**2020届选修一必背知识点**

**专题一 传统发技术的应用**

**课题一 果酒和果醋的制作**

1、果酒菌种：附着在葡萄皮上的野生型**酵母菌**（代谢类型：**异养兼性厌氧**。）

2、制酒原理：

有氧条件下，酵母菌进行有氧呼吸，大量繁殖；无氧条件下，酵母菌进行酒精发酵产生酒精。反应式如下：

3、制酒条件：温度（18-25℃），发酵液**缺氧、呈酸性**（原因：酵母菌可以生长繁殖，而其他微生物无法适应这一环境）

4、果醋菌种：**醋酸菌**（细菌，原核生物），代谢类型：**异养需氧型**。

在变酸的酒的表面观察到的菌膜是怎么形成的? **醋酸菌繁殖**。

5．制醋原理：两条途径生成醋酸：当**氧气、糖源都充足**时，醋酸菌将葡萄汁中的糖分解成醋酸；当**缺少糖源**时，醋酸菌将乙醇变为乙醛，再将乙醛变为乙酸。

反应式如下：

6、制醋条件：①**充入空气**（深层发酵时，短时间不通氧，醋酸菌死亡。）③温度：30-35℃

7、流程

挑选葡萄——冲洗——榨汁——酒精发酵——醋酸发酵

果酒 果醋

8、装置：**制酒时，关闭充气口**；**制醋时，充气口连续输入氧气**。排气口长而弯曲的胶管目的

是防止空气中微生物的污染；开口向下的目的是排出酒精发酵时产生的二氧化碳。

出料口是用来取样检测。

葡萄汁只装2/3，留1/3空间的目的是**让酵母菌先有氧呼吸进行繁殖，为酒精发酵产生留足储存空间，防止培养液溢出**。

9、若用瓶子做装置：制酒时，要每隔12小时**拧松瓶盖1**次（注意**不能打开**），目的是**排出二氧化碳，防止气压过高引起爆炸**；制醋时，**将瓶口打开**，盖上纱布。

10、先冲洗葡萄再除去枝梗，（原因：**避免除去枝梗时引起葡萄破损，增加被杂菌污染的机会**）。

11、酒精检验：**酸性**条件下，**重铬酸钾**与酒精反应呈现**灰绿色**。

醋酸检验：嗅味和品尝（比较PH）

**课题二 腐乳的制作**

1、菌种：多种微生物如青霉、酵母，曲霉、毛霉等，主要是**毛霉**（代谢类型是**异养需氧型**）传统来自**空气中的毛霉孢子**；现代生产将优质毛霉菌种直接接种在豆腐上。

豆腐生长的白毛是**毛霉的白色菌丝**。**毛霉生长**形成菌膜（腐乳的“皮”）

2、原理：毛霉等微生物产生的**蛋白酶**能将豆腐中的蛋白质分解成小分子的肽和氨基酸

**脂肪酶**可将脂肪水解为甘油和脂肪酸。

3、实验流程：**让豆腐上长出毛霉**一加盐腌制一加卤汤装瓶一密封腌制（加盐之前为前期发酵，目的是创造条件让毛霉生长，使包住豆腐使腐乳成型。后期发酵主要是酶与微生物协同作用，生成腐乳的香气，）

4、条件：影响腐乳风味和质量的因素有**盐的用量、酒的种类和用量**、**发酵温度和发酵时间**。

（1）温度：**15～18**℃

（2）加盐：逐层加盐，随着层数的加高面增加盐量，接近瓶口表面的盐**要铺厚一些**，控制盐的用量（豆腐：盐=5：1）：（原因：**盐的浓度过低，不足以抑制微生物的生长，可能导致豆腐腐败变质；盐的浓度过高会影响豆腐乳的口味**。）

食盐的作用：1.**抑制微生物生长，避免腐败变质 2.析出豆腐中的水分，使豆腐变硬.**

（3）酒：作用：**加酒可以抑制微生物的生长，同时能使腐乳具有独特的香味**。注意控制酒的含量：12%左右。（原因：**酒精含量过高，对蛋自酶的抑制作用也越大，使腐乳成熟期延长；酒精含量过低，不足以抑制微生物生长，导致豆腐腐败**。）

（4）香辛料：作用：**可以调制腐乳的风味，也具有防腐杀菌的作用**。

（5）含水量：含水量为**70%**左右的豆腐适于作腐乳（原因：**含水量过高，不易成形；含水量低，不利于毛霉的生长**）。

5、防止杂菌污染的措施：①玻璃瓶，洗净后用沸水消毒。②加卤汤后，用胶条将瓶口密封。③封瓶时将瓶口通过精灯的火焰。

**课题三 制作泡菜**

1、菌种：**乳酸菌**（代谢类型**异养厌氧型**）。

包括乳酸链球菌和乳酸杆菌。乳酸杆菌常用于生产酸奶。

泡菜坛内长的白膜是**酵母菌繁殖形成的**。

2、制作泡菜的原理：**乳酸菌的乳酸发酵**。反应式如下：。

3、实验流程：

4、条件：注意控制腌制时间、温度和食盐用量。（原因：温度过高、食盐用量过低，腌制时间过短，容易造成细菌大量繁殖，亚硝酸盐含量增加。）

（1）配制盐水：水：盐=4：1；**煮沸冷却**（煮沸目的是杀菌和去除溶解氧，以利于乳酸菌的繁殖。冷却目的是不影响乳酸菌的生命活动。）

（2）无氧：用水封闭坛口的作用是：保证发酵的无氧环境。不封闭结果：①有氧会抑制乳酸菌的无氧呼吸确 ②杂菌污染

5、测定亚硝酸盐含量。

（1）方法：比色法。

（2）原理：在盐酸酸化条件下，亚硝酸盐与**对氨基苯磺酸**发生**重氮化**反应后，与**N-1-萘基乙二胺盐酸盐**结合形成**玫瑰红色染料**，与已知浓度的**标准显色液**目测比较，估算泡菜中亚硝酸盐含量。

（3）含量变化及原因：发酵初期，硝酸还原菌的活动增强，将硝酸盐还原为亚硝酸 。一般在腌制10d后，亚硝酸盐的含量开始下降，原因是硝酸还原菌受到抑制，同时形成的亚硝酸盐又被分解。

（4）含量超过3克造成中毒的原因：亚硝酸盐为强氧化剂，能够把血液中携带氧的低铁血红蛋白转变为高铁血红蛋白，从而导致缺氧性中毒症状。

（5）亚硝酸盐在特定的条件下会转变成致癌物——**亚硝胺**。亚硝胺具有致癌作用，同时对动物具有致畸和致突变作用。

6、含抗生素牛奶不能生产酸奶的原因是抗生素杀死乳酸菌。

7、制作酸奶的过程中是否会产生亚硝酸盐？请设计出实验方案，用来检验自己的假设。

（取等量的牛奶及制作成的酸奶，用相同的方法检测亚硝酸盐的含量，对比亚硝酸盐的含量，得出结论。）

【小结】传统发酵技术

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 区别 | 酒精发酵 | 醋酸发酵 | 腐乳的制作 | 泡菜的制作 |
| 微生物 | 酵母菌 | 醋酸菌 | 主要是毛霉 | 乳酸菌 |
| 温度 | I8－25℃ | 30-35℃ | 15-18℃ | 16-26℃ |
| 氧气 | 无氧 | 有氧 | 有氧 | 无氧 |
| 代谢类型 | 异养兼性厌氧型 | 异养需氧型 | 异养需氧型 | 异养厌氧型 |
| 共同特点 | 都巧妙的利用了天然菌种，都为特定的菌种提供了良好的生存条件，最终的发酵产物不是单一的组分，而是成分复杂的混合物。 | | | |

**专题二 微生物的培养与应用**

**课题一 微生物的实验室培养**

1、培养基的类型及其应用

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 标准 | 培养基类型 | 配制特点 | 主要应用 |
| 物理性质 | 固体培养基 | 加入琼脂较多 | **菌种分离**，鉴定，计数 |
| 半固体培养基 | 加入琼脂较少 | 菌种保存 |
| 液体培养基 | 不加入琼脂 | 工业生产，**大量繁殖** |
| 目的用途 | 鉴别培养基 | 添加**某种指示剂**或化学药品 | 菌种的鉴定 |
| 选择培养基 | 添加（或缺少）**某种化学成分** | 菌种的分离 |

2、培养基的营养成分：水、无机盐、**碳源、氮源**。还要满足微生物生长对PH、**特殊营养物质**以及氧气的要求。

3、无菌技术——（**微生物接种技术的核心**）获得纯净培养物的关键是：防止杂菌污染。

（1）消毒指使用较为温和的物理或化学方法杀死物体表面或内部的**部分微生物**（不包括芽孢和孢子）。分为煮沸消毒法，**巴氏消毒法**（不耐高温的液体，如牛奶。原因：可以杀死牛奶中的微生物，并且使牛奶的营养成分不被破坏。）化学药剂消毒法（如酒精、氯气、石碳酸等），紫外线消毒法（原理：破坏DNA的结构）。

（2）灭菌是指使用强烈的理化因素杀死物体内外**所有的微生物**，包括芽孢和孢子。

分为**灼烧灭菌法**（接种环、接种针等金属工具、试管口）、**干热灭菌法**（吸管、培养皿等玻璃器皿、金属用具，所用器械是干热灭菌箱）、**高压蒸汽灭菌**（培养基、无菌水等，所用器械是高压蒸汽灭菌锅）

（3）防止杂菌污染的操作有哪些？（在**酒精灯火焰旁**拔出锥形瓶瓶盖；在酒精灯火焰旁打开培养皿一条缝；打开的锥形瓶的瓶口通过火焰；平板冷却凝固后倒置。）

4、制作牛肉膏蛋白胨固体培养基。

（1）各营养成分都有且有一定的比例。牛肉膏提供碳源、氮源和生长因子等；蛋白胨提供碳源、氮源和生长因子等；琼脂作为凝固剂。

（2）要将平板倒置的原因：防止皿盖上的水珠落入培养基，造成污染。

5、**纯化大肠杆菌**

（1）纯化方法：微生物接种的方法，最常用的是平板划线法和稀释涂布平板法。

（2）纯化原理：在**数次划线**后培养或在**稀释度足够高**的菌液里，可以分离到**由单个菌体繁殖而来的菌落**。

（3）平板划线法是通过接种环在琼脂固体培养基表面连续划线的操作，将聚集的菌种逐步稀释分散到培养基的表面。

①每次划线从上一次划线的末端开始，能**使菌体的数目随着划线次数的增加而逐步减少**，最终能得到**由单个菌体繁殖而来的菌落**。

②划线时不要将最后一区的与第一区相连。

③操作的第一步**灼烧接种环**是为了避免接种环上可能在在的微生物污染培养物；每次划线之前都要为烧接种环是为了杀死上次划线结束后，接种环上残留的菌种；划线操作结束时，要灼烧接种环是为了杀死接种环上残留的菌种，避免细菌污染环境和感染操作者。

（4）稀释涂布平板法是将菌液进行一系列的梯度稀释，然后使用接种涂布器将不同稀释度的菌液分别涂布到琼脂固体培养基的表面，进行培养。

（5）平板划线法和稀释涂布平板法分别通过连续划线、梯度稀释操作，目的是：将聚集在一起的菌体逐步稀释分散成单个菌体。

6、菌种的保存。对于频繁使用的菌种，我们可以采用临时保藏的方法。首先，将菌种接种到试管的固体斜面培养基上，在合适的温度下培养。当菌落长成后，将试管放入**4℃的冰箱**中保藏。对于需要长期保存的菌种，可以采用**甘油管藏**的方法。1 mL甘油后灭菌后与1 mL培养的菌液充分混匀后，放在**-20℃的冷冻箱**中保存。

**课题二 土壤中分解尿素的细菌的分离与计数**

1、土壤中的细菌之所以能分解尿素，是因为他们能合成脲酶。

2、微生物的筛选应用的原理：人为提供有利于目的菌株生长的条件（包括营养、温度、PH等》同时抑制或阻止其他微生物生长。

3、测定微生物数量（计数）的常用方法：**稀释涂布平板法**。依据：当**样品的稀释度足够高**时，培养基表面生长的一个菌落，来源于样品稀释液中的一个菌体。（①一般设置3～5个平板；②选择菌落数在30-300的平板进行计数，并取平均值；③统计的菌落数往往比活菌的实际数目**低**，（因为有**2个或2个以上相连的菌体长成同一个菌落）**。因此，④统计结果一般用菌落数而不是用活菌数来表示。）和**显微镜直接计数法**（原因：不能区分死细胞或活细胞，统计的菌落数往往比活菌的实际数目**高**）、滤膜法。

稀释涂布平板法计算公式：每克样品中的菌落数＝**（C/V）M**其中，C代表某一稀释度下平板上生长的平均菌落数，V代表涂布平板时所用的稀释液的体积（mL），M代表稀释倍数。

4、菌落特征：菌落有**形状、大小、隆起程度、颜色**等特征。

5、鉴定方法：在**以尿素为唯一氮源**的培养基中加入**酚红指示剂**，培养某种细菌后，指示剂变红（细菌合成的脲酶将尿素分解成氨，pH升高）则可初步鉴定该种细菌能分解尿素。

6、大肠杆菌鉴定方法：在伊红美蓝培养基上培养，大肠杆菌的菌落呈现黑色。

**7、**设置对照

（1）对照实验是指除了**被测试的条件**以外，其他条件都相同的实验，其作用是比照实验组，**排除任何其他可能原因的干扰**，证明**确实是所测试的条件引起相应的结果**。

（2）设置对照的目的是**排除实验组中非测试因素对实验结果的影响**，提高实验结果的**可信度**。

（3）例：设计实验，判断所配制的选择培养基是否起到了选择作用。写出实验设计方案。

答：设置牛肉膏蛋白胨培养基的对照组，接种相同的菌液，观察菌落的生长情况。如果在牛肉膏蛋白胨培养基上生长的菌落数目应明显多于选择培养基上的数目，该选择培养基起到了选择作用，否则，没有起到选择作用。

8、试题优选

（1）判断样品的某一稀释度的稀释操作是否成功的依据是什么？

答：是否获得了某一稀释度下，菌落数目在30～300的平板。在这一稀释度下，是否至少有两个平板的菌落数相接近。

（2）A同学的相同稀释度培养的计数结果与其他多数同学的相差太大，该同学分析操作失败的原因，认为是培养基被杂菌污染了造成的。请写出验证这一假说的实验设计方案？

答：将A同学配制的培养基在不加土样的情况下进行培养，作为空白对照，观察培养基上菌落的生长情况。如果对照组有菌落生长，证明培养基受到污染；否则，证明培养基没有受到污染。

（3）本实验使用的平板和试管比较多，为避免混淆，最好在使用前就**做好标记**。

**课题三 分解纤维素的微生物的分离**

1、纤维素酶是一种**复合酶**，包括C1酶、CX酶和葡萄糖苷酶，前两种使纤维素分解成纤维二糖，第三种将纤维二糖分解成葡萄糖。

2、筛选方法­——**刚果红（CR）染色法**。其原理是：刚果红可以与纤维素形成**红色复合物**，当纤维素被**纤维素酶**分解后，红色复合物无法形成，培养基中会出现**以纤维素分解菌为中心的透明圈**，我们就可以通过是否产生透明圈来筛选纤维素分解菌。

3、分离分解纤维素的微生物的实验流程

土壤取样 **选择培养**（此步可省略。目的是**增加纤维素分解菌的浓度**。） **梯度稀释** 将样品**涂布**到鉴别纤维素分解菌的培养基上 挑选产生透明圈的菌落

（1）在什么样的环境取样? 为什么要在富含纤维素的环境中寻找纤维素分解菌？

（选择富含纤维素的环境。根据生物与环境的互相依存关系，在富含纤维素的环境中纤维素分解菌的含量相对提高。）

（2）将滤纸埋在土壤中有什么作用？（人工设置适宜环境，使纤维素分解菌相对聚集。）

（3）选择培养的目的是什么?

（通过选择培养**增加纤维素分解菌的浓度**，以确保能够从样品中分离到所需要的微生物。）

（4）纤维素分解菌的筛选实验，能否**设计一个对照实验**，说明选择培养的作用？

答：增加设置一组不含纤维素粉与实验组相同的液体培养基的对照组，接种相同的菌液，在相同的条件下培养相同的时间，都进行梯度稀释并将等量样品涂布在鉴别纤维素分解菌的培养基上，观察和记录相同稀释度的培养基中产生透明圈的菌落的数目。如果对照组的产生透明圈的菌落数目明显少于实验组，该选择培养起到了增加纤维素分解菌浓度的作用，如果两组相差不大，则该选择培养不起作用。

（5）本实验流程与课题2中的实验流程有哪些异同？

（增加了选择培养，不需要进行菌落计数。）

4、用刚果红（CR）染色法筛选得到的产生透明圈的菌落就一定是纤维素分解菌吗？

（不一定。产生淀粉酶的微生物也产生模糊透明圈，有些微生物能降解色素，形成明显的透明圈**。）**

5、为了确定分离得到的是纤维素分解菌，还需要进行**发酵产纤维素酶**实验，纤维素酶测定方法是对纤维素酶分解滤纸等纤维素所产生的**葡萄糖**含量进行定量测定。

**专题四 酶的研究与应用**

**课题1 果胶酶在果汁生产中的作用**

1、果胶和果胶酶。

（1）果胶对果汁制作的影响：影响果汁的出汁率，还会使果汁浑浊。

（2）果胶酶的种类：果胶酶并不特指某一种酶，而是分解果胶的一类酶的总称，包括**多聚半乳糖醛酸酶**、**果胶分解酶**和**果胶酯酶**等。

（3）果胶酶的作用：①能够分解果胶，瓦解植物的细胞壁及胞间层，能**提高果汁的出汁率**；②而果胶分解成可溶性的半乳糖醛酸，使得**浑浊的果汁变得澄清**。

（4）植物、**霉菌、酵母菌**和细菌均能产生果胶酶。由**霉菌发酵生产的果胶酶**是食品加工业中使用量最大的酶制剂之一。

**2、 探究温度和pH对酶活性的影响**

* 实验设计思路：**通过设置梯度来确定最适值**。

（1）自变量的处理方法：设置**一系列的温度梯度**或**PH梯度**的对照实验。

（2）因变量的检测方法：**苹果汁的体积**或**果汁的澄清度**。

（3）为什么在混合苹果泥和果胶酶之前，**要将果泥和果胶酶分装在不同的试管中恒温处理**？用什么方法进行恒温处理？

答：保证果泥与果胶酶混合时温度相同，避免混合时影响混合物的温度，从而影响果胶酶活性。

**水浴加热**。

（4）在探究温度或pH对酶活性的影响时，是否需要设置对照？如果需要，又应该如何设置？为什么？

答：需要。不同的温度或pH之间，就可以作为对照——这种对照称为相互对照。

（5）为使果胶酶能够够充分催化反应，应**用玻璃棒不时地搅拌反应混合物。**

**3、探究果胶酶的用量**

（1）实验变量：为**酶的用量**。你打算如何设置酶用量的梯度呢？（同体积不同浓度的酶或不同体积相同浓度的酶。）

（2）因变量：**苹果汁的体积**或**果汁的澄清度**。

（3）实验结果和结论：随着酶的用量增加，过滤到的果汁的体积也增加，说明**酶的用量不足**；当酶的用量增加到某个值后，再增加酶的用量，过滤到的果汁的体积不再改变，说明**这个值就是酶的最适用量**。

**课题2探究加酶洗衣粉的洗涤效果**

（一）加酶洗衣粉

1、定义：加酶洗衣粉是指含有**酶制剂**的洗衣粉。

2、常用的酶制剂有四类：蛋白酶、脂肪酶、淀粉酶和纤维素酶。其中，应用最广泛、效果最明显的是**碱性蛋白酶**和**碱性脂肪酶**。

3、衣服有油渍、血渍的衣服很难洗干净，你是如何解决这个问题的？为什么？

答：使用加酶洗衣粉。酶具有高效性，**碱性蛋白酶**能迅速将血渍、奶渍等含有的大分子蛋白质分解成可溶性小分子肽和氨基酸。

（二）影响酶活性的因素：温度、酸碱度和**表面活性剂**都会影响酶的活性。

1、能否将酶直接添加到洗衣粉中？如何解决这个难题？

答：不能，因为洗衣粉中的表面活性物质会降低酶的活性。酶制剂的特点能够**耐酸、耐碱、忍受表面活性剂和较高的温度**，并且通过**特殊的化学物质**将酶包裹，与洗衣粉其他成分隔离。

2、在环保方面，与普通洗衣粉相比，使用加酶洗衣粉有什么优点？

答：加酶洗衣粉可以**降低表面活性剂和三聚磷酸钠的用量**，使洗涤剂朝**低磷、无磷**的方向发展。

**（三）实验设计**

1、探究普通洗衣粉和加酶洗衣粉对衣物污渍的洗涤效果有什么不同；

（1）自变量：洗衣粉的类型。

（2）因变量：**污渍的残留程度**。

2、探究在什么样的温度下使用加酶洗衣粉效果最好；

（1）自变量：温度。

（2）因变量：污渍的残留程度。

（3）实验原理：酶的催化活性受温度影响，在适宜温度下酶的催化活性最高，温度过低或过高酶的催化能力降低。

3、探究添加不同种类的酶的洗衣粉，其洗涤效果有哪些区别。

（1）自变量：**不同类型的酶+相同的污渍物**或**不同的污渍物+相同种类的酶**。

对照实验：**设置加普通洗衣粉的对照组，观察污渍物的残留程度**。

（2）因变量：**污渍的残留程度**。

**课题3酵母细胞的固定化**

1、解决在应用酶的过程中遇到的问题的方案是什么？有何优点？

答：将酶固定在**不溶于水的载体**上，使酶既能**与反应物接触**，又能**与产物分离**，同时，固定在载体上的酶还可以**被反复利用**。

**2、固定化酶的应用实例----**高果糖浆的生产

（1）高果糖浆的生产原理：用**葡萄糖异构酶**，将葡萄糖转化成果糖。

（2）生产中遇到的问题：这种酶无法从糖浆中回收，造成很大的浪费。如何解决这一问题？（使用**固定化酶**技术。）

**3、**固定化酶和固定化细胞技术的常用方法：包括**包埋法**、**化学结合法**和**物理吸附法**（图4-6）。

4、一般来说，固定化酶更适合采用什么方法？而固定化细胞多采用什么方法？为什么？

答：固定化酶更适合采用**化学结合法和物理吸附法**，因为酶分子很小，容易从包埋材料中漏出；固定化细胞多采用**包埋法**，因为细胞体积大，难以被吸附或结合。

5、与固定化酶相比较，固定化细胞有哪些优点或特点？

答：固定化细胞操作更容易；对酶活性的影响更小；固定的不是一种酶而是一系列酶；适于催化连续的酶反应；

6、如果反应物是大分子物质，又应该采用哪种方法？（**固定化酶技术**。）

7、包埋法常用的多孔性载体有明胶、**琼脂糖**、**海藻酸钠**、醋酸纤维素和**聚丙烯酰胺**等。

**8、**制备固定化酵母细胞的实验操作流程：

酵母细胞的活化 配制物质的量浓度为0.05mol/L的CaCl2溶液 配制海藻酸钠溶液 海藻酸钠溶液与酵母细胞混合 固定化酵母细胞

（1）酵母细胞的活化用什么方法？目的是什么？

答：加入蒸馏水。在缺水状态下，微生物处于休眠状态。活化就是让处于休眠状态的微生物重新恢复正常的生活状态。

（2）CaCl2溶液的作用是什么？

答：**使海藻酸钠溶液与酵母细胞的混合液形成凝胶珠**。

（3）海藻酸钠的作用？注意，加热时**要用小火**，或者间断加热，反复几次。为什么？

答：**作为载体包埋酵母细胞**。促进海藻酸钠溶解，如果加热太快，海藻酸钠会发生焦糊。

（4）将溶化好的海藻酸钠溶液冷却至室温，加入已活化的酵母细胞，进行充分搅拌。为什么？答：冷却防止杀死酵母细胞，搅拌使其混合均匀。

（5）如何判断固定化酵母细胞是否操作成功？

答：（1）通过观察凝胶珠的**颜色和形状**判断。凝胶珠呈圆形或椭圆形、颜色不能浅，说明操作成功。（2）用手挤压，凝胶珠不容易破裂；用力摔打，凝胶珠很容易弹起，表明制备的凝胶珠是成功的。

**专题五 课题3 血红蛋白的提取和分离**

1、蛋白质提取与分离的原理是什么？

答：依据蛋白质各种特性的差异，如**分子的形状和大小**、**所带电荷的性质和多少**、溶解度、吸附性质和对其他分子的亲和力，等等，可以用来分离不同种类的蛋白质。

2、凝胶色谱法：也称做分配色谱法，是根据**相对分子质量的大小**分离蛋白质的有效方法。

2、凝胶：（1）化学本质：大多数是由**多糖类化合物**构成的，如葡聚糖或**琼脂糖**。

（2）特性：实际上是一些微小的多孔球体，在小球体内部有许多**贯穿的通道**。

3、凝胶色谱法原理：当相对分子质量不同的蛋白质通过凝胶时，**相对分子质量较小的蛋白质**容易进入**凝胶内部的通道**，路程较**长**，移动速度较**慢；**而**相对分子质量较大的蛋白质**无法进入**凝胶内部的通道**，只能在**凝胶外部**移动，路程较**短**，移动速度较**快**。相对分子质量不同的蛋白质分子因此得以分离（图5-13）。

4、缓冲溶液通常由**1~2种缓冲剂**溶解于水中配制而成。在一定范围内，缓冲溶液能够抵制**外界的酸和碱**对溶液pH的影响，维持pH**基本不变**。如H2CO3/NaHCO3，NaH2PO4/Na2HPO4等。

5、**调节缓冲剂的使用比例**就可以制得在不同pH范围内使用的缓冲液。

6、电泳是指**带电粒子**在电场的作用下发生迁移的过程。

7、电泳的原理：①许多重要的生物大分子，如多肽、核酸等都具有**可解离的基团**，在一定的pH下，这些基团会带上**正电或负电**。②在电场的作用下，这些带电分子会向着**与其所带电荷相反**的电极移动。③电泳利用了待分离样品中各种分子**带电性质的差异以及分子本身的大小、形状**的不同，使带电分子产生不同的迁移速度，从而实现样品中各种分子的分离。

3、电泳类型：琼脂糖凝胶电泳 迁移率取决于它**所带净电荷的多少以及分子的大小、**

聚丙烯酰胺凝胶电泳 **形状**。

SDS—聚丙稀酰胺凝胶电泳。迁移率完全取决于**分子的大小**。应用：测定蛋白质分子量、进行**蛋白质纯度鉴定**。

4、**琼脂糖凝胶电泳**和**聚丙烯酰胺凝胶电泳**是两种常用的电泳方法，在测定蛋白质分子量时通常使用**SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳**。

5、原理：为了**消除净电荷对迁移率的影响**，可以在凝胶中加入SDS。SDS能使蛋白质发生**完全变性**。由几条肽链组成的蛋白质复合体在SDS的作用下会**解聚成单条肽链**，因此测定的结果只是**单条肽链**的分子量。 SDS能与各种蛋白质形成蛋白质-SDS复合物，SDS所带负电荷的量**大大超过了**蛋白质分子原有的电荷量，因而掩盖了不同种蛋白质间的电荷差别，使电泳迁移率完全取决于**分子的大小**。

6、蛋白质的提取和分离一般分为四步：**样品处理**、**粗分离**、**纯化**和**纯度鉴定**。

7、样品处理包括**红细胞的洗涤**、**血红蛋白的释放**和**分离血红蛋白溶液**。

**（1）红细胞的洗涤**

1）洗涤红细胞的目的是什么？（**去除杂蛋白**。）

2）用什么方法分离红细胞？（**低速短时间离心**）

3）洗涤液是什么？（加入五倍体积的生理盐水洗涤，如此重复洗涤三次）

4）怎么判断是否洗涤干净？（直至**上清液不再呈现黄色**，表明红细胞已洗涤干净。）

5）操作提示：注意**控制洗涤次数、离心速度与离心时间**。（原因：洗涤次数过少，无法除去血浆蛋白；离心速度过高和时间过长会使白细胞等一同沉淀，达不到分离的效果。）

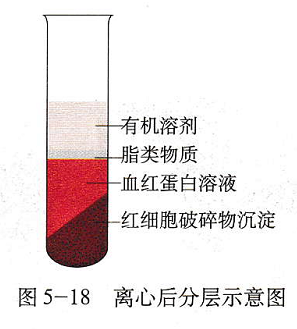
6）洗涤液为什么用生理盐水？（原因：维持红细胞正常的形态和功能。）

**（2）血红蛋白的释放**

用什么方法让**血红蛋白释放**？原理是什么？

答：**蒸馏水+40%体积的甲苯**。在蒸馏水中红细胞吸水胀破，甲苯能溶解细胞膜。

**（3）分离血红蛋白溶液**

1）用什么方法分离血红蛋白溶液？结果是什么？

答：2000r/min的速度离心10min。试管中的溶液分为4层，从上往下数，第1层为无色透明的**甲苯层**，第2层为白色薄层固体，是**脂溶性物质**的沉淀层，第3层是红色透明液体，这是**血红蛋白**的水溶液，第4层是**其他杂质**的暗红色沉淀物。

2）如何除去脂溶性沉淀层？（将试管中的液体**用滤纸过滤**，除去脂溶性沉淀层。）

3）用什么方法分离甲苯层与血红蛋白溶液？（**用分液漏斗中静置**片刻，分出下层的红色透明液体。）

**8、透析**（**粗分离**）

（1）透析液是什么？（20 mmol/L的磷酸缓冲液。）

（2）透析的目的是什么？（透析可以**去除样品中分子量较小的杂质**，**粗分离血红蛋白**，或用于**更换样品的缓冲液**。）

**9、纯化（分离）方法----凝胶色谱法。**

（1）本实验使用的凝胶是**交联葡聚糖凝胶G-75**。“G”表示**凝胶的交联程度，膨胀程度及分离范围**，75表示**凝胶得水值**，即每克凝胶膨胀时吸水7.5 g。

（2）**凝胶色谱柱的装填**操作提示：

1）凝胶的装填要紧密、均匀。如何做到？

①凝胶悬浮液**一次性缓慢倒入**色谱柱内，

②装填时可**轻轻敲动色谱柱**，使凝胶装填均匀。

③装填完后，用**20 mmol/L的磷酸缓冲液**充分**洗涤平衡凝胶**12 h，使凝胶装填紧密。

2）注意色谱柱内不能有气泡存在。为什么？

答：**气泡会搅乱洗脱液中蛋白质的洗脱次序，降低分离效果**。

3）将加入洗脱液的湿凝胶用沸水浴加热的作用是什么？

答：这种方法不但节约时间，而且可以除去凝胶中可能带有的微生物，排除胶粒内的空气。

**（3）样品的加入和洗脱**

1）**样品的加入**操作提示：**注意不要破坏凝胶面**。如何操作？

加样前，打开色谱柱下端的流出口，使柱内凝胶面上的缓冲液缓慢下降到与凝胶面**平齐**，关闭出口。加样时，要**贴着管壁**加样，吸管管口要沿管壁**环绕**移动。

2）加**20 mmol/L的磷酸缓冲液**进行洗脱。

**（4）蛋白质的分离。**

office6\wpsassist\cache\A000220150821A09PPIC本实验的因变量的观察指标是什么？怎样的实验结果能说明色谱柱制作成功？

答：观察**红色区带在洗脱过程中的移动情况**。如果**红色区带均匀一致地移动**，说明色谱柱制作成功。

**10、纯度鉴定----SDS—聚丙烯酰胺凝胶电泳**

判断纯化的蛋白质是否达到要求，需要进行**蛋白质纯度的鉴定**。在鉴定的方法中，使用最多的是**SDS—聚丙烯酰胺凝胶电泳**。

* 为防止血液凝固，在采血容器中要预先加入抗凝血剂**柠檬酸钠**，比例是每100mL血液加入3.0g柠檬酸钠。

**专题六 植物有效成分的提取**

**课题一 植物芳香油的提取**

1、天然香料的来源：植物、动物（麝、灵猫、海狸、抹香鲸）、真菌

2、芳香油的提取方法：**蒸馏、压榨、萃取**等。

3、水蒸气蒸馏法：（玫瑰精油）

（1）原理：**水蒸汽可将挥发性较强的芳香油携带出来**形成油水混合物，冷却后水油分层。

（2）实验流程：

采集玫瑰花（盛花期），清水清洗沥干 **水蒸气蒸馏**（**花：水1：4**） 油水混合物

NaCL 分离油层 无水NaSO4 **除水** 过滤 玫瑰油

（3）氯化钠作用：**增加盐的浓度，使油水混合物分层**，分离油层用具：分液漏斗

（4）无水硫酸钠：吸收油层中的水分。

（5）不足：有些原料不适宜于水中蒸馏，如柑橘、柠檬。因为**原料易焦糊，有效成分易水解**。（也是判断能否用水蒸汽蒸馏法提取的依据。）

4、萃取法：

原理：**芳香油易溶于有机溶剂，溶剂挥发后**得到芳香油。萃取剂：如**石油醚**、酒精、乙醚等。

不足：**有机溶剂中的杂质**会影响芳香油的品质。

5、压榨法（橘皮精油）

橘皮精油：无色，主要成分**柠檬烯**，主要分布在橘皮中。

流程：**石灰水浸泡**一漂洗一压榨一过滤一静置一再次过滤一橘皮油

（1）石灰水：**防止压榨时滑脱，提高出油率；降低压榨液黏稠度，**过滤不堵塞筛眼。

（2）小苏打、硫酸钠：促进油和水的分离（用量分别为橘皮质量的**0．25％和5％**）

**课题二 胡萝卜素的提取**

1、胡萝卜素

（1）性质：是橘黄色结晶，化学性质**比较稳定**，不溶于水，微溶于乙醇，**易溶于石油醚等有机溶剂**。

（3）用途：①治疗因**缺乏维生素A**而引起的各种疾病，如**夜盲症**、幼儿生长发育不良、干皮症等。②胡萝卜素还是常用的**食品色素**，广泛地用作食品、饮料、饲料的添加剂。③天然胡萝卜素还具有**使癌变细胞恢复成正常细胞**的作用。

3、为什么服用β-胡萝卜素能治疗夜盲症？（原因：一分子的β-胡萝卜素在人或动物的小肠、肝脏等器官被氧化成两分子的维生素A。）

4、炒胡萝卜时要多加些油。（因为胡萝卜素会溶解在油中，溶解的胡萝卜素容易被人体吸收。）

5、工业生产上，提取天然β-胡萝卜素的方法主要有三种，一是从植物中提取，二是从大面积养殖的岩藻（如螺旋藻）中获得，三是利用微生物（如三孢布拉霉菌）的发酵生产。

6、实验流程：粉碎 干燥 萃取 过滤 浓缩。

7、**操作提示**

① 萃取前，为什么要将胡萝卜进行粉碎和干燥？

（原因：含水量少，原料颗粒小，需要提取的物质就能够充分溶解，萃取效果就好。）

② 干燥时要注意控制温度和时间。为什么？

（原因：温度太高，干燥时间太长会导致胡萝卜素分解。）

③ 萃取：

1）萃取的目的：**使胡萝卜素充分溶解在有机溶剂中**。

2）萃取剂的选择：具有**较高的沸点**，**能够充分溶解胡萝卜素**，并且**不与水混溶**。

此外，还需要考虑**有机溶剂是否能从产品中完全除去**、会不会影响产品质量等问题。

①乙醇和丙酮能够用于胡萝卜素的萃取吗？为什么？

答：不能。萃取胡萝卜素的有机溶剂应不与水混溶，而乙醇和丙酮为水溶性有机溶剂。

②在石油醚、醋酸乙醋、乙醚、苯和四氯化碳这几种有机溶剂中，哪种最适宜用来提取胡萝卜素？写出选择的实验方案。

答：先用这几种有机溶剂进行萃取实验，再从中选择出萃取效果最好的有机溶剂。

③为什么**选用石油醚**做**萃取剂**萃取胡萝卜素效果最好？

（因为**石油醚是水不溶性有机溶剂，胡萝卜素易溶于石油醚等有机溶剂**。**沸点在90-120℃之间，远远低于胡萝卜素的沸点，加热时石油醚首先被蒸馏出去，有利于浓缩**。）

3）**影响萃取的因素**

萃取的效率主要取决于**萃取剂的性质和使用量**，同时还受到原料**颗拉的大小**、**萃取的温度和时间**等条件的影响。（原因：一般来说，原料**颗粒小**，萃取**温度高，时间长**，需要提取的物质就能够充分溶解，萃取效果就好。）

4）装置：水浴锅；在加热口安装冷凝装置。

① 为什么不明火加热，而用水浴加热？

（因为**有机溶剂都是易燃物，直接使用明火加热容易引起燃烧爆炸**。）

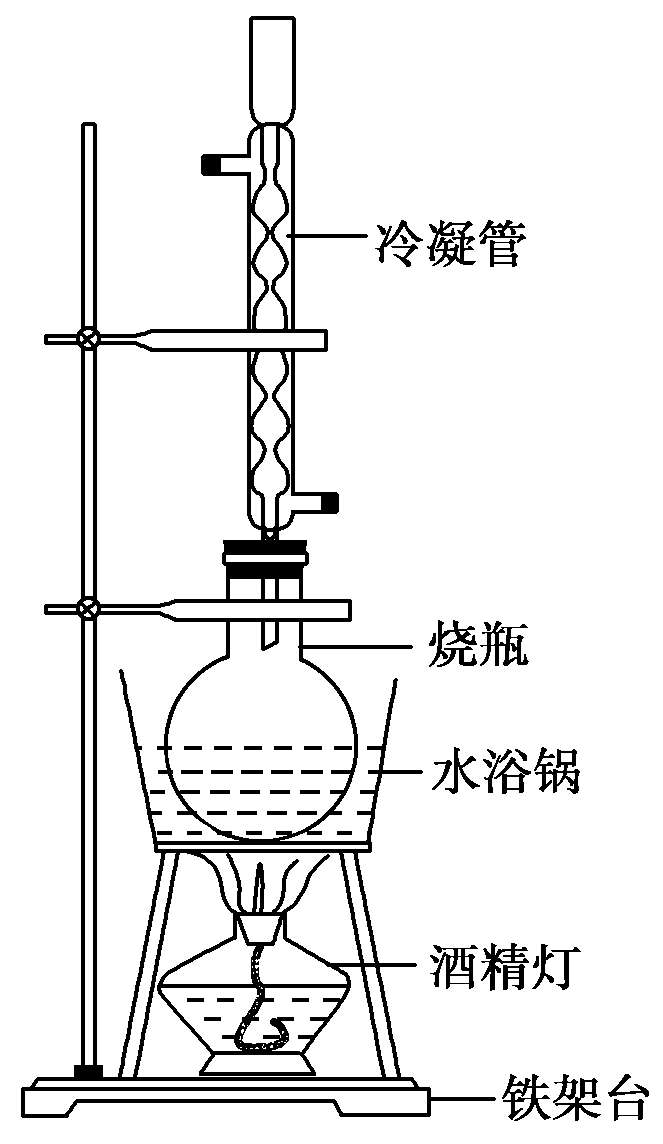
② 为什么要在加热口加装冷凝管？（**防止有机溶剂挥发**。）

④ 过滤：**除去萃取液中的不溶物。**

⑤ 浓缩：1）浓缩的目的：**将石油醚和胡萝卜素分开**。

2）用什么装置进行浓缩？（**使用蒸馏装置**）。

3）结果：蒸馏出来的是**有机溶剂**（如石油醚），留在烧瓶中的是**胡萝卜素提取液**。

萃取装置 浓缩装置

* 萃取回流和浓缩蒸馏时要注意操作安全。

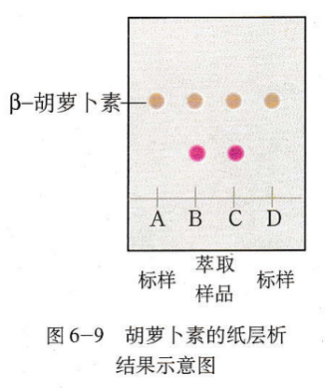
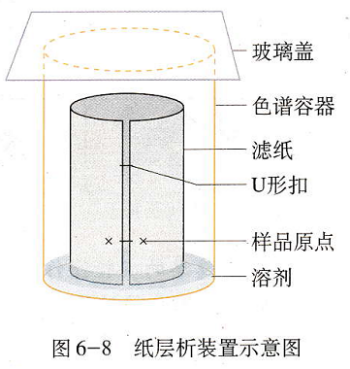
8、胡萝卜素粗品鉴定

（1）方法：**纸层析法**。

（2）原理：利用色素在层析液中的**溶解度**不同,随着层析液**在滤纸上的扩散速度不同**，将它们分离开来。

（3）步骤：做基线 **对照点样** 干燥层析 对比观察。

* 点样应该快速细致，点样后会在基线上形成细小的圆点，注意保持滤纸干燥。

AD**标准样品**BC**提取样品** 

A B C D

基线

2cm

（4）结果：是否出现对应的色素带。

①如果萃取样品中出现了和**标准样品一样的层析带**，说明提取胡萝卜素的实验成功。

②如果在滤纸上出现**多个不同高度的色素点**，则说明提取到的胡萝卜素含杂质。由于提取物中含有杂质,萃取样品的**颜色可能比标准样品的颜色浅**,所以也可以通过颜色的比较，初步确定提取的胡萝卜素的量。