

普通高中课程标准实验教科书

生物学

# 生物技术实践

选修一

主编 张新时

上海科技教育出版社

## 编写人员名单

本册主编 石 建

编 著 者 (以姓氏笔画为序)

冯永康 何兴明 李德成

赵广宇 屈寄成

## 目 录

## 第一章 微生物培养技术

第一节 微生物的分离和纯培养 .....	2
第二节 培养基对微生物的选择作用 .....	7
第三节 测定微生物的数量 .....	12
课外阅读 纯种分离和培养技术的发展 .....	17

## 第二章 食品加工与食品安全

第一节 发酵与食品加工 .....	20
第二节 食品安全的评估 .....	23
课外阅读 食品卫生标准 .....	27

## 第三章 酶的制备及应用

第一节 酶的制备及酶活力测定 .....	30
第二节 酶在食品加工中的应用 .....	35
第三节 加酶洗衣粉的洗涤条件 .....	40
第四节 酶的固定化 .....	43
课外阅读 纤维素酶的神奇作用 .....	46

## 第四章 植物有效成分的提取

第一节 植物色素的提取 .....	48
第二节 植物芳香油的提取 .....	52
课外阅读 食用色素与健康 .....	55

# 目 录

## 第五章 植物的组织培养技术

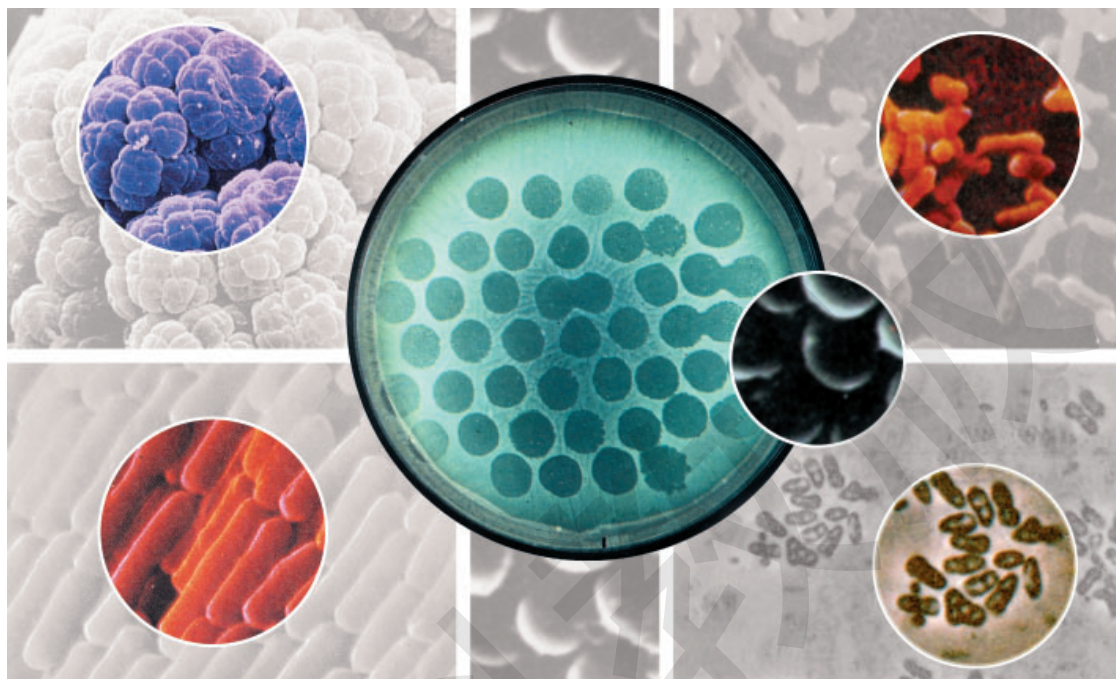
第一节 植物快速繁殖技术 .....	58
第二节 植物种苗脱毒技术 .....	64
课外阅读 兰花工业 .....	67

## 第六章 蛋白质和DNA技术

第一节 蛋白质的提取和分离 .....	70
第二节 DNA片段的扩增——PCR技术 .....	74
课外阅读 PCR技术的诞生 .....	80

附录一 实验室规则 .....	82
附录二 部分培养基配方 .....	83
附录三 电泳试剂及配制方法 .....	85
附录四 中英文对照表 .....	86

# 第一章 微生物培养技术



## 课题研究

在江河湖海、土壤大气、动植物的体内体表，微生物无处不在。这些微小的生物在维持自然生态系统的稳定性上起着极其重要的作用。

微生物具有结构简单、代谢产物多样、生长繁殖迅速、易于培养、突变率较高等特点，是生物学基础研究和实践应用中的重要材料。人类利用自然界中丰富多样的微生物资源，解决了工业、农业及医药卫生领域中的许多问题。

### ▲ 研究计划

1. 查阅微生物培养技术的资料，收集有关微生物培养的实验材料。
2. 运用微生物培养技术，完成所需微生物的分离和培养。
3. 观察微生物菌落的特征。
4. 测定特定样品中微生物的数量。

### ▲ 总结交流

1. 总结微生物分离和培养的关键技术及注意事项。
2. 各小组交流测定的特定样品中微生物的数量，提出改善环境或食品卫生状况的建议。

### 第一节 微生物的分离和纯培养

19世纪70年代,德国科学家柯赫(R.Koch, 1843—1910, 图1-1-1)研究牛的炭疽病时,将病牛的血液转移到人工配制的养料中,在适宜条件下培养,使得血液中的各种细菌大量繁殖,形成了不同形状和颜色的细菌群体。他将这些细菌分别注射到健康牛的体内,结果发现牛的炭疽病是由炭疽杆菌引起的。在此过程中,柯赫所采用的细菌培养方法,开创了微生物分离(isolation)和纯培养(pure culture)技术的先河。



图1-1-1

柯赫(前)和他的助手在观察炭疽杆菌



**背景知识** 自然界中的微生物(microorganism)主要包括细菌、放线菌、酵母菌、霉菌以及立克次氏体、衣原体、支原体、病毒等类群。这些微生物都需要从生活环境中获取各种营养物质,以维持自身的生命活动。微生物代谢方式不同,因而对营养物质的需求也是有差异的。根据这个特点,在进行微生物的分离和纯培养时,可根据微生物生长繁殖和代谢的需要,将各种营养物质混合在一起,配制成适合微生物生存的营养基质——培养基(culture medium)。其中,将熔化后的固体培养基基质倒入无菌培养皿,冷却凝固后制成的培养基称为平板培养基。

把相应的研究对象移入培养基中的过程称为接种(inoculation)。在平板培养基上接种的方法有平板划线法、稀释涂布平板法、稀释混合平板法等。通过这些方法,可将所需要的微生物从混杂的微生物群体中分离出来,获得纯种微生物,这个过程称为纯培养。实验中要根据实验目的、培养基种类和实验器皿的差异采用不同的接种方法。接种技术是进行微生物实验和相关研究(如植物的组织培养)的基本技术。

微生物的生长繁殖还需要适宜的温度,一般是将接种后的培养基放入恒温培养箱中,在一定的温度下培养一定的时间,以得到所需要的微生物。

在微生物的分离和纯培养中,一定不能有外来的污染性杂菌,所以必须采用无菌技术(aseptic technique)进行操作。因此,在实验过程中,要对所用的器材、培养基进行严格的灭菌,对工作场所进行消毒。灭菌(sterilization)是指用强烈的理化因素杀死环境或物体内外所有的微生物,常用的是高温灭菌法。而消毒(disinfection)一般是用相对温和的理化方法杀死环境中或物体上的病原微生物和有害微生物的营养细胞,常用的是射线消毒法和化学药剂消毒法。



#### 大肠杆菌的分离和纯培养

大肠杆菌是人体肠道中普遍存在的一类细菌,容易进行体外培养,常作为分子生物学、遗传学和基因工程研究的重要材料。



### 材料器具

含大肠杆菌的混合菌液；牛肉膏蛋白胨琼脂培养基（附录二）、无菌水；酒精灯、接种环、高压蒸汽灭菌锅、恒温培养箱、培养皿、试管等。

### 活动程序

#### 1. 配制培养基

由教师提供配制好的牛肉膏蛋白胨琼脂培养基。

（配制方法请参考本章第二节的内容）

#### 2. 接种

采用平板划线法进行接种。

接种前的准备工作：将所用的实验器材全部放入超净工作台或无菌箱(室)，用紫外灯照射30 min。进入无菌室前，要用消毒液清洁双手，还需换好工作服、鞋、帽，戴上口罩。

将接种环环端在酒精灯火焰上烧红，再将接种环斜放，沿环向上，烧至可能碰到培养皿的部分。来回数次(图1-1-2)。

在酒精灯火焰附近冷却接种环。左手拿取混合菌液试管，让试管口缓缓通过火焰灭菌(图1-1-3)。

将接种环伸入试管内，沾取一环混合菌液(图1-1-4)。

左手持培养皿并开启一条缝隙，右手将接种环迅速伸入平板，进行划线(图1-1-5)。



图1-1-2  
接种环灭菌



图1-1-3  
试管口灭菌



图1-1-4  
沾取混合菌液



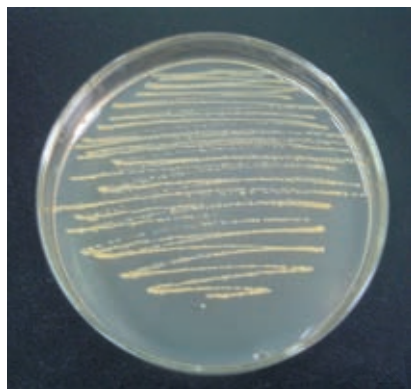
图1-1-5  
接种

划线的方法包括连续划线法和交叉划线法(图1-1-6)。

连续划线法是从平板边缘的一点开始,连续作紧密的波浪式划线。

交叉划线法是从平板的一边作第一次平行划线若干条。转动培养皿约70°角,将接种环在火上灼烧并冷却后,通过第一次划线部分,作第二次平行划线。同法进行第三次、第四次划线。

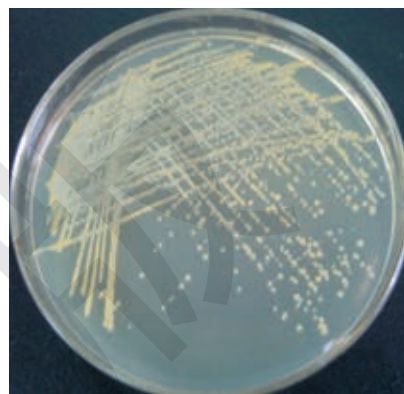
通过平板划线,聚集的多种微生物被分散到培养基的表面。在数次划线后,可以分离得到由单个细菌繁殖而来的菌落。



采用连续划线法经培养得到的菌落

图1-1-6

平板划线菌落图



采用交叉划线法经培养得到的菌落

## 3. 培养

划线完毕后,盖上培养皿盖,将培养皿倒置,放入37℃的恒温培养箱中培养24 h(图1-1-7)。

## 4. 观察记录

将观察到的大肠杆菌的菌落特征记录于表1-1-1中。



图1-1-7

恒温培养

表1-1-1 大肠杆菌的菌落特征

形状	大小	表面	边缘	隆起	透明度	颜色

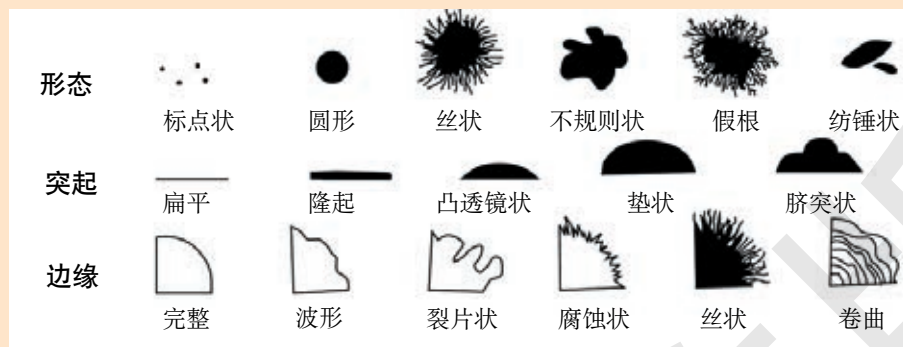
## 5. 纯化培养

挑取单个大肠杆菌菌落接种到培养基上,仍在37℃恒温培养箱中培养24 h,可获得大肠杆菌的纯培养。检查后如果发现有杂菌,可进一步划线挑菌,直至纯化。



在固体平板培养基上，单个微生物细胞或孢子可生长繁殖成一个具有特定形状的菌落。在一定培养条件下，微生物的菌落形状、大小、边缘、隆起度和颜色等是稳定的。如细菌菌落光滑，易与基质分离；放线菌菌落质地致密，菌落较小而不致广泛延伸；酵母菌菌落较细菌菌落大而厚；霉菌形成的菌落较稀松，多呈绒毛状、絮状。通过对菌落特征的观察可以识别微生物的类群。

相关链接



## 结果分析

1. 经过第一次恒温培养后，培养基上是否只有大肠杆菌的菌落？
2. 如果要进一步认识大肠杆菌的特征，应该如何操作？不妨查阅有关资料，学会观察细菌形态的方法。

## 探究特定微生物的分离和纯培养

在豆科植物根部生活的固氮菌，能直接固定空气中的氮气，为植物的生长提供所需要的氮肥(图1-1-8)。我们可以利用微生物的分离和纯培养技术，将根瘤菌从豆科植物的根部分离出来，制成菌肥，用于农业生产，这会有明显的增产效果。

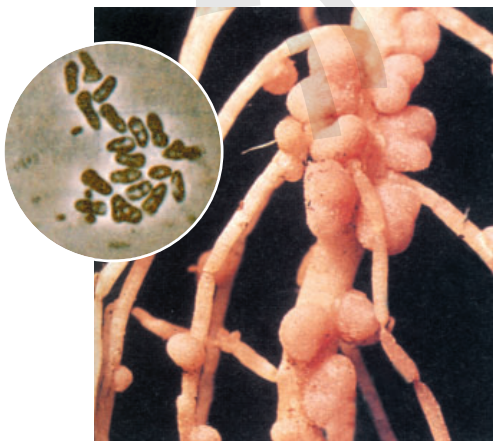


图1-1-8  
根瘤中的固氮菌

### 活动建议

1. 从豆科植物根瘤中分离和培养根瘤菌

选用根系比较完整，根瘤大而内部红润的新鲜豆科植物作为材料。由于根瘤表面杂菌多，分离培养的关键是杀死表面杂菌。



探究活动

### 2. 从酒曲中分离和培养酵母菌

酒曲中含有霉菌、酵母菌、细菌等大量微生物(图1-1-9)。宜选用酸性液体培养基培养,再用划线分离法在固体培养基上分离培养。

培养不同的微生物,使用的培养基、培养的温度和时间有所不同。大多数微生物适宜生长的温度为 $25\sim 40^{\circ}\text{C}$ ,实验室中常采用 $28\sim 30^{\circ}\text{C}$ 培养微生物。一般的细菌适合在中性环境下生长,放线菌适合于偏碱性环境,而酵母菌和霉菌适合于微酸性环境,配制培养基时需要根据微生物的类群调节pH。

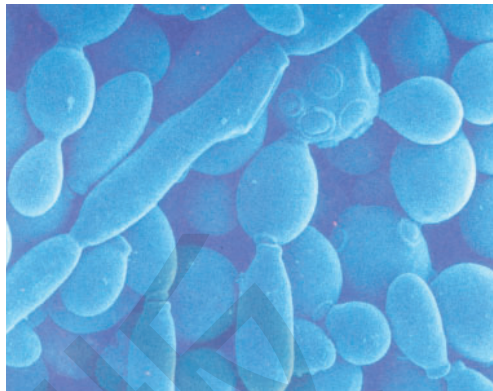


图1-1-9  
酵母菌

#### 分析讨论

1. 在本次活动中,你是否获得了所需微生物的纯培养?你认为取得成功的关键技术是什么?
2. 你在实验中获得的细菌或其他微生物的纯培养,如果需要保留便于以后使用,应该如何保存?如果不需要保留,应该如何处理?

琼脂平板培养基分离纯化技术是一种简便有效的微生物学常规技术,它至今仍广泛应用于微生物菌种的筛选、鉴定、育种、计数以及各种微生物的测定工作。纯种分离技术还在不断发展完善,如许多用于活菌计数的平板等已日趋微型化、简便化、商品化和系列化。

#### 巩固提高

1. 在平板划线时,若需再次取菌液划线,需要先灼烧接种环。这是为什么?
2. 接种以后,为什么要将培养皿倒置放入恒温箱中培养?

## 第二节 培养基对微生物的选择作用

我们食用的火腿肠等熟肉制品中常常添加食用色素——红曲，从而使这些食品显得更加诱人(图1-2-1)。你知道吗，早在宋代，我国就根据红曲霉有耐酸和耐高温的特点，采用明矾调节酸度和用酸米抑制杂菌的方法，培养出纯度很高的红曲。这实际上是利用培养基对微生物的选择作用。



图1-2-1

添加红曲的熟肉制品



### 背景知识

有些微生物可以分泌纤维素酶，使纤维素分解，为生命活动提供所需要的碳源。如果在固体培养基中加入纤维滤纸作为唯一碳源，则只有能分解纤维素的微生物可以生存，其他微生物由于缺乏纤维素酶，不能利用纤维素作为碳源而无法生存。这样就可以分离出能分解纤维素的微生物。

这种能让特定的微生物生长，抑制其他微生物生长，从而将所需要的微生物从混杂的微生物群体中分离出来的培养基，称为选择培养基(selective medium)。很多微生物都可以通过选择培养基进行分离纯化。

配制选择培养基时，可以根据某一种或某一类微生物的特殊营养要求，加入某些物质或除去某些营养物质(如碳源、氮源、水、无机盐、生长因子等)，抑制其他微生物的生长，从而有利于某一类群或某一种特定的微生物生长。此外，也可以根据某些微生物对一些物理、化学因素的抗性，在培养基中加入某种化学物质，以抑制不需要的微生物的生长繁殖，造成有利于特定微生物种类优先生长的条件。

### 用唯一碳源培养基分离微生物

自然界的纤维素资源十分丰富，在植物的枝叶、秸秆和糠壳中都含有大量的纤维素，但是多数纤维素原料都作为燃料或废物被处理掉了(图1-2-2)。如果我们利用分解纤维素的微生物，将纤维素转变成糖类等可溶性的物质，将为饲料、食品及发酵工业开辟新的原料来源。

#### 材料器具

土壤悬液；赫奇逊培养基(附录二)、蒸馏水；滤纸、酒精灯、电炉、高压蒸汽灭菌锅、电子秤、培养皿、pH试纸、棉花、锥形瓶、镊子、吸管、干燥器、恒温培养箱等。



### 实践案例

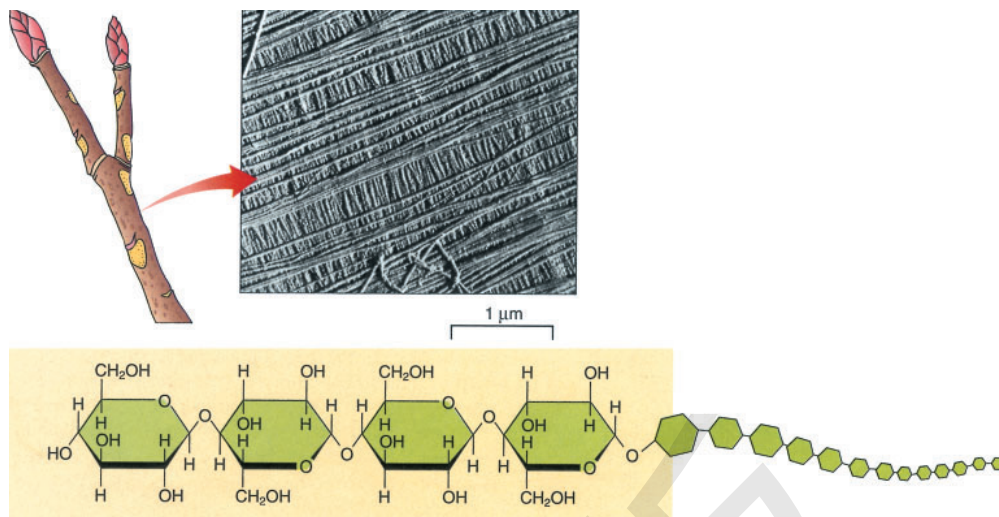


图1-2-2

树皮中含有大量的纤维素

## 活动程序

### 1. 配制培养基

**原料称量、溶解** 根据培养基的配方，准确称取各原料成分置于锥形瓶中，并加入适量蒸馏水，在电炉上边加热边搅拌，直至琼脂完全溶解，然后加蒸馏水至1 000 mL(图1-2-3，图1-2-4)。

**调节pH** 先用精密pH试纸测定培养基的原始pH，再滴加物质的量浓度为1 mol/L的NaOH或盐酸溶液，边加边搅拌，并随时用pH试纸测试pH，直至pH达7.2~7.4。

**分装、包扎** 将配制好的培养基分装到锥形瓶内（不超过其容积一半为宜），用棉塞塞紧(图1-2-5)。棉塞外包一层牛皮纸。用记号笔注明名称、组别、日期。

**灭菌** 将上述培养基放置于高压蒸汽灭菌锅中，121 °C下灭菌20 min。



图1-2-3

原料称量



图1-2-4

加热溶解



图1-2-5

培养基的分装

### 2. 倒平板

将灭菌后的培养液倒入培养皿中。

待培养基冷却至50 °C左右时，在酒精灯火焰旁拔出棉塞。(图1-2-6a)。

手拿锥形瓶，瓶口通过火焰，灼烧灭菌(图1-2-6b)。





a



b



c

图1-2-6  
倒平板的操作方法



a



b



c

图1-2-7  
稀释涂布平板操作方法

左手持培养皿，打开皿盖。右手将锥形瓶中的约15 mL培养液倒入培养皿。立即盖上皿盖，待平板冷却后备用(图1-2-6c)。

### 3. 接种

采用稀释涂布平板法进行接种。

将长玻璃吸管在酒精灯火焰上灼烧，把一端弯成30°呈“了”字形，制成涂布器(图1-2-7a)。

用无菌吸管吸取0.05 mL的土壤稀释液滴于平板上，再用无菌涂布器涂布。涂布时可转动培养皿，使涂布均匀(图1-2-7b)。

用无菌镊子取无菌滤纸覆盖于培养基上，并用涂布器压平(图1-2-7c)。

### 4. 培养

先向干燥器中加入适量无菌蒸馏水，以保持一定的湿度，再将培养皿置于干燥器隔板上，于28~30 °C条件下恒温培养10 d左右(图1-2-8)。



图1-2-8  
恒温培养



### 手提式高压蒸汽灭菌锅的使用方法

**加水** 打开高压蒸汽灭菌锅，将里面的灭菌桶取出，向锅内加水，水面与底架平齐为宜。

**装料** 将锥形瓶瓶口向上竖放在灭菌桶内，再将灭菌桶放回灭菌锅。物品之间要保留空隙，以利于通气。

**密封** 加盖，将排气软管插入灭菌锅的排气管内。以两两对称的方式，同时拧紧相对的两个紧固螺栓，以防漏气。

**排气** 加热，当压力上升到49 kPa时，打开排气阀放气，当压力降到零时，关闭排气阀。重复上述放气过程一次，以彻底排出锅内的冷空气。

**升压** 当锅内的压力升到98 kPa左右时，保持20 min。

**降压** 停止加热，让其自然降压。当压力降至零以后，打开排气阀，10 min后，拧开紧固螺栓，取出锥形瓶。最后将灭菌锅里的水排放干净。

### 结果分析

1. 如何判断培养基中的微生物能分解纤维素？
2. 观察培养基上的菌落，判断培养基上都有哪些类群的微生物？



### 探究活动

### 利用选择培养基分离微生物

苏云金杆菌细胞内形成的伴孢晶体能够杀死包括棉铃虫在内的许多农作物害虫。1993年，我国科学家成功地将苏云金杆菌中的抗虫基因转入棉植株，培育出抗棉铃虫的转基因抗虫棉(图1-2-9)。利用选择培养基，可极大地提高从虫体中分离苏云金杆菌的效率。

#### 活动建议

##### 1. 分离苏云金杆菌

在未使用农药的田间，染病死亡的棉铃虫等幼虫大多是因为感染了苏云金杆菌中毒所致。可以利用染病的棉铃虫、玉米螟、菜青虫为材料，配制菌液，采用附录二所提供的选择培养基，分离出苏云金杆菌。

##### 2. 分离分解纤维素的细菌

前面的实践案例只是分离到能分解纤维素的微生物类群。可以在此

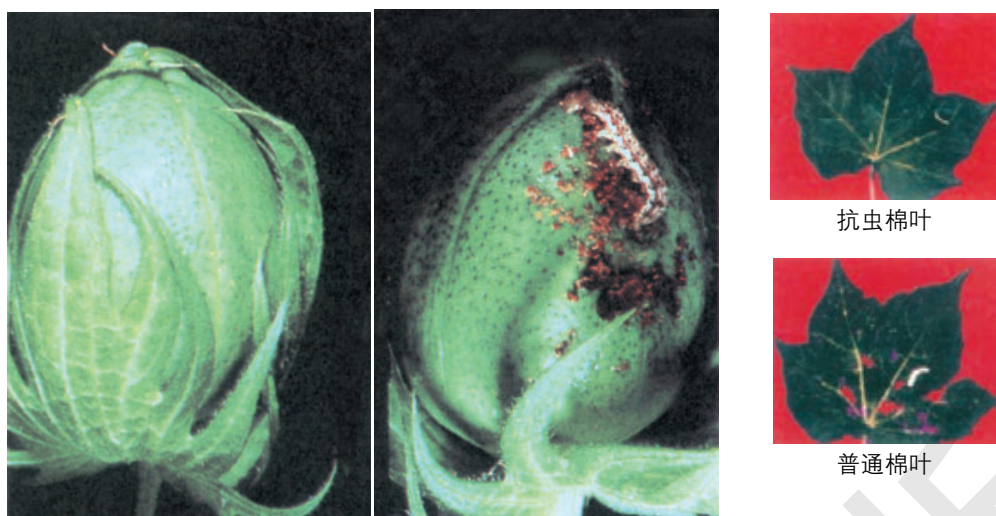


图1-2-9

抗虫棉(左)和普通棉(右)

基础上,根据附录二中所提供的相关培养基配方,进一步分离出能分解纤维素的细菌。

### 分析讨论

- 1.在活动方案中,是否需要设计对照实验?如果需要应该如何设计?
- 2.如何利用活动中分离到的微生物,进一步培养以获得大量的生产用菌种,应该使用哪种类型的培养基?

选择培养基分离法是分离微生物的另一种方法。当需要分离的微生物在混合样品中数量很少时,如果直接采用平板稀释法或划线法进行分离,很难奏效。采用选择培养基则能使分离对象大量繁殖,同时可抑制其他微生物的生长。通过这种方法,可以选择性地分离和培养不同的微生物。

### 巩固提高

- 1.为什么选择培养基能分离出不同的微生物?
- 2.试比较灼烧灭菌与高压蒸汽灭菌的适用范围。

### 第三节 测定微生物的数量

在学习生态系统中的种群数量变动时，我们曾经利用微生物的计数方法，探究培养液中酵母菌的数量变化。其实，微生物的计数方法不仅用于科学研究，而且还广泛应用于食品卫生检验、环境污染检测等领域。



#### 背景知识

测定微生物数量的方法可分为两类：直接计数法和间接计数法。直接计数法中常用的是显微镜直接计数法，这种方法是先将待测样品制成悬液，然后取一定量的悬液放在显微镜下进行计数(图1-3-1)。根据在显微镜下观察到的微生物数目来计算出单位体积内的微生物总数。直接计数法所需设备简单，可迅速得到结果，而且在计数的同时能观察到所研究微生物的形态特征，其缺点是难以计数微小的细菌。这种方法一般适用于纯培养悬浮液中各种单细胞菌体的计数。

间接计数法最常用的是稀释平板计数法，它是根据微生物的培养特征而设计的计数方法。这种方法在样品中含菌数较少的情形下，也可以完成计数。

应用稀释平板计数法计数时，需要将待测样品配制成均匀的系列稀释液，尽量使样品中的微生物细胞分散开。再取一定稀释度、一定量的稀释液接种到平板中，使其均匀分布于培养基内；或是将一定量的稀释液，与熔化后冷却至45℃左右的琼脂培养基混合，倾入无菌培养皿中，摇匀、静置待凝。经过培养后，就由单个微生物生长繁殖形成菌落，这样的菌落就代表着一个微生物个体。统计培养基中出现的菌落数，即可推算出检测样品中的活菌数。

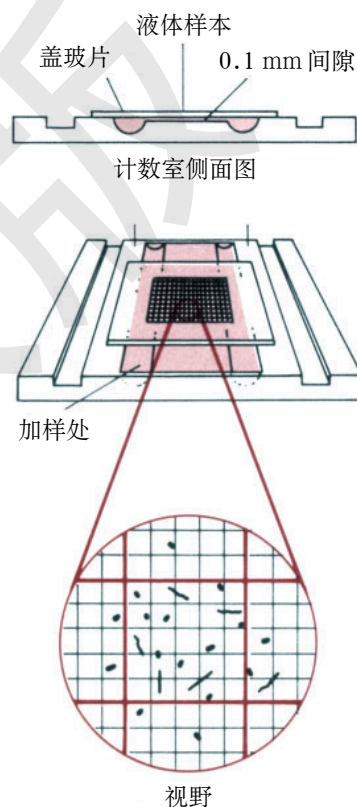


图1-3-1  
显微镜直接计数示意图



#### 实践案例

#### 土壤中好气性细菌的计数

土壤中生活的微生物种类和数量是极其丰富的，这些数量众多的微生物对提高土壤肥力有重要作用。因此，土壤的含菌量可以作为判定土壤肥力的一个重要指标。

##### 材料器具

土壤样品；牛肉膏蛋白胨琼脂培养基(附录二)、无菌水；培养皿、移液管、天平、锥形瓶、试管、酒精灯、恒温培养箱、摇床等。

## 活动程序

### 1. 制备土壤稀释液

取土壤表层5~10 cm处的土样。准确称取1 g土样，放入盛有99 mL无菌水的锥形瓶(250 mL，放有小玻璃珠)中，用手或摇床振荡20 min，即制成 $10^2$ 倍的稀释液。

用1 mL无菌移液管，吸取 $10^2$ 倍稀释液0.5 mL，移入装有4.5 mL无菌水的试管中，配制成 $10^3$ 倍稀释液。

用同样的方法可制成稀释倍数为 $10^4$ 、 $10^5$ 、 $10^6$ 的系列稀释菌液(图1-3-2)。

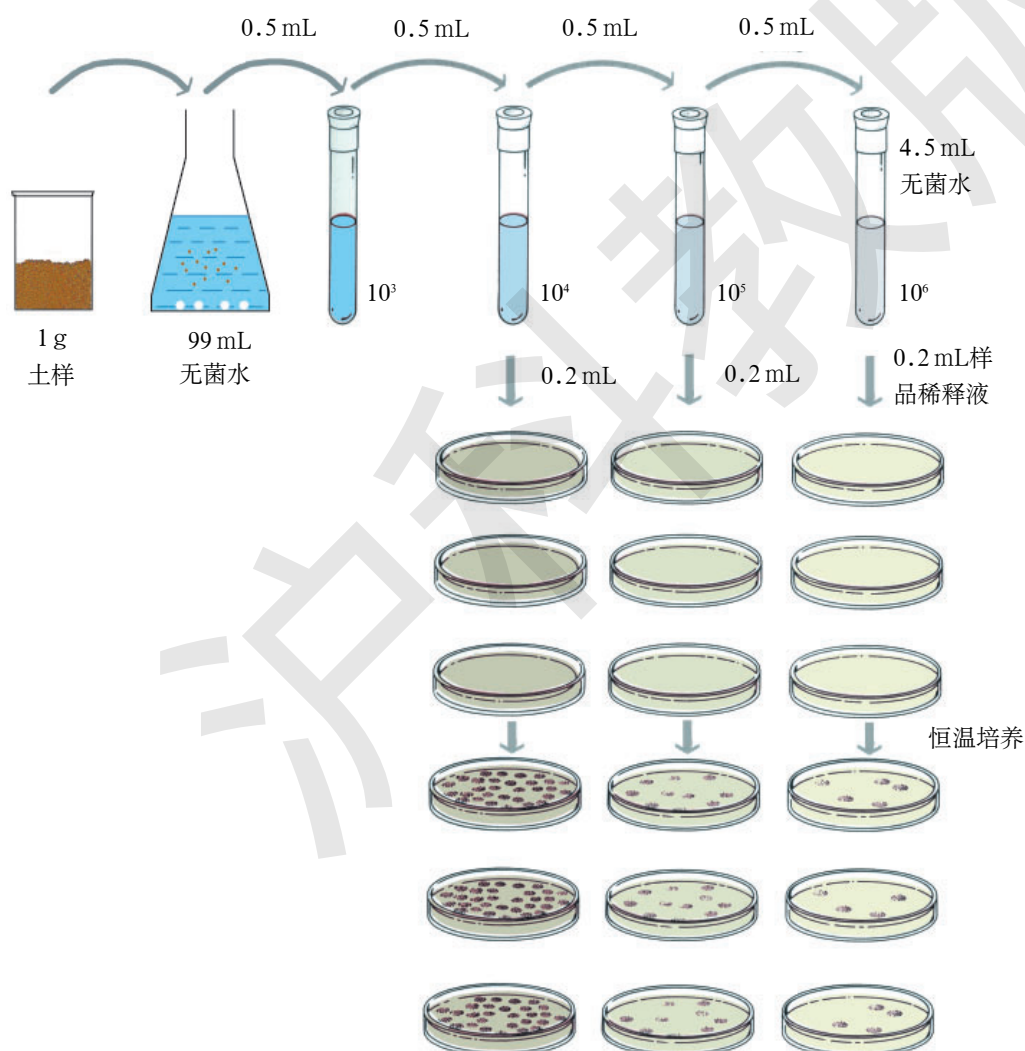


图1-3-2  
稀释平板计数操作示意图



移液时，要将移液管插入液面，吹吸3次，每次吸上的液面要高于前一次，让菌液混合均匀并减少稀释中的误差。每配一个稀释度要换用一支移液管。

## 2. 取样及倒平板

将无菌培养皿编号，依次为 $10^4$ 、 $10^5$ 、 $10^6$ ，每个编号设置3个重复。

用无菌移液管3支，分别吸取稀释倍数为 $10^4$ 、 $10^5$ 、 $10^6$ 的土壤稀释液各0.2 mL，注入到相应编号的培养皿中(每个稀释倍数各3个培养皿)。

将已灭菌牛肉膏蛋白胨琼脂培养基融化，待冷却至 $45\sim 50^{\circ}\text{C}$ ，倾入到无菌培养皿中，每皿约15 mL，轻轻转动培养皿，使土壤稀释液与培养基混合均匀。

## 3. 培养

上述接种好的平板培养基冷却后，倒置放入 $28\sim 30^{\circ}\text{C}$ 的恒温培养箱中培养 $24\sim 36\text{ h}$ ，直至长出菌落。

## 4. 观察记录

将实验中得到的菌落数填入表1-3-1。

表1-3-1 不同稀释倍数下菌落数

稀释倍数	$10^4$				$10^5$				$10^6$			
	1	2	3	平均	1	2	3	平均	1	2	3	平均
菌落数												

## 结果分析

1. 选取具有合适菌落数的稀释倍数并计数。

在计算结果时，从接种的3个稀释度中选择一个合适稀释倍数，统计出菌落数(图1-3-3)。选择的原则是：

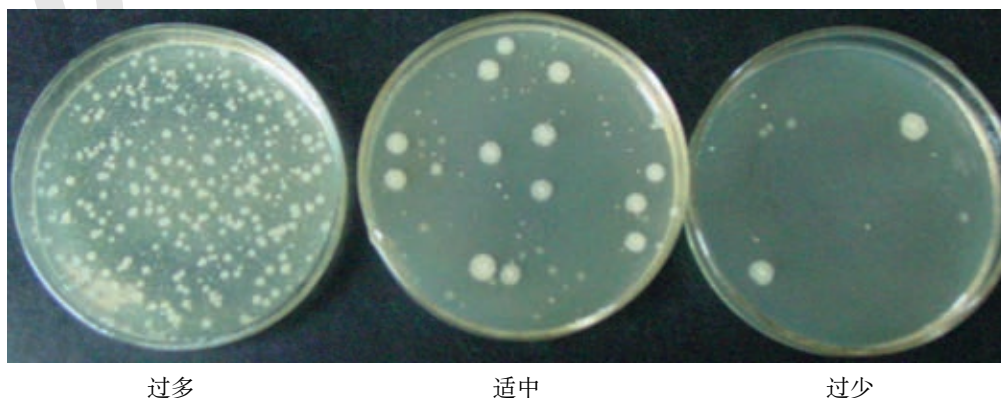


图1-3-3  
培养皿中菌落数



(1)细菌、放线菌、酵母菌以每个培养皿内有30~300个菌落为宜。  
霉菌以每个培养皿内有10~100个菌落为宜。

(2)同一稀释倍数各个重复的菌落数相差不要太悬殊。

2.将统计出的菌落数按下列公式计算,得出每克样品菌数。

$$\text{每克土壤样品菌数} = \frac{\text{某稀释倍数的菌落平均数}}{\text{细菌培养时所用的稀释液体积}} \times \text{稀释倍数}$$

#### 测定特定样品中的微生物数量

人的粪便中含有致病菌,但是通常因数量较少而不易检测。大肠杆菌是生存于人体肠道中的正常菌群,每克粪便中含有 $10^9$ 个大肠杆菌,且能够与致病菌混杂生长。如果食品和饮用水中出现大肠杆菌,就意味着食物可能被粪便污染而带上致病菌。因而常将大肠杆菌数量作为食品卫生的检测指标之一。

##### 活动建议

##### 1.检测天然水源中细菌总数和大肠菌群数

细菌总数通常是指1 g或1 mL检测样品中所含细菌菌落的总数,单位用CFU/g或CFU/mL表示。

大肠菌群数通常是指每100 g或100 mL检测样品中所含大肠菌群的实际数值,以(MPN)表示。大肠菌群是指在37℃条件下,24 h内能发酵乳糖,产酸产气的一类需氧或兼性厌氧型革兰氏阴性无芽孢杆菌。检测大肠菌群数,常用多管发酵法,使用乳糖胆盐蛋白胨培养基、伊红美蓝琼脂培养基(EMB培养基)和乳糖发酵管(附录二,图1-3-4)。

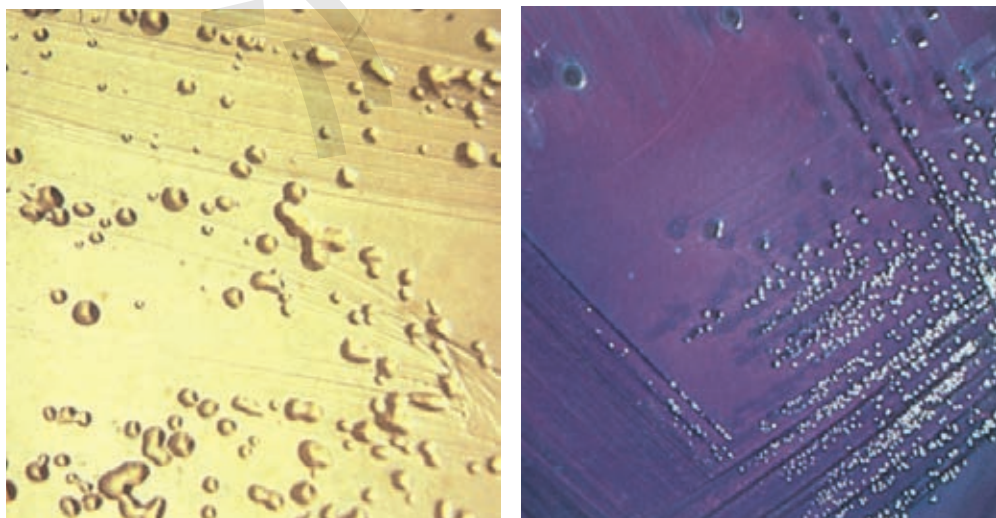


图1-3-4

大肠杆菌使EMB培养基发出蓝紫色金属光泽(右)



### 2. 检测某种食品中的菌落总数和大肠菌群数

食品在原料加工、成品包装等生产环节中，可能受到外界污染。一般说来，菌落总数越多，遭受病原菌污染的可能性越大，说明食品的卫生质量越差。

### 3. 土壤中分解尿素细菌的计数

有些细菌含有尿素分解酶，能将尿素琼脂培养基(附录二)中的尿素分解生成氨，氨溶于水变成氢氧化铵，导致培养基变成碱性，使酚红指示剂呈现红色(图1-3-5)。

#### 分析讨论

1. 如果你和你的同学选择的探究活动内容是相同的，所得到的结果一致吗？如果有不同，请分析造成这种误差的原因。

2. 食品中检测出的菌落数是该食品中所有的细菌数吗？为什么？

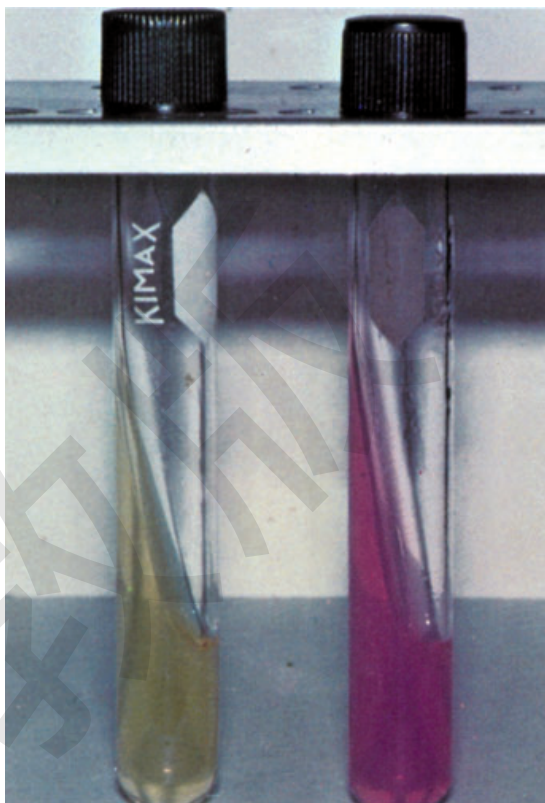


图1-3-5

尿素分解酶分解尿素使培养基变红

显微镜直接计数法和稀释平板计数法是测定微生物数量的常用方法。通过测定微生物数量，可以研究微生物在土壤、水、空气和食品中的繁殖状况，为监测环境质量、检测食品卫生质量等提供科学依据。

#### 巩固提高

1. 影响菌落总数测定准确性的主要因素有哪些？
2. 测定土壤放线菌、真菌数量时，制备的土壤稀释液浓度与测定细菌数量用的土壤稀释液浓度一样吗？为什么？



#### 回顾总结

微生物的分离和纯培养技术是微生物最基本的实验技术，它包括培养基的制备、灭菌和消毒、接种、培养等步骤。

根据培养微生物的种类、研究对象和内容的不同，可配制相应的培养基。其中，选择培养基用于特定目标微生物的分离。

在微生物的分离和培养中，一定要在无菌条件下进行操作。

接种时，根据实验目的、培养基种类、实验器皿等的不同，需采用不同的接种方法。在平板接种时运用的划线法、稀释平板涂布法、混合平板法等，也可用于分离纯化菌种、活菌计数、观察菌落形态，以及在平板上进行各种生理、生化实验。

微生物的培养应根据微生物的种类及实验目的，设定不同的培养时间和温度，并注意在培养过程中适时观察，直至培养基长出菌落为止。



#### 课外阅读

#### 纯种分离和培养技术的发展

纯种分离技术是人类揭示微生物世界奥秘的重要手段，要知晓在自然条件下处于混生状态的某一种微生物的特点以及它对人类是有益还是有害，就必须采用在无菌技术基础上的纯种分离方法。

利用固体培养基来分离和纯化微生物经历了马铃薯块切面、明胶平板、琼脂平板等阶段。最初，使用明胶作为培养基成分中的凝固剂，但明胶在28℃以上就会熔化，因此对于培养人类病原菌(最适温度35~37℃)极不合适。此外，有些细菌可以分解明胶，使它失去作为培养基支撑物的作用。

纯种分离技术的真正突破来自柯赫学派发明的培养皿琼脂平板。柯赫的助手皮特里(J. Petri)设计了透明的玻璃培养皿，这种培养皿既便于容纳培养基，也便于观察细菌等微生物的菌落，同时它还可以达到通气而不易污染杂菌的目的。迄今为止，这种培养皿仍是微生物学中广泛使用的器材之一。柯赫的另一名助手海塞(W. Hesse)在妻子的启发下，用她做果冻用的琼脂作为固体培养基的支撑物。琼脂是从一种海藻中提取出来的，在水中加热可溶解，当溶液温度降至42℃以下则凝固为胶体，且不为微生物所分解。琼脂固体平板培养基的问世和普遍应用为微生物的纯种分离技术奠定了坚实的基础。以后，用于霉菌孢子和酵母菌体等的单孢子或单细胞分离纯化技术也相继问世。

上述方法的综合应用，不但纠正了微生物学早期因分离不纯而将微生物误认为是多形态的观点，还为寻找病原微生物提供了方法上的保证。从此，许多夺走人畜生命的严重传染病的病原体，如结核杆菌、霍乱弧菌、白喉杆菌、伤寒杆菌、破伤风杆菌、鼠疫杆菌、痢疾杆菌、脑膜炎奈瑟菌、梅毒螺旋体等被逐个分离出来，为人们有效地防治这些传染病奠定了基础。

在微生物发酵工业中，要使微生物良好地生长或累积代谢产物，就需要应用微生物纯种培养技术。微生物纯种培养技术的发展表现为：从固体培养法为主发展到液体培养法为

主；从浅层培养法发展到深层发酵法；从静止培养法发展到通气搅拌培养法；从单罐培养发展到连续培养以及多级连续培养；从利用分散的微生物细胞发展到固定化细胞；从利用自然菌种到利用变异菌株、“工程菌”，等等。其中，大规模液体深层通气搅拌发酵装置(即发酵罐)的发明和普及，为生物工程学开辟了崭新的前景，同时也使微生物发酵工业成为国民经济的重要支柱产业之一。

泊禾科技出版



## 第二章 食品加工与食品安全



### 课题研究

传统的微生物发酵技术能生产加工出酒精饮料、乳制品、腌制蔬菜、调味剂等产品，极大地丰富了人们的生活。许多产品的生产加工过程简单，不需要复杂的设备，在家中就可以完成，但必须保证这些食品中不含有病原微生物和有害物质。

#### ▲ 研究计划

1. 查阅有关食品加工的资料，运用微生物发酵原理，制作出发酵食品。
2. 查询食品安全相关资料，了解有关食品安全的知识。

#### ▲ 总结交流

与其他同学交流制作发酵食品的体会，总结提高食品品质的方法和措施。



### 第一节 发酵与食品加工

春秋时期的《尚书·说命篇》中有“若作酒醴，尔惟曲蘖”的记载。意思是要酿造酒类，必须用曲蘖。曲是由谷物发霉制成，蘖是发芽的谷物。说明当时已经能够利用微生物，在不完全灭菌的条件下，培育出具有优良菌种的酒曲，用于酒的酿制。这是我国劳动人民在酿造工艺上的独特贡献。如今，微生物发酵技术已广泛应用于食品加工领域。



#### 背景知识

在生产中，利用微生物在有氧或无氧条件下的生命活动来制备微生物菌体及各种代谢产物的过程，称为发酵(fermentation)。根据发酵过程对氧的需求情况，可分为需氧发酵和厌氧发酵；根据发酵生成的产物，可分为酒精发酵和乳酸发酵等。

食品工业中，酒精是采用厌氧发酵法生产的。其原理是：先将淀粉水解成葡萄糖；再利用酵母菌分解葡萄糖生成丙酮酸，丙酮酸在厌氧和微酸性条件下，转变成酒精。由于酵母菌是兼性厌氧型微生物，因此，在实际制酒过程中，先让酵母菌在有氧条件下大量繁殖，耗尽容器内的氧气。然后，酵母菌在无氧条件下进行厌氧发酵，生成酒精。通常选用高粱、玉米、大麦等谷物以及红薯作为酿制白酒的原料，选用葡萄、苹果等作为酿制果酒的原料(图2-1-1)。

果醋则是利用醋酸菌进行需氧发酵得到的产物。醋酸菌是好氧性细菌，在适宜的条件下，醋酸菌能将糖类分解成醋酸；当糖类不足时，还可以将酒精转变成乙醛，进一步将乙醛转变成醋酸。因此，我们可以在制作果酒的基础上酿制果醋。



图2-1-1

常用的酿酒原料



#### 实践案例

#### 酒精酿制

酒精在生产、生活中使用广泛，在医药上常用于灭菌防腐和药剂调制，在工业生产中常用作有机溶剂和浸出剂，在食品制造中常用来配制各种含酒精饮料。

### 材料器具

酿酒酵母；酒精发酵培养基(附录二)、无菌水；高压蒸汽灭菌锅、锥形瓶、蒸馏装置、恒温培养箱、酒精比重计、量筒、无菌吸管等。

### 活动程序

#### 1. 配制培养基

按酒精发酵培养基配方配制培养基，并将配制好的发酵培养基100 mL装入300 mL的锥形瓶中。将锥形瓶放入高压蒸汽灭菌锅内，在121 °C下高压蒸汽灭菌20~30min。

#### 2. 接种培养

将培养24 h的酿酒酵母加入无菌水5 mL，制成菌悬液，并吸取1 mL接种于装有100 mL培养基的锥形瓶中，30 °C恒温静止培养3 d。

#### 3. 蒸馏

取100 mL已发酵培养3 d的发酵液，加入蒸馏装置的圆底烧瓶中，然后进行蒸馏(图2-1-2)。当接液口开始流出液体时，收集于锥形瓶中。

### 结果分析

用酒精比重计测量出你所得到的酒精的酒精度。

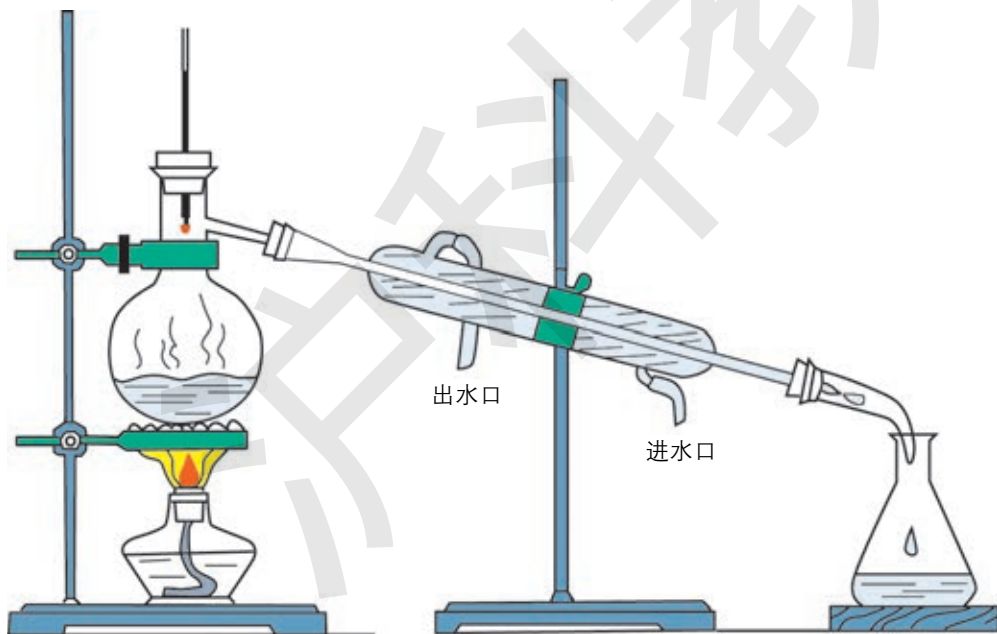


图2-1-2  
蒸馏装置示意图

## 家庭制作发酵食品

利用微生物发酵技术除了可以制作白酒外，还可以生产果酒、果醋、氨基酸、有机酸、维生素等。此外，用酵母菌生产的真菌蛋白质食品，是从微生物的菌体中获得的蛋白质，称为单细胞蛋白，其因具有高蛋白、低脂肪等特点受到人们的欢迎。



### 活动建议

#### 1. 制作果酒

以苹果为原料，制作果酒。可先将原料切成小块蒸煮，使果肉稍软，然后冷却至 $30\sim 36\text{ }^{\circ}\text{C}$ ，再接种酒曲，充分进行发酵后，蒸馏可得果酒(图2-1-3)。

#### 2. 制作果醋

选用新鲜葡萄作为原料，榨取果汁，然后接种酿酒酵母，可得果酒；再以果酒为原料，接种醋酸菌，制作果醋。

#### 3. 制作腐乳、泡菜

同学们可以通过请教家长、邻居或者通过查阅资料来完成腐乳或泡菜的制作(图2-1-4)。

### 分析讨论

1. 你和你的家人品尝了你自制的发酵食品了吗？口味如何？

2. 请同学们交流自制发酵食品的经历与体会。



图2-1-3  
果酒



图2-1-4  
腐乳

人们将微生物发酵与现代工程技术手段相结合，利用微生物的某些特定功能，生产有用的产品或直接把微生物应用于工业生产过程中，这就是发酵工程(图2-1-5)。发酵工程提高了原料的利用率，缩短了生产周期，便于机械化生产。目前，发酵工程在食品工业上的应用，不仅使传统发酵食品的产量和质量得到显著提高，还能生产多种食品添加剂，明显改善了食品的品质。

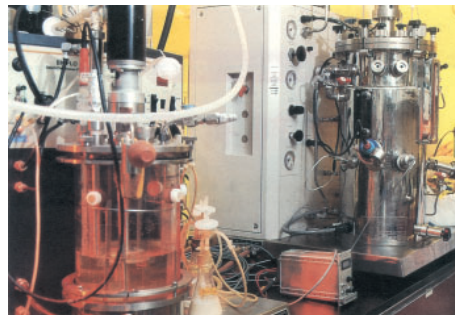


图2-1-5  
发酵工程常用的发酵罐

### 巩固提高

1. 在制作果酒时，首先要将原料进行蒸煮，其目的是什么？
2. 某位同学在制作泡菜时，因操作不当而导致泡菜腐烂，请帮助他分析操作出现失误的原因。



## 第二节 食品安全的评估

除夕之夜，家人团聚，餐桌上摆满了美味佳肴。当你在享用美味的腊肉、香肠及开胃的泡菜时，可曾担忧过这些食品中可能会含有对健康有害的物质？当你在购买食品时，可曾把食品安全性(food safety, 图2-2-1)作为食品选择的重要原则？



图2-2-1

食品质量安全标志



### 背景知识

食品安全性是指食品中不应含有可能损害人体健康的有毒、有害物质或因素，从而消除对消费者及其后代健康造成危害的隐患。由于人类饮食结构的复杂化，无形之中也增加了饮食的风险。就世界范围而言，现代食品安全性有6个方面的问题：微生物致病、自然毒素、环境污染物、人为加入到食物链中的有害化学物质、营养失控和其他不确定的饮食风险。

目前，食品中残留的有害化学物质对消费者身体健康的危害显得尤为突出。我国近年经常发生的食源性亚硝酸盐中毒事件，已成为影响食品安全的重大问题之一(图2-2-2)。



图2-2-2

关于亚硝酸盐中毒的网络新闻

亚硝酸盐是自然界中广泛存在的物质，在粮食、豆类、蔬菜、肉类、蛋类等食品中普遍存在。研究表明，少量的亚硝酸盐不会在人体内蓄积，可随尿液排出。但人体一次性误食工业用亚硝酸盐0.3~0.5 g，就可能引起中毒；当一次性食用总量超过3 g，则可能导致

死亡。如果亚硝酸盐在人体内长期蓄积,在适宜的条件下,可转化成对人体有致癌作用的亚硝胺。

在食品生产和加工过程中,需要对自然毒素和化学物质给食品安全性带来的影响进行评估,以确保食品安全和人体健康。在我国食品卫生标准GB2760-2014中,对亚硝酸盐的使用范围和使用量有严格的规定,如各类肉制品中亚硝酸盐的最大使用量为0.15g/kg。

亚硝酸盐包括亚硝酸钾和亚硝酸钠,为白色或微蓝色的结晶或颗粒状粉末,味微咸,易溶于水。亚硝酸盐在酸性条件下与对氨基苯磺酸重氮化后,再与 $\alpha$ -萘胺反应生成紫红色溶液。将经过反应显色后的待测样品与标准液比色,即可半定量估算样品中的亚硝酸盐含量。

### 实践案例

#### 测定泡菜中的亚硝酸盐含量

色泽鲜艳、口感舒爽的泡菜是佐餐佳品,受到很多人的喜爱(图2-2-3)。但是在腌制泡菜的过程中,硝酸盐可能会被还原为亚硝酸盐。为保证食用安全,我们需要检测泡菜中亚硝酸盐的含量。



图2-2-3  
泡菜

#### 材料器具

泡菜; 对氨基苯磺酸、盐酸萘乙二胺、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{NaOH}$ 、盐酸溶液、氨水、 $\text{NaNO}_2$ 、蒸馏水、冰醋酸、体积分数为60%的醋酸溶液; 小型胶磨机、冰箱、试管、容量瓶、烧杯、比色管、滤纸等。

#### 活动程序

##### 1. 配制试剂

对氨基苯磺酸溶液: 称取10.0 g对氨基苯磺酸,溶于700 mL蒸馏水和300 mL冰醋酸,储存于棕色试剂瓶内,避光保存。



盐酸萘乙二胺溶液：称取盐酸萘乙二胺0.1g，用体积分数为60%的醋酸溶解，并稀释至100 mL，混匀置棕色试剂瓶内，放入冰箱保存备用。

对氨基苯磺酸溶液和盐酸萘乙二胺溶液配制完成后，应为无色透明溶液。如放置较长时间后溶液被氧化而呈色，应弃去，重新配制。

氯化铵缓冲溶液：在1L容量瓶中加入500 mL蒸馏水，然后加入20 mL盐酸混匀。再加入50 mL氨水，pH调至9.6~9.7，定容至1L。

ZnSO<sub>4</sub>溶液：称取120.0 g ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O，用蒸馏水溶解，定容至1L。

NaOH溶液：称取20.0 g NaOH，用蒸馏水溶解，并稀释至1L。

亚硝酸钠标准溶液：称取亚硝酸钠250.0 mg（在硅胶干燥器中干燥24 h），加蒸馏水溶解，移入500 mL容量瓶中，再加入100 mL氯化铵缓冲溶液，加蒸馏水定容至500 mL，摇匀，在4℃下避光备用（1.0 mL该溶液相当于500.0 μg亚硝酸钠）。

亚硝酸钠标准使用液：临用前，吸取1.0 mL亚硝酸钠标准溶液，置于100 mL容量瓶中，加蒸馏水定容至100 mL，混匀（1.0 mL该溶液相当于5.0 μg亚硝酸钠）。

显色剂：临用前，将对氨基苯磺酸溶液和盐酸萘乙二胺溶液等体积混合。

## 2. 配制标准液

吸取0.0 mL、0.5 mL、1.0 mL、2.0 mL、3.0 mL、4.0 mL、5.0 mL亚硝酸钠标准使用液（相当于0.0 μg、2.5 μg、5.0 μg、10.0 μg、15.0 μg、20.0 μg、25.0 μg亚硝酸钠），分别置于25 mL的比色管中，再各加入4.5 mL氯化铵缓冲溶液和2.5 mL体积分数为60%的醋酸溶液，然后立即加入5.0 mL显色剂，加蒸馏水定容至25 mL，摇匀，备用（图2-2-4）。

## 3. 处理样品



图2-2-4  
亚硝酸钠标准液的颜色

称取10.0 g绞碎后混匀的泡菜样品，置于250 mL烧杯中，加入70 mL蒸馏水和12 mL NaOH溶液，混匀。用NaOH溶液将样品的pH调至8，移入200 mL容量瓶中，加10 mL ZnSO<sub>4</sub>溶液，混匀。若不产生白色沉淀，可再加2~5 mL NaOH溶液，搅拌均匀。置于60℃左右的恒温水浴锅中加热10 min，取出后冷却至室温，加蒸馏水定容至200 mL，摇匀。放置0.5 h，用干燥滤纸过滤，弃去初滤液20 mL。取滤液

10 mL于25 mL比色管中，分别加入4.5 mL的氯化铵缓冲溶液和2.5 mL体积分数为60%的醋酸溶液，然后立即加入5.0 mL显色剂，加蒸馏水定容至25 mL，摇匀(图2-2-5)。

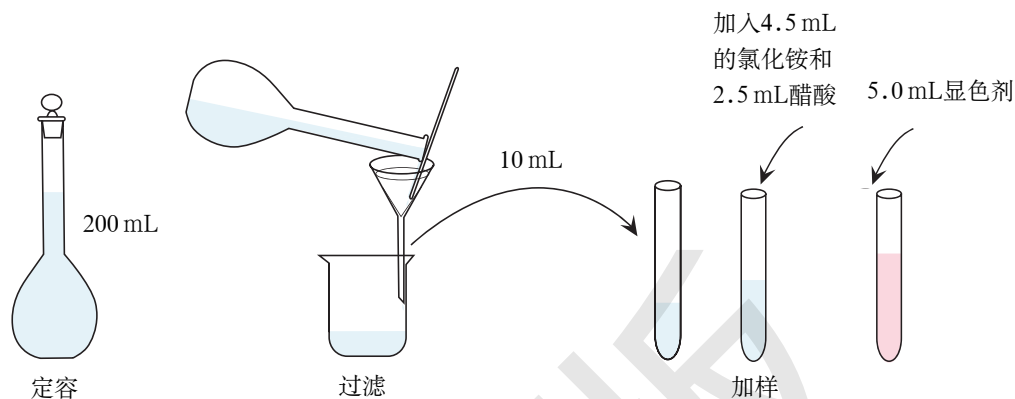


图2-2-5  
加样、显色过程示意图

#### 4. 比色观察

将样品处理后得到的颜色与标准液的颜色比较，从它们之间最相近的颜色中，得到相对应的亚硝酸盐的含量。

#### 结果分析

用下列公式计算样品中亚硝酸盐含量：

$$\text{亚硝酸盐含量}(\text{mg/kg}) = \frac{m_2 V_1}{m_1 V_2}$$

式中： $m_1$ —样品质量(g)

$m_2$ —测定用样液中亚硝酸盐质量( $\mu\text{g}$ )

$V_1$ —样品处理液的总体数(mL)

$V_2$ —测定用样液的体积(mL)



### 测定食品的亚硝酸盐含量

除了泡菜，其他腌制食品中也可能含有较多的亚硝酸盐，需要测定其中的亚硝酸盐含量，以确定其是否符合食用标准。

#### 活动建议

##### 1. 测定腌制肉食品中的亚硝酸盐含量

腌制肉食品时，常常加入亚硝酸盐作为增色、抑菌、防腐的添加剂(图2-2-6)。如果添加过多，会对人体健康造成危害。



图2-2-6  
腌制肉制品

### 2. 测定放置不同时间的剩菜中亚硝酸盐含量

大白菜、菠菜、萝卜等蔬菜中含有较多的硝酸盐，以这些蔬菜为原料做成的饭菜，如果贮存过久，其中的硝酸盐会转化成亚硝酸盐，导致亚硝酸盐含量增高。

#### 分析讨论

1. 你测定的食物样品中，亚硝酸盐含量合乎国家食品卫生标准吗？
2. 各小组同学测定的同一种食物样品的数据一致吗？如果有差异，请分析原因。

亚硝酸盐含量仅仅是食品有毒有害物质检测中的一项，食品安全的检测包括营养成分的分析、有毒有害物质和限制使用添加剂的分析、食品微生物检验等，通过这些方面的检测，可以全面鉴定食品的安全性。

#### 巩固提高

1. 随着剩菜放置时间的变长，其中的亚硝酸盐含量如何变化？为什么？
2. 请你根据实验的测定结果，结合查阅有关食品安全的资料，给家人和朋友日常生活中的饮食安全提出合理化建议。

#### 回顾总结

发酵食品是以农畜产品等为原料，在微生物的作用下，经过一系列酶促反应得到的各种代谢产物。发酵食品具有特殊的香味和独特的口感，并且营养丰富、易于消化，加上发酵食品不易腐败变质，利于储藏，成为广受人们喜爱的食物。

食品的安全性评估，主要是阐明食品中有关危害成分或物质的毒性及其风险大小。通过多种检测手段，评价某种食品是否可以安全食用，因此在食品安全性研究、监控、管理等方面有重要意义。

#### 食品卫生标准

为了保证食品安全，保障公众身体健康和生命安全，国家制定了《中华人民共和国食品安全法》，并根据此法，制定《中华人民共和国食品安全法实施条例》。



为了保护消费者的健康，适应我国参与全球经济一体化，尤其是我国加入世界贸易组织后，能更好地执行“实施动植物卫生检疫措施的协议”等有关规定和国际标准准则的需要，进一步提高我国食品卫生监督管理水平，国家发布了多项食品卫生标准。

## 第二章 食品加工与食品安全

部分食品卫生国家标准 (摘录)

食品	检测项目	限 量			
		<i>n</i>	<i>c</i>	<i>m</i>	<i>M</i>
酱油	菌落总数(CFU/mL)	5	2	$5 \times 10^3$	$5 \times 10^4$
	大肠菌群(CFU/mL)	5	2	10	$10^2$
食醋	菌落总数(CFU/mL)	5	2	$10^3$	$10^4$
	大肠菌群(CFU/mL)	5	2	10	$10^2$
碳酸 饮料	菌落总数(CFU/mL)	5	2	$10^2$	$10^4$
	大肠菌群(CFU/mL)	5	2	1	10
方便面	菌落总数(CFU/mL)	5	2	$10^4$	$10^5$
	大肠菌群(CFU/mL)	5	2	10	$10^2$
浓缩 果蔬汁	霉菌和酵母菌(CFU/mL)	$\leq 10^2$			
	大肠菌群(CFU/mL)	5	2	10	$10^2$
果冻	菌落总数(CFU/g)	5	2	$10^2$	$10^3$
	大肠菌群(CFU/g)	5	2	10	$10^2$
	霉菌(CFU/g)	$\leq 20$			
	酵母菌(CFU/g)	$\leq 20$			
生乳	菌落总数(CFU/mL)	$\leq 2 \times 10^6$			
酱腌菜	大肠菌群(CFU/g)	5	2	10	$10^3$

标准的颁布实施,为我国食品安全的监督管理工作提供了法律依据及技术保证,对规范市场行为、促进我国经济发展与社会稳定起到了积极的作用。