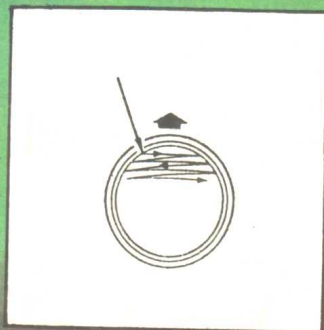
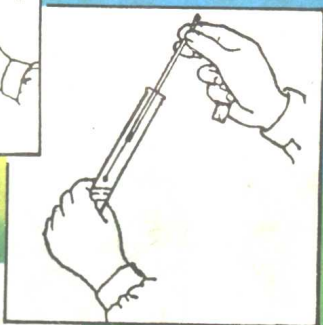
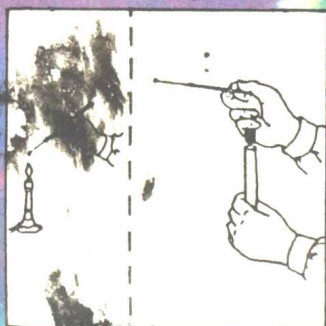


工业微生物 实验技术手册

● 诸葛健 王正祥 编著



中国轻工业出版社

工业微生物实验技术手册

诸葛健 王正祥 编著

中国轻工业出版社

(京)新登字034号

内 容 简 介

本手册是一部集作者及各有关专家长期教学、科研经验和成果编写而成的,实验条件适合于国内。全书共分十三章,202项实验内容。包括显微技术、工业微生物的形态学、纯培养技术、环境对工业微生物生长及发酵的影响、工业微生物的生理学、发酵过程及发酵食品中微生物的检测、选种与育种、工业微生物的保藏技术、固定化技术、工业微生物实验室的设计和实验数据的处理及常见单元操作和附录等,内容涉及工业微生物实验技术的各个主要方面,还附插图166幅和微生物单元规范实验操作套图8组72幅。内容广泛,先进,方法实用。

本手册可供微生物学、生物工程和食品工程等专业高年级学生和研究生,以及有关科研单位和工厂的科技人员实验参考使用。

工业微生物实验技术手册

诸葛健 王正祥 编著
责任编辑 唐是雯 李炳华

中国轻工业出版社出版
(北京市东长安街6号)
北京交通印务实业公司印刷
新华书店北京发行所发行
各地新华书店经售

850×1168毫米 1/32 印张:22.875 字数:476千字

1994年6月 第1版第1次印刷

印数:1—5000 定价:30.00元

ISBN7-5019-1584-9/TS-1034

前 言

工业微生物学是一门实践性很强的应用学科。只有掌握扎实而广泛的基础知识和熟练的操作技能才能真正掌握好这门应用科学。特别是当今生物工程在生产实践发展中的重要性日益突出,编写一本适合国内需要的,跟得上时代步伐的理论与实验技术相结合的工业微生物实验技术手册已是一项迫切的任务。

本手册共分十三章,202项实验内容。包括显微技术、工业微生物的形态学、纯培养技术、环境对工业微生物生长及发酵的影响、工业微生物的生理学、发酵过程及发酵食品中微生物的检测、选种与育种、工业微生物的保藏技术、固定化技术、工业微生物实验室的设计和实验数据的处理及常见单元操作和附录等,内容已涉及到工业微生物实验技术的各个主要方面。为了便于各个层次的学生和科技人员参考使用,还附各类插图166幅和微生物单元规范实验操作套图8组72幅。

本手册在选材上注意了更新,除保留一些典型实用的基础单元实验项目外,特别对一些新概念、新技术作了介绍。内容主要取自于作者及有关专家多年的教学和科研的成果与经验,使本手册具有内容的先进性和方法的实用性。

在本手册编写过程中,方慧英女士给以众多帮助,特致谢意。

由于本手册内容广泛,在编写过程中仍有不少匆促之处,有些实验内容还有待进一步充实提高。我们真诚希望广大读者和有关专家在参考使用过程中不断向我们提供宝贵的批评和建议,以臻逐趋完善。

诸葛健 王正祥

目 录

第一章 显微技术	1
第一节 显微镜的种类、特点和使用	1
一、明视野光学显微镜	1
〔实验1-1〕明视野显微镜的使用	5
二、其他光学显微镜	1
〔实验1-2〕暗视野显微镜的使用	8
〔实验1-3〕相差显微镜的使用	9
〔实验1-4〕荧光显微镜的使用	11
三、电子显微镜	11
〔实验1-5〕质粒DNA的透射电镜观察	12
〔实验1-6〕酵母细胞的扫描电镜观察	14
第二节 显微摄影	16
〔实验1-7〕显微摄影、菌落摄影和凝胶摄影	17
第三节 放射自显影	22
〔实验1-8〕硝酸纤维素滤纸上标记DNA的放射自显影	22
第二章 工业微生物基本形态及观察	24
第一节 细菌	24
〔实验2-1〕细菌形态的观察	26
第二节 放线菌	30
〔实验2-2〕放线菌的形态观察	31
第三节 噬菌体	32
〔实验2-3〕噬菌体的分离与纯化	35
〔实验2-4〕高效价噬菌体原液的制备	36
〔实验2-5〕溶源菌的鉴定	37
第四节 酵母菌	39

〔实验2-6〕 酵母菌细胞形态观察	42
〔实验2-7〕 酵母菌巨大菌落观察	42
第五节 小型丝状真菌(霉菌)	43
一、藻状菌(主要指根霉、毛霉)	43
〔实验2-8〕 根霉、毛霉的形态观察	45
二、曲霉	46
三、青霉	47
〔实验2-9〕 青霉、曲霉的形态观察	47
四、其他霉菌	49
第六节 食用真菌	50
〔实验2-10〕 平菇的瓶栽	51
第三章 工业微生物细胞一般结构与特殊结构的观察	53
第一节 染色技术	53
一、染色的基本原理	53
二、染料	54
三、染色种类	57
〔实验3-1〕 革兰氏鉴别染色法	57
〔实验3-2〕 活体染色法	62
〔实验3-3〕 单染色法	63
〔实验3-4〕 假丝酵母负染色法	63
〔实验3-5〕 枯草芽孢杆菌的抗酸性染色	64
〔实验3-6〕 真菌的荧光染色与观察	65
第二节 细胞各部结构成分的分离与观察	67
〔实验3-7〕 革兰氏阳性细菌细胞壁的制备	67
〔实验3-8〕 酵母细胞壁甘露聚糖的制备	69
〔实验3-9〕 细胞壁的形态观察	70
〔实验3-10〕 革兰氏阴性菌细胞外膜蛋白的分离	71
〔实验3-11〕 细胞荚膜的观察	72
〔实验3-12〕 细菌鞭毛的观察	73
〔实验3-13〕 微生物细胞核的观察	75
〔实验3-14〕 细菌染色体DNA的分离与观察	77

〔实验3-15〕 异染颗粒的观察·····	79
〔实验3-16〕 酵母细胞内脂肪颗粒和肝糖颗粒的观察·····	81
〔实验3-17〕 酵母液泡及线粒体的提取·····	81
第三节 芽孢、子囊孢子和假菌丝的观察 ·····	84
一、芽孢 ·····	84
〔实验3-18〕 细菌芽孢形成及发芽的观察·····	87
二、酵母子囊孢子·····	88
〔实验3-19〕 酵母子囊孢子的形成及观察·····	91
三、酵母假菌丝 ·····	92
〔实验3-20〕 酵母假菌丝的观察·····	93
第四章 工业微生物纯培养技术 ·····	94
第一节 消毒与灭菌·····	94
一、热杀菌 ·····	94
二、化学消毒剂 ·····	97
三、紫外线和射线 ·····	98
四、接种室的空气灭菌 ·····	99
五、过滤除菌 ·····	100
〔实验4-1〕 微孔滤膜滤器的使用 ·····	102
六、防霉剂 ·····	106
〔实验4-2〕 防霉剂的选用 ·····	107
第二节 培养基及其制备 ·····	109
一、培养基 ·····	109
二、培养基成分的说明 ·····	109
〔实验4-3〕 麦芽汁培养基的配制 ·····	112
第三节 分离、接种和培养技术·····	112
一、分离 ·····	112
〔实验4-4〕 试管倾倒培养皿分离法 ·····	112
〔实验4-5〕 平皿划线分离法 ·····	114
〔实验4-6〕 稀释分离平皿菌落计数 ·····	117
二、显微操作技术用于单细胞分离·····	121

〔实验4-7〕 显微操纵器用于单细胞分离	123
〔实验4-8〕 显微操纵器用于酵母子囊的解剖及子囊孢子单 孢化	124
三、接种	126
〔实验4-9〕 接种技术	126
四、摇瓶与发酵	129
〔实验4-10〕 摇瓶发酵生产柠檬酸	133
〔实验4-11〕 小型连续发酵实验	137
〔实验4-12〕 酿酒酵母的同步培养	139
〔实验4-13〕 厌氧罐分离培养厌氧微生物	143
第五章 培养条件对工业微生物生长与发酵的影响	145
第一节 温度	145
〔实验5-1〕 酵母营养细胞致死时间的测定	148
第二节 水活度与渗透压	148
〔实验5-2〕 培养基中糖和盐浓度对微生物生长的影响	151
第三节 氧气和氧化还原电位	151
〔实验5-3〕 微生物生长对氧的要求	155
〔实验5-4〕 培养液氧化还原值 (rH) 的测定	155
第四节 酸碱度	156
〔实验5-5〕 pH对微生物的影响	158
第五节 重金属和一些化合物对微生物的抑制作用	159
〔实验5-6〕 滤纸片法测定重金属对微生物的影响	159
〔实验5-7〕 消毒剂杀菌力的测定	160
第六节 表面张力	162
〔实验5-8〕 表面张力对微生物的影响	162
第七节 极端环境因素对微生物的影响	163
第六章 工业微生物的生理与发酵试验	164
第一节 微生物对碳源的利用	164
〔实验6-1〕 细菌对糖、醇及糖苷的利用	166
〔实验6-2〕 酵母对糖类的发酵	166

第二节 微生物对氮源的利用	167
〔实验6-3〕 细菌对硝酸盐的还原作用	168
〔实验6-4〕 酵母对氮素源的利用	169
第三节 细菌鉴定中的某些特殊生理实验	170
〔实验6-5〕 淀粉水解	170
〔实验6-6〕 V-P试验	171
〔实验6-7〕 硫化氢的生成	172
〔实验6-8〕 吲哚试验	172
〔实验6-9〕 过氧化氢酶的产生	174
〔实验6-10〕 明胶液化试验	175
〔实验6-11〕 石蕊牛乳试验	175
〔实验6-12〕 甲基红试验(M-R)	176
〔实验6-13〕 乙醇的氧化	177
〔实验6-14〕 乙酸的氧化	178
〔实验6-15〕 脲酶的测定	178
第四节 常用细菌的分离和检测	179
〔实验6-16〕 枯草杆菌	179
〔实验6-17〕 醋酸细菌	180
〔实验6-18〕 乳酸菌	182
〔实验6-19〕 德氏乳酸杆菌	185
〔实验6-20〕 丙酸细菌	186
〔实验6-21〕 丁酸细菌	188
第五节 酵母应用特性的测定	189
〔实验6-22〕 酵母发酵力的测定	189
〔实验6-23〕 压榨酵母发酵力的测定	191
〔实验6-24〕 面包酵母发面力的测定	192
〔实验6-25〕 酵母忍耐酒精浓度的测定	193
〔实验6-26〕 酵母抵抗防腐剂能力的测定	194
〔实验6-27〕 啤酒酵母凝絮力的测定	196
〔实验6-28〕 啤酒酵母产生双乙酰的测定	198
第六节 发酵制品的试验	200

〔实验6-29〕 细菌液化型淀粉酶的发酵及活力测定	200
附: 液化型淀粉酶活力的测定方法 (部颁标准)	200
〔实验6-30〕 曲霉的葡萄糖淀粉酶生成和活力测定	202
附: 糖化型淀粉酶活力的测定方法 (部颁标准)	202
〔实验6-31〕 米曲霉的蛋白酶生成及活力测定	205
附: 蛋白酶活力的测定方法 (部颁标准)	205
〔实验6-32〕 纤维素酶的发酵及其活力测定	209
〔实验6-33〕 乳酸发酵及测定	213
附: 乳酸的比色测定法	213
〔实验6-34〕 乳酸菌饮料	214
〔实验6-35〕 葡萄酒饮料	215
〔实验6-36〕 发酵法酿制食醋	216
第七章 发酵过程及发酵食品中微生物的检测	219
第一节 微生物生长、大小和数量的检测方法	219
一、细胞质量测定	219
二、细胞菌数测定法	220
〔实验7-1〕 酵母细胞数的测定	220
〔实验7-2〕 酵母细胞大小的测定	222
〔实验7-3〕 细菌增殖曲线的测定	223
〔实验7-4〕 丝状真菌生长速率的测定	225
第二节 发酵和食品工业中常见的微生物种类及其概测	226
一、发酵和食品工业中常见微生物的种类	227
二、发酵和食品工业中常见微生物类属检索表	228
三、发酵和食品工业中常见微生物类别的概测	232
第三节 发酵和食品工业用水和发酵过程微生物数量的检测	238
一、发酵和食品工业用水微生物数量的测定	238
〔实验7-5〕 水中细菌数的测定	239
〔实验7-6〕 水中大肠菌群数量的测定	240
〔实验7-7〕 水中大肠杆菌数量的测定	242

〔实验7-8〕 大肠杆菌的简易检出法	246
二、酒醅中微生物总数测定	247
〔实验7-9〕 酒醅中微生物数量的测定	247
〔实验7-10〕 固态发酵水浆厌氧微生物的分离	248
第四节 培养皿或试管中菌落总数的确定	249
第五节 免疫学技术	250
一、免疫学中的基本概念及原理	250
二、抗体的制备	251
〔实验7-11〕 乳化抗原的制备	252
〔实验7-12〕 动物的免疫	254
〔实验7-13〕 兔抗血清的收集	256
〔实验7-14〕 杂交瘤与单克隆抗体的制备	257
三、抗体的纯化及标记	263
〔实验7-15〕 抗血清中IgG抗体的纯化	263
〔实验7-16〕 辣根过氧化物酶(HRP)标记抗体IgG的制备	264
〔实验7-17〕 荧光抗体的制备	266
四、凝集反应	267
〔实验7-18〕 玻片凝集试验	267
〔实验7-19〕 试管凝集试验	267
〔实验7-20〕 反向间接血凝试验	268
五、沉淀反应	270
〔实验7-21〕 单相免疫扩散法	270
〔实验7-22〕 双相免疫扩散法	271
六、酶联免疫吸附技术	272
〔实验7-23〕 夹心ELISA	273
七、免疫荧光试验	275
〔实验7-24〕 间接免疫荧光试验	275
八、免疫胶体金技术	276
〔实验7-25〕 免疫胶体金试验	276
九、免疫转移电泳	277
〔实验7-26〕 免疫转移电泳法	278

第六节 分子生物学技术	280
一、GC含量测定	280
〔实验7-27〕热变性温度法测定GC含量	281
二、聚丙烯酰胺凝胶电泳技术	283
〔实验7-28〕SDS-PAGE	284
〔实验7-29〕聚丙烯酰胺凝胶的等电聚焦电泳	289
三、色谱技术	291
〔实验7-30〕离子交换色谱技术	293
〔实验7-31〕凝胶过滤色谱技术	298
〔实验7-32〕Sephacrose 4B溴化氰偶联技术	300
〔实验7-33〕Sephadex 过碘酸钠偶联技术	301
〔实验7-34〕亲和色谱技术	302
四、核酸分子杂交技术	304
(一) 同位素标记探针的制备	305
〔实验7-35〕缺口平移法制备DNA探针	306
〔实验7-36〕随机引物标记法	309
〔实验7-37〕RNA探针的制备	311
(二) 非同位素标记核酸探针的制备	314
〔实验7-38〕Dig-核酸探针的制备	314
〔实验7-39〕光敏生物素标记核酸探针的制备	316
(三) 待检样固相化	317
〔实验7-40〕凝胶中DNA转移至硝酸纤维膜 (Southern blot)	317
〔实验7-41〕菌落原位杂交	319
(四) 硝酸纤维膜上DNA 原位杂交	320
〔实验7-42〕放射性同位素标记核酸探针的杂交	321
〔实验7-43〕地高辛标记核酸探针的杂交及显色	323
〔实验7-44〕生物素标记核酸探针的杂交及显色	325
五、聚合酶链反应技术 (PCR)	326
〔实验7-45〕PCR技术	327
第七节 沙门氏菌和志贺氏菌的检测	329

〔实验7-46〕沙门氏菌和志贺氏菌的检验·····	330
第八章 选种和育种 ·····	335
第一节 工业菌种筛选程序 ·····	335
一、采样·····	335
二、增殖培养·····	336
三、培养分离·····	337
四、筛选·····	337
五、毒性试验·····	338
第二节 培养分离 ·····	338
一、自然界中细菌的分离·····	340
(一) 采样和采集方法·····	340
(二) 生态学参数及培养基的组成原则·····	341
(三) 分离培养基及试液·····	342
(四) 土中细菌的分离·····	346
〔实验8-1〕土中细菌的直接分离·····	346
〔实验8-2〕土中细菌的富集培养与分离·····	347
(五) 植物体上细菌的分离·····	349
〔实验8-3〕植物体上细菌的直接分离·····	349
〔实验8-4〕植物体上细菌的富集培养及分离·····	349
(六) 水中细菌的分离·····	350
〔实验8-5〕水中细菌的直接分离·····	351
〔实验8-6〕水中细菌的滤膜压印分离法·····	351
(七) 次代培养及纯化·····	352
二、放线菌的分离·····	352
(一) 采样及采集方法·····	352
(二) 生态学参数和培养基的组成原则·····	352
(三) 放线菌分离培养基及试液·····	353
(四) 土样中放线菌的分离·····	359
〔实验8-7〕土样中放线菌的非选择性分离·····	360
(五) 植物及植物材料上放线菌的分离·····	361
〔实验8-8〕植物体上放线菌的分离·····	361

(六) 植物体上放线菌分离的饵诱法	362
〔实验8-9〕 饵诱法分离植物体上的放线菌	362
(七) 水中放线菌的分离	363
(八) 次代培养及纯化	363
三、真菌分离	364
(一) 采样及采集方法	364
(二) 生态学参数及培养基组成原则	364
(三) 真菌培养分离常用培养基及试液	366
(四) 土中真菌的分离	368
〔实验8-10〕 土样中真菌的压贴分离	369
(五) 植物材料中真菌的分离	369
(六) 水中真菌的分离	370
(七) 从子实体直接分离培养担子菌	370
〔实验8-11〕 担子菌组织分离法	371
〔实验8-12〕 担子菌孢子分离	371
(八) 植物组织中担子菌的分离	372
(九) 次代培养及纯化	372
四、目标菌株的分离、筛选及毒性试验	372
〔实验8-13〕 利用碱法纸浆废液的微生物的分离	372
〔实验8-14〕 葡萄酒酵母的筛选	373
〔实验8-15〕 生产选种	374
〔实验8-16〕 发酵废液COD测定	374
第三节 工业菌种的育种方针	376
第四节 富集培养技术在育种中的应用	377
一、去调节突变株的富集	378
二、营养缺陷型的富集	380
三、富集法在研究次级代谢的重组DNA技术中的应 用	383
第五节 诱变育种	383
一、诱变剂和诱变处理	384
二、诱变育种步骤	388

〔实验8-17〕 紫外线的诱变育种·····	391
〔实验8-18〕 亚硝基胍诱变曲霉菌(黑曲霉、米曲霉)·····	392
〔实验8-19〕 链霉菌菌丝体的诱变育种·····	393
第六节 营养缺陷型的选育·····	395
一、诱变方法·····	396
二、淘汰野生型·····	396
三、检出缺陷型·····	397
四、营养缺陷型生长谱的确定·····	398
〔实验8-20〕 大肠杆菌营养缺陷型的筛选·····	401
〔实验8-21〕 酵母营养缺陷型的筛选·····	403
〔实验8-22〕 青霉菌营养缺陷型菌株的筛选·····	405
第七节 呼吸缺陷型及代谢调节突变株的筛选·····	407
〔实验8-23〕 酵母呼吸缺陷型的筛选·····	407
〔实验8-24〕 氨基酸抗反馈调节突变株的选育·····	408
第八节 抗噬菌体菌株的选育·····	412
〔实验8-25〕 抗噬菌体产 α -淀粉酶菌株的选育·····	412
第九节 基因育种·····	413
一、质粒的提取与纯化·····	414
〔实验8-26〕 大肠杆菌质粒DNA的提取·····	414
〔实验8-27〕 链霉菌质粒DNA的分离与纯化·····	426
二、染色体DNA的提纯·····	428
〔实验8-28〕 链霉菌染色体DNA的分离与纯化·····	429
〔实验8-29〕 酿酒酵母染色体DNA的提取·····	431
三、DNA和RNA的定量测定·····	433
〔实验8-30〕 DNA的定量测定·····	433
四、遗传转化·····	435
〔实验8-31〕 质粒DNA转化感受态大肠杆菌·····	438
〔实验8-32〕 质粒DNA转化啤酒酵母·····	439
五、DNA的琼脂糖凝胶电泳·····	440
〔实验8-33〕 质粒DNA的琼脂糖凝胶电泳·····	444

六、DNA的聚丙烯酰胺凝胶电泳	446
〔实验8-34〕 DNA的聚丙烯酰胺凝胶电泳	448
〔实验8-35〕 从凝胶中回收纯化DNA片段	448
七、杂交育种	451
(一) 细菌杂交	451
〔实验8-36〕 细菌的接合	451
(二) 酵母杂交育种技术	453
〔实验8-37〕 酵母单倍体的分离与鉴定	455
〔实验8-38〕 罕见交配法转移酵母杀伤质粒	457
第十节 原生质体育种	460
一、原生质体融合育种的特点	461
二、原生质体融合育种步骤	466
三、原生质体融合育种的要点	466
四、原生质体转化	475
五、原生质体再生率和融合率计算	476
〔实验8-39〕 芽孢杆菌的原生质体融合	477
〔实验8-40〕 链霉菌属原生质体融合	480
〔实验8-41〕 小单胞菌的原生质体融合	485
〔实验8-42〕 酵母的原生质体融合	487
〔实验8-43〕 丝状真菌的原生质体融合	491
〔实验8-44〕 芽孢杆菌属间原生质体转化	497
〔实验8-45〕 质粒DNA转化链霉菌原生质体	498
〔实验8-46〕 真菌原生质体转化	501
六、原生质体技术中的一些特殊技术	503
(一) 供体原生质体的热灭活	503
(二) 供体原生质体的紫外灭活	503
(三) 遗传转移	504
〔实验8-47〕 原生质体融合法转移酵母线粒体及杀伤质粒	504
(四) 原生质体诱变育种	506
〔实验8-48〕 紫外线诱变原生质体选育苏氨酸高产菌	506
(五) 原生质体电融合技术	507

〔实验8-49〕电诱导酵母原生质体融合·····	507
第十一节 基因工程技术用于工业菌种改良·····	509
〔实验8-50〕耐热 α -淀粉酶基因的克隆和表达·····	514
第九章 工业微生物菌种保藏技术 ·····	520
第一节 冷冻保藏·····	520
一、普通冷冻保藏技术·····	521
二、超低温冷冻保藏技术·····	521
三、液氮冷冻保藏技术·····	521
〔实验9-1〕快速沙土管保藏法·····	523
第二节 冻干保藏·····	524
〔实验9-2〕菌种冷冻干燥保藏·····	525
第三节 其他保藏方法·····	528
一、传代保藏·····	528
二、矿物油中浸没保藏·····	528
〔实验9-3〕液体石蜡保藏菌种·····	529
三、干燥-载体保藏·····	530
第四节 基因工程菌的保藏·····	531
第五节 微生物活力和稳定性测定·····	532
第六节 常用菌种保藏培养基·····	532
第七节 菌种保藏机构·····	536
第十章 微生物细胞固定化方法 ·····	539
第一节 载体结合法·····	539
第二节 交联法·····	541
第三节 包埋法·····	541
一、藻酸钙凝胶包埋法·····	542
〔实验10-1〕酿酒酵母的藻酸钙固定化·····	544
二、 κ -角叉胶包埋法·····	545
〔实验10-2〕一步法 κ -角叉胶细胞固定化·····	547
〔实验10-3〕二步法 κ -角叉胶细胞固定化·····	549
〔实验10-4〕固定化细胞的回收与活细胞计数·····	550