



发酵工艺学实验

余晓红 彭英云 李凤伟 薛 锋 商曰玲 / 编



科学出版社

发酵工艺学实验

余晓红 彭英云 李凤伟 薛 锋 商曰玲 编

科学出版社

北京

内 容 简 介

本书内容分为两大部分,第一部分为发酵工艺学基础实验,包括发酵菌株的选育及保藏、摇瓶发酵、发酵生化参数的测定和发酵产品的分离提取;第二部分为综合性部分,包含工业上常见的16个发酵工艺实例,既有食品发酵实例又有生物制品发酵实例。本书在编写形式上突出以学生为本的思想,在实验中除让学生明确实验目的、原理和基本操作外,还利用新形态教材形式,在部分实验中制作视频,使用手机扫描二维码即可在线观看实验过程,便于学生在课前预习。

本书适合理、工、农、林各高等院校食品科学与工程及生物工程相关专业本科生学习使用,也可供相关企业员工或科技人员查阅参考。

图书在版编目(CIP)数据

发酵工艺学实验/余晓红等编. —北京:科学出版社,2019.12

ISBN 978-7-03-062711-7

I. ①发… II. ①余… III. ①发酵-生产工艺-实验-高等学校-教材
IV. ①TQ920.6-33

中国版本图书馆CIP数据核字(2019)第242592号

责任编辑:胡凯 许蕾 沈旭/责任校对:杨聪敏

责任印制:张伟/封面设计:许瑞

科学出版社出版

北京东黄城根北街16号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

北京九州迅驰传媒文化有限公司印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2019年12月第一版 开本:787×1092 1/16

2020年1月第二次印刷 印张:10 1/2

字数:249 000

定价:49.00元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

前 言

发酵工艺学实验是“发酵工艺学”课程的重要组成部分。目前现有的发酵工艺学实验教材大致分为食品发酵工艺学实验教材和生物工艺学实验教程，分别适用于食品科学与工程专业和生物工程专业，没有实现教学与学科、教学与科研的交叉和融会贯通。本教材涵盖生物发酵技术的基础操作、食品和生物制品的发酵生产模块，系统地将发酵工程基础与发酵生产实例有机结合，包括传统发酵食品、酒类发酵、有机酸、氨基酸、多糖、抗生素及酶制剂的发酵生产，在内容上可同时满足生物工程专业和食品科学与工程专业的实验教学。

本教材由从事生物工程、食品科学与工程理论教学与实验课程的教师编写，编者在长期的教学和科研过程中积累了丰富的经验。教材共分为两个部分，第一部分为基础篇，主要内容为发酵菌株的选育及保藏、摇瓶发酵、发酵生化参数的测定及发酵产品的分离提取；第二部分主要为发酵工艺实例，包括常见发酵食品的发酵过程和关键参数的测定，如有机酸、氨基酸、多糖、抗生素和酶制剂的测定。全书由盐城工学院余晓红教授统编，第一章和第二章由盐城工学院薛锋老师编写，第三章第一至第四节及第五章第六和第七节由盐城工学院商曰玲老师编写，第三章第五至第九节、第五章第一节、第三和第四节由常熟理工学院彭英云老师编写，第四章和第五章第五节由盐城工学院李凤伟老师编写，第五章第二节由余晓红编写。本书在编写过程中，力求突出实用性、科学性与先进性相结合，以期符合本科教育要求。

本教材由盐城工学院教材基金资助出版。本教材参考了国内外同行的科研成果和著作，在此对相关作者表示感谢。由于编者的学识和水平有限，书中难免出现疏忽之处，敬请读者批评指正，以便将来修订时进一步完善。

编 者

2019年8月

目 录

前言

第一章 发酵菌株的选育及保藏	1
第一节 发酵菌株的筛选	1
实验一 产脂肪酶生产菌株的分离筛选	1
实验二 乳酸菌的分离筛选	4
实验三 酵母菌的分离筛选	7
第二节 发酵菌株的选育	9
实验四 紫外线诱变选育 α -淀粉酶高产菌株	9
实验五 发酵菌株的离子束诱变	11
实验六 发酵菌株的原生质体融合育种	13
实验七 重组基因工程菌的构建	16
实验八 营养缺陷型菌株的筛选	19
实验九 发酵菌株的复壮和保藏	23
第二章 摇瓶发酵	27
实验十 培养基的配制与灭菌	27
实验十一 发酵培养基的单因素优化实验	29
实验十二 发酵工艺的正交优化实验	32
实验十三 发酵工艺的响应面优化实验	35
第三章 发酵生化参数的测定	40
第一节 发酵菌体生物量的测定	40
实验十四 比浊法测定发酵液中菌体浓度	40
实验十五 测定菌体干重	41
第二节 糖含量测定	43
实验十六 DNS 法测定还原糖含量	43
实验十七 苯酚硫酸法测定发酵液中总糖含量	45
实验十八 酶试剂盒法测定葡萄糖含量	46
第三节 氮含量测定	48
实验十九 靛酚蓝分光光度法测定发酵液的氨态氮	48
实验二十 甲醛滴定法测定发酵液中的氮含量	49
第四节 蛋白质和氨基酸含量的测定	51
实验二十一 双缩脲法测定蛋白质含量	51
实验二十二 Folin-酚法测定蛋白质浓度	52
实验二十三 考马斯亮蓝法测定蛋白质浓度	54

实验二十四 茚三酮比色法测定氨基酸浓度	56
第五节 无机磷含量的测定	58
实验二十五 钼酸铵法测定无机磷	58
实验二十六 钼钒法测定无机磷	59
第六节 酸度的测定	62
实验二十七 总酸度的测定	62
实验二十八 电位滴定法测定啤酒的总酸度	64
第七节 生物效价的测定	66
实验二十九 管碟法测定抗生素生物效价	66
实验三十 微生物比浊法测定红霉素效价	69
第八节 体积溶氧系数的测定	71
实验三十一 亚硫酸盐法测定体积溶氧系数	71
第九节 发酵废液 COD 测定	73
实验三十二 重铬酸钾标准法测定发酵废液的 COD	73
第四章 发酵产品的分离提取	77
第一节 发酵液预处理	77
实验三十三 絮凝技术预处理发酵液	77
实验三十四 发酵液中金属离子的去除	79
第二节 细胞破碎	81
实验三十五 超声破碎法破碎酵母细胞	81
实验三十六 酶溶法破碎大肠杆菌细胞	83
第三节 发酵产物分离纯化	85
实验三十七 脂肪酶的盐析沉淀	85
实验三十八 脂肪酶的透析实验	87
实验三十九 离子交换法分离纯化柠檬酸	88
实验四十 淀粉酶的双水相萃取	91
实验四十一 红霉素的有机溶剂萃取	93
实验四十二 桑黄中黄酮类化合物的提取与检测	94
第四节 结晶技术	96
实验四十三 柠檬酸的结晶	96
第五节 产品浓缩与干燥技术	98
实验四十四 多糖的真空浓缩	98
实验四十五 多糖的冷冻干燥	99
第五章 发酵工艺实例	102
第一节 发酵食品工艺实验	102
实验四十六 泡菜的发酵	102
实验四十七 凝固型酸奶的制作	104
实验四十八 腐乳的制作	109

第二节 酒类发酵工艺实验·····	110
实验四十九 啤酒的发酵·····	110
实验五十 黄酒的酿造·····	118
实验五十一 葡萄酒的酿造·····	121
第三节 有机酸发酵工艺实验·····	127
实验五十二 柠檬酸的发酵·····	127
实验五十三 L-乳酸的发酵·····	131
第四节 氨基酸的发酵工艺实验·····	134
实验五十四 谷氨酸的发酵·····	134
实验五十五 赖氨酸的发酵·····	138
第五节 多糖的发酵·····	140
实验五十六 姬松茸多糖的发酵·····	140
实验五十七 灵芝多糖的发酵·····	142
第六节 抗生素的发酵工艺实验·····	144
实验五十八 青霉素的发酵·····	144
实验五十九 红霉素的发酵·····	146
第七节 酶制剂的发酵工艺实验·····	149
实验六十 淀粉酶的发酵生产·····	149
实验六十一 蛋白酶的发酵生产·····	151
参考文献·····	158

第一章 发酵菌株的选育及保藏

第一节 发酵菌株的筛选

实验一 产脂肪酶生产菌株的分离筛选

一、实验目的

- (1) 学习从自然环境中分离工业微生物菌株的方法；
- (2) 熟悉无菌操作技术；
- (3) 掌握从环境中采集样品并从中分离纯化某种微生物的完整操作步骤；
- (4) 巩固微生物学实验技术；
- (5) 掌握脂肪酶活性的测定方法。

二、实验原理

脂肪酶是一类特殊酯键水解酶，产脂肪酶的微生物分布广泛，主要以各类真菌为主；在富含油脂的地方进行采样，以乳化橄榄油为底物，利用稀释平板分离法筛选产脂肪酶菌株。脂肪酶作用于橄榄油乳化液，催化酯键水解，生成脂肪酸。脂肪酸与琼脂中的指示剂（罗丹明或维多利亚蓝）反应，在琼脂平板形成水解圈，根据有无水解酶对脂肪酶酶活进行定性分析，利用对硝基苯酚法测定脂肪酶酶活，脂肪酶水解对硝基苯酚酯产生具有颜色的对硝基苯酚，在 420 nm 波长下测出其吸光度，再对照对硝基苯酚吸光度工作曲线得出脂肪酶活力。

三、实验仪器和试剂

1. 实验材料

由于脂肪酶有分解油脂的特性，故采样环境应含油量较高，如油脂厂、乳品厂、食堂、酒厂、肉制品厂等。

2. 实验仪器

烧杯、玻璃棒、锥形瓶、试管、平板、接种环、制备乳化状态的针筒等。超净工作台、精密电子天平、高压蒸汽灭菌锅、可见光分光光度计、台式高速冷冻离心机、摇床、超声波破碎仪、水浴锅。

3. 实验药品与试剂

(1) 实验药品: 橄榄油、三丁酸甘油酯、维多利亚蓝、对棕榈酸硝基苯酯 (*p*-NPP)、聚乙烯醇、生理盐水、异丙醇、10%三氯乙酸溶液、10%Na₂CO₃ 溶液等。

(2) 试剂:

①1%的维多利亚蓝 B 溶液: 称取 1 g 维多利亚蓝 B 溶于 100 mL 蒸馏水中。

②0.04%溴甲酚紫: 称取 0.04 g 溴甲酚紫溶于 100 mL 蒸馏水中。

③4%聚乙烯醇 (PVA) 溶液: 称取 PVA 4 g, 加水 80 mL, 在沸水中加热搅拌, 直至全部溶解, 冷却后定容到 100 mL, 以干净的双层纱布过滤, 取滤液备用。

④聚乙烯醇 (PVA)-橄榄油乳化液: 量取 4% PVA 溶液 15 mL, 加橄榄油 5 mL, 用超声波破碎仪处理 10 min, 即成乳白色 PVA-橄榄油乳化液。该溶液要现配现用, 如储存在冰箱中, 有效期为一周。

⑤1 mol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.0): 在 800 mL 水中溶解 121.1 g Tris 碱, 加入浓 HCl 调 pH 至 8, 加蒸馏水定容至 1 L, 分装后高压灭菌。使用时用蒸馏水稀释至适当浓度即可。

4. 培养基

(1) 富集培养基: (NH₄)₂SO₄ 0.1 g, K₂HPO₄ 0.1 g, NaCl 0.05 g, MgSO₄·7H₂O 0.01 g, 酵母提取物 0.2 g, 用蒸馏水定容至 100 mL, pH 自然, 121 °C 灭菌 20 min, 备用。

(2) 油脂同化平板分离培养基: (NH₄)₂SO₄ 0.1 g, K₂HPO₄ 0.1 g, KCl 0.05 g, MgSO₄·7H₂O 0.05 g, FeSO₄·7H₂O 0.001 g, 琼脂 2.5 g, pH 自然, 取橄榄油与 2%的聚乙烯醇 (PVA) 以 1:3 的比例混合, 用细胞破碎仪破碎乳化 10 min, 115 °C 灭菌 30 min 后取 12 mL 加入 100 mL 上述培养基中。使用时加入 0.04%溴甲酚紫 12 mL 作为酸碱指示剂进行倒平板。

(3) 三丁酸甘油酯-维多利亚蓝 B 平板筛选培养基: 三丁酸甘油酯 6.25 mL, 3%聚乙烯醇溶液 18.75 mL, 1%维多利亚蓝 B 2.5 mL, 琼脂粉 2.5 g, NaOH-Gly (0.05 mol/L, pH 10.0) 缓冲液 225 mL 加入 500 mL 三角瓶中, 加热溶解琼脂粉, 趁热用细胞破碎仪均质 5 min, 倒平板, 静置自然冷却。

四、实验内容

土样采集→富集培养→分离筛选 (透明圈法、变色圈法)→复筛 (摇瓶发酵)→分光光度法酶活测定→菌种保藏。

1. 土样分离与富集培养

取土样 4.5 g 加入 50 mL 已灭菌的 0.5%生理盐水中, 30 °C 摇床振荡悬浮, 静置 30 min, 取 1 mL 上清液加入 100 mL 富集培养基中, 将加入土样的一个富集培养基三角瓶放在 18~20 °C、200 r/min 的摇瓶中, 培养 2~4 天, 然后取 1 mL 培养液移入另一支装有二次富集培养基的三角瓶中, 在相同的条件下重复培养一次。

2. 脂肪酶产生菌的初筛

富集培养液用无菌水梯度稀释,取 0.1 mL 菌液涂布于分离平板上进行初筛,在 30 °C 条件下培养 5~7 天。产脂肪酶的微生物生成的菌落周围有透明圈。依据产生透明圈的先后和透明圈直径与菌落直径比值的大小分离出脂肪酶活性高且产酶周期短的菌株,直径比大的菌落表明水解脂肪酶的能力强(表 1)。将直径比较大的菌落挑出,保存在斜面培养基上。将这些菌株液体培养 48 h 后,取 50 μ L 的培养液上清液加入三丁酸甘油酯-维多利亚蓝检测平板的小孔中,37 °C 保温 48 h 进行酶解反应,依据培养平板上形成的降解圈大小再次进行菌种筛选。

3. 复筛(摇瓶发酵)

将一环斜面培养的高产脂肪酶菌株接入液体种子培养基中,200 r/min、28 °C 摇床培养 1~2 天进行活化,再取 1 mL 转接到 50 mL 的液体培养基中,200 r/min、28 °C 摇床培养 48 h,将菌体培养液 10000 r/min 离心 10 min,上清记为培养上清,并将菌体重悬于 50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0) 缓冲液中,用超声波破碎仪破碎细胞(10 s/次,间隔 15 s,共破碎 10 次),15000 r/min、4 °C 离心 30 min,此上清记为破碎上清,即得到粗酶液,供测试分析。

4. 分光光度法酶活测定

底物溶液 A: 90 mg 对棕榈酸硝基苯酯 (*p*-NPP) 溶于 30 mL 异丙醇;缓冲液 B: 50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0)。取 2 个试管,分别是对照管和样品管。向两个试管中各加入缓冲液 B 1.8 mL 及底物溶液 A 0.1 mL,37 °C 水浴保温 5 min,然后在对照管中加入已灭活的酶液 0.1 mL,在样品管中加入酶液 0.1 mL,立即混匀计时,在水浴中准确反应 10 min 后加入 0.5 mL 10% 三氯乙酸溶液终止反应,再加入 0.5 mL 10% Na_2CO_3 溶液显色。420 nm 分光光度计下测定酶催化产生的对硝基苯酚的吸收值。脂肪酶 1 个酶活单位定义:在 pH 8.0、37 °C 条件下,以每分钟释放 1 μ mol 对硝基苯酚所需的酶量。

五、实验结果

1. 取样环境情况

地点一:

地点二:

地点三:

2. 绘制透明圈

表 1

项目	地点一			地点二			地点三		
产酶菌落数/个									
比透明圈									

注:比透明圈=透明圈直径(mm)/菌落直径(mm)

六、注意事项

(1) 由于反应体系中存在缓冲液的缓冲作用, 因此直接滴定法的合理性常令人怀疑, 更容易给科研人员造成困扰, 而且直接滴定法的稳定性一般不十分理想。

(2) 三丁酸甘油酯和三油酸甘油酯作为底物的时候, 脂肪酶活力检测的结果比较稳定, 但是由于三丁酸甘油酯和三油酸甘油酯价格比较昂贵, 因此使用的人很少。

(3) 辛酸对硝基苯酚酯的水解速度比较快, 因此检测脂肪酶活力的时候误差比较大; 而乙酸对硝基苯酚酯水解的速度比较缓慢, 因此实验误差相对较小。但是辛酸对硝基苯酚酯和乙酸对硝基苯酚酯都不是脂肪酶的天然底物, 一般认为不适合作为脂肪酶活力检测的底物, 尤其是以乙酸对硝基苯酚酯作为底物, 其检测的活力作为酯酶活力似乎更合理一些。

(4) 本实验筛选得到的野生菌株产胞外脂肪酶活性较小, 采用对传统的直接酸碱滴定法加以改进的方法来检测脂肪酶活性。

七、思考题

- (1) 从不同地点获得的结果为什么会存在差异?
- (2) 可初步得出什么样的结论?

实验二 乳酸菌的分离筛选

一、实验目的

- (1) 学习微生物菌种分离技术;
- (2) 了解和掌握乳酸菌的菌种特性;
- (3) 学习从新鲜酸乳中分离纯化乳酸菌的方法;
- (4) 学习乳酸的检测方法。

二、实验原理

选择适合于待分离微生物的生长条件, 形成只利于该微生物生长而抑制其他微生物生长的环境, 从而淘汰一些不需要的微生物, 加入某种指示剂, 使待分离微生物在培养基中形成具有明显特征的菌落。

微生物在固体培养基上生长形成单个菌落, 挑取菌落平板划线获得纯培养。通过吡啶试验、糖发酵试验及小型发酵试验证明该菌种为乳酸菌, 杆状的叫作短乳杆菌, 链球状的叫作乳链球菌。

三、实验仪器和材料

1. 实验材料

- (1) 菌种来源: 市场销售的各种新鲜酸乳。

(2) 培养基:

①BCG 牛乳培养基: (A) 溶液: 脱脂乳粉 100 g, 水 500 mL, 加入 1.6% 溴甲酚绿 (BCG) 乙醇溶液 1 mL, 80 °C 灭菌 20 min; (B) 溶液: 酵母膏 10 g, 水 500 mL, 琼脂 20 g, pH 6.8, 121 °C 灭菌 20 min。在无菌条件下趁热将 (A)、(B) 溶液混合均匀后倒平板。

②乳酸菌培养基: 牛肉膏 5 g, 酵母膏 5 g, 蛋白胨 10 g, 葡萄糖 10 g, 乳糖 5 g, 氯化钠 5 g, 水 1000 mL, pH 6.8, 1.6% 溴甲酚绿。

③蛋白胨水培养基: 蛋白胨 10 g, 氯化钠 5 g, 水 1000 mL, pH 7.6。

④糖发酵培养基: 蛋白胨水培养基 1000 mL, 1.6% 溴甲酚紫乙醇溶液 1~2 mL, pH 7.6, 另配 20% 葡萄糖溶液和 20% 蔗糖溶液各 10 mL。

(3) 制法:

①将上述含指示剂的蛋白胨水培养基 (pH 7.6) 分装于试管中, 在每管内放一倒置的小玻璃管。

②将已分装好的蛋白胨水培养基和 20% 的各种糖溶液分别灭菌, 蛋白胨水培养基 121 °C 灭菌 20 min, 糖溶液 112 °C 灭菌 30 min。

③灭菌后, 每管以无菌操作分别加入 20% 的糖溶液 (按每 10 mL 培养基中加入 20% 的糖溶液 0.5 mL), 则成 1% 的浓度。

2. 相关试剂

(1) 1.6% 溴甲酚紫乙醇溶液: 溴甲酚紫 1.6 g 溶于 100 mL 乙醇中, 储存于棕色瓶中保存备用。

(2) 吡啶试剂: 将 8 g 对二甲基氨基苯甲醛溶解于 760 mL 中 95% 乙醇, 然后缓慢加入浓盐酸 160 mL。

(3) 2% 高锰酸钾: 避光处称取 2.0 g 高锰酸钾, 加水 100 mL 溶解, 混匀。

(4) 含氨的硝酸盐溶液: 称取硝酸银 2 g, 加蒸馏水 100 mL, 待硝酸银溶解后, 取出 10 mL 备用, 向剩余的 90 mL 硝酸银中滴加氨水, 即可形成很厚的沉淀; 继续滴加氨水至沉淀刚刚溶解成为澄清溶液为止; 再将备用的硝酸银慢慢滴入, 则溶液出现薄雾, 但轻轻摇动后, 薄雾状的沉淀又消失; 继续滴入硝酸银, 直到摇动后仍呈现轻微而稳定的薄雾状沉淀为止。

3. 实验仪器

恒温箱、高压蒸汽灭菌锅、水浴锅、培养皿、试管、涂布器、酒精灯。

四、实验内容

1. 稀释分离

(1) 培养基的配制;

(2) 灭菌;

(3) 倒平板;

(4) 制备样品稀释液 (图 1);

(5) 接种 (涂布法);

(6) 培养。

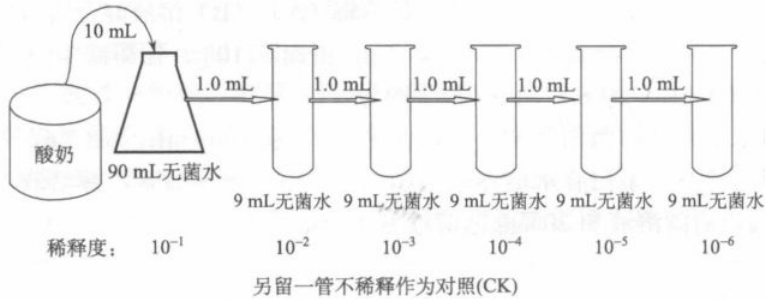


图 1 酸奶悬液的配制

取市售新鲜酸乳稀释至 10^{-6} , 取其中 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 这 3 个稀释度的稀释液各 0.2 mL, 分别接入 BCG 牛乳培养基琼脂平板上, 用无菌玻璃涂布器依次涂布, 置 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 48 h, 如出现圆形稍扁平的黄色菌落及其周围培养基变黄者, 初步定为乳酸菌 (表 1)。

2. 划线分离

挑取单菌落平板划线, 置 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 48 h, 挑选出乳酸菌进行连续 6 次以上的传代, 以达到提纯。

3. 鉴别

1) 吲哚试验

试管标记: 取装有蛋白胨培养基的试管 $n+1$ 支, 分别标记 n 支乳酸菌和 1 支空白对照。

接种培养: 以无菌操作分别接种少量菌苔到标记乳酸菌的试管中, 标记有空白对照的不接种, 置 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中培养 24~48 h。

观察记录: 在培养基中加入乙醚 1~2 mL, 经充分振荡, 使吲哚萃取至乙醚中, 静置片刻后乙醚层浮于培养液的上面, 此时沿管壁缓慢加入 5~10 滴吲哚试剂。如有吲哚存在, 乙醚层呈玫瑰色, 此为吲哚试验阳性反应, 否则为阴性反应。

2) 糖发酵试验

试管标记: 取分别装有葡萄糖、蔗糖发酵培养液的试管各 $n+1$ 支, 每种糖发酵试管中分别标记 n 支乳酸菌和 1 支空白对照。

接种培养: 以无菌操作分别接种少量菌苔至以上各相应试管中, 每种糖发酵培养液的空白对照均不接种。将装有培养液的杜氏小管倒置于试管中, 置 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中培养 24 h, 观察结果。

观察记录: 与对照管比较, 若接种培养液保持原有颜色, 其结果为阴性; 如果培养液呈黄色, 结果为阳性。培养液中的杜氏小管内有气泡为阳性反应, 杜氏小管内没有气泡为阴性反应。

3) 乳酸的检测

选用已经分离的菌种做小型发酵实验,取发酵液的上清液约 10 mL 于试管中,加入 10%硫酸 1 mL,再加 2%高锰酸钾 1 mL,此时乳酸转化为乙醛,把事先在含氨的硝酸银溶液中浸泡的滤纸条搭在试管口上,微火加热试管至沸,观察滤纸变化。

五、实验结果

表 1

稀释度	10 ⁻⁴			10 ⁻⁵			10 ⁻⁶			CK 对照		
平板	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
菌落数/(个/皿)												
各浓度平均菌落数/(个/皿)												
平均菌落数(减去 CK 后) / (个/皿)												

六、注意事项

采用 BCG 牛乳培养基琼脂平板筛选乳酸菌时,注意挑取典型特征的黄色菌落,结合镜检观察,有利于高效分离筛选乳酸菌。

七、思考题

- (1) 乳酸菌有何菌种特性?
- (2) 发酵酸乳为什么能引起凝乳?
- (3) 请说明酸奶常用菌种“保加利亚乳杆菌”和“嗜热链球菌”的分类地位。

实验三 酵母菌的分离筛选

一、实验目的

- (1) 通过酒母中酵母的筛选实验,熟悉微生物分离纯化、微生物接种操作实验;
- (2) 熟悉产酒精酵母的 TTC 显色平板等性能筛选实验。

二、实验原理

1. 基本思想

酵母菌常见于糖分比较高的环境中,如菜园土、果园土及果皮等的表面。多数酵母菌喜欢偏酸条件,最适 pH 为 4.5~6.0。酵母菌生长迅速,且容易分离培养。在液体培养基中酵母菌比霉菌生长快,利用酸性条件可以抑制细菌的生长。因此常用酸性液体培养基获得酵母菌的加富培养,然后在固体培养基上划线分离纯化。

2. 基本路线

采样→稀释→接种→鉴定→纯化→保藏菌种。

三、实验仪器和材料

1. 实验材料

培养基：YDDS 培养基、YPD 培养基、MEB 培养基、TTC 显色培养基。

试剂：酵母膏、蛋白胨、葡萄糖、琼脂粉、脱氧胆酸钠、麦芽浸膏、TTC。

2. 实验仪器

灭菌锅、恒温培养箱、厌氧培养箱、移液管、涂布器、接种环、平板、三角瓶、试管（15 mm×150 mm）、硅胶塞、杜氏小导管、纱布、报纸。

四、实验内容

1. 培养基的配制

(1) YPDS 固体培养基 (1 L)：称取酵母膏 10 g、蛋白胨 20 g、葡萄糖 20 g 溶于 1 L 水中，分装到三角瓶中后加入 2% 琼脂粉，115 °C 灭菌 20 min（注：为抑制霉菌菌丝的生长，可在培养基中加入 0.5%~1% 的脱氧胆酸钠）。

(2) YPD 液体培养基 (1 L)：按 YPDS 配方配制，不加琼脂，121 °C 灭菌 20 min。

(3) NEB 培养基 (1L)：称取麦芽浸膏 30 g，溶于 1 L 蒸馏水中，121 °C 灭菌 20 min。

(4) TTC 显色培养基：每 100 mL YPDS 培养基中加入 0.05 g TTC。

2. 酵母的分离纯化

1) 梯度稀释

将酒样混匀后取 1 mL 加入 9 mL 无菌水（或生理盐水）中制成 10^{-1} 浓度梯度；之后从中取出 1 mL 再加入 9 mL 无菌水中，浓度梯度为 10^{-2} ；依次类推，分别制得 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 不同稀释度的菌液（图 1）。

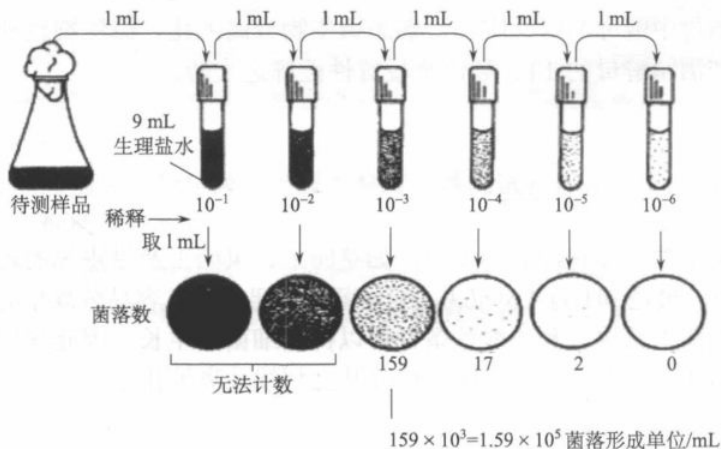


图 1 酒样梯度稀释

2) 涂布

将稀释得到的 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 三个梯度的菌液取 0.5 mL 到预先倒好的 TTC 显色培养基平板中, 沿一个方向均匀地进行涂布, 然后将涂布好的平板用报纸包好避光培养, 倒置于恒温厌氧培养箱中 $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 2~3 d。

3. 酵母的保藏

将划线纯化后的酵母菌株接种在 YPDS 斜面试管上, 用记号笔写上接种的菌名、日期和接种者, $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 1~2 d, 培养好后放置于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。

五、实验结果

- (1) 对实验过程中所得到的实验结果进行拍照。
- (2) 记录所筛选酵母菌株的颜色分级并进行编号。

六、思考题

- (1) 涂布之前稀释的目的是什么?
- (2) 如何获得纯化的微生物菌株?
- (3) 酵母菌 TTC 筛选的原理是什么?

第二节 发酵菌株的选育

实验四 紫外线诱变选育 α -淀粉酶高产菌株

一、实验目的

- (1) 学习菌种的物理因素诱变育种基本技术;
- (2) 通过诱变技术筛选出高产 α -淀粉酶高产菌株。

二、实验原理

紫外线是一种最常用且有效的物理诱变因素, 其诱变效应主要是由于它引起 DNA 结构的改变而形成突变型。紫外线诱变, 一般采用 15 W 或 30 W 紫外线灯, 照射距离为 20~30 cm, 照射时间依菌种而异, 一般为 1~3 min, 死亡率控制在 50%~80% 为宜。被照射处理的细胞必须呈均匀分散的单细胞悬浮液状态, 以利于均匀接触诱变剂, 并可减少不是纯种的出现。同时, 对于细菌细胞的生理状态则要求培养至对数期为最好。本实验以紫外线处理产淀粉酶的枯草杆菌, 通过透明圈法初筛, 选择淀粉酶活力高的生产菌株。

三、实验仪器和材料

1. 实验材料

- (1) 菌种: 产淀粉酶枯草芽孢杆菌。

(2) 培养基:

①选择培养基: 可溶性淀粉 2 g, 牛肉膏 1 g, NaCl 0.5 g, 琼脂 2 g, 蒸馏水 100 mL, pH 6.8~7.0, 121 °C 灭菌 20 min。

②肉汤培养基: 牛肉膏 0.5 g, 蛋白胨 1 g, NaCl 0.5 g, 蒸馏水 100 mL, pH 7.2~7.4, 121 °C 灭菌 20 min。

(3) 试剂: ①无菌水、75%酒精; ②0.5%碘液: 碘片 1 g、碘化钾 2 g、蒸馏水 200 mL, 先将碘化钾溶解在少量水中, 再将碘片溶解在碘化钾溶液中, 待碘片全部溶解后, 加足水即可。

2. 实验仪器

装有 15 W 或 30 W 紫外线灯的超净工作台、电磁力搅拌器(含转子)、低速离心机、培养皿、涂布器、10 mL 离心管、吸管(1 mL、5 mL、10 mL)、250 mL 三角瓶、恒温摇床、培养箱、直尺、棉签、橡皮手套、洗耳球。

四、实验内容

(1) 菌体培养: 取枯草芽孢杆菌一环接种于盛有 20 mL 肉汤培养基的 250 mL 三角瓶中, 于 37 °C 振荡培养 12 h, 即为对数期的菌种。

(2) 菌悬液的制备: 取 5 mL 发酵液于 10 mL 离心管中, 以 3000 r/min 离心 10 min, 弃去上清液。加入无菌水 9 mL, 振荡洗涤, 离心 10 min, 弃去上清液。加入无菌水 9 mL, 振荡均匀。

(3) 诱变处理: 将菌悬液倾于无菌培养皿中(内放一个磁力搅拌棒), 置于电磁力搅拌器上, 于超净工作台紫外线灯下(距离 30 cm)照射 0.5~1 min。

(4) 取 0.1~0.2 mL 诱变后菌悬液于选择培养基平板上, 用涂布器涂匀, 置 37 °C 暗箱培养 48 h(表 1)。

(5) 在长出菌落的周围滴加碘液, 观察并测定透明圈直径(C)和菌落直径(H), 挑选 C/H 值最大者接入斜面保藏(表 2)。

五、实验结果

表 1

诱变剂	处理时间/min	稀释倍数			存活率	致死率
		10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}		
紫外线(UV)	0(对照)					
	1					
	2					