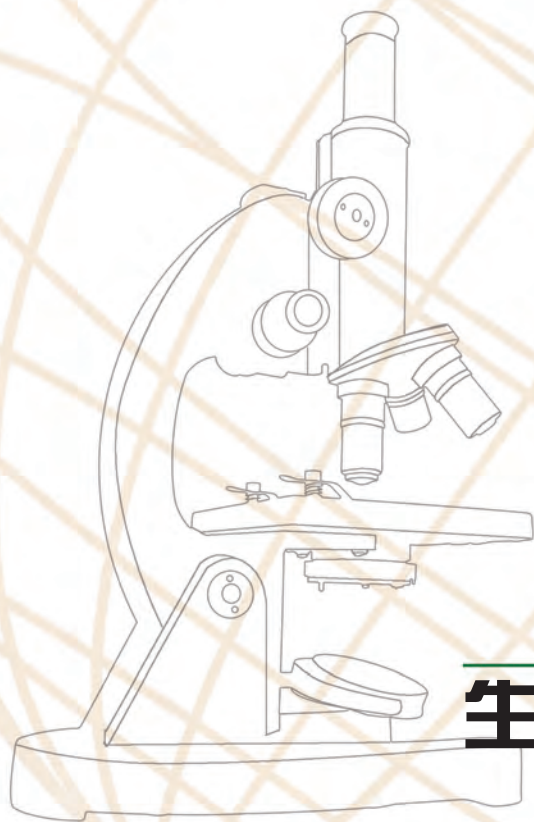


经全国中小学教材审定委员会2006年初审通过
普通高中课程标准实验教科书



生物

生物技术实践

选修1

汪忠 主编

主 编	汪 忠		
分册主编	汪 忠	李其柱	
编写人员	汪 忠	姚玉琴	李其柱
	李 伟	王小平	王苏豫
	刘继祥	李朝晖	宋世亮
	梁 平	虞蔚岩	



同学们,当你们畅游在知识海洋时,可曾想到,生物科学与人类社会的关系比其他科学更为密切;当你们漫步在科学丛林时,可曾感知,生物科学就在你我的身边……

回顾生物科学近百年来的发展史,许多重大的事件,如孟德尔遗传规律的发现、基因学说的创立、DNA 分子双螺旋结构的确定、人类基因组计划的完成……仿佛还在昨天;许多伟大的科学家,如孟德尔、摩尔根、沃森……仿佛就在眼前。在如今这瞬息万变的时代,生物科学在迅猛发展,基因工程、生物克隆、生物芯片等成果的取得,引起了全世界的广泛关注。与此同时,我们还应该知道,千百年来,在这些伟大成果的背后,有许多默默无闻的工作者和无数平凡的事情,所有这些都是生物科学发展进程中不可或缺的、充满生命活力的组成部分!

20 世纪后期,生物科学在物理学和化学等学科发展的基础上取得了长足的进展,已经深入到分子水平探究生命活动的本质。一般来说,新生的交叉学科在很大程度上是未来科学的先驱,而生物科学的研究领域正是产生这些新生学科科学启蒙思想的沃土。难怪许多科学家早就预言,21 世纪生物科学将是自然科学中最为活跃的学科之一。

当今,人类生存环境恶化的倾向对以造福人类为理想目标的科学提出了严峻的挑战,人们对科学进一步发展的期待日益迫切。生物科学在迎接挑战中,不断地丰富着自己。随着数学、技术科学、物理学、化学等学科的不断渗透交融,21 世纪的生物科学必将取得更加重大的突破,呈现出更加欣欣向荣的景象。生活在这样一个激动人心的生物科学时代,我们怎能不兴奋呢!

千鸟竞翔,万马奔腾,是生命的一种壮美;DNA 分子的双螺旋,是生命的一种结构美……同学们,生物科学中蕴含着各种形态的美,让我们在追求美的同时,也用美去感染你我身边的每一个人!

编者
2014 年 6 月

绪论 实验开启生物科学王国的大门

科学实验揭开了 DNA 分子结构之谜	2
实验开启生物科学王国的大门	4

第一章 无菌操作技术实践



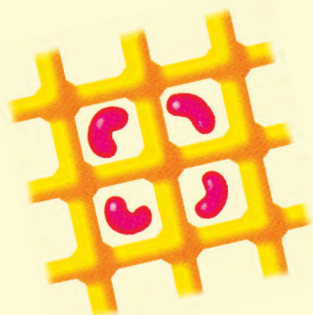
第一节 微生物的分离和培养	8
边做边学 大肠杆菌的接种与分离培养	10
第二节 分离特定的微生物并测定其数量	17
边做边学 以尿素为唯一氮源的土壤微生物的分离、培 养与数量测定	19
课题研究 分离土壤中能分解纤维素的微生物 ...	22
第三节 植物组织培养技术	26
边做边学 天竺葵的组织培养	28

第二章 发酵技术实践



第一节 运用发酵技术加工食品	37
边做边学 水果的发酵加工——制作果酒和果醋	39
边做边学 豆制品的发酵加工——制作腐乳 ...	40
边做边学 蔬菜的发酵加工——制作泡菜	42
第二节 测定发酵食品中的特定成分	45
课题研究 泡菜中是否含有亚硝酸盐	47
课题研究 蔬菜在腌制过程中维生素 C 含量的变化	50

第三章 酶的应用技术实践



- 第一节 酶的制备和应用 56
 - 边做边学 制备果胶酶并观察其作用 57
 - 课题研究 探究洗衣粉中的酶在洗涤中的作用 ... 59
- 第二节 固定化酶的制备和应用 63
 - 边做边学 酵母菌细胞的固定化技术 64

第四章 生物化学与分子生物学技术实践



- 第一节 生物成分的分离与测定技术 71
 - 边做边学 血清蛋白醋酸纤维薄膜电泳 73
 - 课题研究 凝胶色谱法分离血红蛋白 75
 - 边做边学 水蒸气蒸馏法提取橘皮中的芳香油 ... 78
- 第二节 分子生物学技术 83
 - 边做边学 目的 DNA 片段的体外扩增 85

附录



- 附录 1 生物科学实验规则 93
- 附录 2 实验试剂的配制 96
- 附录 3 显微观察和测量细胞 100
- 附录 4 生物科学实验的设计与实施 102
- 附录 5 生物科学实验结果的分析与总结 ... 105



绪 论

实验开启生物科学王国的大门

组织培养实验室

生物科学的每一次重大发现都证明科学实验是开启生物科学王国大门的钥匙。随着现代生物学实验技术的快速发展，一扇扇生物科学王国的大门也必将随之而打开。中学生物学实验教学不仅是生物学科教学的组成部分，更是培养创新精神和提高实践能力的主要载体。积极主动地参与生物技术实践吧！

- 科学实验揭开了 DNA 分子结构之谜
- 实验开启生物科学王国的大门



实验开启生物科学王国的大门

生物科学是一门实验科学。从某种意义上说,生物科学实验技术和方法的创新,是推动生物科学理论飞速发展的直接动力。因此,生物科学实验被认为是开启生物科学王国大门的钥匙。正是因为生物科学实验技术和方法的不断进步,极大地推动了生物科学的迅猛发展,才使得生物科学对整个个人类生活和生产活动的影响日益增大。

科学实验揭开了 DNA 分子结构之谜

生物科学是一门历史悠久的学科。16~18 世纪,生物科学的突出成就是一些分支学科的先后建立和发展,如解剖学、生理学、分类学、胚胎学等。19 世纪是生物科学全面发展的世纪,细胞学说、生物进化论和遗传理论就在此期间创立,它们被誉为现代生物科学的三大基石。20 世纪,伴随物理学、化学、数学等学科的发展以及计算机技术的广泛应用,生物科学的面貌发生了巨大的变革,从静态的、定性描述性的学科向动态的、定量实验性的学科转化,人类基因组计划的完成则标志着生物科学新时代的开始。若追溯起来,人们不会忘记 20 世纪中叶沃森(J.D.Watson)、克里克(F.Crick)、威尔金斯(M. Willkins)和富兰克林(R.E.Franklin)等许多科学家的科学实验成果。

积极思维

科学实验揭开了 DNA 分子结构之谜

事实:

1953 年,沃森和克里克确立了 DNA 分子的双螺旋结构模型,开创了生物科学的新纪元。而此前孟德尔(G. J. Mendel)的遗传实验、格里菲斯(F. Griffith)等的肺炎球菌实验、赫尔希(A. D. Hershey)等的噬菌体实验、富兰克林与威尔金斯给出的 DNA 晶体结构的 X 射线衍射照片等,都为揭开 DNA 分子结构之谜奠定了坚实的基础。

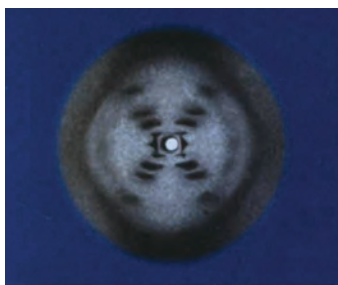
沃森看到富兰克林 1952 年拍摄的 DNA 结构的 X 射线衍射照片后受到启发,认定 DNA 应该是双链结构。沃森和克里克循着这个思路深入研究探讨,终于在 1953 年 3 月 7 日,将美丽无比的 DNA 分子双螺旋结构模型搭建成功,正确地反映出 DNA 分子的空间结构。这是一个无比伟大的时刻,从此生物学研究从细胞生物学阶段发展到了分子生物学阶段。

威尔金斯被列为发现 DNA 分子双螺旋结构的第三人,而富兰克林则是发现 DNA 分子双螺旋结构的真正的“幕后英雄”。



富兰克林

在威尔金斯的研究室里,富兰克林通过反复实验,成功地拍到了显示 DNA 具有螺旋结构的 X 射线衍射照片。威尔金斯将这些照片提供给沃森和克里克,这是后者发现 DNA 具有双螺旋结构的主要实验依据。



富兰克林得到的 DNA 晶体结构的 X 射线衍射照片。



克里克

克里克原来是物理学家,后来才转向生物学研究。37 岁时,他与 25 岁的沃森合作,发表 DNA 具有双螺旋结构的论文,后来他又提出了“中心法则”等理论。1962 年,克里克与沃森及威尔金斯共同获得诺贝尔生理学或医学奖。



威尔金斯

威尔金斯原来是物理学家,后转向生物学研究。他用物理学方法研究染色体和 DNA 的结构,也开展拍摄 DNA 的 X 射线衍射图像的实验。1962 年,他与沃森和克里克一起荣获诺贝尔生理学或医学奖。

图 1 科学实验揭开了 DNA 分子结构之谜

分析:为什么说是科学实验揭开了 DNA 分子结构之谜?

生物科学在 20 世纪已经取得了诸如 DNA 分子结构的揭示等举世瞩目的成就,在自然科学的发展中也处于领先地位,并正向着前所未有的深度和广度迅速地发展。

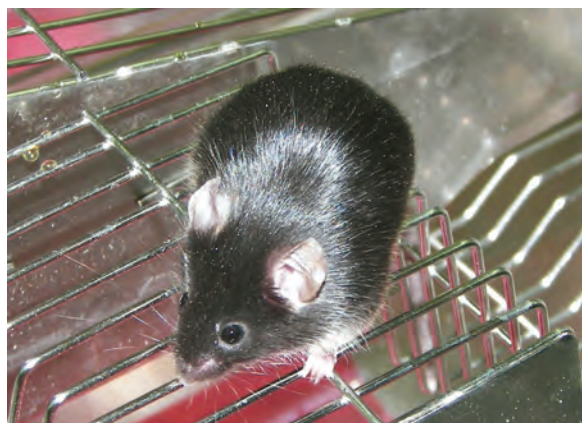
实验开启生物科学王国的大门

从生物进化论和细胞学说的创立，到基因靶向技术的发明、多利羊的诞生和杂交水稻的成功培育等，这些重大成果的取得都证明了实验是开启生物科学王国大门的钥匙。



科学实验创立了细胞学说

施莱登(M. J. Schleiden)和施旺(T. Schwann)分别于1838年和1839年独立提出“细胞学说”，这是科学家积累170余年的实验成果所获得的重大发现。



科学实验成就了基因靶向技术

2007年诺贝尔生理学或医学奖获得者为美国人卡佩奇(M. Capecchi)、史密斯(O. Smithies)与英国人埃文斯(M. Evans)，他们的杰出成果是基因靶向技术。迄今为止，通过该技术已有一万多个小鼠基因被敲除，从而确定了单个基因在健康和疾病中的作用。



科学实验实现了哺乳动物的克隆

1997年，英国科学家们采用哺乳动物体细胞克隆出绵羊。科学家为此进行了277次克隆实验才获得成功。



科学实验开创了稻谷培育的新纪元

20世纪70年代初，袁隆平利用其助手发现的自然不育株(雄性不育)作为杂交水稻的育种材料，提出了水稻杂种优势利用的观点，打破了世界上自花受粉作物育种的禁区，实现了杂交水稻培育的历史性突破，从而大幅度地提高了水稻的产量。袁隆平因此被称为“杂交水稻之父”。

图2 实验开启生物科学王国大门的实例

纵观生物科学的发展史,每一次里程碑式的进展无不源于重大的实验成果。随着生物科学理论与技术的不断进步,它对人类的生活、生产和社会发展将会产生更加深远的影响。

积极思维

袁隆平的“梦想”和“追梦”对我们有什么启迪

事实:

1. 袁隆平对人类的贡献之大、影响之深,是世界公认的。他自己说过:“我做了一个梦,梦见了水稻植株长得像树,稻谷长得像苹果那么的硕大,那么的沉甸甸,把树枝都压弯了……”这是他日有所思、夜有所梦的结果。正是为了实现这个梦想,年逾古稀的袁隆平一直还在为亩产吨粮田的目标而默默耕耘着,孜孜践行着。袁隆平“千里之行,始于足下”的追梦征程就是科学实验和探索的过程,这使他的事业越来越辉煌,创新越来越备受瞩目,梦想越来越接近实现。

因为水稻是雌雄同花、自花受粉的作物,难以一朵一朵地去掉雄花进行杂交。这就需要获得一个雄花不育的稻株,即雄性不育系,然后才能与其他品种杂交。这是一个世界难题。袁隆平知难而进,他认为,雄性不育系的原始亲本,可以是一株自然突变的雄性不育株,因此也能天然存在,而中国有众多的野生稻和栽培稻品种,蕴藏着丰富的种质资源,“外国没有搞成功的,中国人不一定就不能成功”。



图3 沉甸甸的杂交水稻稻穗

为此,袁隆平迈开了双腿,走进了水稻的莽莽绿海,去寻找这从未见过,而且中外资料也没报道过的水稻雄性不育株。时间一天天过去,袁隆平头顶烈日,脚踩烂泥,驼背弯腰地一穗一穗地观察寻找。“功夫不负有心人”,他和他的团队终于发现了一株花药不开裂的天然雄性不育水稻植株。

2. 袁隆平的梦想还启迪我们:没有任何一项科学能穷尽自然的奥秘,宇宙间更广阔的未知领域还有待于我们前仆后继地通过实验去探索。

分析:

1. 从袁隆平的“梦想”和“追梦”故事谈科学实验和探索的重要性。

2. 袁隆平的“梦想”和“追梦”对我们还有什么启迪?

1. 举例说明生物科学在 20 世纪所取得的哪项重大成果对你的日常生活产生了重大影响。

2. 联系自己熟悉的事例，说明生物科

学实验与生物科学迅速发展的关系。

3. 展望未来，畅想生物科学的发展可能对人类的生活、生产和社会发展产生哪些影响。

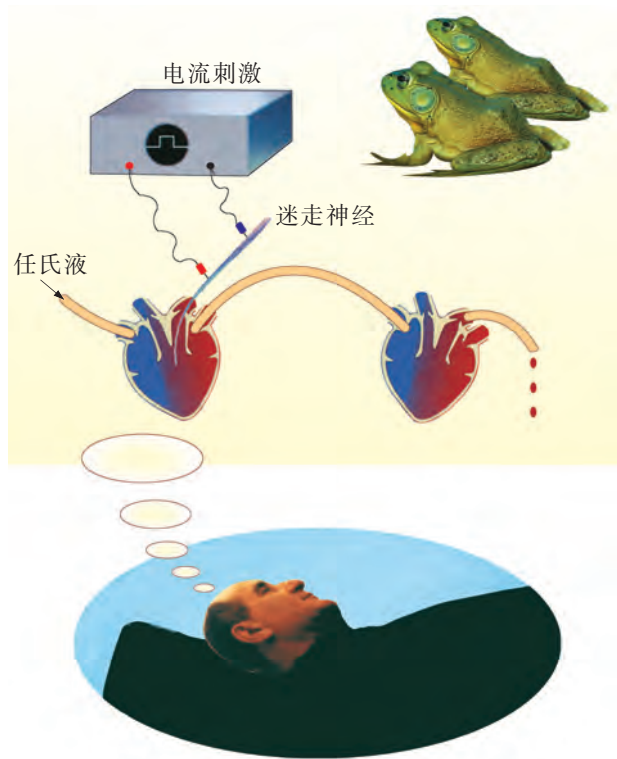
双蛙心灌流实验



20 世纪初，德国生理学家罗维(O. Loewi)研究迷走神经对心跳(心肌收缩)的控制作用。当罗维用电流刺激青蛙的迷走神经时，青蛙的心跳就减慢。罗维想，究竟是迷走神经受电流刺激后，电信号直接传导造成心跳减慢呢，还是由于迷走神经分泌了某种化学物质造成心跳减慢呢？如果是后者，那该如何证明呢？

事实上，罗维一直想用一个实验来证实他的假设，而构思和设计这个实验花费了他整整 17 年的时间。后来罗维回忆了他当时做实验时的情景：“1920 年复活节的前夜，我突然从睡梦中醒来，打开电灯，匆匆在一张小纸片上写下几行字后，我又躺下睡着了。第二天早晨 6 点钟，我起床后想起来，夜间我曾写下一些重要的东西，但小纸片上的字太潦草，根本无法辨认。第三天凌晨 3 点钟，上一夜的想法又在我的脑中出现了，原来是一个验证迷走神经产生化学物质控制心肌收缩的双蛙心灌流实验的设计。这时虽然还是深更半夜，但我立刻起床，冲进实验室，按照梦中的设计，进行了控制青蛙心跳的实验。”

其实这个实验并不复杂。罗维解剖了两只青蛙，取出它们的心脏，第一个心脏上仍连接有迷走神经，另一个心脏上的迷走神经被剥离。他将两个蛙心通过导管连接起来实施灌流实验。他先用电流刺激了第一个心脏上的迷走神经，当连接迷走神经的心脏中的液体(任氏液)流入到另一个心脏中时，奇迹出现了，第二个心脏的跳动立即减慢下来。实验结果证明，神经系统通过产生化学物质作为信号，控制了心肌的收缩。现在我们知道，这种化学物质是乙酰胆碱。罗维的成就在于他通过实验揭开了神经细胞通信问题的神秘面纱。



双蛙心灌流实验的故事

第一章

无菌操作技术实践

一种放线菌的菌落

无菌操作和无菌培养是生物科学、医学等领域最基本的实验要求,在生产和生活中也有广泛的应用价值。例如,图中一种放线菌的菌落的形成离不开无菌操作和无菌培养技术。尝试进行无菌操作技术实践,你会初步掌握这一技术。在今后的工作和生活中,这一技术可能会帮你解决问题呢!

- 微生物的分离和培养
- 分离特定的微生物并测定其数量
- 植物组织培养技术

第一节 微生物的分离和培养

微生物与人类的关系十分密切,如在酒类酿造、食品发酵等传统生产工艺中,飘香的美酒和美味的食品都与微生物的代谢活动密切相关。随着科学技术的发展,在医药、农业、能源、环保等领域中,许多利用微生物生产的产品被逐渐开发出来,如抗生素、疫苗、微生物杀虫剂等。

微生物种类繁多,在自然界分布广泛,为了深入地研究它们的特性,首先要对其进行分离与培养。掌握无菌操作的技能(如使用高压蒸汽灭菌锅进行灭菌)是进行微生物分离与培养的基础;掌握微生物培养基的配制技术(如配制细菌培养基),学习微生物接种和培养的方法等,是实现微生物分离和培养的必要条件。

高压蒸汽灭菌锅

实验室常利用高温处理达到灭菌效果,包括采用干热灭菌或湿热灭菌等方法。干热灭菌方法是将被灭菌的物品放在干热灭菌箱内,在 $160\sim 170\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下加热 $1\sim 2\text{ h}$ 以达到灭菌的目的。湿热灭菌方法常采用高压蒸汽灭菌锅进行,如手提式高压蒸汽灭菌锅就是实验室常用的灭菌仪器之一。

高压蒸汽灭菌锅(图 I-1)的使用包括加水、装锅、加热排气、保温保压、出锅等步骤。

加水是指使用前在锅内加入适量的水。加水不可过少,以防将灭菌锅烧干。

装锅是指将待灭菌物品放在灭菌桶中(不要装得过满),盖好锅盖,按对称方法旋紧四周固定螺栓,打开排气阀。

加热排气是指加热后,锅内水沸腾并有大量蒸汽自排气阀冒出时,维持 $2\sim 3\text{ min}$ 以排出冷空气。如待灭菌物品较大或不易透气,应适当延长排气时间,务必使空气充分排出,然后将排气阀关闭。

保温保压是指当气压升至 100 kPa 、温度达到 $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时控制热源,保持压力,维持 $20\sim 30\text{ min}$ 后,关闭电源。

出锅是指当压力表指针降至“0”点,并待温度下降后,打开排气阀,旋开固定螺栓,开盖,取出灭菌物品。若当压力表指针尚在“0”点以上、温度也在 $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以上时开启排气阀,会因压力骤然降低而造成培养基剧烈沸腾,并冲出管口或瓶口,污染棉塞,以致培养微生物时引起杂菌污染。

灭菌完毕取出物品后,将锅内余水倒出,保持灭菌锅内壁及内胆干燥,盖好锅盖。

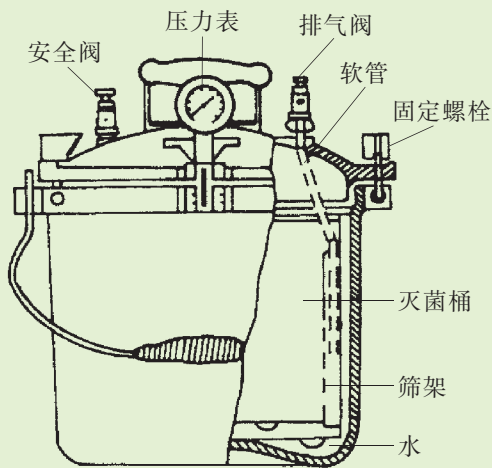


图 I-1 高压蒸汽灭菌锅结构示意图

配制培养基

培养基(culture medium)是为人工培养微生物而制备的适合微生物生长、繁殖或积累代谢产物的营养基质。培养基可以分为天然培养基(采用动植物组织或微生物细胞以及它们的提取物或粗消化物配制而成,如牛肉膏蛋白胨培养基)和合成培养基(由准确称量的分析纯等级别的高纯度化学试剂加蒸馏水配制而成,如葡萄糖铵盐培养基)等类型。

天然培养基的主要优点是取材便利、营养丰富、配制简便,缺点是营养成分难以控制、实验结果的重复性较差;合成培养基的优点是化学成分及其含量明确、实验的可重复性好,缺点是配制繁琐、成本较高。各种培养基的配方虽然不同,但一般都含有水、碳源(提供碳元素的物质)、氮源(提供氮元素的物质)和无机盐等最基本的物质。

配制固体培养基时,常常需要在液体培养基中添加一定量的凝固剂。例如,琼脂是较为常用的凝固剂之一,它是从某些藻类中提取出来的一类多糖物质。通常 100 mL 液体培养基中需要加入 1.5~2.0 g 琼脂。

在配制培养基时,根据拟培养的微生物的不同需要,有时还要加入维生素等特殊的营养物质,并要调节培养基的 pH 使之满足微生物生长的需要。

接种微生物

在无菌条件下将微生物接入培养基的操作过程叫做接种。在接种操作过程中,常用的工具有玻璃涂布器、接种针、接种环等(图 I-Ⅱ)。由于接种方法的不同,采用的接种工具也有区别,如用玻璃涂布器进行涂布平板接种(图 I-Ⅲ),用接种针进行穿刺接种(图 I-Ⅳ),用接种环进行斜面接种(图 I-Ⅴ),或在固体培养基平板上进行划线接种(图 I-Ⅵ)等。

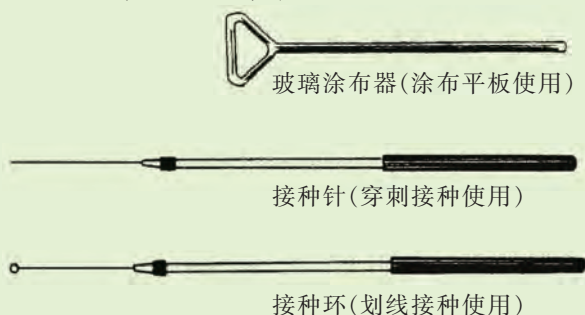


图 I-Ⅱ 接种工具



图 I-Ⅲ 涂布平板接种示意图

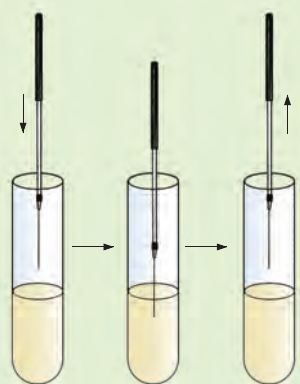


图 I-Ⅳ 穿刺接种示意图

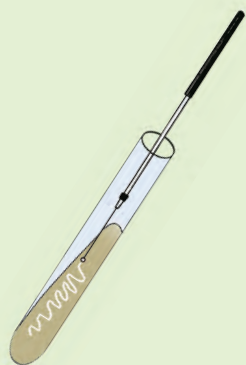


图 I-Ⅴ 斜面接种示意图

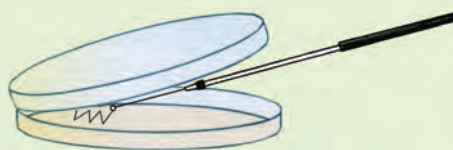


图 I-Ⅵ 平板划线接种示意图

实践:**(一) 配制牛肉膏蛋白胨培养基****1. 配制培养基**

在 200 mL 烧杯中加入 0.5 g 牛肉膏、1.0 g 蛋白胨、0.5 g NaCl、2.0 g 琼脂,再加入蒸馏水至 100 mL,边加热边用玻璃棒搅拌,配制成培养基(图 1-1)。

建议考虑: 牛肉膏蛋白胨培养基是常用的培养细菌的基础培养基,可以根据实际需要配制成液态的(又称为肉汤培养基)或固态的(添加琼脂作凝固剂)。牛肉膏蛋白胨培养基具有营养丰富、配制方便等特点,应用非常广泛。



注意加热安全,参照“附录 1 生物科学实验规则”进行操作。

2. 调节 pH

测试并调节培养基的酸碱度时,先用玻璃棒蘸取培养基接触 pH 试纸测试其 pH,再根据实际情况用质量分数为 3% 的 HCl 溶液或 NaOH 溶液将培养基 pH 调至 7.2(图 1-2)。

3. 分装

将液态的培养基趁热分装到洁净的试管中,培养基的高度约为试管长度的 1/5。分装时注意不要污染试管口,随后立即用棉花塞紧试管口(图 1-3)。

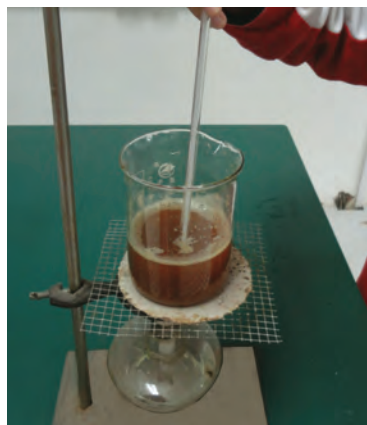


图 1-1 配制培养基

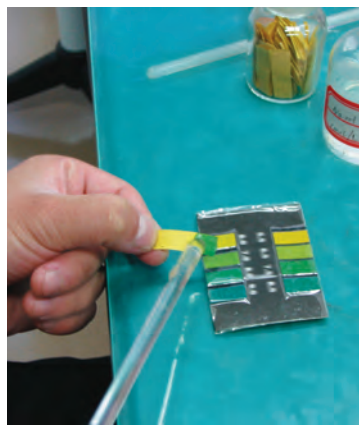


图 1-2 调节 pH



图 1-3 分装

4. 包扎

将 3~5 支试管扎成一捆,并用牛皮纸等将试管口包扎好。在试管壁上注明培养基的名称、组别、配制日期等信息(图 1-4)。

5. 灭菌

高压蒸汽灭菌是常用的灭菌方法之一,通常是在温度为 121 °C、气压为 100 kPa 的条件下灭菌 20~30 min。灭菌完毕后

切断电源,待压力表中指针指向“0”点、温度降至 60 ℃ 以下后,取出灭菌物品(图 1-5)。

建议考虑:灭菌(sterilization)是指采用强烈的物理学或化学方法使物体内外所有的微生物永远丧失生长和繁殖能力的方法。消毒(disinfection)是指用较为温和的物理学方法(如用波长为 265~266 nm 的紫外线照射)或化学方法(如涂抹体积分数为 70%~75%的酒精)杀灭物体上绝大多数微生物的方法。通常认为消毒是一种部分灭菌的方法。

6. 搁置斜面

待试管冷却至 50 ℃ 左右,将试管口部枕在高约 1 cm 的木条或其他合适高度的物体上,使其自然倾斜,斜面长度不超过试管总长的 1/2(图 1-6)。



图 1-4 包扎

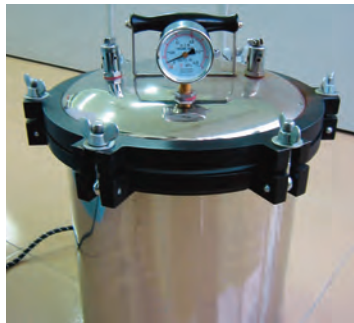


图 1-5 灭菌

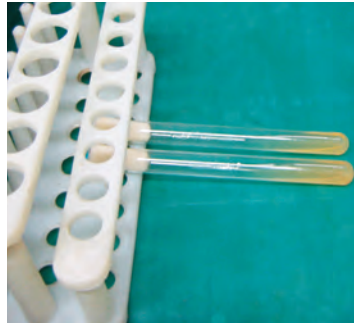


图 1-6 搁置斜面

(二) 斜面接种和培养大肠杆菌

斜面接种大肠杆菌的主要目的有菌种转移、扩大培养和保存纯净菌种等。具体操作步骤如下:

1. 点燃酒精灯后取两支盛有培养基的试管,其中一支内有菌种,另一支为无菌的斜面培养基。用一只手的拇指和其他四指夹住试管,使管口齐平,管内培养基斜面向上(图 1-7)。

2. 手持接种环,将接种环的环端和接种时可能进入试管内的部分放在酒精灯火焰上,来回灼烧多次,以达到迅速彻底灭菌的目的(图 1-8)。



图 1-7 准备接种

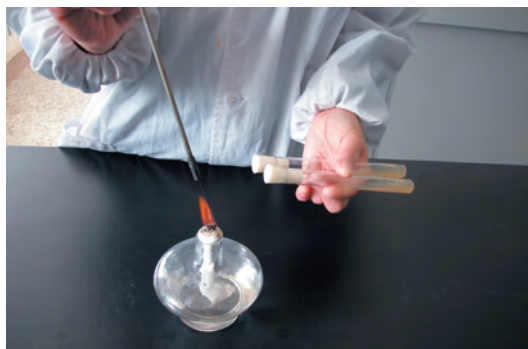


图 1-8 接种环灭菌

3. 在火焰附近用握有接种环的手的小指、无名指、中指和掌心拔去两支试管上的试管塞,迅速将试管口通过火焰 2~3 次,

以杀灭试管口上的微生物(图 1-9)。

建议考虑:无菌操作是微生物接种和培养的关键。为防止被杂菌污染,不但培养微生物用的试管、培养皿和培养基等在接种前须进行灭菌,接种操作通常还需要在酒精灯火焰附近进行,这是因为酒精灯火焰附近的局部高温使微生物难以存活。

4. 将已灭菌的接种环伸入内有菌种的试管中(菌种可以购买,也可以通过分离培养和保存获得),先将环部接触培养基斜面顶端或其他无菌的培养基部位使其冷却,再轻轻挑取少许菌种。在抽出接种环时,注意其带菌部位不要触及试管壁,也不要通过火焰处(图 1-10)。



图 1-9 试管口灭菌



图 1-10 挑取少许菌种

5. 将上述带菌的接种环迅速伸入待接种的试管中,在培养基斜面上由底部向上轻轻划“S”型曲线,将菌种接种到培养基上。划曲线时不要将培养基的表面划破(图 1-11)。

6. 将试管口与试管塞分别通过火焰 2~3 次,迅速塞紧试管。多次灼烧接种环确保无菌,冷却后,放回原处。将接种过菌种的试管,放在恒温箱中(37℃)培养 24 h(图 1-12),观察接种和培养的结果。



图 1-11 划线接种



图 1-12 培养大肠杆菌

7. 将增殖的菌种放置在冰箱的冷藏室中(4℃)保存。由于菌种容易被污染或产生变异等,因此用这种方法保存菌种的时间不宜过长。一般每隔 3~6 个月要重新将菌种从原有的培养基

转移到新鲜的培养基上,以保证菌种的活性。对于需要长期保存的菌种还需要采用其他特殊的方法。例如,采用甘油管藏法:将 1 mL 待保存的菌液转移到 1 mL 已灭菌的甘油中,充分混匀后置于 -20°C 的冷冻箱中长期保存。

(三) 平板划线分离和培养大肠杆菌

在实验室中,平板常常被用来培养、分离细菌等微生物。

1. 牛肉膏蛋白胨固体培养基的平板制作

将配好的牛肉膏蛋白胨培养基装入锥形瓶并用棉塞塞紧,置于高压灭菌锅中;用牛皮纸等将培养皿包好(一般 5 套一包),再用细绳扎紧后也放入高压蒸汽灭菌锅中,与培养基一起灭菌。

灭菌后,将物品取出置于操作台上,待培养基冷却到 50°C 左右时进行倒平板操作。首先,在酒精灯火焰旁一只手拿着装有培养基的锥形瓶,另一只手拔出瓶塞(图 1-13 a),使瓶口迅速通过火焰 2~3 次(图 1-13 b),并转动瓶口,确保瓶口灭菌彻底。再取无菌培养皿,在火焰旁用拇指和食指将培养皿打开一条稍大于锥形瓶瓶口的缝隙,将锥形瓶中的培养基(10~20 mL)倒入培养皿中(图 1-13 c)。等平板冷却凝固后,将平板倒置(皿盖在下、皿底在上)备用(图 1-13 d)。

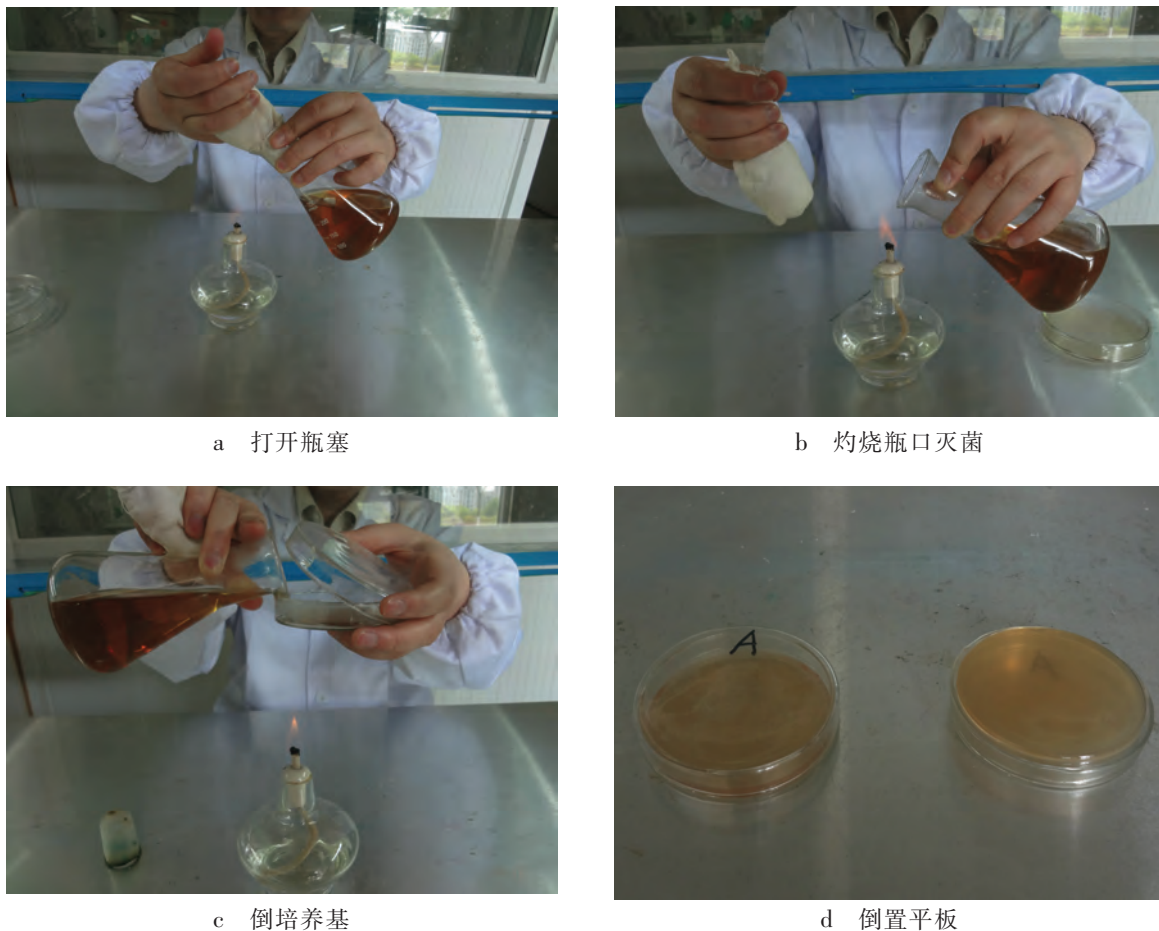


图 1-13 平板制作操作示意图

建议考虑:在制作平板的过程中,一定要注意无菌操作。若在超净工作台上制作平板会更好。

2. 平板划线分离与培养大肠杆菌

除了试管斜面划线法外,纯化和培养微生物的方法还有平板划线法等。平板划线法是指用带有微生物的接种环在平板培养基表面通过分区划线而纯化分离微生物的一种方法。例如,用已制备好的牛肉膏蛋白胨培养基平板进行大肠杆菌的分离与培养(图 1-14)。

在一个倒有培养基的培养皿的皿底外侧面中央用记号笔画一直线,再在此线中间画一垂直线,将培养基分成三个区域:第 1 区域、第 2 区域、第 3 区域,分别标上“1”、“2”、“3”字样。

接种划线时,将带有微生物样品的接种环,在培养皿内培养基的第 1 区域划线,然后再从第 1 区域划到第 2 区域,从第 2 区域划到第 3 区域。在固体培养基表面完成多次“由点到线”的逐步稀释。

通过培养可以得到由单个细菌增殖而形成的菌落。

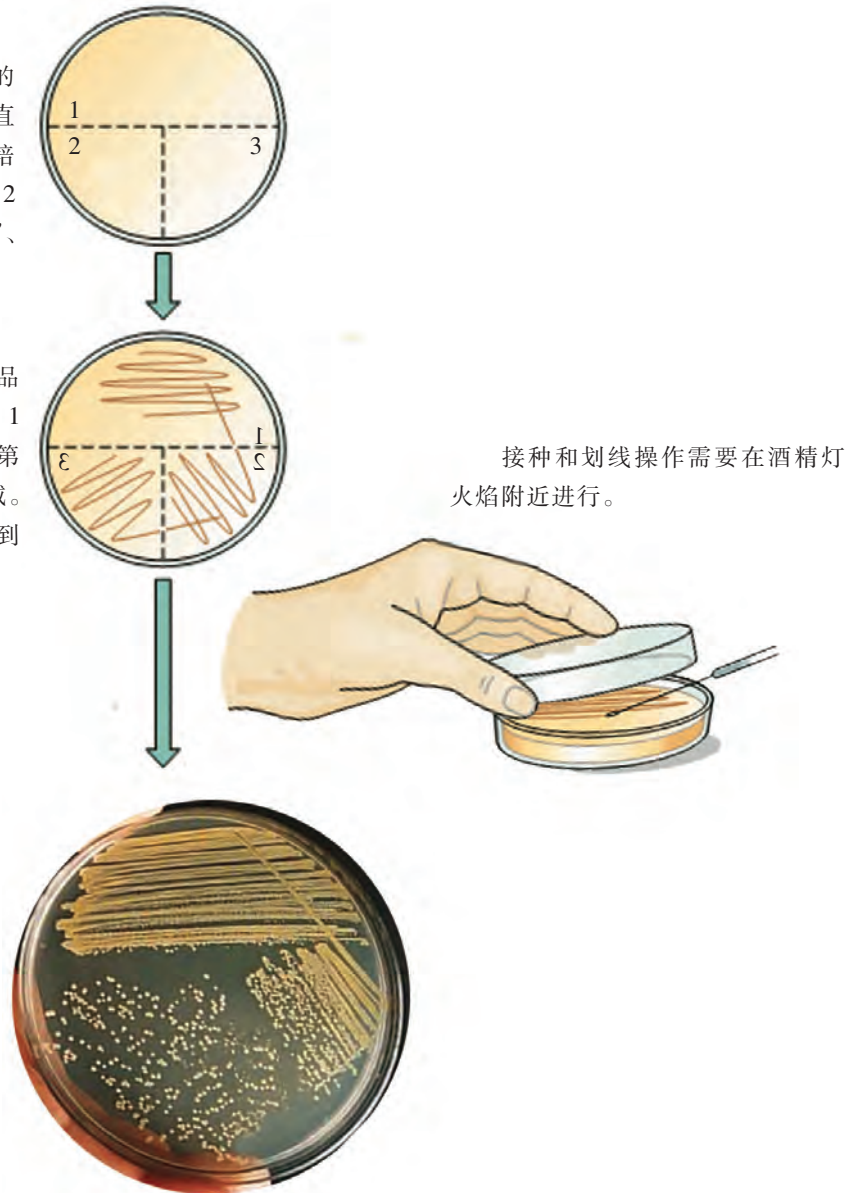


图 1-14 平板划线分离和培养大肠杆菌示意图

讨论:

1. 为什么要在酒精灯火焰附近接种?
2. 24 h 后,培养基上长出了什么? 肉眼看到的一个菌落肯定是由一个大肠杆菌生长和繁殖形成的吗?

一、单项选择题

1. 培养基为培养微生物提供了所需的多种营养物质,牛肉膏蛋白胨培养基常用于培养 ()

- A. 细菌 B. 酵母
C. 霉菌 D. 病毒

2. 下列有关牛肉膏蛋白胨培养基的叙述中,正确的是 ()

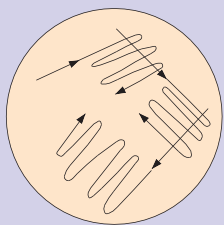
- A. 配制方便的合成培养基
B. 营养丰富的天然培养基
C. 需要牛肉膏的量比蛋白胨多
D. 只适用于培养大肠杆菌

3. 下列有关配制 1 000 mL 牛肉膏蛋白胨培养基的叙述中,错误的是 ()

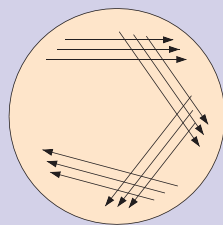
- A. 需要加入 5.0 g 牛肉膏和 10.0 g 蛋白胨
B. 需要加入 5.0 g NaCl
C. 配制固体培养基时一般需要加适量的琼脂
D. 配制液体培养基时一般不需要调节



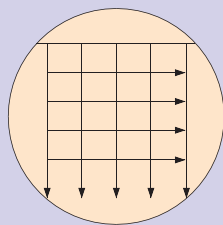
甲



乙



丙



丁

A. 只能是乙

B. 只能是丙

C. 只能是丁

D. 乙、丙、丁都不是

培养基的 pH

4. 通常要在酒精灯火焰附近接种微生物,其原因主要是 ()

A. 酒精灯火焰附近的局部高温使得微生物不能存活

B. 较高的环境温度可以使细菌的代谢更加旺盛

C. 在酒精灯火焰附近操作可以保持培养基的液体状态

D. 火焰灭菌与高压灭菌锅的灭菌原理完全相同

5. 下列关于斜面接种目的的描述中,错误的是 ()

- A. 菌种转移 B. 扩大培养菌种
C. 保存纯净菌种 D. 获得单个菌落

6. 下图中甲为大肠杆菌经过平板划线接种和培养后的菌落分布图,乙、丙、丁为平板划线操作示意图。要得到甲图菌落分布,最可能的平板划线示意图是 ()

二、技能增进题

推理 由一个或几个已知的事实,推导出一个未知结论的思维过程。生物学学习过程中也常常需要用已有的知识去推理得出新的结论。

右表是某微生物培养基成分,请据此作出推理:

该培养基可培养的微生物营养类型是什么?

编号	成分	含量
1	粉状硫	10.0 g
2	(NH ₄) ₂ SO ₄	0.4 g
3	K ₂ HPO ₄	4.0 g
4	MgSO ₄	9.25 g
5	FeSO ₄	0.5 g
6	CaCl ₂	0.5 g
7	H ₂ O	100 g

最早用来培养微生物的人工配制的培养基是液体状态的,分离并获得微生物纯培养物非常困难。因此,在早期微生物学研究中,分离微生物的进展相当缓慢。

利用固体培养基分离、培养微生物的技术,首先是由德国细菌学家罗伯特·科赫及其助手创立的。1881年罗伯特·科赫发表论文,介绍利用土豆片分离微生物的方法,用灼烧灭菌的刀片将煮熟的土豆切成片,然后用针尖挑取微生物样品在土豆片表面划线接种,经培养、分离获得微生物的纯培养物。这一方法的缺点是一些细菌在土豆培养基上生长状态较差。

罗伯特·科赫还将明胶和牛肉膏蛋白胨培养基混合后铺在玻璃平板上,让其凝固,在其表面接种微生物。由于明胶熔点低,而且容易被一些微生物分解利用,其使用受到限制。

有意思的是,罗伯特·科赫一名助手的妻子具有丰富的厨房经验,当她听说明胶作为凝固剂遇到的问题后,建议以厨房中用来做果冻的琼脂代替明胶。琼脂是从几种红藻(主要是石花菜)中提取的,主要成分是琼脂糖和琼脂胶。1882年,琼脂就开始作为培养基的凝固剂,从餐桌走向了实验桌,为微生物学的发展作出了重要贡献。直到今天,琼脂仍然是最常用的凝固剂;在一些食品、化妆品等产品中也是重要的原料之一。

罗伯特·科赫更为杰出的成就是研究和发现结核杆菌与结核菌素等,他也因此而荣获1905年诺贝尔生理学或医学奖。1982年3月24日,中国邮政部发行《罗伯特·科赫发现结核杆菌一百周年》纪念邮票,全套一枚。邮票右边是显微镜、试管,左边的红色图案是中国的防治结核病标志。



第二节 分离特定的微生物并测定其数量

在自然环境中常常有多种不同的微生物生活在一起,要对其中的某种微生物进行研究(如微生物的种类识别、数量统计等),就必须获得其纯培养物,以排除其他微生物的干扰。在实验室中利用选择培养基就可以筛选和分离某种微生物,然后在高度稀释的条件下,在固体培养基上培养一个个微生物(如某种细菌)形成的单个菌落。单个菌落即为纯培养物,可用于科学研究。例如,通过菌落数量的统计,可以计算出样品中的含菌数等。

分离特定的微生物并测定其数量,需要掌握涂布平板法和混合平板法等,如果采用选择培养基分离特定微生物的方法,还需要学习观察各种微生物形成的菌落等。

涂布平板法和混合平板法分离细菌

许多细菌、真菌和单细胞藻类能在固体培养基上形成孤立的菌落,采用适宜的分离方法很容易得到它们的纯培养物。平板分离法能将单个微生物分离和固定在固体培养基表面或里面,每个孤立的活微生物体经过生长、繁殖均可形成单个菌落。

分离、培养微生物最常用的是琼脂固体培养基。这种由德国科学家罗伯特·科赫创立的平板分离微生物并进行纯培养的技术简便易行,100多年来一直被用来分离各种微生物。平板分离法有多种,如涂布平板法和混合平板法就是实验室中最常用的两种方法(图 I-VII)。平板分离法的各项操作均需在超净工作台上或在酒精灯火焰旁进行。

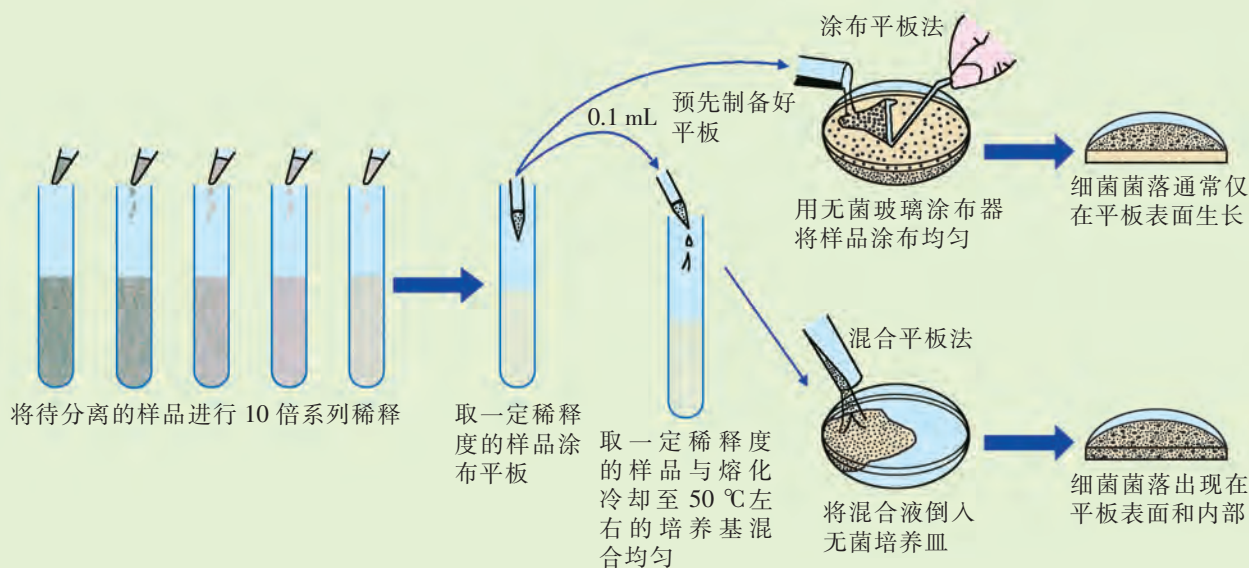


图 I-VII 用涂布平板法和混合平板法分离细菌示意图

选择培养分离

科学家观察到,在一种培养基上接种多种微生物,常常会有一些微生物能生长,而另一些微生物的生长受到抑制。这是因为不同的微生物有不同的营养需求或对某种化学物质有不同的敏感性。根据这一原理,科学家针对某种微生物的特性,设计一个特定的环境,使之特别适合这种微生物的生长,而抑制其他微生物的生长。这种通过选择培养进行微生物纯培养分离的技术称为选择培养分离。通过选择培养能够从自然界混杂的微生物群落中把特定的微生物选择分离出来。

自然界中的微生物群落一般是由多种微生物组成的,特别是当某种微生物与其他微生物相比,数量非常稀少的时候,仅采用一般的平板法几乎不可能把数量稀少的微生物分离出来。要分离这种微生物,必须根据它的特点(包括营养、生理、生长条件等),采用选择培养分离的方法,经过一定时间的培养后,使这种微生物在群落中的数量不断增加,再通过平板法等进行纯培养分离。例如,要分离耐高温菌,可在高温条件下进行培养;要分离对某种抗生素具有抗性的菌种,可在加有该抗生素(如链霉素或青霉素)的平板上进行分离。再如,在培养基中加入质量分数为 10% 的酚,可以抑制细菌和霉菌的生长;运用将纤维素作为唯一碳源和能源的培养基,可以有效地分离能分解纤维素的细菌;运用无氮培养基(培养基完全不含氮元素)可选择能固氮的细菌;运用只含尿素而不含其他氮元素的培养基,可以选择能分解尿素以获取氮的微生物(能合成脲酶的微生物可以分解尿素)。

观察各种微生物形成的菌落

菌落(colony)是指单个微生物在适宜的固体培养基表面或内部生长、繁殖到一定程度,形成肉眼可见的、有一定形态结构的子细胞生长群体。不同微生物在特定培养基上生长形成的菌落一般都具有稳定的特征,如菌落的大小、形状、边缘特征、隆起程度、颜色等(图 I-VIII),这些可以作为对微生物进行分类、鉴定的重要依据。当多种微生物混杂在一起时,根据它们在平板上形成的菌落的形态特征,可初步将所需的微生物与其他微生物区分开,并在此基础上获得所需微生物的纯培养物。



图 I-VIII 各种微生物形成菌落的表观特征

实践:

(一)涂布平板法培养和计数土壤微生物

1. 准备实验器材:土壤样品;移液管(图 1-15 左),洗耳球(图 1-15 右),试管,试管架,锥形瓶,烧杯,培养皿,玻璃涂布器,天平,称量纸,恒温箱等;相关培养基,蒸馏水。所有玻璃器皿灭菌前需用适当浓度的浓硫酸浸泡 24 h。



移液管



洗耳球

图 1-15 移液器具

2. 采集土壤,制备悬液:称取 0.5 g 土壤样品,倒入盛有 50 mL 无菌水的锥形瓶,振荡 20 min,充分打散土壤,即成为 10^{-2} g/mL 的土壤悬液。用无菌移液管吸取 0.5 mL 土壤悬液注入盛有 4.5 mL 无菌水的 1 号试管,配制 10^{-3} g/mL 的土壤悬液。取另一支无菌移液管吹吸 1 号试管 3 次,使悬液均匀,再吸取 0.5 mL 注入盛有 4.5 mL 无菌水的 2 号试管,配制 10^{-4} g/mL 的土壤悬液。以此类推,依次配制 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} g/mL 的土壤悬液。每次用移液管移取悬液前都要用洗耳球吹口对准移液管末端,将悬液吸入或排出移液管数次,以使悬液均匀(参照附录 2 中“容量玻璃器皿的使用”要求)。

3. 选择适于分离特定微生物的培养基:利用不同微生物代谢特性的不同,可以通过选择培养基抑制其他微生物的生长,从而选出所需要的微生物。如要分离土壤中能分解尿素的微生物,可采用唯一氮源为尿素的培养基(表 1-1)。将已灭菌的培养基融化,冷却到 $45\sim 50\text{ }^{\circ}\text{C}$,倒入不同编号的培养皿中,迅速盖好培养皿盖,待凝固后即成平板。另设置一份不加氮源的培养基作为空白对照(以等体积的无菌水代替)。

4. 接种:从浓度最低的土壤悬液(10^{-8} g/mL)开始,用无菌移液管吸取 1 mL 加入到标记有 10^{-8} 的培养皿中,再分别用无菌移液管从 10^{-7} g/mL、 10^{-6} g/mL 的土壤悬液中各吸取 1 mL 加

表 1-1 分离可分解尿素的微生物培养基配方

KH_2PO_4	1.4 g
Na_2HPO_4	2.1 g
$\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.2 g
葡萄糖	10.0 g
尿素	1.0 g
琼脂	15.0 g
加蒸馏水定容至	1 000 mL
pH 7.0~7.2	

入到标记有 10^{-7} 、 10^{-6} 的培养皿中(图 1-16),每个浓度设置 3 个重复,再采用涂布平板法涂布均匀。注意:每次吸取悬液前,都要将土壤悬液充分振荡,混合均匀;每一步操作都需要在无菌条件下进行。

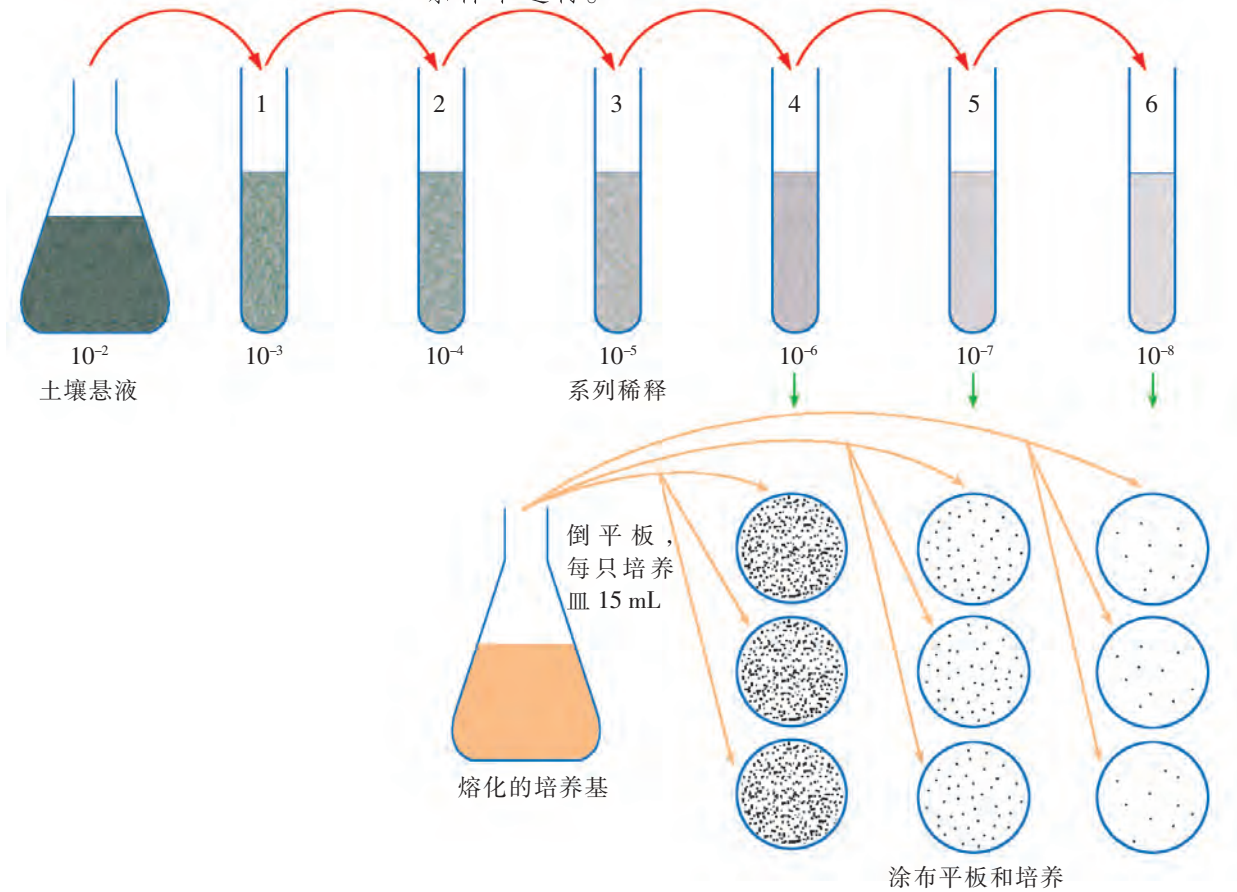


图 1-16 用涂布平板法进行微生物计数示意图

建议考虑: 涂布平板菌落计数法是将待测样品经适当稀释后,其中的微生物可能被分散成单个个体,吸取一定量的稀释样液接种到平板上,经过培养会形成由单个细胞生长繁殖而形成的肉眼可见的菌落,每个菌落代表原样液中的一个微生物。

5. 培养与观察:将已经标明培养基种类、培养日期以及样品稀释度的培养皿,倒置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中培养 1~2 天。观察每个培养皿中的细菌菌落。

6. 计数菌落:取出已培养 1~2 天的平板,观察和统计每个培养皿中的菌落数。计算时,一般选取菌落数为 30~300 的一组为样本进行统计。每克土壤样品的细菌数=某一稀释度几次重复培养后的菌落平均数 \times 稀释倍数(涂布所用稀释液为 1 mL)。

建议考虑: 通过涂布平板菌落计数法统计菌落数时,可根据其稀释倍数和取样接种量换算出样品中的含菌数。由于待

测样品往往不易完全分散成单个个体，长成的一个菌落也有可能来源于样品中的 2~3 个或更多个个体，因此，涂布平板菌落计数法计数的细菌数量与待测样品中真正的细菌数量相比往往偏低。

通过涂布平板法，一般可以在培养基上分离、培养出微生物的单个菌落，以达到纯培养的目的。

(二) 显微镜直接计数法

1. 认识血球计数板。

在通过显微镜对微生物或细胞直接计数时，还需要借助血球计数板(图 1-17)。血球计数板是一块特制的载玻片，它的上表面中央部分由 4 条槽分成 3 个平台，中间平台又被一短槽一分为二，每边各有 1 个方格网，每个方格网有 9 个大小相等的大方格，中间的大方格就是计数室底部，用来计数微生物或单细胞。



图 1-17 血球计数板

根据大方格的不同，可分为两种规格的计数室：一种规格是大方格被分成 25 个中方格，每个中方格又被分成 16 个小方格；另一种规格是大方格被分成 16 个中方格，每个中方格又被分成 25 个小方格。两种规格的计数室均有 400 个小方格。由于大方格的边长为 1 mm，载玻片与盖玻片的间距为 0.1 mm，所以计数室的容积为 $1\text{ mm} \times 1\text{ mm} \times 0.1\text{ mm} = 0.1\text{ mm}^3$ 。

2. 将清洁干燥的血球计数板盖上盖玻片，用无菌的毛细滴管吸取摇匀的土壤微生物培养液，在盖玻片的边缘滴一小滴，让培养液沿着缝隙通过毛细渗透作用自动进入计数室。

3. 加样后静置 5 min，然后将血球计数板置于显微镜载物台上，先用低倍镜找到计数室所在位置，再换成高倍镜进行观察和计数。若浓度太大而无法计数时，可对土壤微生物培养液进一步稀释。

4. 计数时，如使用规格为 16×25 型的血球计数板(图 1-18)，则在计数室内选 4 个中方格(如图中加黑点的左上、右上、左下、右下四个角)中的菌体进行计数。

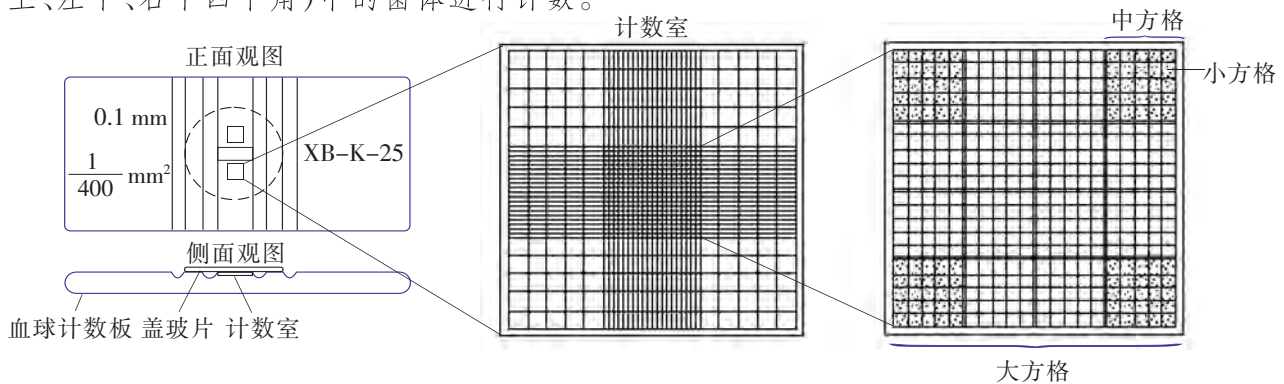


图 1-18 血球计数板结构示意图

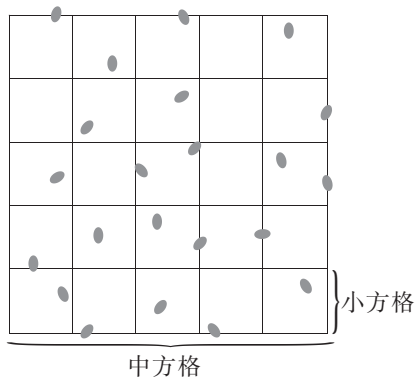


图 1-19 一个中方格中细菌计数示意图

如使用规格为 25×16 型的血球计数板,则在计数室内选 5 个中方格(如四个角和中央的方格)中的菌体进行计数。

对位于中方格四条边线上的菌体,一般只统计相邻两条边线上的菌体,也包括这两条边线的交叉位置上的菌体。例如,如果确定统计中方格的上边线和右边线,图 1-19 的中方格中的细菌数为 20 个。分别记录所选中方格中的菌体数,再算出每个小方格内菌体数的平均值,乘以 400,就能得出一个大方格中菌体的总数,然后换算出 1mL 培养液中菌体的总数。换算公式如下:

$$16 \times 25 \text{ 型的血球计数板: } 1 \text{ mL 悬液中待测标本 (菌体) 总数} = \frac{100 \text{ 小方格内菌体数}}{100} \times 400 \times 10^4 \times \text{稀释倍数}$$

$$25 \times 16 \text{ 型的血球计数板: } 1 \text{ mL 悬液中待测标本 (菌体) 总数} = \frac{80 \text{ 小方格内菌体数}}{80} \times 400 \times 10^4 \times \text{稀释倍数}$$

建议考虑:将稀释后的待测微生物培养液置于计数室内并在显微镜下计数时,一般每个样品重复计数 3 次,取其平均值,按公式计算。这样就可以计算出单位体积内微生物(或细胞)的总数。

5. 使用完毕后,将血球计数板用水反复冲洗干净,切勿用硬物洗刷。洗完后自然晾干即可。

讨论:

1. 为什么要将培养皿倒置于培养箱中培养?
2. 若要将某一菌落进一步分离纯化,应该怎样操作?

微生物与人类的生产、生活密切相关。例如,土壤微生物是大自然的“清洁工”,能够降解土壤中的许多化合物,推动生物圈中的物质循环。又如,农作物秸秆的主要成分是纤维素,是丰富的自然资源之一,这一自然资源至今没有得到充分的利用。如果从土壤中分离出能够高效分解纤维素的微生物,就可以解决这一难题,为人类充分利用相关资源作出贡献。

课题研究

分离土壤中能分解纤维素的微生物

研究目标:

研究培养基对微生物的选择作用,探讨能分解纤维素的微生物的应用价值。

研究实施:

(一)推荐器材

土壤样品;移液管,洗耳球,试管,试管架,锥形瓶,烧杯,培养皿,玻璃涂布器,天平,称量纸,恒温箱等;相关培养基,蒸馏水。

(二)研究指导

1. 问题与假设:小组讨论,提出有关从土壤中分离能分解纤维素的微生物的问题。针对问题,作出相应的假设。

建议考虑:分解纤维素的微生物能以纤维素作为唯一碳源。

2. 设计与实验:根据问题与假设,小组讨论并提出从土壤中分离能分解纤维素的微生物的方案。

建议考虑:分析表 1-2 和 1-3 中的两种培养基成分,考虑是否能用于本实验。参照“以尿素为唯一氮源的土壤微生物的分离、培养与数量测定”实验,进行课题研究。

表 1-2 培养基配方 1

NH ₄ NO ₃	1.0 g
K ₂ HPO ₄	0.5 g
KH ₂ PO ₄	0.5 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5 g
CaCl ₂	0.1 g
FeCl ₃	0.02 g
NaCl	1.0 g
酵母膏	0.05 g
琼脂	15.0 g
纤维素粉	8.0 g
将上述物质溶解后,加蒸馏水定容至	1 000 mL
pH 7.0~7.2	

表 1-3 培养基配方 2

纤维素粉	5 g
NaNO ₃	1 g
Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O	1.2 g
KH ₂ PO ₄	0.9 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5 g
KCl	0.5 g
酵母膏	0.5 g
水解酪素	0.5 g
将上述物质溶解后,加蒸馏水定容至	1 000 mL
pH 7.0~7.2	

在设计实验方案的过程中,与其他小组积极交流,完善本组的方案。小组成员分工合作,实施方案。

3. 结论与反思:分析实验数据,得出研究结论。尝试撰写探究报告,重点讨论这类微生物的应用价值。

深入研究:

若想对培养出来的菌落进行鉴定,可采用刚果红染色法。具体操作如下:

在培养出菌落的培养基上,覆盖质量浓度为 1 mg/mL 的刚果红溶液,10~15 min 后,倒去覆盖的溶液;再加入物质的量浓度为 1 mol/L 的 NaCl 溶液,15 min 后倒掉覆盖的溶液。如果发现菌落周围出现透明圈,说明这些菌落是由能分解纤维素的细菌形成的。

土壤中能分解纤维素的微生物种类很多,有细菌、真菌等。它们能分泌纤维素酶,将纤维素分解成小分子糖类物质以满足自身生命活动的需要,同时也能改善土壤的结构,提高土壤的肥力。

随着能源短缺问题的日益严重,大量富含植物纤维素的农作物秸秆未被充分利用的问题,更加引起了人们的关注。利用纤维素分解菌或其产生的酶来分解纤维素,将农作物秸秆、甘蔗渣等转化成乙醇等清洁能源的技术,正越来越多地受到人们的关注。

一、单项选择题

1. 在一种培养基上接种多种微生物,有些微生物能生长,有些微生物不会生长。下列对此现象的解释最合理的是 ()

- A. 每种培养基都只适合一种微生物的特殊营养需求
- B. 该培养基的营养物质不能满足各种微生物的需要
- C. 自然界中的微生物群落一般是由多种微生物组成的
- D. 该培养基一定添加了抑制其他微生物生长的物质

2. 在无氮的培养基上能够生长的微生物是 ()

- A. 土壤中的某些固氮菌
- B. 能分解纤维素的霉菌
- C. 能利用葡萄糖的酵母菌
- D. 能分解尿素的细菌

3. 采用涂布平板法分离培养微生物时,需要用到的接种工具是 ()

- A. 接种环
- B. 玻璃涂布器
- C. 接种针
- D. 放大镜

4. 经过选择培养分离,在平板上出现了细菌菌落。下列描述中,正确的是 ()

- A. 每个菌落都是由一个细菌形成的

B. 有些菌落可能由 2~3 个细菌形成

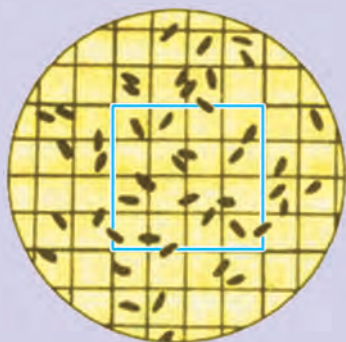
C. 平板上出现的菌落越小越好

D. 平板上出现的菌落越多越好

5. 采用涂布平板菌落计数法时,将待测土壤样品 1g 溶于水,经过反复稀释至 10^{-8} g/mL,取 1 mL 稀释液涂布并选择培养分离,计数菌落平均数为 50 个,那么 1 g 该土壤样品中含有的菌数为 ()

- A. 5×10^9
- B. 5×10^8
- C. 5×10^8
- D. 5×10^9

6. 采用涂布平板菌落计数法计数时,得到的结果会相对偏低,科学家常常采用血球计数板计数。下列蓝色方框显示的中方格内的杆菌数量为 ()



- A. 14
- B. 15
- C. 16
- D. 17

二、技能增进题

重复实验 实验应在一切条件都相同的情况下重复做几次或做几组,取其平均值,以尽量减少实验的偶然性,避免同一个人或不同人实验产生误差的影响,增强实验的说服力与准确性。重复实验中产生的不同实验结果,要加以分析,不能简单肯定或否定,可采取平均的方法,尽量排除其他因素对实验的影响。

两名同学用稀释涂布平板法测定同一土壤样品中的细菌数。在对应稀释数为 10^6

的培养基中,得到以下两种统计结果。

第一名同学在该浓度下涂布了一个平板,统计的菌落数为 234。第二名同学在该浓度下涂布了三个平板,统计的菌落数分别为 21、212 和 256。该同学以这三个平板上菌落数的平均值 163 作为统计结果。

你认为哪名同学的结果更接近真实值?你认为这两名同学的实验需要改进吗?如果需要,如何改进?



真核微生物的培养

根据细胞核膜、细胞器和有丝分裂的有无,可将微生物分为原核微生物和真核微生物。真核微生物的细胞核有膜包被,核内有核仁和染色质;有高度分化的细胞器,如中心体、高尔基体;能进行有丝分裂。

真菌是一类真核微生物,它们对营养的要求不高,在一般培养基上就能生长。实验室常用一种主要含有蛋白胨、葡萄糖和琼脂的培养基培养真菌。由于该培养基的 pH 较低(5.0~6.0),常含有氯霉素和放线菌酮,可抑制细菌的生长而有利于真菌的生长。

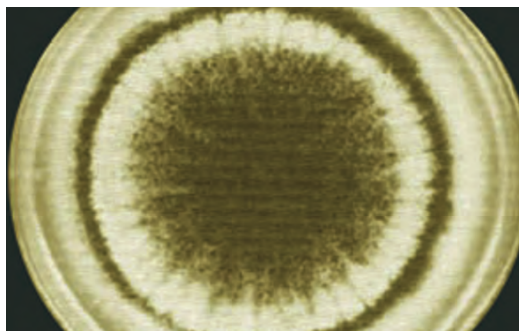
真菌的繁殖能力强,但生长速度比细菌慢,常需 1~4 周才能形成菌落。真菌的菌落主要有酵母型和丝状型。

1. 酵母型菌落为多数单细胞真菌的菌落特征,类似细菌菌落,但菌落体积较大。一般为光滑、湿润、柔软、边缘整齐、不透明、乳白色的圆形菌落。

2. 丝状型菌落为多细胞真菌的菌落特征,菌落较大,由许多疏松的菌丝体构成。菌落可呈棉絮状、绒毛状或粉末状等。



酵母菌落



曲霉菌落



第三节 植物组织培养技术

无性繁殖是许多植物重要的繁殖方式之一。在生产实践中,常常采用扦插、分株、压条和嫁接等多种无性繁殖方法来繁育植物。植物组织培养技术的创立使植物无性繁殖的效率大幅度地提高。例如,一株花卉若用分株法,一般一年只能繁殖几株到几十株;而采用植物组织培养技术,一年则可繁殖出几万甚至数百万株。

植物组织培养技术需要掌握培养基的配制(如 MS 基本培养基贮备液配制),需要掌握植物组织培养过程中的各项技能(如诱导形成愈伤组织、炼苗与定植),还需要掌握合理利用激素诱导植物组织脱分化、再分化等技术。

植物组织培养的过程

植物组织培养(plant tissue culture)是指在无菌和人工控制的条件下,诱导离体的植物器官、组织等在适宜的培养条件下发育成完整植株的技术。植物组织培养的依据是植物细胞的全能性。植物细胞的全能性是指植物体的每个体细胞都携带来自受精卵的完整基因组,并具有发育成完整植株的潜在能力。从植物体上分离出来的一部分器官组织或除去细胞壁的原生质体,在无菌和适宜的营养等条件下,其全能性就会表现出来。例如,在生产实践中已广泛地应用植物的茎尖(图 I-IX)或叶片进行组织培养,以达到农作物品种的复壮、脱毒(脱除感染的病毒)和快速繁殖等目的。

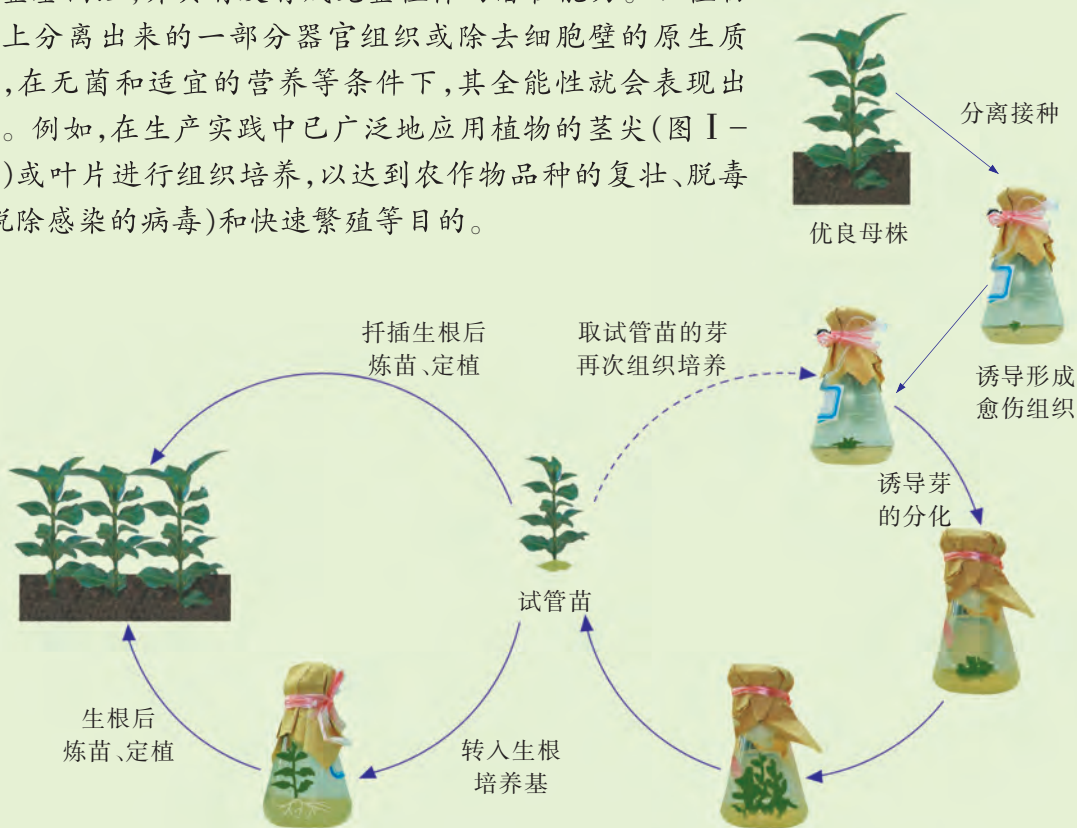


图 I-IX 植物茎尖组织培养的主要过程示意图

MS 基本培养基贮备液的配制

组织培养是否能够获得成功,主要取决于对培养基的选择。不同的培养基具有不同的特点,也就适合于不同的植物种类和接种材料。在开展组织培养时,首先要对所需要的培养基进行分析,以便能配制出适合的培养基。在实际工作中,人们常常会利用已配制好的培养基贮备液来配培养基。例如,在需要 MS 培养基时,就是利用 MS 基本培养基贮备液(表 I-I)来配制的。

表 I-I MS 基本培养基贮备液的配制

类别	化合物名称	称取量/mg	扩大倍数	体积/mL	1 L 培养基的吸取量/mL
大量元素 贮备液	NH ₄ NO ₃	33 000	20	1 000	50
	KNO ₃	38 000	20		
	CaCl ₂ ·2H ₂ O	8 800	20		
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	7 400	20		
	KH ₂ PO ₄	3 400	20		
微量元素 贮备液	KI	166	200	1 000	5
	H ₃ BO ₃	1 240	200		
	MnSO ₄ ·4H ₂ O	4 460	200		
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	1 720	200		
	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	50	200		
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	5	200		
CoCl ₂ ·6H ₂ O	5	200			
铁盐 贮备液	FeSO ₄ ·7H ₂ O	5 560	200	1 000	5
	Na ₂ ·EDTA (乙二胺四乙酸二钠)	7 460	200		
有机物 贮备液	肌醇	20 000	200	1 000	5
	烟酸	100	200		
	盐酸吡哆醇(维生素 B ₆)	100	200		
	盐酸硫胺素(维生素 B ₁)	20	200		
	甘氨酸	400	200		

分别用玻璃瓶贮存配制好的 MS 培养基贮备液,并贴上标签,注明编号、配制倍数、日期等,保存在冰箱的冷藏室中备用。

激素与愈伤组织的再分化

愈伤组织的细胞是一种具有分生能力的薄壁细胞。已经分化的植物细胞或组织产生愈伤组织的过程称为脱分化;在一定条件下继续培养这种脱分化的愈伤组织,又可以重新诱导根、芽等器官的分化,这个过程称为再分化。在植物组织培养的过程中,一般采用不同的植物激素及不同配比来调节脱分化和再分化的过程。生长素、细胞分裂素是启动生长、细胞分裂、脱分化、再分化的关键激素。当同时使用这两种植物激素时,两者用量的比例可能会影响植物细胞分化发育的方向。一般来说,当生长素用量与细胞分裂素用量的比值高时,有利于根的分化而对芽的形成有抑制作用;当生长素用量与细胞分裂素用量的比值低时,有利于芽的分化而抑制根的形成;当生长素用量与细胞分裂素用量相当时,则能促进愈伤组织的生长。

实践:**(一) 组织培养****1. 准备**

(1) 器具准备 高压蒸汽灭菌锅(用于培养基、蒸馏水和接种器械的灭菌);超净工作台(用于无菌操作)(图 1-20);接种工具(体视显微镜、镊子、剪刀、解剖刀、酒精灯或电热灭菌器等);培养设备(空调机、定时器、温度控制器、培养架、摇床或旋转床、日光灯、光照培养箱等);常用玻璃器具、仪器及分析设备(量筒、滴管、天平、酸度计、蒸馏水器、烘箱或玻璃仪器烘干器、电炉、药品柜、冰箱等)。



图 1-20 超净工作台

(2) 试剂准备 试剂: MS 基本培养基贮备液(按表 I-I 配制并保存在 4℃ 冰箱冷藏室中), 漂白粉或次氯酸钠(NaClO), 2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D), 萘乙酸(NAA), 6-苄氨基嘌呤(6-BA)等。

2. 配制

按表 I-I 中最右栏的标准分别取 4 种贮备液, 加入 2 000 mL 烧杯中, 再称取 30 g 蔗糖、8 g 琼脂加入烧杯中, 并加约 800 mL 蒸馏水, 加热煮沸至琼脂完全溶解后用蒸馏水定容至 1 000 mL, 再用质量分数为 10% 的 NaOH 溶液调节 pH 至 5.6~5.8, 即成 MS 基本培养基。

分别向 MS 基本培养基中添加所需的植物激素, 配制诱导愈伤组织形成的培养基 (MS+0.5 mg/L 6-BA+0.125 mg/L 2,4-D)、诱导分化芽的培养基 (MS+1.0 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA)、诱导生根的培养基 (MS+0.1 mg/L NAA)。将添加植物激素后的培养基搅拌均匀, 再次定容并调节 pH。用漏斗将上述各种培养基分别装入若干个 50 mL 锥形瓶中(每瓶约装 20 mL), 塞上棉花塞, 并用牛皮纸包扎; 或装入植物组织培养专用瓶中。

建议考虑: MS 培养基是植物组织培养常用的一种培养基, 其主要成分有大量元素(如 N、P、K、Ca、Mg、S)和微量元素(如 B、Mn、Cu、Zn、Fe、Mo、I、Co)。此外, 除常常添加植物激素外, 还可根据培养需要添加甘氨酸、维生素、肌醇、烟酸、蔗糖等有机物质(参照“附录 2 实验试剂的配制”要求进行)。

3. 灭菌

将培养基于 121℃ 温度下湿热灭菌 20 min, 冷却后置于 30℃ 的培养室中观察 3 天, 以检查灭菌是否彻底。用灭菌彻底的培养基进行天竺葵的组织培养。

4. 取材与接种

植物组织培养的各项操作均需在无菌室中或超净工作台上进行。一般选取未开花天竺葵植株(图 1-21)上新萌生侧枝上生出的幼嫩的叶片为组织培养材料。将其用流水冲净后,用滤纸吸去表面的水分,浸没在质量分数为 10%的漂白粉溶液或质量分数为 2%的 NaClO 溶液中 5~15 min;取出后用无菌水冲洗 4~6 次,再用手术刀(无菌)将它们切成面积约 0.5 cm² 的小块(外植体);接种于已经配制好的诱导愈伤组织形成的培养基上,用无菌棉塞塞紧瓶口,并用牛皮纸包扎好,使用植物组织培养专用瓶培养的需将瓶盖盖好;在培养瓶上贴上标签,写明组织培养的材料名称、接种日期和接种人姓名或小组序号。在 15~25 ℃、光照强度为 1 000~2 000 lx 的条件下,每天光照 12 h,培养 10 天左右(图 1-22)。



图 1-21 未开花天竺葵

5. 观察与记录

每天观察外植体的生长情况,记录愈伤组织的大小、质地、颜色等情况。



图 1-22 诱导培养

6. 转接培养

将增长至一定体积的愈伤组织转接到诱导分化芽的培养基上(图 1-23),在 15~25 ℃、光照强度为 1 000~2 000 lx 的光照培养箱内继续培养。待愈伤组织分化出幼芽后,再转接到诱导生根的培养基上继续培养(图 1-24)。

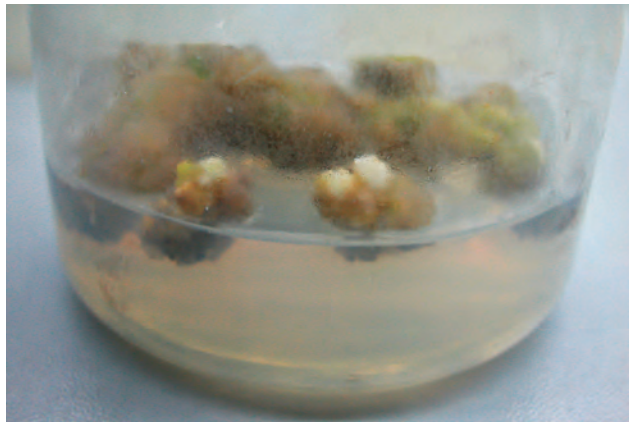


图 1-23 诱导愈伤组织分化芽



图 1-24 转接培养生根

(二) 露地栽培

组织培养得到的试管苗(图 1-25)是非常嫩弱的植株。它们生长在试管或培养瓶内,并处于恒温、高湿、弱光、无菌和有完全营养的条件下,植物表面没有蜡质和角质层等保护组织,气孔没有关闭功能,有叶绿体但光合能力差。这样的试管苗如不经过炼苗驯化,直接移植到大田,在变温、低湿、强光、有杂

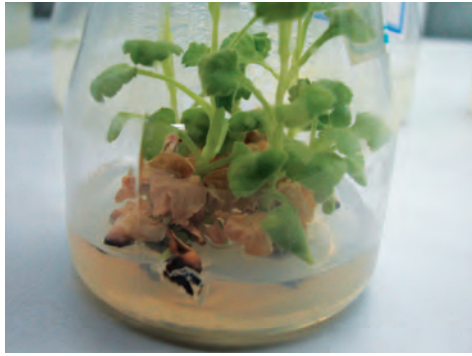


图 1-25 已生根的试管苗

菌的自然条件下,会很快萎蔫甚至死亡。因此,组织培养得到的试管苗在移栽至露天大田之前,一般要经过炼苗,使其更好地进行光合作用,并逐渐适应自然环境下的生长条件。

1. 培育壮苗

在培养基中添加一定数量的生长延缓剂(如多效唑、矮壮素等),使试管苗的茎增粗,根数增加,叶绿素含量提高。同时,打开或半打开瓶塞(瓶盖或封口膜),逐渐加强光照,以逐步适应外界环境,这一过程约需 1 周时间。

2. 选用合适的移植基质

选择排水性和通气性好的材料(如蛭石、珍珠岩、腐殖土等)作为移植基质,并进行消毒。

3. 移栽试管苗

把试管苗从试管或培养瓶中移出时,要细心洗去附着在根系上的琼脂培养基,并将它们移植到基质中生长一段时间(图 1-26)。洗净幼苗根系的培养基能有效地防止移栽后因霉菌等侵染而导致的烂根和植株死亡。



图 1-26 天竺葵试管苗移入基质中生长

4. 移栽后的条件控制

移栽后的前 1~2 周,要保持空气湿度在 90%~100%。在高温和强光的条件下要用遮阳棚降低温度和遮挡强光,并用喷水雾的方法增加空气和基质湿度。

5. 栽培

等幼苗在腐殖土等基质环境下生长健壮后,再移栽到土壤中。移栽后,要注意观察,做好幼苗生长记录;同时还要做好浇水、施肥、除虫等养护工作。

建议考虑:天竺葵有很多种,通常用来观赏、栽培的天竺葵大多喜凉爽环境,怕高温;天竺葵不耐潮湿;栽培基质要求通气性好。

讨论:

影响植物组织培养成败的主要因素有哪些?

一、单项选择题

1. 植物组织培养是将离体的植物器官、组织或细胞在适宜的条件下培养成完整植株的技术。这里所指的适宜的条件是指()

- A. 无菌或有菌的条件
- B. 无菌和人为控制的条件下
- C. 自然环境和有光的条件下
- D. 自然环境与无菌的条件下

2. 植物组织培养的理论依据是 ()

- A. 植物细胞的全能性
- B. 植物组织的全能性
- C. 植物器官的全能性
- D. 植物个体的全能性

3. 下列有关植物组织培养所用的培养基的描述中,正确的是 ()

- A. 植物组织培养所用的培养基种类与植物组织培养的成功与否无关
- B. 植物组织培养的基本培养基的配方一定要加入植物激素
- C. 不同的植物组织培养基具有不同的特点以适合不同的植物种类或培养目的
- D. 植物激素的种类和用量不必随培养阶段和培养材料的不同而变化

4. 植物组织培养中,非必需的器材是 ()

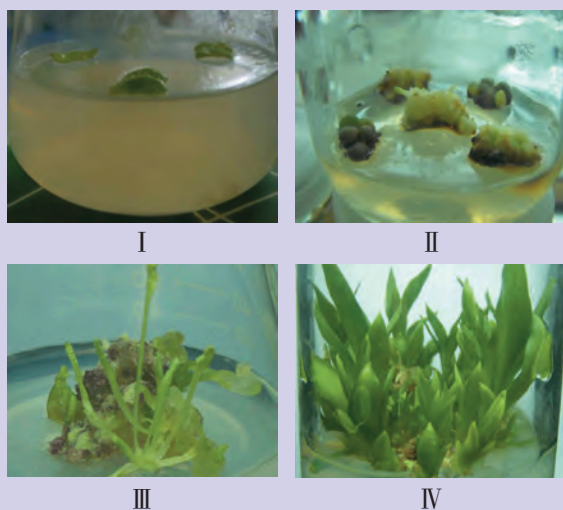
- A. 高压蒸汽灭菌锅
- B. 超净工作台

- C. 锥形瓶和培养皿
- D. 电子显微镜

5. 在配制 MS 培养基时非必需的是 ()

- A. N、P 等大量元素
- B. B、Mn 等微量元素
- C. 6-BA 等植物激素
- D. 肌醇、烟酸等有机物

6. 下图表示的是植物组织培养过程中的不同阶段,则下列说法正确的是 ()



- A. 图 I 中的植物材料一定是愈伤组织
- B. 图 II 中的植物材料被称为试管苗
- C. 图 III 中的植株被称为外植体
- D. 图 IV 中的植株被称为试管苗

二、技能增进题

分析与归纳 分析就是将研究对象的整体分为各个部分、方面等,并分别从各层次加以考察的认识活动。分析的意义在于细致地寻找能够解决问题的方法,并以此解决问题。归纳是从个别性知识,引出一般性知识的推理,是由已知真的前提,引出可能真的结论。

右图作为一种文心兰的植物组织培养过程。请仔细阅读该示意图后分析:操作的关键步骤是什么? 有哪些注意事项? 从而归纳出影响植物组织培养是否成功的主要因素。



花药培养是将发育到一定阶段的花药接种到培养基上进行离体培养,以获得再生植株的技术。自20世纪60年代该技术发明以来,利用花药进行组织培养的研究发展迅速,并被广泛应用到农业、林业生产中,尤其是遗传育种方面。资料表明,世界上已有200多种高等植物的花药培养成功,其中,我国科技人员首先成功培育了大豆、玉米、小麦等近50种花粉再生植株。利用花药进行的组织培养,其培养形成的幼苗中既有二倍体植株,又有单倍体植株,因此,需要对它们进行选择。

提出问题

根据天竺葵组织培养的内容,尝试提出用一种月季品种的花药作为材料,并应用组织培养技术培育月季的问题。例如,如何选择某种月季的花药组织或采用什么培养基来培育月季花药等问题。

推荐器材

光学显微镜,超净工作台,剪刀,接种环,镊子,盖玻片,载玻片,无菌培养皿,无菌滤纸;体积分数为70%的酒精,质量分数为0.1%的氯化汞溶液,酒精棉球,无菌水,醋酸洋红,MS基本培养基;IAA、2,4-D、KT(激动素)等。

作出假设

对提出的问题作出假设。例如,在月季的初花期(大约在每年5月初至中旬),选择适合的花药;用MS基本培养基并添加适量的生长素(IAA等)等激素来培育花药。

设计实验

根据假设,考虑选用哪些器材和采用何种方法进行实验。

实施实验

按小组设计的研究方案进行实验,仔细观察实验现象,记录好实验结果。

1. 试剂配制:

醋酸洋红的配制:将100 mL体积分数为45%的醋酸放入烧瓶中,加热至沸腾后,缓慢加入1 g洋红,继续加热,回流煮沸8 h,冷却后过滤备用。

培养基配制:采用MS基本培养基,并在1 000 mL培养基中添加0.4 mg 2,4-D、0.2 mg KT和4 mg IAA,调节pH至5.8。

2. 材料选取:选择未开放花蕾作为实验材料;对这些花蕾中的花药进行取样,并用醋酸洋红染色法对其染色,通过镜检来确定花药是否处于适宜的发育期(如单核期以前的花药)。

3. 材料消毒:先将适宜的花蕾用70%酒精浸泡约30 s,取出后用无菌水清洗,用无菌吸水纸吸干花蕾表面的水,再放入质量分数为0.1%的氯化汞溶液中2~4 min,取出后用无菌水冲洗3~5次。

4. 接种与培养:在无菌条件下,将消毒后的月季花蕾置于培养皿中的无菌滤纸上,用镊子剥去花萼、花冠,露出雄蕊,再用镊子夹住花丝取下花药,迅速接种到培养基上。每瓶接种7~10枚花药,在25℃和无光照条件下进行培养。在幼小植株形成后给予光照。

得出结论

观察实验现象,如花药经过20~30天培养后,会开裂,长出愈伤组织或胚状体等。将愈伤组织转移到分化培养基上培养,可形成再生植株。

建议考虑:在花药培养过程中,如果花药开裂后为胚状体,并进一步分化出幼小植株后,为什么必须尽快将这些幼小植株分开并移植到新的培养基上?

将探究结果用实验报告、照片或实物等形式与同学和老师交流。



植物组织培养是一项应用广泛的生物技术,具有许多优点。

1. 快速繁殖优良植物株系

植物组织培养具有时间短、增殖率高、能全年生产等优点,并可按照一定的生产程序操作使之实现工厂化生产。再加上培养材料和试管苗的小型化,就可以在有限的空间中培养出大量的个体。例如,兰花、桉树、杨树、秋海棠等植物,应用组织培养技术,只需要一个茎尖或一小块叶片,一年内可以增殖到1万至10万棵植株。

2. 培育农作物新品种

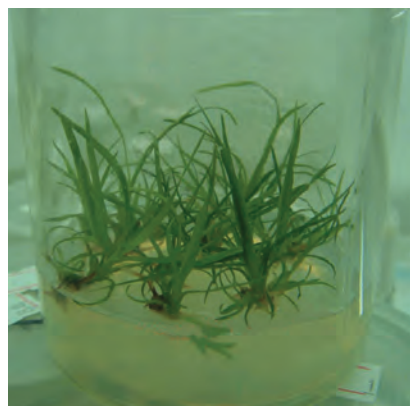
植物组织培养可为遗传育种提供理想的受体材料,又可为植物改良程序提供一种新的手段。例如,利用组织培养技术解决杂交育种中的种胚败育问题,获得了杂种子代,使远缘杂交成为可能;对花药或未授粉的子房进行离体培养,获得了单倍体植株,从而开辟了单倍体育种的新途径。

3. 保存和运输种质

植物的器官、组织、细胞在低温或超低温条件下能长期保存。将来需要时,将其取出通过组织培养,可以迅速进行繁殖。这样不仅大大减少了反复保存种质所耗费的人力、物力和财力,而且也减少了大量的种子在保存过程中因管理不善、病虫害侵害所造成的损失。

4. 获得无病毒植株

由于病毒在植物体内主要通过输导组织进行扩散,其分布并不均匀,植物的茎尖、根尖中几乎无病毒。若用茎尖或根尖进行组织培养,再结合病毒鉴定,就可以得到无病毒的植株。



文心兰的组织培养



利用叶片进行组织培养



本章自主小结

本章内容是生物学实验的重要组成部分,一方面微生物与人类的关系密切,微生物在医疗、环保、工农业生产等许多领域中得到了广泛应用,另一方面微生物的分离和培养是现代生物工程应用中必不可少的环节。此外,本章还介绍了植物组织培养的原理、该技术在农业生产上的应用等内容。通过本章的学习,我们知道了培养基的用途、种类和基本成分,明确了无菌技术的含义,消毒与灭菌的区别;重点尝试了制备牛肉膏蛋白胨固体培养基,和通过平板划线法来纯化、分离微生物;也了解了植物组织培养的基本过程,掌握了配制MS基本培养基的方法,学会合理应用脱分化、形成愈伤组织、再分化等技术,尝试了培育壮苗、移栽等露地栽培操作。

可以通过填写下表,比较消毒与灭菌的区别。

	条件	结果	常用的方法
消毒			
灭菌			

在完成表格后,思考下列问题,并尝试用概念图的方式对本章的其他内容进行小结。

1. 根据培养基的成分、种类和用途,培养基可以分成哪几类? 如何配制牛肉膏蛋白胨培养基? 什么是消毒,什么是灭菌? 一般采用什么设备对实验中的器具进行灭菌? 如何进行大肠杆菌的斜面接种和培养? 如何用平板划线法来分离和培养大肠杆菌? 为什么要在酒精灯火焰附近进行各项操作? 培养后看到的一个菌落肯定是由一个细菌生长和繁殖形成的吗?

2. 如何判断培养基的制备是否成功? 如何判断接种操作和划线纯化是否成功? 分离可分解尿素的微生物的培养基的配方有什么特点? 为什么要把培养皿倒过来放在恒温箱中培养? 为什么说涂布平板菌落计数的结果与待测样品中真正的含菌数相比往往偏低? 利用血球计数板计数时应用什么公式? 分离可分解纤维素的微生物的培养基的配方有什么特点?

3. 细胞的全能性是植物组织培养技术的基础,如何理解细胞全能性的概念? MS培养基的基本组成包括哪四类物质? 能说出植物组织培养的基本过程吗? 诱导愈伤组织形成、芽分化、生根的培养基有什么主要不同点? 为什么组织培养的各项操作过程一般要在超净工作台上进行? 为什么要对试管苗进行露地栽培? 影响植物组织培养成败的主要因素有哪些?

如果有疑难,可以和同学、老师进行探讨,也可以通过图书馆和网络,寻求问题的答案。相信你一定能够正确回答上述问题。

1. 用化学成分不清楚或不恒定的天然有机物配成的培养基称为 ()

- A. 天然培养基 B. 固体培养基
C. 合成培养基 D. 液体培养基

2. 琼脂在培养基中作为 ()

- A. 碳源 B. 氮源
C. 凝固剂 D. 生长调节剂

3. 各种培养基配制完成后一般都需要灭菌。下列关于灭菌的理解中,正确的是 ()

- A. 杀灭物体上绝大多数的细菌
B. 杀灭物体内外所有的有害细菌
C. 杀灭物体上绝大多数的微生物
D. 杀灭物体内外所有微生物

4. 在制备 MS 基本培养基时, 一般需要用质量分数为 10% 的 NaOH 溶液来调节其 pH 至 ()

- A. 7.0~7.5 B. 6.5~6.8
C. 5.6~5.8 D. 4.0~4.5

5. 高压蒸汽灭菌锅是一种常用灭菌器具, 它要达到灭菌的条件是 ()

- A. 75 kPa、115 °C、10 min
B. 75 kPa、115 °C、20~30 min
C. 100 kPa、121 °C、20~30 min
D. 100 kPa、121 °C、10 min

6. 在微生物学研究中, 常常需要配制牛肉膏蛋白胨培养基, 这种培养基具有营养丰富、配制方便等优点, 它属于 ()

- A. 选择培养基 B. 天然培养基
C. 合成培养基 D. 液体培养基

7. 农田土壤的表层中自生固氮菌的含量比较多。微生物学工作者用表面土壤制成的稀泥浆, 接种到特制的培养基上培养, 可将自生固氮菌与其他细菌分开。那么, 对培养基的要求是 ()

- ①加抗生素 ②不加抗生素 ③加氮素
④不加氮素 ⑤加葡萄糖 ⑥不加葡萄糖
⑦在 37 °C 恒温箱中培养 ⑧在 28~30 °C 温度下培养

A. ①③⑤⑦ B. ②④⑥⑧

C. ②④⑤⑧ D. ①④⑥⑦

8. 下列关于细菌菌落的叙述中, 正确的是 ()

- A. 每个菌落由大量的不同种的细菌组成
B. 细菌在液体培养基中才能形成菌落
C. 菌落的特征可以作为鉴定菌种的重要依据
D. 细菌形成的菌落都很大, 边缘不整齐

9. 下列有关植物组织培养技术的描述中, 正确的是 ()

- A. 离体组织有光合作用能力, 为使培养效果达到最好, 常选用无色透明锥形瓶培养
B. 植物组织培养所用的合成培养基中, 蔗糖是离体组织赖以生存的能源和碳源
C. 植物组织培养过程中, 细胞进行无性生殖, 没有细胞的分化
D. 愈伤组织细胞具有很强的分裂能力, 但没有分化的能力

10. 植物组织培养依据的原理、培养过程的顺序及诱导的植物激素分别是 ()

- ①植物体细胞全能性 ②离体植物器官、组织或细胞 ③根、芽 ④生长素和细胞分裂素 ⑤生长素和乙烯 ⑥愈伤组织 ⑦再分化 ⑧脱分化 ⑨植物体

- A. ①、②⑧⑥⑦③⑨、④
B. ①、②⑦⑥⑧③⑨、⑤
C. ①、⑥②⑨⑧③⑦、⑤
D. ①、②⑨⑧⑥⑦③、④

11. 用于植物组织培养的各种培养基中除包含植物激素、蔗糖、维生素等有机物外, 还应有 _____, 且整个操作过程应在 _____ 条件下进行。

12. 在 MS 基本培养基中添加一定量的植物激素, 如添加 6-BA 和 2,4-D 可配制诱导愈伤组织形成的培养基, 添加 6-BA 和 NAA 可配制 _____ 的培养基, 添加 NAA 可配制 _____ 的培养基。

第二章

发酵技术实践

腐乳坯上的毛霉

几千年前,我们的祖先就利用发酵技术生产酒、酱和醋等。今天,发酵技术在生产上的运用更为广泛,如食品生产、药物研发、垃圾处理、能源开发、环境保护等都离不开发酵技术。在生活中,我们都食用过果酒、果醋、腐乳或酸奶等发酵食品。你想尝试运用发酵技术自制这些食品吗?这会使我们的生活更加丰富多彩哦。

- 运用发酵技术加工食品
- 测定发酵食品中的特定成分

第一节 运用发酵技术加工食品

当我们有机会参观生产啤酒或腐乳的车间时，会发现发酵与食品加工有着密切而广泛的联系。目前，人们把利用微生物的生命活动来制备微生物菌体或其代谢产物的过程统称为发酵(ferment)。而利用微生物的发酵作用，大规模生产发酵产品的技术称为发酵技术。发酵技术在生产单细胞蛋白(如酵母菌)、含醇饮料(如果酒、白酒、啤酒)、发酵乳制品(如酸奶、奶酪)、调味品和发酵食品(如味精、醋、腐乳、泡菜)、甜味剂(如木糖醇、糖精)、食品添加剂(如柠檬酸、赖氨酸)等方面具有广泛的应用。

发酵技术实践需要掌握发酵技术与食品加工的基本技能，需要学习酵母菌、醋酸菌、乳酸菌和毛霉等微生物的生物学知识。

果酒的酿制

果酒是以各种果汁为原料，通过微生物发酵而制成的含有酒精的饮料，包括葡萄酒、苹果酒、梨酒等。葡萄酒是以葡萄为原料酿造而成的，酒精含量约为10%~12%。由于酿造工艺的不同，葡萄酒又可分为红葡萄酒(葡萄汁和葡萄皮渣混合酿造)和白葡萄酒(仅用葡萄汁酿造)。

在葡萄酒等果酒的生产中，酿酒酵母菌发挥了重要的作用。酵母菌在厌氧条件下可将葡萄汁中的葡萄糖分解并产生酒精，当酒精浓度达到一定的生产要求后，即可得到葡萄酒产品。葡萄酒的生产一般是用成熟葡萄果实作为原料，经过清洗、榨汁、酒精发酵、陈酿(自然老熟)等制作过程，最后装瓶(图 II-1)。

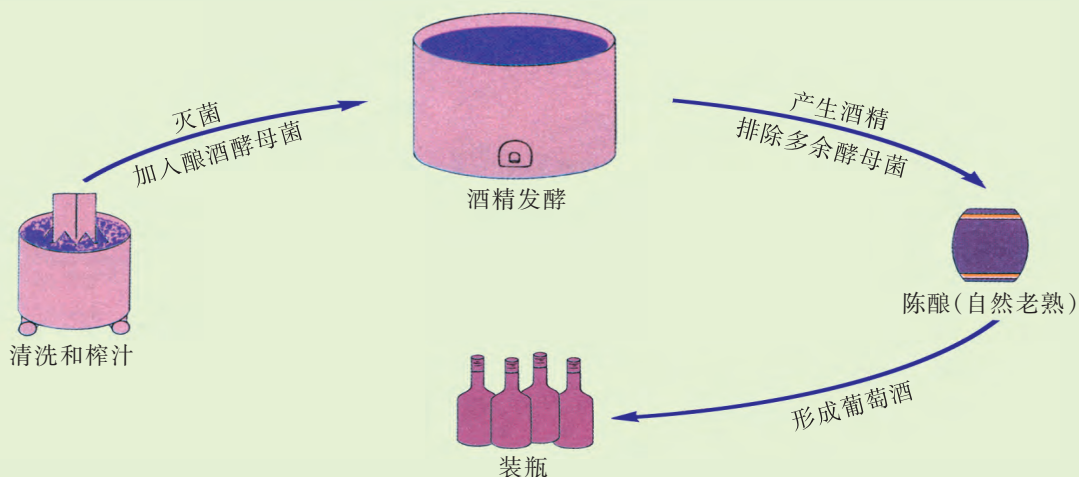


图 II-1 酿制葡萄酒的主要过程

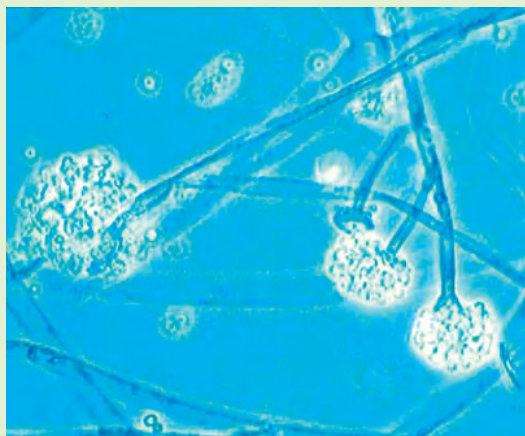
在葡萄酒等果酒的生产中，还广泛使用果胶酶和蛋白酶等酶制剂。果胶酶的应用有利于葡萄的榨汁等，蛋白酶的应用能促进蛋白质的水解，使酒体清澈透明。

毛霉的生物学特性

毛霉(图 II-II)是一类真菌,其菌丝无隔、多核,呈分枝状,在土壤、空气等环境中广泛存在。毛霉的菌丝在生长初期为白色,后期呈灰白色至黑色。毛霉菌落的颜色一般呈灰白色或浅褐色,质地疏松,高度在 1 cm 以内。毛霉在腐乳坯或煮熟的大豆粒上生长旺盛。



毛霉的菌落



毛霉的孢子囊

图 II-II 一种毛霉的菌落和孢子囊

毛霉产生的淀粉酶、蛋白酶和脂肪酶,不仅能使大豆中的淀粉糖化,还有分解大豆蛋白和脂肪的功能。以毛霉为主的多种微生物参与腐乳的发酵过程,使其中的蛋白质等大分子物质分解为氨基酸、多肽等小分子物质。

腐乳是我国传统的特色发酵食品之一。民间传统制作腐乳的方法与工业生产一样,都是主要依靠毛霉等进行发酵。

工业生产腐乳

工业上批量生产腐乳的步骤主要包括接种孢子、培养与晾花、压坯与装坛等。

接种孢子——将豆腐切成小块(腐乳坯),让豆腐上长出毛霉。先用蒸汽消毒笼格,冷却后用毛霉孢子悬液喷洒笼格内壁,然后把腐乳坯均匀竖放在笼格内,块与块之间间隔约 1 cm,再用喷枪向腐乳坯上喷洒毛霉孢子悬液,使每块腐乳坯都沾上毛霉孢子悬液。

培养与晾花——将放有已接种腐乳坯的笼格放入培养箱。在约 20℃下培养 20 h 后,每隔 6 h 调换上下层,使各层温度均匀,并更换新鲜空气。培养 44~48 h 后,腐乳坯上的毛霉呈棉絮状,菌丝下垂,顶端已长出孢子囊,菌丝已包围腐乳坯,此时将其从笼格中取出,待热量和水分散失,腐乳坯自然冷却,这个过程即称为晾花。

压坯与装瓶——将冷却的腐乳坯块上互相依连的菌丝分开,用手指轻轻地在腐乳坯块的表面揩涂一遍,然后将其装入玻璃瓶内。将腐乳坯块沿瓶壁呈同心圆方式一层一层地向内侧放置,摆满一层后稍稍压平,撒一层食盐,使其自然含盐量平均约为 16%。为使上下层含盐均匀,腌制 3~4 天时需加盐水淹没坯面,称之为压坯。一般腌制周期,冬季约为 13 天,夏季约为 8 天。不同类型腐乳的制作还与使用的调料有关。装瓶时可添加不同的调料以获得不同风味的腐乳。例如,在调料中,料酒的含量一般控制在 12% 左右,添加黄酒的,称为醉方(白腐乳);添加红曲的,称为红方(红腐乳)等。

实践:**(一) 制作葡萄酒**

1. 取成熟的紫色葡萄清洗干净并沥干水备用。清洗葡萄时,要连果柄一起在清水中轻轻漂洗,避免损伤葡萄果皮。

建议考虑: 在酵母菌的自然发酵过程中,起发酵作用的主要是附着在葡萄果皮上的野生型酵母菌(图 2-1)。此外,葡萄果皮上还附着有其他的微生物,如制醋所需要的醋酸菌。

2. 把洗净的葡萄切成小块或连皮榨成葡萄汁,移入有盖的、洁净的大广口瓶中,发酵液总量不要超过广口瓶体积的 2/3,盖上瓶盖。

建议考虑: 酵母菌进行酒精发酵时,适宜温度一般是 18~25℃。酵母菌是兼性厌氧微生物,即在有氧条件下,能进行有氧呼吸并大量繁殖新个体;在无氧条件下,则进行酒精发酵。

有氧呼吸的反应式为:



无氧呼吸的反应式为:



3. 每隔一段时间轻轻旋松瓶盖放气,当葡萄皮的色素进入葡萄汁时,溶液呈现深红色。10~12 天可完成葡萄酒的制作。整个过程注意须无菌操作。

(二) 制作葡萄醋

1. 取适量制成的葡萄酒倒入一只大的、洁净的广口瓶中,并加入刚刚制取的新鲜葡萄汁,利用醋酸菌制作葡萄醋。

建议考虑: 醋酸菌是生产果醋的主要发酵菌。在果酒基础上的果醋发酵,是一个有氧发酵的过程,在充分供氧的条件下,醋酸菌能将酒精转化为醋酸。

醋酸菌进行醋酸发酵的反应式可以归纳为:



2. 制作葡萄醋时,将纱布罩在大广口瓶上并把瓶口扎紧,将大广口瓶置于清洁、无尘或无菌条件下避光培养(温度为 30~35℃),发酵 7~8 天,就可以得到葡萄醋。

讨论:

1. 在酿制葡萄酒的过程中,每隔一段时间旋松瓶盖的作用是什么?

2. 利用葡萄酒制作葡萄醋的原理是什么?

在果汁发酵制作果酒和果醋的过程中,为提高果酒的制

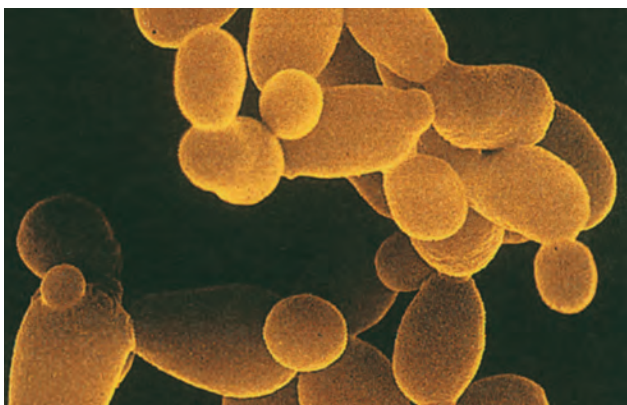


图 2-1 一种酵母菌



图 2-2 重铬酸钾

作效果,可以适当加入培养在质量分数为 5%的葡萄糖溶液中的酵母菌;为提高果醋的制作效果,也可直接加入经过分离培养的醋酸菌。

制作好的葡萄酒会散发出浓郁的酒香,这与产生的酒精有关。要确认是否真有酒精产生,可用重铬酸钾(图 2-2)来验证。重铬酸钾($K_2Cr_2O_7$)是一种橙红色的强氧化剂,在酸性条件下能与酒精发生反应。例如,取自制的葡萄酒液 2 mL,滴入 3 滴物质的量浓度为 3 mol/L 的硫酸溶液,振荡均匀后再滴加 3 滴常温下饱和的重铬酸钾溶液,振荡后产生的产物是绿色的硫酸铬(这也是检测司机是否酒驾的方法之一)。因为重铬酸钾对皮肤和眼等都有很强的伤害性,并对内脏也有损伤作用,在进行实验操作时,要注意穿防护衣,戴防护手套和防护目镜。

在日常生活中,人们经常食用的发酵食品有很多,腐乳是以豆腐为原料,经过发酵加工而成的口味鲜美、风味独特、营养丰富、价格低廉的深受人们喜爱的发酵食品之一。工业化生产腐乳是在传统的民间自制腐乳的基础上发展起来的。

我国民间有许多制作腐乳的方法记载。例如,有资料记载了自制腐乳的简单方法:将水豆腐静置一夜,任其自然沥干水分,然后切成一寸见方的豆腐块;选一木板或木屉,上面稀疏地铺上稻草,将豆腐块置于其上,任其自然发酵,待豆腐块上的霉菌倒伏,发酵即已完成,这时便可将食盐、辣椒粉、五香粉等调料与豆腐块拌和入坛;待坛里装满,可淋一些白酒,以增加其香味;坛沿用水密封,腌制数月后取出食用,味道更佳。你不想参照上述方法尝试自制腐乳?

边做边学

豆制品的发酵加工——制作腐乳

实践:

1. 将豆腐切成大约 $4\text{ cm} \times 4\text{ cm} \times 1.5\text{ cm}$ 的小块,微微晾干,制成腐乳坯(图 2-3)。在晾干过程中,空气中的毛霉孢子会落到腐乳坯上。

建议考虑: 通过在腐乳坯上接种毛霉可以加快制作腐乳的过程。毛霉生长的最适温度为 $15\sim 18^\circ\text{C}$ 左右。毛霉的生长发育大致分为三个阶段:孢子萌发阶段、菌丝生长阶段、孢子形成阶段。在发酵过程中,毛霉分泌蛋白酶、淀粉酶、谷氨酰胺酶、脂肪酶等多种酶,与腌制腐乳坯的调料中的微生物协同作用,使腐乳坯中的蛋白质缓慢水解,生成多种氨基酸和多种有机酸等,形成鲜、香等特有的风味。

2. 将晾制好的腐乳坯竖立放置在清洁的容器内,彼此之间间隔约 1 cm,与容器内壁之间留有空隙,加盖,但要与外界相通,以便通气散热,有利于毛霉生长。若利用空气中的毛霉孢子自然接种,培养时间为 10~15 天。

3. 定时观察腐乳坯上是否出现白色的毛霉。如果发现不仅有白色的毛霉,还有杂菌,应重新试做。在腐乳坯表面开始长有白色毛绒状的菌丝后,可适当翻动腐乳坯,以保证腐乳坯各部分都有毛霉生长(图 2-4)。当菌丝开始变成淡黄色,并有大量灰褐色孢子形成时,便可停止发酵。从容器内取出腐乳坯,用食盐水清洗,然后用食盐腌制 10 天左右。整个过程尽可能做到无菌操作。



图 2-3 制作腐乳坯



图 2-4 长有毛霉的腐乳坯



建议考虑:若发现毛霉生长不够理想,或有部分杂菌生长,在丢弃剩余腐乳坯之前,可挑取毛霉生长良好部位的白色菌丝,分离培养后再接种到新的腐乳坯上。

4. 按照自己喜欢的口味配制调料。调料一般主要包括水、料酒和香辛料(如八角、姜)等。加入料酒(含量一般控制在 12%左右)的目的是抑制杂菌的生长,也使腐乳具有独特的香味;加入香辛料的目的是调节风味,也有防腐的作用。将腌制后的腐乳坯装入瓶内,浸没在配制好的调料中数月(图 2-5)。装瓶后腐乳坯上和配料中的各种微生物会继续发酵,如曲霉具有加速分解蛋白质的功能,形成色、香、味俱佳的腐乳。



图 2-5 腐乳装瓶

讨论:

1. 在制作腐乳的过程中,不同的调料与腐乳的风味之间有什么关系?

2. 工业化生产腐乳时,采用直接将毛霉孢子接种到腐乳坯上的方法,这对腐乳的制作会有什么影响?

微生物在食品生产中的应用十分广泛。例如,乳品厂利用乳酸菌发酵制造酸奶。乳酸菌在自然界中广泛分布于空气、

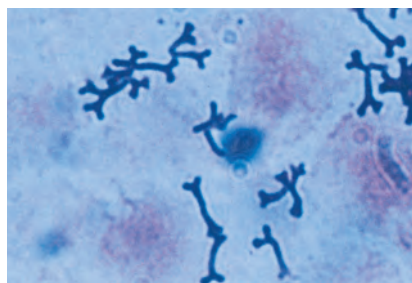


图 2-6 一种双歧杆菌

土壤、植物体表等,只有在厌氧条件下才能进行乳酸发酵。常见的乳酸菌在分类学上多属于链球菌属、乳酸杆菌属、双歧杆菌属(图 2-6)等。在畜牧业上常利用乳酸菌发酵制造青贮饲料,日常生活中常利用乳酸菌发酵腌制泡菜等。

我国制作泡菜的历史可以追溯到 1 400 多年以前。北魏贾思勰在《齐民要术》中记载:“作盐水,令极咸,于盐水中洗菜,即内壅中。”这里说的其实就是制作泡菜的简单过程。

边做边学

蔬菜的发酵加工——制作泡菜

实践:

1. 准备容器并配制泡菜液:用清水清洗制作泡菜的容器并晾干。用冷却的沸水加适量的盐和糖配制泡菜液(图 2-7)。

建议考虑:可在泡菜液中添加调料,以形成独特的风味。调料包括白酒、料酒、辣椒、八角、花椒、胡椒等。

2. 加工蔬菜:将洗净的萝卜、大白菜、卷心菜、甘蓝、豇豆、莴苣、芹菜、辣椒等加工成条状、片状或块状,沥干或晾干待用(图 2-8)。

3. 制作泡菜:将加工好的蔬菜装入瓶中,压紧,注入制备好的泡菜液至刚好浸没原料,密封容器(图 2-9),置于阴凉处自然发酵 7~10 天。

建议考虑:蔬菜上一般会带有乳酸菌、酵母菌等微生物。在制作泡菜的过程中,乳酸菌等微生物分解有机物产生乳酸等物质,这些物质相互作用,使得泡菜带有特殊的酸味和香气。



图 2-7 准备容器



图 2-8 加工蔬菜



图 2-9 制作泡菜

讨论:

1. 根据泡菜的制作过程,分析泡菜为什么会酸化。如何用实验的方法说明微生物在泡菜制作过程中发挥了重要作用?

2. 泡菜液中加入食盐量的多少与泡菜的酸度有什么关系?

泡菜是我国人民喜爱的一类食品。一年四季交替上市的蔬菜品种很多,其中,大白菜、黄瓜、苦瓜、菜瓜、莴苣、辣椒、大蒜、豇豆、卷心菜、萝卜等,都是制作泡菜的好材料。新鲜的蔬菜制成泡菜后一般能保存较长时间。

一、单项选择题

1. 关于利用葡萄为原料制作果酒的过程,下列描述正确的是 ()

- A. 不添加酵母菌不可能制作出葡萄酒
- B. 在无氧条件下酵母菌不能大量繁殖
- C. 在有氧条件下酵母菌进行酒精发酵
- D. 用重铬酸钾可鉴定出发酵液中的酒精

2. 下列关于果醋的制作,错误的是()

A. 醋酸菌是好氧菌,所以在制作果醋的过程中需要通气

B. 醋酸菌分布很广,生长温度要求一般在 50℃ 以上

C. 醋酸菌能够将果酒中的酒精转变成醋酸

D. 当氧气、糖源充足时,醋酸菌可将葡萄中的糖分解为醋酸

3. 下列关于果酒和果醋制作的叙述中,错误的是 ()

A. 参与发酵的微生物都含有线粒体

B. 发酵过程中培养液 pH 都会下降

C. 制作果酒时瓶口要密闭,而制作果醋时需要通气

D. 果酒制成后须将其移至温度略高的环境中制作果醋

4. 在果酒、果醋的制作过程中,发酵条件的控制至关重要,下列叙述正确的是 ()

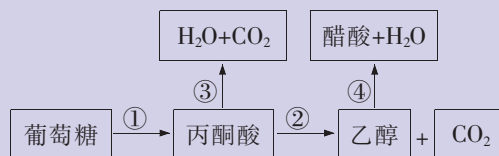
A. 葡萄汁要装满广口瓶,造成无氧环境有利于发酵

B. 在葡萄酒发酵过程中,每隔一段时间将瓶盖旋松一次,放出二氧化碳气体

C. 果酒发酵时温度控制在 30℃, 果醋发酵时温度控制在 20℃

D. 在果醋发酵过程中,通气充分不利于醋酸菌的发酵作用

5. 下图表示果酒和果醋制作过程中的物质变化过程,下列叙述正确的是 ()



A. 过程①和②都只能发生在缺氧条件下

B. 过程①和③都只发生在酵母细胞的线粒体中

C. 过程③和④都需要氧气的参与

D. 过程①~④所需的最适温度基本相同

6. 在家庭中用鲜葡萄制作果酒时,正确的操作是 ()

A. 让发酵装置接受光照

B. 给发酵装置适时排气

C. 向发酵装置通入空气

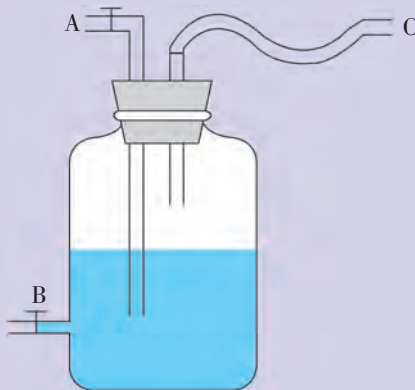
D. 将发酵装置放在 45℃ 处

二、技能增进题

判断与选择 判断是人脑反映事物之间联系和关系的一种思维形式,它是在概括基础上形成的一种对事物之间关系的思维形式之一。选择是在一系列不确定的对象中,根据判断从选项中选择适合的决定。在生物学实验中,判断与选择使用什么样的器具非常重要。

根据果酒制作的原理,判断:为什么可以选取右图所示器具制作果酒? 图中 A、B、C 三个开口在实验中分别起到什么作用? 为什

么开口 C 要通过长而弯曲的胶管与瓶身相连?



发酵与奶酪生产

奶酪是人类最古老的食品之一,全世界大约有 2 000 多种不同类型的奶酪。通常,根据质地或硬度,将奶酪划分成软质奶酪、半软质奶酪、硬质奶酪、特硬质奶酪。

奶酪是将牛奶通过乳酸发酵生产的,发酵过程中产生的凝乳酶使牛奶中的蛋白质凝固起来,形成凝乳。凝乳酶是牛胃中的一种酶,可促进凝乳形成,现在可以由基因工程技术构建的工程菌生产。凝乳形成后,加热并压缩以去除其中多余的水分,再经过加盐、成熟过程制成奶酪。奶酪最后的硬化是成熟过程所起的作用。软质奶酪成熟只要 1~5 个月,硬质奶酪要 3~12 个月,而特硬质奶酪则要 12~16 个月。一些带有特殊风味的奶酪,还需采用独特的工艺。



各种类型的奶酪



走近职业

发酵工程研究人员

发酵工程是生物技术的重要组成部分,是生物技术产业化的重要环节。发酵工程研究人员主要研究微生物菌种选育的方法、发酵的基本过程、常用发酵产品的生产工艺、发酵代谢的调控和优化等。发酵工程研究人员一般应具有大学发酵工程专业本科以上学历。

(图为发酵工程研究人员在进行发酵过程的代谢调控)



第二节 测定发酵食品中的特定成分

研究某种特定成分在不同生物材料中的含量,对于指导食品的发酵、加工与生产以及安全食用等都具有重要意义。例如,亚硝酸盐广泛地存在于自然环境中,通过测定了解食品中亚硝酸盐的含量是否达到中毒剂量,可避免食物中毒事件的发生。为此,我国专门颁布了《中华人民共和国食品安全法》、《食品添加剂使用标准》等,规范食品加工过程中有关物质含量的要求。

测定发酵食品中的特定成分,需要掌握特定成分的相关知识和测定方法。例如,要测定泡菜中亚硝酸盐的含量,就需要了解亚硝酸盐的化学特点、生理功能和含量标准,需要学习测定泡菜中亚硝酸盐的方法等。

亚硝酸盐及部分食品中亚硝酸盐的限量标准(以 NaNO_2 计)

亚硝酸盐(nitrites)主要指亚硝酸钠和亚硝酸钾,它们为白色粉末,易溶于水,其外观及味道都与食盐相似。亚硝酸盐常用于各种染料的生产,也作为防冻剂使用,常称为“工业用盐”。亚硝酸盐广泛存在于自然环境中,在粮食、豆类、蔬菜、肉类、蛋类等中都可以检测出,在食品加工过程中也会产生亚硝酸盐。我国针对食品中的亚硝酸盐残留量制定了严格的限量标准(表 II-1)。

表 II-1 我国食品中亚硝酸盐限量标准(单位:mg/kg)
(摘自 2010 年《食品添加剂使用标准》)

食品名	限量标准	食品名	限量标准
食盐(精盐)、牛乳粉	≤ 2	油炸肉类	≤ 30
鲜肉类、鲜鱼类、粮食	≤ 3	中式火腿	≤ 30
蔬菜	≤ 4	咸肉、板鸭	≤ 30
鲜蛋类	≤ 5	肉类罐头	≤ 50
香肠(腊肠)、香肚、酱腌菜	≤ 20	西式火腿(熏烤、烟熏、蒸煮火腿)	≤ 70

亚硝酸盐不仅具有一定的毒性,还是一种致癌物质。食物中的亚硝酸盐被摄入人体后,大部分可随尿排出,只有在特定条件,如在某些微生物作用下被转变成亚硝胺(致癌物)。据研究,食道癌的发病率与人体摄入的亚硝酸盐量呈正相关性。孕妇如食用了一定量的亚硝酸盐,在体内产生的有毒物质能够透过胎盘进入胎儿体内,对胎儿有致畸作用。6个月以内的婴儿对亚硝酸盐特别敏感,临床上婴儿所患的“高铁血红蛋白症”就是因食用含亚硝酸盐的量过高的食物引起的。

亚硝酸盐中毒发病急速,中毒的主要特点是由于组织缺氧引起的紫绀现象,如口唇、舌尖、指尖青紫;重者眼结膜、面部及全身皮肤青紫,头晕、头疼、乏力、心跳加速、嗜睡或烦躁、呼吸困难、恶心、呕吐、腹痛、腹泻;严重者昏迷、惊厥、大小便失禁,因呼吸衰竭而死亡。

系列亚硝酸钠标准显色液的配制

亚硝酸钠标准溶液(200 $\mu\text{g}/\text{mL}$):准确称取 0.1 g 于硅胶干燥器中干燥 24 h 的亚硝酸钠,加水溶解后定容到 500 mL。

亚硝酸钠标准使用液(5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$):临用前用刻度移液管吸取亚硝酸钠标准溶液 5.0 mL,置于 200 mL 容量瓶中,加水稀释至 200 mL 刻度线处。

配制系列亚硝酸钠标准显色液:用刻度移液管吸取 0.2 mL、0.6 mL、1.0 mL、1.5 mL、2.0 mL、2.5 mL 亚硝酸钠标准使用液(相当于 1.0 μg 、3.0 μg 、5.0 μg 、7.5 μg 、10.0 μg 、12.5 μg 亚硝酸钠),分别加入 6 支 50 mL 比色管;再取一支 50 mL 比色管加蒸馏水作为空白对照。在各比色管中分别加入 2.0 mL 对氨基苯磺酸溶液,混合均匀后静置 3 min,再分别加入 1.0 mL 的盐酸萘乙二胺溶液(2 g/L),添加蒸馏水使各比色管内溶液总体积为 50.0 mL,混合均匀后观察亚硝酸钠溶液颜色的梯度变化(图 II-III)。

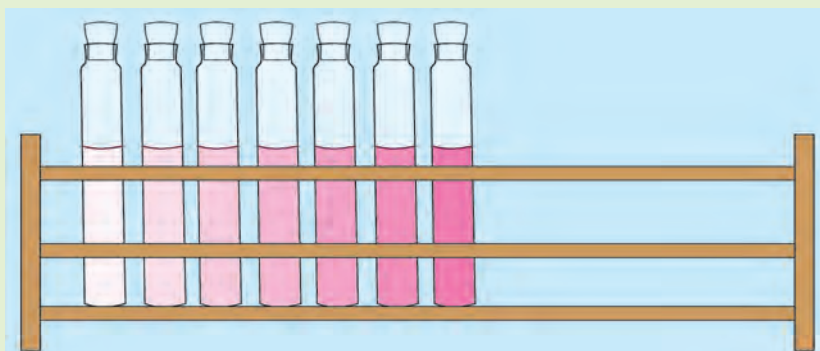


图 II-III 亚硝酸钠标准显色液

维生素 C 及常见食物中维生素 C 的含量

维生素 C,又称为抗坏血酸,是一种水溶性维生素。维生素 C 能促进人体的生长发育,增强人体对疾病的抵抗能力,增强肝脏的解毒能力,还能维持牙齿、骨骼、血管和肌肉等的正常功能。人体缺乏维生素 C 时会患坏血病,其症状表现为创口溃疡不易愈合,骨骼和牙齿易折断或脱落,毛细血管通透性增大,皮下组织、黏膜等处易出血等。

人体所需维生素 C 必须从食物中摄取。维生素 C 广泛存在于新鲜的水果和蔬菜中(表 II-II)。

表 II-II 常见食物中维生素 C 含量(单位:mg/100 g)

食物名称	维生素 C 含量	食物名称	维生素 C 含量
枣	540	马铃薯	16
辣椒	185	大葱	14
山楂	89	胡萝卜	13
桂圆	60	黄瓜	9
柿子	49	番茄	8
菠菜	39	丝瓜	8
韭菜	39	桃	7
甘蓝	38	香蕉	6
白萝卜	30	苹果	4
甘薯	30	西瓜	3

研究目的:

学习测定食品中亚硝酸盐的方法。

推荐器材:

泡菜;pH试纸,滤纸,漏斗,量筒,容量瓶,烧杯,移液管,50 mL比色管,试管架,托盘天平(图2-10),恒温水浴锅(图2-11),榨汁机;亚硝酸钠,亚铁氰化钾,乙酸锌,硼酸钠,对氨基苯磺酸,盐酸萘乙二胺(又称为N-1-萘基乙二胺盐酸盐),氢氧化铝,氢氧化钠,盐酸等。



图2-10 托盘天平

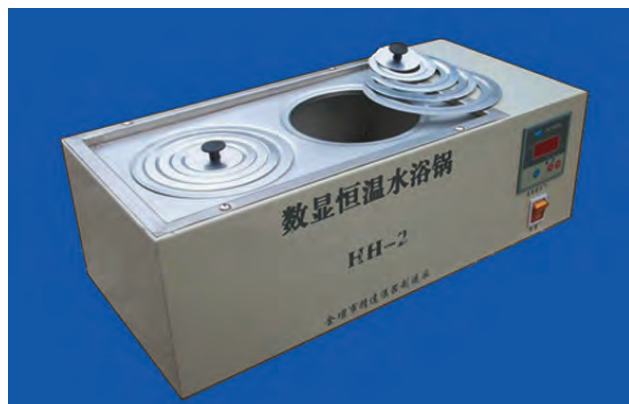


图2-11 恒温水浴锅

研究指导:

1. 问题与假设:小组查阅有关食物中亚硝酸盐的产生过程及其危害的资料,提出测定泡菜中亚硝酸盐含量的问题。针对问题,作出相应的假设。

2. 设计与实验:根据问题与假设,小组讨论并设计测定泡菜中亚硝酸盐的方案。

建议考虑:我国《食品添加剂使用标准(GB/T 5009.33-2003)》中规定了测定食品中亚硝酸盐含量可采用盐酸萘乙二胺法等方法。盐酸萘乙二胺法的测定原理:样品经过沉淀蛋白质、去除脂肪后,在弱酸性条件下亚硝酸盐与对氨基苯磺酸重氮化后,再与盐酸萘乙二胺形成玫瑰红色化合物。其最大吸收波长为538 nm,且色泽深浅在一定范围内与亚硝酸盐含量呈正比,可与系列亚硝酸盐标准显色液比较并确定样品中亚硝酸盐含量。

(1)配制试剂(实验用水应采用蒸馏水,试剂应采用杂质比化学纯试剂更少的分析纯试剂)

称取5.0 g硼酸钠,溶于100 mL热水中,冷却后备用,配制成硼砂饱和溶液;

称取106.0 g亚铁氰化钾,用水溶解,并稀释至1 000 mL,配制成亚铁氰化钾溶液;

称取220.0 g乙酸锌,加30 mL冰醋酸溶于水,并稀释至

1 000 mL, 配制成乙酸锌溶液;

称取 0.4 g 对氨基苯磺酸, 溶于 100 mL 质量分数为 20% 的盐酸中, 置棕色瓶中, 避光保存, 配制成对氨基苯磺酸溶液 (4 g/L);

称取 0.2 g 盐酸萘乙二胺, 溶解于 100 mL 蒸馏水中, 混匀, 避光保存, 配制成盐酸萘乙二胺溶液 (2 g/L)。

亚硝酸钠标准溶液 (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$): 准确称取 0.1 g 于硅胶干燥器中干燥 24 h 的亚硝酸钠, 加水溶解后定容到 500 mL。

亚硝酸钠标准使用液 (5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$): 临用前用刻度移液管吸取亚硝酸钠标准溶液 5.0 mL, 置于 200 mL 容量瓶中, 加水稀释至 200 mL 刻度线处。

(2) 对泡菜样品进行测定前处理

称取 5.0~10.0 g 泡菜, 经榨汁机粉碎 (图 2-12)、过滤 (图 2-13) 后, 置于 50 mL 烧杯中, 加 12.5 mL 硼砂饱和液, 搅拌均匀, 用约 300 mL 70 $^{\circ}\text{C}$ 左右的热热水将样品洗入 500 mL 容量瓶中, 于沸水浴中加热 15 min, 冷却至室温。边转动容量瓶边加入 5 mL 亚铁氰化钾溶液, 摇匀, 再加入 5 mL 乙酸锌溶液, 以沉淀蛋白质。最后加水至 500 mL 刻度线处摇匀, 放置 0.5 h, 再次过滤, 滤液 (样品液) 备用。

建议考虑: 对于含油脂多的样品, 可除去提取液中的上层油脂; 对于有色样品可用氢氧化铝溶液脱色后用于测定。



图 2-12 用榨汁机粉碎泡菜

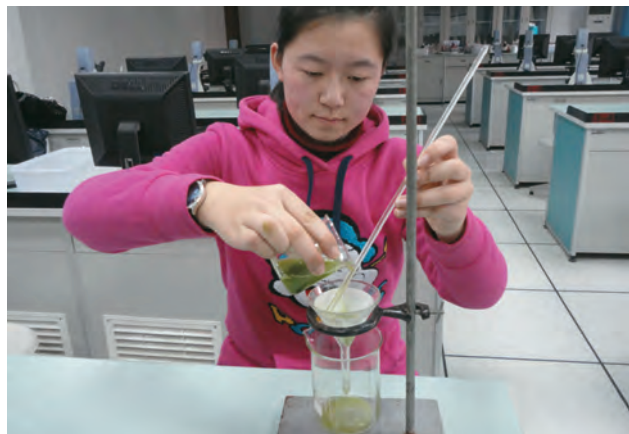


图 2-13 过滤

(3) 测定样品中的亚硝酸盐含量

吸取 40.0 mL 上述样品液于 50 mL 比色管 (有塞) 中, 向样品管中加入 2 mL 对氨基苯磺酸溶液 (4 g/L), 混匀, 静置 3~5 min, 加入 1 mL 盐酸萘乙二胺溶液 (2 g/L), 加蒸馏水至 50 mL 比色管的刻度线处, 混匀, 静置 15 min, 观察样品颜色的变化。配制系列亚硝酸钠标准显色液 (具体配制见本教科书第 46 页“系列亚硝酸钠标准显色液的配制”)。



亚硝酸钠是一种有毒物质。

建议考虑：采用刻度移液管或自动取液器移取各种溶液时，参照“附录2 实验试剂的配制”进行操作。

(4)与亚硝酸钠标准显色液进行比对

比较样品液和亚硝酸钠标准显色液的颜色，可粗略地确定样品中的亚硝酸钠含量。

建议考虑：若需进一步确定样品中亚硝酸钠的精确含量，可采用分光光度计测定波长 538 nm 处各个样品的吸光度，对系列亚硝酸钠标准显色液进行同样的测定，并将结果进行对照，便可确定样品中亚硝酸钠的精确含量。

3. 交流与合作：在设计和实施实验的过程中，和其他小组积极交流，进一步完善本组的计划。小组成员分工合作。

4. 结论与反思：分析实验数据，得出研究结论。

深入研究：

尝试设计实验，测定同种泡菜因腌制时间长短的不同所导致的亚硝酸盐含量的差异。

食物是人体摄入亚硝酸盐的主要来源。在日常生活中，若将亚硝酸盐误作为食盐食用或大量食用富含亚硝酸盐的食物（如未腌制好的腌菜、泡菜）时，就可能发生急性亚硝酸盐食物中毒。导致人发生亚硝酸盐中毒的剂量一般为 0.3~0.5 g，致死剂量为 3 g。亚硝酸盐中毒的主要原因是亚硝酸盐进入人体血液后，能将正常携氧的低铁(Fe^{2+})血红蛋白氧化为高铁(Fe^{3+})血红蛋白，使高铁血红蛋白失去携带氧气的的能力，导致组织细胞缺氧，出现亚硝酸盐中毒现象。

确切地知道某种化学物质在食品加工过程中含量的变化，对指导合理膳食、均衡营养等，具有重要的参考价值。在日常生活中不少青少年喜欢食用烧烤食品(图 2-14)，据测定，肉类食品在烧烤过程中会产生苯并芘等有害物质。

18 世纪，在那些远离陆地而缺乏新鲜水果和蔬菜的远洋航行的水手中，流行着一种被称为坏血病的疾病。直到 1911 年，人类才确定这是因缺乏维生素 C 而引发的。

研究表明，动物一般可以利用体内葡萄糖代谢途径来合成维生素 C，但人类、猿猴等无法自行合成维生素 C，需要通过食物来提供。在各种蔬菜、水果中，维生素 C 的含量其实并不少。例如，青辣椒、橙、葡萄汁和枣都富含维生素 C。

有研究认为，热、光、烟等因素会破坏维生素 C，加热烹调蔬菜也会使其中的维生素 C 含量大幅度减少。那么，腌制蔬菜会不会导致蔬菜中的维生素 C 含量减少呢？



图 2-14 烧烤食品

研究目的:

探究发酵食品(如泡菜)中维生素 C 含量的变化。

推荐器材:

蔬菜及其腌制成的泡菜;试管,漏斗,研钵,滤纸,针筒,铁架台,水果刀;维生素 C 片,2,6-二氯酚溶液等。

研究指导:

1. 阅读背景知识:维生素 C 是一种强还原剂,它能够将蓝色的 2,6-二氯酚溶液还原成无色。为了检测某种果汁中维生素 C 含量的多少,有人设计了如图 2-15 的实验装置,并实施了实验。

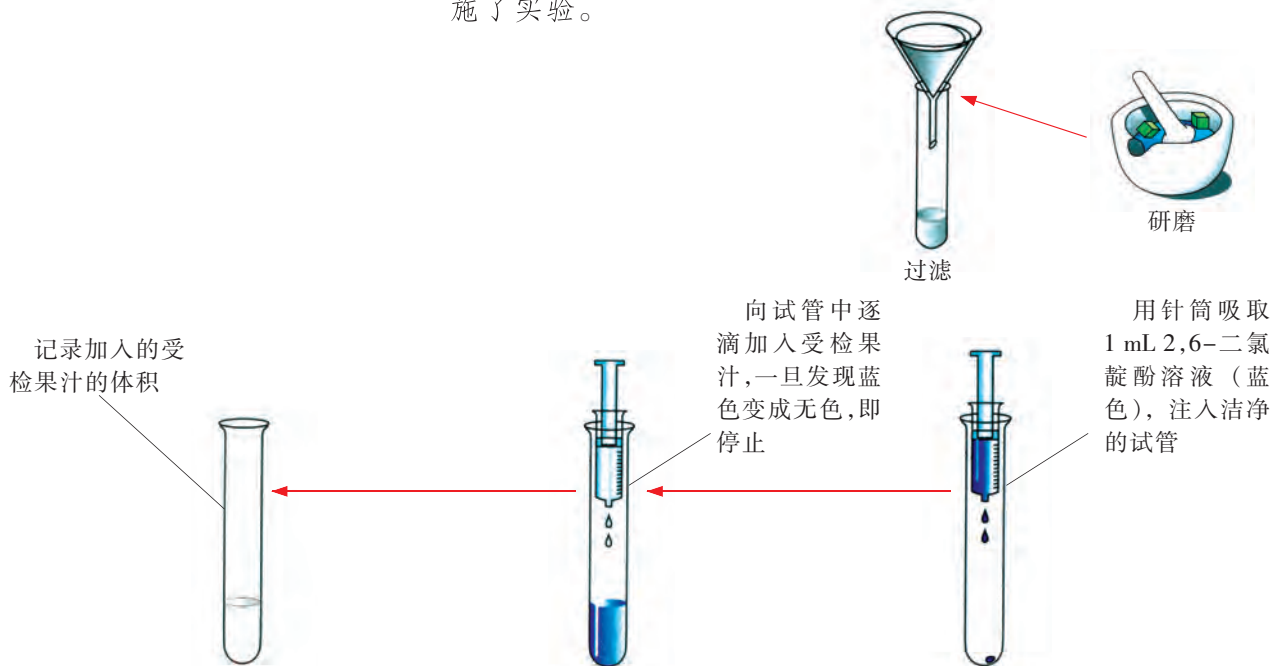


图 2-15 检测果汁中维生素 C 含量的实验示意图

2. 问题与假设:小组讨论并提出一个有关蔬菜(如萝卜)在腌制成泡菜的过程中维生素 C 含量变化的问题。针对问题,作出相应的假设。

3. 设计与实验:根据假设,利用推荐器材设计并实施实验。

建议考虑:药用维生素 C 片含有定量的维生素 C。

4. 交流与合作:在设计和实施实验的过程中,小组成员分工合作,并和其他小组积极交流,适当修正本组的计划。

5. 结论与反思:分析实验数据,反思研究过程,得出研究结论。尝试撰写探究报告。

深入研究:

同种蔬菜的泡菜在发酵时间长短不同的情况下,其维生素 C 含量的差异。

实际上,许多食品在加工过程中都会发生诸如亚硝酸盐和维生素 C 等物质的含量变化。

一、单项选择题

1. 下列有关亚硝酸盐的描述中, 正确的是 ()

- A. 亚硝酸盐只存在于自然环境中
- B. 只能在蔬菜中检测出亚硝酸盐
- C. 在食品加工中一定会产生亚硝酸盐
- D. 亚硝酸盐含量较高的肉类不宜食用

2. 在配制系列亚硝酸钠标准溶液时, 称取的亚硝酸钠需要 ()

- A. 在普通冰箱中冷藏 24 h
- B. 在阳光下累计曝晒 24 h
- C. 在硅胶干燥器中干燥 24 h
- D. 在硅胶干燥器中干燥 12 h

3. 在研究泡菜中是否含有亚硝酸盐的活动中, 不需要使用的试剂是 ()

- A. 亚硝酸钠
- B. 对氨基苯磺酸
- C. 2,6-二氯靛酚
- D. 盐酸萘乙二胺

4. 下列有关研究泡菜中是否含有亚硝酸盐的活动的叙述中, 正确的是 ()



A. 滤纸



B. 天平



C. 容量瓶



D. 超净工作台

8. 维生素 C 是一种强还原剂, 能将 ()

- A. 无色的 2,6-二氯靛酚溶液还原成蓝色

A. 实验用水可以是矿泉水

B. 实验试剂可以是化学纯

C. 实验用水可以是自来水

D. 实验试剂是分析纯试剂

5. 导致人亚硝酸盐中毒的剂量和致死剂量一般分别为 ()

- A. 中毒剂量为 0.3~0.5 g, 致死剂量为 5 g
- B. 中毒剂量为 0.3~0.5 g, 致死剂量为 3 g
- C. 中毒剂量为 0.2~0.3 g, 致死剂量为 5 g
- D. 中毒剂量为 0.2~0.3 g, 致死剂量为 3 g

6. 下列各项中毒原因中, 并非由亚硝酸盐大量进入血液后引起的是 ()

- A. 使低铁血红蛋白氧化为高铁血红蛋白
- B. 使高铁血红蛋白还原为低铁血红蛋白
- C. 使高铁血红蛋白失去携带氧气的的能力
- D. 最终导致组织细胞缺氧

7. 下列四种器材中, 在检测某种食物中亚硝酸盐含量时使用不到的是 ()

二、技能增进题

数学模型建构 数学模型建构是将具体问题进行抽象、假设、简化, 通过建立数学关系, 达到解决问题的目的的过程。

如果测定某种泡菜中亚硝酸盐含量时, 取样量为 A (40 mL 滤液的质量, 单位为 kg), 样品中亚硝酸盐含量为 B (单位为 mg)。那么, 你能构建出计算亚硝酸盐含量 C 的数学

模型(公式)吗?





食品中亚硝酸盐的来源是硝酸盐，过量的硝酸盐在细菌的硝基还原酶的作用下可被还原成亚硝酸盐。人体中的硝酸盐主要来源于食品和饮用水。

1. 在蔬菜种植过程中，氮素肥料的过量施用致使食品中积累了过量的硝酸盐。蔬菜在存放条件差、时间长的情况下，细菌就会大量繁殖，蔬菜开始腐烂，这时亚硝酸盐含量会明显增加。

2. 煮熟的蔬菜存放较久后，亚硝酸盐的含量也会升高。

3. 某些肉制品在加工过程中为保持其呈鲜红色以改善外观和风味，使用了硝酸盐和亚硝酸盐作为起色剂。

4. 蔬菜经腌渍制成罐头后，硝酸盐含量降低了，但亚硝酸盐含量却升高了。

5. 蔬菜中的硝酸盐含量，一般是根菜类大于叶菜类，叶菜类大于茄果类。

6. 某些井水中含有硝酸盐或亚硝酸盐。

要减少亚硝酸盐的摄入，需多吃新鲜的蔬菜和肉类，蔬菜应妥善保存，防止腐烂；低温保存食物，以减少蛋白质分解和亚硝酸盐生成；少吃腌腊制品、酸菜等；勿食用大量刚腌制的菜（腌菜时盐应多放，至少腌至15天以上再食用）等。



走近职业

食品检验工作者

食品检验内容十分丰富，包括食品营养成分分析、食品中污染物质分析、食品辅助材料及食品添加剂分析、食品感官鉴定等。狭义的食品检验通常是指食品检验机构依据《中华人民共和国食品安全法》规定的卫生标准，对食品质量所进行的检验，包括对食品的外包装、内包装、标志和商品外观的特性、理化指标以及其他一些卫生指标所进行的检验。检验方法主要有感官检验法和理化检验法。

本章自主小结

传统的发酵技术广泛运用于酿酒、制醋、制作泡菜和腐乳等许多食品加工中,其基本原理是通过微生物的代谢活动,使食物产生人们需要的特色风味或使食物得以长期保存。在微生物的代谢中,既能产生酒精、乳酸、醋酸、氨基酸等产物,也可能产生一些对人的健康有害的物质(如亚硝酸盐),检测微生物在发酵过程中产生的各种代谢产物,以及这些物质的变化,对于保证食品的安全生产和安全食用,都有十分重要的意义。

由于运用于发酵技术的微生物种类很多,生产方式及产物各不相同,有关知识可用列表比较法进行小结。

	原核生物(细菌)		真核生物(真菌)	
	乳酸菌	醋酸菌	酵母菌	毛霉
制作食品种类				
主要代谢产物				
细胞呼吸类型				
适宜温度条件				
适宜 pH 条件				
其他				

在完成上述有关发酵技术中食品种类、代谢产物、呼吸类型、适宜的培养条件等内容的填写后,思考下列问题,并尝试用列表比较的方法对本章的其他内容进行小结。

1. 生产或生活中常用于制作果酒的原料有哪些? 酿制苹果酒、梨酒与葡萄酒的基本原理是什么? 共同产物是什么? 所需发酵条件是否相同? 在果酒生产过程中,怎样利用酵母菌的呼吸方式创设有利于发酵的条件,从而加快发酵速度,提高发酵产量?

2. 在酿酒和制醋的过程中,所需要的温度、pH、氧气等环境条件有无相同之处? 为什么可以在酒精发酵的基础上继续进行果醋的制作? 是否必须在酒精发酵后进行醋酸发酵?

3. 在制作腐乳的过程中,除了毛霉外,还有哪些微生物能够共同发挥作用? 这些微生物能够产生哪些酶? 大豆中的蛋白质为什么能够分解成氨基酸和多肽等小分子物质?

4. 制作泡菜的条件与酿酒、制醋有何异同? 在你的日常生活中还有哪些食品是利用发酵技术生产的? 测定泡菜中是否含有亚硝酸盐可采用什么方法? 采用盐酸萘乙二胺等测定亚硝酸盐的原理是什么? 主要步骤是什么?

如果有疑难,可以和同学、老师进行探讨,也可以通过图书馆和网络等途径寻求答案。相信你一定能够正确回答上述问题。

1. 在腐乳制作的过程中, 发挥主要作用的微生物是 ()

- A. 酵母菌 B. 乳酸菌
C. 毛霉 D. 曲霉

2. 在酶的作用下, 淀粉分解为麦芽糖等的过程称为糖化。某酒厂把糖化后的淀粉加入发酵罐, 接种酵母菌后, 酒精产量比以往明显减少, 检查发现是发酵罐密封不严所致。试分析反应的结果是 ()

- A. 糖化淀粉消耗减少, 酵母菌量增加
B. 酵母菌量减少, CO_2 释放量减少
C. CO_2 的释放量减少, 糖化淀粉消耗增加
D. 酵母菌量、 CO_2 的释放量和糖化淀粉的消耗量都增加

3. 葡萄酒所含酒精浓度通常不会超过 14%, 原因是 ()

- A. 葡萄酒是人为配制的低度酒
B. 原料中用于发酵的葡萄糖含量偏低
C. 此浓度的酒精妨碍了酵母菌的存活
D. 发酵产热造成了酵母菌的死亡

4. 利用乳酸菌发酵制作泡菜还可增加泡菜的风味。那么, 工业化生产泡菜过程中的乳酸菌主要来自 ()

- A. 接种培养的乳酸菌
B. 制作泡菜时用的凉开水
C. 泡菜缸周围的空气
D. 蔬菜上带有的乳酸菌

5. 在测定维生素 C 含量的实验中, 关于维生素 C 的说法正确的是 ()

- A. 维生素 C 是还原剂, 能将蓝色的 2,6-二氯酚酚溶液还原成无色
B. 维生素 C 是氧化剂, 能将蓝色的 2,6-二氯酚酚溶液氧化
C. 维生素 C 是抗坏血酸, 用 NaOH 溶液来滴定溶液变蓝色
D. 维生素 C 可以用盐酸来滴定, 以确定反应是否结束

6. 某酒厂以大米为原料, 利用酵母菌发酵生产酒精度不低于 12° 的米酒。发酵的主要

工艺为: 清洗大米→蒸煮大米→冷却→加入糖化酶→加入酵母菌→通气发酵→密闭发酵。请回答下列问题:

(1) 生产过程中要蒸煮大米及加入糖化酶等。蒸煮大米的目的是_____。
糖化酶应包括的主要酶类有_____。
糖化酶使大米中的淀粉发生的主要变化包括_____。

(2) 接种后通气培养的目的是_____, 此时酵母菌主要以_____方式迅速繁殖。在接种时常加入尿素或其他含氮物质, 其目的是_____。密闭的目的是_____, 写出此时发生反应的化学方程式:_____。

(3) 俗话说: “酒是陈的香。” 产生酒香的化学原理是_____。

7. 下面是家庭里制作酒酿的具体过程: 先将米煮熟, 待冷却至 35°C 左右时, 加少许水和一定量的酒药(实际是酵母菌菌种), 与米饭混匀后置于一瓷坛(其他容器也可)内。在中间挖一个小洞(深及底部), 加盖后置于适当的地方保温(28°C 最佳), 一般 24 h 即可。现请你从以下几个方面对其发酵过程作简单的分析:

(1) 在中间挖一个小洞(深及底部)的目的是_____。

(2) 酵母菌在发酵初期的呼吸方式主要是_____。

(3) 瓷坛没有密封, 坛内发酵的环境是怎么形成的? _____。

(4) 请你用文字或坐标曲线的形式来说明, 在瓷坛内有氧呼吸和无氧呼吸此消彼长的过程。

(5) 在制作酒酿的过程中, 酒药要按一定的比例加入。如果对用量把握不准, 宁多勿少, 为什么? 如果加少了将会有何后果?