

酶工程综合性实验项目的设计与实践

黄九九

(华南农业大学生命科学学院,广东广州 510642)

摘要 酶工程实验作为生物技术的主要课程之一,具有很强的实用性和应用性。本课程的目的是锻炼学生运用酶知识和技术解决问题。为此,设计了一个综合性实验项目——木瓜蛋白酶反应器的设计及应用,将酶的制备、酶学性质分析、酶的修饰固定、酶反应器的设计及应用等知识点进行整合,选取南方特征水果木瓜为实验对象,包括木瓜蛋白酶的制备、木瓜蛋白酶活力的测定、激活剂对木瓜蛋白酶活力的影响、壳聚糖凝胶颗粒固定化木瓜蛋白酶、酶反应器设计及酪蛋白水解物的制备等6个部分。这项实验可以培养学生综合运用酶学知识和实验技能解决问题的能力。

关键词 酶工程;综合性实验;课程建设

中图分类号 G642 文献标识码 A

文章编号 1007-5739(2020)03-0247-04



开放科学(资源服务)标识码(OSID)

Design and Practice of Comprehensive Experiment Project of Enzyme Engineering

HUANG Jiu-jiu

(College of Life Sciences, South-China of Agricultural University, Guangzhou Guangdong 510642)

Abstract As one of the main courses of Biotechnology, experiment of enzyme engineering has strong practicality and application. The aim of this course is to train students to solve problems with enzyme knowledge and technique. This paper introduced a comprehensive experiment; the design and application of papain enzyme reactor. This project integrated the processes of enzyme preparation, enzyme properties analysis, enzyme modification and immobilization, and the design and application of enzyme reactor, etc. This experiment selected papaya, a southern characteristic fruit, as the research object. It contained six sections; the preparation of papain, the determination of papain activity, the effect of activator on papain activity, the immobilized papain with chitosan gel particles, the design of enzyme reactor and the preparation of casein hydrolysates. Students' way of thinking and experiment skills in enzyme research can be fostered by this comprehensive experiment.

Key words enzyme engineering; comprehensive experiment; course construction

现代生物技术是利用各种特定生物系统进行高效而经济的物质、能量或信号转化的现代复合技术体系,包括基因工程、蛋白质工程、细胞工程、酶工程和微生物工程等^[1]。酶工程指的是在包含细胞、细胞器和酶等元素的特定生物反应器内,利用酶元素特定生物催化活性,将原料催化转化为目标产物并用于社会生产的一门科学技术。

随着生物技术的发展,特别是酶学研究迅速发展、酶制剂的生产和应用推广,酶的应用涉及到社会生产的方方面面,因而急需理论基础扎实和实践经验丰富的人才^[2-3]。酶工程实验课程已成为高等院校生物技术、生物工程、生物制药、生物科学、食品科学等专业的主干课程,熟练掌握酶工程所涉及的实验技术对于生物技术人才的培养日显重要^[4-5]。

1 综合性实验在酶工程实验教学中的必要性

酶工程是以实验为基础的学科,实验教学在酶工程教学中的地位不言而喻^[6]。实验教学是提高学生综合素质能力的关键途径,不仅能进一步巩固课上所学的理论知识而且能培养学生积极思考及动手能力。

目前,用于高校实验课堂教学的实验主要分为基础性、验证性实验和综合性、设计性实验两大类。其中,基础性、验证性实验“教师容易教、学生容易学”,学生只需要按照实验指导书上的步骤按部就班地完成相关实验操作即可,而且具有实验准备简单、实验消耗小等特点,因而这类实验十分受学校、教师、学生的欢迎,其授课学时往往占据了各门类实验授课的大部分学时。这类实验有夯实基础、训练基本实验技能的作用,但对于酶工程这类较为专业的课程来说,这

样的设置不仅不利于提高学生分析、解决问题的能力,同时限制了学生的思维,极易产生思维惰性,不利于学生积极独立思考和主观能动性的发挥^[7]。因此,应增加设计型、复合型实验。此类实验为复合型实验,由本课程多个知识点综合而成,特别强调实验的系统性、连贯性和整体性,是综合训练学生技能、提高学生整体认知的主要途径^[8]。

酶工程课程教学的主要内容包括酶的生产、酶的分离纯化、酶与细胞的固定化、酶的修饰、酶的催化、酶反应器与酶传感器、酶基因改造、新酶的开发等内容(图1),相应的实验教学内容包括酶源的筛选、酶的分离、酶的纯化、酶活测定、酶学性质分析、酶的固定化、酶的化学修饰、酶的应用等。受限于学时安排和实验教学实施条件,许多高校在实施酶工程实验教学中选取其中部分单元,并且各个单元分别设计一个独立实验进行教学,例如,某大学针对生物工程专业开设的酶工程实验课的实验项目中,“酶的生产”用的是淀粉酶,“酶的分离制备和活力测定”用的是大豆脲酶,“酶与细胞的固定化用”的是蛋白酶,“酶的应用”讲的又是果胶酶。虽然这样的实验项目也基本涵盖了主要教学内容,但各个实验之间缺乏关联性、系统性,学生获得的知识是单元化、碎片化的,学生修读完后,对酶工程的教学内容仍然十分迷惑,无法将学到实验技术活学活用。如果将原本单元化独立化的实验进行整合,形成一个综合性实验,不仅有利于学生对酶工程知识能有一个全局性的把握,而且能够使得学生深入理解并掌握内部各个单元实验的关联性,进一步发挥酶工程实验教学在培养应用型、创新型人才方面的作用^[9]。

2 综合性实验的内容

根据实验内容的关联性和多年的教学经验,围绕酶工程的主要知识点,选取南方特征水果木瓜为实验对象,将酶的

作者简介 黄九九(1980-),男,湖南平江人,博士,高级实验师。研究方向:药物转运蛋白与酶工程。

收稿日期 2019-10-28

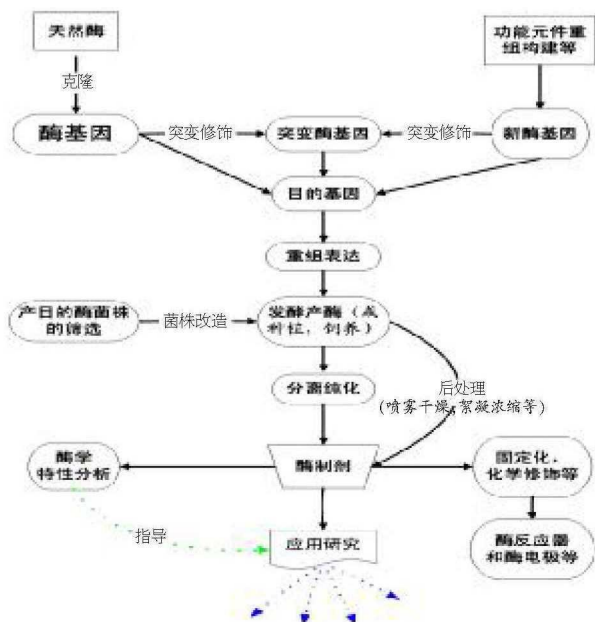


图1 酶工程理论课主要教学内容

制备、酶学性质分析、酶的修饰固定、酶反应器的设计及应用等知识点进行整合,行成了综合性实验项目——木瓜蛋白酶反应器的设计及应用,内容包括木瓜蛋白酶的制备、木瓜蛋白酶活力的测定、激活剂对木瓜蛋白酶活力的影响、壳聚糖凝胶颗粒固定化木瓜蛋白酶、酶反应器设计及酪蛋白水解物的制备等6个部分(图2)。

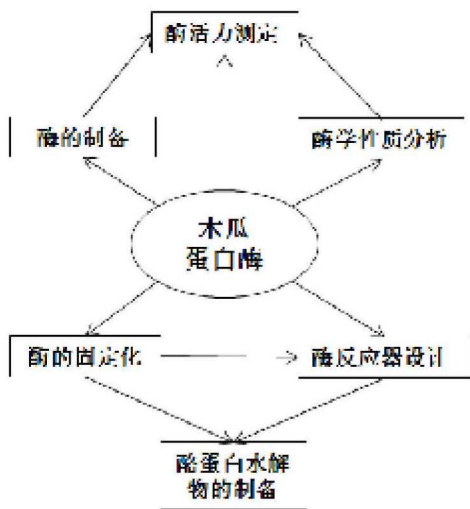


图2 综合性实验项目的主要内容

2.1 木瓜蛋白酶的制备

实验操作内容:选取已经谢花坐果达到2个月以上的木瓜并用湿棉布擦拭表面至干净无痕,采用牙签在其表面划出深度达到1~2 mm的划痕,采用培养皿收集流出的白色汁液,凝固后称量获得汁液的重量,将凝固物转移至研钵中,加入适量浓度为0.1 mol/L磷酸钠缓冲液(pH值7.2)充分研磨,之后按10 000 r/min转速离心10 min,获得上清液体。所得上清即为木瓜蛋白酶粗酶。

涉及的实验原理和方法:木瓜又名番木瓜(*Chaenomeles sinensis*),多年生常绿大型草本植物,生长在南、北纬32°之间,为南方常见水果,木瓜汁液中存在大量的木瓜蛋白酶^[10]。

通过本实验让学生学习和掌握植物酶源的选取、采集和粗酶制备等方面的基本原理和方法。

2.2 木瓜蛋白酶活力测定

实验操作内容:取上述提取得到的粗酶液0.1 mL,加入1.9 mL激活剂溶液,35℃水浴预热10 min,加入1 mL 1%酪蛋白溶液,混匀,35℃水浴反应10 min,加1 mL 10% TCA终止反应,过滤,测定滤液的OD_{275nm}值,以先加1 mL 10% TCA的样品为对照,定义在当前测定条件下,使测定体系在275 nm波长下的吸光度每1 min增加0.01所需的酶量为1个酶活力单位(U)。涉及的实验原理和方法:酪蛋白是一种蛋白质,它被木瓜蛋白酶降解生成的酪氨酸在紫外光区275 nm处有吸收峰,根据测定275 nm处的吸收值,可以判定木瓜蛋白酶的酶活力。通过本实验让学生学习和掌握蛋白酶的测定方法、原理和酶活力单位的定义方法。

2.3 酶学性质分析

实验操作内容:在上述酶活测定方法中,其他成分和步骤不变,激活剂中EDTA的浓度依次设置为0、0.5、1.0、2.0、4.0 mmol/L,测定木瓜蛋白酶的活力,以酶活力大小对EDTA浓度作曲线,分析EDTA对木瓜蛋白酶活性的影响;同样将激活剂中半胱氨酸的浓度依次设为0、5、10、20、40 mmol/L,测定木瓜蛋白酶的活力,以酶活力大小对半胱氨酸浓度作曲线,分析半胱氨酸对木瓜蛋白酶活性的影响。

涉及的实验原理和方法:木瓜蛋白酶的活性中心含有半胱氨酸,是一种巯基蛋白酶,当位于活性中心的Cys25被氧化剂氧化或与金属离子结合时,酶的活力被抑制,而还原剂半胱氨酸(或亚硫酸盐)或EDTA能恢复酶的活力^[11]。通过本实验让学生了解木瓜蛋白酶的结构特点、酶活测定的影响因素分析,并掌握酶学性质动力学曲线分析的实验设计和方法。

2.4 酶的固定化

实验操作内容:准确称取壳聚糖0.5 g,加入35 mL 1%冰醋酸溶液溶解,随后加入3.0 mL 37%甲醛混合均匀,水浴40℃条件下保温100 min,获得透明状凝胶,加入少量蒸馏水,并将其压碎,转移至研钵中研磨成适当大小的颗粒,加入含有100 mL蒸馏水的烧杯中,获得悬浊液,滴加2 mol/L NaOH溶液将pH值调节至8.0,静置10 min,抽滤并用蒸馏水洗涤颗粒多次。取上述制得的凝胶颗粒10 g,加入0.8%戊二醇40 mL,静置100 min,抽滤并用0.1 mol/L磷酸缓冲液(pH值7.2)洗涤3~4次,除去残留的戊二醇。将上述凝胶颗粒加入15 mL木瓜蛋白酶液中,在温度4℃下静置2 h,并多次搅拌分散,并用0.1 mol/L磷酸缓冲液(pH值7.2)洗涤3~4次凝胶颗粒以除去未固定化的木瓜蛋白酶(注意:收集洗液不要超过50 mL),即得固定化木瓜蛋白酶。

数据计算方法:依次测定溶液酶活力、残留酶活力、固定化酶活力,计算固定化酶的活力回收率和相对活力。计算公式如下:

$$\text{活力回收率}(\%) = \frac{\text{固定化酶总活力数}}{\text{溶液酶总活力数}} \times 100;$$

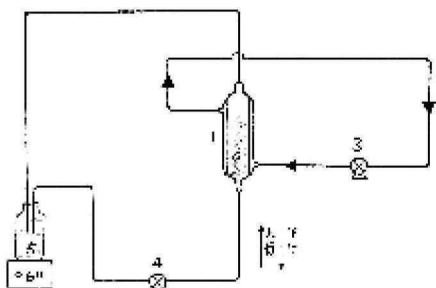
$$\text{相对活力}(\%) = \frac{\text{固定化酶总活力数}}{\text{溶液酶总活力数} - \text{残留酶活力数}} \times 100。$$

涉及的实验原理和方法:壳聚糖由甲壳素脱去分子中

的乙酰基转变而成,是一种无毒易得、生物降解性好且相容性好的天然高分子材料,因而被广泛用于固定化酶的载体。壳聚糖分子中的D-葡胺糖的氨基-NH₂与戊二醛醛基缩合,而戊二醛的另一个醛基与酶的游离氨基缩合,形成壳聚糖-戊二醛-酶结构,得到固定化酶^[12-13]。本实验带领学生学习以戊二醛为双功能试剂的载体交联法固定化木瓜蛋白酶原理和方法,掌握酶的固定化以及固定化效率的评价方法。

2.5 酶反应器的设计

实验操作内容:按图3所示连接好各反应器组件,并将上述实验制备的固定化木瓜蛋白酶装入玻璃反应柱内。



注:1为带外套的玻璃反应柱;2为固定化木瓜蛋白酶;3为超级循环恒温水浴;4为恒流泵;5为取样瓶;6为磁力搅拌器。

图3 固定化木瓜蛋白酶水解酪蛋白反应器组成

涉及的实验原理和方法:酶反应器是酶(包括游离酶、固定化酶或固定化细胞)在体外作为催化剂进行反应时所需的反应容器^[14]。酶反应器是酶工艺的中心环节,是原料到产品的纽带。通过本实验让学生学习了解酶反应器的基本原件、设计思路和组装过程,通过实验室模拟直观掌握酶在生产实践中的应用实例,激发学生学习酶工程、掌握酶工程实验技术的兴趣。

2.6 酪蛋白水解物的制备

实验操作内容:打开超级循环恒温水浴装置,将温度设定在35℃,在取样瓶中加入反应底物溶液150 mL(酪蛋白和激活剂),并打开恒流泵启动反应,计时;每隔5 min从取样瓶中抽取反应样品,分别测定反应过程中底物的减少和产物的增加以了解反应进程。其中,底物的减少以反应液中蛋白含量的减少来表示,其中蛋白含量的测定用考马斯亮兰G-250法,取50 μL的样品液加入2.5 mL的考马斯亮兰G-250溶液,摇匀,在595 nm波长下测定吸光度;产物的增加以反应物中酪氨酸和含酪氨酸的短肽的变化表示,测定方法为取2 mL的反应液加入2 mL 10% TCA混匀,过滤,取滤液测定OD_{275 nm}值。

涉及的实验原理和方法:蛋白水解物在食品、医药和日用化妆品等领域具有广泛的用途^[15],用蛋白酶水解各类蛋白是较常用的方法,应用酶反应器可以充分利用酶的催化特性,不仅可以降低成本,还可以提高生产效率。通过本实验让学生学习和了解酶在生产实践中的应用,切实体会酶催化反应和固定化的特点和优势,更加贴近生产应用实践。

3 综合性实验的教学过程

3.1 实验原理讲解

作为一个综合性实验,在课程开始讲解时要突出“综合”,首先要把整个实验的主线“酶的分离—酶活测定—酶学性质

分析—酶的固定化—酶反应器的设计—酶的应用(酪蛋白水解物的制备)”展示给学生,让学生对这个实验有个总体的把握;其次,综合性实验周期相对较长,涉及的知识点较多,对于实验原理解释,可以利用“实验等待”的时间进行,比如有关固定化的知识可以在处理壳聚糖时讲解,而酶反应器及应用的讲解则可以安排在酶固定化实验等待过程中进行;再次,综合性实验的讲解也要有艺术,是启发式、引导式的讲解,而不是填鸭式的“灌”,比如,在介绍木瓜蛋白酶的制备时可以先让学生回忆接触木瓜的经历,在酶反应器的设计时可以先让学生自己动手,然后结合各人组装的情况边纠正边讲解等。让学生带着问题想和学,引导学生积极思考、参与讨论,鼓励学生发现问题、分析问题和独立解决问题。

3.2 课堂实验操作

实验教学侧重培养的是学生的动手操作能力,让学生通过实践操作更好地理解理论和运用理论知识解决实际问题。首先,在时间安排上,系统的讲解不应超过实验学时的10%,应留更多的时间让学生动手操作。其次,综合性实验对学生的综合能力要求更高,实验过程遇到的问题更多、更复杂,因而实验过程中组成团队十分必要。以往的分组往往是按学号顺序进行,这样的分组方式往往达不到教学效果;在实践过程中发现,最优的组合方式是实验课前先和学习委员进行沟通,根据以前基础实验课的情况(比如上学期实验课的成绩)对学生进行分组,形成一定范围的互助实验团队,以先进带后进,课堂氛围活跃,学生围绕实验讨论积极,学习效果好。

3.3 课后总结提高

获得了实验结果后,如何分析总结、在总结中提高十分必要,作为一个综合性实验项目更是如此。实验的总结,往往以实验报告的形式体现,而以往的实验报告,学生按照实验指导书把实验目的、实验原理、实验材料、实验步骤抄写一遍,然后附上实验结果和数据处理即完成,还可以获得不错的分数。但是,在综合性实验中,这样的报告是不合格的,不利于学生综合思维的培养和独立思考、分析、解决问题能力的提高。总结综合性实验实践的经验,笔者认为,综合性实验的实验报告应包括实验背景、实验步骤、结果分析以及实验小结等4个部分。比如,本文所介绍的“木瓜蛋白酶酶反应器的设计及应用”实验项目,其实验报告应首先围绕“木瓜蛋白酶、酶的分离纯化、酶活力测定、蛋学性质分析、酶的固定化、酶反应器及酶的应用”进行综述,对这些知识点进行系统的梳理;其次,用学生自己的语言对实验整体性进行描述,理顺实验间的关系,用流程图的方式写出实验步骤;再次,要针对每一个单元的实验数据进行处理,并结合其他组以及他人实验结果进行比较分析,查找实验存在的问题及改进的关键点;最后,总结整理通过这次综合性实验的学习掌握的实验技术和方法以及作为参与者的体会,并提出改进的建议。

3.4 实验课程考核

综合性实验由于课时长、知识涉及面广,如何对授课学生进行公平合理评价一直是难题^[16]。以往的实验课程考核仅

仅以实验报告的优劣作为评价指标,导致学生不注重实验过程,片面追求实验结果的正确性、实验报告的篇幅和整洁程度,严重制约了对学生综合素质的培养。在实践过程中,改变传统的考核方式,鼓励学生参与评价,建立了更为客观的实验成绩评价体系(图4)。学生实验成绩由课堂表现和实验报告2个部分组成,其中:课堂表现从课堂考勤、实验参与度、小组配合度3个维度进行评价,实验报告则从及时性与规范性、数据处理与实验分析2个方面进行。这样,既强调了实验报告的重要性,又突出了学生参与实验以及团队协作意识,其公平合理性得到了学生的普遍认同,有利于培养和提高学生的实践能力和创新能力。

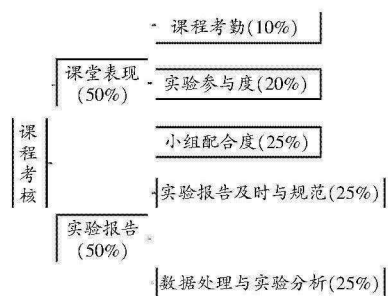


图4 酶工程综合实验项目考核的构成与分值

4 结语

“木瓜蛋白酶反应器的设计及应用”综合实验项目实际上将酶的制备、酶活力测定、酶学性质分析、酶的修饰固定、酶反应器的设计及酶的应用等6个单元的实验内容有机融合在一起,形成了一个集综合性和设计性于一体的实验项目,旨在培养和提高学生综合利用酶工程知识独立分析、解决问题的能力 and 素质。经过多年的实践,学生普遍反映,通过该实验的学习,学生实验的主动性、责任感和参与性增

(上接第246页)

目标值为0.30。

2.2 大幅增加综合性设计创新性实验项目比例

工程专业认证对学生实践能力培养有着很高的要求^①,要求学生具备将所学的专业知识应用到实践中的能力,可以解决实际存在的复杂工艺配方设计及数据处理分析问题。因此,在开展好常规必修实验项目同时,结合学院、学校各类创新大赛科研项目,大幅增加选修的综合性设计创新性实验项目,由学生以小组为单位独立自主设计并完成实验方案、数据分析和撰写实验报告等环节,培养学生的创新能力。教师通过让学生填写指定考核表详细掌握学生在实验过程中遇到的问题,引导学生分析解决问题,要求学生必须强化自主学习过程,教师负责做好师生的互动与引导工作。

2.3 改革优化考核方式

传统实验课程考核主要由2个部分组成:一是实验报告,占总成绩的70%,比较注重报告的完成情况及其完整性,但是无法考核试验设计、数据采集、数据分析、解决问题的实际动手能力等方面;二是平时成绩,包括考勤和回答问题等表现占总成绩的30%,该考核方式效果不尽理想^②。为落实专业认证注重实效的原则,采取将考核指标细化成专门的考核表,从方案设计、数据采集、分析、处理能力等方面对学生进

行考核;同时将学生的动手操作能力、解决问题能力也纳入考核指标。引导学生在实验过程中,形成“问题—探讨—方案—实践—验证”的良性互动学习模式。

5 参考文献

- [1]徐绍涵,徐蕾涵.现代生物技术五大分支及其医学应用[J].生物化工,2016,2(4):73-77.
- [2]张琛,何孔泉.以创新与应用为导向的蛋白质与酶工程教学模式探讨[J].农村经济学,2018(24):269-270.
- [3]孙万儒.我国酶与酶工程及其相关产业发展的回顾[J].微生物学通报,2014,41(3):466-475.
- [4]李秀凉,孟利.现代生物技术背景下酶工程课程体系改革实践[J].黑龙江教育(高教研究与评估),2014(6):33-34.
- [5]陈桂玲,关晶.“四导向”教学模式在酶工程教学实践中的应用[J].药学研究,2018,37(11):676-678.
- [6]康静,刘玉青,关建议,等.加强生物工程专业酶工程实验教学改革的探索[J].安徽农业科学,2011,39(23):14434-14435.
- [7]黄体冉,刘悦萍,张国庆,等.生物化学综合性实验的设计与实现[J].实验室研究与探索,2017,36(4):179-183.
- [8]耿红霞,蒋小林.综合性实验教学改革探索与实践[J].实验室研究与探索,2015,34(5):147-149.
- [9]李小英,张文博,高启禹,等.以提高能力为目标的《酶工程》教学改革探索[J].教育教学论坛,2017(1):77-78.
- [10]韦朝英.木瓜蛋白酶提取及在食品工业中的应用[J].农业与技术,2018,38(15):71-72.
- [11]蒋志国,王伟涛,张海德,等.木瓜蛋白酶在金属螯合亲和双水相中分配行为的研究[J].食品工业,2016,37(1):209-213.
- [12]杨俊玲,周春于,于振东.壳聚糖的制备及其条件优化[J].科技通报,2018,34(11):92-95.
- [13]杨颖,张多英.壳聚糖固定木瓜蛋白酶的制备及性质研究[J].黑龙江科学,2012,3(2):20-23.
- [14]王永红,夏建业,唐寅,等.生物反应器及其研究技术进展[J].生物加工过程,2013,11(2):14-23.
- [15]胡志和,夏磊,李艳军,等.添加紫薯提取物和酪蛋白水解物酸降血压和护肝功能评价[J].食品科学,2018,39(7):207-214.
- [16]肖军,高洁,于伟丽.构建地方高校生命科学实验课程多元化学习评价体系[J].实验科学与技术,2014,12(2):93-96.

行考核;同时将学生的动手操作能力、解决问题能力也纳入考核指标。引导学生在实验过程中,形成“问题—探讨—方案—实践—验证”的良性互动学习模式。

3 结语

开展专业认证是对食品科学专业教育质量和办学水平的一次检验,更是提高人才培养质量的重要途径。通过近年来对食品试验设计与统计分析课程的实验教学改革,收效显著,教学团队既找出了自身存在的问题和差距,又为进一步深化教育教学的改革夯实了基础。只有牢固树立工程专业认证的正确理念,以学生为中心、社会需求为目标导向,持续改进优化,紧跟时代脚步,才能培养出国际化人才。

4 参考文献

- [1]穆浩志,李克旺,牛兴华,等.基于工程教育认证的机械基础系列课程教学设计与实践[J].中国轻工教育,2015(5):66-70.
- [2]陈雯.新建本科院校高等工程教育专业认证探索与实践[J].大学教育,2013(6):20-22.
- [3]李志义.解析工程教育专业认证的持续改进理念[J].中国高等教育,2015(15):33-35.
- [4]林健.面向未来的中国新工科建设[J].清华大学教育研究,2017,38(2):26-35.
- [5]邱乐泉,吴涛,赵嫫,等.普通生物学课程教学改革的探索与实践[J].生物学杂志,2016,33(6):116-119.
- [6]蒋珊,杨燕,丁永红,等.基于专业认证的“高分子材料与工程专业实验”课程教学改革[J].高分子通报,2017(5):76-80.