为乳糖不耐受。乳糖不耐受对婴幼儿影响较大,并会同时伴有呕吐、发育迟缓等,成人有时伴有恶心等反应。乳制品中富含极易吸收的蛋白质和钙、磷、钾等矿物质,是人类比较理想的食物。但由于乳糖不耐受,许多人尤其是亚洲、非洲人的乳制品摄入受到限制。乳糖不耐受的长期危害,在儿童易表现为钙吸收不良、腹泻、软骨病、体重低下以及生长发育迟缓,尤其先天性和继发性乳糖酶缺乏可导致婴幼儿难治性腹泻和慢性腹泻,在老年人尤其是老年妇女易表现为骨质疏松等症状,少量多次摄入乳制品或选用发酵乳、低乳糖制品是避免乳糖不耐受的好方法。

## 本章小结

酶技术又叫酶工程,是现代生物技术的重要内容之一。酶的制备又是酶技术的核心内容之一。果胶酶是分解果胶的多种酶的总称,广泛存在于植物果实和微生物中,果胶酶的粗提液可用盐液进行抽提。果胶酶可用于果浆及果蔬汁的处理,使果汁澄清降低黏度。酶活力的测定实际上就是酶催化的化学反应速度的测定。酶活力的测定都是在一定的条件下进行的,果胶酶的活力可用次碘酸钠法进行定量测定。

食品制造和洗涤剂工业是酶制剂应用的重要领域。蛋液发酵饮料是以新鲜蛋液为原料,经加入乳酸菌在一定条件下发酵而成的新型饮料。洗涤剂中的主要成分是表面活性剂,而酶和漂白活性剂的加入能普遍提高洗涤的性能,洗涤剂中大量使用的酶是碱性蛋白酶。洗涤剂质量的重要指标是去污力,去污力与洗涤条件、污渍类型、衣物质地有关。

酶的固定化技术是酶技术的关键所在,固定化酶与游离酶相比,不但稳定性好,而且酶解产物更易分离纯化。用固定化的乳糖酶处理牛奶,使牛奶中的乳糖还原为葡萄糖和半乳糖。葡萄糖和半乳糖可和斐林试剂反应产生砖红色化合物,由此可定性或定量测定这些产物的量,从而了解乳糖酶的活性。



# 第 3 章 食品加工技术

## 主要内容

### 1. 发酵食品加工

- 酒和醋的制作
- 实验 利用发酵法以果汁制作酒和醋
- 豆腐乳的制备
- 实验 制作豆腐乳

### 2. 天然食品添加剂的制备

- 实验 用蒸馏法从柑橘皮中提取芳香油

### 3. 食品加工过程中产生的有害物质的测定

- 实验 制作泡菜并测定亚硝酸盐含量的变化

## 技术发展历程



食品是人类生存和发展的最基本物质。人类对食品的不断需求，促进了食品加工技术的发展。在人类的发展史中，经历了“食品采集时期”和“食品生产加工时期”。在食品采集时期，人类以生吃肉食、采集野生植物为主。在食品生产加工时期，人类不仅学会了生产食品，还学会了加工、储藏食品。

早期的酿酒、制造奶酪、腌渍食品等食品加工技术是人类在不知微生物的情况下进行的。随着微生物的发现、分离和纯培养技术的建立，发酵的本质逐渐被人们认识，从此开始了人为利用微生物进行食品加工的阶段。20世纪50年代，在青霉素大规模发酵生产的带动下，发酵技术被广泛应用于食品加工、制药、化工等方面，食品加工技术得到了快速发展。80年代初，DNA体外重组技术的实现，标志着基因工程技术的开始，随着现代生物技术的发展，转基因食品、工程食品、疫苗食品等新型食品不断问世，为食品生产加工提供了更为广阔的前景。

自20世纪80年代以来，许多新兴的工业技术在现代食品加工工业中得到了创造性的应用，为食品加工提供了科学的生产、包装手段，既保证了食品的品质，又延长了食品的保质期。

进入21世纪，随着科学技术的进步和社会、经济的发展，食品安全成为人类共同关注的重大课题，人们将更加提倡绿色食品、有机食品的生产与开发。

食品是人类生存和发展的最基本物质。人类对食品的不断需求，促进了食品加工技术的发展。在人类的发展史中，经历了“食品采集时期”和“食品生产加工时期”。在食品采集时期，人类以生吃肉食、采集野生植物为主。在食品生产加工时期，人类不仅学会了生产食品，还学会了加工、储藏食品。



# 第 1 节 发酵食品加工

发酵食品的加工就是利用微生物对食品原料的作用,通过多种化学反应,使产品发生口味、色泽等感官的、物理的和营养方面的改变,使产品口味更好、营养更丰富、更易吸收。生活中的发酵食品随处可见,如香喷喷的面包、酸甜可口的酸奶、各种不同口味的酱菜及大多数调味品等(图 3-1)。那么,发酵食品是怎样加工的?微生物又是如何起作用的呢?



图 3-1 多种多样的发酵食品

## ● 酒和醋的制作



### 利用发酵法以果汁制作酒和醋

#### 活动目标

1. 简述制作酒和醋的流程。
2. 运用果汁发酵制作酒和醋。

#### 实验原理

酵母菌(图 3-2 左)在厌氧条件下可将果汁中的葡萄糖发酵生成酒精(alcohol)。当酒精达到较高浓度时,可分瓶、密封、保存,得到果汁酒。利用醋酸菌(图 3-2 右),在有氧条件下能将酒精氧化生成醋酸,得到食醋产品。

#### 材料用具

成熟葡萄(苹果),培养好的啤酒酵母菌溶液和醋酸菌溶液;白糖,0.1mol/L 的 NaOH 溶液,质量分数 1% 的酚酞指示剂, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>;烧杯,纱布,天平,双孔胶塞,硅胶管,广口瓶,移液管,折射糖度计,加氧器,过滤器,止水夹等。

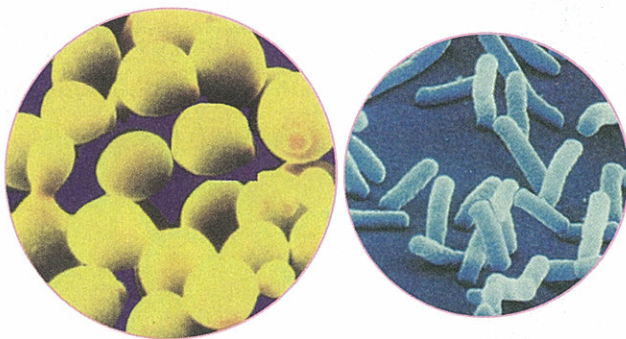
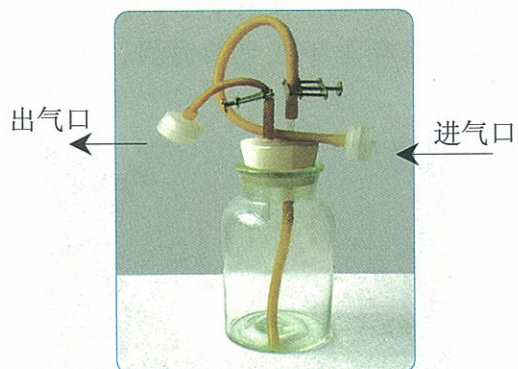


图 3-2 电镜下的酵母菌(左)和醋酸菌(右)

## 方法步骤

### 1. 安装发酵装置

参照下图安装发酵装置。



**思考**

安装进气管时,应注意什么?

### 2. 果酒制备

(1) 果汁制备 将成熟的葡萄洗净,用纱布包好榨汁(或用榨汁机榨汁),将果汁收集到烧杯内。一般 0.7kg 葡萄可榨出果汁 500mL。



(2) 补糖加抑菌剂 参照技能卡,用折射糖度计检测果汁中糖的浓度,加白糖调整其质量分数浓度为 24%。加入  $H_2SO_3$ ,使其最终的质量分数为 0.15%,以抑制杂菌的生长。



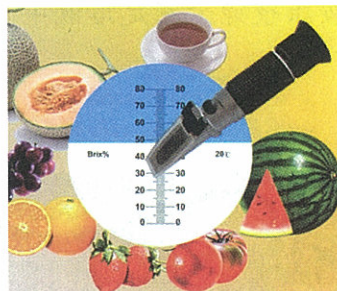
## 技能卡

### 折射糖度计的检测原理和使用方法

原理:含糖溶液的折光率与糖浓度成一定的比例关系,通过测量溶液的折光度可以得到此溶液的糖浓度。

使用方法:

1. 掀开采光板,用柔软的布或擦镜纸仔细地把测试窗表面擦拭干净,取试液数滴放在测试窗的镜面上,盖上采光板,使试液遍布镜面。



折射糖度计

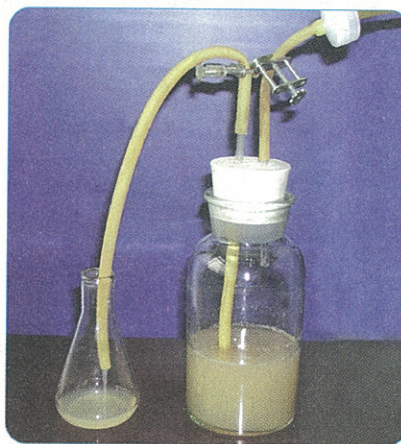
2. 将测试窗对向光源或明亮处,转动聚焦柄使刻度清晰,亮暗分界线所对准的刻度即为测量值。

3. 测量结束后,用擦镜纸将测试窗擦拭干净。

(3) 接种发酵 将果汁迅速倒入灭菌的发酵装置内,接入 10%(v/v)已培养好的啤酒酵母菌溶液,盖好塞,夹紧进气管和排气管上的止水夹,在 25℃~30℃条件下,厌氧发酵 3~5d。



(4) 取样 从第 2 天开始每天取样测定糖的浓度。将排气管连接加氧器,利用压差,从进气管取样。当糖消耗量在 20%以上时,可分瓶、密封,室温下保存 1 年或更长时间,以制成果酒。

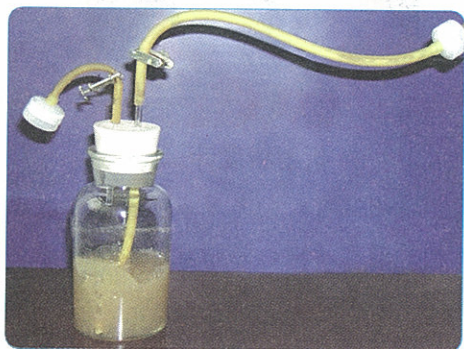


### 3. 果醋的制作

(1) 接种 当制备果酒的果汁发酵液中糖的消耗量在 10%左右时,用移液管接入 10%(v/v)已培养好的醋酸菌溶液。

(2) 耗氧发酵 进气管连接加氧器,打开进气管和排气管上的止水夹,在 25℃~30℃条件下,发酵 3~4 d。利用压差取样,按照技能卡测定溶液中醋酸的浓度。

(3) 过滤、灭菌 当醋酸浓度达到质量分数 4%~5%时,加入少量食盐,用双层纱布过滤,然后将滤液于 90℃~95℃水浴杀菌 10~15min 后,完成果醋的制作。





## 技能卡

### 溶液中醋酸浓度的测定

在 250mL 锥形瓶内加入 5mL 样品和 45mL 蒸馏水,滴加酚酞指示剂 2~3 滴,用 0.1mol/L 的 NaOH 溶液进行滴定,根据 NaOH 溶液的用量计算产生醋酸的量。计算公式如下:

$$\text{醋酸浓度}(\%)=V \times C \times 10^{-3} \times 60.06 \div 5 \times 1 \times 100\%$$

式中:V 表示所用 NaOH 溶液的体积 /mL;

C 表示所用 NaOH 溶液的浓度 /mol·L<sup>-1</sup>;

5 表示样品体积 /mL;

1 表示样品的密度看做 1g / mL。

### 总结与讨论

根据实验过程写出实验报告,并分析讨论下列问题:

1. 加白糖时,糖的浓度一般控制在质量分数 24%,为什么?
2. 如补加葡萄糖,糖的浓度应控制在什么浓度?为什么?
3. 糖消耗量与醋酸生成量之间有何关系?

酵母菌是酒精发酵过程中最主要的微生物。酵母菌是兼性厌氧菌,细胞内含有两套酶系统,一套是有氧呼吸酶系统,另一套是酒精发酵酶系统。在有氧条件下,酵母菌进行有氧呼吸,菌体大量繁殖,用于鲜酵母和干酵母的制备。在无氧条件下,酵母菌进行无氧呼吸,氧化葡萄糖产生酒精和 CO<sub>2</sub>。其反应式为:  $C_6H_{12}O_6 \xrightarrow{\text{氧化酶}} 2CH_3CH_2OH + CO_2$ , 理论质量转化率为 51%。

传统的果酒制备常利用水果带入的酵母菌自然发酵。果酒的酒精浓度一般控制在质量分数 10%以上,这样才能较好的抑制微生物的生长,使果酒不腐败,保证果酒的品质。

醋酸发酵是在醋酸菌的作用下,酒精生成醋酸的过程,其反应式为:  $CH_3CH_2OH \xrightarrow{\text{乙醇脱氢酶}} CH_3CHO \xrightarrow{\text{乙醛脱氢酶}} CH_3COOH$ , 每 1mol 的酒精能生成 1mol 的醋酸,理论质量转化率为 130%。将醋酸的浓度控制在质量分数 4%~5%是制醋的关键。这是因为,醋酸菌耐受醋酸的能力在上述范围内,当醋酸浓度过高时,醋酸菌的生长就会受到抑制。因此,酒精的浓度也应控制在质量分数 5%左右,以提高酒精的转化率。传统的醋酸发酵主要是固体自然发酵,醋酸产率较低,劳动强度大。目前大多数采用人工接种、液体深层发酵生产醋酸。醋酸菌是专性好氧菌,在液体发酵制醋时,中断通气会严重影响醋酸菌的生长。因此,在液体制醋时,要保证充足的通气。

## ● 豆腐乳的制备



### 制作豆腐乳

#### 活动目标

1. 分析豆腐乳发酵原理及菌种的特点。
2. 探讨豆腐乳发酵过程。

#### 实验原理

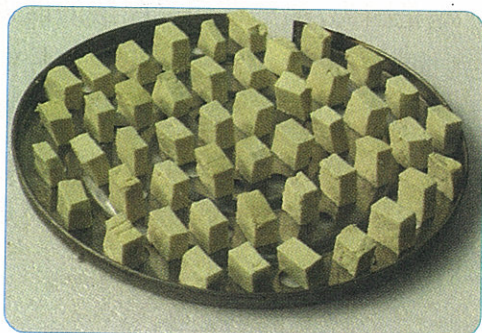
豆腐乳是用豆腐发酵而成的。传统生产豆腐乳的方法均为自然发酵，现代工艺多采用接种鲁氏毛霉(图 3-3)或根霉进行发酵。鲁氏毛霉或根霉可分泌蛋白酶、谷氨酰胺酶等多种酶系，在后期发酵过程中，这些酶与调料中的酶或微生物等协同作用，使豆腐中的蛋白质缓慢水解，生成多种氨基酸。另外，微生物代谢产生的各种有机酸与调料中的醇类作用生成酯，从而制成细腻、味香的豆腐乳。

#### 材料用具

制备好的毛霉孢子悬液(或根霉孢子悬液)，豆腐；米酒，白酒，黄酒，食盐；小笼屉，小刀，喷壶，带盖玻璃瓶等。

#### 方法步骤

(1) 晾制豆腐块 将豆腐切成约  $2\text{cm} \times 2\text{cm} \times 1\text{cm}$  的小块，均匀竖放在灭菌的笼屉内，块与块之间间隔  $2\text{cm}$ 。摊晾  $5\sim 6\text{h}$ ，以表面干、里面湿为适度。



(2) 接种 将制备好的毛霉孢子悬液用喷壶均匀地喷洒在豆腐块上。

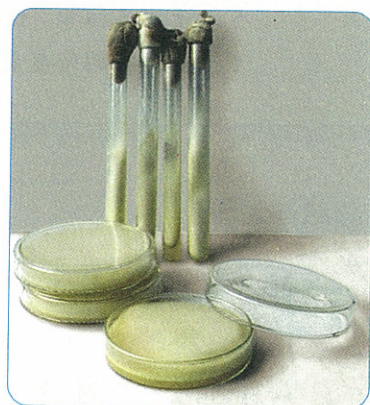


图 3-3 生长好的毛霉

(3) 前期发酵 将笼屉置于 20℃左右培养 44~48h,使豆腐块表面长满菌丝。



(4) 装瓶 用手指轻轻在每块豆腐表面揩涂一遍,使豆腐块表面形成一层菌膜,沿瓶壁呈同心圆方式一层一层向内侧摆放。



(5) 腌渍 装瓶时,每摆一层轻轻用手压平,撒一层食盐(下层食盐用量少,向上食盐增多),腌渍 3~4d。然后加一定浓度的盐水淹没表面。整个腌渍周期冬季 13d,夏季 8d。

(6) 后期发酵(后熟期)

青方 将腌渍好的豆腐块沥干,稍有收缩后,一层层摆入洁净的玻璃瓶中,在底层、中层和上层分别撒少量食盐,加清水淹没豆腐块,加盖密封,在常温下贮藏 2~4 个月。

白方 将腌渍好的豆腐块沥干,稍有收缩后,一层层摆入洁净的玻璃瓶中,按每升加米酒 0.5kg、黄酒 1kg、白酒 0.75kg、盐 0.25kg 的配方配制汤料注入瓶内,淹没豆腐块,加盖密封,在常温下贮藏 2~4 个月,成熟。



思考

为什么要腌渍?腌渍时为何使盐水淹没豆腐块表面?

### 总结与讨论

根据实验过程写出实验报告,并分析讨论下列问题:

1. 接种前控制豆腐块的水分有何作用?
2. 分析豆腐块腌渍时食盐用量对腐乳质量的影响。
3. 发酵后熟期为何要密封?
4. 分析影响腐乳品质的主要因素有哪些。



腐乳是我国传统发酵食品之一，是一种滋味鲜美、风味独特、营养丰富的佐餐食品。腐乳制作中，调料是关键，调料不同，制成的腐乳品味也不同。如在调料中添加红曲，因红曲霉产生红色色素，使腐乳表面呈红色，制成的腐乳称为红方或酱豆腐；添加黄酒的，称为醉方或白方；不添加辅料的，成熟后具有特殊的气味，表面呈青色，称为青方或臭豆腐（图 3-4）。



图 3-4 各种腐乳

豆腐乳发酵为固体发酵，发酵过程分为前期发酵和后期发酵。前期发酵主要是好氧霉菌分泌蛋白酶的作用，后期发酵主要是厌氧菌继续协同作用，从而形成豆腐乳独特的风味。

微生物在食品中的生长繁殖，给食品的成分和性质带来了广泛和深刻的变化。一方面，人们可以利用微生物制成不同口味的食品；另一方面，一些微生物又会引起食品及食品原料的腐烂与霉变（图 3-5）。用于食品加工的微生物可来自大自然（自然发酵，如传统的发酵食品制备均采用自然发酵），也可以来自人工培养的纯种微生物（接种发酵）。无论是自然发酵还是接种发酵都是通过人工控制条件，利用各种因素促使有益微生物的生长，并建立起不利于有害微生物的生长环境，从而保证发酵食品的品质。



图 3-5 微生物引起草莓的霉变

发酵技术不仅为人类提供了花色品种繁多的食品，还提高了食品的耐藏性，延长了食品的保质期。不少发酵食品，特别是有机酸和酒精，有利于阻止腐败变质菌的生长，同时还能抑制混杂在食品中的一些病原菌的生长。如毒性最强的肉毒杆菌，在 pH 4.5 以下就很难生长和产生毒素，因此，在酸性的发酵食品中就不会有肉毒杆菌的生长。与一般食品相比，发酵食品具有更高的营养价值。食品发酵过程中，微生物首先分解食品中的复杂物质，如蛋白质、淀粉、纤维素等，便于人体吸收利用；其次，微生物在生长繁殖过程中还合成了许多人体必需的维生素，如核黄素、维生素 B<sub>12</sub> 和维生素 C 等。因此，发酵食品口味更好、营养更丰富、更易被吸收。



### 自我检测

1. 酒精发酵时，消耗的糖为 10%，计算生成醋酸的理论值。
2. 试比较醋酸发酵和豆腐乳发酵的不同。
3. 发酵食品有哪些特点？



### 慎用保健食品

随着生活水平的提高,人们的健康观念也发生了一定的转变,亚健康状态逐渐成为人们关注的热点,保健食品日益受到人们的青睐。保健食品是指能调节人体机能、有特定保健功能、只适合特定人群食用、不以治病为目的的食品。科学研究证明,如果一个人能在三餐中,依照食品金字塔的原则吃不同种类的食品,摄取均衡的营养,根本不需要吃保健食品。中国营养学会专家认为,保健食品只对特殊人群适用,一般健康人群如不加选择地食用,超出微量营养素的范围,反而会威胁人体健康。因此,专家建议慎用保健食品,安全饮食、适当运动才是保证健康的根本措施。

## 第 2 节 天然食品添加剂的制备

在食品的制造、加工、处理、包装、储存等过程中,食品添加剂的使用保护了食品的营养,防止了食品腐败变质,改善了食品的色、香、味等感官性状和质量(图 3-6)。因此,各国使用的食品添加剂的品种与数量猛增。但近年来,食品添加剂对食品的污染问题日益受到重视。这是因为食品添加剂从来源上分为两类,一类是从动植物体提纯的天然物质;另一类是人工合成的化学物质。人工合成的添加剂常因其成分不纯或含有有害物质或被滥用,造成食品的污染。天然添加剂以其无毒、安全受到消费者的欢迎。天然食品添加剂是怎样制备的呢?



图 3-6 各种色彩鲜艳的糖果

## 用蒸馏法从柑橘皮中提取芳香油

### 活动目标

1. 举例说出芳香油的性质。
2. 使用蒸馏法提取芳香油。

### 实验原理

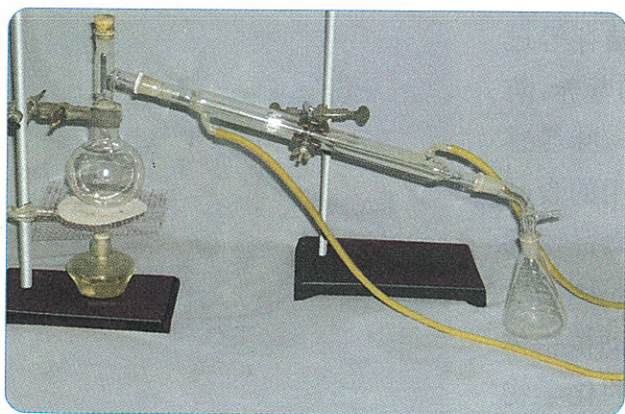
橘皮芳香油存在于柑橘类果皮的油细胞中,有一定的挥发性,且沸点低于水的沸点。在蒸馏时,因温度的升高和水分的侵入,果皮油细胞涨破,芳香油便随水蒸气蒸馏出来。蒸汽通过冷凝器,经导管流入收集瓶,由于油轻水重,静置后油便浮在水面,再经分离即可得到芳香油。

### 材料用具

柑橘皮(新鲜或晾干的橘皮);铁架台,酒精灯,蒸馏瓶,烧杯,冷凝器,收集瓶,量筒,移液管,剪刀等。

### 方法步骤

- (1)安装实验装置 根据实验原理,按下图的设计安装实验装置。



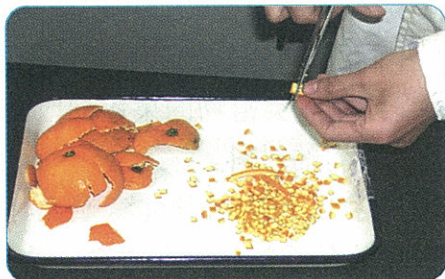
冷却水为什么要从冷凝管的下方进入,而从上方流出?

- (2)设计实验 根据表 3-1 给出的条件,设计实验。

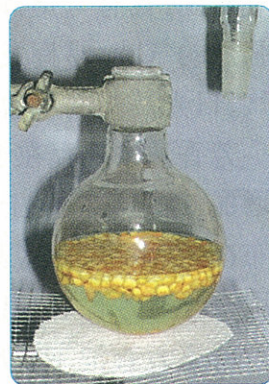
表 3-1 芳香油提取的实验设计条件

设计一	收集液体积 / mL			
	实验材料大小 / mm <sup>2</sup>	2 × 2		
设计二	实验材料大小 / mm <sup>2</sup>			
	收集液体积 / mL	200		

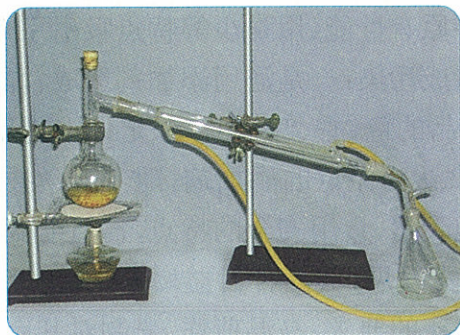
(3)准备材料 将新鲜或晾干的柑橘皮洗净,切碎(晾干的柑橘皮需浸泡 3~4h)。



(4)称量加水 称量一定量的柑橘皮,放入蒸馏瓶内,加水(加水量最多至蒸馏瓶体积的三分之二)。



(5)蒸馏 连接冷凝器,按实验设计加热蒸馏。收集蒸馏液,静置,分层,用移液管小心将上层油状物移入小量筒,静置后,测量油状物体积。



**注意**

蒸馏时不要将水全部蒸干!  
待冷却后再拆洗蒸馏装置!

(6)计算 根据实验结果,计算出油率并将结果填入下表:  
出油率 = 芳香油体积 (mL) / 柑橘皮重 (g) × 100%

收集液体积 / mL			
材料大小 / mm <sup>2</sup>			
出油率 / %			
材料大小 / mm <sup>2</sup>			
收集液体积 / mL			
出油率 / %			

**总结与讨论**

根据实验结果写出实验报告,并讨论以下问题:

1. 材料颗粒大小与出油率有何关系?
2. 收集液体积和出油率有何关系?
3. 提高出油率的方法有哪些?

芳香油 (aromatic oil) 是一类植物次级代谢物质, 是植物体内相对分子质量较小, 可随水蒸气蒸出, 具有一定挥发性的油状液体物质。它的理化性质一般为: 在常温下为液体, 有特殊强烈的气味, 易挥发; 密度一般比水小, 易溶于石油醚等极性小的有机溶剂, 不溶于水; 对空气、日光及温度较敏感, 易分解。

芳香油主要存在于芳香植物体内, 因其原料易得、丰富、香型自然和使用安全, 需求量日益增加, 被广泛应用于食品加工、日化工业和医药生产中。我国有丰富的芳香植物资源, 广泛分布在 20 多个省市, 其中柑橘产区广、品种多、产量大, 且柑橘类植物的果皮、叶、花朵都可以用来提取芳香油, 出油率高, 因此柑橘成为提取芳香油常用的材料。

橘皮芳香油主要成分为柠檬烯, 因其易被氧化, 在储存过程中必须注意避光、防热、防潮。橘皮芳香油具有诱人的橘香味, 是生产食品香精、化妆品香精和医药香精的优质原料。目前, 橘皮芳香油的提取方法主要有压榨法、溶剂浸提法和蒸馏法。

食品添加剂本身不是食品固有的成分, 但在食品加工过程中却经常使用, 它对延长食品储存时间和增强食品的色、香、味等方面具有重要的作用。其中, 人工合成的添加剂以品种齐全、食品加工工艺控制无特殊要求、加工后能保持原有性能、用量少等特点吸引了众多商家。但人工合成食品添加剂的使用又可能会对食品造成污染: 一是滥用添加剂造成食品的污染, 例如一些食品制造商为了招揽顾客, 盲目追求食品的色、香、味, 不按法定标准使用添加剂, 有的甚至还使用有毒添加剂; 另外, 还有一些原来认为无毒的添加剂, 随着科学技术的发展人们发现其有慢性毒性。天然食品添加剂以其纯天然、食用安全的特点, 日益受到人们的欢迎。近几年, 天然食品添加剂的制备技术有了很大发展, 其品种日益增多, 应用范围不断扩大。但一些天然食品添加剂对食品加工工艺有一定的要求, 高温煎炸、烹制对其有一定的破坏作用, 会使其失去原有的效果。因此, 在选择食品时, 不要过分看重食品鲜艳的颜色、浓烈的香味和奇特的口味, 要特别关注食品的安全性。



### 自我检测

1. 用蒸馏法提取物质的原理是什么?
2. 食品添加剂的作用有哪些?



### 课外实践

尝试从新鲜橘皮中用压榨法提取粗芳香油, 计算出油率并和蒸馏法的出油率进行比较。



## 食品安全与安全食品

随着工业化的发展,通过食物链造成的食品污染直接威胁着人类健康。例如,我国癌症患者每年达 160 万人,死亡人数达 130 万人,其中通过食品进入人体诱发的比例高达 60% 以上。当前最引人注目的食品污染物质主要有:无机污染物中的重金属与非金属中的氮氧化物和氯;有机物中的亚硝胺、3,4—苯并芘、人工合成添加剂与色素和化学合成的农药;有机氯物质如二噁英、DDT、多氯联苯及塑料制品等。因此,防止食品污染是保障人体健康的当务之急,发展绿色食品、有机食品成为防止食品污染的重要途径。

绿色食品是在具有良好的水、土、气等生态环境的基础上生产的,经过特殊部门认证的食品。它以控制化肥、农药为保证,要求食品中不含有毒有害物质,且农药残留量、重金属含量和细菌含量必须符合国家标准。绿色食品种类繁多,包括酒、菜、奶、罐头、水果、饮料、粮食、蛋品、调料等,在食品包装上要贴有绿色食品标志(图 3-7)。

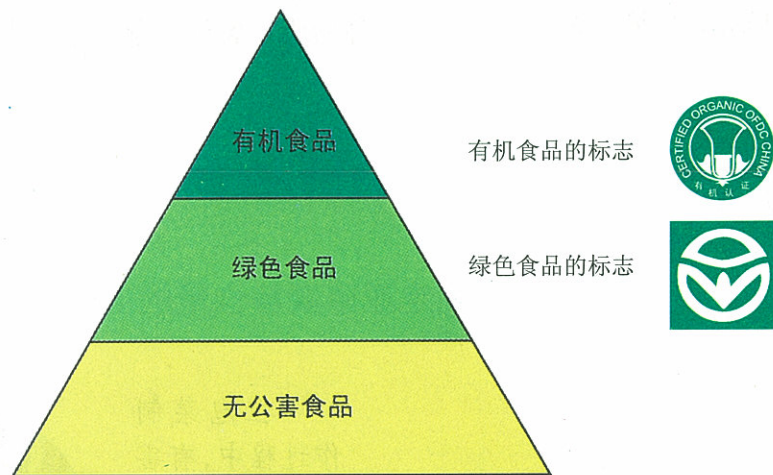


图 3-7 食品的等级

有机食品是根据国际有机农业生产要求和相应的标准生产加工的,并通过独立的有机食品认证机构认证的农副产品。有机食品比绿色食品要求更为严格,它要求:在原料生产和产品加工过程中禁止使用任何人工合成的化学物质,包括化肥、农药、生长激素、化学添加剂、化学色素和防腐剂等,也不得采用基因工程和辐射技术,同时必须符合国家卫生标准和有机食品技术规范要求。在食品包装上要贴有有机食品标志。有机食品在国际上得到普遍接受,1999 年,我国有机食品生产基地达到 6 万多  $\text{hm}^2$ ,认证产品 100 多种,我国有机食品出口以每年 50% 的速度增长。相信在不久的将来,绿色食品、有机食品将会走上寻常百姓家的餐桌。

## 第 3 节 食品加工过程中产生的有害物质的测定

食品的各种加工技术如烟熏、煎炸、烘烤、焙炒、腌渍、冷冻和罐装等,在现代社会中极大地拓展了食品应用的潜力,增加了食品风味,改善了食品的外观和质地,并提高了食品的可



图 3-8 加工后的各种食品

利用度(图 3-8)。但是,食品在加工过程中也能产生一些有害物质引起人类疾病。例如,腌菜是一种传统的利用微生物进行食品加工和食品保藏的方法,距今已有几千年的历史。腌渍后的蔬菜口感好、耐储存,解决了蔬菜的季节性问题,丰富了人们的菜篮子,深受人们的喜爱。但是,近年来在对我国食管癌高发区——河南省林州市及肝癌高发区——江苏省启东市进行调查时,发现上述地区居民非常喜欢食用腌菜。腌菜与癌症究竟有没有关系?食品加工过程中会不会产生有害物质?怎样才能实现食品安全呢?



### 制作泡菜并测定亚硝酸盐含量的变化

#### 活动目标

1. 简述泡菜的制作过程。
2. 测定泡菜制作过程中亚硝酸盐含量的变化。

#### 实验原理

泡菜主要是利用蔬菜自然带入的乳酸菌(图 3-9),在厌氧条件下进行乳酸发酵制成的。蔬菜在带入乳酸菌的同时,还带有大肠杆菌等一些有害微生物。在泡菜制作过程中加入一定浓度的食盐可以抑制有害微生物的生长。随着乳酸菌的繁殖,产生的乳酸进一步抑制有害细菌的生长。

在泡菜制作过程中,有害微生物能将蔬菜内的硝酸盐还原成亚硝酸盐。亚硝酸盐对人体健康有一定危害。因此本实验利用亚硝酸盐与显色剂反应生成红色化合物,通过分光光度计检测泡菜制作过程中亚硝酸盐的含量变化,为安全食用泡菜提供依据。

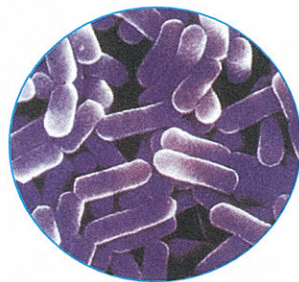


图 3-9 电镜下的乳酸菌

## 材料用具

卷心菜(或萝卜、豆角、莴笋等),食盐,白糖;显色液(质量分数为 0.33%的对氨基苯磺酸溶液和质量分数为 0.05%的 $\alpha$ -萘胺溶液按 1:1 体积比混合),冰醋酸,亚硝酸钠;pH 试纸,分光光度计,研钵,泡菜坛等。

## 方法步骤

### 1. 制作泡菜

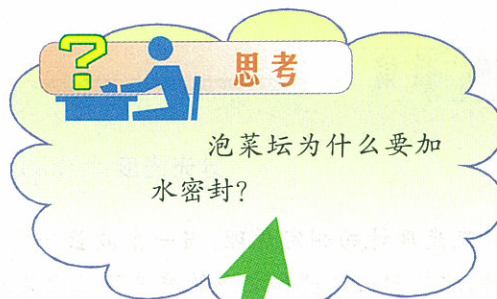
根据制作泡菜的原理,参考图 3-10,利用现有条件,设计制作泡菜的实验,其中包括选择不同的泡菜材料、采用不同的食盐浓度、不加入白糖等不同处理方法。



(1)冲盐卤 取一定量的清水,加入适量的食盐和白糖,煮开后冷却备用。



(2)选菜 精选鲜菜,用清水洗净,切成块状,晾干。



(3)泡制 将晾干的菜装入坛中至满,加盐卤至淹没蔬菜,盖上坛盖,用水密封坛口。

图 3-10 泡菜的制作过程

### 2. 绘制标准曲线

测定泡菜内亚硝酸盐的含量,首先要绘制亚硝酸盐含量的标准曲线(standard curve),也就是将某种亚硝酸盐配制成一系列标准浓度的溶液,经加入显色液显色后,再通过分光光度计测定每一浓度溶液的吸光度(OD 值),然后以标准溶液的浓度为横坐标,OD 值为纵坐标绘制曲线,从中得到溶液浓度和 OD 值之间的线性关系。这条曲线称为标准曲线。利用标准曲线,可将待测样品测得的 OD 值换算成溶液的浓度,从而达到测定溶液浓度的目的。绘制标准曲线的具体方法如下:



将亚硝酸钠依次配制成 20.0、40.0、60.0、80.0、120.0、160.0 $\mu\text{mol/L}$  浓度的溶液。参照技能卡的方法,利用分光光度计(图 3-11),在 540nm 波长下测定各浓度溶液的 OD 值,以浓度为横坐标,以 OD 值为纵坐标,绘制标准曲线。



图 3-11 722 分光光度计



### 技能卡

#### 分光光度计的测定原理和使用方法

分光光度计的测定原理:当一束波长一定的平行单色光,通过液层厚度一定的均匀有色溶液时,溶液的吸光度和溶液的浓度呈正比关系。

分光光度计的使用方法:

1. 接通电源,打开测量室盖,预热 20min 左右。
2. 分别取 1mL 蒸馏水和待测样品,各加入 2mL 显色液混匀,放置 15min。蒸馏水和显色液的混合液为空白液。
3. 将空白液和待测样品分别倒入比色皿中,依次放入比色槽内,调整波长在 540nm 处。调节拉杆,使光路对准空白液,在开盖条件下调透光度为 0,在闭盖条件下调透光度为 100%。然后,依次检测待测样品的吸光度。每个待测样品可重复测 3 次,取平均值。

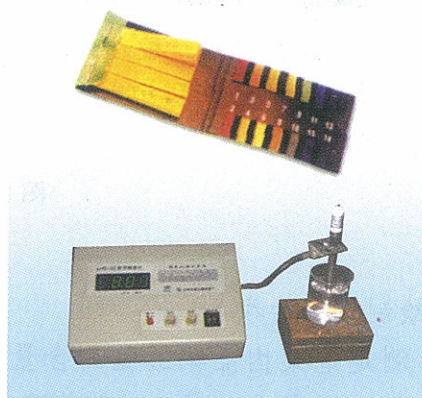
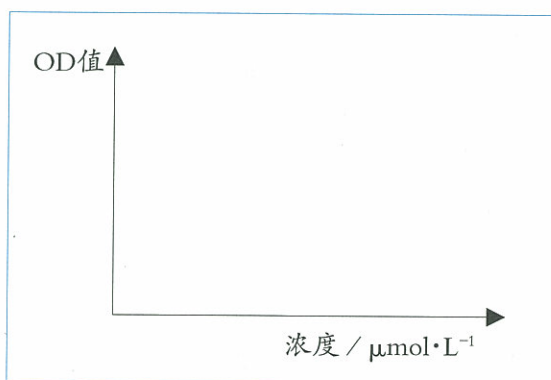


图 3-12 pH 试纸和 pH 计

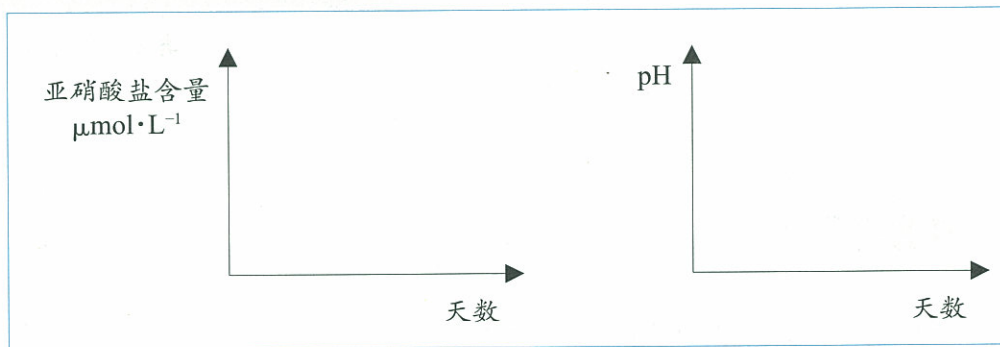
#### 3. 测定泡菜内亚硝酸盐含量的变化

自发酵之日起,连续 10d 取菜叶 100g,用 pH 试纸或 pH 计测 pH(图 3-12);再将菜叶洗净后用研钵研碎,加入 10mL 蒸馏水,取上清液,测定 OD 值。根据标准曲线换算亚硝酸盐含量。将实验数据填入下表:

天 数	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
pH										
亚硝酸盐含量 / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$										

#### 4. 数据处理

以天数为横坐标,以 pH 和亚硝酸盐含量分别为纵坐标作图。



#### 总结与讨论

分析亚硝酸盐含量与发酵日期和 pH 的关系,以及 pH 和发酵日期的关系等问题,写出实验报告,并讨论以下问题:

1. 亚硝酸盐含量和食盐浓度有何关系? 食盐的作用是什么?
2. 亚硝酸盐含量和 pH 有何关系? 白糖的作用是什么?
3. 根据实验,你能说出正确腌渍、安全食用泡菜的方法吗? 对泡菜的安全性你得出怎样的结论?

在我们生活的环境中,硝酸盐(nitrate)的污染与人体关系非常密切。蔬菜含有丰富的营养,是人类不可缺少的食物(图 3-13),但在生产中常因施化肥不当而引起硝酸盐在菜体中的积累。不同蔬菜体内硝酸盐的含量不同。一般说来,叶菜类比瓜果类的硝酸盐含量高。硝酸盐本身毒性不大,但在腌渍蔬菜过程中,由于有害微生物还原蔬菜体内的硝酸盐而产生亚硝酸盐(nitrite)。人体大量摄入亚硝酸盐可诱发高铁血红蛋白症,临床上表现为嘴唇、指甲发绀,皮肤出现紫斑等症状,严重时致死亡。另外,在腌渍过程中,由于微生物对蔬菜和肉类等食物中蛋白质、多肽、氨基酸的降解作用会产生胺类物质,在一定条件下与亚硝酸盐合成亚硝胺,亚硝胺是一种较强的致癌物质。

食品的其他加工方法如烟熏、煎炸、烘烤、罐装等在加工过程中也能产生一些有毒的致癌物质,如多环芳烃、杂环胺和亚硝酸盐等。

虽然食品加工过程中都能产生一定的有害物质,但如果正确、适量食用,这些食品仍然是安全的。如腌渍食品中产生的亚硝酸盐,人体中毒剂量为 0.3~0.6g,致死量为 3g。如果在腌渍 10d 之后食用,并控制一定的食用量,少于世界卫生组织(WHO)和世界粮农组织(FAO)规定亚硝酸盐的允许食用量每天 0.13mg/kg 体重,食用腌菜就是安全的。



图 3-13 种类繁多的蔬菜



### 自我检测

1. 腌渍泡菜过程中,产生亚硝酸盐的根本原因是什么?
2. 根据世界卫生组织和世界粮农组织的规定,计算体重为 60kg 的成人每天食用泡菜的安全量。
3. 食用腌渍食品应注意哪些问题?



### 课外实践

测定烹制蔬菜放置不同时间亚硝酸盐含量的变化。



## 本章小结

食品是人类生存的最基本物质。人类对食品的不断需求促进了食品加工技术的发展。本章从发酵食品加工、天然食品添加剂制备、食品加工过程中可能产生的有害物质及有害物质测定 3 个方面介绍了食品加工的原理、加工工艺及在食用时应注意的食品安全问题。

食品加工方法众多。发酵食品是通过人工控制加工条件,促使有益微生物的生长,利用有益微生物分泌的各种酶进行加工的食品。不同的发酵食品所用微生物不同,发酵原理不同,控制条件也不同。食品添加剂的使用保护了食品的营养,延长了食品保质期,改善了食品的色、香、味。但大量使用人工合成的食品添加剂又会不同程度地造成食品的污染。天然食品添加剂以其无毒、安全受到制造商和消费者的欢迎,并促进了天然食品添加剂制备技术的发展。在制备天然食品添加剂时,要根据它们的不同特性,采用不同的提取制备技术。

食品在加工过程中也能产生一定的有害物质,通过亚硝酸盐含量的测定说明了泡菜腌渍过程中亚硝酸盐的产生规律。因此,只要正确、适量食用,加工食品仍然是安全的。养成良好的饮食习惯是保证身体健康的前提。



# 第 4 章 现代生物技术

## 主要内容

### 1. 植物的组织培养

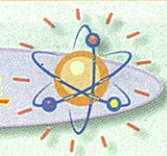
- 实验 胡萝卜的组织培养

### 2. 蛋白质的提取和分离

- 实验 乳酸脱氢酶同工酶的提取和分离

### 3. 聚合酶链式反应技术

- 实验 DNA 片段的扩增和琼脂糖凝胶电泳检测



随着社会文明的发展,20世纪发生了新的技术革命,其中生物技术与计算机微电子技术、新材料、新能源、航天技术等被列为新技术革命的重要组成部分,目前已成为21世纪科学技术的核心。

生物技术的发展经历了传统生物技术和现代生物技术两个阶段。传统生物技术可以上溯到古代的酿酒技术,它几乎与人类文明的发展史一样源远流长。20世纪70年代,随着DNA重组等分子技术的出现和发展,现代生物技术迅速兴起。现代生物技术主要包括基因工程、细胞工程、酶工程、发酵工程,其中基因工程为核心技术。20世纪80年代初,PCR技术的发明,使现代生物技术的发展突飞猛进。20世纪90年代,克隆羊多莉的诞生,使现代生物技术又登上了一个新的台阶。随着人类基因组计划以及一些重要农作物和微生物基因组计划的实施,功能基因组学、生物信息学、生物芯片技术以及一系列的自动化分析测试和药物筛选技术相继兴起。生物技术所提供的实验方法和手段,极大地促进了传统生物学科如植物学、动物学、遗传学、生理学、生物医学等的深入研究。同时,生物技术也被广泛应用于医药、食品、化工、农业及环境保护等领域,为这些行业带来了一场新的技术革命。

现代生物技术的发展仅有30多年的历史,它在生命科学研究和产业化方面虽然已产生了巨大的影响,但这仅仅是个开始,生物技术的发展和应用的方兴未艾。

## 第 1 节 植物的组织培养

伴随着徐徐的春风,绚丽多姿的花草争香斗艳,参天的大树吐出碧绿的嫩芽。我们知道,这些植物的世代繁衍一般是通过种子的播种或枝条的扦插实现的。其实在一定的条件下,利用它们的一片叶子、一个花瓣甚至一粒花粉同样也可以得到大量的幼小植株(图 4-1)。那么,我们如何利用植物的某一部分组织培育出完整的植株呢?



图 4-1 利用叶片繁殖的蝴蝶兰



### 实验

#### 胡萝卜的组织培养

##### 活动目标

1. 说明植物组织培养的基本原理。
2. 尝试植物的组织培养。

##### 实验原理

植物体根、茎、叶的细胞一般都具有全能性,在一定的营养和激素条件下,可以脱分化形成愈伤组织。这些愈伤组织生长一段时间后,转接到含有不同激素成分的培养基上,就可以诱导其再分化生成胚状体或丛芽,进而发育成完整的植株。植物组织培养的全过程反映了植物细胞的全能性,证明分化的植物细胞仍具有形成完整植株所需要的全部基因。

##### 材料用具

胡萝卜肉质根(或小麦花药、烟草叶片、菊花花瓣等);MS 培养基母液,各种植物生长调节剂母液,体积分数为 70%的酒精,体积分数为 20%的次氯酸钠溶液,无菌水;超净工作台(或接种箱),高压灭菌锅(或高压锅),恒温箱,酸度计(或 pH 试纸),50mL 锥形瓶(或大试管),烧杯,酒精灯,滤纸,标签,消毒用酒精棉球,培养皿(或瓷砖),解剖刀,镊子等。

##### 方法步骤

1. 根据表 4-1 和小辞典,以 MS 培养基为基本培养基,尝试设计植物组织培养的几种培养基:

表 4-1 植物组织培养中常用的植物生长调节剂及其作用

类别	作用	植物生长调节剂
生长素类	诱导生根,并能与细胞分裂素互相作用而促进茎的增长	IAA(吲哚乙酸)、IBA(吲哚丁酸)、NAA(萘乙酸)
	诱导植物愈伤组织,抑制植物形态的发生	2,4-D(2,4-二氯苯氧乙酸)
细胞分裂素类	诱导植物的愈伤组织分化出丛芽	6-BA(6-苄基腺嘌呤)
	刺激培养物的细胞加速分裂,加快培养物的生长速度	KT(吡喃氨基嘌呤,也叫激动素)和玉米素
赤霉素类	刺激培养细胞的伸长	AG <sub>3</sub> (赤霉素)



### 小辞典

生长素与细胞分裂素的协同调控作用,在组织培养中非常重要。生长素含量高于细胞分裂素时,诱导植物组织脱分化和根原基的形成;细胞分裂素的效应高于生长素时,诱导植物组织再分化和芽原基的形成。植物生长调节剂在培养基中的用量通常在 0.01~10mg/L 之间变化,细胞分裂素的浓度在非生根培养中要大于生长素。另外,植物生长调节剂在培养基中的用量还要考虑组织内源激素的含量。只有准确把握内源激素与外源激素的协同作用,才能有效地实现一种植物的组织培养。

#### (1) 诱导培养基

推荐配方 Y1:MS 培养基 + 1.0mg/L 2,4-D

设计配方 Y2: \_\_\_\_\_

设计配方 Y3: \_\_\_\_\_

#### (2) 继代培养基

推荐配方 J1:MS 培养基 + 0.5mg/L 2,4-D

设计配方 J2: \_\_\_\_\_

设计配方 J3: \_\_\_\_\_



### 技能卡

#### MS培养基的配制

植物的组织培养一般采用固体培养基。培养基的各种营养成分一般预先配制成储备液,储存在 4℃ 冰箱中备用。储备液一般包括 10 倍的大量元素、100 倍的微量元素、100 倍的有机成分、100 倍的 Fe 盐和 0.1mg/mL 的生长激素。蔗糖的用量大多为 3%,琼脂用量一般为 0.5%~1.0%。

培养基的配制一般按以下步骤进行:

1. 先在少量蒸馏水中按比例加入各种母液(如配制 100mL 培养基需要加入 1mL 100 倍的母液)和药剂。

2. 用 0.1mol/L NaOH 或 0.1mol/L HCl 调整 pH 到 5.8,定容到设计的最终体积。

3. 在培养基中加入质量分数为 0.7% 的琼脂后加热溶解,分装到试管或锥形瓶中。

4. 121℃ 高压灭菌 20 min。



### (3) 分化培养基

推荐配方 F1: MS 培养基 (不添加植物生长调节剂)

设计配方 F2: \_\_\_\_\_

设计配方 F3: \_\_\_\_\_

### (4) 生根培养基

推荐配方 S1: 1/2 MS 培养基 + 0.5mg/L IBA

设计配方 S2: \_\_\_\_\_

设计配方 S3: \_\_\_\_\_

2. 根据上面的设计, 参照技能卡配制培养基, 并贴好标签进行灭菌。

3. 分组利用不同的培养基配方进行胡萝卜组织培养。

(1) 将胡萝卜根用洗涤剂充分洗净并切成段(约 10cm)。打开超净工作台 20min 以上, 用 70% 酒精棉球擦手消毒。

(2) 在超净工作台上将胡萝卜段用体积分数为 70% 的酒精消毒 30s 后, 立即用无菌水清洗 2~3 次。再用体积分数为 20% 的次氯酸钠溶液浸泡 30min 后, 立即用无菌水清洗 2~3 次。

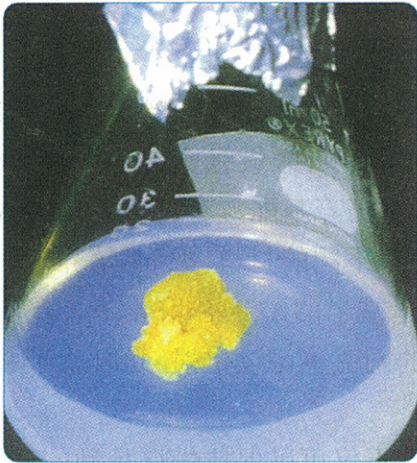
(3) 用无菌的滤纸吸去表面水分, 在消毒瓷砖上, 用无菌的解剖刀将胡萝卜段切成 2mm 厚的横切片。选取有形成层的部位切取 2mm × 2mm × 2mm 左右的小块。



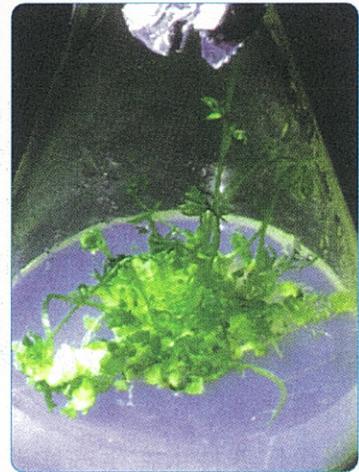
(4) 将组织块接种到无菌的诱导培养基上, 用锡箔纸和橡皮筋重新封盖瓶口, 在培养瓶上贴上标签, 写明材料名称、接种日期和小组号。



(5) 23℃~26℃恒温避光培养。定期观察和记录愈伤组织的生长情况,统计并计算出不同诱导培养基上培养材料的出愈率。培养 30d 左右,将愈伤组织分切成小块,然后转接到继代培养基上继续避光培养,定期观察并记录愈伤组织的生长状况。



(6) 将愈伤组织转接到分化培养基上,23℃~26℃恒温光照培养,每天光照 12h 持续 14d 后,统计并计算出不同培养基上培养材料的分化率。将分化出的幼苗转接到生根培养基上,培养 14d 后,统计并计算出不同培养基上培养材料的生根率。然后将试管苗移栽到大田栽培。



4. 根据给出的公式计算出诱导率、分化率、生根率,并填入表 4-2:

$$\text{诱导率} = \frac{\text{诱导出愈伤组织的材料块数}}{\text{接种材料块数}} \times 100\%$$

$$\text{分化率} = \frac{\text{分化出幼苗的愈伤组织块数}}{\text{接种愈伤组织块数}} \times 100\%$$

$$\text{生根率} = \frac{\text{生根的幼苗数}}{\text{接种的幼苗数}} \times 100\%$$

表 4-2 胡萝卜组织培养实验观察记录表

培养基	诱导率	培养基	生长状况	培养基	分化率	培养基	生根率
Y1		J 1		F 1		S 1	
Y2		J 2		F 2		S 2	
Y3		J 3		F 3		S 3	

## 总结与讨论

1. 根据实验中各组培养物的生长状况, 得出胡萝卜组织培养中各种培养基的最适配方。
2. 在本实验中组织培养的取材部位强调要切取含有形成层部分, 原因是这部分容易诱导形成愈伤组织。请思考并试验胡萝卜的其他部分(如茎、叶、花)是否也能培养再生形成小植株。
3. 请根据上面的实验过程总结植物组织培养技术的流程简图。
4. 在组织培养实验中, 有哪些措施可以降低培养物的污染率?
5. 在愈伤组织分化时, 如何调控其发芽和生根的分化方向?

植物组织培养(plant tissue culture)就是在无菌和人工控制条件下, 将离体的植物器官、组织、细胞, 培养在人工配制的培养基上, 给予适宜的培养条件, 最终诱导产生愈伤组织、从芽或完整植株的技术。在植物的组织培养中常用的基本培养基配方有许多种, 如 MS 培养基、怀特培养基、 $N_6$  培养基等。各种基本培养基适于培养不同的材料, 如  $N_6$  培养基一般常用于植物花药的组织培养; 生根培养基一般采用大量元素减半的 1/2MS 培养基。在实际组织培养实验中, 很多培养物在分化培养基上诱导出幼苗的同时也可以生根, 此时就不必再特地设计生根培养基。

植物组织培养技术在生产实践中应用非常广泛, 它不仅可以保持优良品种的遗传特性, 还可以高效快速地实现种苗的大量繁殖, 因此人们形象地把植物组织培养技术叫做植物的微繁技术, 也叫做快速繁殖技术。另外, 植物组织培养技术在农业上还可以用于马铃薯和草莓等作物的脱毒苗培育、制备人工种子和单倍体育种等; 工业上, 利用植物组织培养技术可以进行一些细胞产物的工厂化生产, 这些细胞产物包括蛋白质、脂肪、糖类、药物、香料、生物碱等。



## 自我检测

1. 如果你打算进行一种植物叶片的组织培养实验, 请写出在实验前需要准备高压灭菌的用具和药品。
2. 试管苗移栽到大田前, 都需要打开培养瓶的盖子, 在室温放置 5~7d, 这一过程称为炼苗。请思考为什么要对培养材料进行炼苗处理?



## 课外实践

以植物的嫩枝为材料, 设计培养基配方, 进行组织培养实验。



## 开阔眼界

### 植物组织培养过程中的体细胞变异

在植物的组织培养过程中,培养细胞一直处于不断的分生状态,容易受到培养条件和外界压力(如射线、化学物质等)的影响而产生突变,从这些突变中我们可以筛选出对人们有用的突变体,进而培育出新品种。

在作物育种中,我们可以对其愈伤组织进行化学或物理的诱变处理,促使其发生突变,然后诱导分化成植株后从中筛选出高抗、高产、优质的优良品种。

化学诱变一般是利用一些化学诱变剂,常见的有甲基磺酸乙酯(EMS)和叠氮化钠( $\text{NaN}_3$ )等。物理诱变一般采用电离辐射处理,主要包括 $\gamma$ 射线、 $\beta$ 射线、中子射线等。

20世纪70年代以来,世界各国的科学家利用这种方法已经筛选出大量的抗病、抗盐、高赖氨酸、高蛋白、矮秆、高产的突变体,其中有些已经用于生产,如抗花叶病毒的甘蔗、抗盐碱的野生烟草、抗除草剂的白三叶草等。

## 第2节 蛋白质的提取和分离

餐桌上琳琅满目的食品为我们提供了各种各样的营养,这些营养成分在生物体中起着不同的作用。其中蛋白质的生物功能很多,如生物的生长发育、细胞结构、能量转换和遗传变异等都与蛋白质有密不可分的关系。科学家为了研究生物体中各种蛋白质的性质和功能,往往要先对某种蛋白质进行提取和分离。那么,你知道科学家是如何提取和分离蛋白质的吗?



### 实验

#### 乳酸脱氢酶同工酶的提取和分离

##### 活动目标

1. 解释蛋白质提取和分离的基本原理。
2. 尝试乳酸脱氢酶同工酶的提取和分离。

##### 实验原理

乳酸脱氢酶(lactic dehydrogenase, LDH)同工酶可以与特定的底物进行反应,形成特殊的蓝紫色产物。同工酶检测必须依靠其具有催化活性的特点,从而使其和其他

的可溶性蛋白质区分开来。因此在提取此类蛋白质时必须提供必要的缓冲系统和低温环境以保持其生物活性。

蛋白质在立体网状的琼脂糖凝胶中电泳时,其迁移率主要取决于它所带净电荷以及分子的大小和形状等因素。具有不同净电荷、分子大小和形状的乳酸脱氢酶同工酶,可以在琼脂糖凝胶中通过电泳分开。

### 材料用具

动物的心脏(或肝脏、骨骼肌、血液、肾脏),碎冰块;琼脂糖,0.05mol/L 磷酸提取缓冲液(pH 7.4),TBE 电泳缓冲液,乳酸脱氢酶同工酶染色液,载样缓冲液;冷冻高速离心机,电泳仪,水平电泳槽,微量移液器,玻璃匀浆器,剪刀,天平,染色盘等。

### 方法步骤

#### 1. 乳酸脱氢酶同工酶的提取

(1)取 5g 新鲜的动物心脏,漂洗干净后剪碎到预冷的玻璃匀浆器中,加入 25mL 磷酸提取缓冲液,然后冰浴研磨成匀浆。

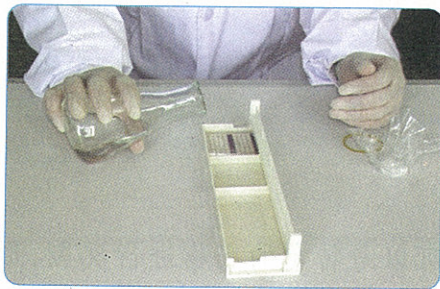


(2)将匀浆收集到冰浴的离心管中,在 4℃条件下 12 000 rpm 离心 10min。吸取上清液,然后在 4℃条件下保存备用。

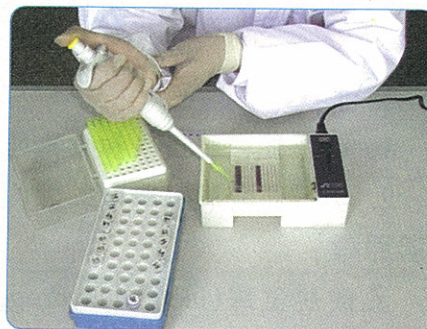


#### 2. 乳酸脱氢酶同工酶的琼脂糖凝胶电泳分离

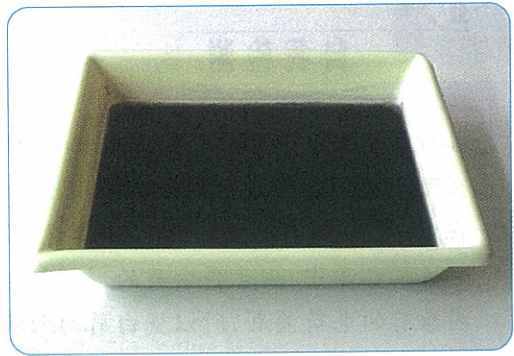
(1)用 TBE 电泳缓冲液配制质量分数为 1%的琼脂糖凝胶,加热溶解后混匀,缓缓倒入胶床中,插入适当的梳子,室温冷却至凝胶凝固。拔出梳子,将凝胶放入电泳槽中,然后向电泳槽中加入适量 TBE 电泳缓冲液。



(2)取适量同工酶提取液与等量载样缓冲液混匀,然后取 20μL 加入样品孔内,100V 条件下进行电泳约 30min。



(3)当溴酚蓝指示剂电泳到凝胶底部时切断电源,取出胶板浸入染色液中,37℃染色 15~30min 后,取出水洗,观察电泳结果。



### 总结与讨论

1. 制备同工酶提取液的过程中,哪些是为了保持酶的活性而采取的措施,试着提出你想到的其他措施。

2. 心脏提取液中除了乳酸脱氢酶还含有其他蛋白质吗?考马斯亮蓝是一种可以使所有蛋白质都染成蓝色的染料。本实验电泳后的凝胶如果用考马斯亮蓝染色,预想会有什么现象发生?你还可以分辨出乳酸脱氢酶同工酶的条带吗?

同工酶(isoenzyme)是指催化相同的化学反应而酶蛋白的分子结构、理化性质乃至免疫学性质不同的一组酶。乳酸脱氢酶一般含有 5 种同工酶,其相对分子质量相同,但所带电荷不同,所以乳酸脱氢酶同工酶的电泳结果应该形成 5 个条带(图 4-2)。

根据本实验,我们初步了解了蛋白质的提取与电泳的方法。其实除了这些,对蛋白质的研究还有很多方面,比如蛋白质的氨基酸组成分析、立体结构研究

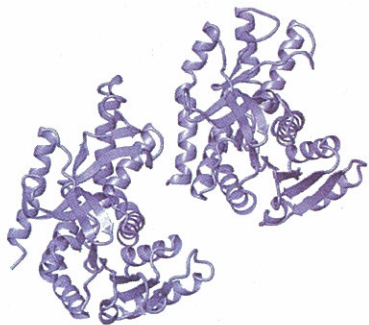
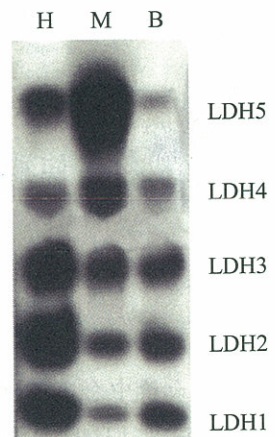


图 4-3 蛋白质的立体结构模型

(图 4-3)和蛋白质的人工合成等。随着科学家对蛋白质各个领域的深入研究,逐步形成了

对生物体各种蛋白质进行系统研究的蛋白质组学(proteomics)。蛋白质组学的研究不仅能分析生物体内蛋白质的组成,还可以揭示出各种蛋白质在生物体内的相互作用与联系。蛋白质组学已经成为 21 世纪生命科学研究领域中新的前沿。



H:心脏,M:骨骼肌 B:脑

图 4-2 乳酸脱氢酶同工酶电泳图谱



## 自我检测

1. 各种动物血清内乳酸脱氢酶同工酶的组成是不同的。现有人血清和兔血清两种试剂被混淆,在可以提供标准人血清的条件下,设计实验分辨出两种血清,请写出具体实验流程。
2. 在电泳缓冲液和凝胶中加入十二烷基硫酸钠(SDS)等变性剂的电泳称为变性胶电泳。在 SDS 变性胶电泳中,由于蛋白质的形状都变为椭圆形,而且 SDS 所带的负电掩盖了不同种蛋白质间原有的电荷差别,所以蛋白质的形状和电荷不再影响其在凝胶中的迁移。请考虑在变性胶电泳中影响蛋白质迁移的主要因素是什么?



## 课外实践

查阅相关资料,以植物的叶片为材料,设计实验进行可溶性蛋白质的提取和电泳分析。



## 开阔眼界

### 乳酸脱氢酶同工酶与人体疾病的诊断

人血清中含有 5 种乳酸脱氢酶(LDH)同工酶,它们由 H(心肌型)和 M(骨骼肌型)两类亚基组成,分别为 LDH1(HHHH)、LDH2(HHHM)、LDH3(HHMM)、LDH4(HMMM)、LDH5(MMMM)。心脏、肾脏和脑细胞富含 LDH1 和 LDH2,而肝脏、骨骼肌和视网膜中含 LDH5 和 LDH4 最多。正常人血清中 LDH 同工酶活性大小顺序为:LDH2>LDH1>LDH4>LDH5,当人体患有某些疾病时,其血清中 LDH 同工酶的含量会发生变化,而且由于病变的脏器不同,各个同工酶变化也不一致:

1. LDH1 升高,而且 LDH1>LDH2,一般见于心肌损伤、急性心肌梗死、心肌病、溶血性贫血、恶性贫血、肺栓塞等。
2. LDH5 升高,而且 LDH5>LDH4,一般见于肝硬化、肝癌、急性肝炎、肌炎、骨骼肌损伤。
3. LDH5>LDH4,而且两者都升高,以 LDH4 更明显,一般见于阻塞性黄疸。

## 第 3 节 聚合酶链式反应技术

1983 年春天的一个晚上,美国科学家穆里斯(K. Mullis)成功地设计出一项在人工条件下,短时间内可以对目的 DNA 片段进行大量体外扩增的技术,这就是聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR) 技术。由于这项技术对生物科学研究的巨大贡献,1993 年穆里斯获得了诺贝尔化学奖。

1988 年,赛凯(Saiki)等从水生栖热杆菌(*thermus aquaticus* Taq)中提取到一种耐热的 Taq DNA 聚合酶。这种聚合酶的使用克服了实验过程中要反复加入聚合酶的缺陷,实现了 PCR 反应的完全自动化。

随着 PCR 技术的日臻完善,PCR 扩增仪(图 4-4)也得到不断的改进。现在新型的 PCR 扩增仪主要是在一个密闭的环境中实现对实验样品的迅速升温、降温,从而完成 PCR 反应的热循环过程。由于新型 PCR 扩增仪的使用,使得 PCR 体外基因扩增技术更加广泛地在社会各个领域得以应用。那么穆里斯设计的 PCR 反应是怎样的一项神奇技术呢?我们又如何对一段 DNA 进行 PCR 体外扩增呢?



图 4-4 PCR 扩增仪



### 实验

#### DNA 片段的扩增和琼脂糖凝胶电泳检测

##### 活动目标

1. 说出 PCR 体外基因扩增的基本原理。
2. 尝试 DNA 片段的扩增和琼脂糖凝胶电泳检测技术。

##### 实验原理

PCR 技术是体外酶促合成特定 DNA 片段的一种方法,其原理是:按照 DNA 复制所需条件,在体外酶促合成 DNA 时,首先必须具备待扩增的目的 DNA(DNA 合成的模板)、合成 DNA 时所需的特异引物和原料——4 种三磷酸脱氧核苷酸(dATP、dGTP、dCTP、dTTP)、起酶促作用的耐热 Taq DNA 聚合酶和作为反应介质的缓冲溶液。其次,根据 DNA 的理化特性,在高温条件下,双链 DNA 解旋变为单链 DNA(变性);低温条件下单链 DNA 又可恢复为双链 DNA(复性);中温条件下能进行 DNA 合成,使 DNA 链延伸。由此,PCR 反应过程一般采取“高温变性——低温复性——中温延伸”三个步骤,促使 DNA 进行复制。另外,为了实现 DNA 的大量扩增,便以上述反



应作为一个周期,循环进行,使目的 DNA 得以迅速扩增,得到大量的目的 DNA 片段。

根据上述原理,PCR 反应的主要操作过程是:将具有待扩增的目的 DNA 反应溶液进行  $94^{\circ}\text{C}\sim 98^{\circ}\text{C}$  高温处理,使反应体系中的目的 DNA 变性成单链模板。然后迅速降温到  $40^{\circ}\text{C}\sim 60^{\circ}\text{C}$ ,使 DNA 发生复性。这时,引物便优先与单链 DNA 模板发生配对,从而引导 DNA 新链的合成。因为 Taq DNA 聚合酶的最适反应温度在  $72^{\circ}\text{C}$  左右,所以 PCR 反应的 DNA 延伸温度一般采用  $72^{\circ}\text{C}$ 。这样,经过一个“变性—复性—延伸”周期后,PCR 体系中的 DNA 模板理论上就可以得到 1 倍的扩增。由于每一周期所产生的 DNA 均能作为下一次循环的模板,所以 PCR 产物以指数方式增加,经过 25~30 个周期之后,理论上可以增加  $10^9$  倍,实际上一般可以扩增  $10^6\sim 10^7$  倍。由此,在短短的几个小时后,目的 DNA 的数量就可以被扩大数百万倍(图 4-5)。



### 小辞典

#### 引物

目前已知的 DNA 聚合酶都不能从头起始合成一条新的 DNA 链,而必须在一段可以与 DNA 模板配对结合的单链 DNA 片段基础上进行延伸合成,这段 DNA 片段就称为引物。PCR 反应的引物一般采用人工合成的单链 DNA 片段,其长度大约为几个到几十个核苷酸。

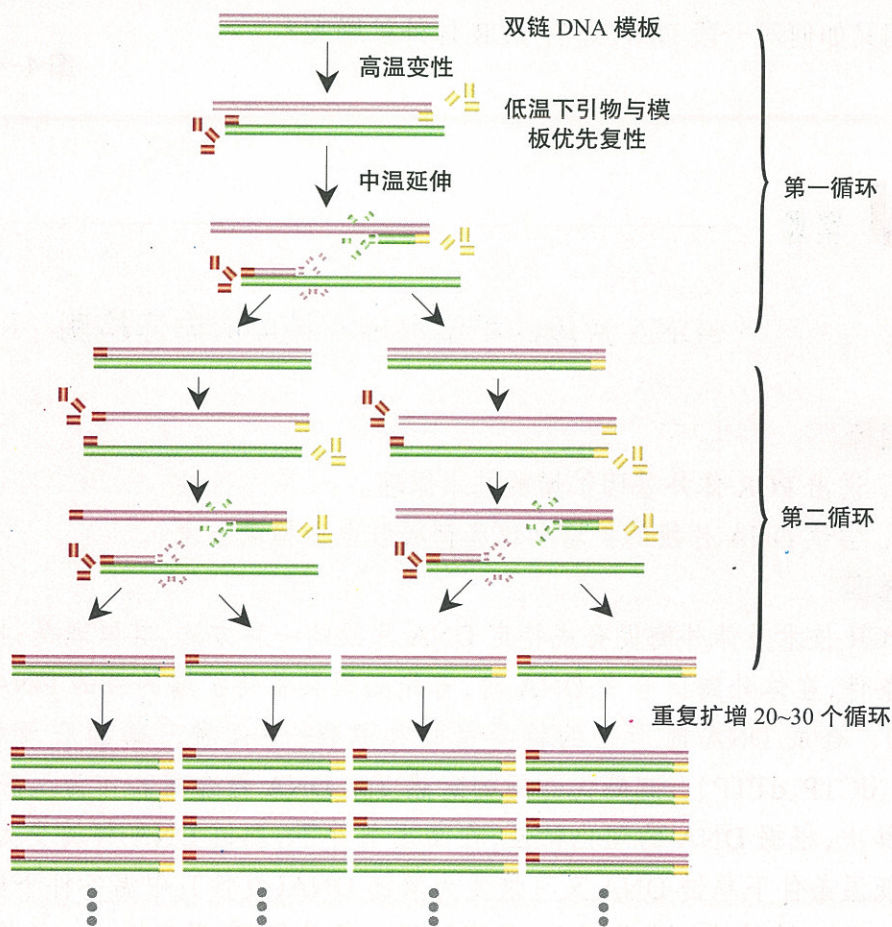


图 4-5 聚合酶链式反应模式图

琼脂糖凝胶电泳是一种非常简便的快速分离、纯化和鉴定 DNA 的方法。琼脂糖凝胶具有大小一致的刚性滤孔,带有大量负电荷的 DNA 分子在外加电场的作用下可以通过这些滤孔向正极泳动。DNA 片段在凝胶中的泳动速率主要取决于其分子的大小,因此大小一致的 DNA 分子会在凝胶的一定位置形成 DNA 条带。

### 材料用具

100ng/ $\mu$ L 模板 DNA 溶液; 琼脂糖, 5U/ $\mu$ L Taq DNA 聚合酶, 10 $\times$ PCR 缓冲液, 25mmol/L MgCl<sub>2</sub> 溶液, 2mmol/L 的 dATP、dTTP、dGTP、dCTP 溶液, 2.5 $\mu$ mol/L 扩增引物 (复性温度为 40 $^{\circ}$ C), TBE 电泳缓冲液, 载样缓冲液, 0.5 $\mu$ g/mL 溴化乙锭溶液, 无菌石蜡油, 无菌水; PCR 热循环仪, 离心机, 电泳仪, 水平电泳槽, 紫外透射仪, 水浴锅, 0.2mL eppendorf 离心管 (EP 管), 微量移液器, 一次性塑料手套, 紫外线防护眼镜等。



### 小辞典

#### PCR 反应参考体系

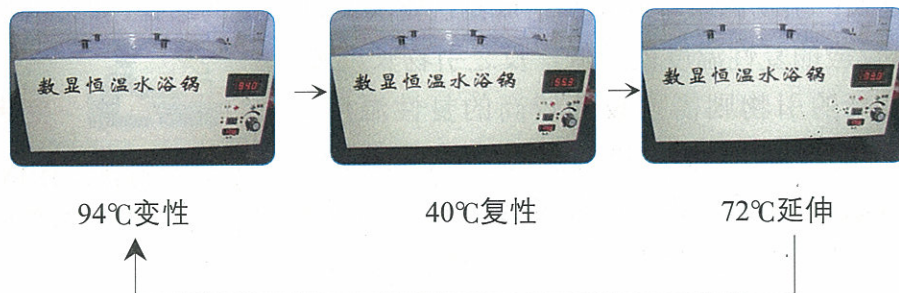
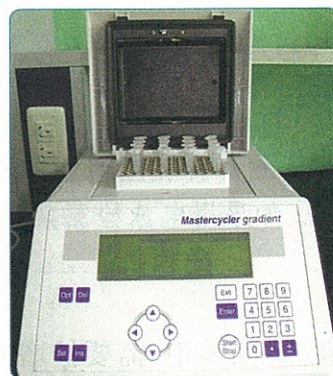
10 $\times$ PCR 缓冲液	2 $\mu$ L
25mmol/L MgCl <sub>2</sub>	1.4 $\mu$ L
5U/ $\mu$ L Taq 聚合酶	0.2 $\mu$ L
2.5 $\mu$ mol/L 引物	2 $\mu$ L
2 mmol/L dNTP	2 $\mu$ L
100ng/ $\mu$ L 模板 DNA	1 $\mu$ L
无菌水	11.4 $\mu$ L

### 方法步骤

#### 1. DNA 片段的 PCR 扩增

(1) 在冰浴的 EP 管中混合 PCR 反应体系的各种药品, 混合均匀后低速离心。每管加入 30 $\mu$ L 无菌石蜡油, 防止反应溶液的蒸发。

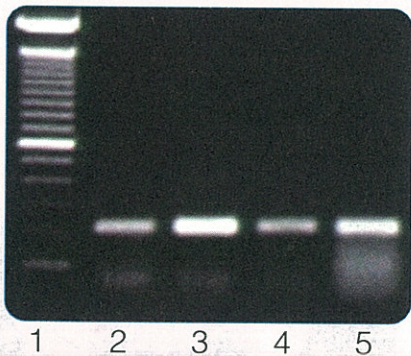
(2) 将 EP 管放入 PCR 热循环仪中, 输入并运行反应程序 (PCR 反应参考程序: 94 $^{\circ}$ C 变性 5min, 进入循环程序 94 $^{\circ}$ C 1min $\rightarrow$ 40 $^{\circ}$ C 1min $\rightarrow$ 72 $^{\circ}$ C 2min, 运行 35 个循环后 72 $^{\circ}$ C 10min, 4 $^{\circ}$ C 保温)。如果没有 PCR 扩增仪, 也可以在 3 个温度不同的水浴锅中手工移动含有反应体系的 EP 管, 运行反应程序。



## 2. 扩增产物的检测

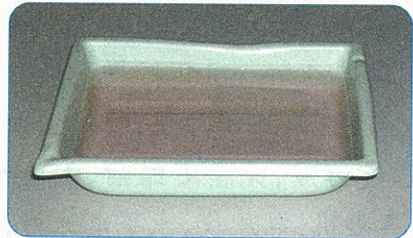
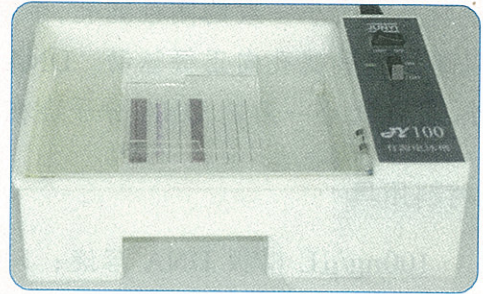
(1) 配制质量分数为 1% 的琼脂糖凝胶，制作成电泳胶板。在扩增的 DNA 样品中加入 0.2 倍体积的载样缓冲液，混匀后，取  $20\mu\text{L}$  加入样品孔内，80V 稳压电泳 20~40min。

(2) 当溴酚蓝指示剂电泳到凝胶底部时切断电源，戴好塑料手套，将胶板浸入溴化乙锭溶液染色 5~10min，在紫外透射仪上观察电泳条带(图 4-6)。



1 为相对分子质量标记;2~5 为 PCR 扩增产物

图 4-6 PCR 扩增产物的琼脂糖电泳



### 注意

溴化乙锭有强致癌性! 请不要沾染到皮肤上。操作过程中注意戴好手套。

紫外线对眼睛有伤害! 用紫外透射仪观察 DNA 时, 要配戴防护眼镜或在透射仪上面加塑料防护罩。

### 总结与讨论

1. DNA 片段在 TBE 缓冲液中带有负电荷, 请思考在电泳检测 PCR 扩增产物时, 胶板的加样孔应该靠近电泳槽的正极还是负极。

2. 如果用电泳检测某种扩增产物时发现许多条带, 可能是由哪些原因造成的?

在 PCR 实验中, 需要扩增的 DNA 片段的大小决定延伸的时间, 片段越大, 中温延伸的时间就要相应延长; 引物的碱基数量和组成则决定着复性温度的选择, 如果引物越短, A、T 含量越多, PCR 反应的复性温度就越低, 反之引物长度较长, G、C 含量较高的引物则需要设计较高的复性温度。Taq DNA 聚合酶是一种具有高度准确性的 DNA 聚合酶, 在经过反复的升温、降温后依然可以忠实地复制出我们需要的目的 DNA 片段, 但 Taq DNA 聚合酶在 PCR 扩增过程中也存在大约为  $1 \times 10^{-5}$  的出错几率, 而且随着循环数



### 思考

为什么 DNA 中 A、T 含量越多, 其复性温度就越低?

的增加,其活性也逐渐降低。因此,PCR 扩增循环次数并非越多越好,一般控制在 25~35 个循环。

PCR 扩增技术现在已经应用到临床诊断、法医鉴定、分子生物学、农牧业等领域。凡是涉及到 DNA 分子操作的研究工作,几乎都需要用到 PCR 技术。现在经过科学家不断的发展和丰富后,PCR 技术已经衍生出多种的 DNA 检测手段,如随机扩增多态 DNA (random-amplified polymorphic DNA,RAPD) 技术、单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 技术和扩增片段长度多态性 (amplified fragment length polymorphism, AFLP) 技术等。这些 DNA 检测技术正在越来越广泛地应用于我们生活中的方方面面。



### 自我检测

1. 复性温度对 PCR 反应的成功与否非常关键,我们在 PCR 扩增进行之前都要根据引物的大小和碱基组成来设计合适的复性温度,那么复性温度过高或过低对 PCR 扩增有何影响?
2. 简述 PCR 技术的原理。



### 课外实践

查阅《中国科学》、《植物学报》、《遗传学报》等资料,了解现代科学研究中与 PCR 技术相关的技术,写出总结报告。



### 开阔眼界

## PCR 技术在临床检验中的应用

1983 年穆里斯发明了聚合酶链式反应技术,使医学界真正兴起了基因诊断,成为现代医学发展的又一里程碑。

首先,PCR 技术极大地促进了孕期检查及产前诊断。通过孕期的 PCR 技术检查,能及时了解孕妇是否患有某些对胎儿发育有严重影响的疾病,如风疹病毒、沙眼衣原体、巨细胞病毒感染等,从而做到及早治疗并采取有效措施预防发展成为宫内感染。利用 PCR 技术还可以对地中海贫血、血友病、苯丙酮尿症、脆性 X 综合征等遗传性疾病进行宫内诊断。可见,PCR 在优生优育方面有很高的应用价值。

其次,PCR 技术在癌基因的检测和传播性疾病如乙型肝炎、梅毒、淋病等的诊断中有较广泛的

应用。PCR 扩增简便、快捷,有较强的实用性,甚至可以直接从病人体液样本中检测活化的致病基因而不需切取活的组织,这对一些疾病的早期诊断有极其重要的意义。

另外,PCR 技术的出现对法医学的发展也有不可低估的作用。在法医物证如血斑、毛发、组织碎片等的确证、亲子鉴定和个人身份确认方面,PCR 分析远比血清学等方法更为可靠,理论上其准确率可达 99.999%。

当然,PCR 技术在医学中的应用仍在起步阶段,有许多技术问题有待解决,如样本中的抑制剂、检测中 DNA 的损伤、PCR 扩增污染等。相信随着 PCR 技术的不断完善,它将在医学领域中发挥更加巨大的作用。

## 本章小结

本章主要介绍了现代生物技术中最常用的 3 种基本实验技术:植物的组织培养技术、蛋白质的提取和电泳检测技术、DNA 片段的 PCR 扩增和扩增产物的电泳检测技术。

植物组织培养技术是利用了植物细胞具有全能性的特点。在具备生长所需的全部营养和特定植物生长调节剂的条件下,植物的细胞、组织和器官可以诱导产生愈伤组织、丛芽或完整的植株。

在一定的缓冲液和低温条件下,可以从生物组织内提取蛋白质并保持其特有的生物活性。各种蛋白质分子具有不同净电荷、分子大小和形状,可以通过电泳进行分离。

聚合酶链式反应技术可以在体外短时间内对 DNA 片段实现数百万倍的扩增,扩增得到的 DNA 产物可以通过电泳进行检测。科学家利用 PCR 技术衍生出的各种 DNA 检测技术正在生物学研究领域中发挥着越来越大的作用。

## 附录 I

### 中英文词汇对照表

标准曲线	standard curve
单核苷酸多态性	single nucleotide polymorphism
蛋白质组学	proteomics
酒精	alcohol
芳香油	aromatic oil
固定化酶	immobilized enzyme
聚合酶链式反应	polymerase chain reaction
菌落	colony
扩增片段长度多态性	amplified fragment length polymorphism
培养基	medium
平板菌落计数法	plate colony count method
乳酸脱氢酶	lactic dehydrogenase
随机扩增多态 DNA	random-amplified polymorphic DNA
同工酶	isoenzyme
硝酸盐	nitrate
亚硝酸盐	nitrite
植物组织培养	plant tissue culture

## 附录 II

### 书海拾贝

1. 《微生物工程》 曹军卫 马辉文著 科学出版社 2002年
2. 《生物科技活动指导》 陈三茂著 湖南科学技术出版社 2001年
3. 《微生物实验》 赵斌 何绍江著 科学出版社 2002年
4. 《微生物实验教程》 祖若夫 胡宝龙 周德庆著 复旦大学出版社 1993年
5. 《酶制剂工业》(上、下册) 张树政主编 科学出版社 1998年
6. 《畜产品加工新技术》 董开发 徐明生编著 中国农业出版社 2002年
7. 《图解生活中的科学小实验》 (日)西山隆造著 科学出版社 2000年
8. 《发酵工业概论》 李艳著 中国轻工业出版社 2000年
9. 《天然实用香料的生产 and 应用》 杜进能 黄士诚著 中国轻工业出版社 1998年

10. 《食品安全与生态风险》 马逊风 等著 化学工业出版社 2001年
11. 《现代生物技术导论》 瞿礼嘉 顾红雅 胡莘 陈章良主编 高等教育出版社 1998年
12. 《生物分子科学实验技术》 王小菁 李德红 孟祥春译 湖南科学技术出版社 2001年
13. 《生物学实验技术》 李玲 张春荣 郭建军译 湖南科学技术出版社 2001年
14. 《探索生命》 王直华 杨汝戩 杜富山主编 河北少年儿童出版社 1999年