



校企双元合作开发“互联网+教育”新形态一体化系列教材

# 食品微生物 微课版

主 编 陈飞雪 齐艳玲



汕頭大學出版社

# 模块一 绪论

## 知识目标

1. 掌握微生物的基本概念以及微生物的生物学特点及作用。
2. 了解微生物的生物学分类地位。
3. 熟悉食品微生物学的研究内容与任务。

## 技能目标

1. 学会宏观把握课程的章节内容与脉络。
2. 认识微生物是一类独具特色的生物群，它与人类的生活、生产活动关系十分密切。

## 任务一 了解微生物的概念、分类、命名和生物学特性

### 一、微生物的概念

微生物不是生物分类学中的名词，而是一类个体微小、结构简单，肉眼不可见或看不清楚，必须借助于显微镜才能看清其外形的微小生物统称。它既包括属于原核微生物的细菌、放线菌、蓝细菌、衣原体、支原体、立克次氏体，又包括属于真核微生物的酵母菌、霉菌、大型真菌、低等藻类和原生动物，还包括不具备细胞结构的病毒、亚病毒（类病毒、拟病毒、朊病毒）。虽然微小生物包括了众多的生物类群，形态和大小各异，但是，由于它们都是比较简单的、低等的生物，其生物学特性比较接近，所以人们赋予其一个共同的名称——微生物。

食品生产中经常遇到的微生物是细菌、放线菌、酵母菌、霉菌和噬菌体等，将在以后的章节中分别介绍。

### 二、微生物的分类及命名

18世纪中叶，人们把所有生物分成两界，即动物界和植物界。

随着研究不断深入，把自然界中形体微小、结构简单的低等生物笼统地归入动物界和植物界并不妥当。1866年海克尔（Haeckel）又提出了原生生物界，其中包括藻类、原生动物、真菌和细菌。

20世纪50年代，随着电子显微镜的应用和细胞超微结构研究的迅速发展，人们提出了原核与真核的概念。1957年科普兰（Copeland）提出四界分类系统，即原核生物界（细菌、蓝细菌等）、原生生物界（原生动物、真菌、黏菌和藻类等）、动物界和植物界。

1969年，惠特克（Whittaker）提出把真菌单独列为一界，即形成了生物五界分类系统：原核生物界、真核原生生物界、真菌界、动物界和植物界。

1977年，我国微生物学家王大耜提出把病毒列为一界，即病毒界。因此在五界分类系统的基础上形成了六界分类系统。

在生物六界分类系统中，微生物横跨四界，微生物各类群在生物分类学中的地位见表1-1。

表 1-1 微生物在生物六界系统中的地位

生物界名称	主要结构特征	微生物类群名称
病毒界	无细胞结构，大小为纳米（nm）级	病菌、类病菌等
原核生物界	为原核生物，细胞中无核膜与核仁的分化，大小为微米（ $\mu\text{m}$ ）级	细菌、蓝细菌、放线菌、支原体、衣原体、立克次氏体、螺旋体等
真核原生生物界	细胞中具核膜与核仁的分化，为小型真核生物	单细胞藻类、原动物等
真菌界	单细胞或多细胞，细胞中具核膜与核仁的分化，为小型真核生物	酵母菌、霉菌等
植物界	细胞中具核膜与核仁的分化，为大型非运动真核生物	
动物界	细胞中具核膜与核仁的分化，为大型能运动真核生物	

### 三、微生物的生物学特点

微生物除具有生物的共性外，也有其独特的特点，正因为具有这些特点，才使得这样微不可见的生物类群引起人们的高度重视。

微生物由于其形体极其微小，因而导致了一系列与之密切相关的重要特性。

#### （一）分布广泛，种类繁多

微生物因其体积小、重量轻和数量多，因此可以到处传播甚至达到“无孔不入”的地步。只要条件合适，它们就可“随遇而安”。微生物只怕明火，地球上除了火山的中心区域等少数地方外，从土壤圈、水圈、大气圈至岩石圈，到处都有它们的踪迹。在动植物体内外、土壤、河流、空气、平原、高山、深海、冰川、盐湖、沙漠中，都有大量与其相适应的微生物在活动。可以认为，微生物将永远是生物圈上下限的开拓者和各项生存纪录的保持者。

微生物的种类多，主要体现在以下五个方面：

##### 1. 物种的多样性

生物的种类极其繁多，我们所知道的动物约有 150 万种，植物约有 50 万种。据估计，微生物的种数在 50 万~600 万之间，其中已记载的仅约 20 万种（1995 年），包括原核生物 3500 种、病毒 4000 种、真菌 9 万种、原动物和藻类 10 万种。随着人类对微生物的不断开发、研究和利用，这些数字还在不断增长。

##### 2. 生理代谢类型的多样性

微生物的生理代谢类型之多，是动、植物所大大不及的。例如：①分解地球上贮量最

丰富的初级有机物——天然气、石油、纤维素、木质素的能力为微生物所垄断；②微生物有着最多样的产能方式，如细菌的光合作用、嗜盐菌的紫膜光合作用、自养细菌的化能合成作用以及各种厌氧产能途径等；③生物固氮作用；④合成次生代谢产物等各种复杂有机物的能力；⑤对复杂有机分子基团的生物转化能力；⑥分解氰、酚、多氯联苯等有毒和剧毒物质的能力；⑦抵抗极端环境（热、冷、酸、碱、渗、压、辐射等）的能力，等等。

### 3. 代谢产物的多样性

微生物究竟能产生多少种代谢产物，是一个不容易准确回答的问题。20世纪80年代末曾有人统计为7890种，后来（1992年）又有人报道仅微生物产生的次生代谢产物就有16500种，且每年还在以500种新化合物的数目增长着。

### 4. 遗传基因的多样性

从基因水平看微生物的多样性，内容更为丰富，这是近年来分子微生物学家正在积极探索的热点领域。在全球性的“人类基因组计划”的有力推动下，微生物基因测序工作正在迅速开展，并取得了巨大的成就。

### 5. 生态类型的多样性

微生物广泛分布于地球表层的生物圈（包括土壤圈、水圈、大气圈、岩石圈和冰雪圈）；对于那些极端微生物即嗜极菌而言，则更易生活在极热、极冷、极酸、极碱、极盐、极压和极旱等的极端环境中；此外，微生物与微生物或与其他生物间还存在着众多的相互依存关系，如互生、共生、寄生、抗生和猎食等，如此众多的生态系统就会产生各种相应生态型的微生物。

微生物的分布广、种类多这一特点，为人类进一步开发利用微生物资源提供了无限广阔的前景。

## （二）生长繁殖快，代谢能力强

微生物具有极高的生长和繁殖速度。一种至今被人们研究得最透彻的微生物——大肠埃希氏菌（简称大肠杆菌），在适宜的条件下，1h即繁殖三代，24h即可繁殖72代，由一个菌细胞可繁殖到 $47 \times 10^{22}$ 个，总重可达4700多吨。如果将这些新生菌体排列起来，可绕地球一周有余。48h繁殖后的重量约等于4000个地球之重。事实上，由于营养、空间和代谢产物等条件的限制，微生物的几何级数分裂速度充其量只能维持数小时而已，因而在液体培养中，细菌细胞的浓度一般仅达 $10^8 \sim 10^9$ 个/mL。但正是因为微生物的这一特性使其在发酵工业上具有重要的实践意义。例如，一头500kg重的食用公牛，每昼夜只能从食物中“浓缩”0.5kg的蛋白质，而用500kg重的酵母菌，以废糖液和氨水为养料，在1天内即可合成50000kg的蛋白质。

由于微生物个体微小，单位体积的表面积相对很大，有利于细胞内外的物质交换，细胞内的代谢反应快，代谢能力强。如此强的代谢能力，加速了微生物的生长繁殖，才使得微生物能够成为发酵产业的产业大军，才使得其在工、农、医等领域发挥巨大作用。

此外，微生物的种类繁多，代谢类型多种多样，在地球的物质转化中起到了重要作

用。如果没有微生物，动植物尸体以及生产生活中产生的垃圾将不能腐烂分解，早已是堆积如山，布满全球。但事物总是一分为二的，也正是由于上述特点，微生物也曾经或随时都有可能给人类带来疫病的灾难。

### （三）遗传稳定性差，容易发生变异

微生物个体微小，一般是单细胞、简单多细胞或非细胞的，它们通常是单倍体，加之它们具有繁殖速度快、数量多和与外界环境直接接触等原因，使得微生物很容易受到各种不良外界环境的影响。即使微生物变异频率十分低（一般为  $10^{-10} \sim 10^{-8}$ ），也可能在短时间内产生大量的变异后代。

一方面，微生物的遗传稳定性差，给菌种保藏工作带来一定不便。一般在能满足生产需要的情况下，尽量减少菌种的传代次数，并且经常检测菌种的纯度和活力，一旦出现菌种因突变而退化的现象，就必须对菌种进行复壮工作。另一方面，正因为微生物的遗传稳定性差，其遗传的保守性低，使得微生物菌种培育相对容易。工业上用的生产菌种大多是经过突变培育的，其生产性能比原始菌株提高几倍、几十倍甚至几百倍。例如，生产青霉素的产黄青霉菌，1943年每1mL青霉素发酵液只生产20单位的青霉素，经过多年来的育种工作，目前青霉素发酵水平已提高几百倍、几千倍。

## 任务二 食品微生物学的研究内容与任务

### 一、食品微生物学的研究内容

食品微生物学是微生物学的一个重要分支。食品微生物学是一门研究微生物与食品之间相互关系的科学，主要的研究内容包括食品生产、加工、贮藏、运输、销售等各个环节，涉及各种微生物（细菌、酵母菌、霉菌、病毒等）的形态特征（个体形态、菌落特征）、生物学特征（生理特征、遗传特征、生态学特征）、生产性能研究。在这些数以万计的微生物中，有的起着有益的作用，有的可能会给食品带来腐败或者危害人类健康。

### 二、食品微生物学的研究任务

我国幅员辽阔，微生物资源丰富，在不同的食品中或者在不同的条件环境下，微生物菌群的种类、数量、发挥的作用都是不同的。食品微生物学的研究任务：研究有益微生物在食品中的应用，从而开发营养丰富、有益健康的食品；同时，避免食品在生产、贮藏、流通中遭有害微生物的污染，防止食品腐败变质和食品中毒，确保食品安全。

#### （一）食品工业中的有害微生物

微生物是食品发生腐败变质的主要原因之一。引起食品腐败变质的微生物是人类的致

病菌，有的微生物还产生毒素，如黄曲霉毒素，它是一种毒性极强的剧毒物质，被世界卫生组织划定为Ⅰ类致癌物。研究这些有害微生物，可以减少或者避免有害微生物对食品的污染，保证食品安全，从而保证人类的健康。

## （二）食品工业中的有益微生物

近年来，在经济高速发展的同时，中国老百姓对于健康的重视提升到一个新的高度。益生菌产品成为了健康生活的一个重要元素，从完全依赖进口到中国企业自主研发，中国益生菌产业已然进入高速发展阶段。微生物在食品中的应用可以分为三种：①利用微生物所分泌的酶类：例如酱油、腐乳制作过程中，利用了霉菌分泌的蛋白酶类，将蛋白质原料分解成氨基酸；白酒、食醋制作过程中，利用霉菌分泌的淀粉酶类，将淀粉原料分解成糊精、葡萄糖。②利用微生物代谢产物：例如谷氨酸等氨基酸生产、柠檬酸等有机酸生产、维生素生产等。③利用微生物的菌体：很多微生物本身就是食物，比如食用菌，也就是生活中常见的蘑菇（比如发菜、木耳、银耳等）。此外，对于很多传统发酵食品，例如酸奶、泡菜等，都离不开发酵微生物。

传承与弘扬我国“食药同源”的传统饮食文化，是我国食品工业健康转型的一个特色方向。益生菌行业充分利用我国食药物质资源，结合现代益生菌发酵技术，将食药物质与菌种进行科学搭配及工艺创新，实现传统资源与现代技术的创新融合，有效成分得以高效释放，或经转化形成更多的生物活性物质，对我国传统食药物质的深度利用与功能提升具有积极的引领作用。

## 思政园地

几千年来，我国劳动人民在认识和利用微生物方面，有过许多重大发明创造；在中华民族的文明宝库中，它们像一颗颗璀璨的明珠，闪耀着中国古人智慧的光辉，我国古代在和工业、农业有关的微生物学方面取得了巨大成就。

据历史记载，我国酿酒历史有四五千年。殷墟出土的商代甲骨文中，有和现代汉字形体相似的“酒”字。在殷墟中发现的酿酒作坊遗址，证明早在三千多年前，我国的酿酒事业已经相当发达。

记叙殷商历史的书籍中，有“若作酒醴，尔惟曲蘖”（《尚书·说命下》）的字句，说明当时酿酒已经用了长微生物的谷物（曲）和发芽的谷物（蘖）。但是，在汉代以前，酿酒已经只用曲了。当时，由于制曲的时候利用了某些有利条件，曲中应该大量含有混杂生长着的霉菌和酵母，分别起着糖化和酒精发酵的作用。用这种曲酿酒，可以使酿酒的糖化和酒精发酵两个过程连续而又交叉地进行。这种方法现在叫复式发酵法。这是我国劳动人民在酿酒工业中的一大发明。我国出产的风味别致、驰誉世界的黄酒“善酿”和白酒“茅台”，都是复式发酵法不断发展中产生的名酒。古代西方用麦芽酿成啤酒。直到今天，西

方各国主要的谷物酒仍然是用麦芽糖化，再加入酵母进行酒精发酵制成的（例如威士忌酒、伏特加酒等）。19世纪末，欧洲人在研究了我国的酒曲后，才知道我国这种独特的方法，把它称作“淀粉发酵法”。

在制曲酿酒方面，特别应该提到红曲。这是我国劳动人民的一项重大发明。据历史记载，红曲的出现不会晚于公元10世纪。宋代诗人曾经有过“夜倾闾酒赤如丹”的诗句，可见用红曲酿成的酒在宋代已经相当普遍。红曲是我国特产，不仅可以酿酒，还是一种无害的食品染料，还可以作药用。

在制曲技术发展的漫长过程中，还分化出专用于酿醋、制酱和腌制食品的各类曲。随着制曲技术的发展，人们对微生物活动的认识越来越深入，我国古代已经有不少观察微生物活动的记录，有些方法和近代微生物学所采用的方法接近。例如，早在周代，王后穿的黄色礼服叫作曲衣，这说明当时的曲中黄曲霉已经占显著优势，使曲呈现美丽的黄色；晋代已经有曲中加入中草药的记载，《南方草木状》记载两广的制曲方法：“杵末粉杂以众草叶，治葛汁，潏搜之大如卵，置蓬蒿中，经月而成，用者合糯为酒。”由于中草药里含有某些有助于微生物生长的维生素等，曲中的微生物能长得更好，酿出的酒也具有特殊风味；东汉时代，有些酿酒方法中，用曲量已经由原来的百分之几十降低到百分之几，这表明曲的用途已经由糖化发酵剂变成使所需微生物繁殖的菌种了；北魏时代，曲的形式已经几乎全部是成块的“饼曲”了；到了宋代，已经知道制曲的时候把优良的老曲涂在培养前的生曲表面，这就是“传醅”的方法。这类似于今天的接种操作，曲的质量就更加容易保证。

通过千百年来选育，曲的质量不断提高，种类逐渐增多，用途日趋专一，我国的曲中有许多生产能力极强的菌种。

（来源：<https://guoxue.httpcn.com/info/html/200783/ILCQUYXVUY.shtm>）



## 习 题

### 简答题

1. 什么是微生物？它包括哪些类群？微生物在生物不同分类系统中的地位如何？
2. 举例阐述微生物的生物学特点以及与人类实践的关系。





# 模块二 原核微生物

## 知识目标

1. 了解细菌、放线菌等原核微生物的形态结构及其他主要特征。
2. 掌握菌落的概念和细菌菌落的特征。
3. 熟悉细菌的繁殖方式。

## 技能目标

1. 学会使用显微镜，并用显微镜观察细胞。
2. 掌握菌落形态的观察和描述及格兰染色的操作。

## 任务一 细菌的认知

微生物是一群繁殖快、分布广、结构简单、种类繁多的生物。微生物根据是否有细胞结构分为细胞型微生物和非细胞型微生物，两类，病毒就是最典型的非细胞型微生物。而根据是否有真正的细胞核，细胞型微生物又分为原核微生物和真核微生物，细菌、放线菌属于原核微生物，酵母菌、霉菌属于真核微生物。

原核微生物是单细胞微生物，细胞中没有真正的细胞核，没有核膜和核仁，只含一个由裸露 DNA 分子构成的原始核区。原核微生物主要包括细菌、放线菌、蓝细菌、支原体、立克次氏体和衣原体。

细菌是典型的原核微生物，在自然界中分布最广，种类最多，数量最大，与人类食品的关系最为密切，是食品微生物的主要研究对象之一。

### 一、细菌的基本形态

细菌的基本形态有球状、杆状与螺旋状，分别称为球菌、杆菌与螺旋菌（见图 2-1）。



图 2-1 球菌、杆菌与螺旋菌

#### （一）球菌

球菌大多呈现比较有规则的球形，有的略长呈矛头状、肾状或扁豆形。按其分裂方式和分裂后的排列形式，可将球菌分为单球菌、双球菌、链球菌、四联球菌、八叠球菌和葡萄球菌等（见图 2-2）。

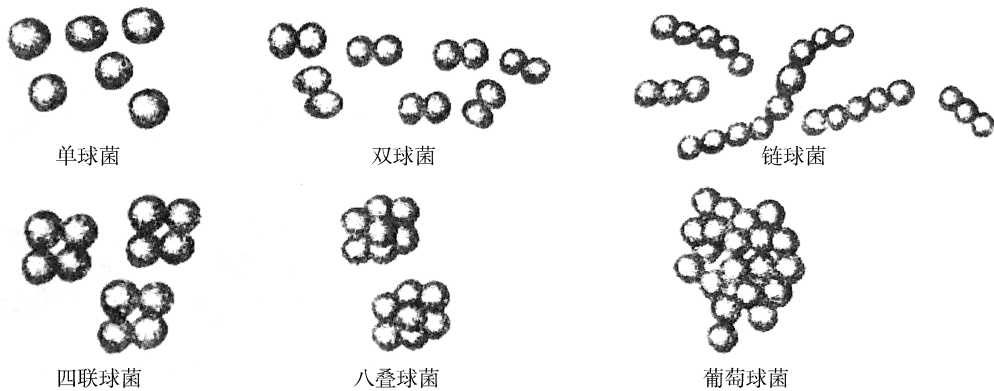


图 2-2 球菌

- (1) 单球菌 球菌在分裂后，分散而单独存在，如尿素微球菌。
- (2) 双球菌 在一个平面上分裂，分裂后成双成对存在，接触面扁平。菌体变成肾状、扁豆形，如肺炎链球菌呈矛头状，钝端相连，尖端相背。
- (3) 链球菌 在一个平面上连续分裂，分裂后连成三个及以上链状排列，如嗜热链球菌、乳酸乳球菌。
- (4) 四联球菌 球菌先后向两个互相垂直的平面上分裂，分裂后四个球菌粘附呈方形，如四联微球菌。
- (5) 八叠球菌 球菌在三个相互垂直的平面上分裂，分裂后八个球菌重叠排列粘附呈立方状，如尿素八叠球菌。
- (6) 葡萄球菌 在数个不规则的平面上分裂，分裂后若干球菌粘附聚集在一起，呈葡萄串状排列，如金黄色葡萄球菌。

## (二) 杆菌

杆状细菌统称为杆菌。不同杆菌的形态差别很大，同一种杆菌的形态相对稳定。在观察杆菌形状时，要注意菌体的长和宽的比例、菌体两端的形状以及排列情况。杆菌有以下分类：

- (1) 长杆菌 杆菌菌体很长， $4\sim 8/\mu\text{m}$ ，如乳酪杆菌。
- (2) 短杆菌 杆菌菌体较短， $2\sim 8/\mu\text{m}$ ，呈椭圆形，如醋酸杆菌。
- (3) 球杆菌 杆菌菌体短小， $1\sim 2/\mu\text{m}$ ，两端钝圆，近似球形。
- (4) 分枝杆菌 杆菌菌体具有分枝或侧枝。
- (5) 棒状杆菌 杆菌菌体一端膨大，如北京棒状杆菌。
- (6) 梭状杆菌 杆菌菌体如梭状，如肉毒梭状芽孢杆菌。
- (7) 杆菌是否能形成芽孢 能产生芽孢的称为芽孢杆菌，如枯草芽孢杆菌；不能产生芽孢的称为无芽孢杆菌，如大肠杆菌。
- (8) 杆菌分裂后的排列方式 分裂后菌体单独存在的，称为单杆菌；分裂后两菌端相连成对排列在一起的，称为双杆菌；分裂后菌体相连成链状的，称为链杆菌。

### （三）螺旋菌

细胞呈螺旋状，但不同的菌体，在长度、弯曲度、螺旋度、螺旋形式和螺距等方面有显著差别，一般有鞭毛，可细分为三种形态（见图 2-3）。

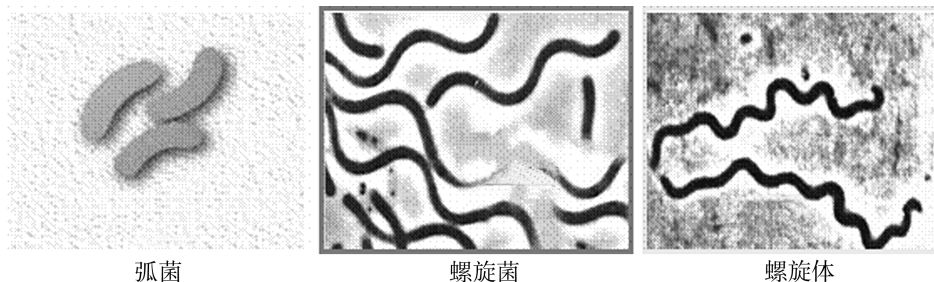


图 2-3 螺旋菌

- (1) 弧菌 菌体只有一个弯曲，螺旋不满一圈，呈 C 字形或逗号形，如霍乱弧菌。
- (2) 螺旋菌 菌体螺旋数在一圈至几圈的小型螺旋状菌体，如干酪螺菌。
- (3) 螺旋体 菌体呈现较多弯曲，螺旋数多达六圈以上的较大螺旋状细菌，如梅毒密螺旋体。

细菌的基本形态除上述球菌、杆菌、螺旋菌三种外，还有少数其他形态的细菌，如三角形、方形、星形等。

细菌的形态明显受培养温度、时间、培养基的组成与浓度等环境条件的影响。一般幼龄较正常、整齐。在不正常条件下，细胞常出现不正常形态，如梨形、分枝、丝状等异常形态，条件适宜可恢复原状。

## 二、细菌的大小

细菌的个体一般都十分微小，往往要借助光学显微镜，用测微尺测量出来，通常以微米 ( $\mu\text{m}$ ) 作为度量单位。

细菌的大小随种类不同而有差异。一般球菌以直径来表示；杆菌与螺旋菌以“长度×宽度”来表示，其中，螺旋菌的长度是指自然条件下其菌体两端间的空间直线距离，而非其真正长度。几种常见细菌的个体大小见表 2-1、表 2-2、表 2-3。

表 2-1 球菌的个体大小

球菌	直径 ( $\mu\text{m}$ )
尿素微球菌	1.0~1.5
金黄色葡萄球菌	0.8~1.0
乳链球菌	0.5~0.6
亮白微球菌	0.5~0.7

表 2-2 杆菌的个体大小

杆菌	长度 (μm) × 宽度 (μm)
大肠埃希菌	(0.4~0.7) × (1.0~3.0)
枯草杆菌	(1.2~3.0) × (0.8~1.2)
枯草芽孢杆菌	(0.8~1.2) × (1.5~4.0)
肉毒梭状芽孢杆菌	(4.0~6.0) × (0.8~1.2)

表 2-3 螺旋菌的个体大小

螺旋菌	长度 (μm) × 宽度 (μm)
霍乱弧菌	(1.0~3.0) × (0.3~0.6)
红色螺菌	(1.0~3.2) × (0.6~0.8)
迂回螺菌	(1.5~2.0) × (10~20)

影响形态变化的因素也会影响细菌的大小。除少数例外，一般幼龄菌比成熟或老龄的细菌大得多。例如枯草杆菌，培养 4h 比培养 24h 的细胞长 5~7 倍，但宽度变化不明显。细菌大小随菌龄的变化可能与代谢废物积累有关。另外，培养基中渗透压增加也会导致细胞变小。

### 三、细菌的结构

细菌细胞的结构可分为一般结构和特殊结构（见图 2-4）。一般结构是指一般细菌细胞共同具有的结构，包括细胞壁、细胞质膜、细胞质、核质体等；特殊结构是指仅某些细菌细胞才具有的或仅在特殊条件下才能形成的结构，包括糖被（荚膜和黏液层）、鞭毛、芽孢和菌毛等。

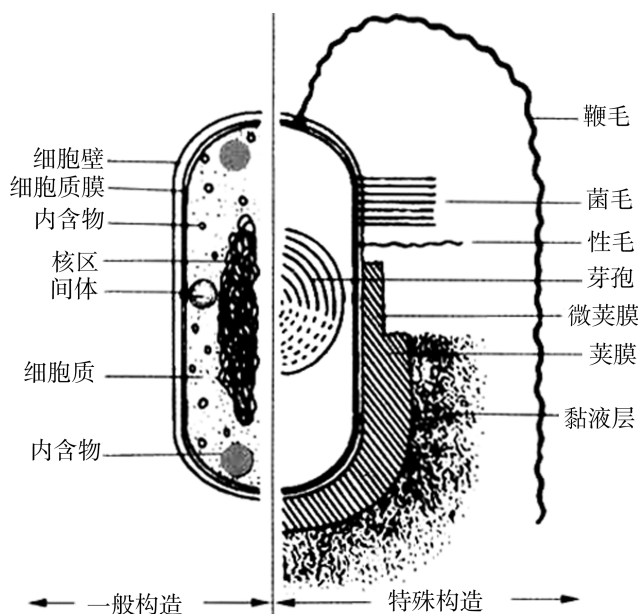


图 2-4 细菌细胞的结构

## （一）一般结构

细菌的一般结构是指任何一种细菌都具有的细胞结构，主要包括细胞壁、细胞膜、细胞质和核质体等。

### 1. 细胞壁

细胞壁包在细胞膜外表面，是一层无色透明、质地坚韧而富有弹性的构造。它的厚度为 $10\sim 80\mu\text{m}$ ，占细胞干重的 $10\%\sim 25\%$ 。通过特殊染色方法或质壁分离法，可在光学显微镜下看到细胞壁的存在，或用电子显微镜，则清晰可见。

细胞壁的主要功能：①维持菌体固有形状。各种形态的细菌失去细胞壁后，均变成球形。用溶菌酶除去细菌细胞壁后，剩余的部分称为原生质体或原生质球。原生质体的结构与生物活性并未因失去细胞壁而发生改变，因而细胞壁并不是细菌细胞的必要结构。②提供足够的强度，具有保护作用，使细胞免受机械性外力或渗透压的破坏。细菌在一定范围的高渗溶液中，原生质收缩，但细胞仍可保持原来的形状；在低渗溶液中，细胞膨大，但不致破裂，这些都与细胞壁具有一定韧性及弹性有关。③起渗透屏障作用，与细胞膜共同完成细胞内外物质变换。细胞壁有许多微孔（ $1\sim 10\text{nm}$ ），可允许可溶性小分子及一些化学物质通过，但对大分子物质有阻拦作用。④协助鞭毛的运动。如果将细胞壁去掉，鞭毛仍存在，但不能运动，可见细胞壁为鞭毛运动提供支点。

细胞壁的化学组成与细菌的抗原性、致病性，以及对噬菌体的特异敏感性有密切关系。细胞壁是菌体表面抗原的所在地。革兰氏阴性菌细胞壁上有脂多糖，具有内毒素的作用，与致病性有关。细胞壁的化学组成与细菌横隔壁的形成有关。细胞分裂时，其中央部位的细胞壁不断向内凹陷，形成横隔，即将原细菌细胞分裂为两个子细胞。此外，细胞壁还与革兰氏染色反应密切相关。

细胞壁的化学组成相当复杂。由于细胞壁的化学成分不同，用革兰氏染色法将所有细菌分为革兰氏阳性菌与革兰氏阴性菌两大类。两大类细菌细胞壁的化学组成与结构有很大差异（见图 2-5）。

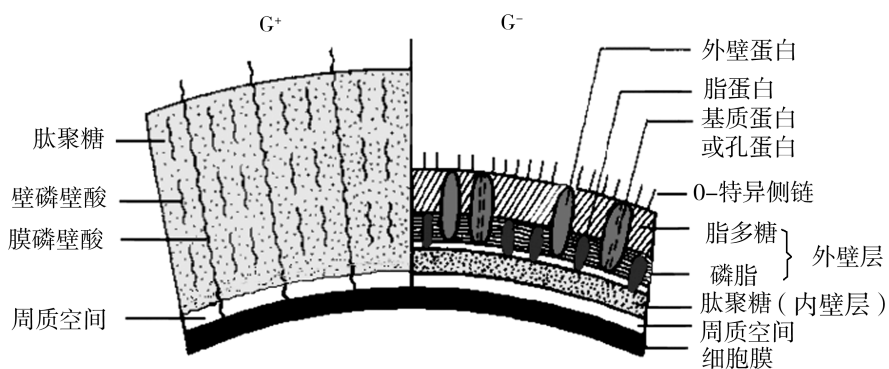
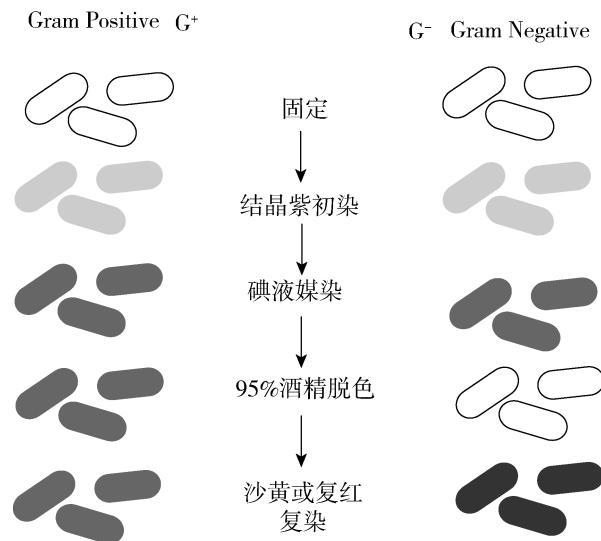


图 2-5 革兰氏阳性菌与革兰氏阴性菌细胞壁构造的比较

革兰氏染色法是丹麦人 Gram 于 1884 年发明的，其步骤示意图如图 2-6 所示。



据革兰氏染色反应不同，可以把细菌分为两大类：

- 革兰氏阳性菌 G<sup>+</sup>
- 革兰氏阴性菌 G<sup>-</sup>

图 2-6 革兰染色步骤示意图

格兰氏染色法的原理：革兰氏阳性菌由于细胞壁较厚，肽聚糖含量较高和其分子交联度较紧密，故在用乙醇洗脱时，肽聚糖网孔会因脱水而明显收缩，再加上它基本上不含类脂，故乙醇处理不能在壁上溶出缝隙。因此，结晶紫与碘复合物被阻留在细胞壁内，使其呈现出紫色。革兰氏阴性菌因为细胞壁薄、肽聚糖含量低和交联松散，遇乙醇处理时，肽聚糖网孔不易收缩，且它的类脂含量高，所以乙醇处理时脂质溶解，在细胞壁上就会形成较大的缝隙，这样结晶紫与碘的复合物就极易被溶出细胞壁。因此，通过乙醇脱色后，细胞又呈无色，再用沙黄等红色染料进行复染，就使革兰氏阴性细菌呈现红色，而革兰氏阳性细菌仍保留为紫色。

## 2. 细胞膜

细胞膜是紧贴细胞壁内侧柔软而富有弹性的半透性薄膜，又叫作细胞质膜或原生质膜，厚 7~8nm。通过质壁分离利用光学显微镜可以看到细胞膜，利用电子显微镜也可证明细胞膜的存在。

细胞膜的主要成分是磷脂（约 40%）、蛋白质（约 60%）及多糖（约 2%）。其中磷脂构成双分子层，形成膜的基本构造；而蛋白质分子有些位于磷脂层表面，有些穿透磷脂层，镶嵌在其中（见图 2-7）。



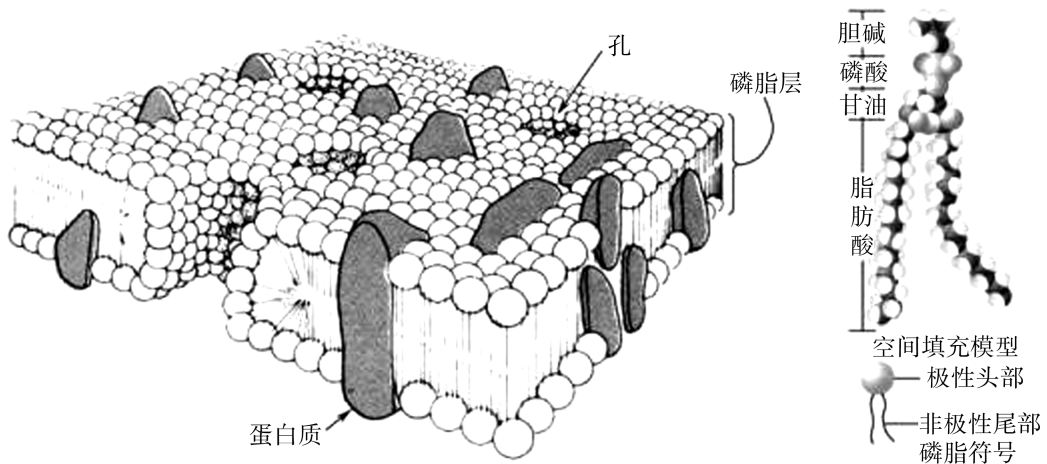


图 2-7 细胞膜结构图

细胞膜的功能：选择性地控制细胞内、外的营养物质和代谢产物的运输、交换；维持细胞内正常渗透压的屏障；合成细胞壁各种组分（LPS、肽聚糖、磷壁酸）和荚膜等大分子的场所；进行氧化磷酸化或光合磷酸化的产能基地；许多酶（ $\beta$ -半乳糖苷酶、有关细胞壁和荚膜的合成酶、ATP 酶）和电子传递链组分的所在部位；是鞭毛的着生点和提供其运动所需的能量等。

### 3. 细胞质和内含物

细胞质又称细胞浆，是细胞膜内除核质体之外的一切无色、透明、黏稠的胶状物质和一些颗粒状物质的总称。原核生物的细胞质不流动，这是与真核细胞的明显区别。

细胞质的化学成分：化学成分随菌种、菌龄、培养基的成分不同而异。基本成分是水（约占 80%）、蛋白质、核酸、脂类和少量的糖类、无机盐等。

细胞质的功能：细胞质构成细菌的内部环境，含有丰富的可溶性物质和各种内含物，在细菌的物质代谢及生命活动中起重要作用。细胞质中还含有多种酶系统，是细菌合成蛋白质、脂肪酸、核糖核酸的场所，同时也是营养物质进行同化和异化代谢的场所，以维持细菌生长所需要的环境。

细菌细胞质内没有真核细胞所具有的细胞器，细胞质中形状较大的颗粒状结构被称为内含物。内含物主要包括核糖体、异染颗粒、肝糖粒、淀粉粒、脂肪粒、液泡等，有较强的嗜碱性，易被碱性和中性染料着色。

### 4. 核质体

核质体又称核质、核区、原核、拟核或核基因组，是指原核生物所特有的无核膜结构、无固定形态的原始细胞核。

核质体的化学成分：其化学成分是一个大型的环状双链 DNA 分子，一般不含组蛋白或只有少量组蛋白与之结合。

核质体的生理功能：核质体是蕴藏（负载）遗传信息的主要物质基础；通过复制将遗传信息传递给子代；在细胞分裂时，核质体直接分裂成两个而分别进入两个子细胞中；通

过转录和翻译调控细胞新陈代谢、生长繁殖、遗传变异等全部生命活动。

## (二) 特殊结构

不是所有细菌都具有的细胞构造称为特殊结构，包括荚膜、鞭毛、芽孢和菌毛等。

### 1. 荚膜

在某些细菌细胞壁外存在着一层厚度不定的胶状物质，称为荚膜，又称糖被。荚膜有无和厚度与菌种的遗传性有关，还与其环境（特别是营养）条件密切相关。根据其厚度的不同，荚膜分为微荚膜、荚膜、黏液层和菌胶团。菌胶团是指细菌群体的共同荚膜。

荚膜的功能：起保护作用，使细菌能抗干燥、抗噬菌体吸附、抗白细胞吞噬；是菌体外的储存物质，营养缺乏时可作为碳源和能源利用；可使菌体附着于某些物体表面；作为透性屏障，使细菌免受重金属离子毒害。

### 2. 鞭毛

鞭毛是由某些运动细菌菌体长出的细长、波浪形弯曲的丝状物。鞭毛着生在细胞膜上，非常纤细，长  $15\sim 20\mu\text{m}$ ，直径为  $0.01\sim 0.02\mu\text{m}$ 。

鞭毛的主要化学组成是蛋白质，还有少量的多糖、脂类和核酸。

鞭毛的生理功能是运动，鞭毛的运动引起菌体的运动，以实现其趋性。鞭毛是菌体的运动器官。

鞭毛不能直接在光学显微镜下看到，只有通过特殊的鞭毛染色（如以鞣酸做媒染剂，用碱性品红做染料，使其附着在鞭毛上，从而加大鞭毛直径）才能看到。

细菌有无鞭毛、鞭毛数量及其着生方式由细菌的遗传特性决定，这些特性也是细菌分类、鉴定的重要依据。所有的弧菌和螺旋菌、多数的杆菌、球菌中的动球菌属、微球菌属中的尿素微球菌都有鞭毛。根据鞭毛在菌体表面的着生位置和数目，可将其着生方式分为三个主要类型（见图 2-8）。

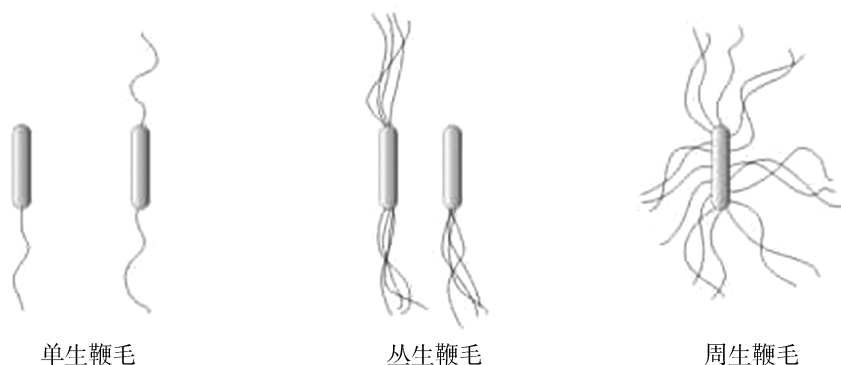


图 2-8 鞭毛的着生方式

单生鞭毛：在菌体一端着生一根鞭毛，如霍乱弧菌等（见图 2-9）；两端各着生一根鞭毛，如鼠咬热螺旋体做快而旋转式直线运动。

丛生鞭毛：在细菌的一端着生一丛鞭毛，如荧光假单胞菌（见图 2-10）、铜绿假单胞

菌等；两端各着生一丛鞭毛，如红色螺旋菌等，常做摇摆运动。

周生鞭毛：在菌体周身生有多根鞭毛，常见的有普通变形杆菌（见图 2-11）、大肠杆菌、伤寒沙门氏菌、产碱杆菌、枯草芽孢杆菌、丙酮丁醇梭菌等，常做慢而翻转式运动。



图 2-9 霍乱弧菌鞭毛



图 2-10 荧光假单胞菌鞭毛



图 2-11 普通变形杆菌鞭毛

### 3. 芽孢

某些细菌在其生长发育后期，细胞质脱水浓缩，在细胞内形成一个圆形或椭圆形，对不良环境条件具有较强抗性的休眠体，称为芽孢。

带有芽孢的菌体称为孢子囊，未形成芽孢的菌体称为营养体或繁殖体。由于一个营养细胞仅能形成一个芽孢，而一个芽孢萌发后仅能生成一个新营养细胞，故芽孢不具有繁殖功能。

芽孢的类型：芽孢的形状、大小和在菌体内的位置因菌种不同而异，是细菌分类鉴定的依据之一。根据芽孢在菌体内的位置不同，可分为以下三种类型（见图 2-12）：一是中央芽孢，芽孢位于细胞中央，或近于中央，它又分为两种：芽孢直径小于菌体宽度，如枯草芽孢杆菌（见图 2-13）；芽孢直径大于菌体宽度，呈梭状，如丙酮丁醇梭菌（见图 2-14）。二是近端芽孢，芽孢靠近细胞末端，如肉毒梭菌（见图 2-15）。三是顶端芽孢，芽孢位于细胞末端，它又分为两种：芽孢直径小于菌体宽度，如己酸乙酯菌（见图 2-16）；芽孢直径大于菌体宽度，呈鼓锤状，如破伤风梭菌（见图 2-17）。



图 2-12 细菌芽孢的各种类型

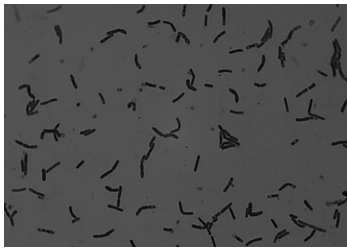


图 2-13 枯草芽孢杆菌

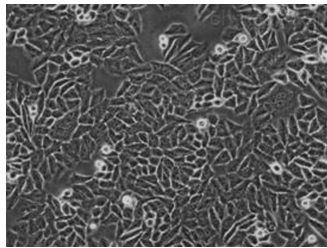


图 2-14 丙酮丁醇梭菌



图 2-15 肉毒梭菌

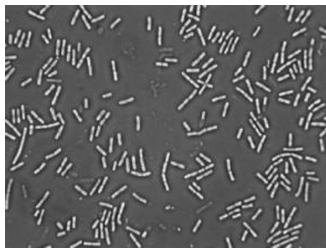


图 2-16 己酸乙酯菌

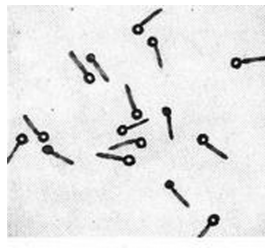


图 2-17 破伤风梭菌

芽孢的抗性：芽孢具有极强的抗热、抗干燥、抗辐射、抗化学药物和抗静水压等对抗不良环境的能力。例如嗜热解糖梭菌的营养细胞在 55℃ 以上短时间即死亡，而其芽孢在 132℃ 温度下处理 4.4min 才被杀死 90%。芽孢抗辐射能力也比营养细胞强一倍。芽孢休眠能力惊人，在普通条件下可保持活力数年至数十年之久。芽孢如此强的耐热性和对抗不良环境的能力与其结构有关。芽孢的结构十分复杂，最外层是孢外壁，是一种类似角蛋白的蛋白质，致密、无通透性，可防止有害物质侵入；贴在壁内的是芽孢衣；芽孢衣的里面是皮层，含有在芽孢形成过程中产生的高度抗性物质——2, 6-吡啶二羧酸；皮层内是核心，又依次包含了芽孢壁、芽孢膜、芽孢质和芽孢核区四部分并含耐热性酶（见图 2-18）。

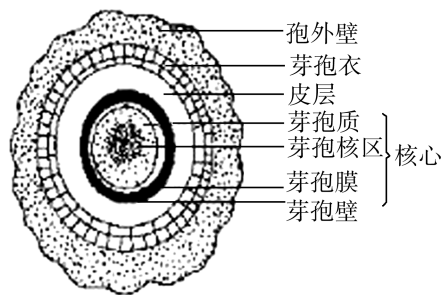


图 2-18 细菌芽孢结构模式图

研究芽孢的意义：芽孢的有无、形状和着生位置等是细菌分类、鉴定的一项重要的形态学指标；芽孢是最好的菌种保存形式，有利于对这类菌种的筛选和长期贮藏；由于芽孢具有很强的耐热性，针对食品、医药或物品的灭菌以能否杀灭一些代表菌的芽孢作为主要指标。例如，在罐头食品生产中，对鲜肉中的肉毒梭菌灭菌不彻底，会引起该菌在肉类罐头中繁殖并产生肉毒毒素。已知其芽孢在 pH=7.0 时要在 100℃ 的水中煮 8h 后才能致死，

因此要求肉类罐头必须在 121℃ 维持 20min 以上或在 115℃ 维持 30~40min 灭菌。在发酵工业或实验室中，常以能否杀死耐热性最强的嗜热脂肪芽孢杆菌的芽孢为灭菌标准。此菌的芽孢在 121℃ 维持 12min 才能杀灭。由此规定湿热灭菌要在 121℃ 维持 15~30min 才能保证培养基或物品的彻底灭菌。

#### 四、细菌的繁殖

细菌既可进行无性繁殖，又可进行有性繁殖，其中以无性繁殖为主。无性繁殖中又以裂殖为主要方式。

细菌的裂殖中，一个母细胞分裂成两个子细胞，故又称为二分裂法。

在电子显微镜下观察，细菌的裂殖经过了核质分裂、横隔壁形成和子细胞分离三个连续过程（见图 2-19）。

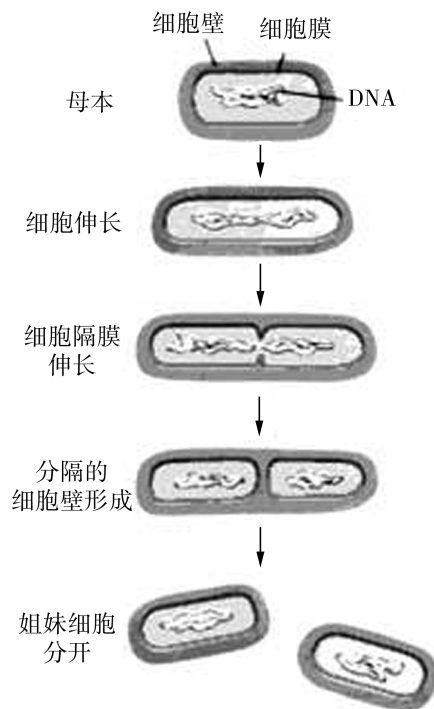


图 2-19 细菌的裂殖

##### （一）核质分裂

细菌生长到一定阶段，进行 DNA 复制，形成两个原核，随后原核彼此分开；同时细胞膜、细胞壁在相应位置向细胞质凹陷，使细胞质随原核分开，完成核质分裂。

##### （二）形成横隔壁

随着细胞膜向内凹陷，细胞壁也向内生长，将横隔膜分为两层，每层分别成为子细胞

的细胞膜；随后横隔壁也形成两层，成为两个子细胞的细胞壁。

### （三）子细胞分离

横隔壁形成后，子细胞相互分离成两个独立的菌体，呈单个游离状态存在。有些细菌在横隔壁形成后暂时不发生分离，成为双球菌、双杆菌、链状菌等。一些球菌因分裂面的变化（双向、三向和多向分裂），成为四联球菌、八叠球菌、葡萄球菌等。

## 五、细菌的培养特征

细菌形体微小，肉眼看不见，但在营养基质中，细菌局限在一处大量繁殖，聚集形成群体的团块则是肉眼可见的。这种细胞团块的形态也有一定的稳定性和专一性，我们称之为群体形态，又称培养性状。认识群体形态，除鉴定的需要外，对检查菌种纯度、辨认菌种等都是很重要的。

菌落是由单个细菌（或其他微生物）细胞或一堆同种细胞在适宜固体培养基表面或内部生长繁殖到一定程度，形成肉眼可见的子细胞群落。在适宜培养条件下，24h 内每个菌落的细菌数目可达几十亿个（见图 2-20）。

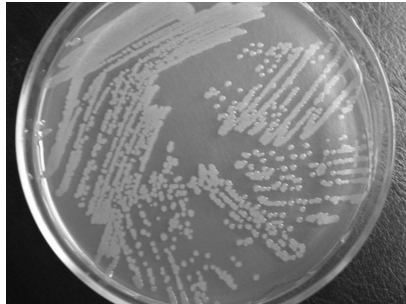


图 2-20 细菌菌落

菌落具有一定特征（见图 2-21），如菌落大小、形状（圆形、假根状、不规则状等）、边缘情况（整齐、波形、裂叶状、锯齿形等）、隆起情况（扩展、台状、低凸、凸面、乳头状等）、光泽（闪光、金属光泽、无光泽等）、表面状态（光滑、皱褶、颗粒状、龟裂状、同心环状等）、质地（油脂状、膜状、黏稠、脆硬等）、颜色（正反面或边缘与中央部位的颜色）、透明程度（透明、半透明、不透明）等。菌落特征对细菌的分类、鉴定有重要意义。

### (一) 细菌的固体培养特征

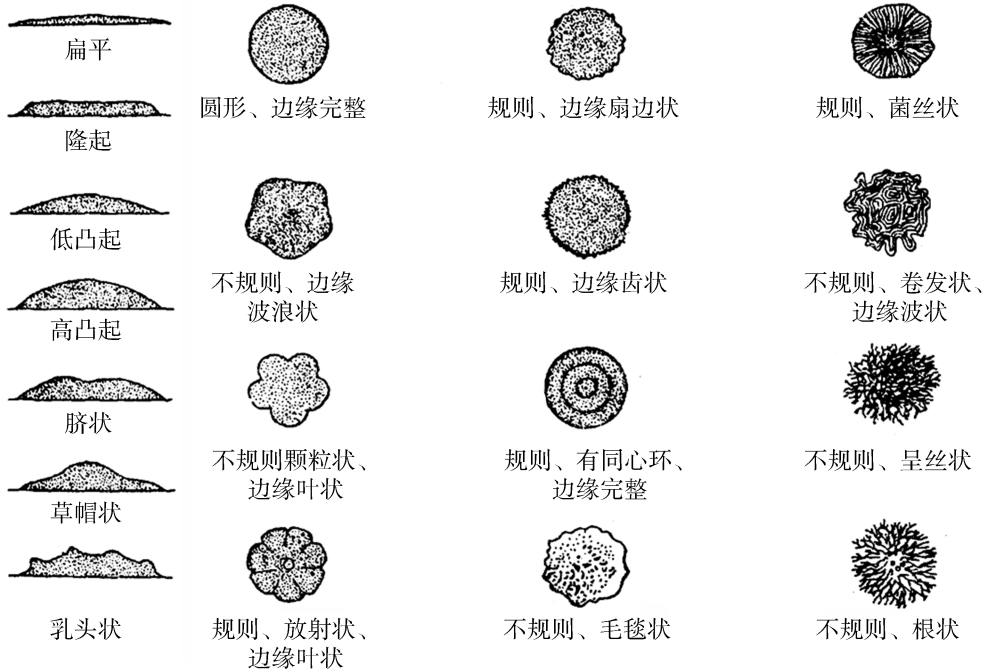


图 2-21 细菌的菌落特征

### (二) 细菌的斜面培养特征

采用直线划线法将菌种接种于试管斜面上，于适宜条件培养 3~5 天，可观察到斜面菌苔的生长程度、形状、光泽、质地、透明度、颜色、隆起和表面状况等培养特征（见图 2-22）。

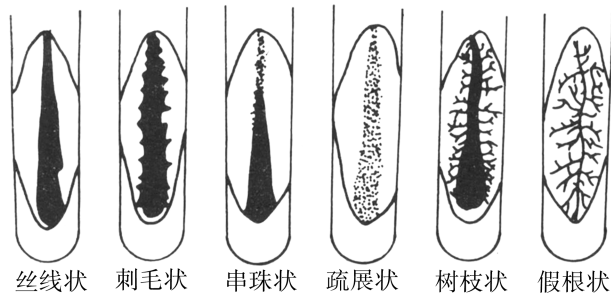


图 2-22 细菌斜面生长形态

### (三) 细菌的液体培养特征

采用液体接种方法将菌种接种于试管液体培养基中，于适宜条件培养 1~3 天，可观察到液体培养特征，包括表面状况（如菌膜、菌醭、菌环等）、混浊程度、沉淀情况、有

无气泡、色泽等。细菌在液体培养基中生长时，会因其细胞特征、相对密度、运动能力和对氧气等关系的不同，形成不同的培养特征：多数表现为混浊，部分表现为沉淀，一些好氧性细菌则在液面上大量生长，形成菌膜、菌醭或菌环等。

## 六、食品中常见的细菌

### （一）乳酸杆菌

大多数可发酵乳糖都不利用乳酸。乳酸杆菌为微好氧菌，较难培养，液体深层培养比固体培养生长好，固体培养的菌落生长小而慢。乳酸杆菌的主要用于生产乳酸、乳制品、药用乳酸菌制剂，也用于其他乳酸发酵食品，如乳酸发酵蔬菜和肉制品等。

### （二）双歧杆菌

双歧杆菌主要用于生产微生态制剂以及含活性双歧杆菌的乳制品。

### （三）链球菌

链球菌生长需要丰富的培养基，其发酵代谢主要产乳酸，但不产气，通常溶血，常寄生于脊椎动物的口腔和上呼吸道。有些链球菌是食品工业中的重要发酵菌株，如乳链球菌、嗜热链球菌等，主要用于乳制品工业及传统食品工业中。有的能引起食品腐败变质，如粪链球菌、液化链球菌等。

### （四）醋酸杆菌

醋酸杆菌可将乙醇氧化成醋酸，也可氧化醋酸盐和乳酸盐成为  $\text{CO}_2$  和  $\text{H}_2\text{O}$ 。醋酸杆菌的主要用途为生产各种食用醋、多种有机酸、山梨糖等。醋酸杆菌分布很普遍，一般从腐败的水果、蔬菜及变酸的酒类、果汁等食品中都能分离出醋酸杆菌。醋酸杆菌在日常生活中常常危害水果与蔬菜，使酒、果汁变酸。

### （五）大肠杆菌

大肠杆菌存在于人类及牲畜的肠道中，是肠道的正常寄居菌，在肠道中一般不致病，但侵入某些器官时，可引起炎症，是条件致病菌。大肠杆菌的用途主要是作为多种氨基酸和酶的产生菌，作为基因工程受体菌以及作为食品卫生的检验指标。

### （六）葡萄球菌

葡萄球菌葡萄串状，普遍存在于人类和动物的鼻腔、皮肤及机体的其他部位，有的是人和动物的致病菌，或产生外毒素，从而引起食物中毒或腐败变质。其代表菌为金黄色葡萄球菌，主要在鼻黏膜、人及动物的体表上发现，可引起感染。葡萄球菌可污染食品产生肠毒素，使人食物中毒。



## （七）沙门菌

沙门菌为无芽孢杆菌，不产荚膜，通常可运动，具有周生鞭毛，也有无动力的变种。该菌属常常污染鱼、肉、禽、蛋、乳等食品，特别是肉类。是人类重要的肠道致病菌。误食由此菌污染的食品，可引起肠道传染病或食物中毒。

## （八）假单胞杆菌

假单胞杆菌可在食品表面迅速生长，一般产生水溶性色素、氧化产物和黏液，引起食品产生异味及变质，很多在低温下能良好地生长，所以是冷藏食品腐败变质的主要原因。如荧光假单胞菌在低温下可使肉、牛乳及乳制品腐败，腐败假单胞菌可使鱼、牛奶及乳制品腐败变质，可使牛奶的表面出现污点。假单胞杆菌的主要用途是生产维生素 C、抗生素和多种酶等。

# 任务二 放线菌的认知

放线菌是一类主要呈菌丝状生长和以孢子繁殖的原核微生物，几乎都是革兰氏阳性。

放线菌广泛分布于含水量较低、有机物质丰富、呈微碱性的土壤中。泥土所特有的泥腥味，主要是由放线菌产生的土腥味素导致的。土壤中放线菌的孢子数可达  $10^7$  个。

放线菌与人的关系密切，绝大多数是有益菌，对人类健康贡献最突出。人类至今报道的近万种抗生素中，大约 70% 是由放线菌产生的；临床常用的抗生素除青霉素和头孢霉素类外，多数都是放线菌的产物。已知链霉菌属有 1000 多种。据统计链霉菌属产生的抗生素占放线菌目的 90% 以上，许多著名而常用的抗生素均由链霉菌产生，如灰色链霉菌产生链霉素，龟裂链霉菌产生土霉素，红霉素链霉菌产生红霉素等。

近年来，人类关注放线菌产生的次级代谢产物，如酶的抑制剂、抗癌剂、免疫抑制剂、农用杀虫（杀菌）剂以及抗寄生虫剂等。放线菌还能产生许多酶和维生素，在甾体转化、石油脱蜡和污水治理中也有重要作用。少数放线菌能引起人和动物、植物致病。

## 一、放线菌的形态

### （一）放线菌的个体形态

放线菌是单细胞原核微生物，菌体由丝状的菌丝组成，菌丝纤细（直径  $0.5 \sim 1.0 \mu\text{m}$ ），有分枝，无横隔膜。

放线菌的菌丝根据形态、功能不同，可分为营养菌丝、气生菌丝和孢子丝三部分（见图 2-23）。

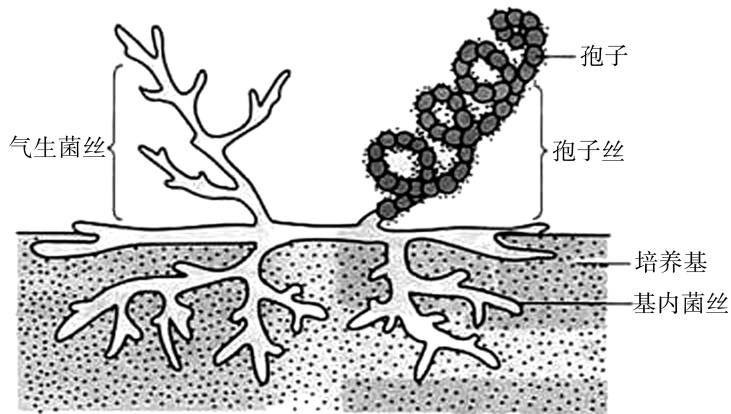


图 2-23 放线菌的形态

### 1. 营养菌丝

营养菌丝又称基内菌丝，是伸入到培养基内，吸收营养物质的菌丝。一般颜色较淡，有的无色，有的产生黄、橙、红、紫、蓝、绿、褐、黑等水溶性或脂溶性色素。

### 2. 气生菌丝

当营养菌丝发育到一定阶段，长出培养基外伸向空间的菌丝就是气生菌丝。一般颜色较深，比基内菌丝粗 1~2 倍，直生状或弯曲状而有分枝，有的产生色素。

### 3. 孢子丝

当气生菌丝发育到一定阶段，其上能分化出可以形成孢子的菌丝即孢子丝。孢子丝的形状（见图 2-24）及在气生菌丝上排列的方式往往因种不同而有差异，这是鉴定放线菌菌种的重要依据之一。孢子的形态多样，有球形、椭圆形、柱形、瓜子形、梭形和半月形等。孢子颜色有白、灰、黄、橙、红、蓝、绿等。

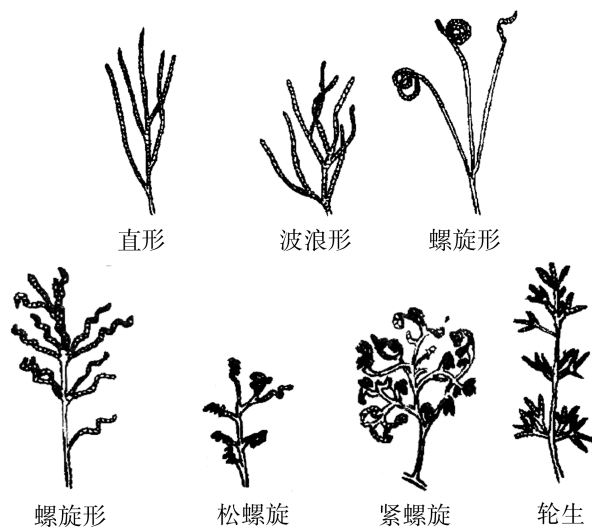


图 2-24 放线菌孢子丝的各种形态

## （二）放线菌的群体特征

### 1. 放线菌的固体培养特征

多数放线菌有基内菌丝和气生菌丝的分化，气生菌丝成熟时又会进一步分化成孢子丝并产生成串的干粉状孢子，于是就使放线菌产生与细菌有明显差别的菌落：干燥、不透明、表面呈致密的丝绒状，上有一薄层彩色的干粉；菌落和培养基的连接紧密，难以挑取；菌落的正反面颜色常不一致，并常有辐射状皱褶等。少数原始的放线菌如诺卡菌属等缺乏气生菌丝或气生菌丝不发达，因此其菌落外形与细菌极其相似，结构松散并易于挑取。

### 2. 放线菌的液体培养特征

放线菌在液体培养基内进行摇瓶培养时，其菌丝翻滚交织形成珠状菌丝团（或菌丝球），小型菌丝球悬浮于液体培养基中，大型菌丝球则沉于瓶底。此外，与液面交界的瓶壁处常生长着一圈菌苔。

## 二、放线菌的结构

放线菌的形态与霉菌相似，而细胞结构则与细菌一样，属于原核细胞，具有细胞壁、细胞膜、细胞质及内含物、核质体等。

放线菌的化学组成也同细菌细胞相似，细胞壁中含有胞壁酸和二氨基庚二酸，没有几丁质或纤维素。

## 三、放线菌的繁殖

放线菌的繁殖主要是通过各种无性的孢子进行繁殖的，少数的是以基内菌丝分裂形成孢子状细胞进行繁殖的。放线菌在液体培养基中培养时很少形成孢子，各种菌丝片段都有繁殖功能，这一特性对于实验室进行摇瓶培养和工厂的大型发酵罐中进行液体深层搅拌培养来说，就显得十分重要。放线菌产生的无性孢子主要有横隔孢子（又称节孢子或粉孢子）、孢囊孢子、凝聚孢子（又称分生孢子）三种（见图 2-25）。

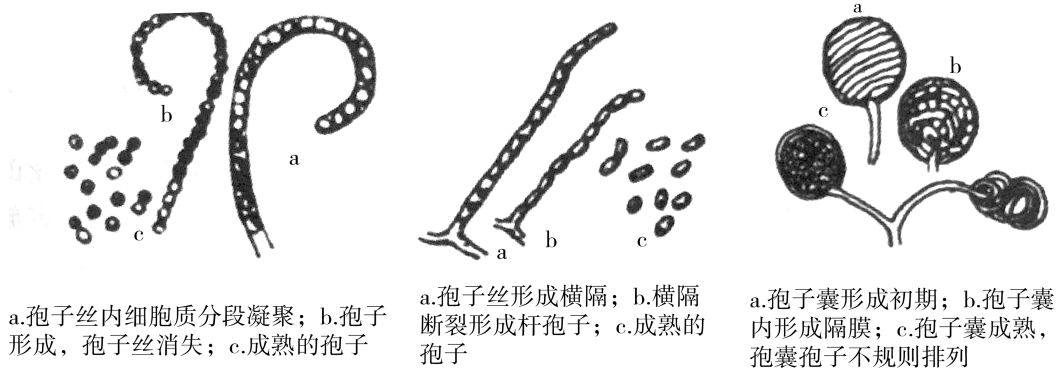


图 2-25 放线菌各种无性孢子形成的过程

### (一) 横隔孢子

当孢子丝生长到一定阶段时，其中产生许多横隔膜，然后沿横隔膜断裂，形成孢子，如诺卡氏菌产生横隔孢子。

### (二) 孢囊孢子

孢子丝盘卷或孢子囊柄顶端膨大形成孢子囊，其间产生横隔形成孢子，如游动放线菌产生孢囊孢子。

### (三) 凝聚孢子

大部分放线菌产生凝聚孢子。当孢子丝生长到一定阶段时，从顶端向基部，孢子丝中的细胞质分段围绕拟核物质逐渐凝聚成一串大小相似的小段，然后每小段收缩，并外生新的孢子壁而形成圆形或椭圆形孢子。孢子丝壁最后自溶或裂开，释放出成熟的孢子，如大多数链霉菌产生凝聚孢子。

## 四、常见的放线菌

### (一) 链霉菌属

链霉菌的气生菌丝和基内菌丝有各种不同的颜色，有的菌丝还产生可溶性色素分泌到培养基中，使培养基呈现各种颜色。链霉菌的许多种产生对人类有益的抗生素，如链霉素、红霉素、四环素等都是链霉菌中的一些种产生的。

### (二) 诺卡菌属

诺卡菌只有基内菌丝，没有气生菌丝或只有很薄一层气生菌丝，靠菌丝断裂进行繁殖，该属产生多种抗生素，如对结核分枝杆菌和麻风分枝杆菌有特效的利福霉素。

### （三）小单胞菌属

小单胞菌的菌丝体纤细，只形成基内菌丝，不形成气生菌丝，在基内菌丝上长出许多小分枝，顶端着生一个孢子，也是产生抗生素较多的一个属，如庆大霉素就是由该属的绛红小单胞菌和棘孢小单胞菌产生的。

### （四）放线菌属

放线菌的菌丝直径小于  $1\mu\text{m}$ ，有横隔，可断裂成 V 形或 Y 形，不形成气生菌丝，也不产生孢子，通常为厌氧或兼性厌氧。放线菌属多为致病菌，可引起人畜疾病。如衣氏放线菌寄生于人体，可引起后颞骨肿瘤和肺部感染；牛型放线菌可引起牛颞肿病。

### （五）链轮丝菌属

气生菌丝对称轮生，孢子链很短，二级轮生，孢子光滑。该属在生物制药工业上主要用于生产各种抗肿瘤、抗霉菌、抗结核等抗生素，如博莱霉素、结核放线菌素、柱晶白霉素等。

### （六）链孢囊菌属

基内菌丝分支很多，横隔很少，气生菌丝成丛、散生或同心环排列，主要特征是能形成孢子囊和孢囊孢子，有时还可形成螺旋孢子丝。很多种可产生广谱抗生素，主要有多霉素、孢绿菌素、西伯利亚霉素等。

## 任务三 其他原核微生物的认知

### 一、古细菌

古细菌简称古菌，多数生活于地球上的极端环境或生命出现初期的自然环境中，存在于超高温（ $100^{\circ}\text{C}$  以上）、高酸度（ $\text{pH}$  值  $<1.0$ ）、高碱度（ $\text{pH}$  值  $>11.5$ ）、无氧或高盐的热液或地热环境中。有些菌种也作为共生体存在于动物消化道内。

古细菌根据其生理特性和生活习性不同，常分成三大类：产甲烷菌、嗜热嗜酸菌、极端嗜盐菌。其中，产甲烷菌是严格的厌氧菌，生活在与氧气隔绝的水底、沼泽、水稻田、厌氧处理装置及动物的消化道特别是反刍动物的瘤胃中，处理有机废物时能产生清洁的生物能源——甲烷。

### 二、蓝细菌

蓝细菌旧称蓝藻、蓝绿藻。自从发现这类微生物的细胞核与细菌一样是原核，而不像

其他藻类的细胞核是真核之后，就将之归属于原核生物界，并改称蓝细菌。

蓝细菌在自然界分布广泛，无论在淡水、海水、潮湿土壤、树皮和岩石表面，还是沙漠甚至温泉（70~73℃）等极端环境中都能生长。有些蓝细菌还能与真菌、苔藓、蕨类、种子植物、珊瑚和一些无脊椎动物共生。

蓝细菌是一类含叶绿素 A，能进行光合作用的原核微生物，属光能自养型微生物。

蓝细菌与人类的关系十分密切。其中，有的富含营养，可供食用，如利用螺旋藻可制成螺旋藻饼干、螺旋藻酸奶、螺旋藻挂面、螺旋藻胶囊等主副食品和营养保健品；有的能固氮，可增加水体和土壤的氮素营养；有的在营养丰富的湖泊、水库中大量繁殖，污染水体；还有的能产生毒素，通过食物链危害人体健康。

### 三、支原体

支原体又名类菌质体，是介于细菌与病毒之间的一类无细胞壁的可以独立生活的最小细胞生物。最早是从患胸膜肺炎的牛体中分离得到的，后来发现许多动物中都可分离，统称类胸膜肺炎微生物，现称支原体。

支原体广泛分布于土壤、污水、温泉等温热环境，以及昆虫、脊椎动物和人体中。一般为腐生或无害共生菌，少数为致病菌。支原体可寄生在人或脊椎动物黏膜表面，并引发肺炎、关节炎等疾病。

### 四、衣原体

衣原体是一类能通过细菌过滤器，在活的真核细胞内营专性能量寄生的小型革兰氏染色阴性原核微生物。

衣原体具有独特的生活史：具有感染力的个体——原体，是一个小的球状细胞，有坚韧的细胞壁。在宿主细胞内原体逐渐伸长，形成无感染力的薄壁球状大细胞，称为始体。始体通过二等分裂可在宿主细胞质内形成一个微菌落即包涵体，随后大量的子细胞又分化成较小而厚壁的原体。一旦宿主细胞破裂，原体又可感染新的寄主细胞。

衣原体一般不需要媒介而能直接感染人或动物。例如，鹦鹉热衣原体能引起鸟的鹦鹉热；砂眼衣原体是人类砂眼的病原菌；肺炎衣原体能引起各种呼吸综合征。

### 五、立克次氏体

立克次氏体是一类专性寄生于真核细胞内的革兰氏阴性原核微生物。

立克次氏体通常寄生在虱、蚤、蜱、螨等节肢动物的消化道上皮细胞内，但对这些宿主致病。

立克次氏体的寄生过程包括两个阶段，它先寄生于啮齿动物或节肢动物中，然后再通过这些媒介动物的叮咬或排泄物感染人和其他动物，可引起疾病。如普氏立克次氏体借虱

传播斑疹伤寒，恙虫热立克次氏体借螨传播恙虫热。因此，防治人体立克次氏体病的主要措施是消灭虱、蚤等传染媒介。

立克次氏体对热、干燥、光照和化学药剂的抗性较差，在室温中仅能存活数小时至数日，温度达到 100℃时就很快死亡；但耐低温，在 -60℃时可存活数年。立克次氏体随节肢动物粪便排出，在空气中自然干燥后，其抗性显著增强。

## 思政园地

牟希亚（1927~2014），山东省栖霞市人，中国著名微生物学家，菌毛学创始人。从 1952 年起，师从著名医学微生物学家魏曦院士和人类学奠基人吴汝康院士、药理学家张毅教授、循环生理学家吴襄教授等。在魏曦院士的带领下，牟希亚等 5 人参与了抗美援朝美军细菌战罪行调查工作，多次奔赴中朝边境进行细菌分离及鉴定。通过对大量临床病例的观察，他发现抗生素的长期使用会引起人体正常菌群的失调，并可能使细菌产生耐药性。于是，他产生了制备“菌苗”治疗感染的想法，并为此展开长期的实验研究。

1959 年，牟希亚通过实验研究首次提出“细菌依靠菌毛粘附在人体易感细胞表面进而占领感染点，从而进一步引发疾病”的假想推理，并通过微生物菌毛作用机制的研究，分离及深度纯化肺炎克雷伯菌、变形杆菌、大肠杆菌、铜绿假单胞菌等 30 多株细菌，深入探索其遗传生物学特征、微细结构、毒力、致敏性、综合致病力和免疫调节活性等。但随后，大连医学院南迁至贵州遵义，科研条件一度极为落后，研究工作也因此受阻。

牟希亚携家带口来到遵义，却因水土不服身体极为虚弱。简陋的条件和病痛的折磨下也没有中断研究工作。“没有无菌室，他便凌晨起床，尽量选择相对干净的环境；没有酒精灯，他就用煤油灯消毒；没有保温箱，他使用自己的体温培育菌种……”即使在这样艰苦的条件下，牟希亚也营造了最为简易的“无菌操作箱”，并成功培育出了第一批减毒后的菌株。

1984 年，牟希亚用生物工程技术成功培育出绿脓杆菌甘露糖敏感血凝菌毛株，并制成具有双向免疫调节作用的治疗用生物药品——绿脓杆菌制剂，它可调整人体免疫及细胞免疫的不平衡状态，增加巨噬细胞和 HK 细胞（识别人体外来细胞的细胞，是提高人体免疫力的关键）的活性，支持人体建立完善的防御体系；该菌株 1985 年经学界著名专家界定，一致认为国内外首创，1986 年获得原卫生部科技成果乙等奖，1996 年列为国家火炬计划，于 2007 年取得国家发明专利。

2014 年，牟希亚因病去世。在他生命的最后几年，依然在争分夺秒地做细菌方面的研究。牟希亚出生、成长于祖国风雨之时，新中国成立后，在艰苦的科研、生活条件下，牟希亚潜心研究，不为纷乱复杂的外界所干扰，不断实现新的科研突破，追随着共和国发展的脚步，追寻心中那份崇高的梦想和从不曾改变的情怀。

（来源：新华网北京 8 月 20 日电题：牟希亚：他用一生研究细菌）



## 习题

## 简答题

1. 细菌的基本形态有哪几种？其中球菌的空间排列方式有几种？
2. 绘出细菌细胞的结构模式图，注明其基本结构和特殊结构并简述各部分的生理功能。
3. 列表比较  $G^+$  细菌与  $G^-$  细菌细胞壁在结构和成分组成上的区别。
4. 简述革兰氏染色技术的原理。
5. 什么是糖被？其化学组成如何？有何生理功能？与人类实践有何关系？
6. 芽孢的概念、结构是什么？有何理论与实践意义？
7. 简述细菌的繁殖过程。
8. 什么是菌落？讨论细菌的细胞形态与菌落形态之间的关系。
9. 什么是放线菌的基内菌丝、气生菌丝和孢子丝？
10. 蓝细菌、支原体、衣原体和立克次氏体的形态结构、化学组成和生理功能有哪些特点？





# 模块三 真核微生物

## 知识目标

1. 了解酵母菌和霉菌的形态结构。
2. 掌握酵母菌和霉菌的培养特征。
3. 熟悉酵母菌和霉菌的繁殖方式。

## 技能目标

1. 学会酵母菌和霉菌的形态观察。
2. 掌握酵母菌和霉菌水浸片制片的操作。

## 任务一 酵母菌的认知

酵母菌是一个通俗名称，不是分类学上的名称，是指能发酵糖类、以出芽繁殖为主的真核微生物。由于不同的酵母菌在进化和分类地位上的异源性，很难对酵母菌下一个确切的定义，通常认为酵母菌是一群单细胞真核微生物，有五种特征：①以单细胞形式存在；②多数为出芽生殖；③能发酵糖类产能；④细胞壁常含甘露聚糖；⑤常生活在含糖量较高、偏酸性的环境中。

### 一、酵母菌在自然界中的分布

酵母菌在自然界中分布很广，主要分布在偏酸性、含糖量较高的环境中，在水果的表面分布很多，如葡萄、樱桃等；在果树的土壤中也常见；此外，在蔬菜、花蜜和植物的叶片上也较多。有的酵母菌可以利用烃类物质，所以在油田和炼油厂附近的土层中也有酵母菌。有的酵母菌与动物（特别是昆虫）共生，如球拟酵母菌属存在于昆虫肠道、脂肪体及其他内脏中。

### 二、酵母菌与人类的关系

酵母菌与人类的关系极为密切，多数是有益微生物，少数种类有害。

酵母菌是人类最早利用的微生物之一，酵母菌及其发酵产品极大地改善和丰富了人类生活。例如乙醇和酒精饮料的生产，馒头和面包的制造，甘露醇和甘油的发酵，维生素和有机酸的生产，石油和油品的脱蜡，均离不开酵母菌。此外，还可从酵母菌菌体中提取核酸、麦角固醇、辅酶 A、细胞色素 C、凝血质和维生素 B<sub>2</sub> 等生化药物。酵母菌菌体中，蛋白质含量很高，且含有丰富的必需氨基酸，常用于生产饲用、药用或食用单细胞蛋白。

酵母菌也给人类带来危害。腐生型酵母菌能使食品、纺织品及其他原料腐败变质。少数嗜高渗酵母，如鲁氏酵母、蜂蜜酵母存在于昆虫肠道、脂肪体及其他内脏中。也有少数种（约 25 种）为寄生菌，引起人或其他动物的疾病。例如，白假丝酵母（旧称白色念珠菌）可引起人的皮肤、黏膜、呼吸道、消化道及泌尿系统等多种疾病，如鹅口疮、阴道炎等；新型隐球酵母可引起慢性脑膜炎和轻度肺炎等。

### 三、酵母菌的形态与大小

#### （一）酵母菌的细胞形态

酵母菌是真核生物中最低等的生物细胞，大多数为单细胞。

酵母菌的细胞形态通常为球形、卵圆形或椭圆形，少数为圆柱形或香肠形、柠檬形、尖顶形、三角形、长颈瓶形等（见图 3-1）。在一定培养条件下，有的酵母菌（如白假丝酵母），在进行一连串的出芽繁殖后，如果子细胞与母细胞不立即分离，其间以极狭小的面积相连，这种藕节状的细胞串称假菌丝（见图 3-2）。此种假菌丝与霉菌的真菌丝不同。霉菌的真菌丝是细胞相连的横隔面积与细胞直径一致的竹节状。

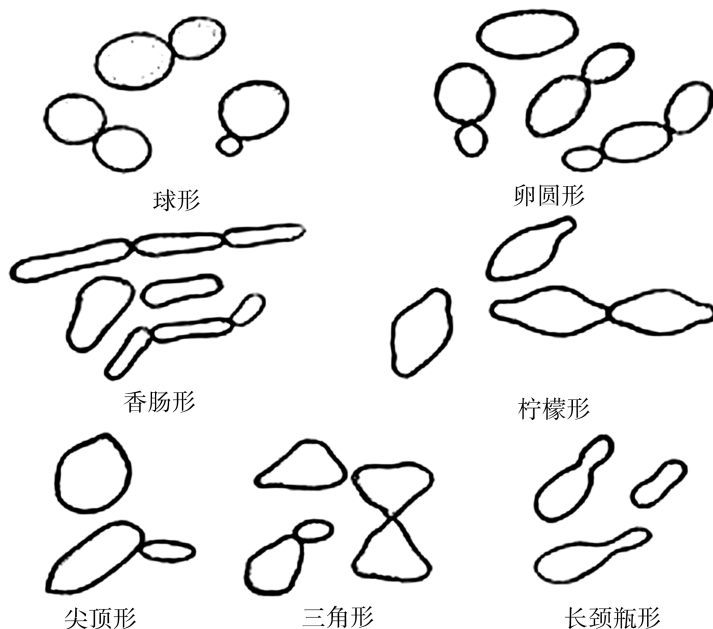


图 3-1 酵母菌的各种形状



图 3-2 白假丝酵母细胞形态

## （二）酵母菌的细胞大小

酵母菌的细胞大小一般为  $(1\sim5)\mu\text{m} \times (5\sim30)\mu\text{m}$ ，约为细菌细胞大小的 10 倍，但有些种的酵母菌可达  $20\sim50\mu\text{m}$  甚至  $100\mu\text{m}$ 。其宽度变化较小，通常为  $1\sim5\mu\text{m}$ 。例如，典型的啤酒酵母（又称酿酒酵母）细胞大小为  $(2.5\sim10.0)\mu\text{m} \times (4.5\sim21)\mu\text{m}$ ，长的

可达  $30\mu\text{m}$ 。在光学显微镜下清晰可见酵母菌的形态。各种酵母菌有一定的形态和大小，但也随菌龄、环境条件（如培养基成分）的变化而有差异。一般成熟的细胞大于幼龄细胞，液体培养的细胞大于固体培养的细胞。有些种的细胞大小、形态极不均匀，而有的种则较均匀。

#### 四、酵母菌的细胞结构和功能

酵母菌是典型的真核微生物，细胞结构与其他真核微生物相似，有细胞壁、细胞膜、细胞核、细胞质及其内含物。细胞质内含有线粒体、核糖体、内质网、微体、中心体、高尔基体、纺锤体、液泡及贮藏物质等。此外，有些种还有出芽痕（诞生痕），有些种还具有荚膜、菌毛等特殊结构。正在芽殖的啤酒酵母的细胞结构如图 3-3 所示。

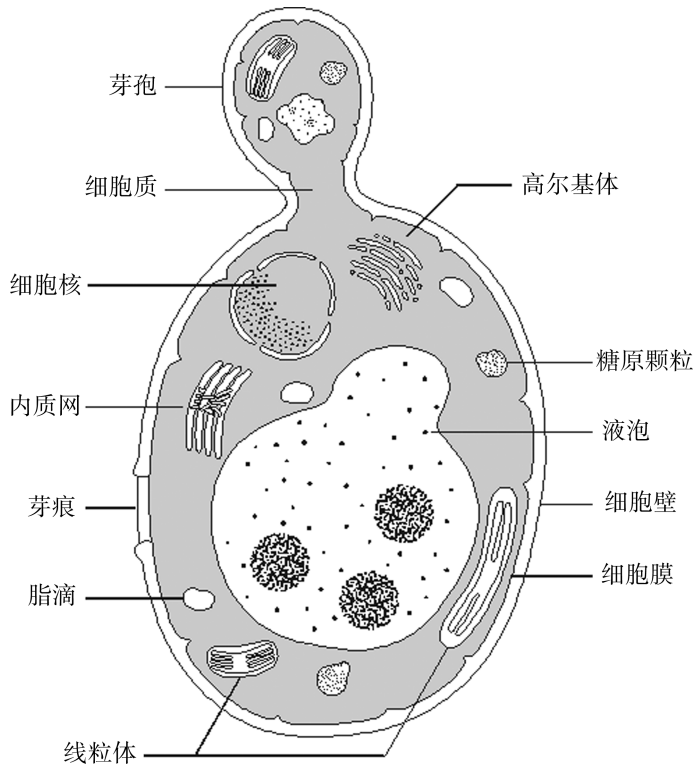


图 3-3 正在芽殖的啤酒酵母的细胞结构

##### （一）细胞壁

细胞壁位于细胞的最外侧，包围细胞膜，保持细胞的形态，是一种坚韧的结构。

有些出芽繁殖的酵母菌，芽体脱落后，在母细胞的壁上留下痕迹，叫芽痕。每产生一个芽，就在母细胞的壁上产生一个芽痕，通过计算芽痕的数目，可确定某一细胞已产生过的芽体数，测定细胞菌龄。

细胞壁厚  $25\sim 70\text{nm}$ ，约占细胞干质量的 25%。细胞壁的主要成分是葡聚糖和甘露聚

糖，均为分枝状聚合物，共占细胞壁干质量的 75% 以上，还含有 8%~10% 的蛋白质和 8.5%~13.5% 的脂类。根据酵母菌的种的不同，其细胞壁还含有其他一些特殊成分。如啤酒酵母菌约含 1% 的几丁质，有些假丝酵母菌含有超过 2% 的几丁质，裂殖酵母属一般不含甘露聚糖而含较多的几丁质。

酵母菌的细胞壁由外向内为甘露聚糖—蛋白质—葡聚糖三层，中间层的蛋白质包括多种酶类，如甘露聚糖酶、葡聚糖酶、蔗糖酶、碱性磷酸酶和酯酶等。

细胞壁除了维持菌体的固有形态外，在细胞壁上还存在着许多种酶及雌、雄两性的识别物质，因而它们在对物质的通透性及细胞间的识别反应等方面有重要作用。此外，菌体抗原活性也存在于细胞壁上，从而成为血清学分类法的基础。

## (二) 细胞膜

细胞膜紧贴于细胞壁内侧，厚约 7.5nm，结构与细菌的细胞膜相似，也是三层结构（见图 3-4），由上、下两层磷脂分子以及镶嵌在其间的固醇和蛋白质分子构成。

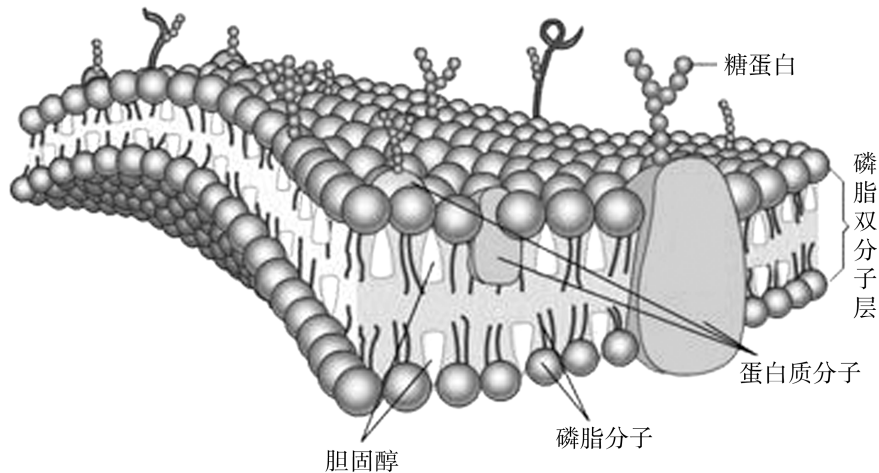


图 3-4 酵母菌细胞膜结构

酵母菌细胞膜的功能不如原核细胞膜那样具有多样性，细胞膜的功能主要是控制细胞内外物质的交换，调节渗透压，参与细胞壁和部分酶的合成。酵母菌细胞膜上的麦角甾醇，它是维生素 D 的前体，经紫外线照射后可以转化为维生素 D<sub>2</sub>，所以酵母菌可以作为维生素 D 的来源。

## (三) 细胞核

酵母菌具有核膜包被的细胞核，细胞核呈球形，直径约 2 $\mu$ m，多在细胞中央与液泡相邻，有核膜、核仁和染色体，核膜上有核孔，与细菌的拟核有本质的区别。核膜是一种双层膜，在细胞的整个生殖周期中保持完整状态，外层与内质网紧密相接。核膜上有许多直径为 40~70nm 的核孔，这是细胞核与细胞质交换大分子物质的通道。核仁是核糖体 RNA 合成的场所。

细胞核是储存遗传信息并进行复制和转录的主要场所，并控制生长、繁殖及遗传和变异。真核微生物 DNA 的含量比原核微生物高 10 倍左右。

#### （四）细胞质及内含物

细胞质是细胞质膜包围的除核区外的一切半透明、胶状、颗粒状物质的总称。

细胞质是细胞进行新陈代谢的场所，也是代谢物贮存和运输的环境。幼小细胞的细胞质稠密而均匀，老龄的细胞则出现较大的液泡和各种贮藏物质。细胞质的内含物主要包括核糖体、线粒体、内质网、中心体、高尔基体、纺锤体、微体、液泡及贮藏物质（肝糖粒、脂肪粒、异染颗粒）等。

##### 1. 核糖体

核糖体又称核蛋白，是一种无膜包裹的颗粒状细胞器，是合成蛋白质的场所。

##### 2. 线粒体

线粒体通常呈杆状或球状，一般位于核膜及中心体表面。细胞内线粒体数量变化较大，从数十个至数百个不等，长  $1.5\sim 30\mu\text{m}$ ，直径为  $0.5\sim 1.0\mu\text{m}$ 。线粒体具有双层膜，外膜光滑且与质膜相似，内膜较厚，常向内延伸成不同数量和形状的嵴，嵴的外形是板片状或管状。内膜上有细胞色素、NADH 脱氢酶、琥珀酸脱氢酶和 ATP 磷酸化酶，以及三羧酸循环的酶类、蛋白质合成酶和脂肪酸氧化的酶类；外膜上也有多种酶类，如脂肪酸代谢的酶等。一般来说，生长旺盛需要能量多的细胞内，线粒体的数目也越多，所以线粒体的功能是细胞呼吸产生能量的场所。

##### 3. 内质网

内质网是由膜围成的竹状或囊状结构组成的一个复杂的双层膜系统。内质网外与细胞膜相连，内与核膜相通。内质网起物质传递和通讯联络作用，还有合成脂类和脂蛋白的功能，供给细胞质中所有细胞器的膜。

##### 4. 液泡

酵母细胞中有一个或几个大小不一的液泡。幼龄细胞的液泡很小，老龄细胞液泡较大，位于细胞中央，外具一层液泡膜。液泡内含有盐类、糖类、脂类、氨基酸，有的种类含蛋白酶、酪酶、核糖核酸酶。液泡是离子和代谢产物交换、贮藏的场所，并调节细胞渗透压。

## 五、酵母菌的培养特征

### （一）酵母菌的固体培养特征

酵母菌在固体培养基上形成类似细菌的菌落，一般菌落表面湿润、透明、光滑、容易挑起、菌落质地均匀，正反面、边缘与中央部位的颜色一致。酵母菌细胞比细菌细胞大，细胞内颗粒较明显，细胞间隙含水量相对较少，不能运动，故反映在宏观上就产生了较

大、较厚、外观较稠以及较不透明的菌落。酵母菌菌落的颜色比较单一，一般为乳白色、土黄色、红色。无假菌丝的酵母菌，菌落都隆起，边缘圆整；有假菌丝的酵母菌，菌落扁平，表面及边缘粗糙。菌落的颜色、光泽、质地、表面和边缘等特征都是酵母菌菌种鉴定的依据。酵母菌的菌落一般有酒香气，这正是酵母菌可发酵糖类产生酒精的原因。

## （二）酵母菌的液体培养特征

在液体培养基中，不同酵母菌的生长情况各异。有的生长于培养基的底部并产生沉淀；有的在培养基中均匀悬浮生长；有的则在培养基表面生长并形成菌膜、菌醭或壁环，其厚度因种而异。有假菌丝的酵母菌所形成的菌醭较厚，有些酵母菌形成的菌醭很薄，干而变皱。菌醭的形成与特征具有分类、鉴定意义。上述生长情况反映了酵母菌对氧气需求的差异。

## 六、酵母菌的繁殖方式

酵母菌的繁殖以无性繁殖为主，有的酵母菌进行有性繁殖。无性繁殖方式主要包括芽殖、裂殖和无性孢子繁殖；有性繁殖主要是产生有性的子囊孢子和接合孢子进行繁殖。

### （一）无性繁殖

#### 1. 芽殖

成熟的酵母细胞上长出的一个小突起称为芽孢。芽孢长到一定程度脱离母细胞继续生长，再出芽产生新个体，如此循环往复（见图 3-5）。

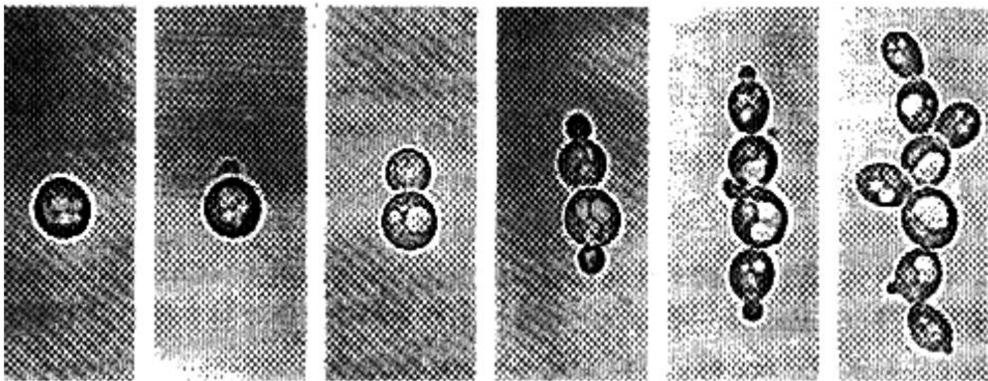


图 3-5 啤酒酵母的芽殖过程

酵母菌的出芽过程：在母细胞形成芽体的部位，由于水解酶对细胞壁多糖的分解，使细胞壁变薄，细胞表面向外突起，称为芽体。而后，母细胞核分裂成两个子核，其中一个随母细胞的增大部分及延长的细胞质和细胞器（如线粒体等）进入芽体，最后芽体从母细胞得到一套完整的核物质、线粒体、核糖体和液泡等细胞物质。当芽体长大到接近母细胞的大小时，即成为子细胞。子细胞与母细胞的相连部位形成了一个隔壁层；最后，子细胞



与母细胞在隔壁层处分离，成为独立的细胞（新个体）。

不同酵母菌在母细胞上出芽的部位不同。如果在母细胞的各个方向出芽称多边芽殖。多数酵母菌为多边出芽，细胞呈圆形、椭圆形或香肠形。如果在母细胞的两端出芽称两端芽殖，产子囊的尖形酵母为两端出芽，细胞常呈柠檬形。如果在母细胞的三个方向出芽称三端芽殖，此种情况较少，细胞呈三角形。如果总在母细胞的一端出芽，称一端芽殖，此时细胞呈瓶形。

当环境条件适宜，生长繁殖迅速时，有的酵母菌出芽形成的子细胞仍不脱离母细胞，并在子细胞上长出新芽，如此继续出芽，细胞成串排列，成为具有发达分枝或不分枝的假菌丝。

由于出芽数目受营养和其他环境条件的限制，因而每个细胞出芽数量是有限的，一般酵母菌可以产生 9~43 个芽体。

## 2. 裂殖

酵母菌的裂殖与细菌的裂殖相似（见图 3-6）。其过程是细胞伸长，核分裂为二，细胞中间形成隔膜，然后两个子细胞分离，末端变圆，形成两个大小相等、各具有一个核的子细胞。进行裂殖的酵母菌种类很少，常见的有裂殖酵母属的八孢裂殖酵母等。在快速生长的时期中，细胞可以没有形成隔膜而核分裂，或者形成隔膜而子细胞暂时不分开，形成细胞链，类似于菌丝，但最终细胞仍然会分开。

裂殖酵母（裂殖酵母 II A）



图 3-6 酵母菌的裂殖

## （二）有性繁殖

凡能进行有性繁殖的酵母菌称为真酵母，只进行无性繁殖的酵母菌称为假酵母。真酵母以形成子囊孢子的方式进行有性繁殖。

酵母菌可以通过形成子囊和子囊孢子进行繁殖。酵母菌发育到一定阶段，两个性别不同的细胞彼此接近，各伸出一小突起而相接触，接触处的细胞壁溶解，并形成一管道，两个细胞内的细胞质通过管道融合，称为质配。随后两个单倍体的核移到融合管道中融合形成二倍体核，此时称为核配。二倍体接合子可在融合管的垂直方向形成芽，然后二倍体核移入芽内。此二倍体芽可以从融合管道脱离下来，再开始二倍体营养细胞的出芽繁殖。很多酵母菌的二倍体细胞可以进行多代的营养生长繁殖。通常二倍体营养细胞较大，且生命力强，故发酵工业多采用二倍体细胞进行生产。在合适条件下，接合子的核进行减数分裂，成为 4 个或 8 个核（一般形成 4 个核），以核为中心的原生质浓缩，在其表面形成一层孢子壁而成为孢子。原来的接合子称为子囊，其内的孢子称为子囊孢子。子囊破裂，子囊孢子被释放出来，萌发成单倍体营养细胞。

酵母菌形成子囊孢子需要一定的条件。生长旺盛的幼龄细胞容易形成孢子，老龄细胞不易形成，还需要适宜的培养基和良好的生长条件。酵母菌产生的子囊孢子形状因菌种不同而异，有球形、椭圆形、半球形、帽子形、柑橘形、柠檬形、肾形、镰刀形、针形等。孢子表面有平滑的、刺状的，孢子的皮膜有单层的、双层的，这些都是酵母菌分类鉴定的重要依据。

## 七、酵母菌的生活史

生活史是指上一代个体经生长发育产生下一代个体的全部过程，也称为生命周期。各种酵母菌的生活史可分为以下三个类型：

### （一）单倍体型

八孢裂殖酵母菌在生活史中单倍体阶段较长，二倍体细胞不能独立生活，故二倍体阶段很短。其过程要点：单倍体营养细胞进行裂殖繁殖，两个营养细胞接触发生质配，质配后立即核配；二倍体核通过减数分裂形成4个或8个单倍体子囊孢子。

### （二）二倍体型

路德酵母菌在生活史中，单倍体不能独立生活，仅以子囊孢子形式存在于子囊中，单倍体阶段较短，二倍体营养阶段较长。其过程要点：单倍体子囊孢子在囊内成对结合，发生质配和核配，形成二倍体细胞；该二倍体细胞萌发形成的芽管穿过子囊壁而成为芽生菌丝，在此菌丝上长出芽体，子细胞与母细胞间形成横隔后迅速分开，这些二倍体细胞转变为子囊，每个膜内的核通过减数分裂产生4个单倍体的子囊孢子。

### （三）单双倍体型

啤酒酵母菌在生活史中，一般情况下都以营养体状态进行出芽繁殖，营养体既可以单倍体的形式存在，也能以二倍体的形式存在，在特定的条件下可以进行有性繁殖。其过程要点：子囊孢子在适宜条件下出芽产生单倍体营养细胞；单倍体营养细胞进行出芽繁殖；两个性别不同的营养细胞彼此结合，在质配后立即发生核配，形成二倍体营养细胞；二倍体营养细胞不进行核分裂，而是不断进行出芽繁殖；在特定条件下二倍体营养细胞转变成子囊，细胞核进行减数分裂，形成4个子囊孢子；子囊破壁后其中的子囊孢子释放出来。

## 八、常见的酵母菌

### （一）酵母菌属

酵母菌发酵能力强，能发酵多种糖类，如葡萄糖、麦芽糖、蔗糖、半乳糖和棉籽糖，主要产物是乙醇和二氧化碳，但不发酵乳糖。

典型代表有啤酒酵母，它既是面包酵母也是酿酒酵母。它作为面包酵母用于制作馒头、面包等食品，作为酿酒酵母用于生产啤酒、葡萄酒等乙醇饮料。另外，啤酒酵母菌体中维生素、蛋白质的含量很高，既可以用来生产蛋白质、维生素，还可以作为人类食品和动物饲料。

巴斯德酵母可以使啤酒产生不愉快的气味。

鲁氏酵母和蜂蜜酵母都是嗜渗酵母，能在高糖或高盐的食品中生长，引起高糖食品（如果酱）和高盐食品（如酱油）的变质。

## （二）毕赤氏酵母属

毕赤氏酵母分解糖的能力弱，不产生乙醇却能氧化乙醇，常使酒类和酱油变质并形成浮膜。

典型代表有膜醭毕赤酵母，它是啤酒和葡萄酒的污染物，能在酒的表面形成一层薄膜。

## （三）汉逊氏酵母属

汉逊氏酵母对糖类有较强的分解作用，可同化硝酸盐，也可产生乙酸乙酯。

典型代表有异常汉逊酵母，能产生乙酸乙酯，可以用于食品的增香，如应用于无盐发酵酱油中；但它也可以引起装箱贮存大米的腐坏；它还可以在食盐浓度为10%以下的黄瓜盐水表面生长，生成干皱的菌醭。

## （四）假丝酵母属

热带假丝酵母，可用作食用或饲用酵母，也会引起米糠油腐败；产阮假丝酵母，可以用来处理工农业废液，生产单细胞蛋白。

## （五）红酵母属

红酵母是较好的产脂肪菌种，脂肪含量可达干重的50%~60%；可产蛋氨酸；同时，又可污染牛肉、奶制品和酸泡菜。

## （六）德巴利酵母属

克氏德巴利酵母产柠檬酸量较高；季也蒙德巴利酵母新西兰变种可使香肠变黏。

## （七）裂殖酵母属

栗酒裂殖酵母是酿造乙醇的优良菌种，又能使蜂蜜、无核小葡萄干、梅干和花果腐败。

另外，啤酒型真菌对汽水有害；针孢酵母能引起柑橘水果腐烂；柠檬形克勒克酵母能引起草莓软腐等。

## 任务二 霉菌的认知

霉菌不是分类学上的名称，而是一些丝状真菌的统称。凡是生长在固体营养基质上，形成绒毛状、蜘蛛网状、棉絮状的菌丝体，统称为霉菌。霉菌意即“发霉的真菌”，通常是指那些菌丝体比较发达而又不产生大型子实体的真菌，约有4万多种。

### 一、霉菌在自然界中的分布

霉菌在自然界分布极为广泛，存在于土壤、空气、水体和生物体内外等处，它们同人类的生产、生活关系极为密切，是人类认识和利用最早的一类微生物。在地球上，几乎到处都有霉菌的踪迹。它们在自然界中扮演着最重要的有机物分解者的角色，从而把其他生物难以分解利用的数量巨大的复杂有机物如纤维素、木质素分解，促进了生物圈的繁荣发展。

### 二、霉菌与人类的关系

#### （一）霉菌的有益应用

##### 1. 发酵工业中的应用

霉菌可用于生产酒精、有机酸（柠檬酸、葡萄糖酸、延胡索酸等）、抗生素（青霉素、头孢霉素、灰黄霉素等）、酶制剂（糖化酶、蛋白酶、纤维素酶等）、维生素（硫胺素、核黄素等）、生物碱（麦角碱、胆碱等）、真菌多糖等；此外，利用某些霉菌对甾族化合物的生物转化以生产甾体激素类药物。

##### 2. 生产各种传统食品

霉菌可用于酿造酱油和食醋、制酱、腐乳、干酪等。

##### 3. 农业中的应用

霉菌可用于发酵饲料、植物生长刺激素（赤霉素）、杀虫农药（白僵菌剂）等的生产。

##### 4. 基本理论研究

霉菌作为基因工程的受体菌，在理论研究中具有重要价值。如粗糙脉孢霉作为研究遗传学的理想材料而应用于生化遗传学，它在多种氨基酸的生物测定方面也有应用。

##### 5. 环境保护

广泛利用腐生型霉菌具有分解各种复杂有机物（尤其是纤维素、半纤维素和木质素）的能力，使数量巨大的动植物尤其是植物的残体重新转变为生态系统中绿色植物的养料，在自然界物质转化中具有重要作用。此外，霉菌在污水处理方面也有应用。

## （二）霉菌带给人类的危害

### 1. 引起工农业产品的霉变

霉菌可造成食品、谷物、果蔬、纺织品、皮革、木器、纸张、光学仪器、电工器材和照相胶片等发霉变质。

### 2. 引起植物病害

霉菌是引起植物传染性病害的主要病原微生物。

### 3. 引起人和动物疾病

不少致病真菌可引起人和动物的浅部病变（如皮肤癣菌引起的各种癣症）和深部病变（如既可侵害皮肤、黏膜，又可侵犯肌肉、骨骼和内脏的各种致病真菌），在目前已知的真菌中，被国际确认的人、畜致病菌或条件致病菌已有 200 余种（包括酵母菌在内）。

### 4. 引起食物中毒

霉菌能产生真菌毒素达 100 多种，其中有 14 种毒素对实验动物致癌，严重威胁人和动物的健康。目前已知毒性最强的是由黄曲霉产生的黄曲霉毒素，可诱发实验动物肝癌。在霉变的花生、大米、玉米中黄曲霉毒素含量最多，易引起食物中毒的发生。

## 三、霉菌细胞的形态与大小

霉菌菌体是由分枝或不分枝的菌丝构成，许多菌丝交织在一起构成菌丝体。

### （一）菌丝

菌丝是霉菌营养体的基本单位，它是由细胞壁包被的一种管状细丝，直径一般为 3~10 $\mu\text{m}$ ，与酵母菌宽度相似，但比细菌或放线菌的细胞约粗 10 倍。菌丝是由霉菌的孢子萌发而形成，幼龄菌丝一般无色透明。霉菌的菌丝分为有隔膜菌丝和无隔膜菌丝（见图 3-7）。

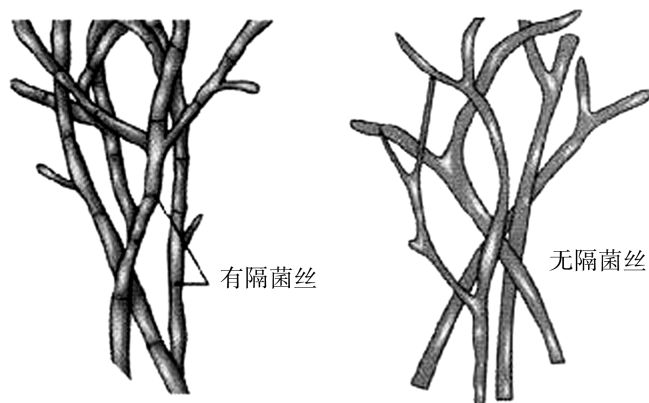


图 3-7 霉菌菌丝的形态

菌丝内无隔膜，整个菌丝就是一个长管状的单细胞，细胞质内含有多个细胞核。在菌丝生长过程中只有细胞核的分裂和原生质量的增加，而无细胞数目的增多。接合菌亚门和鞭毛菌亚门的霉菌菌丝属于此种类型，如根霉属、毛霉属、梨头霉属等。只有菌丝在产生生殖器官或有机械损伤时，才在其下面产生隔膜。但也有例外，某些种类的老菌丝上有时也形成隔膜。

## （二）菌丝体的分化及其特化形态

当霉菌孢子落在适宜的固体营养基质上后，就发芽产生菌丝，菌丝继续生长并向两侧分枝。由许多分枝菌丝相互交织而成的群体称为菌丝体。霉菌菌丝体在功能上有一定的分化，密布于营养基质内部主要执行吸收营养功能的菌丝体称为营养菌丝体；伸出培养基长在空气中的菌丝体则称为气生菌丝体；部分气生菌丝体生长到一定阶段，可以分化成为具有繁殖功能、产生生殖器官和生殖细胞的菌丝体称为繁殖菌丝体。在长期进化过程中，为了适应环境和自身生理功能的需要，霉菌菌丝体可分化出许多功能不同的特化形态，如营养菌丝体可形成假根、匍匐菌丝、吸器、附着胞、附着枝、菌核、菌索、菌环、菌网等，气生菌丝体可形成各种形态的子实体。

### 1. 匍匐菌丝

匍匐菌丝又称匍匐枝，是根霉属的霉菌营养菌丝分化形成的具有延伸功能的匍匐状菌丝。每隔一段距离在其上长出伸入基质的假根和伸向空间生长的孢子囊梗，新的匍匐菌丝再不断向前延伸，以形成蔓延生长的菌苔。

### 2. 假根

假根是根霉属的霉菌匍匐枝与固体基质接触处分化形成的根状菌丝，其功能是固着和吸收营养物质。在显微镜下假根的颜色比其他菌丝要深。

### 3. 吸器

吸器是由专性寄生性真菌如锈菌、霜霉菌和白粉菌等从营养菌丝上产生出来的旁枝，侵入细胞内分化成指状、球状、丝状或丛枝状结构，用以吸收寄主细胞的养料。

### 4. 菌核

菌核是由霉菌的菌丝团组成的一种外层色深、坚硬的休眠体。其内层疏松，大多呈白色，它对外界不良环境有较强抵抗力，在适宜条件下可萌发出菌丝，生出分生孢子梗、菌丝子实体等。

### 5. 子实体

子实体是指在其内部或表面产生无性或有性孢子，具有一定形状和构造的菌丝体组织。它是由真菌的气生菌丝和繁殖菌丝缠结而成的产生孢子的结构，其形态因种而异。

## 四、霉菌的细胞结构和功能

菌丝是构成霉菌的基本单位，在功能上有一定的分化。其直径一般为  $2\sim 10\mu\text{m}$ ，比细

菌和放线菌菌丝粗几倍到十几倍。霉菌细胞由细胞壁、细胞膜、细胞核、细胞质及其内含物等组成。细胞质内含有线粒体、核糖体、内质网、高尔基体和液泡及贮藏物质等（见图 3-8）。

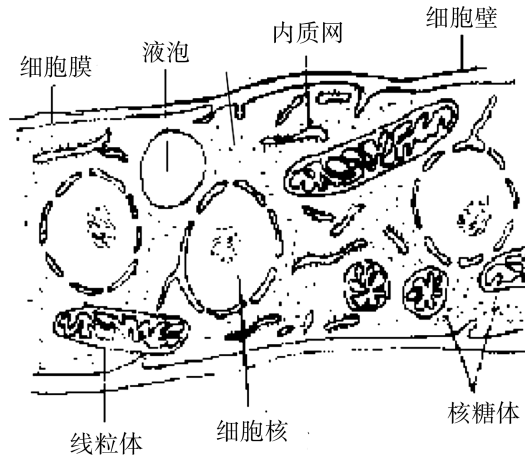


图 3-8 霉菌典型的细胞结构

### （一）细胞壁

细胞壁厚 100~250nm。除少数低等的水生霉菌细胞壁中含有纤维素外，大部分霉菌的细胞壁由几丁质组成（占细胞干质量的 2%~26%）。细胞壁位于细胞的最外侧，包裹细胞膜，保持细胞的形态、坚韧性。

### （二）细胞膜

细胞膜厚 7~10nm，其结构和功能与酵母菌细胞相同，具有典型的三层结构，为流体镶嵌模型的单位膜，有物质转运、能量转换、激素合成、核酸复制等作用。

### （三）细胞核

细胞核通常为椭圆形，直径为 0.7~3.0 $\mu\text{m}$ ，有核膜、核仁和染色体。双层的核膜厚度为 8~20nm，其上有许多直径为 40~70nm 的核膜孔，核仁直径约 3nm。在有丝分裂时，核膜、核仁不消失，这是与其他高等生物的不同之处。不同真菌细胞核的数目变化很大，如有的真菌细胞内有 20~30 个核，而担子菌的单核或双核菌丝细胞只有 1 个或 2 个核，在菌丝顶端的细胞中常找不到核。

### （四）细胞质及内含物

幼龄菌丝的细胞质均匀而透明，充满整个细胞；老龄菌丝的细胞质黏稠。在细胞质中存在着核糖体、线粒体、内质网、液泡和贮藏物质等。

#### 1. 核糖体

霉菌核糖体的结构和功能与酵母菌基本相同，是蛋白合成的场所。

## 2. 线粒体

霉菌线粒体的结构和功能与酵母菌基本相同。它是酶的载体，是细胞呼吸产生能量的场所，能为细胞运动、物质代谢、活性物质运输提供足够的能量。

## 3. 内质网

内质网是细胞中各种物质运转的一种循环系统，同时，细胞质中所有细胞器上的双层膜由内质网提供。

## 4. 液泡

液泡常靠近细胞壁，多为球形或近球形，少数为星形或不规则形。大多数真菌的液泡都有明显的结构，一般有两层膜。

## 5. 贮藏物质

细胞质中有许多贮藏物质，如类脂质、异染颗粒和肝糖粒、淀粉粒等。

# 五、霉菌的培养特征

## （一）霉菌的固体培养特征

霉菌菌落是由分枝状菌丝组成的，在固体培养基上形成营养菌丝（基内菌丝）和气生菌丝。气生菌丝间无毛细管水，所形成的菌落与细菌和酵母菌的菌落不同，与放线菌的菌落接近。霉菌菌落形态较大，质地比放线菌疏松，外观干燥，不透明，呈现或紧或松的蛛网状、绒毛状或棉絮状。菌落与培养基连接紧密，不易挑取。少数霉菌，如根霉、毛霉、脉孢菌生长很快，菌丝生长没有局限，可在固体培养基表面蔓延以至扩展到整个培养皿，看不到单独菌落。在固体培养基上菌落最初常呈浅色或白色，当菌落产生各种颜色的孢子后，菌落表面往往呈现出肉眼可见的不同结构和颜色，如绿、青、黄、棕、橙等。黑曲霉呈黑色孢子；米曲霉呈黄绿色孢子；青霉呈铜绿色孢子；木霉呈绿色孢子；红曲霉呈红色孢子等。

根霉、毛霉的菌落：菌落无定型，根霉菌落呈疏松的蜘蛛网状，毛霉菌落呈绒毛状、棉絮状，菌落与培养基连接紧密，不易挑起，菌落的正反面的颜色、构造及边缘与中心的颜色构造常常不一致等。根霉菌和毛霉菌是食品工业中发酵生产豆豉、豆腐乳等的菌种，前者在 18~20℃ 生长最好，后者在 30℃ 生长好。

曲霉的菌落特征：菌落有定型，为圆形，直径在 2~3cm，边缘整齐，菌丝比毛霉、根霉短，呈致密的绒毛状，菌种不同孢子的颜色也不同，也是生产糖化酶的菌种。

同一种霉菌，在不同成分的培养基上和不同条件下培养，形成的菌落特征有所变化，但各种霉菌在一定的培养基上和一定的条件下形成的菌落大小、形状、颜色等却相对稳定。霉菌菌落特征是鉴定霉菌的重要依据之一。

## （二）霉菌的液体培养特征

当霉菌在液体培养基中进行通气搅拌或振荡培养时，霉菌的菌丝体会呈现特化形态，



它们的菌丝体会相互紧密扭结，纠缠成一种特殊构造，呈颗粒状的菌丝球，均匀地悬浮在发酵液中且不会长得过密，因而发酵液外观较稀薄，有利于发酵的进行。在静止培养时，菌丝常生长在培养液表面，培养液不混浊，有时可用来检查培养物是否被细菌所污染。

## 六、霉菌的繁殖方式

在自然界中，霉菌以产生各种无性或有性孢子进行繁殖，一般以无性繁殖产生无性孢子为主要繁殖方式。根据孢子的形成方式、孢子的作用及自身特点，可将霉菌的繁殖方式分为多种类型（见表 3-1）。由于不同种属的霉菌产生孢子的方式、孢子的形态或产生孢子的器官不同，所以霉菌孢子的形态特征和产生孢子的器官的特征是霉菌分类、鉴定的主要依据。

表 3-1 霉菌的繁殖方式

霉菌繁殖	无性孢子	孢囊孢子
		分生孢子
		节孢子
		厚垣孢子
	有性孢子	卵孢子
		接合孢子
		子囊孢子
		担孢子
	菌丝片段	断裂繁殖

### （一）无性孢子

形成无性孢子，是霉菌繁殖的主要方式。形成的无性孢子往往分散、量大，具有一定的抗性，有利于保藏菌种。

#### 1. 孢囊孢子

孢囊孢子又称孢子囊孢子，是一种内生孢子。当气生菌丝长到一定阶段时，顶端开始膨大，并在下方生出横隔与菌丝分开而形成孢子囊。孢子囊逐渐长大，囊中形成许多核，每一个核外生膜壁并包有原生质，就形成了孢囊孢子（见图 3-9）。产生孢子囊的菌丝称为孢囊梗，孢囊梗伸入孢子囊的膨大部分叫囊轴。

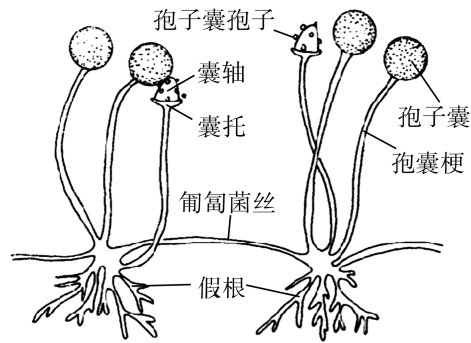


图 3-9 孢囊孢子

孢子成熟后，孢子囊破裂，孢子分散出来，遇到适宜条件就可以萌发成新的个体。孢囊孢子按运动性可以分成两类，一类是游动孢子，如水霉的孢子，顶生两根鞭毛；另一类是不动孢子，无鞭毛，如陆生毛霉、根霉的孢子。

## 2. 分生孢子

分生孢子是一种外生孢子，这是霉菌中最普遍的一类孢子。分生孢子是由菌丝的顶端（或分生孢子梗）以类似于出芽的方式（或浓缩）形成的单个（或成簇）的孢子（见图 3-10）。

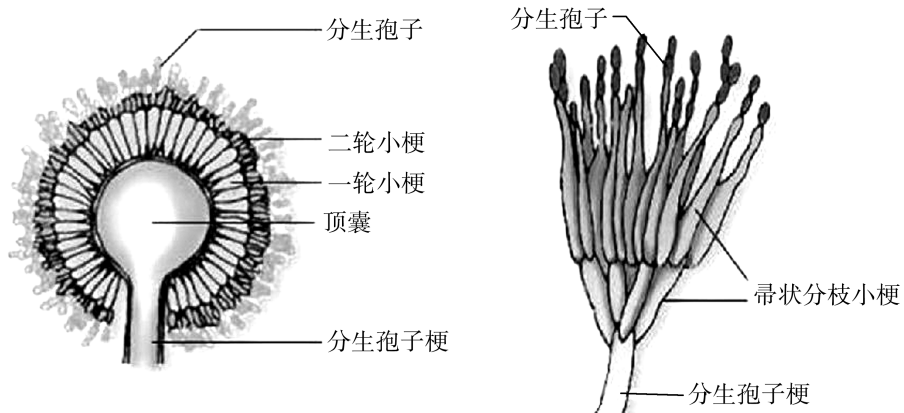


图 3-10 分生孢子

分生孢子产生的方式可大致归为以下几种：

(1) 无明显分化的分生孢子梗 分生孢子着生在菌丝或其分枝顶端，单生，成链或成簇，而且产生孢子的菌丝与一般菌丝无显著的区别，如红曲霉（见图 3-11）。

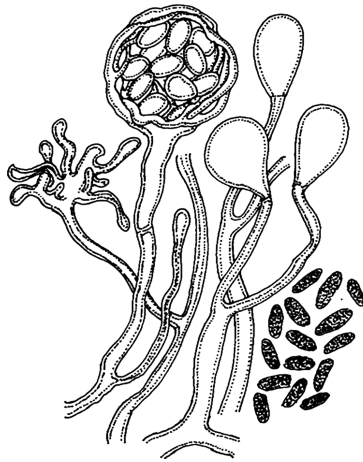


图 3-11 红曲霉的分生孢子

(2) 具有分化的分生孢子梗 分生孢子着生在已分化的（如细胞壁加厚或菌丝直径增大）分生孢子梗的顶端或侧面。这种菌丝与一般菌丝有明显的区别，它们或直立、或朝一定方向生长，如粉红单端孢霉、新月弯孢霉等（见图 3-12）。



图 3-12 粉红单端孢霉的分生孢子

(3) 具有一定形状的小梗 在已分化的分生孢子梗上，产生一定形状、大小的小梗（常呈瓶形，有人称为瓶形小梗），分生孢子则着生在小梗的顶端，成串（链）或成团，如青霉（见图 3-13）。



图 3-13 青霉的分生孢子

### 3. 节孢子

节孢子是由菌丝断裂形成的孢子。其形成过程：菌丝生长到一定阶段，菌丝内出现许

多横隔膜，然后从横隔膜处断裂，产生许多短柱形、筒形或两端呈钝圆形的节孢子，如白地霉（见图 3-14）。

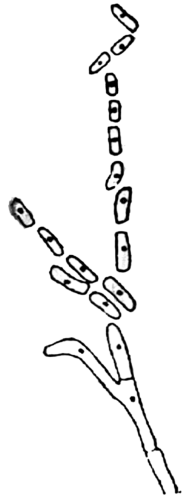


图 3-14 白地霉的孢子

#### 4. 厚垣孢子

厚垣孢子又称厚膜（壁）孢子，它是由菌丝中间（少数在顶端）的个别细胞膨大，原生质浓缩和细胞壁加厚形成的休眠孢子。其形成过程：在菌丝中间或顶端的个别细胞膨大，原生质浓缩、变圆，类脂物质密集，然后在四周生出厚壁或者原来的细胞壁加厚，形成圆形、纺锤形或长方形的厚垣孢子。它是霉菌抵抗热与干燥等不良环境的一种休眠体。厚垣孢子寿命较长，菌丝体死亡后，上面的厚垣孢子生存下来，当条件适宜时能萌发成菌丝体，如总状毛霉、地霉（见图3-15）。



图 3-15 地霉的厚垣孢子

### （二）有性孢子

霉菌的有性繁殖在一般培养基上不常出现，多发生于特定条件下，产生有性孢子。霉菌的有性繁殖是指经过两个性细胞结合，一般经质配、核配和减数分裂而产生子代

新个体的过程。有性繁殖所产生的孢子称有性孢子。霉菌常见的有性孢子有卵孢子、接合孢子、子囊孢子和担孢子。

霉菌有性孢子的形成过程一般分为三个阶段：

**质配：**即两个性细胞接触后细胞质发生融合，但两个单倍染色体的核不立刻融合，称双核细胞。

**核配：**质配后双核细胞中的两个核融合，产生二倍染色体的双倍体接合子核。

**减数分裂：**双倍体核通过减数分裂，细胞核中的染色体数目又恢复到单倍体状态。

霉菌形成有性孢子有不同的方式：

经核配以后，含有双倍体核的细胞直接发育形成有性孢子，如卵孢子和接合孢子，此种孢子的核处于双倍体阶段，萌发时才进行减数分裂。

经核配以后，双倍体的核进行减数分裂，然后再形成有性孢子，如子囊孢子，此种孢子的核处于单倍体阶段。

两个性细胞结合经质配形成双核细胞后，直接侵入寄主组织，形成休眠体孢子囊，囊内的双核在萌发时才进行核配和减数分裂。

### 1. 卵孢子

霉菌的菌丝分化成大小不同的两类配子囊，小的称为雄器，大的称为藏卵器。交配时雄器的内含物（细胞质与细胞核）通过受精管进入藏卵器，最后由受精的卵球生出厚壁而形成卵孢子，如水霉（见图 3-16）。

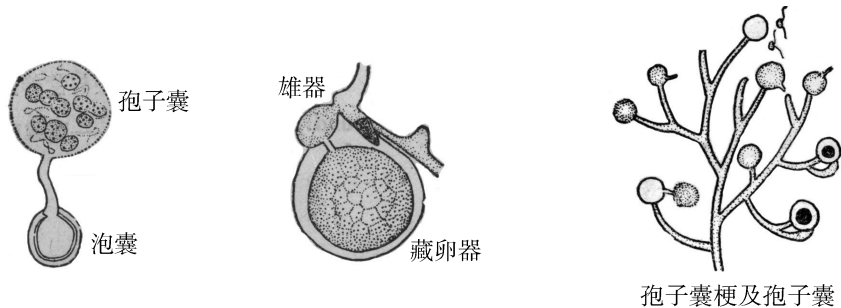


图 3-16 水霉的卵孢子形成过程

### 2. 接合孢子

接合孢子由菌丝生出形态相同或略有不同的配子囊接合而成，如根霉（见图 3-17）。

**接合孢子的形成过程：**两个相邻的菌丝相遇，各自向对方生出极短的侧枝称为原配子囊。原配子囊接触后，顶端各自膨大并形成横隔即为配子囊。配子囊下面的部分称为配子囊柄。

相接触的两个配子囊之间的横隔消失，其细胞质与细胞核相融合，同时外部形成厚壁即为接合孢子囊。其内有一个接合孢子，在适宜条件下萌发成新的菌丝体。含有双倍体核的接合孢子在萌发前或萌发时进行减数分裂。

霉菌接合孢子的形成可分为同宗配合与异宗配合两种方式。同宗配合是雌雄配子囊来

自同一个菌丝体，甚至在同一菌丝的分枝上也会接触形成接合孢子；异宗配合是两种不同质菌系的菌丝相遇后形成接合孢子。接合孢子由菌丝上生出的两个圆形或形状上略有不同的配子囊接合而成。

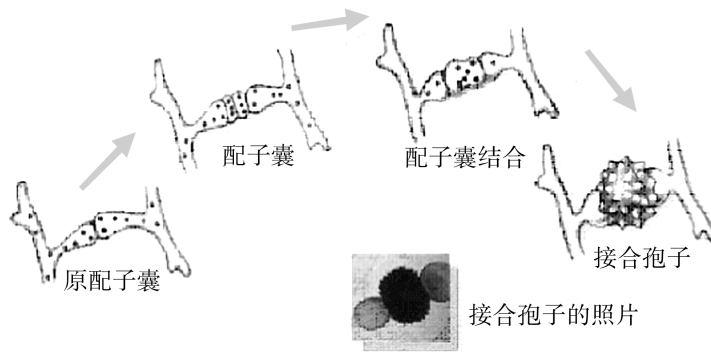


图 3-17 根霉的接合孢子

### 3. 子囊孢子

在子囊中形成的有性孢子称为子囊孢子。子囊是一种囊状结构，有圆球形、宽卵形、棒形或圆筒形等多种形状，因种而异（见图 3-18）。

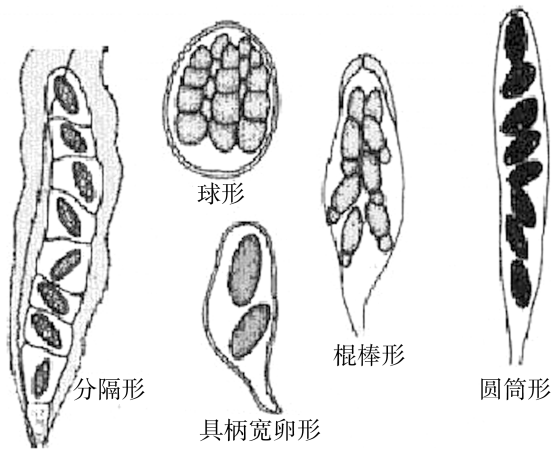


图 3-18 各种类型的子囊

子囊的形成有两种类型，一种是由两个营养细胞结合后直接形成；另一种是由两个异性的配子囊经接触交配后生出子囊丝间接形成。多个子囊外面被菌丝包围，形成子实体，称为子囊果。子囊果的大小、形态随种而不同（见图 3-19），共分为三种类型。

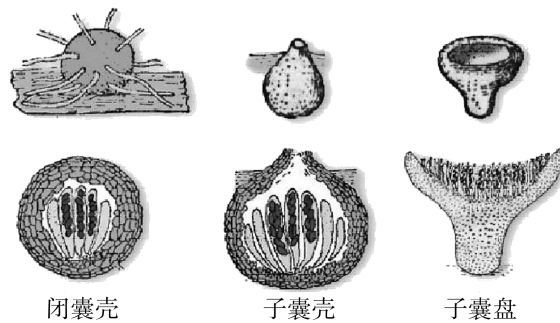


图 3-19 子囊果的类型

闭囊壳：完全封闭式的圆球形。

子囊壳：有孔口的烧瓶形。

子囊盘：开口式，呈盘状。

#### 4. 担孢子

菌丝经特殊的分化和有性结合形成担子，在担子上形成有性孢子，即担孢子。

综上所述，霉菌种类不同，孢子的形态、形成也多有不同，这在分类鉴定上也具有重要的意义。霉菌的孢子小、轻、干、多，休眠期长，抗逆性强，故霉菌在自然界中可以随处传播且具有极强的繁殖能力。霉菌孢子的这些特点一方面有利于霉菌的接种、扩大培养及菌种选育、保藏等；另一方面，则又容易造成污染、霉变和导致动植物病害。

## 七、食品工业中常见的霉菌

霉菌的种类繁多，目前已知的就有四万多种。霉菌与人类生活息息相关，一方面它们给了人类极大的帮助；另一方面它们又给人类带来了极大的损害。

### (一) 毛霉属

毛霉的菌丝为无横隔的单细胞，多核，有分枝，以孢囊孢子和接合孢子繁殖，孢子囊呈球形，孢子囊梗多数呈丛生状，分枝或不分枝（见图 3-20）。

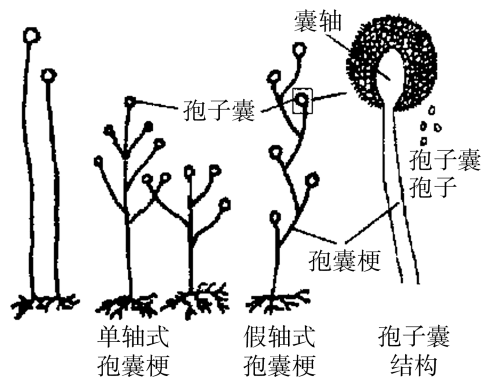


图 3-20 毛霉

毛霉在自然界分布很广，在阴暗、潮湿、高温处常见，是制曲时常见的一种杂菌。

毛霉的用途广泛，可分解大豆蛋白，用来制造豆腐乳及豆豉；具有较强的糖化力而应用于乙醇工业、有机酸工业中对原料进行糖化。

### 1. 鲁氏毛霉

在马铃薯培养基上菌落呈黄色，在米饭上略带红色；多用来做豆腐乳。

### 2. 总状毛霉

菌落质地疏松，在豆腐坯和熟大豆上生长迅速，在我国四川多用来制作豆豉。不过，毛霉也会引起水果、蔬菜、糕点、乳制品、肉类等食品的腐败变质，如鲁氏毛霉。

## (二) 根霉属

根霉的菌丝为无横隔的单细胞，有分枝。菌丝伸入培养基内的部分长成分枝的假根，吸收营养；靠近培养基表面横向匍匐生长而连接假根的菌丝称为匍匐菌丝；由假根处向上丛生直立、有分枝的孢子囊梗，顶端膨大形成圆形的孢子囊，内生孢囊孢子（见图 3-21）。



图 3-21 根霉

根霉在自然界分布很广，常生活在淀粉质馒头、面包、甘薯等物品上，产生大量的淀粉酶，把淀粉转为糖，是酿酒工业中常用的糖化菌，我国民间酿制米酒用的米曲中主要含有根霉。

### 1. 华根霉

华根霉在基质上生长极快，菌落疏松，假根不发达，形如手指，淀粉糖化力强。在酒药和酒曲中大量存在，是酿酒所必需的主要霉菌，也是酸性蛋白酶和豆腐乳生产的主要菌种。

### 2. 米根霉

米根霉假根较发达，有指状或根状分枝，多用作糖化菌，大量存在于酒药曲中。

## (三) 曲霉属

曲霉的菌丝为有横隔的多细胞，营养菌丝多匍匐生长于培养基的表层，无假根；附着在培养基的匍匐菌丝分化出具有厚壁的足细胞，在足细胞上生出直立的分生孢子梗，顶端膨大形成顶囊，顶囊表面以辐射状生长一层或两层小梗，在小梗上生有一串串的分生孢



子，这些结构合称“孢子穗”（见图 3-22）。

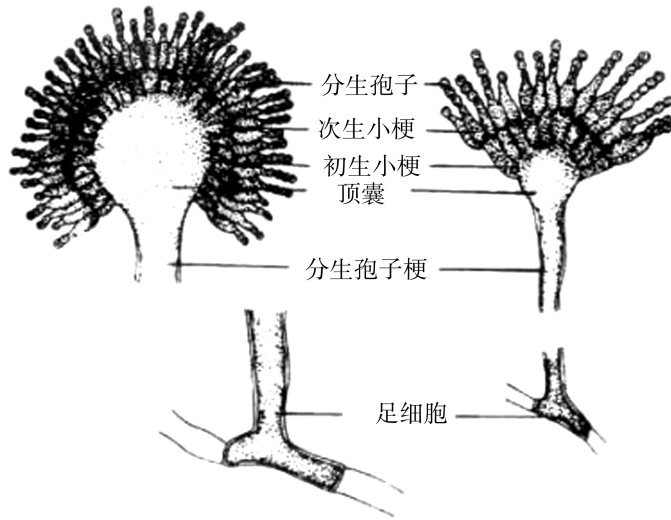


图 3-22 曲霉

曲霉具有分解有机质的能力。几千年来，我国民间就用曲霉酿酒、制酱、制醋等。现代工业利用曲霉生产各种酶制剂（淀粉酶、蛋白酶、果胶酶等），有机酸（柠檬酸、葡萄糖酸等）。农业中往往用曲霉来糖化饲料。

#### 1. 黑曲霉群

黑曲霉的菌丝为黑色；工业上广泛用邬氏曲霉、甘薯曲霉等生产柠檬酸。

#### 2. 黄曲霉群

黄曲霉的菌丝最初为白色，后变为黄绿色，老熟后为褐绿色，是粮食发霉的优势菌，特别在花生上容易生成，产生的黄曲霉毒素是一种致癌物质，能引起家禽、家畜中毒以至死亡。我国现已停止使用能产生黄曲霉毒素的菌种。

### （四）青霉属

青霉的菌丝为有横隔的多细胞、无足细胞、无顶囊；营养菌丝深入培养基中，并生出直立的气生菌丝，即分生孢子梗；分生孢子梗经多次分枝，产生几轮对称或不对称的小梗，形如扫帚，称为“帚状体”；分生孢子梗顶端着生成串的分生孢子（见图 3-23）。

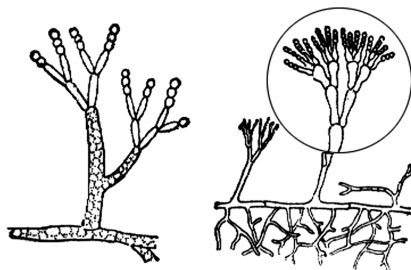


图 3-23 青霉

青霉菌因产生青霉素而著称，又是制曲时常见的杂菌，对制曲危害相当大，它可以使食品变质，使酒类发苦。灰绿青霉可着生于面包、糕点、干酪表面，还能引起酒石酸、苹果酸、柠檬酸等饮料变质。

### （五）镰刀霉属

镰刀霉在培养基中菌丝蔓延呈棉絮状，产生的分生孢子透明，形状多样，主要有两种：大型分生孢子，呈镰刀状，3~5隔；小型分生孢子，单细胞，长圆形，在菌丝顶端串生或聚成团（见图3-24）。



图 3-24 镰刀菌

镰刀霉是果汁中常见的腐败菌。

### （六）红曲霉属

红曲霉的菌丝体初期为白色，以后呈红色、红紫色，色素可分泌到培养基中去。闭囊壳为橙红色、球形，子囊呈球形，含8个子囊孢子。子囊孢子卵圆形、光滑、无色或淡红色，分生孢子着生在菌丝及其分支的顶端，单生或呈链形、球形或梨形。

红曲霉菌可用于制取红曲，作为优良的自然食品着色剂，如红色豆腐乳就是典型的产品。

### （七）木霉属

木霉的菌丝生长初期为白色，有横隔，菌丝在培养基上蔓延生长形成平坦的菌落。分生孢子梗直立、分枝多，不规则分枝或轮生，分枝菌丝与孢子梗多成直角。分枝上有侧枝分出称为小梗，小梗上长出分生孢子，孢子一般为无色或淡绿色，呈圆形、椭圆形或卵圆形，常常丛生集合在一起似花簇，如绿色木霉。木霉属霉菌产生纤维素酶，可用于淀粉加工、饲料的发酵和纯棉布的处理等，也引起木材、皮革和纤维素物品等霉烂。

### （八）赤霉属

赤霉属于核菌纲，球壳菌目。赤霉属霉菌进行有性繁殖产生子囊和子囊孢子。子囊壳呈球形、光滑，为蓝色，子囊常为棒形，内有8个子囊孢子。

赤霉菌可产生赤霉素，它是一种激素，能刺激植物生长，对蔬菜有增产的作用。此

外，该菌是寄生在植物上的病原菌，能引起植物致病。

## 思政园地

陈华癸（1914—2002），我国著名的微生物学家、土壤学家和优秀的教育家，我国农业微生物学的奠基人之一。陈先生一生致力于我国农业科技和高等农业教育事业，先后培养了范云六院士、陈文新院士、刘更另院士、赵其国院士、邓子新院士、陈焕春院士等一批农业科教领域杰出人才。他领衔主编的《微生物学》教材，荣获国家优秀教材奖。根瘤菌是他终身研究的主要对象，并取得了许多具有开创性的研究成果。1992年，他的学生陈文新院士将紫云英根瘤菌定名为“华癸根瘤菌”，并得到了国际上的公认。

某日，陈先生给时为大学二年级的范云六院士和同学们布置了一道没有题目的“试卷”——要求同学们自设题目，阐明选题依据理由及自己的实验思路，并在规定时间内完成。

“考题”下达后，忙坏了这些年轻学子。大家整天泡在图书馆里查资料、找数据，忙得不亦乐乎，碰到一起还互相交流，看彼此进展得怎么样。到了规定时间，同学们把完成的小论文交给了陈先生。可没有想到的是，交上去的作业如石沉大海，再无消息。当时，范云六心里疑惑不解，陈先生既不给分数，也不作评判，那为何还如此“折腾”学生呢？

多年以后，范云六在科研工作中找到了答案：陈先生是在引导同学们学会提出科学命题，并培养独立思考、独立钻研的精神。

陈先生认为，对于专业人才培养而言，学校是“秧田”，社会是人才成长的“大田”。“学校不可能提供学生一生需要的猎物，而是提供学生一支猎枪和使用猎枪的方法，而且即使是猎枪及其使用方法也是在不断更新换代的。”

某日，陈华癸先生和土化系全体研究生在一起座谈交流。会上，有位同学向先生请教如何才能处理好与导师之间的关系，先生答以四个字：“多去找他！”回答浅显直白、言简意赅，却充满了生活艺术与人生法则。

“亲其师，信其道”，陈先生是这样教导学生，更是主动关爱学生、身体力行。

陈先生叮嘱学生学习任务重，要注意锻炼好身体，“只有身体好了，学习才可能好；也只有身体好了，学习好才有真正的意义”，几句简单的言语就把两者的逻辑关系讲得十分明确。

某日，陈华癸先生带领正在读研究生的喻子牛教授一起到农村调查紫云英种植情况。第一站到随县，他白天下田、夜访老农，指导检测紫云英的株高、根系多少和长短、结瘤数等，详细询问种紫云英的是新区还是老区、新区是否接种根瘤菌剂、老区复种了几年、水肥怎么管理等。第二站是当阳，同样考察种植现场、开座谈会。当阳领导一再请陈先生作个报告，都被他婉言谢绝。实际上，他感觉没有调查完，不敢轻易下结论。在第三站宜昌调查完后，县领导邀请他作报告，他这才满口答应了。

严谨务实的科学精神在陈先生身上得到完美体现。陈先生招收博士，不达条件宁缺毋滥；发表文章，坚持按贡献大小署名；研究结果，务须反复和充分的科学验证。他提出，“做事讲目标而不做糊涂事；讲认真而反对敷衍、草率；讲质量而忌低劣”。这种精神，不仅成就了他自己，也成就了无数的后人。

（来源：各类史料档案、纪念文集、重要文献和主流媒体公开报道）



## 习 题

### 简答题

1. 简述酵母菌的一般特点。
2. 简述酵母菌的形态结构和菌落特征。
3. 举例说明酵母菌的三种生活史类型。
4. 酵母菌的无性繁殖和有性繁殖有哪些特点？
5. 简述霉菌菌丝细胞的形态结构和菌落特征。
6. 霉菌的无性及有性孢子各有哪些类型？简述它们的形成过程。
7. 试论酵母菌、霉菌与食品工业的关系。



# 模块四 非细胞型微生物

## 知识目标

1. 熟悉病毒的生物学特性和形态结构，掌握病毒的增殖特点。
2. 了解噬菌体的形态结构特点，熟悉烈性噬菌体和温和噬菌体的繁殖特点，了解噬菌体的监测方法。
3. 熟悉噬菌体与发酵工业的关系，掌握防止噬菌体污染的措施。

## 技能目标

1. 学会描述发酵过程中遭受噬菌体污染的现象。
2. 能根据生产过程合理制定防止和解决噬菌体污染的措施。

病毒广泛分布于自然界中，无论动物、植物和人类都可受到病毒的危害。例如：由微生物引起的人类传染性疾病，就有 80% 是由病毒所引起的。病毒不仅是病毒学研究的对象，而且也成为分子生物学和分子遗传学的主要研究对象，研究病毒对这两门学科的发展产生了重大的影响。人们利用噬菌体对细菌作用的专一性，进行细菌分型鉴定或细菌病治疗；在分子生物学研究中，它作为载体应用于遗传工程上；在食品工业发酵生产中，病毒作为噬菌体对发酵工业具有极其重要的危害。

## 任务一 病毒的认识

### 一、病毒的概念及生物学特性

病毒是一类比细菌更小，能通过细菌过滤器，只含一种类型的核酸（DNA/RNA），仅能在活细胞内生长繁殖的非细胞形态的微生物。

病毒是目前已知的最小生物，和其他细胞生物相比较，具有以下显著特性：

①形体极其微小。一般都可以通过细菌过滤器。病毒的大小常用纳米（nm）表示，只有通过电子显微镜放大数千倍甚至几万倍才能看见。

②无细胞结构。病毒是由核酸和蛋白质组成的有生命特征的核蛋白颗粒，且只含有一种核酸，不是 DNA 就是 RNA。至今还没有发现一种病毒同时兼有两类核酸。大多数植物病毒的核酸为 RNA，少数为 DNA；动物病毒包括昆虫病毒，则部分是 RNA，部分为 DNA；噬菌体核酸大多数为 DNA。

③严格的专性活体寄生。无产能酶系，也无蛋白质和核酸合成酶系，只能利用宿主活细胞内代谢系统合成自身的核酸和蛋白质组分，所以病毒是严格的专性活细胞寄生生物。

④在宿主细胞协助下，通过核酸的复制和核酸蛋白装配的形式进行增殖，不存在个体的生长和二均分裂等细胞繁殖方式。

⑤在离开活体寄主细胞条件下，能以无生命的化学大分子状态存在，并可形成结晶。

⑥抵抗力小。一般情况下，病毒对自然环境的抵抗力是很小的，对阳光、紫外线、干燥和温度都很敏感。绝大多数病毒不同程度对干扰素敏感，而对一般抗生素不敏感。

由于病毒是活细胞内的寄生物，因此，如果它的宿主是人或对人类有益的动植物和微生物，就会给人类带来巨大损害。反之，如果它所寄生的对象是对人类有害的动植物或微生物，则会给人类带来巨大的利益。

## 二、病毒的形态和结构

### (一) 病毒的形态大小

病毒外形多呈球状或似球状，少数病毒呈杆状、丝状、弹状或砖块状，人、动物和真菌的病毒大多呈球状（如腺病毒、蘑菇病毒），少数为弹状或砖块状（如弹状病毒、痘病毒）。植物病毒和昆虫病毒则多数为线状和杆状（如烟草花叶病毒、家蚕核型多角体病毒），少数为球状（如花椰菜花叶病毒）。噬菌体则多呈蝌蚪状。绝大多数的病毒都能通过细菌过滤器的微小颗粒，病毒大小不一，一般长 100nm（10~250nm 之间）。因此，可粗略地记住病毒、细菌和真菌这三类微生物个体直径比约为 1 : 10 : 100。大病毒可长达 300nm，最小病毒的直径仅为 10nm（见图 4-1）。

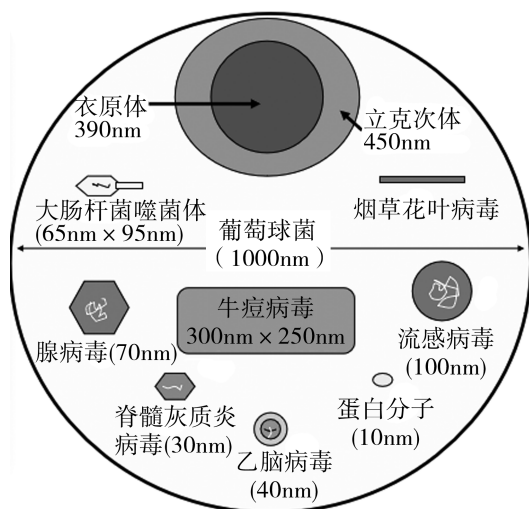


图 4-1 部分微生物的大小比较图

### (二) 病毒的基本结构

结构完整、功能齐全和有感染性的单个成熟病毒，称为病毒颗粒或病毒颗粒子。这是因为病毒是非细胞生物，单个病毒个体不能称作“单细胞”。病毒颗粒的基本成分是核酸和蛋白质（见图 4-2）。病毒的中心为核酸，是病毒的核心，它含有病毒的基因组，能为病毒的增殖、遗传、变异等功能提供遗传信息。核酸的外周包被的蛋白质外壳，称为衣壳体。衣壳体是由衣壳粒规则排列组成的。衣壳粒是由单个或多个多肽分子构成的。衣壳体是病毒粒子的主要支架结构和抗原成分，对核酸有保护作用，使核酸免受环境中核酸酶等其他破坏因素的破坏。衣壳粒的排列有的在核酸外面整齐排列呈二十面立体对称型，有的紧绕核酸呈螺旋对称型，也有衣壳粒排列不规律的复合对称型。



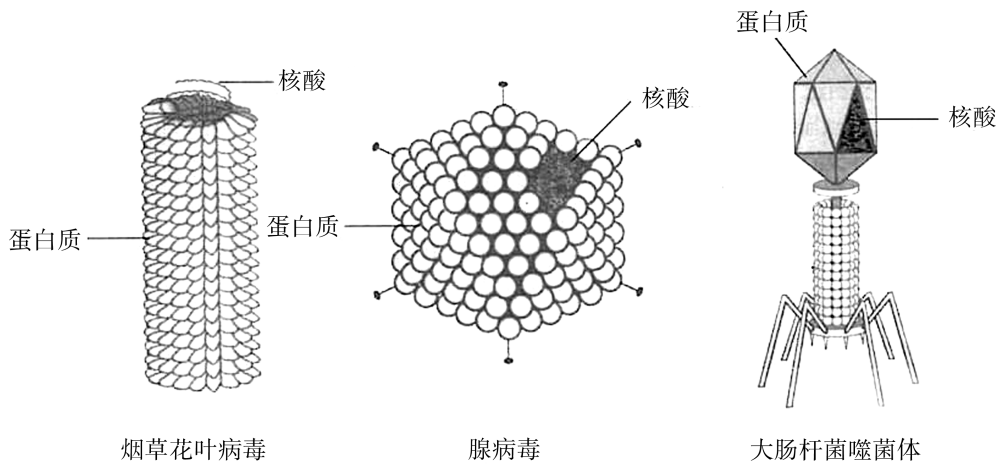


图 4-2 病毒结构示意图

### 三、病毒的分类

#### (一) 微生物病毒

微生物病毒是指侵染细菌、放线菌等原核微生物的病毒，通常称为噬菌体，微生物病毒广泛存在于自然界中，在真菌、蓝绿藻中也发现有病毒的存在。在病毒学中，以大肠杆菌中发现的噬菌体最多，研究也最深入。

#### (二) 植物病毒

植物病毒大部分属于 ssRNA 病毒，其基本形态有杆状、丝状和等轴对称的近球状，二十面体，一般没有包膜，只有少数种类才有包膜。

#### (三) 动物病毒

在人类、哺乳动物、禽类和鱼类等各种动物中，广泛存在着相应的病毒。目前研究得较广泛和深入的还是那些与人类健康、畜牧业直接相关的病毒。常见的如流感病毒、麻疹病毒、腮腺炎病毒、肝炎病毒、疱疹病毒、流行乙型脑炎病毒、艾滋病毒以及狂犬病毒等。此外，据统计，在人类的恶性肿瘤中，约有 15% 是由于病毒的存在而诱发的。家禽和其他哺乳动物中的病毒病也相当普遍，如猪瘟、牛瘟、口蹄疫等。几种病毒的形态比较如图 4-3 所示。

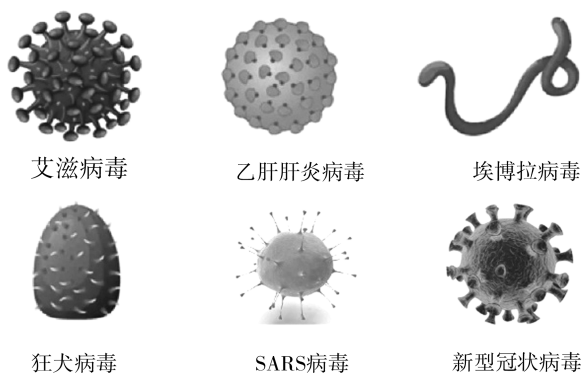


图 4-3 几种病毒的形态比较

## 四、病毒的增殖

病毒的增殖方式与细胞型微生物不同。病毒是专性活细胞内寄生物，缺乏生活细胞所具备的细胞器（如核糖体、线粒体等）以及代谢必需的酶系统和能量。增殖所需的原料、能量和生物合成的场所均由宿主细胞提供，在原代病毒核酸的控制下合成病毒的核酸和蛋白质等成分，并装配成熟的子代病毒，释放主细胞外，或接着感染其他易感活细胞，这种增殖方式称为复制。从病毒靠近宿主细胞，并进入细胞，到复制后子代病毒释放出来的全过程，称为复制周期，也称为感染周期。无论是动物病毒、植物病毒还是细菌病毒，其繁殖过程虽不完全相同，但基本相似，概括起来可分为吸附、侵入与脱壳、生物合成、装配与释放四个连续阶段。

### （一）吸附

病毒感染细胞先要吸附在易感染细胞上，这一过程又分两步：第一步是随机吸附，第二步为特异性结合。病毒由于随机碰撞或布朗运动，通过静电引力而与敏感细胞表面接触。这种吸附作用往往是暂时的。在通常情况下，敏感细胞表面具有特异性表面化学组分作为接受部位，病毒也含有与其“互补”的特异性化学组分作为吸附部位，这种吸附作用是牢固的，不可逆的。

研究病毒的吸附过程对了解受体组成、功能、致病机理以及探讨抗病毒治疗有重要意义。

### （二）侵入与脱壳

侵入是指病毒核酸或感染性核衣壳穿过细胞进入胞浆的过程。病毒可通过多种方式进入细胞内，有的病毒是通过细胞膜吞入，称为病毒胞饮，形成含病毒的吞饮泡，是病毒侵入的常见方式；有的病毒可直接穿过宿主细胞膜，进入胞浆，不过这种进入的方式较为少见；某些有囊膜的病毒，其囊膜与宿主细胞膜发生融合，囊膜留在细胞外面，病毒核衣壳进入细胞质中。病毒进入细胞后，其蛋白质衣壳会迅速被溶酶体蛋白质水解酶分解而脱

掉，并释放出核酸。

### （三）生物合成

生物合成包括病毒核酸的复制和蛋白质的合成。病毒侵入敏感细胞后，将核酸释放于细胞中，宿主细胞内的生物合成不再由细胞本身支配，而受病毒核酸携带的遗传信息控制。病毒利用宿主细胞的合成机构，如核糖体、tRNA 以及酶与 ATP 等，使病毒核酸复制，并合成大量病毒蛋白质。

多数 DNA 病毒在细胞核内合成核酸，多数 RNA 病毒在细胞质中合成核酸。病毒蛋白质在细胞质中合成。

病毒的生物合成基本上按下列步骤进行：

- ①按亲代病毒的样板转录 mRNA。
- ②由 mRNA 转录“早期蛋白”。这些早期蛋白一般为非结构蛋白，如合成核酸时所需要的 RNA 或 DNA 多聚酶，控制宿主蛋白质和核酸合成的调控蛋白等。
- ③复制核酸，以亲代病毒核酸为模板。
- ④合成“晚期蛋白”，主要由子代核酸转录 mRNA，再转译为“晚期蛋白”。晚期蛋白主要为子代病毒的衣壳蛋白以及在病毒形成阶段起作用的非结构蛋白等。

### （四）装配与释放

新合成的病毒核酸和病毒结构蛋白在感染细胞内组合成病毒颗粒的过程称为装配，而从细胞内转移到细胞外的过程称为释放。

病毒核酸与蛋白质合成完毕后，根据病毒种类不同，或在细胞核内或在细胞浆内进行装配，形成核衣壳。有囊膜的病毒形成核衣壳之后，其囊膜是通过细胞核膜或细胞膜时获得的，并以与吞饮病毒相反的过程——“出芽”的方式释放。无囊膜的病毒在宿主细胞装配成核衣壳后，即为成熟的病毒粒子，它或以细胞溶解或局部破裂的方式释放出来。还有的病毒能在宿主细胞间以转移的方式进行扩散和感染。

## 任务二 噬菌体

### 一、噬菌体的概念及主要类型

#### （一）概念

专门侵害细菌和放线菌等原核生物病毒称为噬菌体，包括噬细菌体、噬放线菌体、噬蓝细菌体等，它们广泛分布于自然界。1915 年英国人（图尔特）在培养葡萄球菌时，发现菌落上出现了透明斑。用接种针接触透明斑后再接触另一菌落，被接触的部分不久又

出现了透明斑。1917年法国人（德赫雷尔）在巴斯德研究所也观察到，向痢疾杆菌的新鲜液体培养物中加入某种污水的无细菌滤液，混浊的培养物变清了。将此澄清液再行过滤并加到另一敏感菌株的新鲜培养物中，混浊的培养物同样变清。以上现象，被称为“图尔特—德赫雷尔”现象。后来证实，这种现象由噬菌体所引起。

## （二）主要类型

与其他病毒一样，噬菌体也是由蛋白质和核酸组成的。核酸以单链或双链分子组成环状或丝状，病毒粒子外壳有不同形状和大小。基本形态有蝌蚪形、微球形和丝状三种，从结构上看，又可分为六种不同类型（见图 4-4）。

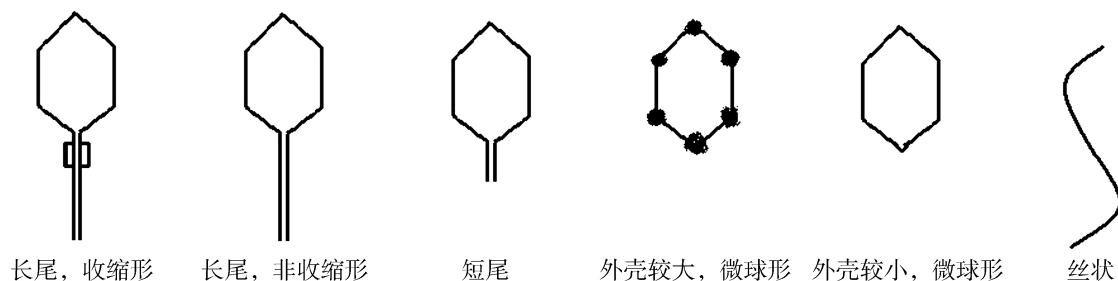


图 4-4 噬菌体的主要类型

- (1) 蝌蚪形收缩性长尾噬菌体 具六角形头部及可收缩的尾部，DNA 双链。
- (2) 蝌蚪形非收缩性长尾噬菌体 具六角形头部及不能收缩的长尾，DNA 双链。
- (3) 蝌蚪形非收缩性短尾噬菌体 有六角形头部和不能收缩的短尾，DNA 双链。
- (4) 六角形大顶壳粒噬菌体 有六角形头部，12 个顶角各有一个较大的壳粒，无尾部，DNA 单链。
- (5) 六角形小顶壳粒噬菌体 有六角形头部，无尾部，RNA 单链。
- (6) 丝状噬菌体 无头部，蜿蜒如丝，DNA 单链。

## 二、噬菌体的结构

以大肠杆菌 T4 噬菌体为例，介绍蝌蚪形噬菌体的结构。大肠杆菌 T4 噬菌体的结构与对称性均较复杂，它们除具二十面体的蛋白质衣壳组成的头部外，还有一个螺旋对称的尾部。在头部蛋白质外壳内，一条长  $50\mu\text{m}$  的 DNA 分子折叠盘绕其中。尾部则由不同于头部的蛋白质组成，其外包围有可收缩的尾鞘，中间为一空髓，即尾髓。有的噬菌体的尾部还有颈环、尾丝、基板和刺突。大肠杆菌 T4 噬菌体结构如图 4-5 所示。

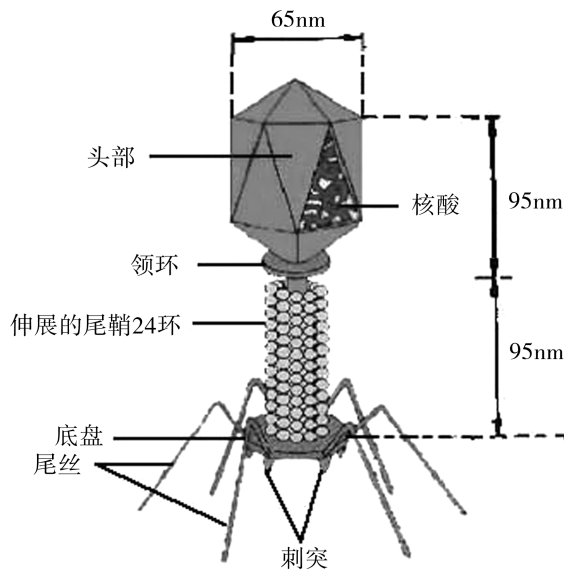


图 4-5 大肠杆菌 T4 噬菌体结构

### 三、烈性噬菌体和温和噬菌体

噬菌体感染细菌后会产生两种后果：一种是噬菌体增殖而引起细菌裂解；另一种是噬菌体不增殖而使细菌建立带噬菌体基因的状态，此现象称为溶原现象或溶原性。因此，根据与宿主细胞的关系将噬菌体分为烈性噬菌体和温和噬菌体两类。

#### (一) 烈性噬菌体

大部分噬菌体侵入寄主细胞后，引起寄主细胞的代谢改变，在寄主细胞内复制其核酸、蛋白质，装配成新的噬菌体，最终使寄主细胞破裂而释放大量子代噬菌体，这类噬菌体称为烈性噬菌体。

噬菌体的繁殖一般分为五个阶段，即吸附、侵入、增殖（复制与生物合成）、成熟（装配）、裂解（释放）。烈性噬菌体在短时间内能连续完成这五个阶段而实现其繁殖，其增殖过程与一般病毒相似。大部分噬菌体利用其尾端的尾丝吸附在宿主细胞壁的特异受体上。吸附作用受噬菌体数量、环境温度、pH 值、某些离子的存在等因素的影响。由于每一宿主细胞表面的特异受体有限，因此所能吸附噬菌体的数目也有一个限量。 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$  和  $\text{Ba}^{2+}$  等阳离子对吸附有促进作用，而  $\text{AP}^{+}$ 、 $\text{Fe}^{+}$  和  $\text{Cr}^{+}$  等阳离子则可引起失活。另外，pH 中性、生长最适温度环境有利于吸附。利用某些理化因子对吸附的促进作用和抑制作用，在发酵工业中对防止噬菌体的污染有一定的意义。噬菌体的增殖过程很快，例如，E. coli T 系噬菌体在合适的温度等条件下仅为 15~20min。

## （二）温和性噬菌体

自然界还存在另一种噬菌体，它吸附并侵入细胞后，噬菌体的 DNA 只整合在宿主的核染色体组上，并可长期随宿主 DNA 的复制而进行同步复制，因而在一般情况下不进行增殖和引起宿主细胞裂解，这种噬菌体称为温和噬菌体或溶原性噬菌体。

## 四、噬菌体的检测方法

噬菌体是形态极其微小的微生物，通常在光学显微镜下看不见，在人工培养基上又不能生长。所以，对噬菌体的检测只能采用间接的方法进行。这些方法主要是根据噬菌体的生物学特性而设计的。第一，噬菌体对寄主具有高度的特异性，可利用敏感菌株对其进行培养；第二，噬菌体侵染宿主细胞后可引起裂解，通过观察在含有敏感菌的琼脂平板上接种噬菌体培养后是否出现噬菌斑，或观察在含有敏感菌的液体培养基中培养物是否变清来进行判断。常用的方法有载片快速检测法、单层琼脂法和双层琼脂法。

## 五、噬菌体与发酵工业的关系

噬菌体对发酵工业许多领域有重大危害，需要严格防止，但可应用于细菌鉴定和分类、诊断和治疗疾病、基因载体等多个方面。

### （一）噬菌体污染及其防止

噬菌体对发酵工业的危害较大。深层液体发酵的大罐更增加了被噬菌体侵染的机会，若受噬菌体严重污染，轻则延长发酵周期、发酵液变清和发酵产物难以形成，重则造成倒灌、停产甚至危及企业命运，这种情况在谷氨酸发酵、细菌淀粉酶或蛋白酶发酵、丙酮丁醇发酵以及各种抗生素发酵中比较常见。

当发酵液受噬菌体严重污染时，会出现以下现象：发酵周期明显延长；碳源消耗缓慢；发酵液变清，常规镜检时，有大量异常菌体出现，用电子显微镜可观察到有无数噬菌体粒子；发酵产物的形成缓慢或根本不形成；用敏感菌做平板检测时，出现大量噬菌斑。

要防止噬菌体的危害，必须树立防重于治的观念。预防噬菌体污染的主要措施：绝不使用可疑菌种，严格保持环境卫生；绝不任意排放和丢弃有生产菌种的菌液；注意通气质量（选用 30~40 m 高空的空气再经严格过滤），加强发酵罐和管道的灭菌；不断筛选抗噬菌体菌种，经常轮换生产菌种等。

如果预防不成功，遭受噬菌体污染时，应及时采取合理措施。如果发现污染时发酵液中的代谢产物含量已较高，应及时补加营养并接种抗噬菌体菌种继续发酵后尽快提取产品；目前抑制噬菌体污染的药物很有限，在谷氨酸发酵中，加入草酸盐、柠檬酸铵等金属螯合剂可抑制噬菌体的吸附和侵入，加入金霉素、四环素或氯霉素等抗生素或吐温 60、吐温 20 或聚氧乙烯烷基醚等表面活性剂可抑制噬菌体的增殖或吸附；在以后的发酵过程中

应及时改用抗噬菌体生产菌株并轮换使用菌种。

## （二）噬菌体的应用

### 1. 用于细菌鉴定和分型

在生物学上，有些病原菌用其他方法很难鉴别。由于噬菌体的作用具有高度特异性，即一种噬菌体只能裂解和它相应的细菌，因此可用于细菌的鉴定。而且噬菌体的这种作用除具有种的特异性外，还具有型的特异性。一种噬菌体只能作用于该种细菌的某一型，于是可利用某一特定的噬菌体对细菌进行分型鉴定。

### 2. 用于诊断和治疗疾病

噬菌体感染相应细菌后，在适宜培养条件下，迅速繁殖并产生大量子代噬菌体。利用这一特性可将已知噬菌体加入被检材料中共同培养，如果出现噬菌体效价增长，就证实材料中有相应的细菌存在。在疾病治疗中可以使用噬菌体来裂解细菌，特别是在治疗某些创伤感染时，由于多数细菌对多种抗生素都产生了耐药性，在药物治疗效果不佳的情况下，最有效的办法就是采用相应噬菌体来治疗。现利用葡萄球菌、链球菌，尤其是绿脓杆菌的噬菌体用于治疗已取得了良好的效果。

### 3. 用作分子生物学研究的实验工具

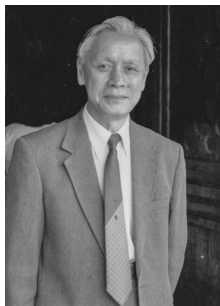
噬菌体的基因数目少，噬菌体变异或遗传性缺陷株容易辨认、选择和进行遗传性分析，因此，可以通过物理或化学的方法诱变使其产生多种噬菌体的突变株，然后利用这些突变株进行基因重新组合试验，研究噬菌体基因的排列顺序和功能。

在基因工程研究方面，噬菌体可作为载体，例如，感染大肠杆菌的另一半则是对其自身生命活动无重大影响的“非必要基因”。因此，可以被外源基因取代而建成良好的基因工程载体，将目的基因传递到另一细胞中，改变细胞的遗传特性。

## 思政园地

顾方舟（1926年6月16日—2019年1月2日），男，浙江宁波人，出生于上海市；第三世界科学院院士，英国皇家内科学院（伦敦）院士，欧洲科学、艺术、文学学院院士，医学科学家、病毒学专家，中国医学科学院北京协和医学院原院长、一级教授；我国脊髓灰质炎疫苗研发生产的拓荒者、科技攻关的先驱者，2019年9月17日，国家主席习近平签署主席令，授予顾方舟“人民科学家”国家荣誉称号。

也许，许多人并不了解什么是中国脊髓灰质炎疫苗，但却对儿时吃过的白色小“糖丸”印象深刻。正是这样一粒粒不起眼的小“糖丸”，帮助中国消灭了



脊髓灰质炎病毒。这一切的背后，是一位老人为之奉献一生的传奇故事。

脊髓灰质炎俗称小儿麻痹症，生病的对象主要是7岁以下的儿童，一旦得病就无法治愈，若病情严重，还会危及生命。

1955年，小儿麻痹症在青岛、上海、济宁、南宁等地蔓延。疾病暴发之初，有家长背着孩子跑来找顾方舟，希望他能给孩子治病，顾方舟却束手无策……这件事一直影响着他。我国当时每年有一两千万名新生儿，他知道早一天研发出疫苗，就能早一天挽救更多孩子的未来。

1957年，顾方舟正式开展脊髓灰质炎研究。从此，与脊髓灰质炎打交道成了他毕生的事业。当时，国际上存在两种疫苗技术路线。一种是灭活疫苗，也称为死疫苗，可以直接投入生产使用，但要打三到四针，每针价格几十块钱；另一种是减毒活疫苗，成本是死疫苗的千分之一，但因刚刚发明，药效、不良反应等都是未知数。深思熟虑后，顾方舟认为当时我国人口多、生产力欠发达，他认定，在中国消灭脊髓灰质炎，只能走活疫苗路线。就这样，顾方舟自己带人挖洞、建房，以他为组长的一支脊灰活疫苗研究协作组在昆明远郊的山洞搭起了疫苗实验室。疫苗在动物试验通过后，进入了更为关键的临床试验阶段。

按照顾方舟设计的方案，临床试验分为Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ三期，其中，第一期需要在少数人身上检验效果。面对未知风险，顾方舟义无反顾地喝下了一小瓶疫苗溶液。在经历吉凶难料的一周后，他的生命体征平稳，没有出现任何异常。但是，成人本身大多就对脊髓灰质炎病毒有免疫力，必须证明疫苗对小孩也安全才行。那么，找谁的孩子试验？顾方舟遇到了新的难题。于是，他做出了一个惊人的决定：瞒着妻子，给刚满月的儿子喂下了疫苗！实验室一些研究人员也做出了同样的决定：让自己的孩子参加了这次试验。经历漫长而煎熬的一个月，孩子们生命体征正常！第一期临床试验顺利通过。

1960年底，首批500万人份疫苗在全国11个城市推广开来。在投放了疫苗的城市，脊髓灰质炎流行高峰逐渐变弱。随着脊髓灰质炎疫情逐渐好转，顾方舟却在疫苗推广中发现新的问题：疫苗的储藏还有不小难度，而且孩子们都不喜欢打针吃药。经过反复试验，顾方舟和团队把打针吃药“变”成了吃“糖丸”，同时糖丸剂型比液体保存期更长，保存的难题也迎刃而解。

1990年，全国消灭脊髓灰质炎规划开始实施。

2000年，“中国消灭脊髓灰质炎证实报告签字仪式”举行，当时74岁的顾方舟作为代表，郑重签下了自己的名字。

从无疫苗可用到消灭脊髓灰质炎，顾方舟用40多年护佑中国儿童远离小儿麻痹症。面对如此成就，这位老爷爷却谦逊地说：我一生只做了一件事，就是做了一粒小小的“糖丸”。

（来源：功勋模范 | 顾方舟：我这一生，只做了一件事—新华网）



## 习题

### 简答题

1. 什么是病毒？与其他生物相比，病毒有哪些突出特点？



2. 病毒的大小一般如何？试用图示说明病毒的典型构造。
3. 简述病毒的增殖过程。
4. 什么是噬菌体、烈性噬菌体、温和噬菌体？
5. 试述噬菌体与人类实践的关系。
6. 举例说明噬菌体给发酵工业带来的危害，如何防止？

# 模块五 微生物营养

## 知识目标

1. 了解微生物细胞的化学组成及微生物生长所需的六大营养要素及其功能。
2. 理解微生物吸收营养物质的不同方式。
3. 熟悉微生物的不同营养类型及其划分依据。
4. 掌握微生物培养基配制的原则。

## 技能目标

1. 能够根据不同的需要来选择合适的培养基。
2. 能够根据培养基配制的原则调整培养基的成分。

## 任务一 了解微生物的营养要素

### 一、微生物细胞的化学组成

元素是构成微生物细胞的物质基础，和其他高等动植物细胞一样，微生物细胞中的元素也可分为主要元素（也称大量元素）和微量元素。主要元素包括碳、氮、氢、氧、磷、硫等，不同种类的微生物细胞主要元素含量不同（见表 5-1）。微量元素包括锌、锰、钠、氯、钼、硒、钴、铜、硼等。

表 5-1 微生物细胞中几种主要元素的含量（%）

元素	细菌	酵母菌	霉菌
碳 (C)	50	49.8	47.9
氮 (N)	15	12.4	5.2
氢 (H)	8	6.7	6.7
氧 (O)	20	31.1	40.2
磷 (P)	3	—	—
硫 (S)	1	—	—

组成微生物细胞的各种化学元素随菌龄和培养条件的变化而在一定范围内发生变化，如铁细菌、硫细菌和海洋细菌会含有较高的硫、铁、钠、氯等元素，而幼龄或在氮源丰富的培养基上生长的细胞含氮量也较高。

以上化学元素主要以有机物、无机盐和水的形式存在于细胞中。有机物主要包括蛋白质、糖、脂、核酸、维生素以及它们的降解产物和一些代谢产物等物质。

### 二、微生物营养要素及其功能

根据在微生物中的生理功能不同，可将营养要素分为六类：碳源、氮源、能源、生长因子、无机盐和水六大要素物质。

#### （一）碳源

凡是能供给微生物碳元素营养的物质都称为碳源。碳源的作用是构成微生物的细胞物质（如糖、脂、蛋白质等）或为机体提供维持生命活动所需的能源。

微生物能够利用的碳源种类非常多，碳源可分为无机碳源（CO<sub>2</sub> 或碳酸盐）和有机碳源（糖类、脂类、醇类、有机酸类、烃类等）两大类，不同营养类型微生物能利用的碳源

不同。

自养型微生物的碳源是  $\text{CO}_2$  或碳酸盐。但它们需要其他的化合物或光作为能源。

异养型微生物的碳源是有机碳化合物，同时也作为能源。糖类（葡萄糖、果糖、乳糖、淀粉、糊精等）是微生物最广泛利用的碳源，其次是醇类、有机酸类和脂类。糖类中单糖优于双糖，己糖优于戊糖；葡萄糖、蔗糖、淀粉通常作为培养微生物的主要碳源；少数微生物能够利用纤维素。

不同种类的微生物利用碳源的能力也不同，有的能广泛地利用多种不同类型的碳源物质，而有些微生物能利用的碳源物质则比较少，例如假单胞菌属中的某些种可利用多达 90 种以上的碳源物质，而甲烷氧化菌仅能利用甲醇或甲烷作为碳源物质。

## （二）氮源

构成微生物细胞物质或代谢产物中含氮元素来源的营养物质称为氮源。微生物细胞中氮元素主要组成核酸和蛋白质，对微生物的生长发育有重要作用，同时也会形成含氮元素的代谢产物，一般不提供能量。

能够被微生物利用的氮源物质也十分广泛，可分为无机氮源（氮气、氨、铵盐和硝酸盐等）和有机氮源（尿素、氨基酸、嘌呤和嘧啶等）。同一种微生物能够利用多种氮源，但对不同氮源的利用程度并不相同，需要根据不同的需要进行选择。固氮微生物能够利用氮气作为唯一的氮源合成细胞内的物质。大多数微生物能够利用简单的化合态的氮源，如铵盐、硝酸盐等，而有些微生物则只能利用活体中的有机氮。

实验室中常用的氮源物质有碳酸铵、硝酸盐、硫酸铵、尿素、牛肉膏、酵母膏、蛋白胨等，而生产上则常用黄豆饼粉、花生饼粉、鱼粉、蚕蛹粉、玉米浆、酵母粉等。

氮源也可分为速效氮源和迟效氮源两类。速效氮源是以无机氮源或蛋白质的降解产物形式存在的有机氮源，可以直接被微生物利用，如铵盐、硝酸盐、尿素、牛肉膏、蛋白胨、酵母膏等；迟效氮源是蛋白氮，必须水解后降解为胨、肽、氨基酸等才能被利用，如鱼粉、蚕蛹粉、黄豆饼粉等。速效氮源通常有利于菌体的生长，迟效氮源则有利于代谢产物的形成。

一些氮源被利用会引起培养基 pH 值的变化，需要在生产中予以注意，如以  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  等铵盐为氮源培养微生物时，由于  $\text{NH}_4^+$  被吸收，会导致培养基 pH 值下降，因而称其为生理酸性盐；而以硝酸盐（如  $\text{KNO}_3$ ）为氮源培养微生物时，由于  $\text{NO}_3^-$  被吸收，会导致培养基 pH 值上升，因而称其为生理碱性盐。

## （三）能源

能源为微生物的生命活动提供最初能量来源的营养物质或辐射能。

利用有机物或无机物中的化学能作为能源的微生物称为化能型微生物；吸收光能作为能源的微生物称为光能型微生物（见表 5-2）。

表 5-2 微生物的能源

能源	化学能 (化能营养型)	有机物, 化能异养微生物的能源, 同碳源
		无机物, 化能自养微生物的能源, 非碳源
	光能 (光能营养型)	光, 光能自养和光能异养微生物的能源

化能自养微生物有硝酸细菌、亚硝酸细菌、硫化细菌、硫细菌、氢细菌和铁细菌等, 是自然界中一类非常独特的微生物, 它们所利用的能源是一些还原态的无机物, 如  $\text{NH}_4^+$ 、 $\text{NO}_2^-$ 、S、 $\text{H}_2\text{S}$ 、 $\text{H}_2$  和  $\text{Fe}^{2+}$  等。

#### (四) 生长因子

生长因子是指微生物生长所必需而且需要量很小, 自身不能合成或合成量不足以满足生长需要的有机化合物。生长因子包括维生素、氨基酸、嘌呤和嘧啶及其衍生物等。狭义的生长因子一般仅指维生素。生长因子的主要功能是提供微生物的重要化学物质(蛋白质、核酸和脂质)、辅酶和辅基的组分和参与代谢。维生素一般会构成酶的辅酶或辅基, 缺乏会影响微生物的代谢。

缺乏合成生长因子的微生物称为营养缺陷型微生物。不需要生长因子, 能够在基础培养基上生长的微生物则称为野生型微生物。例如缺乏合成赖氨酸能力的微生物称为赖氨酸缺陷型, 必须在培养基中加入赖氨酸, 这种微生物才能生长和繁殖。酵母膏、玉米浆、肝浸液、麦芽汁或其他新鲜的动植物组织浸液中富含各种维生素和氨基酸, 可满足各类微生物对生长因子的需求。

#### (五) 无机盐

无机盐是微生物生长必不可少的一类营养物质, 是指为微生物细胞生长提供碳源、氮源以外的多种重要元素。它们在机体中的生理功能包括: ①构成微生物细胞的组分; ②作为酶活性中心的组成部分; ③维持生物大分子和细胞结构的稳定性; ④调节并维持细胞的渗透压平衡、控制细胞的氧化还原电位; ⑤作为某些自养微生物生长的能源物质等。微生物生长所需的无机盐主要包括磷酸盐、硫酸盐、氯化物以及含有钠、钾、钙、镁、铁等金属元素的化合物(见表 5-3)。

根据微生物对无机盐的需要量可将无机盐分为大量元素(需要浓度在  $10^{-4} \sim 10^{-3} \text{ mol/L}$ , 包括磷、硫、钾、镁、钙、铁)和微量元素(需要浓度在  $10^{-8} \sim 10^{-6} \text{ mol/L}$ , 包括锌、锰、钠、氯、钼、硒、钴、铜、钨、镍、硼等)。天然有机营养物、无机化学试剂、自来水、蒸馏水、普通玻璃器皿中通常混杂有足够的微量元素, 所以如果没有特殊原因, 在配制培养基时没有必要另外加入微量元素。

表 5-3 无机盐及其生理功能

元素	化合物形式 (常用)	生理功能
磷 (P)	$\text{KH}_2\text{PO}_4$ , $\text{K}_2\text{HPO}_4$	核酸、核蛋白、磷脂、辅酶及 ATP 等
硫 (S)	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , $\text{MgSO}_4$	含硫氨基酸 (半胱氨酸、假硫氨酸)、维生素的成分
镁 (Mg)	$\text{MgSO}_4$	己糖磷酸化酶、异柠檬酸脱氢酶、核酸聚合酶等活性中心组分, 叶绿素和细菌叶绿素成分, 固氮酶的辅助因子
钙 (Ca)	$\text{CaCl}_2$ , $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	某些酶的辅因子, 维持酶的稳定性, 芽孢和某些孢子形成所需, 建立细菌感受态所需
钠 (Na)	$\text{NaCl}$	细胞运输系统组分, 维持细胞渗透压, 维持某些酶的稳定性等
钾 (K)	$\text{KH}_2\text{PO}_4$ , $\text{K}_2\text{HPO}_4$	某些酶的辅因子, 维持细胞渗透压和电位差, 某些嗜盐细菌核糖体的稳定因子
铁 (Fe)	$\text{FeSO}_4$	细胞色素及某些酶的成分, 某些铁细菌的能量物质, 合成叶绿素、白喉毒素等所需

## (六) 水

微生物细胞中含量最多的是水, 占细胞鲜重的 70%~90%。一般低等微生物含水量高于高等微生物, 幼龄菌含水量大于老龄菌。水在微生物中的功能主要有: ①起到溶剂和运输介质的作用 (营养物质的吸收与代谢产物的分泌以水为介质); ②参与细胞内各种化学反应; ③水的比热高, 是热的良好导体, 能有效地吸收代谢过程中产生的热, 并及时地将热迅速散发到体外, 从而有效地控制细胞内温度的变化; ④保持充足的水分使细胞维持正常形态。

## 任务二 了解微生物的营养类型

根据微生物生长所需要的能源和碳源的不同, 可以将微生物的营养类型分为光能自养型、光能异养型、化能自养型、化能异养型四种类型 (见表 5-4)。

表 5-4 微生物的营养类型

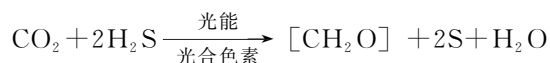
营养类型	能源	主要碳源	供氢体	代表菌
光能自养型 (光能无机营养型)	光能	$\text{CO}_2$	无机物	蓝细菌、紫硫细菌、绿硫细菌

续表

营养类型	能源	主要碳源	供氢体	代表菌
光能异养型 (光能有机营养型)	光能	有机物	有机物	红螺菌
化能自养型 (化能无机营养型)	化学能 (无机物)	CO <sub>2</sub>	无机物	硝化细菌、硫化细菌、铁细菌等
化能异养型 (化能有机营养型)	化学能 (有机物)	有机物	有机物	绝大多数细菌和全部真核微生物

## 一、光能自养型

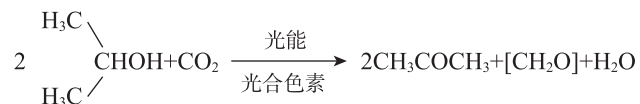
光能自养型微生物利用光能作为所需要的能源，以 CO<sub>2</sub> 为唯一碳源或主要碳源，以还原态无机化合物 (H<sub>2</sub>O、H<sub>2</sub>S、Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> 等) 作为还原 CO<sub>2</sub> 的供氢体。其代表微生物主要是一些蓝细菌、绿硫细菌、红硫细菌等少数微生物，它们含叶绿素或菌绿素等光合色素，能将光能转变成化学能，供机体直接利用。其光合作用可概括为：



## 二、光能异养型

光能异养型微生物以光为能源，产生细菌叶绿素和类胡萝卜素，呈粉红、紫红、橙、褐、绿等色，需要有机物作为碳源和供氢体。它们利用光能将 CO<sub>2</sub> 还原成细胞物质，但 CO<sub>2</sub> 不是唯一碳源。

例如：红螺菌利用异丙醇作为供氢体，进行光合作用，将 CO<sub>2</sub> 还原成细胞物质，并生成丙酮：



光能异养型微生物在生长时大多数需要外源的生长因子。

## 三、化能自养型

化能自养型微生物利用无机物氧化放出的化学能作为能源，以 CO<sub>2</sub> 或碳酸盐作为唯一碳源或主要碳源，常见的有硫化细菌、硝化细菌、氢细菌、铁细菌、和甲烷氧化细菌等。它们可以硫、还原态硫化物、氨、亚硝酸、氢气、二价铁、甲烷等作为能源和供氢体，还原 CO<sub>2</sub> 为细胞物质，广泛分布于土壤和水域中，对自然界的物质转换起重要作用。

## 四、化能异养型

化能异养型微生物的能量来自有机物氧化所产生的化学能，碳源和供氢体也是有机化合物。化能异养型微生物的碳源同时也是能源，自然界中的已知微生物大多数属于此类，包括大部分的细菌、全部真核微生物、原生动物和病毒。

化能异养型微生物根据生态习性又可分为腐生微生物和寄生微生物。其中腐生微生物利用无生命的生物物质，如毛霉、根霉等；而寄生微生物则是寄生在活体细胞中，利用活的有机体内的营养物质，如立克次氏体、噬菌体等。除此以外也存在中间类型，既可以腐生又可以寄生，称为兼性腐生或兼性寄生，如结核杆菌和痢疾志贺菌是以腐生为主，兼营寄生的兼性寄生菌。

以上四种营养类型的划分不是绝对的，微生物在不同条件生长时，往往可以相互转变。例如氢细菌，在完全无机的环境中进行自养生活，利用氢气氧化获得能量，将  $\text{CO}_2$  还原为细胞物质；而在供给合适的有机物时，它们便利用有机的碳源，则是化能异养型。

## 任务三 知道营养物质进入细胞的方式

营养物质能否被微生物利用的一个决定性因素是这些营养物质能否进入微生物细胞。细胞的表面为细胞壁和细胞膜，细胞壁阻挡大颗粒物质，而细胞膜则具有高度选择通透性。细胞膜的主要结构是磷脂双分子层，所以一般情况下物质的脂溶程度越高，越容易透过细胞膜，另外气体和小分子物质比较容易透过细胞膜。而许多大分子物质如糖类、氨基酸、核苷酸及许多细胞代谢产物都是非脂溶性的，要穿过细胞膜就需要载体蛋白及能量。营养物质进入细胞的方式主要有四种：单纯扩散、促进扩散、主动运输和基团移位。

### 一、单纯扩散

单纯扩散又称被动运输或被动扩散，是指物质以细胞膜内外浓度梯度为动力，不需载体蛋白，直接以扩散方式进入细胞。单纯扩散是一种最简单的物质跨膜运输方式，在扩散过程中不消耗能量，营养物质不能逆浓度运输。物质扩散的速率随细胞膜内外营养物质浓度差的降低而减小，直到膜内外营养物质浓度相同时才达到动态平衡。

相对分子量小、脂溶性、极性小的物质易通过单纯扩散进出细胞，包括水、脂肪酸、乙醇、甘油、苯、一些气体分子 ( $\text{O}_2$ 、 $\text{CO}_2$ ) 及某些氨基酸。

### 二、促进扩散

促进扩散也称异化扩散、协助扩散，是指物质借助存在于细胞膜上的特异性载体蛋白



协助，顺浓度梯度进入细胞的方式。与单纯扩散一样，促进扩散也是一种被动的物质跨膜运输方式，不消耗能量，不能进行逆浓度运输，运输速率与膜内外物质的浓度差成正比。

载体蛋白也称为透过酶或渗透酶，具有较高的专一性，只运输一种分子或一类分子，如葡萄糖载体蛋白只运转葡萄糖；转运芳香族氨基酸的载体蛋白只转运芳香族氨基酸。

通过促进扩散进入细胞的营养物质主要有氨基酸、单糖、维生素及无机盐等。促进扩散主要存在于真核微生物。例如，葡萄糖通过促进扩散进入酵母菌细胞；在原核生物中比较少见，但甘油可通过促进扩散进入沙门氏菌、志贺氏菌等肠道细菌细胞。

### 三、主动运输

主动运输是指物质通过细胞膜上特异性载体蛋白的运输，同时消耗能量，逆浓度梯度进入膜内的一种物质运输方式。

环境中的营养物质往往不那么丰富，因此主动运输是微生物吸收营养物质的一种主要方式，很多氨基酸、无机离子、有机离子和一些糖类（乳糖、葡萄糖、麦芽糖等）都是通过这种方式进入细胞的。

### 四、基团移位

基团移位与主动运输相似，有特异性载体蛋白参与并需要消耗能量，但基团移位有一个复杂的运输系统，被运输的物质在运输过程中发生化学变化。基团移位主要存在于厌氧型和兼性厌氧型细菌中，主要运输糖、脂肪酸、核苷、碱基等。

例如葡萄糖的基团移位运输，每输入一个葡萄糖分子，就要消耗一个 ATP 的能量。运送时依靠磷酸转移酶系统，即磷酸烯醇式丙酮酸—己糖磷酸转移酶系统，运输后葡萄糖会转变为磷酸化的葡萄糖。

### 五、四种运输方式的比较（见表 5-5）

表 5-5 四种运输方式的比较

项目	单纯扩散	促进扩散	主动运输	基团移位
特异载体蛋白	无	有	有	有
运送速度	慢	快	快	快
溶质运送方向	由浓至稀	由浓至稀	由稀至浓	由稀至浓
平衡时内外浓度	内外相等	内外相等	内部浓度高得多	内部浓度高得多
运送分子	无特异性	特异性	特异性	特异性
能量消耗	不需要	不需要	需要	需要
运送前后溶质分子	不变	不变	不变	改变

## 任务四 学会配制培养基

培养基是人工配制的适合微生物生长繁殖或积累代谢产物的营养物质，是进行科学研究和发酵生产的基础。

不同微生物细胞组成成分不同，所以营养需求也不同，对培养基的配制要求就不同。适合微生物生长繁殖的培养基与积累代谢产物的培养基也不同，可以根据不同的使用目的、培养要求来选择适当的培养基。

### 一、培养基类型

培养基种类繁多，目前已有数千种不同的培养基。根据其成分、物理状态和用途可将培养基分成多种类型。

#### （一）按营养物质来源不同划分

根据培养基中营养物质的来源，可将培养基分为天然培养基、合成培养基和半合成培养基。

##### 1. 天然培养基

天然培养基是以天然有机物配制而成的培养基。常用的天然有机营养物质包括牛肉膏、蛋白胨、酵母浸膏、麦芽汁、豆芽汁、玉米粉、马铃薯、麸皮、牛奶、血清等。天然培养基的优点是营养丰富、配制方便、成本低，适合于微生物的大规模培养；其缺点是化学成分复杂，且难以确定。

##### 2. 合成培养基

合成培养基是由化学成分完全了解的化学物质用纯净蒸馏水配制而成的培养基，如高氏Ⅰ号合成培养基和查氏合成培养基就属于此类。合成培养基的成分精确，重复性好，但相对天然培养基配料复杂，价格较贵，而且一般微生物在其中生长速度较慢，适于在实验室进行微生物营养代谢、分类鉴定、生物量测定、菌种选育及遗传分析等方面的研究工作。

##### 3. 半合成培养基

用一部分天然有机物质作为碳源、氮源和生长因子等，再加入适量的化学物质配制而成的培养基称为半合成培养基。这类培养基用途最广，大多数微生物都能在这类培养基上生长。

#### （二）根据物理状态划分

根据培养基的物理状态，可将培养基划分为固体培养基、半固体培养基和液体培养基

三种。这三种培养基中所含的凝固剂含量不同，理想的凝固剂应具备以下条件：①不被微生物分解利用；②在微生物生长的温度范围内保持固体状态；③凝固剂凝固点不能太低，否则将不利于微生物的生长；④在灭菌过程中不会被破坏；⑤透明度好，黏着力强；⑥配制方便且价格低廉。最常用的凝固剂是从海藻（海产石花菜）中提取的多糖物质琼脂，大多数微生物不能降解琼脂，能反复凝固，灭菌过程中不会被破坏，且价格低廉，在水中加热至 95℃ 时才开始熔化，熔化后的溶液降到 40℃ 时才开始凝固。

### 1. 固体培养基

在液体培养基中加入一定量的凝固剂（如 2% 左右的琼脂），在微生物培养温度下呈固体状态的培养基即为固体培养基。固体培养基为微生物的生长提供了一个固体的支持表面，在这个营养表面上微生物能形成单个菌落，可用于微生物分离、鉴定、计数、保藏及观察菌落的形态等。

### 2. 半固体培养基

半固体培养基中凝固剂含量较少，培养基中琼脂含量通常为 0.2%~0.8%，常用来观察微生物的运动性、菌种的分类鉴定及噬菌体效价测定等。

### 3. 液体培养基

液体培养基中不加凝固剂，常用于大规模工业生产，或在实验室进行微生物形态及代谢产物的检查等基础理论和应用方面的研究。在用液体培养基培养微生物时，可通过振荡或搅拌增加培养基的通气量，并使营养物质分布均匀。

## （三）按用途划分

培养基按照用途主要可分为基础培养基、选择培养基、加富培养基和鉴别培养基。

### 1. 基础培养基

各种微生物的营养要求虽不相同，但多数微生物所需的基本营养物质相同。按一般微生物生长繁殖所需要的基本营养物质配制的培养基即基础培养基，如牛肉膏蛋白胨培养基。基础培养基也可以作为一些特殊培养基的基础成分，再根据某种微生物的特殊营养需求，在基础培养基中加入所需营养物质。

### 2. 选择培养基

选择培养基是根据某些微生物对一些物理、化学因素的抗性而设计的一种培养基，在培养基中加入抑菌剂，抑制不需要的微生物的生长，有利于所需微生物的生长。例如添加青霉素的培养基能够抑制革兰氏阳性细菌的生长；在培养基中添加数滴 10% 酚，可抑制细菌和霉菌的生长，从而分离出放线菌；马丁氏培养基中添加有孟加拉红、链霉素等，可抑制细菌生长而分离真菌；又如，采用中性及偏碱性的培养基，有利于细菌和放线菌的生长，同时抑制了真菌的生长；分离醋酸菌，可在培养基中添加 1:500000~1:200000 浓度的结晶紫来抑制大多数革兰氏阳性细菌的生长。

### 3. 加富培养基

加富培养基也称增殖培养基或营养培养基，即在基础培养基中加入某些特殊营养物质

(如血液、血清、酵母浸液、动植物组织液、生长因子等)制成的一类营养丰富的培养基。这些特殊的营养物质特别有利于某种微生物的生长繁殖,使该种微生物在培养基中较其他微生物生长速度快,逐渐富集而占优势,从而容易分离。加富培养基类似于选择培养基,两者均可达到在混杂的菌种中分离某些微生物的目的。两者区别在于,选择培养基则一般是通过抑制不需要的微生物的生长,使所需要的微生物增殖,从而达到分离所需微生物的目的;而加富培养基是增加所要分离的微生物的数量,使其形成生长优势,从而分离到该种微生物。

#### 4. 鉴别培养基

鉴别培养基是用来鉴别不同类型微生物的培养基。在培养基中加入某些特殊化学物质,某种微生物在培养基中生长后产生的特殊代谢产物,可以与培养基中的特殊化学物质发生特定的化学反应,产生明显的特征性变化,根据这些变化,可将该种微生物与其他微生物区分开来。鉴别培养基可用于微生物的快速分离鉴定,或分离和筛选产生某种代谢产物的微生物菌种。例如伊红美蓝培养基中加入了伊红、美蓝,水中大肠菌群产酸,在该培养基上产生特征性金属光泽的深紫色菌落,可用于鉴别水中产酸的大肠菌群;酪素培养基中含有酪素,产胞外蛋白酶的菌株菌落周围会形成蛋白水解圈;产 $H_2S$ 的菌株会使 $H_2S$ 试验培养基中的醋酸铅产生黑色沉淀。

## 二、配制培养基的原则

### (一) 选择适宜的营养物质

微生物生长繁殖均需要培养基含有碳源、氮源、无机盐、生长因子、水及能源,但由于微生物种类繁多,不同微生物对营养物质的要求是不一样的,因此首先要明确培养哪种微生物;另外是获得菌体还是代谢产物;是一般的研究还是遗传学研究;是生理生化鉴定还是其他等,根据目的不同选择相应的培养基和培养基的成分。一般自养型微生物能利用简单的无机物合成自身需要的复杂的有机物,因此培养基完全可以由简单的无机物组成。而异养型微生物合成能力较弱,不能以无机碳作为唯一碳源,培养它们的培养基必须含有一种有机物。

微生物有四大类群:细菌、放线菌、酵母菌和霉菌。牛肉膏蛋白胨培养基适合培养细菌;高氏I号合成培养基适合培养放线菌;麦芽汁培养基多用来培养酵母菌;查氏合成培养基用于培养霉菌。

有些代谢产物的积累需要额外加入一些作为它们组成部分的元素或前体物质,如金霉素生产中要加入氯化物。

### (二) 营养物质浓度及配比合适

培养基中营养物质浓度合适时,微生物才能生长良好。过低的营养物质浓度不能满足微生物正常生长所需,浓度过高时则可能对微生物生长起抑制作用,例如高浓度糖、无机

盐、重金属离子等不仅不能维持和促进微生物的生长，反而起到抑菌或杀菌的作用。另外，培养基中各营养物质之间的浓度配比也会影响微生物的生长繁殖和代谢产物的形成和积累，其中碳氮比（C：N）的影响较为显著。例如，在微生物的谷氨酸发酵生产过程中，碳氮比为4：1时，菌体大量繁殖，谷氨酸积累少；碳氮比为3：1时，菌体繁殖受到抑制，谷氨酸产量则大量增加。

### （三）适宜理化条件

#### 1. 适宜的 pH 值

在设计培养基时，除营养物质之间的比例外，pH 值也是微生物生长繁殖和代谢积累很重要的一个环境指标。各类微生物生长繁殖或产生代谢产物的最适 pH 条件各不相同，一般来讲，细菌与放线菌适于在 pH7~7.5 范围内生长，酵母菌和霉菌通常在 pH4.5~6 范围内生长。在微生物生长繁殖和代谢过程中，由于营养物质被分解利用和代谢产物的形成与积累，会导致培养基酸碱度发生变化。如果不对培养基 pH 条件进行控制，往往导致微生物生长速度下降或代谢产物产量下降。因此，通常在培养基中加入 pH 值缓冲剂来维持培养基 pH 的相对恒定，常用的缓冲剂是磷酸盐类（如  $K_2HPO_4$  和  $KH_2PO_4$ ）组成的混合物，能够在 pH6.4~7.2 内起调节作用。另一种调节物质是  $CaCO_3$ ，因为它难溶于水，所以不会使培养基 pH 值过度升高，但如果微生物产酸，它可以不断进行中和，同时释放出  $CO_2$ ，将培养基 pH 值控制在一定范围内。

#### 2. 适宜渗透压

微生物的细胞膜是半透膜，当外部环境溶液渗透压低于细胞内部环境时，水分子会由外部环境进入细胞，导致细胞的膨胀甚至破裂；反之，当外部环境溶液渗透压高于细胞内部环境时，渗透会迫使水从细胞内部扩散出来，导致细胞壁与细胞膜分开（质壁分离）。因此，微生物只有在等渗溶液中（0.85%~0.9% NaCl 溶液）才能生长。所以在配制培养基的过程中，要控制好各营养物质的浓度。通常在培养基中适当加入氯化钠以提高渗透压。

#### 3. 经济节约

在满足微生物的生长与积累代谢产物的前提下，尽量设计和选用廉价且易于获得的原料作为培养基成分，特别是在大规模的工业化发酵生产时，培养基用量很大，降低原料的成本能够获得更大的经济效益。例如谷氨酸发酵生产，普遍使用淀粉水解的葡萄糖，其次用甜菜糖蜜、甘蔗糖蜜作为糖质原料来源。



我国糖尿病患者有 1 亿多人，是世界上糖尿病患者人数最多的国家。阿卡波糖是 II 型

糖尿病防治的重要品种。此前，阿卡波糖因生物合成途径复杂、发酵效价低、杂质组分多，其生产技术长期被国际制药巨头垄断，患者只能选择价格高昂的德国进口药物“拜唐苹”。

针对当时我国阿卡波糖生产技术空白的现状，从2000年起，郑裕国生物催化与微生物发酵创新团队和华东医药、杭州中美华东、华东医药集团新药研究院有限公司开展联合攻关，在微生物育种与发酵、产物提取与纯化、制剂设计与生产等方面开发了系列创新性技术，并在实施企业成功实现了阿卡波糖的产业化，相继建成年产50吨原料生产线和20亿片片剂生产线，生产能力国内第一。片剂以商品名“卡博平”大量进入临床使用，使用量占国产制剂份额的95%以上，华东医药集团借此成为全国最大的糖尿病治疗药物生产企业。同时，阿卡波糖片通过欧盟GMP认证，出口国际高端市场，打破了国外制药巨头长期技术和市场垄断。阿卡波糖原料和制剂生产关键技术及产业化项目获2014年度国家科技进步二等奖。该项目的经济效益和社会效益持续凸显，2020年“卡博平”片剂销售总额近30亿元。

“学术论文应该写在国家经济建设上，学问应该做在祖国大地上。”郑裕国常常对同事说，“我们的目标就是努力研发颠覆性生物制造技术，并利用这些技术在传统生物产业中实现颠覆性创新，从而使得相关联的传统生物产业获得新生，在为百姓健康谋取福泽的同时，起到减排增效、节省资源和保护生态环境的作用。”

(摘自 [https://m.thepaper.cn/baijiahao\\_15138534](https://m.thepaper.cn/baijiahao_15138534) 【天南地北象山人】郑裕国：情怀注故土)



## 习 题

### 一、名词解释

生长因子 营养缺陷型 培养基

### 二、选择题

- 下列关于微生物营养物质的叙述中正确的是 ( )
  - 同一物质不可能既作为碳源，又作为能源
  - 凡是碳源都能提供能量
  - 无机氮源也可以提供能量
  - 除水以外的无机物仅提供无机盐
- 要将土壤中的自生固氮菌与其他杂菌分离出来，应将它们接种到 ( )
  - 加入氮源加入杀菌剂的培养基上
  - 不含氮源但加入杀菌剂的培养基上
  - 加入氮源但不加杀菌剂的培养基上
  - 不含氮源，不加杀菌剂的培养基上

### 三、判断

1. 微生物中大量元素更重要，而微量元素并不重要。( )
2. 所有碳源都能提供能量。( )
3. 化能异养型微生物的碳源同时也是能源。( )
4. 同一种微生物生长和代谢所需要的培养基都是相同的。( )
5. 主动运输既需要载体，又需要消耗能量。( )
6. 合成培养基营养成分丰富，所以微生物在合成培养基上生长速度快。( )

### 四、简答题

1. 微生物的营养物质有哪几大类？各有什么作用？
2. 微生物有哪几种营养类型？是怎样划分的？
3. 培养基的配置应遵循哪几个原则？
4. 微生物培养基有哪些类型？主要的用途是什么？

### 五、技能题

1. 高氏 I 号合成培养基有哪些成分？每种成分分别对应了什么营养物质？
2. 今天的实验需要配制 1500mL 营养琼脂培养基，请计算培养基中每种物质需要取多少？写出制作培养基的简要步骤。

# 模块六 微生物生长与控制

## 知识目标

1. 了解微生物生长的概念。
2. 了解微生物群体生长的规律和特点。
3. 理解环境条件中物理、化学因素对微生物生长的影响。
4. 了解微生物菌种保藏、选育、复壮的方法。

## 技能目标

1. 学会微生物生长量测定的方法。
2. 能够在生产科研中运用微生物生长曲线的规律。
3. 能够合理运用环境因素对微生物的生长进行控制。



## 任务一 了解微生物的生长及其测定方法

### 一、微生物的生长

微生物的生长包含两层含义：一是个体生长，二是群体生长。个体生长是指一个微生物细胞在合适的外界环境条件下，吸收营养物质进行新陈代谢，当同化作用的速度超过异化作用的速度时，其原生质的总量（质量、体积、大小）增加的过程。如果个体生长是平衡的，各细胞组分按恰当的比例增长，达到一定程度后就会发生繁殖，从而引起个体数目的增加，这时，原有的个体就发展成了一个群体。随着群体中每个个体的进一步生长，再进入繁殖，就引起了这一群体的生长，如此反复进行，这就是群体的生长。

除了特定的目的以外，在微生物的研究和应用中，只有群体的生长才有实际意义，因此，在微生物学中提到的“生长”，均是指群体生长。

### 二、微生物生长的测定

微生物生长的测定也同样是指对微生物群体的生长量的测定。单细胞微生物如细菌和一些酵母菌，可测定细胞数量，也可测定细胞的质量；丝状真菌则以菌丝的质量或菌丝的长度为测定指标，属于直接测定法。还有的方法是通过测定细胞的组分变化和代谢活动等，属于间接测定法。以下介绍几种常用的微生物生长量的测定方法。

#### （一）显微计数法（也称血球计数板法）

血球计数板（见图 6-1）由一块特制玻片制成，比普通载玻片厚，上面刻有特定大小的计数室，其长和宽各为 1mm，深度为 0.1mm，体积为  $0.1\text{mm}^3$ ，供微生物计数用。将一定稀释度的菌悬液加到计数室中，盖上盖玻片，在显微镜下计算细胞个数，再进行推算就可得到 1mm 样品中所含的菌体数，这就是显微计数法。

显微计数法操作简单、快速，适用于单细胞的微生物测定，但无法区分死菌和活菌，因此测定的是总菌数。

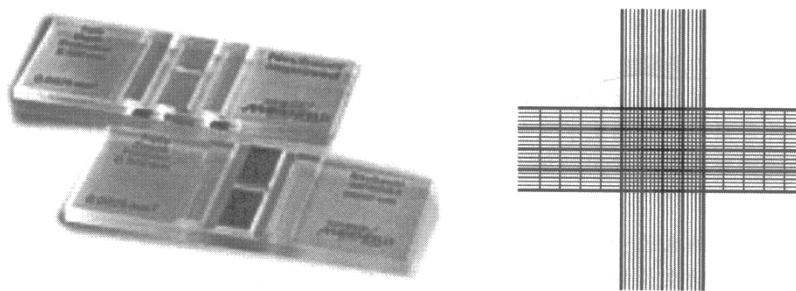


图 6-1 血球计数板和血球计数板记数网的分区与分格

## （二）平板菌落计数法

平板菌落计数法是通过测定样品在培养基上形成的菌落数来间接测定活菌数的一种方法。一般先将被测菌体进行 10 倍梯度稀释，细胞充分分散成单个细胞，取一定体积的稀释菌液，涂布于固体培养基平板上（涂布平板法），或将冷却至 45℃ 的固体培养基倒入一定体积的稀释菌液均匀混合（倒平板法），经保温培养后，固体培养基上可形成肉眼可见的菌落，即一个菌落代表一个细胞，计算菌落数，根据稀释倍数与取样量即可推算出 1mL 原菌液的含菌数。但在实际工作中，细胞可能无法完全分散成单细胞，所以一个单菌落可能来自 2~3 个或更多的细胞，因此平板计数法结果可能偏低。

## （三）比浊法

比浊法的原理：当光线通过微生物菌悬液时，一部分会被菌体散射和吸收，从而使光线的透过量降低。同时，在一定浓度范围内，悬液中细胞浓度与透光度成反比，与光密度成正比。一般利用分光光度计在 450~650nm 波长进行比色测定。单细胞微生物在一定范围内光吸收值与细胞的数量成正比，因此可以测定菌悬液的总菌数。该法除受菌体浓度影响外，还与细胞大小、形态、培养液成分有关，因而需通过显微计数法或平板菌落计数法制作标准曲线。

比浊法的优点是简单、快速，广泛用于微生物生长速率的测定。但其缺点是菌悬液颜色不能过深，也不能混杂其他物质，菌悬液的浓度应在  $10^7$  个/mL 以上。

## （四）干重法

如果培养物中没有除菌体外的固体颗粒，且菌体浓度较高，即可采用重量测定的方法。干重法即测定单位体积的培养物中菌体干物质的质量。该法既可以测定单细胞的微生物，也可以测定多细胞的微生物，菌丝体的微生物尤其适合用该方法进行测定。一般将培养液离心或过滤后，用清水洗涤 1~5 次，除去培养基成分，固体物质置于干燥箱中 100~105℃ 烘干或置于真空干燥箱 60~80℃，也可用红外线烘干至恒重，然后称重。一般干重为湿重的 10%~20%。若是固体培养的培养物，可先加热融化琼脂或明胶等物质，然后过滤出菌体。

## （五）其他

除以上常用的微生物生长量测定的方法以外，还可以测定菌体的体积、菌丝生长的长度，也可以测定菌种细胞内的化学成分，如含氮量、DNA含量等。另外还有各种形式的微生物检测仪器设备，如全自动微生物快速检测系统，可在数小时内获得检测结果。

# 任务二 了解微生物的生长规律

微生物的生长规律，包括微生物个体生长规律和群体生长规律两个层次。

## 一、微生物细胞的个体生长和同步生长

微生物细胞个体极其微小，它的个体生长在外观上会由小变大，同时在细胞内会发生极其复杂的生物化学变化和细胞学变化，细胞物质会增加，同时还包含组建细胞结构和细胞器。研究单个细胞的生长是非常困难的，目前的方法有两种：一种是利用电子显微镜观察细胞的超薄切片，另一种是采用同步培养技术对获得的同步生长细胞群体，通过研究该群体的生物化学特征，来了解单个细胞在每个阶段的生长规律。

微生物的细胞群体中，每个细胞一般都处于生长的不同阶段，生长和分裂是不同步的。能使培养的微生物比较一致，生长、发育、分裂在同一阶段上的培养方法称为同步培养法。微生物群体中每个细胞都处于同样的生长阶段，同步分裂，这种生长方式即称为同步生长。

采用同步培养法就可以用研究群体的方法来研究个体水平上的问题。同步培养法很多，最常用的有以下两种。

### （一）机械法（又称选择法）

#### 1. 过滤分离法

不同生长阶段的细胞，其个体大小不同，应用各种孔径大小不同的微孔滤膜，可将大小不同的细胞分开。相同大小的细胞一般处于同样的生长阶段，再进行培养，即获得同步培养的细胞。

#### 2. 密度梯度离心法

用一定的介质在离心管内形成连续或不连续的密度梯度，将细胞混悬液或匀浆置于介质的顶部，通过离心就可使大小不同的细胞群体在一定程度上分开，然后用同样大小的细胞进行培养便可获得同步培养物。

### （二）诱导法（又称环境条件控制法）

诱导法主要通过控制环境条件如温度、营养物质等来诱导微生物的同步生长。

## 1. 温度控制

最适生长温度下微生物的生长和分裂速度最快。将微生物的培养温度控制非最适温度条件下培养一段时间,然后将培养温度调整至最适生长温度,交替进行,大多数细胞就会进行同步分裂,通过这种方法即可获得同步培养的细胞。

## 2. 培养基成分控制

限制培养基中的营养成分如碳源、氮源、生长因子进行培养,使微生物生长缓慢,或只能进行一次分裂而不能继续生长,然后转入营养丰富的培养基中,就会使微生物进入同步生长。也可以在培养基中加入抗生素抑制蛋白质合成(如氯霉素),诱导一段时间后再转到另一种完全培养基中培养,亦可以得到同步培养物。

不论采用什么方法,获得的同步生长并不能无限地维持,最多能维持2~3个世代,又逐渐转变为随机生长。

## 二、微生物细胞的群体生长规律

### (一) 单细胞微生物的典型生长曲线

将少量细菌或酵母菌,接种于一定容积的液体培养基中,在适宜的条件下培养时,其生长过程会具有一定的规律性。以培养时间为横坐标,以细胞数目的对数为纵坐标,所绘制的有规律的曲线称为单细胞微生物的典型生长曲线。单细胞微生物的生长曲线,大致可划分为四个阶段(见图6-2)。

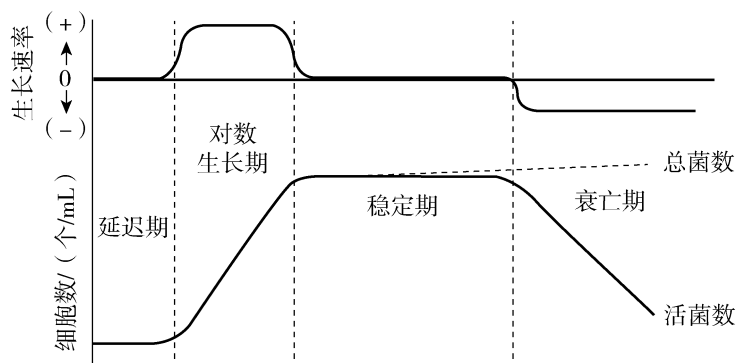


图 6-2 单细胞微生物的典型生长曲线

#### 1. 延迟期(又称延滞期、迟滞期、调整期)

将单细胞微生物接种到新鲜培养基,由于要适应新的生长环境,因此在一段时间里并不分裂,细菌的数量维持恒定,或增加很少,这个时期称为延迟期。此期微生物细胞的生理特点:①生长速率常数等于零,细胞数目不增加但个体体积增加;②菌体内代谢非常活跃,产生相应的酶、辅酶、ATP、核酸及某些中间代谢产物为细胞分裂做准备;③对外界不良条件如NaCl溶液浓度、温度和抗生素等反应敏感。

不同细菌的延滞期长短不同，除与菌种特性有关以外，接种量、菌龄、培养条件等都会影响延滞期的长短。接种量大、选用对数生长期的微生物做种子都可以缩短延滞期。另外，如果使培养基营养丰富、条件适宜，且成分与种子培养基尽量一致，则延迟期较短。

## 2. 对数生长期（也称指数生长期）

对数生长期是细菌细胞快速生长，细胞数目以几何级数增加的时期，又称指数生长期。细胞分裂一次所需要的时间称为代时。单位时间内细胞繁殖的代数即为生长速率。在对数生长期的特点：①细胞的代时最短，生长速率最高；②细胞进行平衡生长，健壮、整齐、大小比较一致、生活力强；③酶系活跃，代谢旺盛，对外界环境因素敏感。

对数生长期是研究菌体的形态、代谢、生理以及革兰氏染色菌种鉴定的最佳时期；对数生长期后期的细胞也适合作为发酵工业的“种子”，可缩短延迟期。

## 3. 稳定期

随着细胞在对数生长期快速生长繁殖，消耗了培养基中大量的营养物质，代谢产物逐渐积累而对细菌产生毒性，pH值也会变化而不利于菌体生长，细胞繁殖速率减小，死亡率增大，最终繁殖速度和死亡速度相等，生长速率逐渐下降直至为零，此时期称为稳定期。

在稳定期，细胞从生理上的年轻转为衰老，细胞开始合成糖原、淀粉粒、异染颗粒和脂肪粒等贮藏物；多数芽孢杆菌开始形成芽孢；一些代谢产物特别是抗生素等次生代谢产物主要在此期间大量合成。

在发酵工业中，许多发酵产品主要在此阶段形成和积累。如果以菌体为终产品，稳定期也是最佳的收获期，因此可尽量延长这一时期。在发酵工业中，连续流加碳源和氮源，移走积累起来的代谢物，改善培养条件，都可延长稳定期，提高产量。

## 4. 衰亡期

在稳定期后，培养基中的营养成分逐渐耗尽，代谢过程中的有害物质也越来越多，环境的pH值等条件越来越不适合细胞的生长，分解代谢大大超过合成代谢，此时菌体大量死亡。当死亡的速度大于繁殖的速度时，则群体中活细胞数开始下降。衰亡期细菌呈多形态，出现不规则的畸形或衰退型，一些细胞自溶，革兰氏染色反应的阳性菌可能变成阴性菌。此期一些微生物释放对人类有用的次生代谢产物，包括抗生素或酶等，芽孢菌释放芽孢大多也在这一时期。在发酵工业上，必须监测好衰亡期，在适当的时候结束发酵。

微生物生长曲线描述了微生物在一定环境中生长、繁殖和死亡的规律，它可作为营养物质和环境因素对生长繁殖影响的理论研究指标，也可以作为调控微生物生长代谢的依据，指导发酵生产。

## 任务三 了解环境对微生物生长的影响与控制

微生物的生长和繁殖除了与营养因素有关以外，还包括环境条件。环境条件主要包括物理、化学和生物的因素。本章主要探讨对微生物生长的影响较大的物理因素和化学因素。

### 一、温度

#### (一) 微生物生长温度三基点

温度是影响微生物生长的最重要的环境因素之一。每种微生物的生长都有一定的温度范围，在适宜的温度范围内，微生物能够正常地进行生长繁殖，而过高或过低的温度都会对微生物的生长产生不良影响。温度过低，原生质处于凝固状态，酶的活性也很低；温度过高，微生物细胞内的核酸、蛋白质等会发生变性，生物活性降低，细胞功能下降，甚至导致死亡。所以各种微生物都有三种基本温度，也称为微生物生长温度三基点：最低生长温度、最适生长温度、最高生长温度。

最低生长温度是指微生物能进行繁殖的最低温度限度。在这个温度下微生物生长很缓慢，低于这个温度则完全停止生长。最适生长温度是指微生物分裂代时最短或生长速率最高的温度。但是最适生长温度不同于最适发酵温度，也不同于积累产物的最适温度。例如，嗜热链球菌的最适生长温度是 37℃，最适发酵温度是 47℃，而积累产物的最适温度是 37℃。温度进一步升高，微生物的生长速率又会降低，达到最高生长温度。最高生长温度是指微生物生长繁殖的最高温度界限。高于此温度，则会导致微生物死亡。这种导致微生物死亡的最低温度界限称为致死温度。

#### (二) 微生物生长的三种温度类群

不同微生物具有不同的生长温度三基点，根据微生物生长的温度范围可将微生物分为低温型微生物、中温型微生物、高温型微生物三大类（见表 6-1）。

表 6-1 微生物的生长温度类型

微生物类型	生长温度/℃			主要分布区域
	最低	最适	最高	
低温型微生物	-10	10~20	30	地球两极、海洋、冷藏食品

微生物类型		生长温度/°C			主要分布区域
		最低	最适	最高	
中温型微生物	室温型	10	25~30	45	土壤、水、空气、人和动植物体内和表面
	体温型		35~40		
高温型微生物		25	50~60	80	温泉、海底火山口、堆肥、土壤表层、加热器

低温型微生物也称嗜冷微生物，可在较低的温度下生存，大多分布于地球的两极地区或海洋深处，有的分布在冷泉，能够引起冷藏、冷冻食品腐败。它们的细胞膜中不饱和脂肪酸含量高，在低温下仍可维持半流动性，能够进行物质运输，同时细胞中酶在低温下依然有催化活性。

中温型微生物也称嗜温微生物，又可分为室温型和体温型两种，自然界绝大多数微生物属于这种类型。室温型微生物适于在 25~30°C 条件下生长，分布于空气、土壤、水、植物体表或体内。体温型微生物多为人或温血动物的寄生或兼性寄生病原菌，最适生长温度与其宿主体温接近，在 35~45°C 之间，人体寄生菌的最适生长温度为 37°C 左右。

高温型微生物又称嗜热微生物，生长的温度范围在 25~80°C，多存在于温泉或堆肥中，如嗜酸硫杆菌属、硫化杆菌属、甲烷杆菌属等。一些温泉中的细菌可在接近 100°C 的高温中生长。PCR 技术中使用的 Taq DNA 聚合酶就是从温泉的水生栖热菌中分离得到的，在 94°C 还能保持稳定。

### （三）利用温度控制微生物的生长

在实际的生产生活中，可通过低温或高温的方法来抑制和杀死有害微生物。低温保藏只能抑制微生物的生长，而不能杀死微生物。加热可以使蛋白质变性，从而达到消灭微生物的目的。用物理化学因子使存在于物体中的所有微生物永久地丧失活力称之为灭菌。各种微生物都有一定的耐热性，细菌的芽孢耐热性最强，例如肉毒素梭菌的芽孢在干热条件下需要 120°C，经过 120min 才能被杀死，而湿热条件则需 4~20min。所以灭菌是否彻底，一般是以杀死细菌的芽孢作为标准。

灭杀微生物的常用方法是高温，例如干热灭菌和湿热灭菌。

#### 1. 干热灭菌

干热灭菌有两种方法，一种是火焰灭菌法，另一种是干热空气灭菌法。

（1）火焰灭菌法 火焰灭菌法也称为灼烧法，即直接用火焰灼烧的灭菌方法，适用于金属器械（如接种环、镊子、剪子等）、玻璃瓶口或试管口，也可以用于处理废弃的污染物品、实验材料等。这种方法简便、快速、彻底，但使用范围有限。

（2）干热空气灭菌法 干热空气灭菌法也称干烤法，是在干燥箱中利用高温干燥空气灭菌，常用的灭菌条件为 160°C，2h，适用于平皿、三角瓶、试管等玻璃器皿及保藏微生物用到的沙土、石蜡油、碳酸钙等物质的灭菌，并且对新制作的试管和三角瓶的棉塞具有

固定形状的作用。不耐热的物品如橡胶、塑料制品、培养基等不能采用干热空气灭菌法。

## 2. 湿热灭菌

(1) 煮沸法 物品在水中煮沸至  $100^{\circ}\text{C}$ ，保持  $5\sim 10\text{min}$ ，可杀死微生物的营养细胞；保持  $1\sim 3\text{h}$ ，可杀死芽孢；在水中加入  $1\%\sim 2\%$  碳酸氢钠，可使沸点达到  $105^{\circ}\text{C}$ ，提高杀菌力的同时，能够防止金属生锈。该法适合于注射器、食具、搪瓷、金属等物品的消毒。

(2) 巴氏消毒法 巴氏消毒法是以法国微生物学家巴斯德的名字命名的，在过去是一种低温消毒法。这种方法能消灭食品中的病原菌同时保持食品的营养物质和风味。常用的处理条件有  $63^{\circ}\text{C}$  处理  $30\text{min}$  和  $72^{\circ}\text{C}$  处理  $15\text{s}$ 。该法适合于不宜进行高温灭菌的食品，如牛奶、果汁、啤酒、果酒、蜂蜜等。现在的瞬时高温巴氏消毒法是牛奶常用的消毒方法，处理条件为  $141^{\circ}\text{C}$ ，仅需  $2\text{s}$ 。

(3) 间歇灭菌法 该方法是在常压下，反复多次利用流通蒸汽来杀死细菌的繁殖体和芽孢。将物品放在普通蒸笼或阿诺氏灭菌器中，用  $100^{\circ}\text{C}$  的水蒸气处理  $15\sim 30\text{min}$ ，灭活细菌的繁殖体；然后将物品取出，放在  $37^{\circ}\text{C}$  下恒温培养箱中培养过夜，使未死亡的芽孢萌发成为繁殖体；第二天再用同样的方法处理。反复三次，可杀灭物品中所有的芽孢和繁殖体。该方法适合不耐高温的培养基进行灭菌，也适合缺乏高压蒸汽灭菌设备时的灭菌。

(4) 高压蒸汽灭菌法 高压蒸汽灭菌法利用的是高温水蒸汽进行灭菌，常用的灭菌条件为  $121^{\circ}\text{C}$ ， $20\sim 30\text{min}$ 。高压锅中，水的沸点是随着水蒸汽压力增高而增高的，因此高压蒸汽灭菌时关键的步骤是排除灭菌锅中的冷空气。如果未排净锅内的冷空气，则同一压力下，温度会低于饱和蒸汽的温度。例如：在  $0.105\text{MPa}$  下，空气完全排除的饱和水蒸汽温度为  $121^{\circ}\text{C}$ ，而空气排除  $1/2$  的灭菌锅内温度只有  $112^{\circ}\text{C}$ 。高压蒸汽灭菌适合于耐高温、高压的物品灭菌，包括一般培养基、生理盐水、金属器具、工作服等。

## 二、氧气

氧气对微生物的生命活动有着非常重要的影响。按照微生物与氧气的关系，可把微生物分为两大类：好氧菌和厌氧菌。好氧菌又分为专性好氧菌、兼性厌氧菌和微好氧菌；厌氧菌又可分为专性厌氧菌和耐氧厌氧菌（见图 6-3）。

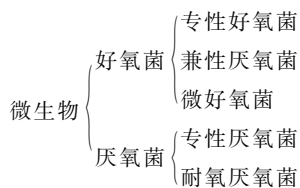


图 6-3 微生物与氧气的关系

### (一) 专性好氧菌

专性好氧菌必须在有氧气的地方才能生长，包括大多数的真菌和部分细菌，如黑曲霉、米曲霉、枯草芽孢杆菌、铜绿假单胞菌等。专性好氧菌有完整的呼吸链，以分子氧为



最终氢受体，细胞内有超氧化物歧化酶和过氧化氢酶。

## （二）兼性厌氧菌

兼性厌氧菌在有氧和无氧条件下都能生长，但在有氧条件下生长更好，细胞中含有超氧化物歧化酶和过氧化氢酶，包括许多酵母菌和细菌，例如酿酒酵母、大肠杆菌等。它们在有氧时进行呼吸产能，在无氧时进行发酵或无氧呼吸产能。

## （三）微好氧菌

微好氧菌是一类只能在较低的氧分压（1000~3000kPa，正常大气压为20kPa）下才能正常生长的微生物。微好氧菌通过呼吸链产能，以分子氧作为最终氢受体。这类微生物在无氧条件下不能生长，在正常空气中生长不好，例如霍乱弧菌、发酵单胞菌属等。

## （四）专性厌氧菌

专性厌氧菌只能在没有氧气的环境下生长，氧气对其有毒性，如肉毒梭状芽孢杆菌、双歧杆菌、嗜热梭状芽孢杆菌等。它们的细胞内缺乏超氧化物歧化酶和细胞色素氧化酶，大多数还缺乏过氧化氢酶，生命活动所需能量来源于发酵、无氧呼吸、循环光合磷酸化等。

## （五）耐氧厌氧菌

耐氧厌氧菌是一类能够在分子氧存在下进行厌氧生活的微生物，它们的生长不需要氧气，氧气对它们也没有毒性。耐氧菌没有呼吸链，仅依靠发酵产能，细胞内含有超氧化物歧化酶和过氧化物酶，没有过氧化氢酶，例如乳酸杆菌、乳链球菌等。

# 三、干燥

微生物的生命活动需要水。干燥条件下，多数微生物细胞失水而代谢停滞甚至死亡。各种微生物对干燥的耐受力不同，一般来说，细菌生长的最低水活度  $A_w$  为 0.90、酵母菌为 0.88、霉菌为 0.80。个别的耐高渗酵母，如鲁氏酵母在  $A_w$  为 0.60 条件下依然能够生长。

在生产生活中，常用烘干、晒干或熏干等手段来保存食品 and 食品发酵工业原料，在实验室则利用真空冷冻干燥法保存菌种。

# 四、渗透压

微生物的细胞膜是选择性透过膜，细胞膜内溶解有一些物质，具有一定的渗透压。微生物细胞外溶液的溶质浓度如果与细胞内溶质浓度相等，则细胞处于等渗溶液中，微生物的代谢活动正常。如果细胞外溶液溶质浓度大于细胞内溶质浓度，即高渗溶液，则微生物

细胞就会脱水，发生质壁分离甚至死亡。微生物细胞内溶质浓度大于细胞外环境中溶质浓度，即低渗溶液，微生物细胞会吸水膨胀甚至破裂。

食品工业中经常用高浓度糖或盐来保存食品，如用盐腌渍的蔬菜、肉类，盐的浓度通常为 5%~30%；用糖腌渍的果脯、蜜饯等，糖浓度通常为 30%~80%。

## 五、pH 值

环境中的 pH 值对微生物的主要影响：引起细胞膜的电荷变化，从而影响微生物对营养物质的吸收；影响代谢过程中酶的活性；引起代谢途径的改变；改变营养物质离子化程度及有害物质的毒性。因此微生物生长也有一个最适生长的 pH 值范围，即为最适 pH 值，不同微生物的最适 pH 值也不同。大多数细菌的最适 pH 值为 7.0~7.6，放线菌为 7.5~8.5，为偏碱性环境；而霉菌为 4.0~5.8，酵母菌为 3.8~6.0，为偏酸性环境。少数微生物可在 pH 值低于 2 和高于 10 的极端环境中生长。

微生物生长的最适 pH 值与积累发酵产物的最适 pH 值并不一定完全相同，这对发酵生产非常重要，在发酵过程中应根据需要调整。例如黑曲霉最适生长 pH 值为 5.0~6.5，在 2.5~6.5 范围有利于产柠檬酸，而在 7 左右以合成草酸为主。

发酵过程中由于代谢产物的积累或营养物质的消耗，培养基的 pH 值会发生变化，因此要及时调整。过酸时可加入氢氧化钠、碳酸钠等碱进行中和，过碱时则可加入盐酸、硫酸等酸性物质，这是直接的调整方法。另外可以通过加入碳源或氮源等营养物质和调节通气量等方法间接进行调节。过酸时可加入适当氮源，如尿素、硝酸钠、蛋白质，提高通气量；过碱时可加入适当碳源，如糖、乳酸、油脂等，降低通气量。

## 六、辐射

电磁辐射包括可见光、红外线、紫外线、X 射线等。波长越短，含有的能量越高。辐射灭菌是利用电磁辐射产生的电磁波杀死微生物的方法。

紫外线是非电离辐射，可明显杀死微生物，是强杀菌剂，波长在 265~266nm 的紫外线杀菌力最强，但其穿透力弱，不能透过普通玻璃和不透明的物体，所以常用于空气和物体表面的消毒。

X 射线、 $\gamma$  射线、 $\alpha$  射线和  $\beta$  射线属于高能电磁波，波长更短，可使被照射的分子发生电离，具有较强的穿透力和杀菌效果，能量大、可灭杀物品内部的微生物，辐射灭菌方法简便、不污染环境，多用于医疗卫生用品的消毒灭菌或食品的保藏。

# 任务四 微生物的菌种选育

食品发酵工业中菌种的来源一般有以下三种途径，一是根据信息向菌种保藏机构、工

厂或科研单位直接索取或购买，可直接用于生产；二是从自然界中分离出新菌株，再进行遗传改良；三是对现有的菌种进行遗传改造。自然界中正常的微生物，依靠其代谢调节系统，趋向于快速生长和繁殖，但在发酵生产中，大多数培养微生物的目的是使其积累大量的代谢产物，因此需要采用育种的方法来打破自然界微生物原有的正常代谢途径。另外，生产上一些原有的生产菌株也可以通过育种的方法获得生产性能更加优异、产量更高的菌株。

## 一、自然界中新菌种的分离筛选

新菌种的分离筛选大致可分为采样、增殖培养、纯种分离、生产性能测定等步骤。

### （一）采样

根据筛选的目的、微生物的分布概况及菌种的主要特征与外界环境关系等进行综合分析来决定采样地点。土壤是微生物的发源地和大本营，1g土壤中含有微生物约几百万甚至几十亿个。如果不知道生产某种产品的微生物种类或特性，一般都可以土壤为样品进行分离。土质不同，微生物种类也不同。一般有机质较多的土壤，微生物的数量也多。在园田土和耕作过的土壤或中性偏碱性的土壤中，以细菌和放线菌为主；在有很多动植物残骸的土壤和沼泽地或偏酸性的土壤中，酵母菌和霉菌较多。

离表面5~15cm处土壤中微生物含量最多，用无菌刮铲或土样采集器取此深度土壤几十克，放入预先消毒好的牛皮纸袋或塑料袋中，记录采样时间、地点、环境情况等，以备考证。一般芽孢杆菌、放线菌和霉菌的孢子耐受不良环境的能力较强，因此不太容易死亡。但由于采样后的环境条件与天然条件有着不同程度的差异，微生物数量和种类都可能会变化，所以应尽快处理。

除土壤以外，采样的对象也可选择植物、腐败物品或某些水体等。

### （二）增殖培养

如果收集到的样品中目的菌种含量不多，直接分离有困难，就需要设法增加该菌种的数量，这种人为的方法就称为增殖培养或富集培养。增殖培养就是依据菌种特性，人为地加入一定的限制性因素，如特定的营养、培养温度、pH值、抗生素等，使所需类型的菌种在数量上占优势，以便将它们分离出来。如果一次增殖数量还太少，可以再次或多次进行增殖培养，直到达到分离的要求。如果样品中所需的菌种本来就比较多，就可以直接进行纯种的分离。

### （三）纯种分离

通过增殖培养不能得到目的菌种的纯种，因为样品还会混有一些具有相同特性的其他微生物，或抗逆性较强的微生物孢子、细菌的芽孢等。因此增殖培养后就必须进行分离纯化，获得纯种。常用的纯种分离方法有划线分离法、稀释分离法等。

#### (四) 生产性能测定

要得到较为理想的生产菌株，还需进行一系列有关的生产性能测定，尽可能筛选出性能稳定、符合生产要求的高产菌株。

### 二、微生物的诱变育种

诱变育种是指利用物理或化学因素处理微生物细胞群体，促使其中少数细胞中的遗传物质发生变化，从而引起微生物遗传性状改变，然后设法从群体中筛选出少数性状优良的突变菌株。

用来进行诱变实验的菌株称为出发菌株。作为出发菌株应对诱变剂敏感，变异幅度大。出发菌株的来源：①从自然界分离得到的野生型菌株对诱变剂敏感，易发生正向突变；②生产中选育出的自发突变的菌株，也属于野生型菌株，对诱变剂的敏感性也很好；③已经诱变处理过的高产菌株，继续诱变不一定能继续提高产量，易出现副突变，继续提高产量较难，可通过回复突变或基因重组后，再作为诱变育种的出发菌株，常会收到良好的效果。

常用的物理诱变剂有紫外线、 $\alpha$ 射线、 $\gamma$ 射线及 X 射线等；常用的化学诱变剂有碱基类似物、亚硝酸、烷化剂、羟胺及吡啶类化合物等。

诱变育种的工作流程如图 6-4 所示。

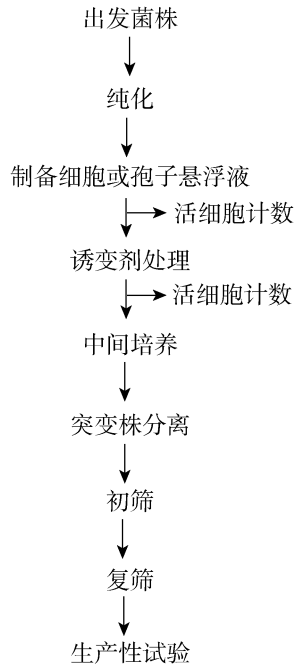


图 6-4 诱变育种的工作流程

### 三、微生物的杂交育种

微生物的杂交育种是指将两个基因型不同的菌株经细胞结合、细胞核融合，随后细胞核进行减数分裂，遗传性状出现分离和组合，产生具有各种新性状的重组体，然后经分离和筛选，获得符合要求的生产菌株。

### 四、原生质体融合育种

原生质体融合是在高渗稳定剂存在的溶液中，加入消化细胞壁的酶（如溶菌酶、蜗牛酶、纤维素酶等）或抑制细胞壁合成的试剂（如青霉素、甘氨酸等），使细胞壁消化而制备成球形的原生质体，加入促融合剂聚乙二醇，使二亲本原生质体细胞融合，在再生选择培养基上，使融合细胞的细胞壁再生，恢复细胞原来的形态，最后选择合适的融合子，还要进行生产性能的筛选，得到符合生产要求的菌株。

根据融合的目的，原生质体融合所选择的亲本株应性能稳定，并带有遗传标记。采用的遗传标记主要有营养缺陷型、抗药性、温度敏感型、形态和颜色等，经常采用的是前两种。

图 6-5 所示为原生质体融合示意图。

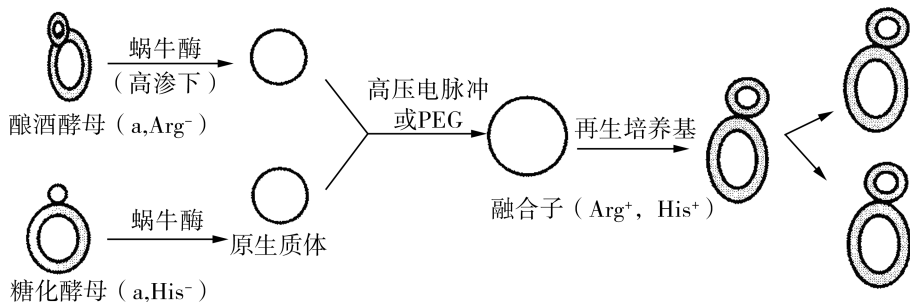


图 6-5 原生质体融合示意图

### 五、基因工程育种

基因工程是指利用分子生物学的理论和技术，设计、操纵、改造和重建细胞的基因组，从而使生物体的遗传性状发生定向变异。虽然这项技术是在 20 世纪 70 年代才开始发展，但它可达到超远源杂交，至今依然前景广阔。基因工程育种包括以下步骤：

#### (一) 目的基因的取得

目的基因的取得主要有三个途径：①从适当的供体生物中提取；②通过逆转录酶的作用由 mRNA 合成 cDNA；③由化学方法合成。

## （二）优良载体的选择

基因工程的载体必须具备以下条件：①相对分子质量较小，结构清楚；②有自我复制能力，能在受体细胞内大量扩增；③最好只有一个限制性核酸内切酶的切口，使目的基因能固定地整合到载体的一定位置上；④有一种选择性遗传标记。基因工程的载体主要是质粒和病毒。

## （三）目的基因与载体 DNA 的体外重组

主要方法有黏性末端连接法、同聚物加尾连接法、平端连接法和人工接头连接法。在连接酶的作用下，目的基因与载体 DNA 进行共价结合，形成有复制能力的环状重组载体（或称嵌合体）。

## （四）重组载体导入受体细胞

重组载体可通过转化、转导等途径将其导入受体细胞中，使其中的目的基因扩增和表达。

## （五）基因工程重组菌的筛选和鉴定

利用选择培养基或鉴别培养基可快速鉴别和区分遗传表型和功能特征，例如抗药性、营养缺陷型、噬菌斑等，从大量菌株中筛选出目的重组菌株，也可以通过测定重组目的基因大小、核苷酸序列、基因表达产物的分子生物学特性来进行筛选和鉴定。

# 任务五 微生物的菌种退化、复壮及保藏

## 一、微生物的菌种退化、复壮

### （一）菌种的退化

微生物的菌种只要进行传代，DNA 就会以一定的概率发生变异，如果没有这些变异，则生物就没有进化。而对于生产菌株，退化性的变异经常是大量的，而进化性的变异却是个别的。如果不进行人工筛选，则负突变的菌株的比例会逐步升高，慢慢变成群体中的优势菌株，造成发酵力下降，产品质量和数量均降低，这就是菌种的退化。菌种退化是细胞群体的变化，是逐渐发生的一个从量变到质变的逐步演变过程。环境的不利因素会加速突变型生产菌向野生型菌方向退化。此时，菌种原有的典型性变得不典型，菌落形态和细胞形态也可能发生改变。

要防止菌种退化，就必须控制传代次数，即把传代降低到最低的水平，尽量避免不必

要的移种和传代，以减少突变。另外应尽量创造一个适合原种生产的条件，可以防止菌种衰退。例如，给与营养缺陷型菌适当的营养成分可防止其回复突变；培养抗性菌株时加入一定的药物，可使回复突变的敏感菌受到抑制；控制好碳源、氮源、培养温度、pH值等。对于霉菌和放线菌来说，菌丝往往是多核的，而且有异核存在，而孢子是单核的，所以移种最好用孢子，防止用菌丝移种造成的菌落不纯和衰退。在菌种保藏的过程中，也要尽可能采用有效的保藏方法。

## （二）菌种的复壮

通过纯种分离等措施从已经衰退的菌种群体中找出少数未衰退的细胞，恢复该菌种原有的典型性状，这是狭义的菌种复壮；广义的复壮则是指在菌种未退化之前就进行纯种分离和生产性能的测定，这样不仅可避免菌种衰退带来的损失，而且有可能找到正突变的更优秀菌株，生产性能可能有所提高。菌种的复壮方法有以下几种：

### 1. 纯种分离

在退化的菌种群体中，必然有一部分仍保持原有的生产能力特征，通过纯种分离技术，可以从退化群体中把个别优秀者挑选出来，经过生产能力的检定，接种到斜面用于生产，这样就可保持生产的稳定性。常用的纯种分离技术有平板划线分离法、稀释分离法、涂布分离法、毛细管分离法、显微操作分离法等。菌种分离的复壮工作也可以未雨绸缪，在未出现退化之前复壮，这样就可以避免在生产上受损失。

### 2. 通过寄主进行复壮

将寄生性微生物接种到相应的敏感寄主体内，可提高菌株的活力。例如苏云金芽孢杆菌，经过多次传代就会发现菌种产生的伴孢晶体减少，杀虫效力降低，如果把菌体接到青虫身上，让它在青虫体内繁殖，青虫死后再进行分离，则毒力不但可以恢复，而且可以逐步提高。

### 3. 遗传育种

可将已经退化的菌株作为出发菌株，重新进行育种，从中筛选出高产菌株。

## 二、菌种保藏

菌种保藏是指保持微生物菌株的活力和遗传性状的技术。菌种保藏的目的是使要保存的菌种存活、不污染杂菌、不变异，保持菌种原有的各种特征和生理活性，达到便于使用的目的。

菌种保藏的原理主要是运用一些方法尽量降低生物体内的代谢，达到延长生命、减少变异的目的。首先要挑选优良纯种，最好采用休眠体，如孢子或芽孢；其次是创造一个有利于休眠的环境条件，通常采用的方法是低温、缺氧、干燥、缺乏营养和添加保护剂或酸度中和剂等方法。常用的菌种保藏措施如下：

### （一）低温保藏法

低温对微生物的生命活动有抑制作用，可根据这个原理来进行菌种保藏。根据所需温度高低可分为两种方法，一种是在4℃左右的普通低温保藏，利用一般冰箱即可达到保存菌种的目的。将菌种接种在固体斜面、半固体穿刺或悬浮液培养基上，在最适温度下培养，长出健壮菌落时，置于4℃左右冰箱中保存，这种方法必须每5~15天或1~4个月重新移接传代一次，间隔时间因微生物种类不同而异。另一种是利用超低温进行冻结保藏，例如用-20℃低温冰箱或干冰、液氮进行保藏。液氮超低温保藏是依据在温度低于-130℃时，一切生化反应处于停止状态，微生物也不能进行代谢的原理而设计的。保藏时要使用甘油或二甲亚砜作保护剂制备菌悬液，以防止微生物被冻死、冻伤或在细胞内形成大量的冰晶。

### （二）干燥保藏法

干燥保藏法是指将微生物接种到土壤、细沙、硅胶、瓷球或滤纸片等适当载体上，在干燥条件下进行保藏。如果同时结合低温或真空密封保藏，则效果更好。这种方法适用于产生孢子的霉菌、放线菌和细菌的芽孢。最常用的为砂土管保藏法，将沙或土过筛、烘干、装管、灭菌，再将孢子悬液滴入，混匀，放入盛有氯化钙的干燥器中除去水分，用火焰封管保存。缺水条件下孢子处于休眠状态，可较长时间保存。

### （三）隔绝空气保藏法

这类方法用来保藏好氧菌，比较简便。如液体石蜡封藏法，可将液体石蜡滴入培养好的菌种斜面，高出斜面1cm，再用固体石蜡密封试管口，低温保藏。也可以用灭过菌的橡皮塞代替棉塞直接塞紧试管口来隔绝空气，放入低温冰箱保存，效果也很好。

### （四）真空冷冻干燥保藏法

这种方法简称冻干法，其原理包括低温、干燥、缺氧，使菌种代谢终止并处于休眠状态，是目前最好的综合保藏法，适用于各种微生物的长期保存，保存期可达5~15年。为防止细胞在冻干过程中损伤或死亡，要加入保护剂制备菌悬液。常用的保护剂包括脱脂乳、血清、10%葡萄糖或蔗糖溶液等。其简要流程：菌种→加保护剂→分装、预冷冻→真空冻干→真空封口→低温保藏。



基因工程育种，是一种前景广阔、正在迅速发展和得到广泛应用的定向育种技术。通过转基因技术得到的生物产品为原料生产加工的食品，可以改善原有食品性状和营养品



质。科学是一把双刃剑，随着对食品安全问题的日益重视，人们也同时提出了转基因食品的安全性问题。表达载体是基因工程中常用的工具之一，通常以抗生素抗性基因作为选择标记，然而抗性基因具有潜在的转移性，可能会对生物和生态造成危害，所以涉及食用微生物的基因工程，宜选择食品级的表达载体和系统。食品级表达载体有以下要求：①载体的宿主必须是食品级，具有稳定且可鉴定的遗传特性和已知的遗传组成；②载体的构成必须是食品级，载体必须由同源宿主或通常被认为是安全生物的 DNA 组成，特别是使用食品级选择标记而非抗生素抗性标记；③载体的诱导物必须是食品级，如乳糖、乳链菌肽等。目前已构建了乳酸菌食品级表达载体，并在食品、医药领域得到了应用，且具有应用前景和商业价值。



## 习 题

### 一、名词解释

生长曲线 诱变育种

### 二、判断题

1. 微生物的生长一般是指微生物个体的生长。( )
2. 血球计数板法测定的是微生物的总菌数。( )
3. 菌悬液中的细胞浓度与浑浊度成正比，与透光度成反比。( )
4. 工业生产上应尽可能缩短延滞期。( )
5. 延滞期菌种进入新的培养环境，并不能完全适应，所以代谢缓慢。( )
6. 工业发酵生产上一般应尽量延长稳定期。( )
7. 微生物的最适生长温度就是最适发酵温度。( )

### 三、简答题

1. 什么是微生物生长温度的三基点？
2. 举例说明控制温度在生产实践中有哪些应用。
3. 请画出单细胞微生物的典型生长曲线。
4. 对数生长期有什么特点？处于指数期的微生物有什么应用？
5. 稳定期为什么会到来？有什么特点和应用？
6. 菌种退化的原因是什么？如何进行菌种的复壮？
7. 菌种保藏的方法有哪些？

# 模块七 食品工业中常用微生物及其应用

## 知识目标

1. 掌握食品工业中常用的细菌、酵母菌和霉菌的种类及其生物学特性。
2. 掌握各类发酵食品的发酵原理。
3. 了解单细胞蛋白、益生菌的开发和应用。

## 技能目标

1. 会描述各类发酵食品微生物的生物学特性。
2. 会各类发酵食品微生物菌种的选择和扩大培养。

## 任务一 食品工业中常用的细菌及其应用

### 一、乳酸菌

乳酸菌的应用历史十分久远，远古时期人类就在酿造食品方面不自觉地利用了乳酸菌，但真正科学地研究和利用始于19世纪中叶。乳酸菌是一类能利用可发酵性碳水化合物（主要为葡萄糖）产生大量乳酸的细菌的通称，在自然界广泛存在，绝大多数乳酸菌对人、畜健康有益。近年来对它的应用与研究及新资源的开发，已成为我国工、农、医、食品、饲料、化工等领域中的重要课题，其丰富的资源对国民经济发挥着重要作用。

乳酸菌的特征：细胞呈球状、杆状和不固定的多形态（不规则）状，一般无芽孢，仅少数种生芽孢；生理上有需氧、微需氧、耐氧和严格厌氧四种类型；对糖的分解代谢有有氧途径和厌氧途径（包括同型发酵、异型发酵和双歧菌型等）；在代谢产物上，与其他细菌不同的是有独特的凝乳酶和双歧杆菌所产的糖苷酶；此外还有各种有机酸、多糖、寡糖，产生乳制品的风味物（双乙酰、3-羟基丁酮、乙醛等）、生物表面活性剂、细菌素、肽类物等。

目前对该类菌的分类不断有变化且更加细致，已知它有10多个属100多个种。目前，用于发酵工业生产乳酸和乳品的乳酸菌有5个属共50多个种。现就生产上常见常用的重要属、种简介如下。

#### （一）链球菌属

链球菌属会发酵碳水化合物产生乳酸，属同型乳酸发酵，多形成D-乳酸。重要的有下列几种。

##### 1. 乳酸链球菌

乳酸链球菌的细胞呈球形或卵圆形，直径为 $0.5\sim 1.0\mu\text{m}$ ，成对或短链状排列。能发酵葡萄糖、麦芽糖和乳糖。该菌需要复合营养素。在合成培养基上，要求含4~5种维生素、10~13种氨基酸才能生长。在含4%的NaCl培养基中可生长，而在含6.5%的NaCl培养基中不生长；在pH9.2时才可生长，而在pH9.6时不生长；在0.1%美蓝乳和40%胆汁中可生长。生长最适温度为 $30^{\circ}\text{C}$ ， $45^{\circ}\text{C}$ 时不生长。从生乳中检出率可达33%，是牛奶细菌检出率最高的菌。有的菌株可产生抗生素——乳酸链球菌素，能抑制多种革兰氏阳性菌生长，是一种高效、无毒的天然食品防腐剂，目前已被世界50多个国家和地区广泛用于乳制品、罐头食品、高蛋白食品和乙醇饮料的防腐保鲜。我国中科院微生物研究所也选育到一株乳酸链球菌素的高产突变株，已中试成功，这一新型食品添加剂的生产应用，将为我国食品工业的发展带来更好的效益。在生产上，该菌可用于制造干酪、奶油和

酸乳。

## 2. 乳脂链球菌

乳脂链球菌的细胞呈圆形，双球或短链排列，直径为  $0.6\sim 1.0\mu\text{m}$ ，革兰氏阳性菌，不运动，不产芽孢。发酵葡萄糖和乳糖产生乳酸。产酸适温比乳链球菌低，在  $18\sim 20^\circ\text{C}$  生长良好，在  $40^\circ\text{C}$  以上不生长。在含  $4\%\text{NaCl}$  的肉汤中不生长，在  $\text{pH}9.2$  的肉汤中及含  $0.1\%$  美蓝的培养基中均不生长。这些特性可与乳链球菌相鉴别。其中的某些菌株可产生芳香风味物，有些菌株可产生抗菌物质——双球菌素。该菌可用作乳酸菌饮料和酸乳的生产菌。

## 3. 嗜热链球菌

嗜热链球菌的细胞呈卵圆形，直径为  $0.7\sim 0.9\mu\text{m}$ ，成对或形成长链。细胞形态与培养条件有关。在  $30^\circ\text{C}$  乳中培养时，细胞成对，而在  $45^\circ\text{C}$  时呈短链，在高酸度乳中细胞呈长链。液体培养时，细胞呈链状；平板培养时细胞膨胀变粗，有时会呈杆菌状，形成针尖状菌落。嗜热链球菌的某些菌株在平板移接时，如中间不经过牛奶培养，往往得不到菌落，这些菌株是典型的牛奶菌。嗜热链球菌是革兰氏阳性菌，微需氧，最适生长温度为  $40\sim 45^\circ\text{C}$ ，低于  $20^\circ\text{C}$ 、高于  $53^\circ\text{C}$  则不能生长；耐热性强，在  $85^\circ\text{C}$  条件下能耐受  $20\sim 30\text{min}$ 。能发酵葡萄糖、果糖，不能发酵麦芽糖，易发酵蔗糖和乳糖。蛋白质分解能力微弱，对抗生素极敏感。在合成培养基上常需多种 B 族维生素。

嗜热链球菌具有分解乳酸链球菌产生的乳酸链球菌素的酶系，为同型乳酸发酵菌，在代谢过程中产生 L (+)-乳酸和风味物质双乙酰，是生产瑞士干酪、砖形干酪和酸乳的优良菌种。

## 4. 粪链球菌

粪链球菌的细胞呈球形、成对或链状，发酵葡萄糖产酸不产气，在  $10\sim 45^\circ\text{C}$  时都能生长，在含  $6.5\%$  的  $\text{NaCl}$ 、 $\text{pH}9.6$  和  $0.1\%$  的美蓝牛奶中均能生长。能使酪氨酸脱羧，能利用精氨酸生成  $\text{NH}_3$ 。该菌寄生于动物肠道内，在乳和乳制品中也常出现。应用它能促使干酪成熟。

## 5. 丁二酮乳酸链球菌

这种菌属乳酸链球菌的亚种。其特点是能发酵柠檬酸产生  $\text{CO}_2$ 、羟丁酮和丁二酮，后者是乳制品芳香风味的来源。在  $\text{pH}4.3\sim 4.8$  的环境中，用柠檬酸调节  $\text{pH}$  值，同时通入  $\text{O}_2$ ，可生成丁二酮。该菌用于制作干酪、酸乳和乳酸菌饮料。

## (二) 片球菌属

片球菌属的细胞呈球形，四联或成对，兼性厌氧菌，利用葡萄糖产酸不产气，属同型乳酸发酵。生长温度范围为  $25\sim 40^\circ\text{C}$ 。生长时需要复合生长因子和氨基酸丰富的培养基、烟酸、泛酸和生物素。生产上重要的种有啤酒片球菌和乳酸片球菌等。前者可产双乙酰。

### （三）明串珠菌属

明串珠菌属的细胞球形呈豆状，成对和链状排列，革兰氏阳性菌，不运动，无芽孢。属微好气性的异型发酵类型。菌落常小于1.0mm，光滑、圆形、灰白色。培养液常混浊，可在5~30℃生长，适温20~30℃，生长需复合生长因子。需在含有烟酸、硫氨素、生物素和氨基酸的培养基中生长。发酵葡萄糖产生D(-)-乳酸、乙醇、CO<sub>2</sub>。该属的重要种如下。

#### 1. 肠膜明串珠菌

此菌以发酵蔗糖生成黏性的葡聚糖为特征，生成力强，也可发酵戊糖。从糖厂可分离出该菌，是汽水等饮料厂的污染菌。

#### 2. 葡聚糖明串珠菌

此菌又名副噬柠檬酸链球菌，该菌的葡聚糖生成力稍弱于肠膜明串珠菌。不发酵戊糖，对石蕊乳稍凝固，还原力较弱。糖厂及许多食品、牛乳中常可检出。该菌具有生成芳香风味物质的能力。

#### 3. 乳脂明串珠菌

此菌旧称噬柠檬酸明串珠菌，牛奶中常出现，可利用柠檬酸产生双乙酰和3-羟基丁酮，常用于干酪及发酵奶油的发酵剂中，能产生芳香风味物质。与乳脂链球菌共生力很强，生产上常将两者制成混合发酵剂使用。

### （四）乳杆菌属

此菌细胞呈杆状、形态多样，从长的、细长状到弯曲形及短杆形等，多形成链。大小在(0.5~1.2) μm × (1.0~10.0) μm 之间。多数不运动，无芽孢，革兰氏阳性菌。兼性厌氧，有时微好氧，降低氧压和在充有5%的CO<sub>2</sub>空气中可促进生长。在营养琼脂上菌落凸起、全缘和无色，直径为2~5mm。化能异养菌，需营养丰富的培养基。发酵分解糖的代谢终产物中50%以上是乳酸。不还原硝酸盐，不液化明胶，接触酶和氧化酶均为阴性。最适生长温度为30~40℃。耐酸，最适pH值为5.5~6.2。广泛分布于环境中，特别是动物、蔬菜和食品上，罕见致病。目前将乳杆菌属分为三个亚属即专性同型发酵种、专性异型发酵种、兼性异型发酵种。与生产有关的重要代表种如下。

#### 1. 乳杆菌属专性同型发酵菌种

在乳酸发酵过程中，发酵产物中只有乳酸的称为同型发酵。

(1) 德氏乳杆菌 细胞呈杆状，单生或呈短链。不发酵乳糖，能利用麦芽糖、蔗糖、果糖、葡萄糖、半乳糖、糊精等碳源，发酵产生d-乳酸，少数菌株产生D, L-乳酸。在不加中和剂的情况下最高生成的乳酸浓度为16g/L。最适生长温度为45℃，在50℃时仍能旺盛生长并产生乳酸，最高耐受温度为55℃。在琼脂平板上菌落小、扁平，边缘锯齿状。在明胶平板上菌落灰色、环状。在琼脂斜面上呈半透明灰色条纹菌苔。该菌是发酵法生产乳酸最常用的菌种。

(2) 嗜酸乳杆菌 为革兰氏阳性、微厌氧菌。细胞两端钝圆，呈杆状，单个、成双或成短链。菌落粗糙，无色，深层菌落形状不规则，周围有分枝状的放射物。最适培养温度为 35~38℃，15℃下不生长，最适生长 pH 值为 5.5~6.0。能发酵葡萄糖、果糖、蔗糖和乳糖，除此之外，还能利用麦芽糖、纤维二糖、甘露糖、半乳糖和水杨苷等作为生长的碳源；对热的耐受性差，蛋白质分解力弱，对抗生素比嗜热链球菌更敏感。对培养基营养成分要求较高。用牛奶培养时，一般都添加酵母膏、肽或其他生长促进物质，在合成培养基中需补充乙酸、甲羟戊酸、核黄素、泛酸钙、烟酸和叶酸。使用合成培养基时需添加番茄汁或乳清；能耐胃酸和胆汁，在肠道中可存活。属同型乳酸发酵，产 D, L-乳酸。

(3) 瑞士乳杆菌 细胞呈杆状，单生或链状，用美蓝染色无异染粒，利用此特征可与德氏乳杆菌、保加利亚乳杆菌、赖氏乳杆菌相区别。在葡萄糖肉汁琼脂平皿上，菌落大小为 2~3mm，不透明、白色至淡灰色，粗糙。在厌氧和含 5% CO<sub>2</sub> 的环境中，菌落生长良好。在含吐温 and 油酸钠的培养基中，菌落大而光滑。发酵产生 D, L-乳酸，不发酵精氨酸产氨，需复合培养基培养。在乳中生长良好，产生 2% 以上的乳酸。在含有乳清、马铃薯、胡萝卜浸汁、酪蛋白消化液及酵母浸膏的培养基上生长良好。在合成培养基中培养时，需加入泛酸钙、烟酸、核黄素等维生素类物质。最适生长温度为 40~42℃，在 15℃ 以下不生长，最高生长温度为 50~53℃。该菌可用于制造干酪。

(4) 保加利亚乳杆菌 为革兰氏阳性菌，微厌氧。最适生长温度为 40~43℃，最高生长温度为 53℃，最低生长温度为 20℃。对热的耐受性差，超过 60℃ 可致死，个别菌株在 75℃ 条件下能耐受 20min。能发酵葡萄糖、果糖、半乳糖和乳糖，但不能利用蔗糖和麦芽糖。蛋白质分解能力弱。对抗生素不如嗜热链球菌敏感。细胞呈杆状，两端钝圆，单个或成链，大小为 (0.8~1.0) μm × (2.0~20) μm，频繁传代会变形，用美蓝染色可见到细胞内的异染颗粒。培养基和培养温度对细胞形态影响很大。在 20℃ 乳中培养，细胞可成为长的纤维状菌；在 50℃ 下培养，细胞停止生长，如在此温度下继续培养，细胞形状变得不规则。在冷的酸乳中，由于温度和高酸度的影响，会有异常杆菌出现，可能是由于氧的阻碍作用或者氮源不合适。在琼脂平板上培养时，细胞形状不规则。将嗜热链球菌和保加利亚乳杆菌混合培养，两者的生长情况都比各自单独培养时好。这是因为保加利亚乳杆菌分解酪蛋白，游离出的氨基酸为嗜热链球菌的生长提供营养物质，而嗜热链球菌产生的甲酸能促进保加利亚乳杆菌的生长。对牛乳进行杀菌处理时，采用 90℃ 加热 5min 或 85℃ 加热 20~30min。牛乳中甲酸的含量比较多，用这样的牛乳来培养保加利亚乳杆菌可得到满意的结果。保加利亚乳杆菌属同型乳酸发酵菌，产生 D (-) -乳酸；对牛乳形成强的酸凝固，在 37℃ 乳中培养 6~8h，酸度约达 0.7%，24h 后可达 2%，经 3~4 天后则可达 3%。在发酵过程中可产生香味物质乙醛。该菌是制作酸奶及发酵法生产乳酸最常应用的菌种之一。

(5) 嗜热乳杆菌 细胞杆状，大小为 0.5 μm × 3.0 μm，不产生芽孢。为厌氧菌，耐热性很强，最适生长温度为 50~62.8℃，能耐 71℃、30min 和 82℃、25min 的加热条件，30℃ 以下不生长。在琼脂培养基上形成微小菌落。该菌适于制作酸奶、马奶酒和干酪等。

## 2. 乳杆菌属专性异型发酵菌种

异型发酵菌种即发酵葡萄糖，除生成乳酸外，还生成  $\text{CO}_2$ 、乙醇、乙酸等多种副产物的发酵菌种。其中包括有适温  $28\sim 32^\circ\text{C}$ ，能发酵阿拉伯糖的巴氏乳杆菌、布氏乳杆菌及短乳杆菌和适温在  $35\sim 40^\circ\text{C}$  或更高，不发酵阿拉伯糖的发酵乳杆菌。在乳及乳制品和青贮饲料中常出现的是短乳杆菌和发酵乳杆菌。

此外尚有赖氏乳杆菌。该菌能利用葡萄糖、果糖、蔗糖、麦芽糖和海藻糖产酸。在不加中和剂的条件下，可产生  $13\text{g/L}$  的 D(-)-乳酸。最适生长温度为  $32\sim 36^\circ\text{C}$ 。是制作泡菜、乳酸菌饮料的优良菌种。

## 3. 乳杆菌属兼性异型发酵菌种

(1) 干酪乳杆菌 细胞杆状，两端平直多呈链状，大小为  $0.8\mu\text{m}\times(2\sim 4.0)\mu\text{m}$ 。在营养琼脂深层中菌落光滑，呈凸镜形或菱形，白色或淡黄色。发酵糖可形成 D(-)-乳酸及 L(+)-乳酸。最适生长温度为  $30^\circ\text{C}$ 。在合成培养基上需加入核黄素、叶酸、泛酸钙和烟酸，也需要吡哆醛或吡哆胺。

该菌存在于乳、乳制品、干酪、青贮饲料以及人的口腔、肠道中，可用于制造干酪和生产乳酸。

(2) 植物乳杆菌 细胞杆状，单个或呈短链，端头圆形。在己糖发酵中产 D, L-乳酸及少量乙醇和  $\text{CO}_2$ 。发酵戊糖产生醋酸和乳酸，不中和时产酸量可达  $12\text{g/L}$  (以乳酸计)。最适生长温度为  $30^\circ\text{C}$ ，最高可耐  $40^\circ\text{C}$ 。该菌可用于腌制蔬菜及制作青贮饲料的发酵剂。

## (五) 双歧杆菌属

该菌属的细胞形态多样。不同菌种、不同培养条件，细胞的形态很不一样，有棍棒状、勺状、V 字状、弯曲状、球杆状和 Y 字形等；单生、成对或链状、V 字形或细胞平行成栅栏状排列。大小为  $(0.5\sim 1.3)\mu\text{m}\times(1.5\sim 8)\mu\text{m}$ 。革兰氏阳性菌，专性厌氧，少数种可在含  $10\%\text{CO}_2$  的空气中生长。但目前应用于生产的菌株是耐氧的，甚至可以在有氧环境下培养，经多次传代后，革兰氏染色反应转为阴性。不抗酸，不运动，无芽孢。最适生长温度为  $37\sim 41^\circ\text{C}$ ，对热耐受性差。初始生长最适 pH 值为  $6.5\sim 7.0$ ，pH 值低于  $4.5$  或高于  $8.5$  时不生长。能发酵葡萄糖、果糖、乳糖和半乳糖，除两歧双歧杆菌仅缓慢利用蔗糖外，短双歧杆菌、长双歧杆菌和婴儿双歧杆菌等均能发酵蔗糖。蛋白质分解力微弱，对抗生素敏感。对营养要求复杂，通常要求多种维生素，在培养基中添加还原剂维生素 C 和半胱氨酸有利于双歧杆菌生长。属异型发酵菌，发酵产物主要是乙酸和 L(+)-乳酸，两者的摩尔比是  $3:2$ ；不产生  $\text{CO}_2$ ；不产生丁酸和丙酸，接触酶阴性。在人和动物（牛、羊、兔、鼠、猪、鸡和蜜蜂等）的肠道、婴儿粪便、牛瘤胃及污水中可分离得到。

该属有 30 余种，其模式种为两歧双歧杆菌。常在婴幼儿肠道中生存，有益于婴幼儿发育，对人体免疫功能的加强作用已有许多报道。用两歧双歧杆菌或经驯化选育的耐氧菌株进行发酵可制作饮料、保健药品等，如婴儿乳粉、雪糕和酸奶等。

## （六）乳酸菌在食品工业中的应用

在发酵食品行业中应用最广泛的是乳酸菌。经过乳酸菌发酵作用制成的食品称为乳酸发酵食品。随着科学研究的不断深入，乳酸菌对人体健康有益作用的机理逐步被揭示，因而，乳酸发酵食品更加受到人们的重视，在食品工业中占有越来越重要的地位。

### 1. 发酵乳制品

（1）酸乳 经乳酸发酵的乳类称为酸乳。各种动物乳都可用于酸乳的制造，目前以酸牛乳应用最普遍。传统的酸乳通常分为凝固型和搅拌型两种。每类酸乳又可添加各种果汁、蔬菜、蜂蜜等制成不同风味的酸乳。搅拌型还可加工成冷冻酸乳、浓缩或干燥酸乳等品种。

①凝固型酸乳的生产：凝固型酸乳的生产是以新鲜牛乳为主要原料，经过净化、标准化、均质、杀菌、接种发酵剂、分装后，通过乳酸菌的发酵作用，使乳糖分解为乳酸，导致乳的 pH 值下降、酪蛋白凝固，同时产生醇、醛、酮等风味物质，再经冷藏和后熟制成乳凝状的酸牛乳。生产工艺流程：

原料乳→净乳→标准化→配料→预热（60℃）→脱气→均质（15~25 MPa）→杀菌→冷却→接种→分装→发酵→冷藏（0~5℃）→检验→发送

发酵操作：培养温度为 42~45℃，时间为 2~3h。在发酵过程中，对发酵乳要认真观察，必要时要取样检查，当 pH 值达到 4.5~4.7 时，即可终止发酵。

②搅拌型酸乳的生产：搅拌型酸乳即纯酸乳，与凝固型酸乳生产工艺基本相似，所不同的是：搅拌型酸乳为先发酵，再搅拌，后分装；凝固型酸乳为先分装，后发酵，不搅拌。生产工艺流程：

原料鲜乳→净化→标准化调制→均质→杀菌→冷却→接种发酵剂→发酵→搅拌破乳→冷却→分装→冷藏后熟→成品

发酵操作：首先在发酵罐中 42℃ 发酵 3~5h。当发酵乳 pH 值达 4.5~5.0 时，终止发酵。发酵结束后，将品温降至 38℃，进行搅拌。

（2）干酪 干酪是在乳中加入适量的乳酸菌发酵剂和凝乳酶，使蛋白质（主要是酪蛋白）凝固后，排除乳清，将凝块压成块状而制成的产品。制成后未经发酵的产品称新鲜干酪，经长时间发酵而制成的产品称为成熟干酪，这两种干酪称为天然干酪。

①干酪生产工艺：不同品种的干酪，其风味、质地、颜色等特性不同，生产工艺也不尽相同，但都有共同之处。用杀菌的脱脂乳或全脂乳加入乳酸菌或凝乳酶凝固乳的酪蛋白而制得凝乳，然后进一步经加热、加压、加盐和存放老熟（通常用专门的微生物）处理而成。生产工艺流程：

原料乳→标准化→杀菌→冷却→添加发酵剂→调整酸度→加入添加剂→加色素→加凝乳酶→凝块切割→搅拌→加温→排出乳清→成型压榨→盐渍→上色挂蜡→包装→贮存

②干酪发酵的菌种：用于干酪发酵的菌种大多数为乳酸菌，但有些干酪使用丙酸菌和霉菌。乳酸菌发酵剂大多是多种菌的混合发酵剂，根据最适生长温度不同，可将干酪生产的乳酸菌发酵剂菌种分为两大类：一类是适温型乳酸菌，包括乳酸链球菌、乳脂链球菌、



乳脂明串珠菌等，主要作用是将乳糖转化为乳酸和将柠檬酸转化为双乙酰；另一类是具有脂肪分解酶和蛋白质分解酶的嗜热型乳酸菌，包括嗜热链球菌、乳酸乳杆菌、干酪乳杆菌、短杆菌、嗜酸乳杆菌等。

③干酪微生物次生菌群：有大量微生物繁殖生长在成熟干酪的表面和干酪基质的内部，它们的生长、代谢活性及蛋白质水解酶与酯类水解酶的分泌可以改变干酪的结构和风味，其随干酪种类和制作工艺的不同而异。目前已分离到的一些重要的干酪次生菌群有如下几种：

**霉菌：**霉菌是成熟干酪的主要菌种，如白地霉、沙门柏干酪青霉。在实际生产过程中，一般将这两种菌混合使用，使干酪表面形成灰白色的外皮。

**酵母：**酵母是许多表面成熟干酪的微生物群的重要组成部分，特别是青纹干酪、软霉菌成熟干酪。克鲁维酵母、假丝酵母、德巴利氏酵母和糖酵母是所知的最常见酵母。它们在一开始便可在干酪的表面形成菌落，可在4%的盐浓度下生长。由于具有代谢乳酸的能力，故有较强的中和活力。这些酵母既可水解蛋白质，又可水解脂类，产生多种挥发性的风味物质以及肽/氨基酸风味物质。

**细菌：**在干酪次生菌群中特别重要的细菌有微球菌、乳杆菌、片球菌、棒状杆菌和丙酸杆菌。微球菌是好氧的耐盐细菌，生长温度为10~20℃。它们是表面涂抹菌种的重要组成部分，在干酪的成熟过程中发挥着重要作用。许多硬干酪、半硬干酪（如切达、瑞士和意大利干酪等）的次生菌群中的主导菌是嗜温的乳杆菌。乳杆菌是革兰氏阳性，过氧化氢酶阴性，无孢子，不能运动，杆状，兼性厌氧，在奶中能够缓慢生长，但在干酪中生长迅速。片球菌很少能够从切达干酪上分离到。与乳品工业有关的棒状杆菌群中重要的是扩展短杆菌，因为它与表面涂抹和去皮干酪的橘红色以及源于含硫氨基酸的特征香味有关。

(3)酸性奶油 酸性奶油是用杀菌稀奶油经乳酸菌发酵后加工制成的。目前都采用混合乳酸菌发酵剂生产酸性奶油。菌种要求产香能力强，产酸能力相对较弱，因此，可将发酵剂菌种分为两大类：一类是产酸菌种，主要包括乳酸链球菌、乳脂链球菌，可将乳糖转化为乳酸；另一类是产香菌种，主要包括嗜柠檬酸链球菌、丁二酮链球菌，可将柠檬酸转化为丁二酮，赋予酸性奶油特有的香味。生产工艺流程：

原料乳→离心分离→稀奶油→加碱中和→杀菌→冷却→接种发酵剂→发酵→物理成熟→添加色素→搅拌→排出酪乳→洗涤→加盐压炼→包装→成品

发酵时，接种混合发酵剂3%~6%，20℃发酵2~6h，使乳酸度达0.3%，即中止发酵。

## 2. 乳酸菌发酵果蔬汁饮料

乳酸菌发酵果蔬汁是一种新型饮料，它综合了乳酸菌和果蔬汁两方面的营养保健功能，而且产品的原料风味和发酵风味浑然一体，所以深受消费者喜爱。下面以番茄汁乳酸菌发酵饮料的生产为例进行讨论。工艺流程：

清洗番茄→热烫→榨汁→均质→调节pH值→杀菌→冷却→接种发酵剂→发酵→加糖调配→包装→成品

用于番茄汁乳酸菌发酵饮料生产的发酵剂是采用保加利亚乳杆菌和嗜热链球菌以1:1

比例制成的混合发酵剂。42℃下发酵 30h，pH 值降至 4.0~4.5，发酵结束。

### 3. 益生菌制剂

益生菌又称正常菌群或生理性菌群，是指与人或动物保持共生关系的一类有益微生物菌群，对宿主具有改善微生态平衡、提供营养、提高免疫力、促进健康等重要生理功能。常见的此类微生物有双歧杆菌、嗜酸乳杆菌等。益生菌制剂是一类新型生物制剂，国外称益生菌，国内则称微生态制剂。

就双歧杆菌制品来看，目前生产规模和产量逐年增加，品种已达 70 多种，产品形式分为液态型和固态型两种。液态产品有双歧杆菌发酵乳饮料、双歧杆菌口服液、双歧杆菌果蔬复合汁饮料。固态产品有双歧杆菌乳粉和干酪、双歧杆菌干制糖果和糕点、双歧杆菌粉剂和胶囊。

## 二、醋酸菌

醋酸菌不是细菌分类学上的名词，是一类具有氧化酒精生成醋酸能力的细菌。按照其生理生化特性，可将醋酸菌分为醋酸杆菌属和葡萄糖氧化杆菌属两大类。酿醋用醋酸菌株，大多属醋酸杆菌属，仅在传统酿醋中发现有葡萄糖氧化杆菌属的菌株。

### (一) 醋酸菌的特性

醋酸菌是两端钝圆的杆状菌，单个或呈链状排列，有鞭毛，无芽孢，属革兰氏阴性菌。在高温或高盐浓度或营养不足等不良培养条件下，菌体会伸长，变成线形、棒形或管状膨大等。

醋酸菌为好氧菌，必须供给充足的氧气才能进行正常发酵。在实施液态静置培养时，会在液面形成菌膜，但葡萄糖氧化杆菌除外。在含有较高浓度乙醇和醋酸的环境中，醋酸杆菌对缺氧非常敏感，中断供氧会造成菌体死亡。

醋酸菌生长繁殖的适宜温度为 28~33℃，不耐热，在 60℃下经 10min 即死亡。醋酸菌生长的最适 pH 值为 3.5~6.5，一般的醋酸杆菌菌株在醋酸含量达 1.5%~2.5%的环境中，生长繁殖就会停止，但有些菌株能耐受 7%~9%的醋酸。醋酸杆菌对酒精的耐受力颇高，通常可达 5%~12%（体积分数），但对盐的耐受力很差，食盐浓度超过 1.0%~1.5%时就停止生长。在生产中当醋酸发酵完毕就添加食盐，除了调节食醋的滋味外，也是防止醋酸菌继续将醋酸氧化为二氧化碳的有效措施。

醋酸菌最适的碳源是葡萄糖、果糖等六碳糖，其次是蔗糖和麦芽糖等。醋酸菌不能直接利用淀粉等多糖类。酒精也是很适宜的碳源，有些醋酸菌还能以甘油、甘露醇等多元醇为碳源。蛋白质水解产物、尿素、硫酸铵等都适宜于作为醋酸菌的氮源。生长繁殖必须有磷、钾、镁等元素。

## （二）常用和常见的醋酸菌

### 1. 奥尔兰醋酸杆菌

它是法国奥尔兰地区用葡萄酒生产醋的主要菌株。最适生长温度为 30℃。该菌能产生少量的酶，产醋酸的能力弱，能由葡萄糖产 5.3% 葡萄糖酸，耐酸能力较强。

### 2. 许氏醋酸杆菌

它是国外有名的速酿醋菌株，也是目前制醋工业重要的菌种之一。在液体中的最适生长温度为 28~30℃，最高生长温度为 37℃。该菌产酸高达 11.5%。对醋酸没有进一步的氧化作用。

### 3. 恶臭醋酸杆菌

它是我国醋厂使用的菌种之一。该菌在液面形成菌膜，并沿容器壁上升，菌膜下液体不浑浊。一般能产酸 6%~8%，有的菌株副产 2% 的葡萄糖酸，能把醋酸进一步氧化为二氧化碳和水。

### 4. 攀膜醋酸杆菌

它是葡萄酒、葡萄醋酿造过程中的有害菌，在醋醅中常能分离出来。最适生长温度为 31℃，最高生长温度为 44℃。在液面形成易破碎的膜，菌膜沿容器壁上升得很高，菌膜下液体很浑浊。

### 5. 胶膜醋酸杆菌

它是一种特殊的醋酸菌，若在酿酒醪液中繁殖，会引起酒酸败、变黏。该菌生成醋酸的能力弱，又会氧化分解醋酸，因此是酿醋的有害菌。在液面上，胶膜醋酸杆菌会形成一层皮革状类似纤维样的厚膜。

### 6. AS1.41 醋酸菌

它属于恶臭醋酸杆菌，是我国酿醋常用的菌株之一。该菌细胞呈杆状，常呈链状排列，单个细胞大小为  $(0.3\sim 0.4)\mu\text{m}\times(1\sim 2)\mu\text{m}$ ，无运动性，无芽孢。在不良条件下，细胞会伸长，变成线形或棒形，管状膨大。平板培养时菌落隆起，表面平滑，菌落呈灰白色，液体培养时则形成菌膜。该菌适宜生长温度为 28~30℃，生成醋酸的最适温度为 28~33℃，最适 pH 值为 3.5~6.0，耐受酒精浓度为 8%（体积分数），最高产醋酸 7%~9%，产葡萄糖酸能力弱，能将醋酸氧化分解为二氧化碳和水。

### 7. 沪酿 1.01 醋酸菌

它是从丹东速酿醋中分离得到的，是我国食醋工厂常用菌种之一。此菌细胞呈杆形，常呈链状排列，菌体无运动性，不形成芽孢。在含酒精的培养液中，常在表面生长，形成淡青灰色薄层菌膜。在不良条件下，细胞会伸长，变成线形或棒状，有的呈膨大状，有的分枝。该菌由酒精产醋酸的转化率平均达到 93%~95%。

由于酿制食醋的原料一般是粮食，即使是使用代用原料，其淀粉、蛋白质、矿物质的含量也很丰富，营养成分能满足醋酸菌的需要。除少数酿醋工艺外，一般不再需要另外添

加氮源、矿物质等营养物质。

醋酸菌有相当强的醇脱氢酶、醛脱氢酶等氧化酶系活性，因此，除氧化酒精生成醋酸外，也有氧化其他醇类和糖类的能力，生成相应的酸、酮等物质。例如，丁酸、葡萄糖酸、葡萄糖酮酸、木糖酸、阿拉伯糖酸、丙酮酸、琥珀酸、乳酸等有机酸，以及氧化甘油生成二酮、氧化甘露醇生成果糖等。醋酸菌也有生成酯的能力，接入产生芳香酯多的菌种发酵，可以使食醋的香味倍增。上述物质的存在对形成食醋的风味有重要作用。

### 三、谷氨酸产生菌

#### (一) 谷氨酸产生菌的分属及其特征

目前经鉴定和命名的谷氨酸产生菌很多，主要分布于四个属中：棒状杆菌属、短杆菌属、小杆菌属、节杆菌属。

##### 1. 棒状杆菌属

本属菌是细胞为直或微弯的杆菌，常呈一端膨大的杆状，折断分裂形成“八”字形排列；不运动，少数植物致病菌能运动；革兰氏染色阳性，但常有阴性反应者；好氧或厌氧；棒状杆菌属中的谷氨酸生产菌有北京棒杆菌 AS1.299、钝齿棒杆菌 AS1.542、谷氨酸棒杆菌等。

##### 2. 短杆菌属

本属菌是细胞为短的不分枝的杆菌，革兰氏染色阳性，大多数不运动，运动的种具有周生鞭毛或端生鞭毛。在普通肉汁培养基中生长良好。有时产非水溶性色素，色素呈红、橙红、黄、褐色。可以从乳制品、水、土壤、昆虫、鱼及植物体等样品中分离得到。该属中的谷氨酸生产菌有扩展短杆菌、乳糖发酵短杆菌、黄色短杆菌、天津短杆菌 T6-13。

##### 3. 小杆菌属

本属细菌是杆状菌，性状和排列都和棒状杆菌相似，有时呈球杆菌状，美兰染色呈现颗粒，革兰氏染色阳性，不抗酸、无芽孢，在普通肉汁蛋白陈培养基上生长，发酵糖产酸弱，主要产乳酸不产气。该属中的谷氨酸发酵菌有水杨苷小杆菌、嗜氨小杆菌、产碱小杆菌等。

##### 4. 节杆菌属

本属细菌的突出特点是在培养过程中出现细胞形态由球菌变杆菌，由杆菌变球菌，革兰氏染色由阳性变阴性，又由阴性变阳性的变化过程。一般不运动，固体培养基上菌苔软或黏，液体培养生长旺盛。大部分的种液化明胶，利用碳水化合物产酸极少或不产酸。好氧，大部分的菌种在 37℃ 下不生长或微弱生长，最适生长温度为 20~25℃。节杆菌属中的谷氨酸发酵菌有氨基酸节杆菌新种、裂烃谷氨酸节杆菌、石蜡节杆菌。

#### (二) 我国常用的生产菌株

我国谷氨酸发酵生产中使用的菌株主要有北京棒杆菌 AS1.299 及其诱变种、钝齿棒

杆菌 AS1.542、Hu7251、B9、B9-17-36 等菌株。下面分别介绍。

### 1. 北京棒杆菌 AS1.299

(1) 形态特征 细胞短杆状或棒状，两端钝圆，不分枝，有时微呈弯曲状；细胞单个、成对或呈 V 字形排列。大小为  $(0.7\sim 0.9)\mu\text{m}\times(1.0\sim 2.5)\mu\text{m}$ ；革兰氏染色呈阳性反应；无运动能力；细胞内有明显的横隔，在次极端有异染颗粒；不形成芽孢。

(2) 生理特征 好氧，兼厌氧性，在  $20^{\circ}\text{C}$  时生长缓慢，在  $30\sim 32^{\circ}\text{C}$  时生长旺盛，在  $41^{\circ}\text{C}$  时生长微弱；生长最适 pH 值为  $6\sim 7.5$ ，pH 值在  $5\sim 11$  范围内均能生长，pH 值低于 4 不能生长；有脲酶活力；不能利用淀粉和纤维素；生物素是必需生长因子；在含 2.6% 尿素的普通肉汁琼脂平板上生长良好，当尿素提高至 3% 时，生长受影响；在含 7.5% 氯化钠的普通肉汁培养基中生长良好，当氯化钠提高至 10% 时，生长受影响。

(3) 培养特征 在肉汁琼脂斜面上划线培养，菌落呈淡黄色，表面湿润光滑，不产生水溶性色素；在肉汁琼脂平板上培养，24h 时菌落呈白色，直径约为 1mm，继续培养至 48h，菌落直径扩大至 2.5mm，培养 7 天，菌落增大至 6.0mm 左右，此时菌落呈淡黄色且中间隆起，表面湿润光滑，边缘整齐，不产生水溶性色素；在柱状肉汁琼脂中穿刺培养，穿刺口的菌体生长良好，沿穿刺线的菌体生长情况较差。

### 2. 北京棒杆菌 7338

7338 菌株是以北京棒杆菌 AS1.299 为出发菌株，经亚硝基胍多次诱变处理后选育的。该菌体适合于淀粉质原料的谷氨酸发酵。

### 3. 北京棒杆菌 D110

D110 菌株是以北京棒杆菌 AS1.299 为出发菌株，经硫酸二乙酯 (DES) 多次诱变处理后选育的。该菌体适合于甜菜糖蜜为原料的谷氨酸发酵。

### 4. 棒杆菌 S-914

S-914 菌株是从土壤中分离得到的棒状杆菌。

(1) 形态特征：细胞为两端钝圆的杆菌，伴随生活环境的变化或培养时间的推移，形态会有所变化，如椭圆形、短杆形和棍棒形等；细胞排列为单个、成对或 V 字形；细胞大小为  $(1\sim 4)\mu\text{m}\times(0\sim 0.5)\mu\text{m}$ ；不形成芽孢。

(2) 生理特征 在 pH 值为  $5\sim 9$  范围内生长良好；生物素和维生素 B 是必需生长因子；有脲酶活力。

(3) 培养特征 在肉汁琼脂斜面上培养，菌落呈淡黄色；在含 0.1% 酵母膏的加糖肉汁琼脂平板上培养，菌落呈淡黄色，直径为  $1.5\sim 2.0\text{mm}$ 。

### 5. 钝齿棒杆菌 AS1.542

(1) 形态特征 细胞两端钝圆，不分枝，在肉汁琼脂斜面上培养，细胞呈短杆状或棒状；单个、成对或 V 字形排列，大小为  $(0.7\sim 0.9)\mu\text{m}\times(1.0\sim 3.4)\mu\text{m}$ ；革兰氏染色呈阳性反应；在细胞内次极端有异染颗粒；细胞内有数个横隔；不形成芽孢；无运动能力。

(2) 生理特征 好氧并兼厌氧性；在  $20\sim 37^{\circ}\text{C}$  范围内生长良好， $30^{\circ}\text{C}$  为最适生长温

度, 39℃时生长微弱; 在 pH 值为 6~9 范围内生长良好; 有脲酶活力; 生物素为必需生长因子; 在含 2.5% 尿素的普通肉汁琼脂培养基上生长良好, 当尿素含量提高时, 菌体生长受影响; 在含 7.5% 氯化钠的肉汁琼脂培养基上生长良好, 当将氯化钠浓度提高至 10% 时, 菌体生长受影响; 不受北京棒杆菌 AS1.299 的噬菌体感染。

(3) 培养特征 在肉汁琼脂斜面上培养, 菌落呈草黄色, 表面湿润、无光泽, 边缘较薄显钝齿状, 不产生水溶性色素; 在肉汁琼脂平板上培养 48h, 菌落呈草黄色, 直径为 3~4mm, 表面湿润、无光泽, 边缘呈钝齿状, 产生水溶性色素; 在柱形肉汁琼脂中穿刺培养, 沿穿刺线均能生长, 但不扩展。

#### 6. 钝齿棒杆菌 Hu7251

(1) 形态特征 细胞两端钝圆, 不分枝, 在肉汁琼脂斜面上培养, 细胞呈短杆状或棒状, 有的还略微弯曲不挺直; 细胞排列为单个、成对或 V 字形; 大小为 (0.7~0.9)  $\mu\text{m}$  × (1.0~3.4)  $\mu\text{m}$ ; 革兰氏染色呈阳性反应; 不形成芽孢; 无运动能力。

(2) 生理特征 好氧并兼厌氧性, 在 20~37℃ 范围内都能生长, 30℃ 为最适生长温度; 在 pH 值为 6~9 范围内生长良好; 生物素为必需生长因子; 有脲酶活力; 在含 7.5% 氯化钠的普通肉汁琼脂培养基上生长良好, 当氯化钠浓度提高到 10% 时, 菌体生长受影响; 在含 2.5% 尿素的普通肉汁琼脂培养基上生长良好, 当尿素浓度提高到 3% 时, 菌体生长受影响; 受钝齿棒杆菌 AS1.542 的噬菌体感染, 但不受北京棒杆菌 AS1.299 的噬菌体感染。

(3) 培养特征: 在肉汁琼脂斜面上划线培养, 菌落呈草黄色, 表面湿润、无光泽, 边缘较薄显钝齿状, 不产生水溶性色素; 在肉汁琼脂平板上培养 48h, 菌落呈草黄色, 直径为 3~5mm, 表面湿润、无光泽, 边缘较薄显钝齿状, 不产生水溶性色素。

#### 7. 钝齿棒杆菌 B9

B9 菌株是以钝齿棒杆菌 Hu7251 为出发菌株, 用氯化锂作为诱变剂, 经诱变处理后选育得到的。该菌株适合于淀粉质原料的谷氨酸发酵。

#### 8. 钝齿棒杆菌 B9-17-36

B9-17-36 菌株是以钝齿棒杆菌 B9 为出发菌株, 先后分别用亚硝基胍 (NTC) 和硫酸二乙酯 (DES) 诱变处理后选育得到的。该菌株适合于淀粉质原料的谷氨酸发酵。

#### 9. 黄色短杆菌 T6-13

(1) 形态特征 细胞两端钝圆, 不分枝, 呈短杆状, 以单个、成对或 V 字形排列; 大小为 (0.7~1.0)  $\mu\text{m}$  × (1.2~3)  $\mu\text{m}$ ; 革兰氏染色呈阳性反应; 无运动能力; 不产生孢子, 细胞内次极端有异染颗粒。

(2) 生理特征 好氧并兼厌氧性; 在 26~37℃ 范围内生长良好; 在 pH 值为 6~10 范围内生长良好; 有脲酶活力; 在含 10% 氯化钠的肉汁琼脂平板上生长良好, 当氯化钠提高至 12.5% 时, 生长受影响; 生物素是必需生长因子, 如果与生物素同时加入维生素 B 或一种氨基酸 (如天冬氨酸、丝氨酸、甘氨酸、苏氨酸) 时, 菌体的生长受到明显促进; 在含 0.5%~3.5% 尿素的普通肉汁琼脂培养基上生长良好, 当尿素含量提高至 5% 时, 菌体

生长受影响；受钝齿棒杆菌 AS1.542、B9 和 Hu7251 的噬菌体感染，但不受北京棒杆菌 AS1.299 的噬菌体感染。

(3) 培养特征 在肉汁琼脂斜面上划线培养 24h，菌落呈淡黄色，表面湿润光滑，不产生水溶性色素；在肉汁琼脂平板上培养 24h，菌落呈淡黄色，直径约为 1mm，表面湿润光滑，不产生水溶性色素；在柱形肉汁琼脂中穿刺培养，穿刺口的菌体生长良好，沿穿刺线的菌体生长情况较差。

#### 10. 黄色短杆菌 FM84-415

FM84-415 菌株是以黄色短杆菌 T6-13 为出发菌株，分别经过 60Co 和亚硝基胍的诱变处理选育得到的。该菌株具有耐高糖的特性，当培养基中初糖浓度在 19% 以上时菌体生长不受影响。

从总体来说，我国谷氨酸发酵所用菌种的产酸能力尚低于日本，因此，高产优良菌株的选育仍是我国当前谷氨酸生产面临的重要任务。

## 任务二 食品工业中常用的酵母菌及其应用

### 一、啤酒酵母

啤酒酵母属于典型的上面酵母，又称爱丁堡酵母，广泛应用于啤酒、白酒酿造和面包制作。

#### 1. 形态特征

啤酒酵母的细胞呈圆形或短卵圆形，大小为  $(3\sim7)\mu\text{m}\times(5\sim10)\mu\text{m}$ ，通常聚集在一起，不运动。细胞形态往往受培养条件的影响，但恢复原有的培养条件，细胞形态即可恢复原状。

单倍体细胞或双倍体细胞都能以多边出芽方式进行无性繁殖，也能以形成子囊和子囊孢子的方式进行有性繁殖，产生 1~4 个子囊孢子。

#### 2. 培养特征

麦芽汁固体培养，菌落呈乳白色，不透明，有光泽，表面光滑湿润，边缘略呈锯齿状；随着培养时间的延长，菌落颜色变暗，失去光泽。麦芽汁液体培养，表面产生泡沫，液体变混浊，培养后期菌体悬浮在液面上形成酵母泡盖，因此称上面酵母。

#### 3. 生理生化特性

啤酒酵母属化能异养型，能发酵葡萄糖、果糖、半乳糖、蔗糖等，不发酵乳糖，也不发酵淀粉、纤维素等多糖。兼性厌氧，有氧条件下，将糖彻底氧化为  $\text{CO}_2$  和  $\text{H}_2\text{O}$ ，释放大量能量供细胞生长；无氧条件下，使可发酵性糖类通过发酵作用（EMP 途径）生成酒精和  $\text{CO}_2$ ，释放较少能量供细胞生长。

啤酒酵母不分解蛋白质，可同化氨基酸和氨态氮，不同化硝酸盐，需要 B 族维生素和 P、S、Ca、Mg、K、Fe 等无机元素。最适生长温度为 25℃，发酵最适温度为 10~25℃。最适发酵 pH 值为 4.5~6.5。

## 二、葡萄酒酵母

葡萄酒酵母属于啤酒酵母的椭圆变种，简称椭圆酵母，常用于葡萄酒和果酒的酿造。

### 1. 形态特征

葡萄酒酵母的细胞呈椭圆形或长椭圆形，大小为  $(3\sim 10)\mu\text{m} \times (5\sim 15)\mu\text{m}$ ，不运动。细胞形态往往受培养条件的影响，但恢复原有的培养条件，细胞形态即可恢复原状。

单倍体细胞或双倍体细胞都能以多边出芽方式进行无性繁殖。在环境条件不良时以形成子囊和子囊孢子的方式进行有性繁殖。

### 2. 培养特征

葡萄汁固体培养，菌落呈乳黄色、不透明、有光泽，表面光滑湿润，边缘整齐；随培养时间延长，菌落颜色变暗。

液体培养变浊，表面形成泡沫，凝聚性较强，培养后期菌体沉降于容器底部。

### 3. 生理生化特点

葡萄酒酵母属化能异养型，可发酵葡萄糖、果糖、蔗糖、麦芽糖、半乳糖等，不发酵乳糖、蜜二糖和甘油醛，也不发酵淀粉、纤维素等多糖。属兼性厌氧菌。

葡萄酒酵母不分解蛋白质，不还原硝酸盐，可同化氨基酸和氨态氮。需要 B 族维生素和 P、S、Ca、Mg、K、Fe 等无机元素。

葡萄酒酵母最适生长温度 22~30℃，低于 16℃ 生长缓慢，40℃ 停止生长。耐酸，耐乙醇，耐高渗，耐二氧化硫能力强于啤酒酵母。葡萄酒发酵后乙醇含量达 16% 以上。

## 三、卡尔酵母

卡尔酵母属于典型的下面酵母，又称卡尔斯伯酵母或嘉士伯酵母，常用于啤酒酿造、药物提取以及维生素测定。

### 1. 形态特征

卡尔酵母的细胞呈椭圆形，大小为  $(3\sim 5)\mu\text{m} \times (7\sim 10)\mu\text{m}$ ，通常分散独立存在，不运动。单倍体细胞或双倍体细胞大多以单端出芽方式进行无性繁殖。采用特殊方法培养才能进行有性生殖形成子囊孢子。

### 2. 培养特征

麦芽汁固体培养，菌落呈乳白色，不透明，有光泽，表面光滑湿润，边缘整齐；随培养时间延长，菌落颜色变暗，失去光泽。

麦芽汁液体培养，表面产生泡沫，液体变混浊，培养后期菌体沉降于容器底部，因此



又称下面酵母。

### 3. 生理生化特点

卡尔酵母属化能异养型，能发酵葡萄糖、果糖、半乳糖、蔗糖、麦芽糖、蜜二糖、麦芽三糖和甘油醛以及全部棉子糖，不发酵乳糖以及淀粉、纤维素等多糖。属兼性厌氧菌。

卡尔酵母不分解蛋白质，不还原硝酸盐，可同化氨基酸和氨态氮。需要 B 族维生素以及 P、S、Ca、Mg、K、Fe 等无机离子。

卡尔酵母最适生长温度为 25℃，啤酒发酵最适温度为 5~10℃。最适发酵 pH 值为 4.5~6.5。

## 四、产蛋白假丝酵母

产蛋白假丝酵母又称产朊假丝酵母或食用圆酵母，富含蛋白质和 B 族维生素，常作为生产食用或饲用单细胞蛋白（SCP）以及 B 族维生素的菌株。

### 1. 形态特征

产蛋白假丝酵母的细胞呈圆形、椭圆形或腊肠形，大小为  $(3.5\sim 4.5)\mu\text{m}\times(7.0\sim 13.0)\mu\text{m}$ ，以多边出芽方式进行无性繁殖，形成假菌丝。没有发现有性生殖和有性孢子，属于半知菌类酵母菌。

### 2. 培养特征

麦芽汁固体培养，菌落呈乳白色，表面光滑湿润，有光泽或无光泽，边缘整齐或菌丝状；玉米固体培养产生原始状假菌丝。葡萄糖酵母汁蛋白陈液体培养，表面无菌膜，液体混浊，管底有菌体沉淀。

### 3. 生理生化特点

产蛋白假丝酵母属化能异养型，能发酵葡萄糖、蔗糖和 1/3 的棉子糖，不发酵半乳糖、麦芽糖、乳糖、蜜二糖。能同化尿素、铵盐和硝酸盐，不分解蛋白质和脂肪。

产蛋白假丝酵母属兼性厌氧型，有氧条件下进行有氧呼吸，无氧条件下进行酒精发酵。产蛋白假丝酵母最适生长温度为 25℃，最适生长 pH 值为 4.5~6.5。

发酵工业中，常采用富含半纤维的纸浆废液、稻草、稻壳、玉米芯、木屑、啤酒废渣等水解液和糖蜜为主要原料，培养产蛋白假丝酵母，生产食用或饲用单细胞蛋白和 B 族维生素。

## 五、酵母菌在食品工业中的应用

### （一）啤酒酿造

啤酒酿造是以大麦、水为主要原料，以大米或其他未发芽的谷物、酒花为辅助原料，经过制备麦芽、糖化、发酵等工序制成的富含营养物质和 CO<sub>2</sub> 的酒精饮料。啤酒营养丰

富，含酒精低，易被人体吸收。我国目前啤酒生产总量居世界前列，但人均水平仍落后于西方发达国家。

啤酒根据酵母品种可分为上面发酵啤酒和下面发酵啤酒；根据颜色可分为淡色啤酒和浓色啤酒；根据生产方式可分为鲜啤酒、纯鲜啤酒和熟啤酒。

### 1. 啤酒发酵优良酵母的评估及选育

(1) 啤酒酵母应具有的良好性状 ①生长繁殖力强，发酵活力高；②代谢产物能够赋予啤酒良好的风味；③凝聚性强，沉降速度快，发酵结束易与发酵液分离，便于菌体回收。

(2) 优良菌种的选育 ①菌种筛选；②诱变育种；③杂交育种，如通过杂交育种有可能获得凝聚性强、风味良好、发酵度比较高的新菌种；④细胞融合育种，如凝聚性强但发酵度低的菌株和发酵度高但凝聚性弱的菌株通过细胞融合有可能产生凝聚性强和发酵度高的新型细胞。

### 2. 啤酒酵母的扩大培养

#### (1) 工艺流程

斜面原种→活化（25℃，1~2天）→2个100mL富士瓶（25℃，1~2天）→2个1000mL巴士瓶（25℃，1~2天）→2个10L卡氏罐（25℃，1~2天）→200L汉森式种母罐（15℃，1~2天）→2t扩大罐（10℃，1~2天）→10t繁殖槽→（8℃，1~2天）→主发酵

#### (2) 技术要点

①温度控制：培养初期，采用酵母菌最适生长温度25℃培养，之后每扩大培养一次，温度均有所降低，使酵母菌逐步适应低温发酵的要求。

②接种时间：每次扩大培养均采用对数生长期后期的种子液接种，一般泡沫达到最高将要回落时为对数生长期。

③注意及时通风供氧：从斜面原种至卡氏罐为实验室扩大培养阶段，应注意每天定时摇动容器，达到供氧目的；从汉森罐至酵母繁殖槽为生产现场扩大培养阶段，应定时通入无菌压缩空气供氧。

### 3. 啤酒酿造工艺

生产工艺流程：原料大麦→清选→分级→浸渍→发芽→干燥→麦芽及辅料粉碎→糖化→过滤→麦汁煮沸→麦汁沉淀→麦汁冷却→接种→酵母繁殖→主发酵→后发酵→过滤→包装→杀菌→贴标→成品

发酵过程：冷却麦芽汁入酵母繁殖槽，接种6代以内回收的酵母泥5%（或扩大培养的种子液），控制品温6~8℃，好氧培养12~24h，待起发后入发酵池（罐）进行主发酵。

主发酵：主发酵也称前发酵，可分为四个时期：入发酵池（罐）后4~5h，酵母菌产生的CO<sub>2</sub>使麦芽汁饱和，在麦芽汁表面出现白色乳脂状气泡，称为起泡期。此时不需人工降温，保持2~3天。随着发酵的进行，酵母菌厌氧代谢旺盛，使泡沫层加厚、温度升高，发酵进入高泡期。此时需开动冰水人工降温，最高发酵温度不超过9℃，保持2~3

天。发酵 5~6 天后，泡沫开始回缩，颜色变深，称为落泡期。此时需开动冰水逐渐降温，维持 2 天。发酵 7~8 天后，泡沫消退，形成泡盖（由酒花树脂、蛋白质多酚复合物、泡沫和死酵母构成），称为泡盖形成期。此时应急剧降温至 4~5℃，使酵母沉降，并打捞泡盖，回收酵母，结束主发酵。

后发酵：主要作用是使残糖继续发酵，促进 CO<sub>2</sub> 在酒液中饱和；同时利用酵母内酶还原双乙酰。

后处理：后发酵结束，酒液经过过滤、装瓶、热杀菌（60℃，30min）处理，称为熟啤酒，而不经过热杀菌的啤酒称为鲜啤酒。

## （二）果酒酿造

果酒是以多种水果如葡萄、苹果、梨、橘子、山楂、杨梅、猕猴桃等为原料，经过破碎、压榨，制取果汁；果汁通过酵母菌的发酵作用形成原酒；原酒再经陈酿、过滤、调配、包装等工艺制成的酒精含量在 8.5% 以上、含多种营养成分的饮料酒。在各种果酒中葡萄酒是主要品种，其产量在世界饮料酒中居第二位。

果酒一般以所用的原料来命名，如葡萄酒、苹果酒、梨酒等；根据酿制方法可分为发酵酒、蒸馏酒、露酒、汽酒等；根据含糖量可分为干酒、半干酒、半甜酒、甜酒；根据酒精含量可分为低度果酒和高度果酒。

果酒酿造工艺流程：

水果→分选→洗涤→破碎→压榨→果汁→成分调整→添加 SO<sub>2</sub>、接种酒母→主发酵→后发酵→陈酿→冷、热处理→过滤→调配→灌酒→杀菌→贴标→成品

果酒酿造主要是前发酵和后发酵。前发酵的目的是进行酒精发酵，产生芳香物质，浸提色素物质。前发酵有分离发酵法和混合发酵法两种。分离发酵法是水果经破碎、压榨后，仅有果汁入发酵池进行发酵。混合发酵法是水果破碎后不经压榨，将果汁、果浆、皮渣一起入发酵池进行发酵。后发酵的目的是继续发酵使残糖下降；在低温缓慢的后发酵中，前发酵原酒中残留的部分酵母及其他果肉纤维等悬浮物逐渐沉降，形成酒泥，使酒逐步澄清；排放溶解的 CO<sub>2</sub>；氧化还原及酯化作用。

## （三）白酒酿造

白酒是以曲类、酒母等为糖化发酵剂，利用粮谷或代用原料经蒸煮、糖化发酵、蒸馏、贮存、勾兑而成的蒸馏酒。

白酒的质量与风味，由于所用原料、糖化剂和发酵工艺的不同差异很大。有按原料命名的，如高粱酒、玉米酒、米酒等；有按发酵剂命名的，如大曲酒、小曲酒、麸曲酒等。

白酒工业生产方法，根据发酵物料状态不同可分为固态发酵法、半固态发酵法和液态发酵法。我国传统工艺是以固态发酵法为主。

### 1. 酒曲的主要种类

（1）大曲 大曲是固态发酵法酿造大曲白酒的糖化发酵剂。它以小麦或大麦、豌豆为曲料，经过粉碎、加水拌料、踩曲制坯、堆积培养，依靠自然界带入的各种酿酒微生物

(包括细菌、霉菌和酵母菌)在其中生长繁殖制成成曲,再经贮存后制成陈曲。大曲有高温曲(制曲温度在60℃以上)和中温曲(制曲温度不超过50℃)两种类型。目前国内绝大多数著名的大曲白酒均采用高温曲生产,如茅台、泸州、西凤、五粮液等。

(2) 麸曲 麸曲是固态发酵法酿造麸曲白酒的糖化剂。它以麸皮为主要曲料,以新鲜酒糟为配料,经过润水、蒸煮、冷却后,接种黑曲霉和黄曲霉混合(混合比例为7:3),再经通风培养制成成曲。

(3) 小曲(米曲) 小曲(米曲)是半固态发酵法酿造小曲白酒(米酒)的糖化发酵剂。它以米粉或米糠为原料,添加或不添加中草药,经过浸泡、粉碎,接入纯种根霉和酵母菌或两者混合种曲,再经制坯、入室培养、干燥等工艺制成小曲。

(4) 液体曲 液体曲可作为液态发酵法酿酒制醋的糖化剂。它是将曲霉菌的种子液接入发酵培养基中,在发酵罐中进行深层液体通气培养,得到含有丰富酶系的培养液称为液体曲。

## 2. 固态发酵法生产工艺

### (1) 特点

①低温双边发酵:采用较低的温度,让糖化作用和发酵作用同时进行,即采用边糖化边发酵工艺。生产上糖化和发酵处于同样的低温条件下,可防止发酵过程中的酸败,防止微生物产生酶的钝化,有利于酒香味的保存和甜味物质的增加。

②配醅蓄浆发酵:由于高粱、玉米等颗粒组织紧密,又处于固态发酵,所以淀粉不易充分利用。因此生产上常采用对蒸馏后的醅,添加一部分新料,配醅继续发酵,反复多次。这是我国所特有的白酒生产工艺,称为续渣发酵。这样做的目的是使淀粉充分利用,能调节酸度及淀粉的浓度,增加微生物营养及风味物质。

③多菌种混合发酵:固态法白酒生产,在整个生产过程中都是敞口操作,空气、水、工具、窖地等各种渠道都能把大量的、多种多样的微生物带入到料醅中,它们与曲中的有益微生物协同作用,产生出丰富的香味物质,因此固态发酵是多菌种混合发酵。

④固态蒸馏:发酵后的酒醅采用固态蒸馏方式,不仅是浓缩酒精的过程,而且是香味的提取和重新组合的过程。

⑤界面复杂:白酒固态发酵时,窖内气相、液相、固相三种状态同时存在,这个条件有力地支配着微生物的繁殖与代谢,形成白酒特有的芳香。

(2) 大曲的生产 根据原料、生产用曲、操作方法以及产品风味的不同,一般可将固态法生产的白酒分成大曲酒、麸曲酒和小曲酒三种类型。本书只讨论大曲与大曲酒的生产。

①大曲的特点:制曲原料要求含有丰富的碳水化合物(主要是淀粉)、蛋白质以及适量的无机盐等,能够供给酿酒有益微生物生长所需的营养物质;生料制曲,有利于保存原料中所含有的丰富的水解酶类;自然接种。

②大曲的种类:一般根据制曲过程中对控制曲坯最高温度的不同,大致分为高温曲、中温曲和低温曲。高温曲主要用于制酱香型酒,中温曲用于酿制清香型酒,某些传统浓香型酒也有采用低温曲的。

③高温曲的生产工艺：主要包括选料磨碎、润料、拌料、踩曲、曲的堆积培养及贮存等环节。

#### （四）面包加工

面包是以面粉、糖、水为主要原料，经过和面、发酵、整形、成型、烘烤、冷却、包装等程序加工而成的焙烤食品。它是一种营养丰富、组织膨松、易于消化的方便食品。

面包的种类很多，按照加入糖和盐量的不同可分为甜面包和咸面包；按照成型方法不同可分为模具吐司类和非模具型面包；按照配料不同可分为普通面包和特制及高级面包；按照面包柔软度可分为软式面包和硬式面包；按照消费习惯可分为主食面包和点心面包。

面包发酵剂菌种是啤酒酵母，应选择发酵力强、风味良好、耐热、耐酒精的微生物在食品工业中的应用酵母菌株。

面包发酵剂类型有压榨酵母和活性干酵母两种。压榨酵母又称鲜酵母，是酵母菌经液体深层通气培养后再经压榨而制成的，发酵活力高，使用方便，但不耐贮藏。活性干酵母是压榨酵母经低温干燥或喷雾干燥或真空干燥而制成的，便于贮藏和运输，但活性有所减弱，需经活化后使用。

面包生产工艺流程：

准备材料→搅拌→发酵→分割→滚圆→松弛→造型→最后醒发→烘烤→冷却→包装

#### （五）单细胞蛋白的开发

单细胞蛋白主要是指酵母菌、细菌、真菌等微生物蛋白质资源，即用发酵法培养微生物而获得的菌体蛋白，又称微生物蛋白、菌体蛋白。按产生菌的种类不同，又可分为细菌蛋白、真菌蛋白等。

##### 1. 应用微生物生产单细胞蛋白的优点

(1) 生产效率高，比动植物高成千上万倍 主要是因为微生物生长繁殖速度快。如500kg的酵母在24h内可生产80t蛋白质，而一头同样质量的公牛在同样时间内仅生产400~500g蛋白质；一只鸡在两个月中只能产生2kg的肉，却要消耗8.4kg的植物蛋白。

(2) 生产原料来源广 用于生产单细胞蛋白的原料有以下几类：①工农业生产的废弃物和下脚料，如秸秆、蔗渣、甜菜渣、木屑等含纤维素的废料及纸浆废液、啤酒废渣、味精废液、淀粉废液、豆制品废液；②碳水化合物类，如淀粉质和纤维质的水解糖液；③碳氢化合物类，如甲烷、乙烷、丙烷及短链烷烃；④石油产品类。

(3) 可工业化生产 它不仅需要的劳动力少，不受地区、季节、气候的限制，而且生长条件完全受人工控制，可在工厂中大量生产。

##### 2. 生产单细胞蛋白常用菌种

具有原核细胞的细菌、放线菌、蓝藻和具有真核细胞的酵母菌、霉菌、担子菌和原生动物等各种微生物都可作为生产单细胞蛋白的菌种。现在工业上生产用的资源主要是酵母菌、细菌以及一部分担子菌和藻类。最早用于生产单细胞蛋白且应用最广的是酵母菌，主

要原因是其个体大，易从培养介质中回收，酵母成品的色、香、味易为人们所接受。

### 3. 单细胞蛋白的作用

单细胞蛋白不仅能制成人造肉供人们直接食用，还常作为食品添加剂，用于补充蛋白质或维生素、矿物质等。由于某些单细胞蛋白具有抗氧化能力，使食物不容易变质，因而常用于婴儿米粉及汤料、作料中。由于酵母含热量低，也常作为减肥食品的添加剂。酵母的浓缩蛋白具有显著的鲜味，已广泛用作食品的增鲜剂。在畜禽饲料中，只要添加3%~10%的单细胞蛋白，就能大大提高饲料的营养价值和利用率。

## 任务三 食品工业中常用的霉菌及其应用

### 一、毛霉属

按安斯沃思的分类系统，毛霉属属于接合菌亚门、接合菌纲、毛霉目、毛霉科，该菌有很强的分解蛋白质和糖化淀粉的能力，因此常用于酿造、发酵食品等工业。

#### (一) 毛霉的生物学特性

毛霉菌落呈絮状，初为白色或灰白色，后变为灰褐色；菌丛高度可由几毫米至十几厘米，有的具有光泽。菌丝无隔，分气生、埋生，后者在基质中较均匀分布，吸收营养；气生菌丝发育到一定阶段，即产生垂直向上的孢囊梗，梗顶端膨大形成孢子囊，囊成熟后，囊壁破裂释放出孢囊孢子；囊轴呈椭圆形或圆柱形；孢囊孢子为球形、椭圆形或其他形状；单细胞，壁薄而光滑，无色或黄色；有性孢子（接合孢子）为球形，黄褐色，有的有突起。

#### (二) 常见的毛霉菌种

##### 1. 高大毛霉

菌落初期为白色，随培养时间的延长，逐渐变为淡黄色，有光泽，菌丝高达3~12cm或更高。孢子囊柄直立不分枝，孢子囊壁有草酸钙结晶。此菌能产生3-羟基丁酮、脂肪酶。

##### 2. 总状毛霉

总状毛霉是毛霉中分布最广的一种。菌丝初期为白色，后期为黄褐色；孢子囊柄总状分枝。孢子囊为球形，褐色；孢子较短，卵形。厚垣孢子数量很多，大小均匀，为无色或黄色。该菌种的最适生长温度为23℃，低于4℃和高于37℃环境下都不能生长。我国四川的豆豉即用此菌制成。

### 3. 鲁氏毛霉

此菌种最初是从我国小曲中分离出来的。菌落在马铃薯培养基上呈黄色，在米饭上略带红色，孢子囊柄呈假轴状分枝，厚垣孢子数量很多，大小不一，黄色至褐色，接合孢子未见。鲁氏毛霉能产生蛋白酶，有分解大豆的能力，我国多用它来做豆腐乳。

## 二、根霉属

根霉属与毛霉类似，能产生大量的淀粉酶，故用作酿酒、制醋业的糖化菌。有些种的根霉还用于甾体激素、延胡索酸和酶剂制的生产。

### （一）根霉的生物学特性

根霉的菌丝为无隔单细胞，生长迅速，有发达的菌丝体，气生菌丝白色、蓬松，如棉絮状。

根霉气生性强，故大部分菌丝匍匐生长在营养基质的表面，这种气生菌丝称为匍匐菌丝。基内菌丝根状称为假根。由假根着生处向上长出直立的2~4根孢囊梗，孢囊梗不分枝，梗的顶端膨大形成孢囊，同时产生横隔，囊内形成大量孢囊孢子。

根霉的有性生殖产生接合孢子。除有性根霉为同宗结合外，其他根霉都是异宗结合。

### （二）常见的根霉菌种

#### 1. 米根霉

这个种在我国酒药和酒曲中常看到，在土壤、空气以及其他各种物质中亦常见。菌落疏松，初期白色，后变为灰褐色到黑褐色，匍匐枝爬行，无色。假根发达，指状或根状分枝，褐色，孢囊梗直立或稍弯曲，2~4根，群生。尚未发现其形成接合孢子，发育温度为30~35℃，最适生长温度37℃，41℃下亦能生长。此菌有淀粉酶、转化酶，能产生乳酸、反丁烯二酸及微量的酒精。产L(+)乳酸量最强达70%左右，是腐乳发酵的主要菌种。

#### 2. 华根霉

此菌多出现在我国酒药和药曲中，这个种耐高温，在45℃下能生长，菌落疏松或稠密，初期白色，后变为褐色或黑色，假根不发达，短小，手指状。孢子囊柄通常直立、光滑、浅褐色至黄褐色。不生接合孢子，发育温度为15~45℃，最适生长温度为30℃。此菌淀粉液化力强，有溶胶性，能产生酒精、芳香脂类、左旋乳酸及反丁烯二酸，能转化甾族化合物。

## 三、红霉属

红霉属又称链孢霉，因子囊孢子表面有纵形花纹，犹如叶脉而得名脉孢菌，属于囊菌

亚门。其菌丝透明，有分枝，具隔膜，疏松呈网状，无色、白色或灰色。无性繁殖形成分生孢子，一般为卵圆形，在气生菌丝顶部形成分枝链，分生孢子呈橘黄色或粉红色，常生在面包等淀粉性食物上，故俗称红色面包霉。有性过程产生子囊和子囊孢子，属异宗配合。

红霉属是研究遗传学的好材料。因为它的子囊孢子在于囊内呈单向排列，表现出有规律的遗传组合。如果用两种菌杂交形成的子囊孢子分别培养，可研究遗传性状的分离及组合情况。在生化途径的研究中也被广泛应用。此外，菌体内含有丰富的蛋白质、维生素B12等。链孢霉属种类多，主要有橙色链孢霉、粗糙链孢霉、好食链孢霉，有些种类可用于发酵工业。链孢霉多为腐生，有许多种是植物的病原菌。链孢霉属在污染过程中靠气流传播，传播力极强，蔓延快，危害极大，一旦发生，难以治理，一般进行掩埋或焚烧。最常见的菌种如粗糙脉孢菌、好食脉孢菌。有的可造成食物腐烂。

## 四、曲霉属

曲霉属广泛分布于土壤、空气、谷物和各类有机物中，在湿热相宜条件下，引起皮革、布匹和工业品发霉及食品霉变。同时，曲霉也是发酵工业和食品加工方面应用的重要菌种，如黑曲霉是化工生产中应用最广的菌种之一，用于柠檬酸、葡萄糖酸、淀粉酶和酒类的生产。米曲霉具有较强的淀粉酶和蛋白酶活力，是酱油、面酱发酵的主发酵菌。

### （一）曲霉属的生物学特性

本属菌丝有隔，多细胞，菌落呈圆形，以分生孢子方式进行无性繁殖。本属分生孢子呈绿、黄、橙、褐、黑等各种颜色，故菌落颜色多种多样，而且比较稳定，是分类的主要特征之一。曲霉菌的有性世代产生闭囊壳，其中着生圆球状子囊，囊内含有8个子囊孢子，子囊孢子大都无色，有的菌种呈红、褐、紫等颜色。

### （二）常见的曲霉菌

#### 1. 米曲霉

米曲霉菌落生长快，10天直径达5~6cm，质地呈疏松，初白色、黄色，后变为褐色至淡绿褐色，背面无色。分生孢子头呈放射状，直径达150~300 $\mu\text{m}$ ，也有少数为疏松柱状。分生孢子梗2mm左右，近顶囊处直径可达12~25 $\mu\text{m}$ ，壁薄、粗糙。顶囊近球形或烧瓶形，大小为40~50 $\mu\text{m}$ 。小梗一般为单层，大小为12~15 $\mu\text{m}$ ，偶尔有双层，也有单、双层小梗同时存在于一个顶囊上的。分生孢子幼时呈洋梨形或卵圆形，老后大多变为球形或近球形，一般直径为4.5 $\mu\text{m}$ ，粗糙或近于光滑。米曲霉依靠各种孢子繁殖，以无性孢子繁殖为主。在适宜条件下，米曲霉可生成大量分生孢子。

#### 2. 黄曲霉

黄曲霉菌生长温度为6~47 $^{\circ}\text{C}$ ，最适生长温度为30~38 $^{\circ}\text{C}$ ，生长的最低水分活度为



0.8~0.86。黄曲霉菌分布很广泛，在各类食品和粮食上均能出现。有些种产生黄曲霉毒素，使食品和粮食污染带毒。黄曲霉毒素毒性很强，有致癌、致畸作用。该菌产毒的最适温度为27℃。有些菌株具有很强的糖化淀粉、分解蛋白质的能力，因而广泛用于白酒、酱油和酱的生产。黄曲霉有如下特点：

①菌落生长快，柔毛状，平坦或有放射状沟纹；初为黄色，后变为黄绿或褐绿色；反面无色或略带褐色。有的菌株产生灰褐色的菌核。

②菌体分生孢子梗壁粗糙或有刺，无色；分生孢子头为半球形、柱形或扁球形；小梗一层或两层，在同一顶囊上有时单、双层并存；顶囊近球形或烧瓶状；分生孢子球形，表面光滑或粗糙。

### 3. 黑曲霉

该群是接近高温性的霉菌，最适生长温为35~37℃，最高可达50℃；孢子萌发的水分活度为0.80~0.88，是自然界中常见的霉腐菌。黑曲霉有如下特点：

①菌落菌丝密集，初为白色，扩散生长，培养时间延长，菌丝变为褐色，分生孢子形成后由中央变黑，逐步向四周扩散，有的有放射状沟纹；背面无色或黄褐色。

②菌体分生孢子梗壁厚，光滑，分生孢子头球形，放射状或裂成几个放射的柱状，黑色或褐色，分生孢子球形；菌丝有横隔。

该菌具有多种活性强大的酶系，可用于工业生产，如淀粉酶用于淀粉的液化、糖化以及生产酒精、白酒或制造葡萄糖和糖化剂；酸性蛋白酶用于蛋白质的分解或食品添加剂的制造及皮毛软化；果胶酶用于水解聚半乳糖醛酸、果汁澄清和植物纤维精。

## 五、青霉属

青霉属在自然界中广泛分布，一般在较潮湿冷凉的基质上易分离到它。许多是常见的有害菌，破坏皮革、布匹以及引起谷物、水果、食品等变质。青霉属不仅导致食品和原材料的霉腐变质，而且有些种可产生毒素，引起人、畜中毒；也有些青霉菌是重要的工业菌株，在医药、发酵、食品工业上广泛应用于生产抗生素和多种有机酸，如生产柠檬酸、葡萄糖酸、纤维素酶和常用的抗生素——青霉素。

### （一）生物学特性

#### 1. 菌落

青霉属的菌落呈圆形，扩展生长；表面平坦或有放射状沟纹或有环状轮纹；有的有较深的皱褶，使菌落呈纽扣状；有的表面有各种颜色的渗出液，具有霉味或其他气味；四周常有明显的淡色边缘；菌落正面有青绿、蓝绿色、黄绿色、灰绿色。

#### 2. 菌丝

青霉属菌丝有隔，分气生、基生。大部分青霉菌只有无性世代，产生分生孢子，个别具有性世代，产生子囊孢子。进行无性繁殖时，在菌丝上向上长出芽突，单生直立或密集

成束，即为分生孢子梗。分生孢子梗向上长到一定程度，顶端分枝，每个分枝的顶端又继续生出一轮次生分枝称梗基；在每个梗基的顶端，产生一轮瓶状小梗；每个小梗的顶端生成串的分生孢子链。分枝、梗基、小梗构成帚状分枝；帚状分枝与分生孢子链构成帚状穗（青霉穗）；分生孢子呈球形、卵形或椭圆形，光滑或粗糙。

## （二）常见的青霉菌

### 1. 橘青霉

该菌属于不对称组、绒状亚组、橘青霉系。一般大米产区都有此菌发生，危害大米使其黄变（泰国黄变米），有毒，其毒素是橘青霉素。该菌最适生长温度为25~30℃，最高发育温度为37℃；生长的最低水分活度为0.80~0.85。

①菌落生长局限为10~14天，直径为2~2.5cm；有放射状沟纹；绒状，有的稍带絮状；艾绿色到黄绿色；有窄白边；渗出液淡黄色；反面黄色至褐色。

②菌体帚状枝典型的双轮生，不对称；分生孢子梗多数由基质长出，壁光滑，带黄色，长50~200μm；梗基2~6个，轮生于分生孢子梗上，明显散开，端部膨大；小梗6~10个，密集而平行，基部圆瓶形；分生孢子链为分散的柱状；分生孢子球形或近球形，直径为2.2~3.2μm，光滑或接近光滑。

### 2. 展开青霉

展开青霉是作为苹果的腐败菌被分离到的。

①菌落生长迅速，黄绿色至青绿色，束状，背面无色至黄褐色。

②菌体分生孢子梗长200~300μm，平滑，梗径为10~15μm，分生孢子小梗单轮生，分生孢子呈椭圆形或球形，大小为2.3μm×1μm。

## 六、霉菌在食品工业中的应用

### （一）酱油酿造

酱油是一种常用的咸味调味品，它是以蛋白质原料和淀粉质原料为主，经米曲霉等多种微生物共同发酵酿制而成。酱油中含有多种调味成分，有酱油的特殊香味、食盐的咸味、氨基酸钠盐的鲜味、糖及其他醇甜物质的甜味、有机酸的酸味、酪氨酸等爽适的苦味，还有天然的红褐色色素，可谓咸、酸、鲜、甜、苦五味调和，色、香俱备的调味佳品。

我国是世界上最早利用微生物酿造酱油的国家，迄今已有3000多年的历史，后技术传到日本、东南亚各国，成为世界范围内最受欢迎的调味品之一。在酱油酿造过程中，利用微生物将原料的蛋白质水解成多肽、氨基酸，成为酱油的营养成分以及鲜味的来源。另外，部分氨基酸进一步反应与酱油香气、色素的形成有直接关系。因此，蛋白质原料对酱油色、香、味、体的形成至关重要，是酱油生产的主要原料。酱油酿造一般选择大豆、脱

脂大豆作为蛋白质原料，也可选用其他蛋白质含量高的代用原料，例如蚕豆、豌豆、绿豆、花生饼、葵花子饼、芝麻饼、脱毒的菜子饼和棉子饼等。

### 1. 参与酱油酿造的微生物

酱油酿造是半开放式的生产过程，环境和原料中的微生物都可能参与到酱油的酿造中来。在酱油酿造的特定工艺条件下，并非所有的初始微生物都能良好生长。只有那些人工接种的或适合酱油酿造微生态环境的微生物，才能生长繁殖并发挥作用。参与酱油酿造的微生物主要有米曲霉、酵母、乳酸菌及其他细菌，它们具有各自的生理生化特性，对酱油品质的形成有重要作用。

(1) 米曲霉 米曲霉是曲霉的一种。由于它与黄曲霉十分相似，所以过去很长一段时间归属于黄曲霉群，甚至直接就称黄曲霉。后来证明，生产酱油的黄曲霉不产黄曲霉毒素，为了区分产黄曲霉毒素的黄曲霉，特冠以米曲霉的名称。

米曲霉酶系复杂，分泌的胞外酶有蛋白酶、 $\alpha$ -淀粉酶、糖化酶、谷氨酰胺酶、果胶酶、半纤维素酶等，胞内酶有氧化还原酶等。蛋白酶、 $\alpha$ -淀粉酶、糖化酶、谷氨酰胺酶活力的高低与酱油品质及原料利用率的关系密切。

米曲霉可以利用的碳源是单糖、双糖、淀粉、有机酸、醇类等，氮源如铵盐、硝酸盐、尿素、蛋白质、酰胺等都可以利用。磷、钾、镁、硫、钙等也是米曲霉生长所必需的。因为米曲霉分泌的蛋白酶和淀粉酶是诱导酶，在制酱油曲时要求配料中有较高的蛋白质和适当的淀粉含量，以诱导酶的生成。大豆或脱脂大豆富含蛋白质，小麦、麸皮含有淀粉，这些农副产品也含有较丰富的维生素、无机盐等营养物质，以适当的配比混合作制曲的原料，能满足米曲霉繁殖和产酶的需要。

对应用于酱油生产的米曲霉菌株的基本要求：不产黄曲霉毒素，蛋白酶和淀粉酶活力高，有谷氨酰胺酶活力，生长快速，培养条件粗放，抗杂菌能力强，不产生异味，酿制的酱油香气好。目前国内常用的菌株如下：

①AS3.863：蛋白酶、糖化酶活力强，生长繁殖快速，制曲后生产的酱油香气好。

②AS3.951（沪酿3.042）：以AS3.863为出发菌株，用紫外线诱变得到的。蛋白酶活性比出发菌株高，用于酱油生产蛋白质利用率可达75%。生长繁殖快，对杂菌抵抗力强，制曲时间短，生产的酱油香气好。但该菌株的酸性蛋白酶活力低。

③UE328、UE336：以AS3.951为出发菌株，用快中子、Co、紫外线、乙基磺酸甲烷、氯化锂等诱变剂处理得到，酶活性是出发菌株的170%~180%。UE328适用于液体培养，UE336适用于固体培养。UE336的蛋白质利用率为79%，但制曲时孢子发芽较慢，制曲时间延长4~6h。

④渝3.811：从曲室泥土中分离出菌株后经紫外线三次诱变后得到的新菌株。孢子发芽率高，菌丝生长快速旺盛，孢子多，适应性强，制曲易管理，酶活力高。

⑤酱油曲霉：酱油曲霉是日本学者坂口从酱曲中分离出来的，用于酱油生产。酱油曲霉分生孢子表面有小突起，孢子柄表面平滑，与米曲霉相比，其碱性蛋白酶活力较强。在分类上酱油曲霉属于米曲霉系。

(2) 酵母菌 从酱醪中分离出的酵母菌有7个属23个种，其中有的对酱油风味和香

气的形成有重要作用。它们多属于鲁氏酵母和球拟酵母。

鲁氏酵母是酱油酿造中的主要酵母菌。菌体在麦芽汁中培养 3 天，细胞为小圆形或卵圆形，大小为  $(2.5\sim 5)\mu\text{m}\times(3.5\sim 8.5)\mu\text{m}$ 。适宜生长温度为  $28\sim 30^{\circ}\text{C}$ ， $38\sim 40^{\circ}\text{C}$  生长缓慢， $42^{\circ}\text{C}$  不生长。最适 pH 值为 4~5。生长并活跃在酱醅这一特殊环境中的鲁氏酵母是一种耐盐性强的酵母，抗高渗透压，在含食盐 5%~8% 的培养基中生长良好，在 18% 食盐浓度下仍能生长，在 24% 盐浓度下生长弱。维生素 H、肌醇、胆碱、泛酸能促进它在高食盐浓度下的生长。在高食盐浓度下，其生长 pH 值范围很窄，为 4.0~5.0。培养基中食盐浓度不同时，这些酵母发酵糖类的情况也不同。在不添加食盐的基质中，利用葡萄糖和麦芽糖发酵；而在食盐浓度 18% 的培养基中，容易利用葡萄糖发酵，几乎不利用麦芽糖。

球拟酵母在酱醅发酵后期开始活跃。随着发酵进行，糖浓度降低、pH 值下降，鲁氏酵母发生自溶，而球拟酵母开始活跃。球拟酵母是酯香型酵母，能生成酱油的重要芳香成分，如酯类等。因此，球拟酵母与酱醅的香味成熟有关。在发酵后期的酱醅中，由于糖分较少，已生成一定量的酒精，氨基酸浓度增高，而且有高浓度的食盐存在，因此球拟酵母不会发生过度繁殖。但是，在采用添加人工培养酵母工艺时，加进多量鲁氏酵母不会发生不良影响，球拟酵母添加过量，会使酱醅香味恶化。这是因为球拟酵母生成过量醋酸、烷基苯酚等刺激性强的香味物质所造成。

(3) 乳酸菌 酱油乳酸菌是生长在酱醅这一特定生态环境中的特殊乳酸菌，在此环境中生长的乳酸菌是耐盐的。代表性的菌有嗜盐片球菌、酱油微球菌、植物乳杆菌。这些乳酸菌耐乳酸的能力不太强，因此，不会因产过量乳酸使酱醅 pH 过低而造成酱醅质量变坏。适量的乳酸是构成酱油风味的重要因素之一，不仅乳酸本身具有特殊的香味而对酱油有调味和增香作用，而且与乙醇生成的乳酸乙酯也是一种重要的香气成分。一般酱油中乳酸的含量为 15 mg/mL。在发酵过程中，由嗜盐片球菌和鲁氏酵母共同作用生成的糠醇，赋予酱油独特香气。酱油乳酸菌的另一个作用是使酱醅的 pH 值下降到 5.5 以下，促使鲁氏酵母繁殖和发酵。

(4) 其他微生物 在酱油酿造中除上述优势微生物外，还有其他一些微生物存在。它们的作用有的还不是很清楚。从酱油曲和酱醅中分离的微生物还有毛霉、青霉、根霉、产膜酵母、圆酵母、枯草芽孢杆菌、小球菌、粪链球菌等。当制曲条件控制不当或种曲质量差时，这些菌会过量生长，不仅消耗曲料营养成分，使原料利用率下降，而且使成曲酶活力降低，产生异臭，曲发黏，造成酱油浑浊、风味不佳。

## 2. 生产工艺流程

酱油生产分种曲制备、成曲制造、发酵、浸出提油、成品配制几个阶段。

(1) 种曲制备 工艺流程：

麸皮、面粉→加水混合→蒸料→冷却→接种→装匾→曲室培养→种曲

(2) 成曲制造 工艺流程：

原料→粉碎→润水→蒸料→冷却→接种→通风培养→成曲

(3) 发酵 在酱油发酵过程中，根据醪醅的状态，有稀醪发酵、固态发酵及固稀发酵之分；根据加盐量的多少，又分有盐发酵、低盐发酵和无盐发酵三种；根据加温状况不

同，又可分为日晒夜露与保温速酿两类。目前酿造厂中用得最多的是固态低盐发酵，其工艺流程：

成曲→打碎→加盐水拌和（12~13<sup>°</sup>Be 的盐水，含水量 50%~55%）→保温发酵（50~55<sup>°</sup>C，4~6 天）→成熟酱醅

## （二）食醋酿造

食醋可划分为酿造醋、合成醋、再制醋三大类，其中产量最大的是酿造醋。酿造醋是以粮食等为原料，经微生物制曲、糖化、酒精发酵、醋酸发酵等阶段酿制而成。酿造醋除主要成分醋酸外，还含有各种氨基酸、有机酸、糖类、维生素、醇和酯等营养成分和风味物质，具有独特的色、香、味。合成醋是用化学方法合成的醋酸配制而成，缺乏发酵调味品的风味，质量不佳。再制醋是以酿造醋为基料经进一步加工精制而成，如姜醋。

### 1. 食醋酿造用微生物

传统工艺制醋是利用自然界中野生菌制曲、发酵，因此，涉及的微生物种类繁多，如霉菌属的根霉、曲霉、毛霉、犁头霉，酵母属中的汉逊氏酵母、假丝酵母，以及芽孢杆菌、乳酸菌、醋酸菌、产气杆菌等。在众多的微生物中，有对酿醋有益的，也有对酿醋有害的菌种。新法酿醋，均采用经人工选育的纯培养菌株进行制曲、酒精发酵和醋酸发酵，其好处是酿醋周期短、原料利用率高，因此带来了显著的经济效益。

（1）曲霉菌 曲霉菌有丰富的淀粉酶、糖化酶、蛋白酶等酶系，因此，常用曲霉菌制糖化曲。糖化曲是水解淀粉质原料的糖化剂，其主要作用是将制醋原料中的淀粉水解为糊精，蛋白质被水解为肽、氨基酸，有利于下一步酵母菌的酒精发酵以及之后的醋酸发酵。

（2）酵母菌 在食醋酿造过程中，淀粉质原料经曲的糖化作用产生葡萄糖。酵母菌则通过其酒精发酵酶系将葡萄糖转化为酒精和二氧化碳，完成酿醋过程中的酒精发酵阶段。除酒化酶系外，酵母菌还有麦芽糖酶、蔗糖酶、转化酶、乳糖分解酶和脂肪酶等。在酵母菌的酒精发酵中，除生成酒精外，还有少量有机酸、杂醇油、酯类等物质生成，这些物质对形成醋的风味有一定作用。酵母菌培养和发酵的最适温度为 25~30<sup>°</sup>C，但因菌种不同稍有差异。

酿醋用的酵母菌与生产酒类使用的酵母菌相同。适合于高粱原料及速酿醋生产的菌种有南阳混合酵母（0308 酵母）；适合于高粱、大米、甘薯等多种原料酿制普通食醋的有 K 字酵母；适合于淀粉质原料酿醋的有 AS2.109、AS2.399；适合于糖蜜原料的有 AS2.1189、AS2.1190。另外，为了增加食醋香气，有的厂还添加产酶能力强的产酶酵母进行混合发酵，使用的菌株有 AS2.300、AS2.338、中国食品发酵研究院的 1295 和 1312 等产酶酵母。

（3）醋酸菌 醋酸菌可将酵母菌产生的乙醇进一步氧化成醋酸，是食醋生产的关键菌株。酿醋用的醋酸菌最好是氧化酒精速度快、醋酸产率高、不再分解醋酸、耐酸性强、制品风味好的菌种。在目前发现和使用的醋酸菌种中，有些虽然不会分解醋酸，但产醋酸能力弱；有些醋酸产率高，但具有将醋酸氧化成二氧化碳和水的能力。所以目前国内外有些工厂用混合醋酸菌生产食醋，除能快速完成醋酸发酵、提高醋酸产率外，还能形成其他有

机酸和酯类等成分，能增加成品的香气和固形物含量。

## 2. 工艺流程

原料→原料处理→酒精发酵→醋酸发酵→熏醋淋醋→灭菌→灌装

## 思政园地

我国是乳品生产和消费大国。近 10 年来，我国乳业处于快速增长时期，以年平均超过 10% 的增长速度发展。特别是发酵乳制品产销量年增长速度平均在 25% 以上，已成为乳业产品结构调整的重要方向和发展趋势。乳酸菌菌种是生产发酵乳制品的核心技术，被誉为乳业的“芯片”。多年来，生产发酵乳制品的乳酸菌菌种（包括益生菌）及其制剂主要由欧美发达国家垄断，我国自主创新能力不足。针对这一问题，内蒙古农业大学乳品生物技术与工程重点实验室经过二十多年的努力，从乳酸菌菌种库的建设、乳酸菌的开发利用和产业化实现了从“0”到“1”的突破。

内蒙古农业大学乳品生物技术与工程重点实验室由张和平教授带领，从 2001 年至今，寻访亚洲、欧洲、非洲、南美洲、大洋洲的 26 个国家，采集自然发酵乳制品（牛乳、马乳、驼乳、羊乳、牦牛乳、奶酪）、自然发酵品（酸粥、泡菜、米酒、酸面团）等样品 5000 多份，分离、收集乳酸菌超过 32000 株，涵盖乳酸菌的 33 个属、138 个种和亚种，建成全球最大的乳酸菌种质资源库，为挖掘潜在益生菌奠定坚实基础。除此之外，实验室利用二、三代测序等前沿技术，完成了 2 万株乳酸菌基因组测序，搭建全球最大乳酸菌全基因组数据库和分析平台，以更准确地从菌群、菌种和菌株层面系统研究自然发酵乳中乳酸菌的生物多样性。

2002 年，张和平教授带领团队从锡林郭勒大草原自然发酵的酸马奶中分离出一株乳酸菌——干酪乳杆菌 Zhang。干酪乳杆菌 Zhang 中的“Zhang”取自于张和平教授名字中的“张”，这株被发现于内蒙古锡林郭勒大草原的菌株，由此被深深烙上了中国印迹，成为了一株“中国菌”。现在已经成为国内外知名的“明星菌株”。

依靠先进的科研设备，内蒙古农业大学研究团队对乳酸菌进行了更加深入的研究，并围绕乳酸菌菌株在 *Nature Communications*、*The ISME Journal* 等杂志发表 SCI 论文 350 余篇，EI 论文 100 多篇；著作出版英文专著 1 部、中文专著 7 部；授权发明专利 45 项。

当前，张和平团队研发的多个代表性益生菌菌株已投入生产并进入市场，出现在酸奶、乳酸菌饮料、奶粉、益生菌膳食补充剂等各类产品中，令万千消费者受益，成功实现产业转化。而在科学守门人张和平及其团队的支持下，科拓生物已于 2020 年 7 月正式登陆深交所。

千里之行，始于足下。二十多年寻菌之路艰辛迈出的每一步，才令我们今天可以在酸奶等多种产品中享有中国人的乳酸菌。内蒙古农业大学科研团队戮力科学研究二十余载，

他们用汗水与努力彰显出一代又一代科研人的坚守，也为我国乳品生物工程技术发展做出了巨大贡献。



## 习 题

### 简答题

1. 什么是乳酸菌？简述乳杆菌属、链球菌属、明串珠菌属、片球菌属的生物学特性。以番茄汁乳酸菌饮料为例，简述果蔬汁乳酸菌发酵饮料的生产工艺流程。
2. 什么是醋酸菌？醋酸菌的主要种类有哪些？常见的醋酸菌有哪些？
3. 谷氨酸菌在细菌分类中属于哪些属？我国谷氨酸发酵最常见的生产菌种有哪些？各有什么样的生物学特性？
4. 简述葡萄酒酵母的生物学特性，并说明葡萄酒酵母与啤酒酵母的不同之处。
5. 什么叫酒曲？酿造白酒的酒曲有几种？它们在白酒酿造中各起什么作用？白酒的种类如何划分？
6. 面包生产菌种是什么？选择菌种的依据是什么？如何制备活性干酵母面包发酵剂？
7. 什么叫单细胞蛋白？利用微生物开发单细胞蛋白的优点是什么？
8. 简述毛霉属、根霉属、曲霉属、青霉属的生物学特性。
9. 参与酱油酿造的微生物有哪些？它们在酱油酿造中的作用如何？
10. 食醋酿造的基本原理是什么？其糖化剂（曲）菌种、酒母菌种和醋母菌种各有哪些？

# 模块八 微生物与食品腐败变质

## 知识目标

1. 掌握污染食品的微生物来源及途径，并了解其在食品中的消长规律和特点。
2. 了解引起腐败变质的微生物类群及它们的主要生物学特性，掌握微生物引起各类食品腐败变质的基本原理、内在因素和外界条件。
3. 掌握食品保藏中控制微生物污染的主要措施及食品腐败变质的控制方法。

## 技能目标

1. 学会判断各类食品腐败变质的基本特征。
2. 能够运用控制食品腐败变质的方法。



食品腐败变质广义上是指食品受到各种内外因素的影响，造成其原有化学性质或物理性质和感观性状发生变化，降低或失去其营养价值和商品价值的过程。狭义的食品腐败变质是指食品在一定的环境因素影响下，在以微生物为主的多种因素作用下所发生的食品失去或降低食用价值的一切变化，包括食品成分和感官性质的各种变化，从而使食品失去了食用价值。

## 任务一 污染食品的微生物来源与途径

食品的微生物污染是指食品在加工、运输、贮藏、销售过程中被细菌、病毒、霉菌等微生物及其有毒产物污染。了解微生物在自然界中的分布规律及其生长、繁殖的动态，掌握食品微生物的来源，对切断污染途径、控制其对食品的污染，延长食品保藏时间、防止食品变质与食物中毒的发生起着十分重要的作用。

### 一、污染食品的微生物来源

#### (一) 土壤

土壤是微生物生活最适应的环境，因为土壤具有微生物所需要的一切营养物质和进行生长繁殖及生命活动的各种条件。土壤中含有大量的硫、磷、钾、钙、镁等矿物质，也含有微生物所需要的硼、铝、锌、锰等微量元素。动植物的残体分解又为微生物提供了氮源和碳源，加之土壤的保水性、通气性以及适宜的酸碱度，都为微生物的生长繁殖提供了良好的条件。

土壤中细菌占微生物的70%~80%，放线菌占5%~30%，其次还有真菌、藻类及原生动物。不同土壤中微生物的种类和数量有很大差异，地面下5~20cm是微生物最活跃的场所，在肥沃的耕作土层中，每克土壤中可含有 $3 \times 10^9$ 个细菌，每亩耕作土层的细菌可达90~200kg。另外在果树园和葡萄园土壤中，存在着大量的酵母菌。

土壤中常见的与食品有关的细菌有不动杆菌属、产碱杆菌属、芽孢杆菌属、节杆菌属、棒杆菌属、微球菌属、葡萄球菌属、假单胞菌属等。土壤中常见的与食品有关的霉菌有曲霉属、枝孢霉属、青霉属、毛霉属、根霉属、木霉属、镰刀菌属等。土壤中常见的与食品有关的酵母菌有假丝酵母属、隐球酵母属、汉逊氏酵母属、红酵母属等。

以上微生物可通过土壤、尘埃污染食品，引起食品的腐败或罐装食品变质。

#### (二) 水

水是食品生产中不可缺少的原料之一，也是食品微生物的污染源。水中的微生物主要来自于土壤、空气、动物排泄物及工厂、生活的污物等。微生物所以能够在水中大量存在、生长繁殖，主要是由于水中有机物的存在，因此水中的有机物含量是决定水中微生物

数量的重要因素。微生物在水中的分布是不均匀的,受水体类型、有机物含量、温度、酸碱度、溶解氧、深浅度和微生物之间拮抗作用等诸多因素的影响。受到土壤和生活污水影响的湖泊、河流的水中菌数多,常见的有变形杆菌、芽孢梭菌、大肠杆菌、粪链球菌以及病原性细菌。在远离居民区不受污染的水域、水草茂盛的清洁池塘和湖泊中的水是比较清洁的,微生物类群也与污水微生物不同,常见的有荧光假单孢菌、灵杆菌、蜡样芽孢杆菌等。直接来自地下的水,因土壤的过滤作用和缺乏有机质,菌数较少,主要为黄杆菌属种类。

### (三) 空气

空气是多种气体的混合物,其中没有可被微生物直接利用的营养物质和足够的水分,不是微生物生长繁殖的场所。因此,空气中没有固定的微生物种类。空气中的微生物主要来源于带有微生物细胞和孢子的土壤尘埃和气溶胶,不同场所的空气含有微生物的种类和数量不同。公共场所、街道、畜舍、屠宰场、原料库等空气中的微生物较多。田间、林区、海洋及空气清新的地方微生物较少。空气中的微生物一般在空气中停留的时间不长,一部分堕落地面而死亡,一部分由于日光紫外线等杀菌因素而致死。在空气中存活较长的微生物主要是霉菌的孢子、细菌的芽孢、酵母菌和病毒。

空气中的微生物种类主要为真菌和细菌,它们的分布常因地区而异,但有些微生物如霉菌和酵母菌几乎到处都有,曲霉、青霉、木霉、根霉、毛霉、白地霉等都是最常见的真菌。最常见的细菌有枯草芽孢杆菌、肠膜芽孢杆菌、微球菌和八叠球菌等。另外,还有某些病原菌,如结核杆菌、白喉杆菌、肺炎双球菌、溶血链球菌以及流感病毒等。

树木不仅可以阻滞灰尘,还能产生植物杀菌素,可以使空气中的菌数减少,所以食品加工厂厂区的绿化可净化环境,杀灭细菌,防止食品污染。

### (四) 人及动物

人、动物在食品微生物的来源中是不容忽视的一个方面。人主要包括食品加工人员、运输人员及参与者,动物即指作为食品的动物胴体及苍蝇、鼠类等。

在健康人和动物的皮肤、口腔、消化道、呼吸道、眼结膜以及其他器官中寄居着对人畜无害的细菌,称为正常菌群,但当因病原微生物寄生而对人和动物造成病害时,患者体内会有大量的病原微生物通过呼吸道和消化道排泄物向体外排出,接触食品同样可造成微生物的污染。

在人手臂皮肤及动物体表有葡萄球菌、八叠球菌、消化球菌、微球菌、芽孢杆菌、假单孢菌及棒状杆菌。在口腔中有奈氏球菌、乳杆菌、螺旋体和真菌。在消化道中有大肠杆菌、乳酸杆菌、双歧杆菌等。在呼吸道中除葡萄球菌外,还有肺炎球菌、溶血性链球菌、流感杆菌、绿脓杆菌等。这些寄居在人畜体内的正常微生物可通过工作人员的皮肤、唾液、衣服及动物胴体而污染食品。

志贺氏菌及葡萄球菌污染的食品,易引起食物中毒,而工作人员的带菌者可能是主要的污染源。因此,食品厂中的工作人员要定期进行健康检查,凡不适合在食品厂工作的人

员，均应调离食品厂。在食品加工中应尽量减少直接用手操作，以免造成食品污染。

动物屠宰后的胴体上，也可能因动物患病而带有某种病原微生物，如炭疽杆菌、布氏杆菌、结核杆菌、口蹄疫病毒、瘦病毒等。在屠宰过程中，这些病原微生物也可能污染胴体。

### （五）设备与工具

随着食品加工科学技术的发展，越来越多的机械代替了人的操作，减少了人与食品的接触。食品加工厂的多数设备是由金属、橡胶和塑料等制成的，这些材料本身没有微生物所需要的营养物质，微生物是不能生长繁殖的，但设备在使用过程中，食品颗粒或汁液会残留在设备表面，微生物会在其上生长繁殖，是食品的一个重要污染源。使用过的设备虽经清洗和消毒，肉眼看起来很干净，但也不能认为是无菌的。如设备上看到食品残留物，此时菌数一定会很多。清洗和消毒可大大减少设备上的微生物，在清洗时要特别注意凹处和接头部位，在不影响食品质量的前提下，对设备和工具要定期进行清洗和消毒，并按食品安全法要求，合理使用消毒剂以减少设备与工具对食品的污染。

### （六）原料和辅料

原料和辅料本身带有微生物，是影响食品品质的主要原因。

肉类制品原料的微生物污染来自两个方面：一是动物在屠宰前的生活中其消化道、呼吸道、体表存在有微生物，也可能感染某种传染性疾病；二是在屠宰中放血、脱毛、剥皮、去内脏、分割等过程中污染，也可能在运输、贮藏加工过程中被污染。

乳制品的原料为鲜乳汁，其微生物来源主要有两个方面：一是来自被感染的乳房内微生物；二是来自畜体外部，如挤乳过程中被饲料、粪便、草料、空气污染，加工、运输、贮存过程中被人及用具等污染。

作为蛋制品原料的鲜蛋，微生物来源比较复杂，因为新鲜鸡蛋一般是无菌的，但禽类患传染病时，病原菌可经血液循环进入卵巢，在卵巢内形成时即可被病原菌污染，在卵壳形成前，存在于排泄腔中的细菌向上污染至输卵管，可导致卵污染，蛋壳上有 $4\sim 40\mu\text{m}$ 左右的毛细孔，鲜蛋在收购、运输、贮存过程中，可被禽粪、饲料、容器上的微生物所污染。

健康的植物在生长期与自然界广泛接触，其体表存在有大量的微生物，所以收获后的粮食一般都含有其原来生活环境中的微生物。植物体表还会附着有植物病原菌及来自人畜粪便的肠道微生物及病原菌。健康的植物组织内部应该是无菌或仅有极少数菌，如有时外观看上去是正常的水果或蔬菜，其内部组织中也可能有某些微生物的存在。

食品的微生物学品质，除受原料影响外，还受辅料的影响，辅料虽仅占食品总量的一小部分，但往往带有大量微生物。据试验，一克调料中需氧菌高达 $10^8$ 个。佐料、淀粉、面粉、糖中都含有耐热菌，常引起消毒过的食品发生变质，特别是耐热菌的芽孢发育，可引起罐头食品的腐败。

## （七）包装材料和容器

各种包装材料和容器如果处理不当也会带有微生物。一次性包装材料通常比循环使用的材料所带有的微生物数量要少。塑料包装材料由于带有电荷会吸附灰尘及微生物。有人研究过不同容器和包装材料对食品的影响，加工厂用的食品箱、贮放肉禽的容器菌可达 $11\sim 376$ 个/cm<sup>2</sup>。如果将肉、禽贮放过夜，菌数会进一步增加。

塑料容器及包装制品，在制造过程中带有电荷，这些电荷会吸附灰尘或微生物而污染食品，所以在使用塑料原料制品包装食品时要注意这个问题。

包装材料与容器虽可防止微生物污染食品，但它们不能抑制食品中微生物的生长，所以食品在包装前应尽量减少污染。在使用包装材料与容器时，除注意微生物学指标外，也要注意其一定的坚固性，以免在食品贮存与运输中破漏而污染食品。

## 二、微生物污染食品的途径

食品在生产加工、运输、贮藏、销售以及食用过程中都可能被各种微生物污染，其污染的途径可分为两大类。

### （一）内源性污染

凡是作为食品原料的动物、植物体在生活过程中，由于本身带有的微生物而造成食品的污染，称为内源性污染，也称第一次污染。如牲畜在生活期间，在其消化道、上呼吸道和身体表面，总是存在一定类群和数量的微生物。另外，被病原微生物（如沙门氏菌、布氏杆菌、炭疽杆菌等）感染的牲畜，在它们的某些脏器和组织内就有病原微生物的存在。健康乳牛的乳房内也常见有小球菌属和链球菌属的细菌，其他菌（如棒状杆菌属和乳杆菌属）也可能出现。病牛亦可能带有病原微生物，如结核杆菌、口蹄疫病毒等。家畜感染了某些传染病（如鸡白痢病、鸡伤寒病），病原微生物通过血液循环侵入卵巢，在蛋黄形成时被病原菌污染，所产的卵中也含有相应的病原菌。据测定，每克粮食含有几千个以上的细菌。有人从苹果、樱桃等组织内分离出酵母菌，从番茄组织中分离出酵母菌和假单胞菌属的细菌，这些微生物是果蔬开花期侵入并生存于果实内部的。

### （二）外源性污染

食品在生产加工、运输、贮藏、销售、食用过程中不遵守操作规程或不按卫生要求使食品发生污染，称为外源性污染，也称第二次污染。这是食品微生物污染的主要方面。

#### 1. 通过水的污染

食品加工过程中，各种天然水源包括地上水（海水、河水、湖水、塘水）和地下水（深井水、泉水），不仅是微生物的污染源，也是微生物污染食品的主要途径。水既可能本身是食品的配料成分，同时也是清洗、冷却不可缺少的物质。如果使用了微生物污染严重的水作原辅料，则会埋下食品腐败变质的隐患。食品加工厂的用水要注意品质，必须符合

饮用水标准，最好使用过滤水、深井水，不得使用污水。在循环使用冷却水时，要防止被畜禽粪便及下脚料污染。

## 2. 通过空气的污染

微生物在空气中的分布是不均匀的，空气中微生物的变动情况与灰尘变动的情况大体相似。随着尘埃、水沫的飞扬或沉降，使微生物附着在食品上。此外，人体的痰沫、鼻涕与唾液的小水滴中含有的微生物，在讲话、咳嗽或打喷嚏时均可直接或间接污染食品。人在讲话或咳嗽时，距人体 1.5 m 以内的范围是直接污染区，大的水滴呈浮游状停留在空气中能达 30min 之久，小的水珠可在空气中停留 4~6h，因此，食品暴露在空气中被微生物污染是不可避免的。

## 3. 通过生产加工的污染

生产加工过程对食品的污染是多方面的，几乎每个加工环节都能造成食品的污染。如动物毛皮上的大量微生物在屠宰时通过剥皮、剔肉，微生物便可污染肉尸。在挤乳过程中，挤乳工人的手不经消毒或工作衣帽不清洁，均可污染乳汁。如挤乳工人患有呼吸道或消化道传染病，也可污染乳汁，造成危害。制作罐头时，由于封闭不严，加热杀菌不彻底也可造成微生物污染。再有，加工用具也会造成食品的污染，如食品加工车间的设备、工具等不洁均成为污染源，必须引起足够的重视。

## 4. 通过运输的污染

食品从加工到消费者手中必须通过运输，在运输过程中，因运输车辆不清洁，甚至装运过腐败变质物品，在使用前又没有经彻底清洗和消毒，就可造成食品的污染。或在运输途中，对食品不加包装和密封，也可被微生物污染。所以，在运输时应使用专用车辆，并做到经常清洗和消毒。食品要采取良好的包装密封，以减少污染。

## 5. 通过保藏的污染

食品在保藏过程中，往往由于环境被微生物污染而造成食品的污染。如将动物性食品贮存于阴暗潮湿、霉菌滋生的仓库内，而造成食品霉菌的污染，存放在露天广场上的食品而被风尘中的微生物所污染。

## 6. 通过动物的污染

苍蝇、老鼠、蟑螂等体内或体表可带有大量的微生物，在加工、运输、保藏、销售过程中，如食品被它们叮咬、践踏就会造成食品污染。实验证明：每只苍蝇带有数百万至数千万个细菌，80%的苍蝇肠道中带有痢疾杆菌，鼠类粪便中带有沙门氏菌、钩端螺旋体等病原微生物。

# 三、食品中微生物的消长

食品受到微生物的污染后，其中的微生物种类和数量会随着食品所处环境和食品性质的变化而不断地变化。这种变化所表现的主要特征就是食品中微生物出现的数量增多或减少，即称为食品微生物的消长。食品中微生物的消长通常有以下规律及特点。

### （一）食品加工前

在食品加工前，无论是动物性原料还是植物性原料都已经不同程度地被微生物污染，加之运输、储藏等环节，微生物污染食品的机会进一步增加，因而使食品原料中的微生物数量不断增多。虽然有些种类的微生物污染食品后因环境不适而死亡，但是从存活的微生物总数看，一般不表现减少而只有增加。这一微生物消长特点在新鲜鱼肉类和果蔬类食品原料中表现明显，即使食品原料在加工前的运输和储藏等环节中曾采取了较严格的卫生措施，但早在原料产地已污染而存在的微生物如果不经过一定的灭菌处理它们仍会存在。

### （二）食品加工中

在食品加工的整个过程中，有些处理工艺如清洗、加热消毒或灭菌对微生物的生存是不利的。这些处理措施可使食品中的微生物数量明显下降，甚至可使微生物几乎完全消除。但如果原料中微生物污染严重，则会降低加工过程中微生物的下降率。在食品加工过程中的许多环节也可能发生微生物的二次污染。在生产条件良好和生产工艺合理的情况下，污染较少，食品中所含有的微生物总数不会明显增多，如果残留在食品中的微生物在加工过程中有繁殖的机会，则食品中的微生物数量就会出现骤然上升的现象。

### （三）食品加工后

经过加工制成的食品，由于其中还残存有微生物或再次被微生物污染，在储藏过程中如果条件适宜，微生物就会生长繁殖而使食品变质。在这一过程中，微生物的数量会迅速上升，当数量上升到一定程度时不再继续上升，相反活菌数会逐渐下降。这是由于微生物所需营养物质的大量消耗，使变质后的食品不利于该微生物继续生长而逐渐死亡，此时食品不能食用。如果已变质的食品中还有其他种类的微生物存在，并能适应变质食品的基质条件而得到生长繁殖的机会，这时就会出现微生物数量再度升高的现象。加工制成的食品如果不再受污染，同时残存的微生物又处于不适宜生长繁殖的条件，那么随着储藏日期的延长，微生物数量就会日趋减少。

由于食品的种类繁多，加工工艺及方法和储藏条件不尽相同，致使微生物在不同食品中呈现的消长情况也不可能完全相同。充分掌握各种食品中微生物消长规律的特点，对于指导食品的生产具有重要的意义。

## 任务二 各类食品腐败变质的相关性质

食品从原料到加工产品，随时都有被微生物污染的可能。这些污染的微生物在适宜条件下即可生长繁殖，分解食品中的营养成分，使食品失去原有的营养价值，成为不符合卫生要求的食品。当然由于食品类型不同，引起其发生腐败变质的微生物也有所不同。下面就微生物引起各类主要食品的腐败变质作介绍。

## 一、乳及乳制品的腐败变质

各种不同的乳，如牛乳、羊乳、马乳等，其成分虽各有差异，但都含有丰富的营养成分，容易消化吸收，是微生物生长繁殖的良好培养基。乳一旦被微生物污染，在适宜条件下，就会因微生物迅速繁殖引起腐败变质而失去食用价值，甚至可能引起食物中毒或其他传染病的传播。

### （一）乳中微生物的来源及主要类群

牛乳在挤乳过程中会受到乳房和外界微生物的污染，通常根据其来源可以分为两类。

#### 1. 乳房内的微生物

牛乳在乳房内不是无菌状态，即使遵守严格无菌操作挤出乳汁，在 1mL 乳汁中也有数百个细菌。乳房中的正常菌群，主要是小球菌属和链球菌属。由于这些细菌能适应乳房的环境而生存，称为乳房细菌。乳畜感染后，体内的致病微生物可通过乳房进入乳汁而引起人类的传染。常见的引起人畜共患疾病的致病微生物主要有结核分枝杆菌、布氏杆菌、炭疽杆菌、葡萄球菌、溶血性链球菌、沙门氏菌等。

#### 2. 环境中的微生物

环境中的微生物包括挤奶过程中细菌的污染和挤后食用前的一切环节中受到的细菌污染。污染的微生物的种类、数量直接受牛体表面卫生状况、牛舍的空气、挤奶用具、容器、挤奶工人的个人卫生情况的影响。另外，挤出的奶在处理过程中，如不及时加工或冷藏，不仅会增加新的污染机会，而且会使原来存在于鲜乳内的微生物数量增多，这样很容易导致鲜乳变质。所以，挤奶后要尽快进行过滤、冷却。

### （二）乳液的自然腐败变质过程

鲜乳及消毒乳都残留一定数量的微生物，特别是污染严重的鲜乳，消毒后残存的微生物还很多，常引起乳的酸败，这是乳发生变质的重要原因。

乳中含有溶菌酶等抑菌物质，使乳汁本身具有抗菌特性。但这种特性延续时间的长短，随乳汁温度高低和细菌的污染程度而不同。通常新挤出的乳，迅速冷却到 0℃ 可保持 48h，5℃ 可保持 36h，10℃ 可保持 24h，20℃ 可保持 6h，30℃ 仅可保持 2h。在这段时间内，乳内细菌是受到抑制的。

当乳的自身杀菌作用消失后，乳静置于室温下，可观察到乳所特有的菌群交替现象。这种有规律的交替现象分为以下几个阶段。

#### 1. 抑制期（混合菌群期）

在新鲜的乳液中含有溶菌酶、乳素等抗菌物质，对乳中存在的微生物具有杀灭或抑制作用。在杀菌作用终止后，乳中各种细菌均发育繁殖。由于营养物质丰富，暂时不发生互生或拮抗现象，这个时期持续 12h 左右。

## 2. 乳链球菌期

鲜乳中的抗菌物质减少或消失后,存在于乳中的微生物,如乳链球菌、乳酸杆菌、大肠杆菌和一些蛋白质分解菌等迅速繁殖,其中以乳酸链球菌生长繁殖居优势,分解乳糖产生乳酸,使乳中的酸性物质不断增高。由于酸度的增高,抑制了腐败菌、产碱菌的生长,以后随着产酸增多乳链球菌本身的生长也受到抑制,数量开始减少。

## 3. 乳杆菌期

当乳链球菌在乳液中繁殖,乳液的pH值下降至4.5以下时,由于乳酸杆菌耐酸力较强,尚能继续繁殖并产酸。在此时期,乳中可出现大量乳凝块,并有大量乳清析出,这个时期约2天。

## 4. 真菌期

当酸度继续升高至pH3.0~3.5时,绝大多数的细菌生长受到抑制或死亡。而霉菌和酵母菌尚能适应高酸环境,并利用乳酸作为营养来源而开始大量生长繁殖。由于酸被利用,乳液的pH值回升,逐渐接近中性。

## 5. 腐败期(脓化期)

经过以上几个阶段,乳中的乳糖已基本消耗掉,而蛋白质和脂肪含量相对较高,因此,此时能分解蛋白质和脂肪的细菌开始活跃,凝乳块逐渐被消化,乳的pH值不断上升,向碱性转化。同时,并伴随有芽孢杆菌属、假单胞杆菌属、变形杆菌属等腐败细菌的生长繁殖,于是牛奶出现腐败臭味。

在菌群交替现象结束时,乳亦产生各种异色、苦味、恶臭味及有毒物质,外观上呈现黏滞的液体或清水。鲜乳腐败变质过程中微生物的菌群交替可从图8-1中直观地看出。

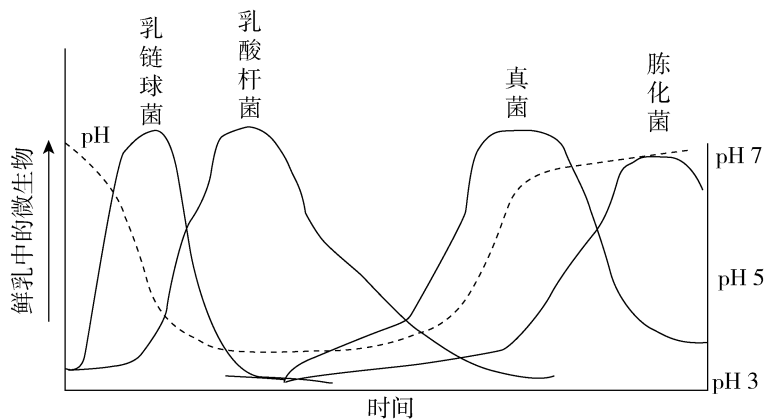


图 8-1 鲜乳中微生物活动曲线

## （三）乳液的消毒和灭菌

鲜乳消毒和灭菌是为了杀灭致病菌和部分腐败菌。消毒的效果与鲜乳被污染的程度有关。牛乳消毒的温度和时间的确定是保证最大限度地消灭微生物和最高限度地保留牛乳的



营养成分和风味，首先是必须消灭全部病原菌。

鲜乳的消毒灭菌方法有多种，以巴氏消毒法最为常见。巴氏消毒的操作方法有多种，其设备、温度和时间各不相同，但都能达到消毒目的。目前鲜乳的消毒灭菌方法主要有以下几种：

### 1. 低温长时消毒法

60~65℃加热保温 30min。目前市场上见到的玻璃瓶装、罐装的消毒奶、啤酒、酸渍食品、盐渍食品采用的就是这种常压喷淋杀菌法。但此法由于消毒时间长，杀菌效果不太理想，目前许多乳品厂已不再使用。

### 2. 高温短时消毒法

将牛乳置于 72~75℃加热 4~6min，或 80~85℃加热 10~15s。可杀灭原有菌数的 99.9%。用此法对牛乳消毒时，有利于牛乳的连续消毒，但如果原料污染严重时，难以保证消毒的效果。

### 3. 高温瞬时消毒法

目前许多大城市已采用高温瞬时消毒法。即控制条件为 85~95℃，2~3s 加热杀菌，其消毒效果比前两者好，但对牛乳的质量有影响，如容易出现乳清蛋白凝固、褐变和加热臭等现象。

### 4. 超高温瞬时灭菌法

许多科学家做了大量的试验，发现在保证相同杀菌效果的前提下，提高温度比延长杀菌时间对营养成分的损失要小些。因而，目前比较盛行的牛乳灭菌方法是超高温瞬时灭菌法。即牛乳先经 75~85℃预热 4~6min，接着通过 136~150℃的高温 2~3s。预热过程中，可使大部分的细菌杀死，其后的超高温瞬时加热，主要是杀死耐热的芽孢细菌。该方法生产的液态奶可保存很长的时间。

## （四）消毒牛乳的微生物

牛乳经低温长时间或高温瞬时杀菌后，还有少量对热抵抗力较强的微生物残留，不能完全杀灭。另外，当乳中微生物细胞聚集或微生物细胞被包围在凝乳中时，也使得微生物不易被杀灭，造成杀菌效果低而使乳中微生物增多。消毒牛乳中残存的细菌最常见的有芽孢杆菌类和非芽孢杆菌类。芽孢杆菌有枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌和蜡样芽孢杆菌；非芽孢杆菌类有嗜热链球菌、牛链球菌、小球菌、变异小球菌和乳杆菌等。

## （五）乳粉的腐败变质

乳粉是由原乳经调整成分、杀菌、真空浓缩及喷雾干燥而成的乳制品。由于脱去了绝大部分的水分并经过灭菌，制品便于储存、携带、运输及使用。乳粉可根据原料乳是否经过脱脂，分为全脂乳粉和脱脂乳粉。另外，还可以根据加糖与否、是否加入某些特殊成分等，有更加细致的分类。

由于生产时，采用了杀菌、真空浓缩、喷雾干燥和密封包装等处理措施，乳粉中的微

生物含量比原料乳大大减少，且乳粉的水分在5%以下，一般在2%~3%之间，即使是生产中残留或污染少量适于在牛乳中生存的乳酸链球菌、小球菌、八叠球菌和乳杆菌等，在如此低的水分条件下，也不会生长繁殖并引起乳粉的变质。相反，由于高渗透压的作用，密封较好的乳粉，随着时间的推移和温度的增高，微生物的数量会出现递减的趋势。但是，如果乳粉污染了金黄色葡萄球菌，此菌可以分泌肠毒素，食用被污染的食物后会发生食物中毒。乳粉开封后，会逐渐吸收水分，当水分含量超过了5%后，细菌就会进入生长繁殖状态，导致乳粉变质。

## （六）炼乳的腐败变质

炼乳是将牛乳浓缩至原体积40%左右的乳制品。按加工时加糖与否，可分为加糖炼乳（甜炼乳）和无糖炼乳（淡炼乳）两类制品。

### 1. 甜炼乳及其腐败变质

甜炼乳是在牛乳中加入16%的蔗糖，经杀菌并浓缩至原体积40%左右的一种乳制品。由于该制品在装罐后不再进行杀菌处理，及常因生产原料灭菌不彻底以及保存不当等引起微生物的生长，并出现诸如钮扣状凝块、胖听和变稠等变质现象。

发生霉变的甜炼乳，开罐后会发现在炼乳的表面有白色、黄色或红褐色形状似钮扣的凝块，并散发出金属臭和陈腐的干酪气味。产生此类污染的主要原因是霉菌或放线菌，常见的有匍匐曲霉和芽枝霉等。

膨罐又称胖听，也是甜炼乳在保存期间容易发生的异常现象。按其发生的原因，可分为物理性胖听和微生物的污染引起的变质性胖听。甜炼乳含糖量高，不利于一般微生物的生长。但如果被耐高渗透压、嗜糖性的微生物污染，情况就会发生变化。因为它们可以在高糖的炼乳中生长、繁殖，耗尽罐内残存的氧气后，通过发酵作用分解糖并产酸、产气，使制品出现变质性胖听。此类微生物主要有耐高渗透压的嗜糖酵母、乳酸菌和丁酸菌。

变稠是甜炼乳在较高的储存温度条件下易于出现的一种异常现象。细菌性变稠是因微生物的代谢引起，制品理化指标发生变化，如酸度增高，并产生异臭味。引起细菌变稠的微生物主要是芽孢菌、链球菌、葡萄球菌和乳酸杆菌。它们利用乳中的碳水化合物，产生甲酸、乙酸、丁酸、琥珀酸和乳酸，并可产生凝乳酶。在这些酸性产物及酶的作用下，乳中酪蛋白溶解度降低并析出，即出现所谓的变稠性变化。

### 2. 淡炼乳的腐败变质

淡炼乳是将原料乳消毒并浓缩至原体积的40%后，再经装罐密封、杀菌等工序制成的乳制品。它与甜炼乳在成分上的区别主要在于未添加蔗糖。另外，装罐后在115~117℃、15min以上的高温灭菌或超高温灭菌处理，不存在罐装后的二次污染问题，制品基本同一般罐藏食品，处于无菌状态。所以，淡炼乳可以在常温条件下长时间的保存而不变质。但如果原料乳原始污染较重，灭菌不彻底，残留了耐热性的芽孢菌（及孢子）或包装罐体不严而在生产后被微生物污染，均可使淡炼乳发生变质。微生物引起的变质，主要有凝乳、产气乳和苦味乳三种类型。

淡炼乳发生凝乳时，罐内会产生凝固，色泽变浅。污染菌主要有枯草芽孢杆菌、凝结乳芽孢杆菌、蜡状芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌、嗜热芽孢杆菌和单纯芽孢杆菌等耐热性的芽孢杆菌。除具有上述的变质特征外，淡炼乳还因这些污染菌的不同，呈现出某些特殊的变质现象。凝结芽孢杆菌可使炼乳酸度增高，并散发出干酪气味；蜡状芽孢杆菌是需氧菌，在乳液的表面繁殖，并使乳液产生柔软性的凝固。

淡炼乳的产气性变质与甜炼乳的胖听相似。罐内有气体产生，并伴有凝固现象和不良气味出现。其污染菌包括酵母和产气性的埃希氏大肠杆菌及梭状芽孢杆菌属的细菌。

淡炼乳的苦味，是由少数微生物分解、消化蛋白质产生的苦味物质引起的。这类微生物包括刺鼻芽孢杆菌和面包芽孢杆菌等耐热性杆菌。

### （七）稀奶油的腐败变质

稀奶油保存在5℃的条件下，保存初期嗜冷菌的比例很低，然后嗜冷菌（5℃）的数量为 $10^2 \sim 10^7$ CFU/mL，嗜温菌（30℃）的数量为 $10^3 \sim 10^7$ CFU/mL。储存在5℃的鲜制稀奶油的优势菌是假单胞菌、无色杆菌、产碱杆菌、不动杆菌、气单胞菌，储存在30℃时的优势菌为棒杆菌、芽孢杆菌、微球菌、乳杆菌和葡萄球菌等。稀奶油来源不同，不同细菌之间的数量差异较大。给稀奶油带来缺陷的微生物是产麦芽臭乳链球菌，它是稀奶油产生麦芽臭的原因。另外，还可能有使稀奶油变成紫色的蓝紫色杆菌。乳糖发酵性酵母一般除产生恶臭以外，还伴有气体产生。但是，酵母在已进行乳酸发酵的稀奶油内停止发育；经常在稀奶油中可发现不发酵乳糖的酵母。霉菌在稀奶油表面呈膜状或簇状繁殖。

### （八）酸奶的腐败变质

酸奶因为其自身的特点，呈酸性。以乳酸计，酸度在1%左右，在此条件下，沙门氏菌之类的致病菌基本上处于失活状态，大肠菌群也很难存活。另一方面，酸奶的发酵剂在发酵过程中可以产生多种抑菌物质。因此，在正常情况下，只要不出现微生物严重污染的情况，酸奶产品很容易达到大肠杆菌少于30CFU/100g的卫生标准。但是，一些腐生菌对环境条件不如致病菌敏感，特别是霉菌和酵母菌，低pH值对它们基本没有影响，只需蔗糖或乳糖作为碳源便可成长。酵母主要通过车间设备或墙壁表面附着或者在果粒上存在而造成酸奶的变质。霉菌是另外一种造成酸奶严重污染的主要微生物类群。如木霉属、根霉属、曲霉属或青霉属等霉菌在酸奶和空气的接触面处生长后，可出现各种钮扣状斑块。

### （九）干酪的腐败变质

将牛乳转变成干酪是牛乳储存最有效、最方便的方法之一。干酪是一种浓缩的乳制品。其主要成分有水、脂肪和蛋白质。此外，还含有丰富的维生素、钙和磷。干酪中含有大量的乳酸菌，亦大大有助于改善人体健康。干酪经成熟之后，其主要碳水化合物——乳糖全部被发酵剂耗尽，因此腐败性微生物缺少可利用的碳源，难以生长，这包括了起膜性酵母、霉菌和一些厌氧性芽孢菌如丁酸梭菌。同时，厌氧条件也使起膜性酵母和霉菌仅能在干酪表面生长，而无法生长于干酪内部。加盐和较低的酸度对干酪的保存也起着重要的

作用。但是，当污染非常严重时，以上条件都不能阻止腐败变质的发生。

有些品种的干酪需要霉菌来促进干酪的成熟。但是对大多数的干酪而言，霉菌会引起干酪的腐败变质，破坏产品的外观，产生霉味，甚至产生毒素。常见的霉菌有交链孢属、曲霉属、枝孢属、念珠霉属、木霉属和青霉属。水分含量较高的软质干酪、农家干酪和稀奶油干酪容易受到地霉属的污染。

干酪在制造和成熟过程中，腐败性气体的产生与乳中残留的产气菌数量及凝块的受污染程度有关。生乳受到大肠杆菌的严重污染时能产生大量气体，导致凝块在干酪槽中上浮。由于引起污染的细菌不同，产生气体的时间段也有所不同。早产气一般发生在干酪成熟的最初几天，主要由大肠菌群造成，能发酵乳糖的酵母菌也会引起干酪的早产气，产生水果味；中期产气主要表现为3~6周的切达干酪不规则的开裂，这种现象与产气性的乳杆菌有关；干酪的晚期产气通常发生在干酪制成的几周后，主要是梭状芽孢杆菌如生孢梭菌、丁酸梭菌和酪丁酸梭菌的生长。

如果硬质干酪的表面不能保持干燥，水分会在表面凝聚，从而导致微生物如成膜性酵母、霉菌和蛋白分解性细菌的生长，最终引起干酪的变软、变色，甚至产生异味，这种现象称为烂边。

在成熟过程中，霉菌在干酪表面生长会引起干酪表面颜色的变化，黑曲霉会在硬质干酪的表面形成黑斑。

## 二、肉类的腐败变质

肉类食品包括畜禽的肌肉及其制品、内脏等。由于其营养丰富，有利于微生物的生长繁殖。家畜、家禽的某些传染病和寄生虫病也可通过肉类食品传播给人。因此，保证肉类食品的卫生质量是食品卫生工作的重点。

### （一）肉类中的微生物

参与肉类腐败过程的微生物是多种多样的。一般常见的有腐生微生物和病原微生物。腐生微生物包括细菌、酵母菌和霉菌，它们污染肉品，使肉品发生腐败变质。

细菌主要是需氧的革兰氏阳性菌，如蜡样芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌及肠球菌、乳杆菌等；需氧的革兰氏阴性菌有假单胞杆菌属、无色杆菌属、黄色杆菌属、产碱杆菌属、埃希氏杆菌属、变形杆菌属等。此外，还有腐败梭菌、溶组织梭菌和产气荚膜梭菌等厌氧梭状芽孢杆菌。

酵母菌和霉菌主要包括假丝酵母菌属、丝孢酵母属、交链孢霉属、曲霉属、芽枝霉属、毛霉属、根霉属和青霉属。

病畜、禽肉类可能带有各种病原菌，如沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、结核分枝杆菌、炭疽杆菌和布氏杆菌等。它们对肉的主要影响并不在于使肉腐败变质，严重的是传播疾病，造成食物中毒。

## （二）肉类腐败变质现象和原因

食源性微生物污染主要来自两个方面。一是原料污染。我国地域辽阔，动物品种多，各地防疫基础水平不同，加上由于畜产品市场放开，流通渠道繁杂等因素，致使动物疫病流行。其主要特点是传染性疾病加重，新病种类增多。抗生素的大量使用，导致细菌产生强大的耐药性，细菌性疫病严重。环境性病原微生物感染的疾病日渐严重，有的已成为饲养场的常发病。加上部分地区不能严格监督检验，导致部分病、死畜禽肉、注水肉流入市场，严重影响了肉食品的质量和安​​全。二是加工污染。肉品在生产、包装、运输过程中处理不当，容易被微生物（细菌、霉菌等）污染。由于以上原因以及病原菌检测技术落后、追溯手段不健全，导致消费者感染或中毒事件时有发生。

肉类腐败变质时，往往在其表面产生明显的感官变化，常见的现象有：

### 1. 发黏

微生物在肉表面大量繁殖后，肉体表面有黏状物质产生，这是微生物繁殖后所形成的菌落，以及微生物分解蛋白质的产物。这主要是由革兰氏阴性细菌、乳酸菌和酵母菌所产生。当肉的表面有发黏、拉丝现象时，其表面含菌数一般为  $10^7$  cfu/cm<sup>2</sup>。

### 2. 变色

肉类腐败变质，常在肉的表面出现各种颜色变化。最常见的是绿色。这是由于蛋白质分解产生的硫化氢与肉质中的血红蛋白结合后形成的硫化氢血红蛋白造成的。这种化合物积蓄在肌肉和脂肪表面，即显示暗绿色。另外，黏质赛氏杆菌在肉表面能产生红色斑点，深蓝色假单胞杆菌能产生蓝色斑点，黄杆菌能产生黄色斑点。有些酵母菌能产生白色、粉红色、灰色等斑点。

### 3. 霉斑

肉体表面有霉菌生长时，往往形成霉斑。特别是在一些干腌肉制品中更为多见。如美丽枝霉和刺枝霉在肉表面产生羽毛状菌丝。白色侧孢霉和白地霉产生白色霉斑。草酸青霉产生绿色霉斑。蜡叶芽枝霉在冷冻肉上产生黑色斑点。

### 4. 气味

肉体腐烂变质，除上述肉眼观察到的变化外，通常还伴随一些不正常或难闻的气味。如微生物分解蛋白质产生恶臭味；在乳酸菌和酵母菌的作用下产生挥发性有机酸的酸味；霉菌生长繁殖产生的霉味等。

此外，肉品所处的环境条件如温度、气体成分、是否进行真空包装等都对肉品的货架期有着重要的影响。

## （三）鲜肉的腐败变质过程

健康动物的血液、肌肉和内部组织器官一般是无微生物存在的。但由于屠宰、运输、保藏和加工过程中的污染，致使肉体表面有一定数量的微生物。这时，肉体若能及时通风干燥，使其表面的肌膜和浆液凝固形成一层薄膜，即可固定和阻止微生物侵入内部，

从而延缓肉的变质。

通常鲜肉保藏在 0℃ 左右的低温环境中，可存放 10 天左右。当保藏温度上升时，表面的微生物就能迅速繁殖，其中以细菌的繁殖速度最为显著。它沿着结缔组织、血管周围或骨与肌肉的间隙蔓延到组织的深部，最后使整个肉变质。宰后畜禽的肉体由于有酶的存在，使肉组织产生自溶作用，结果使蛋白质分解产生蛋白胨和氨基酸，这样更有利微生物的生长。

随着保藏条件的变化与变质过程的发展，细菌由肉的表面逐渐向深部侵入。与此同时，细菌的种类也发生变化，呈现菌群交替现象。这种菌群交替现象一般分为三个时期，即需氧菌繁殖期、兼性厌氧菌繁殖期和厌氧菌繁殖期。

### 1. 需氧菌繁殖期

腐败分解前 3~4 天，细菌主要是在表层蔓延，最初见到各种球菌，继而出现大肠杆菌、变形杆菌、枯草芽孢杆菌等。

### 2. 兼性厌氧菌繁殖期

腐败分解 3~4 天，细菌已在肉的中层出现，这时能观察到产气荚膜梭菌等的存在。

### 3. 厌氧菌繁殖期

在腐败分解的 7~8 天，深层肉中已有细菌生长，主要是腐败梭菌。

值得注意的是这种菌群交替现象与肉的保藏温度有关。当肉的保藏温度较高时，杆菌的繁殖速度较球菌快。

## （四）冻结肉中的微生物及腐败变质

冻结肉的细菌总数明显减少，微生物种类也发生明显变化。如冻结前牛肉的平均细菌总数大约为  $10^5$  CFU/g，而经 -30℃ 冻结后，平均细菌总数减少到 10CFU/g。一般革兰氏阴性菌比革兰氏阳性菌、繁殖体比芽孢对冻结致死更敏感。如牛肉冻结前革兰氏阳性菌占 15%，革兰氏阴性菌占 85%，经 -30℃ 冻结后，革兰氏阳性菌的比例上升到 70%，革兰氏阴性菌下降为 30%。在商业冻藏温度下（-15℃ 以下），细菌不仅不能生长，其总数也减少。但长期冻藏对细菌芽孢基本上没有影响，酵母和霉菌对冻结和冻藏的抗性也很强。因而，在通风不良的冻藏条件下，胴体表面会有霉菌生长，形成黑点或白点。

## （五）真空包装鲜肉中的微生物

不透氧的真空包装袋可使鲜牛肉的货架期达到 15 周以上，而透氧薄膜仅能使货架期达 2~4 周。在不透氧真空包装袋内，由于肌肉和微生物需氧，氧很快消耗殆尽，二氧化碳趋于增加，氧化还原电位降低。真空包装的鲜肉储藏于 0~5℃ 时，微生物生长受到抑制，一般 3~5 天之后，微生物缓慢生长。储藏后期的优势菌是乳酸菌，占细菌总数的 50%~90%。主要包括革兰氏阳性乳杆菌和明串珠菌。革兰氏阴性假单胞杆菌的生长则受到抑制，相对数目减少。

腌肉的盐分高，室温下主要的微生物类群是微球菌。真空包装的腌肉在储藏后期的优

势菌仍然是微球菌，链球菌（如肠球菌）、乳杆菌和明串珠菌也占一定比例。

### （六）解冻肉中的微生物

在正常冻结冻藏条件下，经过长期保存的冻结肉其细菌总数明显减少，即肉在解冻时的初始细菌数比其原料肉的细菌数少。在解冻期间，肉的表面很快达到解冻介质的温度。解冻形状不规则的肉时，微生物的生长依肉块部位不同而有所差异。同时，取决于解冻方法、肉表面的水分活度、温度以及肉的形状和大小。

在正常解冻下，当温度达到微生物的生长要求时，由于延迟期（即少量微生物接种到新鲜培养基质，一段时间内细胞数目不增加的时期）的原因，微生物并不立即开始生长。延迟期的长短取决于微生物本身、解冻温度和肉表面的小环境。 $-20^{\circ}\text{C}$ 下冻藏的肉在 $10^{\circ}\text{C}$ 下解冻时，假单胞菌的延迟期为 $10\sim 15\text{h}$ ；在 $7^{\circ}\text{C}$ 下解冻时的延迟期为 $2\sim 5$ 天。与鲜肉相比，解冻后的肉更加容易腐败，应尽快加工处理。

### （七）其他肉制品中发生的微生物污染

酱卤肉品是我国古老传统肉类熟食品中的一种，营养丰富、风味独特、鲜美可口，是深受广大人民群众欢迎的一种副食品。但是，这种产品由于在加工、运输、销售过程中流转环节复杂、污染的几率很大，加之酱卤肉品具有极易污染的特点。只要温度适宜，数小时以内微生物就可繁殖到十分惊人的数量。如果食用前未经加热处理，食后往往引起食物中毒事故的发生。因此，预防酱卤肉品微生物的污染，防止食物中毒以及肠道传染病的发生，是广大食品生产经营者、卫生监督管理和肉品卫生检验人员的重要职责。微生物污染酱卤肉品的途径主要在加工、运输、销售环节，按卫生防疫部门检查结果看，在肉食中毒事件中，酱卤肉品的中毒率是较高的。

腌制和熏制后肉食的微生物学特性与鲜肉完全不同。腌熏制品中腌制剂，如氯化钠、硝酸钠、亚硝酸钠等及接下来的相关处理中，形成了肉食制品中的一个微生态环境，对起初污染鲜肉并导致其腐败的革兰氏阴性细菌的生长有抑制作用，而只有一些特殊的革兰氏阳性细菌可以生长。在腌熏过程中的这种微生物的转换抑制了鲜肉中的大多数微生物菌群，而达到延长货架期的目的。鲜肉的真空包装也是基于相同的原理，即由于缺少氧气，正常好氧性的腐败微生物得到了应有的抑制，而延长了肉食制品货架期。腌熏肉的微生物菌群中主要包括微球菌、乳酸菌、链球菌、明串珠菌和微杆菌，还有部分酵母和霉菌。腌熏肉食的腐败常见的有以下几种类型：表面发黏，主要是细菌在其表面大量生长所致；发酸，是由乳酸细菌等生酸菌类所引起；产气，是由异型乳酸发酵菌（如乳杆菌、明串珠菌等）和一些酵母发酵糖类所致；变绿，是由于肉中色素的化学氧化，各种乳酸细菌积累的过氧化氢和部分细菌的大量繁殖所致。

食盐和硝是有效的微生物抑制剂，许多病原微生物在腌熏肉食中都不能生长。此外，选择性的环境条件有利乳酸菌的生长而使之成为微生态环境中的有力竞争者。乳酸菌的生长通常伴随着酸性物质的形成，降低了产品的pH，进一步抑制了食物病原微生物的生长。葡萄球菌在与乳酸细菌的生存竞争中，不会因为pH的降低而受到影响，肉毒梭菌在

腌熏制品中可以生长，但其毒素的形成受乳酸细菌的抑制。

法兰克福香肠、波罗纳香肠和午餐肉这些产品的腐败通常有：发黏、酸败和发绿三种。发黏腐败常发生在肠衣的外层，在法兰克福香肠中尤为如此。腐败早期以单个菌落形式出现，随后多菌落结合为一体，形成一层灰色的发黏层。从发黏的物质中可分离到酵母、乳酸杆菌、肠球菌、魏斯氏菌和热死环丝菌。发黏通常只限于肠衣外层。

酸败通常发生于这些肉制品的肠衣内，是由乳酸杆菌、肠球菌及相关微生物引起的。微生物对乳糖和其他糖的利用及产酸是酸败的直接原因。由于使用多种调味料，香肠通常比其他大多数肉制品含有更多类型的微生物，调味料几乎都把它们自己特有的菌群带入产品中。热死环丝菌被认定为是引起香肠腐败的最主要的菌种。

霉菌腐败并不常见于这类产品中。但是，当产品的水分含量较高，贮存条件下湿度高，它们容易发生由细菌和酵母引起的腐败。只有当产品储存在不适宜细菌或酵母生长的条件下或产品表面比较干燥时，霉菌腐败不会发生。

红色肉制品在储存中通常发生两种类型的发绿变质：一种是由  $H_2O_2$  引起的，另一种是由比  $H_2S$  引起。前者常发生在法兰克福香肠以及其他腌制和真空包装肉制品中。在厌氧条件下保存的肉制品一旦暴露于空气中，通常会出现前一类型的发绿变质。虽然明串珠菌、粪肠球菌和粪渣肠球菌也会引起产品的发绿，但是绿色魏斯氏菌是引起此类发绿现象的最常见的菌。产生  $H_2O_2$  的菌，例如糖果乳酸杆菌和詹生氏乳酸杆菌也会使产品变绿。尽管有变色现象发生，但使用此类变绿的肉制品未发现有害作用。第二种类型的发绿通常发生于那些在  $1\sim 5^\circ C$  下储藏在不透气或真空包装容器中的新鲜红色肉上。它是由于  $H_2S$  的产生而引起的。当肉的 pH 值低于 6.0 时，通常不会发生这种类型的发绿现象。恶臭假单胞菌被认为是与之相关的菌。在真空包装牛肉中有一种清酒乳酸菌被证实能产生  $H_2S$ ，但引发的发绿现象不太强烈，在  $0^\circ C$  下经大约 6 周后才出现发绿现象。

腊肉和腌制火腿这类产品的特性以及制作工艺如烟熏、盐浸等使它们不容易发生由大多数细菌引起的腐败。腊肉腐败最常见的形式是霉变，可能是由曲霉、交链孢霉、镰刀霉、毛霉、根霉、葡萄孢霉、青霉和其他霉菌引起的。产品的高脂含量和低水分含量的特性决定了它们易于发生此类变质。在一些特殊的腊肉中，细菌中的肠球菌、乳酸杆菌和微球菌也能生长良好，有时粪肠球菌也能被检出。真空包装的腊肉易发生由微球菌和乳酸杆菌引起的变酸。真空包装的、低盐含量的腊肉在  $20^\circ C$  以上储存时，可发生由葡萄球菌引起的腐败变质。腌制火腿发生的腐败类型与新鲜或烟熏火腿发生的腐败有所不同。主要是因为注入火腿的腌制液中含有糖，而这些糖可被火腿中原有的自然菌群和那些随腌制液进入产品的菌群，如乳酸杆菌所利用。导致火腿变酸的菌包括了不动菌属的细菌、芽孢菌、假单胞菌、乳酸杆菌、变形杆菌、微球菌和梭状芽孢杆菌。在腌制火腿中检出的梭状芽孢杆菌属中的细菌均无产气能力。

## （八）动物脏器的腐败变质

此处脏器主要指肝脏、肾脏、心脏和动物的舌头。它们与骨骼肌肉的不同之处在于前者具有较高的 pH 值和糖原水平，特别是肝脏。新鲜牛、猪肝脏的 pH 值范围为  $6.1\sim$



6.5，而肾脏则为6.5~7.0。这些制品中微生物数量通常较少，主要包括革兰氏阳性球菌、棒状杆菌、需氧芽孢杆菌、不动莫拉氏杆菌及假单胞菌。研究发现，在羊肝腐败中，表面腐败微生物菌群主要为假单胞菌、不动杆菌和肠球菌。来自肝脏的液滴主要含有假单胞菌和肠球菌。而在深层组织中主要微生物为肠细菌和乳酸杆菌。在产生臭味之前，高葡萄糖水平可以满足可见的表面菌落生长，由此说明肝脏中的主要腐败微生物为非乳酸菌类型。在整个肝脏腐败的过程中，乳酸菌的作用并不明显，因为条件更利生长快速、嗜冷的革兰氏阴性细菌生长。

### 三、鱼类的腐败变质

#### （一）鱼类中的微生物

目前一般认为，新捕获的健康鱼类，其组织内部和血液中常是无菌的，但在鱼体表面的黏液中，鱼皮、鱼鳃以及消化器官等处存在着微生物。由于季节、鱼场、种类的不同，体表所附细菌数有所差异。而捕获过程所使用过的鱼仓、渔具、甲板以及捕获人员的手都将成为新的污染源。捕获地区和捕捞方式的差异也将造成一定的影响，污染细菌的菌相也有所差异。

存在鱼类中的微生物主要有假单胞菌属、无色杆菌属、黄杆菌属、不动杆菌属、拉氏杆菌属和弧菌属。海水鱼中常见的腐败微生物有假单胞菌、无色杆菌、摩氏杆菌、黄色杆菌、小球菌、棒状杆菌及葡萄球菌等。海水鱼中的腐败微生物种类将随鱼捕获的海域及鱼捕获后的处理方法的不同而异。比如北海、挪威远海捕获的鱼带有较多的假单胞菌、摩氏杆菌及黄色杆菌等细菌，而日本近海捕获的鱼中，假单胞菌、无色杆菌及摩氏杆菌等细菌占有较大的比例。淡水鱼带有的腐败微生物除了海水鱼中常见的那些细菌以外，还有产碱杆菌、气单胞杆菌和短杆菌属等细菌。另外，芽孢杆菌、大肠杆菌、棒状杆菌等也有报道。

虾等甲壳类中的腐败微生物主要有假单胞菌、不动杆菌、摩氏杆菌、黄色杆菌及小球菌等。而牡蛎、蛤、乌贼及扇贝等软体动物中常见的腐败微生物包括假单胞菌、无色杆菌、不动杆菌、摩氏杆菌等。

#### （二）微生物与鱼类的腐败变质

一般情况下，鱼类比肉类更易腐败。因为通常鱼类在捕获后，不是立即清洗处理，而多数情况下是带着容易腐败的内脏和鱼鳃一道进行运输，这样就容易引起腐败。其次，鱼体本身含水量高（70%~80%），组织脆弱，鱼鳞容易脱落，细菌容易从受伤部位侵入，而鱼体表面的黏液又是细菌良好的培养基，因而造成了鱼死后很快就发生腐败变质。鱼体所带的腐败细菌主要是水中细菌，多数是需氧性细菌。这些细菌在鱼类生活状态下存在于鱼体表面的黏液、鱼鳃及消化道中。细菌侵入鱼体的途径主要有两种：一是体表污染的细菌，温度适宜时首先在黏液中生长繁殖，使其体表黏液变得浑浊，失去光泽，鳃部颜色变

灰暗，鱼体表面变得混浊，并产生不快的味道。细菌进一步侵入鱼皮，表皮组织因细菌的分解而变得疏松，使固着鱼鳞的结缔组织发生蛋白质分解，造成鱼鳞容易脱落。当细菌从体表黏液进入眼部组织时，眼角膜变得混浊，并使固定眼球的结缔组织分解，因而使眼球陷入眼窝。大部分情况下，鱼都是因窒息而死的，鱼鳃充血，给细菌繁殖创造了有利条件。鱼鳃在细菌酶的作用下，失去原有的鲜红色而变成褐色甚至灰色，并产生臭味。细菌还可以通过鱼鳃进入鱼的组织内部。细菌腐败的另一种途径则是腐败细菌在消化道内繁殖，消化道组织发生溃烂，细菌即穿过肠壁进入腹腔各脏器组织，在细菌酶的作用下，蛋白质发生分解，并产生气体，使腹腔的压力升高继而膨胀破裂。细菌扩散进入体腔壁并通过毛细血管进入肌肉组织内部，在此过程中引起溶血现象，脊骨上的肌肉脱离，形成骨肉分离的状态，使整个鱼体组织被分解，产生氨、硫化氢、吲哚、粪臭素、硫醇等腐败特征产物。一般地，当细菌总数达到或超过  $10^8$  CFU/g 的时候，从感官上即可判断鱼体已进入腐败期。

来源于水产品中的致病菌通常可分为两种。一种是自身原有的细菌，广泛分布于世界各地的水环境中，并受气温的影响。嗜冷菌如肉毒梭菌和李斯特氏菌常见于北极和较寒冷气候的地区，而较多的嗜热菌如霍乱弧菌和副溶血性弧菌，代表了部分滨海、港湾的环境或温热带水域中鱼体上细菌的自然种群。有些水产食品原料也可能被更多种病原体感染，但因污染水平低，生鲜水产品中含有的病原体数量一般不引发疾病，然而其生长繁殖可使生产的加工食品中的浓度升高，增加引起疾病风险。另一种致病菌是水产品非自身原有细菌。例如沙门氏菌属，以及志贺氏菌、金黄色葡萄球菌等。

## 四、鲜蛋的腐败变质

### （一）鲜蛋中的微生物

通常新产下的鲜蛋里是没有微生物的，新蛋壳表面又有一层黏液胶质层，具有防止水分蒸发，阻止外界微生物侵入的作用。其次，在蛋壳膜和蛋白中，存在一定的溶菌酶，可以杀灭侵入壳内的微生物，故正常情况下鲜蛋可保存较长的时间而不发生变质。然而鲜蛋也会受到微生物的污染，当母禽不健康时，机体防御机能减弱，外界的细菌可侵入到输卵管，甚至卵巢，而蛋产下后，蛋壳立即受到禽类、空气等环境中微生物的污染，如果胶质层被破坏，污染的微生物就会透过气孔进入蛋内，当保存的温度和湿度过高时，侵入的微生物就会大量生长繁殖，结果造成蛋的腐败。

鲜蛋中常见的微生物有大肠菌群、无色杆菌属、假单胞菌属、产碱杆菌属、变形杆菌属、青霉属、枝孢属、毛霉属、枝霉属等。另外，蛋中也可能存在病原菌，如沙门氏菌、金黄色球菌。

### （二）鲜蛋的腐败变质

由于上述的多种原因，鲜蛋也容易发生腐败变质，其变质有两种类型。

### 1. 腐败

主要是由细菌引起的鲜蛋变质。侵入到蛋中的细菌不断生长繁殖，并形成各种相适应的酶，然后分解蛋内的各组成成分，使鲜蛋发生腐败和产生难闻的气味。主要由荧光假单胞菌所引起，使蛋黄膜破裂，蛋黄流出与蛋白混合（即散蛋黄）。如果进一步发生腐败，蛋黄中的核蛋白和卵磷脂也被分解，产生恶臭的硫化氢等气体和其他有机物，使整个内含物变为灰色或暗黑色。这种黑腐病主要是由变形杆菌属和某些假单胞菌和气单胞菌引起。

### 2. 霉变

霉菌菌丝经过蛋壳气孔侵入后，首先在蛋壳膜上生长，逐渐形成斑点菌落，造成蛋液黏壳，蛋内成分分解，并有不愉快的霉变气味产生。

## 五、罐藏食品的腐败变质

罐藏食品是将食品原料经一系列处理后，再装入容器，经密封、杀菌而制成的一种特殊形式保藏的食品。一般来说，罐藏食品可保存较长时间而不发生腐败变质。但是，有时由于杀菌不彻底或密封不良，也会遭受微生物的污染而造成罐藏食品的变质。

### （一）罐藏食品的性质

存在于罐藏食品上的微生物能否引起食品变质，是由多种因素来决定的。其中食品的pH值是一个重要因素。因为食品的pH值多半与食品原料的性质及确定的食品杀菌工艺条件有关，并进而与引起食品变质的微生物有关。罐藏食品按照pH值可以分为三类。

#### 1. 酸性食品

酸性食品pH值 $<4.6$ ，一般包括各种果汁、柠檬汁、黄豆、酸奶、酸菜等，这类食品的酸度高，可以防止细菌滋生，保存时间相对较长。

#### 2. 中性食品

中性食品pH值在 $4.6\sim 7.0$ ，主要包括大豆油、糖、淀粉等，这类食品的pH值较高，比较易受微生物的影响，保存时间相对较短。

#### 3. 碱性食品

碱性食品pH值 $>7.0$ ，包括大米、白面条等，这类食品pH值较高，具有抗菌和抗氧化的作用，但保存时间相对较短，容易变质。

### （二）引起罐藏食品变质的微生物

罐藏食品生物腐败变质通常分为嗜热菌、中温菌、不产芽孢菌、酵母菌和霉菌引起的腐败。

#### 1. 芽孢杆菌

嗜热脂肪芽孢杆菌、凝结芽孢杆菌，它们是引起罐头平酸腐败（产酸不产气腐败）的

嗜热菌；枯草芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌和蜡样芽孢杆菌，它们是引起罐头平酸腐败中温菌；也有少数中温芽孢细菌引起罐头腐败变质时伴随有气体产生，如多黏芽孢杆菌、浸麻芽孢杆菌；TA菌（如嗜热解糖梭菌）是一种分解糖、专性嗜热、产芽孢的厌氧菌；特别是厌氧的肉毒梭状芽孢杆菌，在食品中繁殖能产生肉毒毒素，且毒性很强，因此罐藏食品常把能否杀死肉毒梭菌的芽孢作为灭菌标准。

罐藏食品发生由芽孢杆菌引起的腐败，大多是由于杀菌不彻底造成的。

## 2. 非芽孢细菌

非芽孢细菌有两类：一类是肠杆菌，如大肠杆菌、产气杆菌、变形杆菌等；另一类是球菌，如乳链球菌、粪链球菌和嗜热链球菌等。它们能分解糖类产酸，并产生气体，造成罐头胀罐。不产芽孢的细菌耐热性不如产芽孢细菌，如果罐头中发现有不产芽孢的细菌，这常是由于罐头密封不良，漏气而造成的，或由于杀菌温度过低造成的。

## 3. 酵母菌

引起罐藏食品变质的酵母菌主要是球拟酵母属、假丝酵母属、啤酒酵母属。由于罐头食品加热杀菌不充分，或罐头密封不良而导致了酵母菌残存于罐内。罐藏食品因酵母引起的变质，绝大多数发生在酸性或高酸性罐头食品，如水果、果浆、糖浆以及甜炼乳等制品中。酵母菌多为兼性厌氧菌，发酵糖产生二氧化碳而造成腐败胀罐。

## 4. 霉菌

霉菌具有耐酸、耐高渗透压的特性。因此，引起罐藏食品变质，常见于酸度高（pH值 $<4.5$ ）的罐头食品中。但霉菌多为好氧菌，且一般不耐热，若罐头食品中有霉菌出现，说明罐头食品真空度不够、漏气或杀菌不充分而导致了霉菌残存。例如青霉属、曲霉属等。但也有少数几种霉菌耐热，如纯黄丝衣霉菌和雪白丝衣霉菌等较耐热、耐低氧，可引起水果罐头糖发酵，产生二氧化碳而胀罐。

# 六、果蔬及其制品的腐败变质

## （一）微生物引起新鲜果蔬的腐败变质

### 1. 新鲜果蔬上微生物的来源

水果和蔬菜的表皮和表皮外覆盖着一层蜡质状物质，这种物质有防止微生物侵入的作用。因此，除了患传染性疾病或遭虫害的果蔬外，一般正常的果蔬内部组织是无菌的。但是，果蔬的外表则附有大量的微生物。一般情况下，每平方厘米的果蔬表面附着的微生物的数量从数百至数千乃至几百万个，具体数量与果蔬的种类有关。表皮外分泌物较多的果蔬，如草莓、番茄等浆果类的水果比苹果、梨等水果的表面附着有更多的微生物；而大多数蔬菜的可食部分距地面较近或为植物的地下部分（茎或根），它们的表面附着的微生物的数量要比水果多。施用粪便等有机肥或污水灌溉的蔬菜，更是如此。当果蔬表皮组织受到昆虫的刺伤或其他机械损伤时，微生物就会从此侵入并繁殖，从而促进果蔬的腐烂变

质。尤其是成熟度高的果蔬更易损伤。收获后的包装、储藏、运输和加工等过程也可使果蔬受微生物的污染。

## 2. 腐败菌与新鲜果蔬的腐败变质

水果与蔬菜的物质组成特点是以碳水化合物和水为主。水分含量高，这是果蔬容易引起微生物变质的一个重要因素（水果 85%、蔬菜 88%）；其次水果 pH 值  $< 4.5$ ，蔬菜 pH 值为 5~7，这决定了水果蔬菜是能进行生长繁殖微生物的类群。引起水果变质的微生物开始只能是酵母菌、霉菌；引起蔬菜变质的微生物是霉菌、酵母菌和少数细菌。

由于果蔬类食物尤其是水果中含有较多的有机酸和糖类物质，大多数果蔬呈酸性，pH 值一般较低，适合霉菌、酵母和耐酸性的细菌生长。

最常见的现象是霉菌首先在果蔬表皮损伤处繁殖或者在果蔬表面有污染物黏附的区域繁殖，侵入果蔬组织后，组织壁的纤维素首先被破坏，进而分解果胶、蛋白质、淀粉、有机酸、糖类，继而酵母菌和细菌开始繁殖。由于微生物繁殖，果蔬外观表现出深色的斑点，组织变得松软，发绵，凹陷、变形，逐渐变成浆液状甚至是水液状，并产生了各种不同的味道，如酸味、芳香味、酒味等。

大约有 25 种真菌和细菌与果蔬采后严重腐烂有关。在生长期植物对真菌和细菌具有较强的抵抗力，采后成熟的果蔬对病原菌感染比较敏感。但是，每一种水果或蔬菜仅受相对较少的几种真菌或细菌感染。例如，指状青霉引起柑橘果实绿腐病，但是苹果和梨果实上不造成病害；扩展青霉侵害苹果和梨，但不危害柑橘果实。链核盘菌感染桃、樱桃、苹果和梨引起褐腐病，但不感染热带水果。葡枝根霉、灰霉葡萄孢、链格孢和白地霉引起许多果蔬的腐烂。欧文氏杆菌一般引起蔬菜的软腐病，除了番茄、甜椒、黄瓜、梨以外，其他果实受欧文氏杆菌感染较少。

果蔬中常见的霉菌有青霉、绿霉、白边青霉、镰刀霉菌、黑根霉、黑曲霉、交链孢霉、甘薯黑斑霉、马铃薯疫霉、灰绿葡萄孢霉等；常见的酵母菌有圆酵母属和红酵母属中的微生物；主要的细菌有乳酸菌和醋酸菌。

## 3. 新鲜果蔬的变质现象

新鲜水果因微生物的污染而发生腐败变质时，首先在感官和形态上发生变化，颜色变暗，组织松散，继而变为团状，及至变为半液态，并散发出霉变和酸腐气味。水果可散发出酒的气味。

变质的具体类型及现象则主要取决于果蔬的种类和导致变质的微生物的类型及其代谢方式。例如苹果、梨、柑橘类水果可因污染青霉，其生长与繁殖方式呈现软腐性变质，严重者长有典型的绿色菌落；马铃薯可因镰刀霉菌的生长而发生腐烂；甘薯表面出现的黑斑则因甘薯黑斑菌而产生。

## （二）微生物引起果蔬汁的腐败变质

### 1. 引起果蔬汁变质的微生物

果蔬汁是以新鲜水果（少数以干果）或蔬菜为原料经压榨或浸提等方法制得的只含水

果、蔬菜的可溶性固形物的汁类产品，或是将果蔬的可食部分加水经破碎加工而成的浆状制品。

果蔬原料带有一定数量的微生物，在果蔬汁制造过程中，即将原料果蔬压榨与破碎的过程，不可避免地还会受到微生物的污染，因而果汁中存在一定数量的微生物。再者，在果蔬破碎、均质时的高速剪切过程中，氧气大量地溶于果蔬浆、汁中，这一切都为微生物在此类制品中的繁殖提供了有利条件。但微生物进入果蔬汁后能否生长繁殖，主要取决于果蔬汁的 pH 和果蔬汁中糖分含量的高低。由于果汁的酸度多在 pH2.4~4.2 之间，且糖度较高，因而在果汁中生长的微生物主要是酵母菌、霉菌和极少数的细菌。

果汁中的细菌主要是植物乳杆菌、乳明串珠菌和嗜酸链球菌。它们可以利用果汁中的糖、有机酸生长繁殖，并产生乳酸、二氧化碳等和少量丁二酮、3-羟基-2-丁酮等香味物质。乳明串珠菌可产生黏多糖等增稠物质而使果汁变质；当果汁的 pH 值 >4.0 时，酪酸菌容易生长而进行丁酸发酵。

酵母菌也是果汁中所含的微生物数量和种类最多的一类微生物。它们是从鲜果中带来的或是在压榨过程中环境污染的，酵母菌能在 pH 值 >3.5 的果汁中生长。果汁中的酵母菌，主要有假丝酵母菌属、圆酵母菌属、隐球酵母属和红酵母属。如新鲜压榨出来的苹果汁，酵母多为假丝酵母属、圆顶酵母属、隐球属和酵母属的酵母菌；而从变质的果汁中分离出来的，则主要是酵母属的菌株；刚压榨出的葡萄汁中主要为柠檬性的克勒氏酵母，其次是葡萄酒酵母等，储存一段时间以后还会发现有汉逊氏酵母属、毕赤氏酵母属、圆酵母属、酒香酵母属和红酵母属等酵母菌的存在。此外，苹果汁保存于低二氧化碳气体中时，常会见到汉逊氏酵母菌生长，此菌可产生水果香味的酯类物质；柑橘汁中常有越南酵母菌、葡萄酒酵母、圆酵母属和酿酵母属的酵母菌，这些菌是在加工中污染的；浓缩果汁由于糖度高、酸度高，细菌的生长受到抑制，在其中生长的是一些耐渗透压的酵母菌，如鲁氏酵母菌、蜂蜜酵母菌等。在呈中性或弱碱性的蔬菜类汁中，酵母菌则比较少见。

霉菌引起果汁变质时会产生难闻的气味。果汁中存在的霉菌以青霉属最为多见。如扩张青霉、皮壳青霉，其次是曲霉属的霉菌，如构巢曲霉、烟曲霉等。原因是霉菌的孢子有较强的抵抗力，可以长时间保持其活力。但霉菌一般对二氧化碳敏感，故充入二氧化碳的果汁可以防止霉菌的生长。在刚压榨出的果汁中，可发现交链孢霉属、芽枝霉属、粉孢属和镰刀霉属的一些霉菌。但是这些霉菌在一般情况下是不会在经脱气和杀菌后储藏的果蔬汁中发现的。霉菌在果汁中稍有生长即可使果蔬汁产生不良的气味。

引起果蔬汁变质的细菌，主要是乳酸菌类的微生物，包括同型和异型乳酸菌，它们可在 pH3.5 以上的果蔬汁中生长。

## 2. 微生物引起果蔬汁变质的现象

微生物引起果蔬汁变质一般会出现浑浊、产生酒精和导致有机酸的变化。浑浊与沉淀是不含果肉的果蔬汁制品中常见的变质现象。果汁浑浊除了化学因素外，还有酵母菌进行酒精发酵的因素。当然，有时也可由霉菌造成。通常引起浑浊的是圆酵母菌属中的一些种以及一些耐热性的霉菌。如雪白丝衣霉菌、纯黄衣霉菌和宛氏拟青霉等。但霉菌在果汁中少量生长时，并不发生浑浊，仅使果汁的风味变坏，产生霉味和臭味等。因为它们能产生

果胶酶，对果汁起澄清作用，只有大量生长时才会浑浊。某些乳酸菌可将糖转化为胶状黏稠物，使果蔬汁呈粥状浑浊。

引起果蔬汁产生酒精而变质的微生物主要是酵母菌。常见的酵母菌有葡萄汁酵母菌、啤酒酵母菌等。酵母菌能耐受  $\text{CO}_2$ ，当果汁含有较高浓度的  $\text{CO}_2$  时，酵母菌虽不能明显生长，但仍能保持活力，一旦  $\text{CO}_2$  浓度降低，即可恢复生长繁殖的能力。此外，少数霉菌和细菌也可引起果蔬汁产生酒精变质，如甘露醇杆菌、明串珠菌、毛霉、曲霉、镰刀霉中的部分菌种。

果汁变质时可导致有机酸的变化。果汁中含多种有机酸如酒石酸、柠檬酸、苹果酸。它们以一定的含量形成了果汁特有的风味。当微生物生长繁殖后，分解或合成了某些有机酸，从而改变了它们的含量比例，因而使果汁原有的风味被破坏，有时甚至产生了一些不愉快的异味。如解酒石杆菌、黑根霉、葡萄孢霉属、青霉属、毛霉属、曲霉属和镰刀霉属等。

颜色的异变是果蔬汁变质的另一种表现形式。除果蔬的自身原因外，果蔬汁的颜色常因微生物的繁殖而改变。霉菌污染果蔬汁时，霉菌产生的色素可以扩散到果蔬汁中，从而掩盖了果蔬汁的本色；有的微生物可将果蔬中的色素分解，使果蔬的颜色消退。常见的色变分别为变白、变绿和变褐。

滋气味是果蔬类制品的重要特征之一。而决定果蔬特征性滋气味的糖、有机酸和香气成分，在被微生物分解为具有刺激性的物质后，果蔬汁的滋气味就会产生异常变化。果蔬中的糖类物质经酵母菌的有氧呼吸和发酵作用，可发生大量的二氧化碳或醇类物质；还可以被细菌，尤其是乳酸菌、醋酸菌转化为乙醇、乳酸等挥发性物质。柠檬酸、苹果酸、酒石酸被乳酸菌、某些霉菌和细菌分解利用，产生乳酸、醋酸和碳酸。

## 七、糕点的腐败变质

### （一）糕点变质现象和微生物类群

糕点类食品由于含水量较高，糖、油脂含量较多，在阳光、空气和较高温度等因素的作用下，易引起霉变和酸败。引起糕点变质的微生物类群主要是细菌和霉菌，如沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、粪肠球菌、大肠杆菌、变形杆菌、黄曲霉、毛霉、青霉、镰刀霉等。

### （二）糕点腐败变质的原因分析

糕点变质主要是由于生产原料不符合质量标准、制作过程中灭菌不彻底和糕点包装储藏不当而造成的。

#### 1. 生产原料不符合质量标准

糕点食品的原料有糖、奶、蛋、油脂、面粉、食用色素、香料等。特别是以奶、蛋为主的糕点，微生物容易生长繁殖。市售糕点往往不再加热而直接入口。因此，对糕点原料

选择、加工、储藏、运输、销售等都应严格地遵守卫生要求。糕点食品发生变质的原因之一是原料的质量问题。对含有奶、蛋的糕点食品，葡萄球菌容易繁殖，并产生毒素。如作为糕点原料的奶及奶油未经过巴氏消毒，奶中污染有较高数量的细菌及其毒素；含蛋白的糕点则容易受到沙门氏菌的污染。蛋类在打蛋前未洗涤蛋壳，不能有效地除去微生物。为了防止糕点的霉变以及油脂和糖的酸败，应对生产糕点的原料进行消毒和灭菌。已有霉变和酸败迹象的花生仁、芝麻、核桃仁和果仁等不能采用。

### 2. 制作过程中灭菌不彻底

各种糕点食品生产时，都要经过高温处理，既是食品熟制又是杀菌过程。在这个过程中大部分的微生物都被杀死，但抵抗力较强的细菌芽孢和霉菌孢子往往残留在食品中，遇到适宜的条件，仍能生长繁殖，引起糕点食品变质。

### 3. 糕点包装储藏不当

糕点的生产过程中，由于包装及环境等方面的原因会使糕点食品污染许多微生物。烘烤后的糕点，必须冷却后才能包装。所使用的包装材料应无毒、无味，生产和销售部门应具备冷藏设备。

糕点中含水量较高（20%~30%）的食品如面包、蛋糕等，很容易发生霉变。当烘烤未烤透时，霉变更易发生。霉变的程度同时还与生产工艺、包装和存放有关。在通风条件不良的情况下存放，霉变现象特别容易出现。所以，含水量高的糕点食品不宜用塑料包装。

另外，生产、销售人员如不讲卫生，用不清洁的手接触食品、打喷嚏、咳嗽，甚至谈话都可能带进细菌使食品受到污染。

## 任务三 食品的保藏技术与生产管理

食品保藏的原理就是围绕防止微生物污染、杀灭或抑制微生物生长繁殖以及延缓食品自身组织酶的分解作用，采用物理学、化学和生物学方法，使食品在尽可能长的时间内保持其原有的营养价值、色、香、味等良好的感官性状。

### 一、食品的保藏技术

#### （一）食品的低温保藏

食品在低温下，本身酶活性及化学反应得到延缓，低温也不适宜微生物的生长和繁殖。因此，食品的低温保藏可以防止或减缓食品的变质，并在一定的期限内，可较好地保持食品的品质。

目前在食品制造、储藏和运输系统中，都普遍采用人工制冷的方式来保持食品的品质。



量。另外，冷却和冷冻不仅可以延长食品货架期，也可以和某些食品的制造过程结合起来，从而达到改变食品性能和功能的目的。如在冷饮、冰淇淋制品中，冻结浓缩、冻结干燥、冻结粉碎等都已普遍得到应用。

低温保藏一般可分为冷藏和冷冻两种方式。前者无冻结过程，新鲜果蔬类和短期储藏的食品常用此法。后者要将保藏物降温到冰点以下，使食品中的水部分或全部呈冻结状态，动物性食品常用此法。

### 1. 食品的冷藏

一般的冷藏是指在不冻结状态下的低温储藏。由于病原菌和腐败菌大多为中温菌，其最适生长温度为 $20\sim 40^{\circ}\text{C}$ ，所以在 $10^{\circ}\text{C}$ 以下大多数微生物难以生长繁殖，仅有少数嗜冷性微生物还能活动。而在 $-18^{\circ}\text{C}$ 以下几乎所有的微生物不再发育。由此可见，低温保藏只有在 $-18^{\circ}\text{C}$ 以下才是较为安全的。由于大多数酶的适宜活动温度为 $30\sim 40^{\circ}\text{C}$ ，温度维持在 $10^{\circ}\text{C}$ 以下，酶的活性将受到很大程度的抑制，因此，冷藏可延缓食品的变质。冷藏的温度一般设定在 $-1\sim 10^{\circ}\text{C}$ 范围内。当然，冷藏也只能是食品储藏的短期行为（一般为数天或数周）。

另外，在最低生长温度时，微生物生长非常缓慢，但它们仍在进行生命活动。如霉菌中的侧孢霉属、枝孢属在 $-6.7^{\circ}\text{C}$ 还能生长；青霉属和丛梗孢霉属的最低生长温度为 $4^{\circ}\text{C}$ ；细菌中假单胞菌属、无色杆菌属、产碱杆菌属、微球菌属等在 $-4\sim 7.5^{\circ}\text{C}$ 下生长；酵母菌中，一种红色酵母在 $-34^{\circ}\text{C}$ 冰冻温度时仍能缓慢发育。

对于动物性食品，冷藏温度越低越好，但对新鲜的蔬菜水果来讲，如温度过低，则将引起果蔬的生理机能障碍而受到冷害。因此，应按其特性采用适当的低温，并且还应结合环境的湿度和空气成分进行调节。水果、蔬菜收获后，仍保持着呼吸作用等生命活动，不断地产生热量，并伴随着水分的蒸发散失，从而引起新鲜度的降低，因此，在不造成细胞冷害的范围内，也应尽可能降低其储藏温度。湿度高虽可抑制水分的散失，但高湿度也容易引起微生物的繁殖，故湿度一般保持在 $85\%\sim 95\%$ 为宜。还应说明的是食品的具体储存期限，还与食品的卫生状况、果蔬的种类、受损程度以及保存的温度、湿度、气体成分等因素有关，不可一概而论。

### 2. 食品的冷冻保藏

食品在冰点以上时，只能较短期的保藏，较长期保藏需在 $-18^{\circ}\text{C}$ 以下冷冻储藏。当食品中的微生物处于冰冻时，细胞内游离水形成冰晶体，失去了可利用的水分，水分活性 $A_w$ 值降低，渗透压提高，细胞内细胞质因浓缩而增大黏性，引起pH值和胶体状态的改变，从而使微生物的活动受到抑制，甚至死亡。微生物细胞内的水结为冰晶，冰晶体对细胞也有机械性损伤作用，可直接导致部分微生物的裂解死亡。

食品在冻结过程中，不仅损伤微生物细胞，鲜肉类、果蔬等生鲜食品的细胞也同样受到损伤，致使其品质下降。食品冻结后，其质量是否优良，受冻结时生成冰晶的形状、大小与分布状态的影响很大。如肉类在缓慢冻结中，冰晶先在溶液浓度较低的肌细胞外生成，结晶核数量少，冰晶生长大，损伤细胞膜，使细胞破裂，解冻时细胞质液外流而形成

渗出液，导致肉类营养、水分和鲜味流失，口感降低。同时，肌细胞的水分透过细胞膜形成冰晶，肌细胞脱水萎缩，解冻时细胞不可能完全恢复原状。果蔬等植物食品因含水量较高，结冰率更大，更易受物理损伤而使风味受到损失。

冻结时冰晶的大小与通过最大冰晶生成带的时间有关。肉、鱼等食品通常在 $-5\sim 1^{\circ}\text{C}$ 的温度范围为其最大冰晶生成带。冻结速度越快，形成的晶核越多，冰晶越小，且均匀分布于细胞内，不致损伤细胞组织，解冻后复原情况也较好。因此，快速冻结有利于保持食品（尤其是生鲜食品）的品质。

所谓快速冻结即速冻。不同的教材中其说法不一，并无严格的定义。通常指的是食品在30min内冻结到所设定的温度（ $-20^{\circ}\text{C}$ ），或以30min左右通过最大冰晶生成带（ $-5\sim -1^{\circ}\text{C}$ ）为准。如以生成冰晶的大小为准，生成的冰晶大小在 $70\mu\text{m}$ 以下者称为速冻。不过因食品种类不同，受冰品的影响也不同，故很难有统一的标准。

肉的冻结速度是指在单位时间内，肉体由表面伸展向内部的冻结速度（即结冰层厚度，以厘米表示）。一般冻结速度为 $0.1\sim 1\text{cm/h}$ ，称为缓慢冻结；冻结速度为 $1\sim 5\text{cm/h}$ ，称为中速冻结；冻结速度为 $5\sim 20\text{cm/h}$ ，称为快速冻结。实践证明，对中度厚度的半片猪肉在20h内由 $0\sim 4^{\circ}\text{C}$ 冻结到 $-18^{\circ}\text{C}$ ，冻结质量是好的。对大多数食品来说，冻结速度在 $2\sim 5\text{cm/h}$ 即可避免质量的下降。

肉类中的蛋白质在冻结时会引起酶活性、溶解性、黏度、凝胶形成力、起泡性等一系列变化。一般来说，冻结速度越慢，冻结的最终温度越低，蛋白质变性的程度也越大。防止动物性蛋白质的冻结变性，对于食品的价值及原料品质的保持有重要的意义。

### 3. 解冻

解冻是冻结的逆过程。通常是冻品表面先升温解冻，并与冻品中心保持一定的温度梯度。由于各种原因，解冻后的食品并不一定能恢复到冻结前的状态。冻结食品解冻时，冰晶升温而溶解，食品物料因冰晶溶解而软化，微生物和酶开始活跃。因此，解冻过程的设计要尽可能避免因解冻而可能遭受的损失。对不同的食品，应采取不同的解冻方式。

通常是在流动的冷空气、水、盐水、水冰混合物等作为解冻媒体进行解冻，温度控制在 $0\sim 10^{\circ}\text{C}$ 为好，可防止食品在过高温下造成微生物和酶的活动，防止水分的蒸发。对于即食食品的解冻，可以用高温快速加热。用微波解冻是较好的方法，能量在冻品内外同时发生，解冻时间短，渗出液少，可以保持解冻品的优良品质。

冻结状态良好的肉类，在缓慢解冻时，融解的水分再度被肉质所吸收，滴落液较少，肉质可基本恢复至原来的状态。对于冻结状态较差的肉类，在解冻时产生的滴落液较多，肉的重量损失较多，肉中部分可溶性物质也随之损失，肉的质量降低。

## （二）食品的气调保藏

气调保藏是指用阻气性材料将食品密封于一个改变了气体成分的环境中，从而抑制腐败微生物的生长繁殖及生化活性，达到延长食品货架期的目的。

### 1. 气调保藏的原理

果蔬的变质主要是由于果蔬的呼吸和蒸发、微生物生长、食品成分的氧化或褐变等作

用，而这些作用与食品贮藏的环境气体有密切的关系。如氧气、二氧化碳、氮气、水分和温度等。如果能控制食品储藏环境气体的组成，如增加环境气体中二氧化碳、氮气比例，降低氧气比例，控制食品变质的因素，可达到食品保鲜或延长保藏期的目的。

气调保藏可以降低果蔬的呼吸强度，降低果蔬对乙烯作用的敏感性，延长叶绿素的寿命，减慢果胶的变化，减轻果蔬组织在冷害温度下积累乙醛、醇等有毒物质，从而减轻冷害，抑制食品中微生物的活动，防止虫害，抑制或延缓其他不良变化。因此，气调保藏特别适合于鲜肉、果蔬的保鲜。另外还可用于谷物、鸡蛋、肉类、鱼产品等的保鲜或保藏。

一般来说，果蔬在储藏中希望尽可能降低气体成分中的氧气分压，但是如果氧气浓度降得过低，体内有机物就不能形成好气性分解，从而会引起有害于品质的厌氧性发酵。所以，当降低氧气的浓度时，应以不致造成厌氧性呼吸障碍为度。提高环境中二氧化碳的浓度可降低果蔬成熟反应（蛋白质、色素的合成）的速度，抑制微生物和某些酶（如琥珀酸脱氢酶、细胞色素氧化酶）的活动，抑制叶绿素的分解，改变各种糖的比例，从而良好地保持新鲜蔬菜和水果的品质。但若二氧化碳浓度过高，将造成正常呼吸的生理障碍，反而缩短储藏时间。各种蔬菜水果的最适二氧化碳浓度均有所差别。一般水果为2%~3%，蔬菜为2.5%~5.5%，同时，也都受到氧气浓度和环境温度的影响。氧浓度过低或二氧化碳浓度过高都可能会引起果蔬的异常代谢，从而使组织受到伤害。

## 2. 气调保藏的方法

根据气体调节原理可将气调储藏分为MA（Modified Atmosphere）和CA（Controlled Atmosphere）两种。前者指用改良的气体建立气调系统，在以后储藏期间不再调整，后者指在储藏期间，气体的浓度一直控制在某一恒定的值或范围内，这种方法效果更为确切。要想控制食品的储藏气体环境，则必须将食品封闭在一定的容器或包装内。如气调库、气调车、气调箱、气调袋（即CAP或MAP）、涂膜保鲜、真空包装和充气包装等。

气调的方法较多，主要有自然气调法、置换气调法（即氮气、二氧化碳置换包装）、氧气吸收剂封入包装、涂膜气调法、减压（真空）保藏和充气包装等。但总的来说，其原理都是基于降低含氧量，提高二氧化碳或氮气的浓度，并根据各储藏物的不同要求，使气体成分保持在所希望的状况。

## （三）加热杀菌保藏

### 1. 微生物的耐热性及影响加热杀菌的因素

微生物具有一定的耐热性。细菌的营养细胞及酵母菌的耐热性，因菌种不同而有较大的差异。一般病原菌（梭状芽孢杆菌属除外）的耐热性差，通过低温杀菌（例如63℃，经30min）就可以将其杀死。细菌的芽孢一般具有较高的耐热性，食品中肉毒梭状芽孢杆菌是非酸性罐头的主要杀菌目标。该菌孢子的耐热性较强，必须特别注意。一般霉菌及其孢子在有水分的状态下，加热至60℃，保持5~10min即可以被杀死。但在干燥状态下，其孢子的耐热性非常强。

许多因素影响微生物的加热杀菌效果。首先食品中的微生物密度（原始带菌量）与抗

热力有明显关系。带菌量愈多，则抗热力愈强。因为菌体细胞能分泌对菌体有保护作用的蛋白类物质，故菌体细胞增多，这种保护性物质的量也就增加。其次，微生物的抗热力随水分的减少而增大，即使是同一种微生物，它们在干热环境中的抗热性最大。此外，基质向酸性或碱性变化，杀菌效果则显著增大。

基质中的脂肪、蛋白质、糖及其他胶体物质，对细菌、酵母、霉菌及其孢子起着显著的保护作用。这可能是细胞质的部分脱水作用，阻止蛋白质凝固的缘故。因此，对高脂肪及高蛋白食品的加热杀菌需加以注意。多数香辛料，如芥子、丁香、洋葱、胡椒、蒜、香精等，对微生物孢子的耐热性有显著的降低作用。

## 2. 加热杀菌的方法

食品的腐败常常是由于微生物和酶所致。食品通过加热杀菌使酶失活，可久储不坏。但必须不重复染菌，因此，要在装罐装瓶密封以后灭菌，或者灭菌后在无菌条件下充填装罐。食品加热杀菌的方法很多。主要有常压杀菌（巴氏消毒法）、加压杀菌、超高温瞬时杀菌、微波杀菌、远红外线加热杀菌和欧姆杀菌等。

(1) 常压杀菌 常压杀菌即  $100^{\circ}\text{C}$  以下的杀菌操作。巴氏消毒法只能杀死微生物的营养体（包括病原菌），但不能完全灭菌。现在的常压杀菌更多采用水浴、蒸汽或热水喷淋式连续杀菌。

(2) 加压杀菌 常用于肉类制品、中酸性、低酸性罐头食品的杀菌。通常的温度为  $100\sim 121^{\circ}\text{C}$ （绝对压力为  $0.2\text{ MPa}$ ），当然杀菌温度和时间随罐内物料、形态、罐形大小、灭菌要求和储藏时间而异。在罐头行业中，常用 D 值和 F 值来表示杀菌温度和时间。

Dr (DRT) 值是指在一定温度下，细菌死亡 90%（即活菌数减少一个对数周期）所需要的时间（min）。 $121.1^{\circ}\text{C}$ （ $250^{\circ}\text{F}$ ）的 D (DRT) 值常写作 Dr。例如，嗜热脂肪芽孢杆菌的 Dr 为  $4.0\sim 4.5\text{ min}$ ，A、B 型肉毒梭状芽孢杆菌的 Dr 为  $0.1\sim 0.2\text{ min}$ 。

F 值是指在一定基质中，在  $121.1^{\circ}\text{C}$  下加热杀死一定数量的微生物所需要的时间（min）。在罐头特别是肉罐头中常用。由于罐头种类、包装规格大小及配方的不同，F 值也就不同。故生产中每种罐头都要预先进行 F 值测定。

对液体或固体混合的罐装食品，可以采用旋转式或摇动式杀菌装置。玻璃瓶罐虽然也能耐高温，但是不太适宜压力釜高温杀菌，必须用热水浸泡蒸煮。复合薄膜包装的软罐头通常采用高压水煮杀菌。

(3) 超高温瞬时杀菌 根据温度对细菌及食品营养成分的影响规律，热处理敏感的食品，可考虑采用超高温瞬时杀菌法，即 UHTST 杀菌，简称 UHT。该杀菌法既可达到一定的杀菌要求，又能最大限度地保持食品品质。

牛乳在高温下保持较长时间，则易发生一些不良的化学反应。如蛋白质和乳糖发生美拉德反应，使乳产生褐变现象，蛋白质分解而产生硫化氢的不良气味，糖类焦糖化而产生异味，乳清蛋白质变性、沉淀等。若采用超高温瞬时杀菌既能方便工艺条件，满足灭菌要求，又能减少对牛乳品质的损害。

(4) 微波杀菌 微波（超高频）一般是指频率在（ $300\sim 300000$ ）MHz 的电磁波。目前  $915\text{ MHz}$  和  $2450\text{ MHz}$  两个频率已广泛地应用于微波加热。 $915\text{ MHz}$  可以获得较大穿透

厚度，适用加热含水量高、厚度或体积较大的食品，对含水量低的食品宜选用 2450MHz。

微波杀菌的机理是基于热效应和非热生化效应两部分。热效应即微波作用于食品，食品表里同时吸收微波能，温度升高。污染的微生物细胞在微波场的作用下，其分子被极化并作高频振荡，产生热效应，温度的快速升高使其蛋白质结构发生变化，从而使菌体死亡。非热生化效应即微波使微生物在生命化学过程中产生大量的电子、离子，使微生物生理活性物质发生变化，电场也使细胞膜附近的电荷分布改变，导致膜功能障碍，使微生物细胞的生长受到抑制，甚至停止生长或死亡。另外，微波还可以导致细胞 DNA 和 RNA 分子结构中的氢键松弛、断裂和重新组合，诱发基因突变。

微波杀菌保藏食品是在国际上发展起来的一项新技术，具有快速、节能、对食品的品质影响很小的特点。因此，能保留更多的活性物质和营养成分，适用于人参、香菇、猴头菌、花粉、天麻以及中药、中成药的干燥和灭菌。微波还可应用于肉及其制品、禽及其制品、奶及其制品、水产品、水果、蔬菜、罐头、谷物、布丁和面包等一系列产品的杀菌、灭酶保鲜和消毒，延长货架期。此外，微波应用于食品的烹调，冻鱼、冻肉的解冻，食品的脱水干燥、漂烫、焙烤以及食品的膨化等领域。

目前国外已出现微波牛奶消毒器，采用高温瞬时杀菌技术，在 2450MHz 的频率下，升至 200℃，维持 0.13s，消毒奶的菌落总数和大肠菌群的指标达到消毒奶要求，而且牛奶的稳定性也有所提高。瑞士卡洛里公司研制的面包微波杀菌装置（2450MHz，80kW），辐照 1~2min，温度由室温升至 80℃，面包片的保鲜期由原来的 3 天延长至 30~40 天而无霉菌生长。

(5) 远红外线加热杀菌 远红外线是指波长为 2.5~1000 $\mu\text{m}$  的电磁波。食品的很多成分对 3~10 $\mu\text{m}$  的远红外线有强烈的吸收，因此食品往往选择这一波段的远红外线加热。

远红外线加热具有热辐射率高、热损失少、加热速度快、传热效率高、食品受热均匀、不会出现局部加热过度或夹生现象、食物营养成分损失少等特点。

远红外的杀菌、灭酶效果是明显的。日本的山野藤吾曾将细菌、酵母、霉菌悬浮液装入塑料袋中，进行远红外线杀菌试验，远红外照射的功率分别为 6kW、8kW、10kW、12kW，试验结果表明，照射 10min，能使不耐热细菌全部杀死，使耐热细菌数量降低  $10^5\sim 10^8$  个数量级。照射强度越大，残留活菌越少，但要达到食品保藏要求，照射功率要在 12kW 以上或延长照射时间。

远红外加热杀菌不需经过热媒，只要照射到待杀菌的物品上，热直接由表面渗透到内部，因此，远红外加热已广泛应用于食品的烘烤、干燥、解冻，以及坚果类、粉状、块状、袋装食品的杀菌和灭酶。

(6) 欧姆杀菌 这是一种新型的热杀菌方法。欧姆加热是利用电极，将电流直接导入食品，由食品本身介电性质所产生的热量，以达到直接杀菌的目的。一般所使用的电流是 50~60Hz 的低频交流电。

欧姆杀菌与传统罐装食品的杀菌相比具有不需要传热面，热量在固体产品内部产生，适合处理含大颗粒固体产品和高黏度的物料，系统操作连续、平稳，易自动化控制，维护费用、操作费用低等优点。

对于带颗粒（粒径小于 15mm）的食品，采用欧姆加热，可使颗粒的加热速率接近液体的加热速率，获得比常规方法更快的颗粒加热速率（1~2℃/s），缩短了加工时间，使产品品质在微生物安全性、蒸煮效果及营养成分（如维生素）保持等方面得到改善。因此，该技术已成功地应用于各类含颗粒食品杀菌，如生产新鲜、味美的大颗粒产品，处理高颗粒密度、高黏度食品物料。

英国 APVBaker 公司已制造出工业化规模的欧姆加热设备，可使高温瞬时技术推广应用于含颗粒（粒径高达 25mm）食品的加工。近年来英国、日本、法国和美国已将技术及设备应用于低酸性食品或高酸性食品的杀菌。

#### （四）非加热杀菌保藏

所谓非加热杀菌（冷杀菌）是相对于加热杀菌而言，无需对物料进行加热，利用其他灭菌机理杀灭微生物，因而避免了食品成分因热而被破坏。冷杀菌方法有多种，如放射线辐照杀菌、超声波杀菌、放电杀菌、高压杀菌、紫外线杀菌、磁场杀菌、臭氧杀菌等。

##### 1. 辐照杀菌

食品的辐照保藏是指用放射线辐照食品，借以延长食品保藏期的技术。对辐射保藏的研究已有 60 多年的历史。放射线主要包括紫外线、X 射线和  $\gamma$  射线等。其中紫外线穿透力弱，只有表面杀菌作用，而 X 射线和  $\gamma$  射线（比紫外线波长更短）是高能电磁波，能激发被辐照物质的分子，使之引起电离作用，进而影响生物的各种生命活动。

微生物受电离放射线的辐照，细胞膜、细胞质分子引起电离，进而引起各种化学变化，直接使细胞死亡，在放射线高能量的作用下，水电离为  $\text{OH}^-$  和  $\text{H}^+$ ，从而也间接引起微生物细胞的致死作用，微生物细胞中的脱氧核糖核酸（DNA）、核糖核酸（RNA）对放射线的作用尤为敏感。放射线的高能量导致 DNA 的较大损伤和突变，直接影响细胞的遗传和蛋白质的合成。

放射线辐照由于其具有节约能源（节约 70%~97% 能源）、杀菌效果好、可改善某些食品品质、便于连续工业化生产等优点，目前已有 70 多个国家批准应用于食品保藏，并已有相当规模的实际应用。

##### 2. 超声波杀菌

声波在（9~20）kHz 以上都为超声波。超声波对细菌的破坏作用主要是强烈的机械振荡作用，使细胞破裂、死亡。超声波作用于液体物料，产生空化效应，空化泡剧烈收缩和崩溃的瞬间，泡内会产生几百兆帕的高压、强大的冲击波及数千度的高温，对微生物会产生粉碎和杀灭作用、加热和氧化作用。

超声波灭菌机制可用于食品杀菌、食具的消毒和灭菌及护士的洗手消毒等。曾在实验中用超声波对牛乳消毒，经 15~16s 消毒后，乳液可以保持 5 天不发生腐败；常规消毒乳再经超声波处理，冷藏条件下，保存 18 个月未发现变质。日本生产的气流式超声餐具清洗机，清洗餐具可使细菌总数及大肠菌群降低  $10^5 \sim 10^6$  以上，若同时使用洗涤剂或杀菌剂，可做到完全无菌。

### 3. 高压放电杀菌

高压放电杀菌是近年来出现的新型杀菌技术。高压放电杀菌采用的电源一般为脉冲电压。高压脉冲电场的产生常用 LG 振荡电路，产生强度为（15~100）kV/cm，脉冲为（1~100）kHz，放电频率为 1~20Hz 的电场。

脉冲放电杀菌是电化学效应、冲击波空化效应、电磁效应和热效应等综合作用结果，并以电化学效应和冲击波空化效应为主要作用，可使细胞膜穿孔、液体介质电离产生臭氧。微量的臭氧可有效杀灭微生物。高压放电杀菌的效果取决于电场强度、脉冲宽度、电极种类、液体食品的电导、pH 值、微生物种类以及原始污染程度等因素。

由于放电杀菌的介质为液体，故只能用于液态食品的杀菌。现在，高压放电杀菌已成功地用于牛奶、果汁等的杀菌。

### 4. 高压杀菌

所谓高压杀菌就是将食品物料以某种方式包装以后，置于高压（100MPa 以上）装置中加压，使微生物的形态、结构、生物化学反应、基因机制以及细胞壁、膜发生多方面的变化，进而使微生物的生理机能丧失或发生不可逆变化而致死，达到灭菌、长期安全保存的目的。高压杀菌技术也是近年来出现的新型杀菌技术，需要有特殊的加压设备和耐高压容器及辅助设备。

高压可使蛋白质变性，直接影响到微生物及其酶系的活力，使微生物的活动受到抑制，甚至死亡。一般来讲，真核微生物比原核微生物对压力更为敏感。在 300 MPa 以上的压力下，细菌、霉菌和酵母菌都可被杀死，但一些菌的芽孢耐压强，在 600 MPa 才能被杀死。

## （五）食品的干燥和脱水保藏

食品的干燥脱水保藏，是一种传统的保藏方法。其原理是降低食品的含水量（水活性），使微生物得不到充足的水而不能生长。

各种微生物要求的最低水活性值是不同的。细菌、霉菌和酵母菌三大类微生物中，一般细菌要求的最低  $A_w$  较高，为 0.94~0.99，霉菌要求的最低  $A_w$  为 0.73~0.94，酵母要求的最低  $A_w$  为 0.88~0.94。但有些干性霉菌，如灰绿曲霉最低  $A_w$  仅为 0.64~0.70（含水量 16%），某些食品水活性值在 0.70~0.73（含水量约 16%）之间，曲霉和青霉即可生长，因此干制食品的防霉  $A_w$  值要达到 0.64 以下（含水量 12%~14%）才较为安全。

新鲜食品如乳、肉、鱼、蛋、水果、蔬菜等都有较高水分，其水活性值一般在 0.98~0.99，适合多种微生物的生长。目前防霉干制食品的水分一般为 3%~25%，如水果干为 15%~25%，蔬菜干为 4% 以下，肉类干制品为 5%~10%，喷雾干燥乳粉为 2.5%~3%，喷雾干燥蛋粉在 5% 以下。

食品干燥脱水方法主要有日晒、阴干、喷雾干燥、减压蒸发和冷冻干燥等。生鲜食品干燥和脱水保藏前，一般需破坏其酶的活性，最常用的方法是热烫（亦称杀青、漂烫）、硫磺熏蒸（主要用于水果）和添加抗坏血酸（0.05%~0.1%）及食盐（0.1%~1.0%）。

肉类、鱼类及蛋中因含 0.5%~2.0% 肝糖，干燥时常发生褐变，可添加酵母或葡萄糖氧化酶处理或除去肝糖再干燥。

## （六）食品的化学保藏法

化学保藏法包括盐藏、糖藏、醋藏、酒藏和防腐剂保藏等。盐藏和糖藏都是根据提高食物的渗透压来抑制微生物活动的原理，醋和酒在食物中达到一定浓度时也能抑制微生物的生长繁殖，防腐剂能抑制微生物酶系的活性以及破坏微生物细胞的膜结构。

### 1. 盐藏

食品经盐藏不仅能抑制微生物的生长繁殖，并可赋予其新的风味，故兼有加工的效果。食盐的防腐作用主要在于提高渗透压，使细胞原生质浓缩发生质壁分离，降低水分活性，不利微生物生长，减少水中溶解氧，使好气性微生物的生长受到抑制等。

各种微生物对食盐浓度的适应性差别较大。嗜盐性微生物，如红色细菌、接合酵母属和革兰氏阳性球菌在较高浓度食盐的溶液（15%以上）中仍能生长。无色杆菌属等一般腐败性微生物约在 5% 的食盐浓度，肉毒梭状芽孢杆菌等病原菌在 7%~10% 食盐浓度时，生长受到抑制。一般霉菌对食盐都有较强的耐受性，如某些青霉菌株在 25% 的食盐浓度中仍能生长。

由于各种微生物对食盐浓度的适应性不同，因而食盐浓度的高低就决定了所能生长的微生物菌群。例如，肉类中食盐浓度在 5% 以下时，主要繁殖的是细菌；食盐浓度在 5% 以上，存在较多的是霉菌；食盐浓度超过 20%，主要生长的微生物是酵母菌。

### 2. 糖藏

糖藏也是利用增加食品渗透压、降低水分活度，从而抑制微生物生长的一种贮藏方法。一般微生物在糖浓度超过 50% 时生长便受到抑制。但有些耐渗透性强的酵母和霉菌，在糖浓度高达 70% 以上仍可生长。因而仅靠增加糖浓度有一定局限性，但若再添加少量酸（如食醋），微生物的耐渗透力将显著下降。

果酱等因其原料果实中含有有机酸，在加工时又添加蔗糖，并经加热，在渗透压、酸和加热等三个因子的联合作用下，可得到非常好的保藏性。但有时果酱也会出现因微生物作用而变质腐败，其主要原因是糖浓度不足。

### 3. 防腐剂保藏

防腐剂按其来源和性质可分成有机防腐剂和无机防腐剂两类。有机防腐剂包括苯甲酸及其盐类、山梨酸及其盐类、脱氢醋酸及其盐类、对羟基苯甲酸酯类、丙酸盐类、双乙酸钠、邻苯基苯酚、联苯、噻苯咪唑等。此外，还包括有天然的细菌素（如 Nisin）、溶菌酶、海藻糖、甘露聚糖、壳聚糖、辛辣成分等。无机防腐剂包括过氧化氢、硝酸盐和亚硝酸盐、二氧化碳、亚硫酸盐和食盐等。

（1）苯甲酸及其钠盐 苯甲酸和苯甲酸钠又称安息香酸和安息香酸钠，系白色结晶。苯甲酸微溶于水，易溶于酒精；苯甲酸钠易溶于水。苯甲酸对人体较安全，是我国允许使用的两种符合国家标准的有机防腐剂之一。



苯甲酸抑菌机理是它的分子能抑制微生物细胞呼吸酶系统活性，特别是对乙酰辅酶A缩合反应有很强的抑制作用。在高酸性食品中杀菌效力为微碱性食品的100倍，苯甲酸以未被解离的分子态才有防腐效果。苯甲酸对酵母菌影响大于霉菌，而对细菌效力较弱。

(2) 山梨酸及其钾盐 山梨酸和山梨酸钾为无色、无味、无臭的化学物质。山梨酸难溶于水(600:1)，易溶于酒精(7:1)，山梨酸钾易溶于水。它们对人有极微弱的毒性，是近年来各国普遍使用的安全防腐剂，也是我国允许使用的两种符合国家标准的有机防腐剂之一。

山梨酸分子能与微生物细胞酶系统中的巯基(-SH)结合，从而达到抑制微生物生长和防腐目的。山梨酸和山梨酸钾对细菌、酵母和霉菌均有抑制作用，但对厌气性微生物和嗜酸乳杆菌几乎无效。其防腐作用较苯甲酸广，在pH 5~6以下使用适宜。效果随pH值增高而减弱，在pH 3时抑菌效果最好。在腌制黄瓜时可用于控制乳酸发酵。

(3) 双乙酸钠(缩写为SDA) 双乙酸钠为白色结晶，略有醋酸气味，极易溶于水(1g/mL)，10%水溶液的pH值为4.5~5.0。双乙酸钠成本低，性质稳定，防腐防腐作用显著。可用于粮食、饲料等防霉防腐(一般用量为1g/kg)，还可作为酸味剂和品质改良剂。该产品添加于饲料中可提高蛋白质的效价，增加适口性，提高饲养动物的产肉、产蛋和产乳率，还可防止肠炎，提高免疫力，是新近开发的添加剂。美国食品和药物管理局(FDA)认定其为一般公认安全物质。

(4) 溶菌酶 溶菌酶为白色结晶，含有129个氨基酸，等电点pH值为10.5~11.5。溶于食品级盐水，在酸性溶液中较稳定，55℃活性无变化。

溶菌酶能溶解多种细菌的细胞壁而达到抑菌、杀菌目的。但对酵母和霉菌几乎无效。溶菌酶作用的最适pH值为6~7，温度为50℃。食品中的羧基和硫酸能影响溶菌酶的活性，因此将其与其他抗菌物如乙醇、植酸、聚磷酸盐等配合使用，效果更好。目前溶菌酶已用于面食类、水产熟食品、冰淇淋、色拉和鱼子酱等食品的防腐保鲜。

(5) 海藻糖 海藻糖是一种无毒、低热值的二糖。它之所以具有良好的防腐作用是由它的抗干燥特性决定的。它可在干燥生物分子的失水部位形成氢键连接，构成一层保护膜，并能形成一层类似水晶的玻璃体。因此，它对于冷冻、干燥的食品，不仅能起到良好的防腐作用，而且还可防止品质发生变化。

(6) 过氧化氢 过氧化氢是一种氧化剂。它不仅具有漂白作用，而且还具有良好的杀菌、除臭效果。缺点是过氧化氢有一定的毒性，对维生素等营养成分有破坏作用。但它杀菌力强、效果显著。需经加热或者过氧化氢酶的处理以减少其残留。常用于切面、面条、鱼糕等防腐，允许残留量为0.1g/kg以下，其他食品为0.03g/kg以下。

(7) 硝酸盐和亚硝酸盐 硝酸盐和亚硝酸盐主要是作为肉的发色剂而被使用。亚硝酸盐与血红素反应，形成亚硝基肌红蛋白，使肉呈现鲜艳的红色。另外，硝酸盐和亚硝酸盐也有延缓微生物生长的作用，尤其是对耐热性的肉毒梭状芽孢杆菌芽孢的发芽有良好的抑制作用。但亚硝酸在肌肉中能转化为亚硝酸胺，有致癌作用，因此，在肉品加工中应严格限制其使用量，目前还未找到完全替代物。

## 二、食品生产的质量管理体系

食品的保藏技术与科学的管理体系密不可分，GMP 管理体系、HACCP 质量管理体系和 SSOP 卫生标准操作规范是国际上较为通行的质量管理体系。

### (一) 食品良好操作规范管理体系 (GMP)

GMP (Good Manufacturing Practice) 是美国首创的一种管理保障产品质量和安全的管理体系，后来应用到食品行业，称为食品良好操作管理规范。其定义是生产 (加工) 符合食品标准或法规的食品所必须遵循的、经食品卫生监督与管理机构认可的强制性作业规范。

GMP 是国际通用的一项企业管理体系，它以硬件 (厂房、设施、设备) 为基础设施，以软件 (组织、制度、工艺、操作、卫生标准、记录教育) 为基础条件，以人员素质为保证。它对人员、厂房、设备、卫生、原辅料及包装材料、包装和贴签、生产管理和质量管理、质量管理部门、自检、销售记录、用户意见等方面制定了规范。防止食品在不卫生的条件下，或在可能引起污染或品质变坏的环境中操作，以保证食品安全和质量稳定。

它的重点是确认食品生产过程的安全性，防止异物、毒物、有害微生物污染食品，双重检验制度，防止出现人为的过失，标签管理制度，建立完善的生产记录、报告存档的管理制度。

GMP 标准是由食品生产企业与卫生部门共同制定的。规定了在加工、储藏和食品分配等各个工序中所要求的操作和管理规范。它要求食品生产企业应具备合理的生产工艺过程，良好的生产设备，正确的生产知识，严格的操作规范以及食品质量管理体系。其主要内容涵盖选址、设计、厂房建筑、设备、工艺过程、检测手段、人员组成、个人卫生、管理职责、卫生监督程序、满意程度等一系列食品生产经营条件，并提出了卫生学评价的标准和规范。

GMP 标准用文件形式提供管理的可靠性，目的是为各种食品的制造、加工、包装、储藏等有关方面制定出一个统一的指导原则和卫生规范。不同的食品制造业各有其特点和要求，因而在这个框架的基础上，对各专门的食物制造业还需要制定详细的附加条件才行，使每一种食品加工行为按确定的管理和技术标准受到控制。

### (二) 危害分析与关键点控制体系 (HACCP)

HACCP (Hazard Analysis Critical Control Point) 全面质量管理体系是 20 世纪 60 年代美国太空总署、陆军 NATICK 实验室和美国 PILLSBURY 食品公司共同发展起来的一套科学的卫生质量监控系统。HACCP 系统经过 60 多年的发展和完善，已被食品界公认为确保食品安全的最佳管理方案，在发达国家已得到广泛应用。它可以确保食品加工和制造遵循 GMP 规范，目前已为全世界接受的 ISO 质量认证体系也将 HACCP 纳入其中。

HACCP 系统的最大特点是充分利用检验手段，对生产流程中各个环节进行抽样检测

和有效分析，预测食品污染的原因，从而提出危害关键控制点（包括能保证控制有害事故发生的  $CCP_1$ ，和能最大限度减少事故发生但不能对危害事故控制的  $CCP_2$ ）及危害等级，再根据危害关键控制点提出控制项目（这些因素通常指温度、时间、湿度、水分活度、pH、可滴定酸、氯浓度、黏度等）、控制标准（管理关键限值）、检测方法、监控方法以及纠正的措施。通过采取这些相应的措施，从而预防了危害的发生。同时也能将正确的措施及时反馈到工艺流程中，如此循环反馈、改进，不断提高。同时能对每一个关键控制点的操作进行日常监测，并记录所有检测结果，建立准确可靠的档案资料系统和检查 HACCP 体系工作状况的程序，出现问题有据可查。

HACCP 管理体系的核心是将食品质量的管理贯穿于食品从原料到成品的整个生产过程当中，侧重于预防性监控，不依赖于对最终产品进行检验，打破了传统检验结果滞后的缺点，从而将危害消除或降低到最低限度。HACCP 是一个系统工程，必须各级领导重视，全员投入协调作战，才能保证 HACCP 的正常运转和取得预期效果。

HACCP 系统在发达国家已广泛应用。我国目前也将此管理体系应用于生产当中。HACCP 管理体系是我国今后食品企业管理的发展方向，也是防止食品腐败变质，延长货架期的主要管理模式。

### （三）卫生标准操作规范（SSOP）

SSOP (Sanitation standard Operating Procedure) 是关于食品生产企业如何满足卫生条件和如何按卫生要求进行生产的条例。在美国的两个 HACCP 法规中对 SSOP 提出明确要求。SSOP 是每个企业都应该建立和实施的一套已成文的卫生标准操作规程，它们应具体适用于各家食品生产企业，具体规范加工者应怎样达到这些卫生要求和规范。

## 思政园地

健康是人民最具普遍意义的美好生活需要，而疾病医疗、食品安全、生态环境污染等则是民生突出的后顾之忧。在 2016 年 8 月召开的全国卫生与健康大会上，习近平总书记就明确提出要“将健康融入所有政策，人民共建共享”，强调“没有全民健康，就没有全面小康。要把人民健康放在优先发展的战略地位”。同年 10 月，中共中央、国务院印发《“健康中国 2030”规划纲要》，提出“普及健康生活、优化健康服务、完善健康保障、建设健康环境、发展健康产业”五方面的战略任务。与之密切关联，微生物学知识在普及健康生活方面具有重要的科普价值和指导意义。微生物与食品安全有着紧密联系，比如《生活饮用水的卫生标准》(GB 5749—2006) 中的微生物指标限定了合格饮用水的细菌总数、大肠埃希氏菌、总大肠菌群、耐热大肠菌群以及微囊蓝细菌毒素的安全水平值。饮用水是人们日常生活必不可少的生存物质，然而，中国有些地区水资源分布贫乏和质量堪忧，另一些地方即使水资源丰富也存在水质不合格的问题。结合消毒灭菌知识学习，学生要掌握

生活饮用水的消毒灭菌技术等，在日常生活中运用安全卫生饮用水的知识和能力。

现行《中华人民共和国食品安全法》自2015年10月1日起施行，并根据2018年12月29日第十三届全国人民代表大会常务委员会第七次会议《关于修改〈中华人民共和国产品质量法〉等五部法律的决定》修正。《食品安全法》规定：第三十四条，禁止生产经营致病性微生物，农药残留、兽药残留、生物毒素、重金属等污染物质以及其他危害人体健康的物质含量超过食品安全标准限量的食品、食品添加剂、食品相关产品；第一百二十四条，生产经营致病性微生物，农药残留、兽药残留、生物毒素、重金属等污染物质以及其他危害人体健康的物质含量超过食品安全标准限量的食品、食品添加剂，尚不构成犯罪的，由县级以上人民政府食品安全监督管理部门没收违法所得和违法生产经营的食品、食品添加剂，并可以没收用于违法生产经营的工具、设备、原料等物品；违法生产经营的食品、食品添加剂货值金额不足一万元的，并处五万元以上十万元以下罚款；货值金额一万元以上的，并处货值金额十倍以上二十倍以下罚款；情节严重的，吊销许可证。

学生在今后可能从事食品生产加工的职业中，要正确使用食品防腐技术，杜绝售购交易致病微生物或生物毒素超过食品安全国家标准的食物商品。伴着国家发展的脚步，追寻心中那份崇高的梦想和从不曾改变的美好生活情怀。

## 习 题

### 一、单选题

- 细菌污染了食品，但却因为菌体脱水而不能繁殖生长，该食品很可能是（ ）。  
A. 脱水食品      B. 防腐剂食品      C. 酸性食品      D. 盐制食品
- 高温灭菌法适用于（ ）食品。  
A. 罐头      B. 牛奶      C. 果汁      D. 啤酒
- 一般干制食品的  $A_w$  在（ ）以下时，可达到防霉目的。  
A. 0.90      B. 0.85      C. 0.64      D. 0.50
- 超高温瞬时灭菌法为（ ）。  
A.  $70\sim 100^\circ\text{C}$ 、 $10\sim 30\text{s}$       B.  $85\sim 95^\circ\text{C}$ 、 $10\sim 30\text{s}$   
C.  $110\sim 120^\circ\text{C}$ 、 $1\sim 3\text{s}$       D.  $130\sim 150^\circ\text{C}$ 、 $1\sim 3\text{s}$
- 一般微生物在糖浓度超过（ ）时生长便受到抑制。  
A. 20%      B. 30%      C. 50%      D. 70%

### 二、判断题

- 食品的腐败变质主要是由于微生物的生命活动和食品中的酶所进行的生物化学反应所造成的。（ ）
- 植物性食品如果蔬的组织结构脆弱，细胞壁较薄，含水量高，当冻结进行缓慢时，就会造成严重的组织结构的改变。（ ）
- 在干燥大批食品或干燥初期烘干大量水分时，应选用  $2\ 450\text{MHz}$  的微波，而在干燥

小批食品时或在食品干燥后期，应选择 915MHz 的微波。( )

4. 引起食品变质腐败的微生物种类很多，一般可分为细菌、酵母菌和霉菌三大类。  
( )

5. 食品的低温保藏包括两个方面，即冷却冷藏和冻结保藏。( )

# 模块九 食品微生物检验操作技术规范

## 知识目标

1. 熟悉光学显微镜的结构。
2. 了解革兰氏染色的原理。
3. 掌握细菌菌落总数测定和大肠菌群的测定方法。

## 技能目标

1. 熟练掌握光学显微镜的使用、微生物形态观察、无菌操作、培养基的制备、高压灭菌等微生物实验基本操作技术。
2. 能够对细菌菌落总数进行分析和报告。
3. 能够对大肠菌群的测定结果进行分析和报告。

## 任务一 显微镜的使用

### 一、准备工作

#### 1. 试剂与材料

香柏油、二甲苯、制片标本、擦镜纸。

#### 2. 仪器

普通光学显微镜。



### 二、显微镜的构造与操作程序

#### 1. 显微镜的构造

光学显微镜的构造如图 9-1 所示。

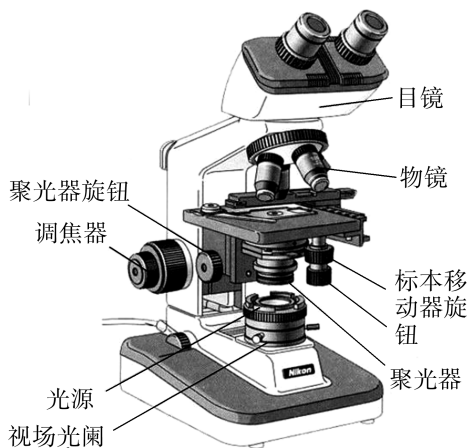


图 9-1 光学显微镜的构造

每台显微镜通常配置 2~3 个不同放大倍率的目镜，常见的有 5×、10× 和 15×（× 表示放大倍数）的目镜，可根据不同的需要选择使用。

常用物镜的放大倍数有 10×、40× 和 100× 等几种。一般将 8× 或 10× 的物镜称为低倍镜（而将 5× 以下的叫作放大镜）；将 40× 或 45× 的称为高倍镜；将 90× 或 100× 的称为油镜（这种镜头在使用时需浸在镜油中）。

## 2. 显微镜的操作程序 (见图 9-2)

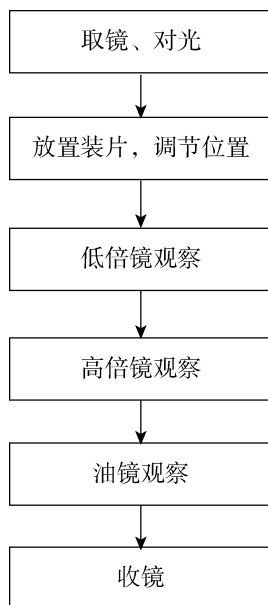


图 9-2 显微镜操作程序

## 三、操作规程

### 1. 观察前的准备

①将显微镜小心地从镜箱中取出(移动显微镜时应以右手握住镜壁,左手托住镜座),放置在实验台的偏左侧,以镜座的后端离实验台边缘 6~10cm 为宜。

②首先检查显微镜的各个部件是否完整和正常,插好电源。如果是镜筒直立式光镜,可使镜筒倾斜一定角度(一般不应超过 45°)以方便观察(观察临时装片时禁止倾斜镜臂)。

③调节光照:不带光源的显微镜,可利用灯光或自然光通过反光镜来调节光照,但不能用直射阳光,直射阳光会影响物像的清晰并刺激眼睛。

将 10×物镜转入光孔,将聚光器上的虹彩光圈打开到最大位置,用左眼观察目镜中视野的亮度,转动反光镜,使视野的光照达到最明亮最均匀为止。光线较强时用平面反光镜,光线较弱时用凹面反光镜。自带光源的显微镜,可通过调节电流旋钮来调节光照强弱。

④调节光轴中心:显微镜在观察时,其光学系统中的光源、聚光器、物镜和目镜的光轴及光阑的中心必须跟显微镜的光轴在同一直线上。带视场光阑的显微镜,先将光阑缩小,用 10×物镜观察,在视场内可见到视场光阑圆球多边形的轮廓像,如此像不在视场中央,可利用聚光器外侧的两个调整旋钮将其调到中央,然后缓慢地将视场光阑打开,能看到光束向视场周缘均匀展开,直至视场光阑的轮廓像完全与视场边缘内接,说明光线已经



合轴。

## 2. 低倍镜观察

镜检任何标本都要养成必须先用低倍镜观察的习惯。因为低倍镜视野较大，易于发现目标和确定检查的位置。

将标本片放置在载物台上，用标本夹夹住，移动推动器，使被观察的标本处在物镜正下方，转动粗调节旋钮，使物镜调至接近标本处，用目镜观察并同时用粗调节旋钮慢慢升起镜筒（或下降载物台），直至物象出现，再用细调节旋钮使物象清晰为止。用推动器移动标本片，找到合适的目的像并将它移到视野中央进行观察。

## 3. 高倍镜观察

在低倍物镜观察的基础上转换高倍物镜。较好的显微镜，低倍、高倍镜头是同焦的，在正常情况下，高倍物镜的转换不应碰到载玻片或其上的盖玻片。若使用不同型号的物镜，在转换物镜时要从侧面观察，避免镜头与玻片相撞。然后从目镜观察，调节光照，使亮度适中，缓慢调节粗调节旋钮，使载物台上升（或镜筒下降），直至物像出现，再用细调节旋钮调至物像清晰为止，找到需观察的部位，并移至视野中央进行观察。

## 4. 油镜观察

油镜的工作距离（指物镜前透镜的表面到被检物体之间的距离）很短，一般在0.2mm以内，再加上一般光学显微镜的油镜没有“弹簧装置”，因此使用油镜时要特别细心，避免由于“调焦”不慎而压碎标本片并使油镜受损。

使用油镜时按下列步骤操作：

- ①先用粗调节旋钮将镜筒提升（或将载物台下降）约2cm，并将高倍镜转出。
- ②在玻片标本的镜检部位滴上一滴香柏油。
- ③从侧面注视，用粗调节旋钮将载物台缓缓地上升（或镜筒下降），使油镜浸入香柏油中，使镜头几乎与标本接触。
- ④从接目镜内观察，放大视场光阑及聚光镜上的虹彩光圈（带视场光阑油镜开大视场光阑），上调聚光器，使光线充分照明。用粗调节旋钮将载物台徐徐下降（或镜筒上升），当出现物像一闪后改用细调节旋钮调至最清晰为止。如油镜已离开油面而仍未见到物象，必须再从侧面观察，重复上述操作。

⑤观察完毕，下降载物台，将油镜头转出，先用擦镜纸擦去镜头上的油，再用擦镜纸蘸少许乙醚酒精混合液（乙醚2份、纯酒精3份）或二甲苯，擦去镜头上残留油迹，最后再用擦镜纸擦拭2~3下即可（注意向一个方向擦拭）。

## 5. 收镜

将各部分还原，转动物镜转换器，使物镜头不与载物台通光孔相对，而是成八字形位置，再将镜筒下降至最低，降下聚光器，反光镜与聚光器垂直，用一个干净手帕将接目镜罩好，以免目镜头沾污灰尘。最后用柔软纱布清洁载物台等机械部分，然后将显微镜放回柜内或镜箱中。

## 四、操作要点

①取用显微镜时，应一手紧握镜臂，一手托住镜座，不要用单手提拿，以避免目镜或其他零部件滑落。

②在使用镜筒直立式显微镜时，镜筒倾斜的角度不能超过  $45^{\circ}$ ，以免重心后移使显微镜倾倒。在观察带有液体的临时装片时，不要使用倾斜关节，以避免由于载物台的倾斜而使液体流到显微镜上。

③不可随意拆卸显微镜上的零部件，以免发生丢失损坏或使灰尘落入镜内。

④显微镜的光学部件不可用纱布、手帕、普通纸张或手指揩擦，以免磨损镜面，需要时只能用擦镜纸轻轻擦拭。机械部分可用纱布等擦拭。

⑤在任何时候，特别是使用高倍镜或油镜时，都不要一边在目镜中观察，一边下降镜筒（或上升载物台），以避免镜头与玻片相撞，损坏镜头或玻片标本。

⑥显微镜使用后应及时复原。先升高镜筒（或下降载物台），取下玻片标本，使物镜转离通光孔。如镜筒、载物台是倾斜的，应恢复直立或水平状态。然后下降镜筒（或上升载物台），使物镜与载物台相接近。将反光镜调至垂直，下降聚光器，关小光圈，最后放回镜箱中锁好。

⑦在利用显微镜观察标本时，要养成两眼同时睁开，双手并用（左手操纵调焦螺旋，右手操纵标本移动器）的习惯，必要时应一边观察一边计数或绘图记录。

## 五、结果与报告

使用光学显微镜观察各种生物形态并作图。

# 任务二 细菌的简单染色与形态观察

## 一、准备工作

### 1. 菌种

培养 12~18h 的枯草杆菌、培养 24h 的大肠杆菌等细菌。

### 2. 药品及试剂

结晶紫染液、二甲苯、香柏油等。



细菌的简单染色  
与形态观察

### 3. 仪器及用具

废液缸、洗瓶、载玻片、接种环、酒精灯、擦镜纸、显微镜。

## 二、操作程序 (见图 9-3)

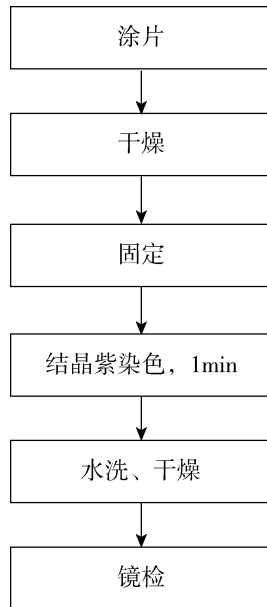


图 9-3 革兰氏染色流程图

## 三、操作规程

无菌操作是指在微生物实验工作中，控制或防止各类微生物的污染及其干扰的一系列操作方法和有关措施。高温对微生物具有致死效应，因此在微生物的转接过程中，一般在酒精灯火焰旁进行，并用火焰直接灼烧接种环，以达到灭菌的目的（见图 9-4）。

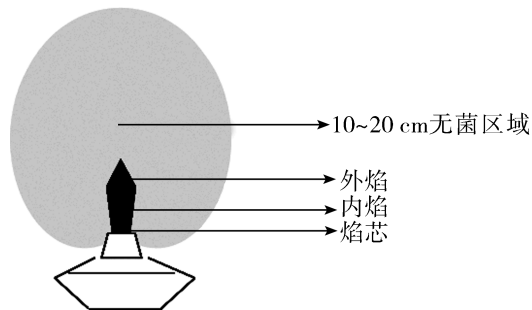


图 9-4 酒精灯无菌区域

### 1. 涂片

取洁净无脂的载玻片，在载玻片上加一滴蒸馏水，用接种环以无菌操作从菌种斜面上挑取少许菌于水滴中，混匀并涂成薄膜，涂布面积约 1~1.5cm（见图 9-5a）。

### 2. 干燥、固定

火焰干燥、固定：手执载玻片一端，使涂菌一面向上，通过火焰上方 2~3 次。此操作也称热固定，其目的是使细胞质凝固，以固定细胞形态，并使细菌附着在载玻片上（见图 9-5b、c）。火焰干燥、固定时注意温度不宜过高。

### 3. 染色

将涂片置于水平位置，滴加结晶紫染色液，以刚好覆盖涂片薄膜为宜，染色 1min 左右。

### 4. 水洗

用水洗去涂片上的染色液（注意不得直接冲洗涂菌处），直至载玻片上流下的水无色为止。

### 5. 干燥

将洗过的涂片放在空气中晾干或用吸水纸吸干。

### 6. 镜检

先低倍观察，再高倍观察，并找出适当的视野后，将高倍镜转出，在涂片上加一滴香柏油，将油镜浸入油滴中，仔细调焦，观察细菌的形态。

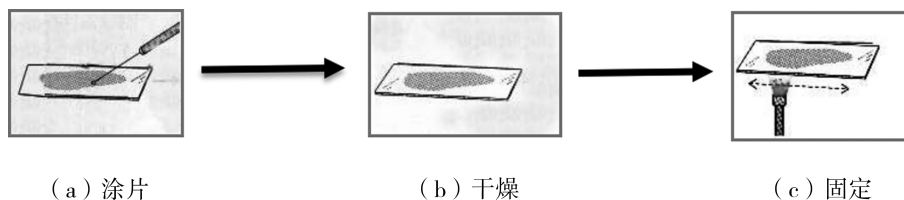


图 9-5 涂片、干燥、固定示意图

## 四、结果与报告

①对所给的菌种分别进行简单染色操作；绘出细菌形态图，注明放大倍数及观察到的颜色。

②镜检：对于球菌，主要观察其大小、排列方式。对于杆菌，主要观察其长/宽比、两端形状、两端是否等宽、排列方式、是否产芽孢等。

## 五、操作要点

①注意取菌不要太多。

②接种用具在使用前后都必须灼烧灭菌。

## 六、思考题

①使用油镜时，应特别注意哪些问题？

②对同一微生物制片，用油镜观察比用低倍镜观察有何优缺点？涂片在染色前为什么要先进行周定？固定时应注意什么问题？

# 任务三 细菌的革兰氏染色

## 一、准备工作

### 1. 菌种

培养 12~18h 的枯草杆菌、培养 24h 的大肠杆菌等细菌。

### 2. 药品及试剂

草酸铵结晶紫染液、卢哥氏碘液、95%酒精、复红染液、二甲苯、香柏油等。

### 3. 仪器及用具

废液缸、洗瓶、载玻片、接种环、酒精灯、擦镜纸、显微镜。



## 二、操作程序（见图 9-6）

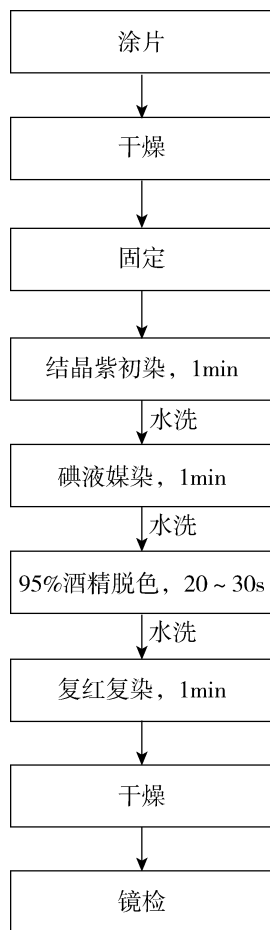


图 9-6 革兰氏染色流程图

## 三、操作规程

### 1. 涂片

取洁净无脂的载玻片，在载玻片上加一滴蒸馏水，用接种环以无菌操作从菌种斜面上挑取少许菌于水滴中，混匀并涂成薄膜，涂布面积约 1~1.5cm，注意取菌不要太多，接种用具在使用前后都必须灼烧灭菌。

### 2. 干燥、固定

火焰干燥、固定：手执载玻片一端，使涂菌一面向上，通过火焰上方 2~3 次。此操作也称热固定，其目的是使细胞质凝固，以固定细胞形态，并使细菌附着在载玻片上。火

焰干燥、固定时注意温度不宜过高。

### 3. 染色：

①初染：涂面加草酸铵结晶紫染液 1~2 滴，染液刚好覆盖涂面为度，染色时间 1min，水洗，吸干。

②媒染：加卢哥氏碘液 1~2 滴，染液刚好覆盖涂面为度，染色时间 1min，水洗，吸干。

③脱色：用 95% 酒精脱色直至滴加的酒精不呈紫色为止，一般约 20~30s，水洗，吸干。

④复染：加复红染液染 1min，水洗，干燥

### (四) 镜检

通过显微镜观察细菌形态并判断是革兰氏阳性菌还是阴性菌。

### (五) 实验完毕后的处理

①将油镜按下述方法擦拭干净：

- a. 先用擦镜纸将油镜上的油擦去。
- b. 用擦镜纸蘸少许二甲苯将镜头擦 2~3 次。
- c. 再用干净的擦镜纸将镜头擦 2~3 次。

注意：擦镜头时向一个方向擦拭。

②观察后的染色玻片用废纸将香柏油擦干净，并清洗、杀菌。

## 四、结果与报告

①根据观察结果，绘出两种细菌的形态图。

②列表简述两株细菌的染色结果（说明各菌的形状、颜色和革兰氏染色反应）。

## 五、操作要点

①脱色操作是关键步骤，操作中用 95% 酒精，滴于涂片上方让酒精均匀流过含菌部位，直到流出的酒精无颜色为止，目的是洗去颜色。阴性菌脱色不够，会呈现假阳性；阳性菌脱色过度，会呈现假阴性。

②操作要求：

匀：酒精通过含菌部位要均匀；

快：操作要快，应在 20~30s 内完成；

准：把握脱色终点要准，流出的酒精一没颜色马上停止脱色。

## 六、思考题

- ①哪些环节会影响革兰氏染色结果的正确性？其中最关键的环节是什么？
- ②不经过复染这一步，能否区别革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌？

## 任务四 玻璃器皿的清洗和包扎

### 一、准备工作

#### 1. 常用各种玻璃器皿

量筒、三角瓶、试管、培养皿、漏斗、玻璃棒、吸管等。

#### 2. 清洗试剂及工具

去污粉、肥皂、洗涤剂、报纸、棉花、防水油纸等。

### 二、操作规程

#### 1. 洗涤器皿的注意事项和方法

①任何洗涤方法，都不应对玻璃器皿有所损伤，所以不能用有腐蚀作用的化学药剂，也不能使用比玻璃硬度大的物品来擦拭玻璃器皿。

②一般新的玻璃器皿用2%的盐酸溶液浸泡数小时，用水充分洗干净。

③用过的器皿应立即洗涤，有时放置太久会增加洗涤难度。

④难洗涤的器皿不要与易洗涤的器皿放在一起。有油的器皿不要与无油的器皿放在一起，否则会使本来无油的器皿也沾上了油垢，浪费药剂和时间。

⑤强酸、强碱、琼脂等腐蚀、阻塞管道的物质不能直接倒在洗涤槽内，必须倒在废缸内。

⑥含有琼脂培养基的器皿，可先用小刀或铁丝将器皿中的琼脂培养基刮去，或把它们用水蒸煮，待琼脂融化后趁热倒出，然后用水洗涤。

⑦一般的器皿都可用去污粉、肥皂或配成5%热肥皂水来清洗；油质很重的器皿，应先将油层擦去。

⑧如果器皿沾有煤膏、焦油及树脂类的一些物质，可用浓硫酸或40%的氢氧化钠液洗涤或用洗涤剂浸泡。

⑨若器皿上沾有蜡或油漆等物质，应用加热方法使之熔化揩去，或用有机溶剂（苯、二甲苯、丙酮、松节油等）拭揩。



⑩洗涤后的器皿应达到玻璃能被水均匀湿润而无条纹和水珠的效果。

⑪载玻片或盖玻片可先在 2% 盐酸溶液中浸 1h，然后用水冲洗 2~3 次，最后用蒸馏水洗 2~3 次，洗后烘干冷却或浸于 95% 酒精中保存备用。用过的载玻片或盖玻片，先擦去油垢，再放在 5% 肥皂水中煮 10min 后，立即用清水冲洗，然后放在洗涤液（稀释）中浸泡 2h，再用清水洗至无色为止，最后用蒸馏水洗数次，干后浸于 95% 酒精中保存备用。

⑫凡遇有传染性材料的器皿，洗涤前应经高压灭菌后清洗。

## （二）器皿包扎

为了灭菌后仍保持无菌状态，各种玻璃器皿均需包扎。

①培养皿的包扎。培养皿洗净烘干后每 10 套叠在一起，用牢固的纸卷成一筒，外面用绳子捆扎，以免散开，然后进行灭菌。要使用时在无菌室中打开取出培养皿。

②吸管的包扎。洗净烘干后的吸管，在口吸的一端用尖头镊子或针塞入少许脱脂棉花，以防止菌体误吸口中以及口中的微生物通过吸管而进入培养物中造成污染。塞入棉花的量要适宜，棉花不宜露在吸管口的外面，多余的棉花可用酒精灯的火焰把它烧掉。每支吸管用一条宽约 4~5cm，45°左右螺旋卷起来的棉花，吸管的尖端在头部，吸管的另一端用剩余纸条迭打成结，以免散开，标上容量。若干支吸管扎成一束（见图 9-7），灭菌后，同样要在使用时才从吸管中间拧断纸条抽去吸管。

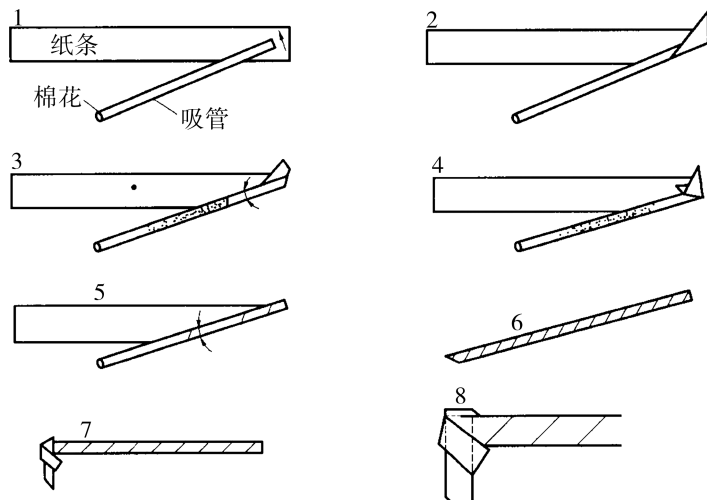


图 9-7 吸管的包扎

③试管和三角瓶的包扎。试管和三角瓶都要做合适的棉花塞。棉花塞能起到过滤的作用，避免空气中的微生物进入试管或三角瓶。棉花塞的制作要求使棉花塞紧贴玻璃壁，没有皱纹和缝隙，不能过松，也不能过紧。过紧易挤破管口和不易塞入，过松易掉落和污染。棉花塞的长度不小于管口直径的二倍，约 2/3 塞进管口（棉花塞的制作见图 9-8）。若干支试管用绳子扎在一起，在棉花塞部分外包油纸或牛皮纸，再在纸外用线绳扎紧。每个三角瓶单独用油纸包扎棉花塞。



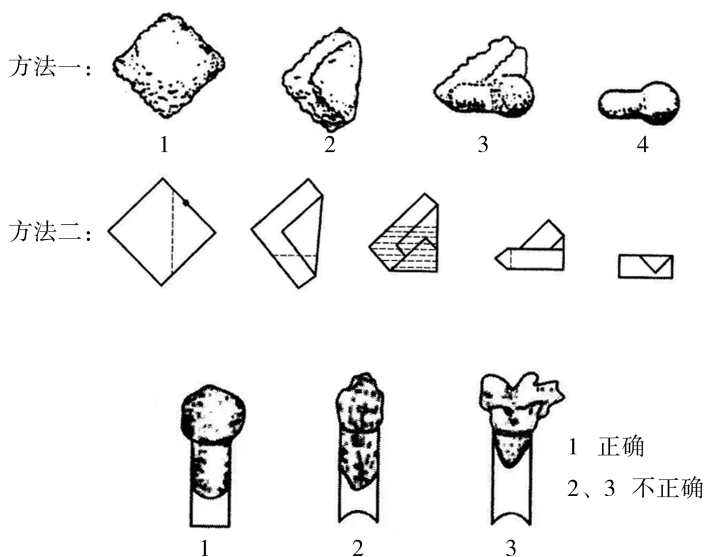


图 9-8 棉花塞的制作

## 四、结果与报告

- ①检查实验效果，做得不好的要反复练习。
- ②能否用橡皮塞、木塞来代替棉塞？为什么？
- ③玻璃器皿清洗时应注意什么？

# 任务五 培养基的配制

## 一、准备工作

### 1. 药品及试剂

牛肉膏、蛋白胨、氯化钠、硝酸钠、磷酸氢二钾、氯化钾、硫酸镁、硫酸亚铁、蔗糖、琼脂、6 mol/L 盐酸、10%氢氧化钠。

### 2. 仪器及用具

试管、三角瓶、烧杯、量筒、玻棒、药匙、高压蒸汽灭菌锅、pH 试纸、棉花、牛皮纸（或报纸）、记号笔、麻绳、纱布、电炉、天平、分装架等。



## 二、操作程序（见图 9-9）

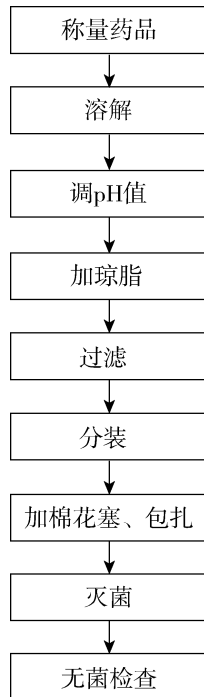


图 9-9 培养基配制流程图

## 三、操作规程

### （一）牛肉膏蛋白胨培养基的配制

牛肉膏蛋白胨培养基配方：牛肉膏 3g、蛋白胨 10g、氯化钠 5g、琼脂 15~20g、水 1000mL；pH 7.0~7.2。

#### 1. 称量和溶解

按照培养基配方，称取牛肉膏、蛋白胨、氯化钠，依次放入盛有适量水的烧杯中，加热溶解。牛肉膏用玻璃棒挑取至称量纸或载玻片上进行称量，之后一起放入水中，待牛肉膏溶解后将称量纸或载玻片取出。

#### 2. 调 pH 值

待溶液冷却至室温，测 pH 值，用氢氧化钠将 pH 值调至 7.4~7.5（加热杀菌后，pH 值会下降 0.3~0.4）。加入氢氧化钠时要缓慢、少量、多搅拌，防止过量。

### 3. 加琼脂

制备固体培养基时，需加入 1.5%~2% 琼脂。

先将溶液加热至沸，将琼脂慢慢倒入，不断搅拌至琼脂溶解，最后补足蒸发的水分。

### 4. 过滤

趁热用滤纸或纱布过滤。

### 5. 分装

趁热分装至试管（见图 9-10）或三角瓶。

装入试管中的固体培养基不宜超过试管高度的 1/5，液体培养基不超过试管高度的 1/4，三角瓶中的量不超过容积的一半。

在分装过程中培养基不应沾污瓶口或管口，以免弄湿棉塞造成污染，如有沾污可用纸擦拭干净。

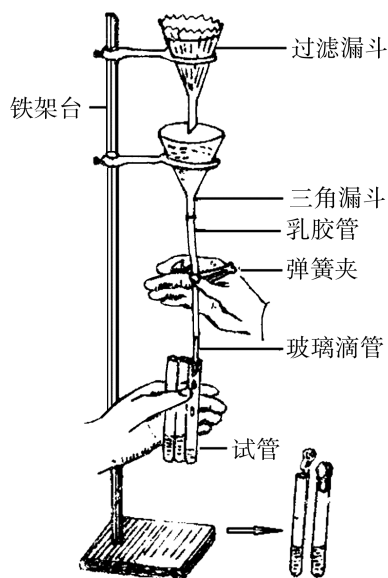


图 9-10 培养基的分装

### 6. 加棉花塞，包扎

方法见任务四。

包扎后标明培养基的名称、制备日期和制备人的组别、姓名。

### 7. 灭菌

121℃，15~20min。

### 8. 趁热摆放斜面

斜面长度一般不超过试管长度的 1/2（见图 9-11）。

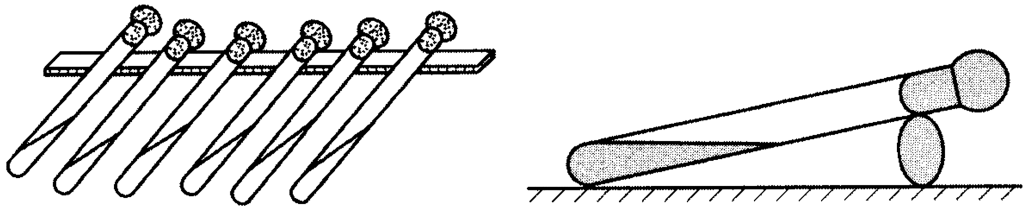


图 9-11 搁置斜面及长度的示意图

## 9. 无菌检验

将灭过菌的培养基随机抽取一支，在 37℃ 恒温培养箱中保温 24h，无杂菌出现，证明合格。

### (二) 高盐察氏培养基的配制

高盐察氏培养基配方：硝酸钠 2g、磷酸氢二钾 1g、氯化钾 0.5g、硫酸镁 0.5g、硫酸亚铁 0.01g、蔗糖 30g、琼脂 15~20g、水 1000mL；pH 值自然，121℃ 灭菌 20min。

在上述培养基中加入 30g、60g 或 120g 氯化钠，则为高盐察氏培养基。

#### 1. 称量和溶解

按照培养基配方，称取硝酸钠、磷酸氢二钾、氯化钾、硫酸镁、硫酸亚铁、蔗糖、氯化钠，依次放入盛有适量水的烧杯中，溶解。

2. 该培养基不需调 pH 值，其余步骤与牛肉膏蛋白胨培养基的配制相同。

## 四、结果与报告

- ① 记录每种培养基的制备步骤。
- ② 记录培养基无菌检查的结果。

## 五、思考题

- ① 本着节约的原则，如果本次实验需要的培养基是 500mL，请你计算一下，每种培养基成分所需的数量。
- ② 如果不马上使用，培养基应当怎样贮存呢？一般能放置多久？

## 任务六 干热空气灭菌和高压蒸汽灭菌

### 一、准备工作

#### 1. 药品及试剂

待灭菌的培养基。

#### 2. 仪器及用具

待灭菌的玻璃器皿、手提式高压蒸汽灭菌锅、电烘箱。

### 二、操作程序（见图 9-12、图 9-13）

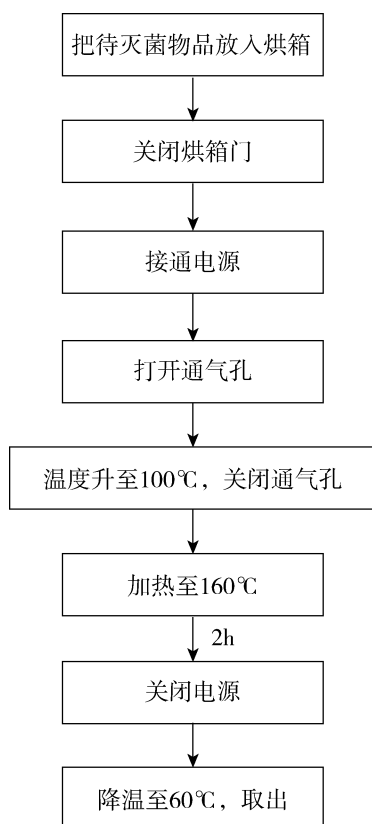


图 9-12 干热空气灭菌流程图

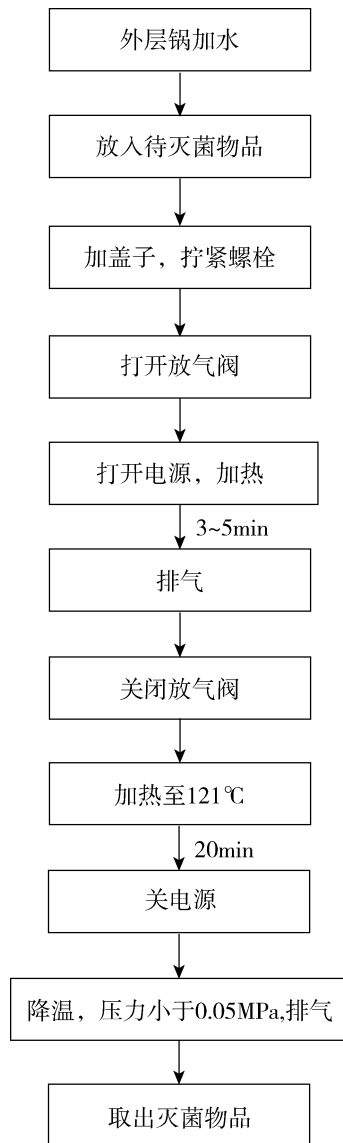


图 9-13 高压蒸汽灭菌流程图

### 三、操作规程

#### 1. 干热空气灭菌

①将待灭菌的物品用报纸或牛皮纸包扎好，放入电烘箱，不要靠四壁或放得过紧太满，以免影响热空气的流通，也不要放在底板上，以免引起包装纸烤焦或着火。

②关闭烘箱门，接通电源，打开通气孔，排出箱内的水汽和冷空气。温度升至 100℃



干热空气灭菌

时，关闭通气孔。

③继续加热至  $160^{\circ}\text{C}$ ，保温 2h。

④关闭电源，箱内温度自然降至  $60^{\circ}\text{C}$  以下，方可打开箱门，取出灭菌的物品。

## （二）高压蒸汽灭菌

①在灭菌锅的外层锅中加入适量的水，高度与搁架相平。

②放入内层的灭菌桶，将待灭菌的物品放入内层的灭菌桶内。

③将盖子上的排气软管插于内层灭菌桶的排气槽，盖好盖子，两两对称拧紧螺栓，应使螺栓松紧一致，勿使漏气。

④打开放气阀。

⑤打开电源，开始加热，水沸腾后放气阀会排气，保持排气 3~5min，使锅内的冷空气完全排出后，关闭放气阀，使压力逐渐上升至  $0.103\text{ MPa}$ ，温度达  $121^{\circ}\text{C}$ ，控制电源，在此温度下维持 20min 后，关闭电源，停止加热。

⑥灭菌完毕，自然降温，当压力表指示压力降到  $0.05\text{ MPa}$  时，可缓慢开启放气阀，防止液体培养基因灭菌锅内压力骤降而沸腾冲湿棉花塞，排气至压力为 0 时，慢慢打开盖子，取出灭菌物品。



## 四、结果与报告

记录灭菌步骤。

## 五、操作要点

①干热空气灭菌时箱内温度不能超过  $180^{\circ}\text{C}$ ，防止引起报纸和棉花烤焦。 $60^{\circ}\text{C}$  以上不可打开箱门，防止引起玻璃器皿的炸裂。

②干热空气灭菌时灭菌物品不可靠四壁或放得过紧太满，以免影响热空气的流通，也不要放在底板上。

③高压蒸汽灭菌物品不可放得过满。

④高压蒸汽灭菌适合于耐高温、高压的物品灭菌，包括一般培养基、生理盐水、金属器具、工作服等。

⑤干热空气灭菌适用于平皿、三角瓶、试管等玻璃器皿及保藏微生物用到的沙土、石蜡油、碳酸钙等物质的灭菌。

## 六、思考题

①如何检查灭菌后的培养菌是无菌的？

②高压蒸汽灭菌的原理是什么？是否只要压力表上的指针指到所需的压力时就能达到所需灭菌温度？为什么？



## 任务七 微生物的接种技术

### 一、准备工作

#### 1. 菌种

大肠杆菌、金黄色葡萄球菌。

#### 2. 器材、培养基及试剂

斜面固体牛肉膏蛋白胨培养基、半固体牛肉膏蛋白胨柱状培养基、试管架、接种环、接种针、酒精灯、记号笔、火柴。



### 二、操作程序（见图 9-14）

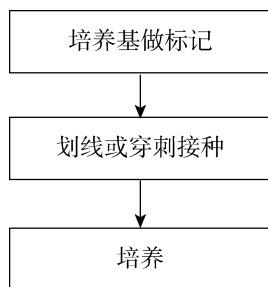


图 9-14 接种流程图

### 三、操作规程

#### 1. 斜面试种（见图 9-15）

①取新鲜固体斜面培养基，分别做好标记（写上菌名、接种日期、接种人等），然后用无菌操作方法把待接菌种接入以上新鲜培养基斜面上。

②接种的方法：用接种环蘸取少量待接菌种，然后在新鲜斜面上按“之”字形划线，方向是从下部开始，一直划至上部。注意划线要轻，不可把培养基划破。

③接种后 37℃ 恒温培养，细菌培养 48h，放线菌、霉菌培养至孢子成熟方可取出保存。

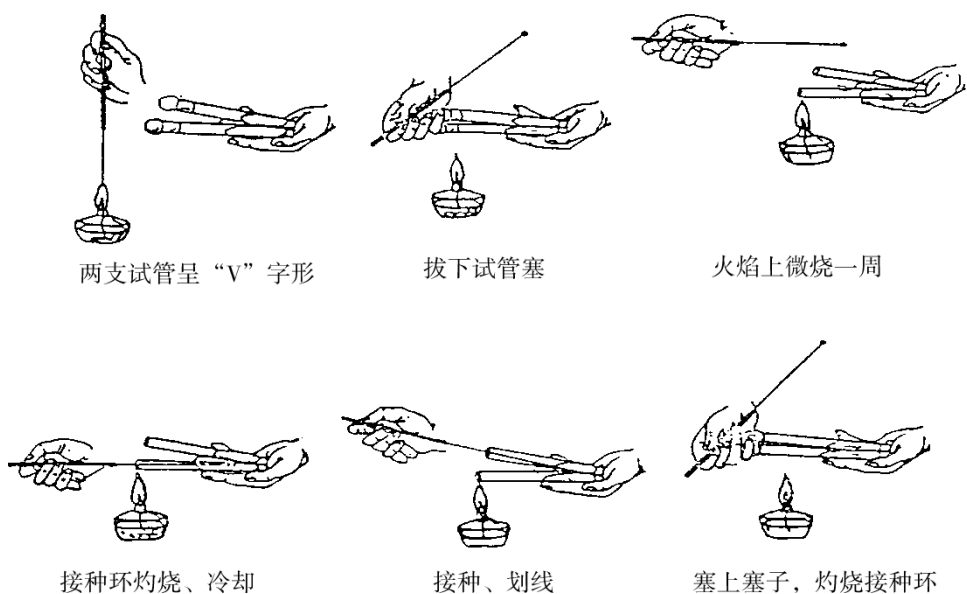


图 9-15 试管斜面接种

## 2. 穿刺接种（见图 9-16）

用接种针蘸取少量待接菌种，然后从柱状培养基的中心穿入其底部（但不要穿透），最后沿原刺入路线抽出接种针。注意勿使接种针在培养基内左右移动，以保持穿刺线整齐，便于观察生长结果。

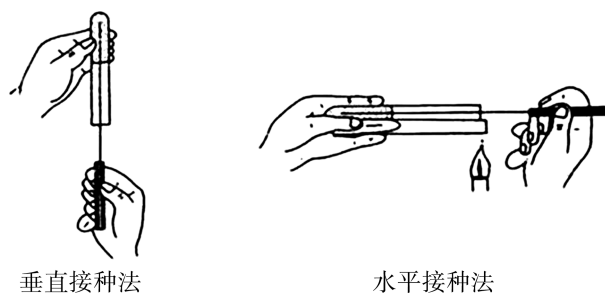


图 9-16 穿刺接种的两种方法

## 四、结果与报告

比较两种细菌穿刺接种的结果，并进行分析。

## 五、操作要点

注意划线要轻，不可把培养基划破。

## 任务八 微生物的分离纯化与培养

### 一、准备工作

#### 1. 材料

土壤样品。

#### 2. 器材、培养基及试剂

淀粉琼脂培养基（高氏 I 号培养基）、牛肉膏蛋白胨培养基、马丁氏琼脂培养基、查氏琼脂培养基；10%酚液、链霉素、盛 9mL 无菌水的试管、盛 90mL 无菌水并带有玻璃珠的三角烧瓶、无菌玻璃涂棒、无菌吸管、接种环、无菌培养皿、酒精灯、玻璃铅笔、火柴、试管架、接种针、滴管。



微生物的分离纯化  
与培养

### 二、操作程序（见图 9-17、图 9-18）

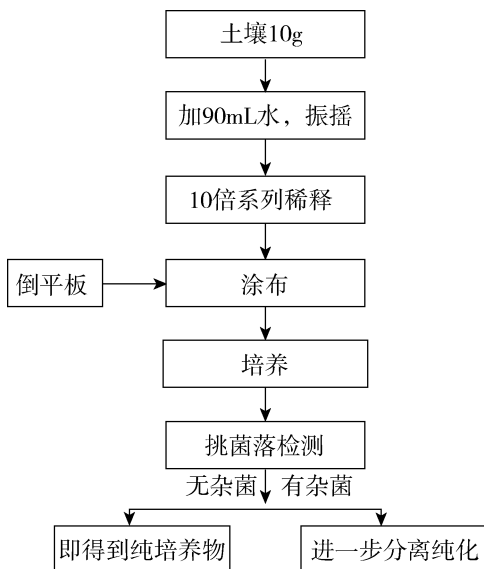


图 9-17 涂布平板法分离流程图

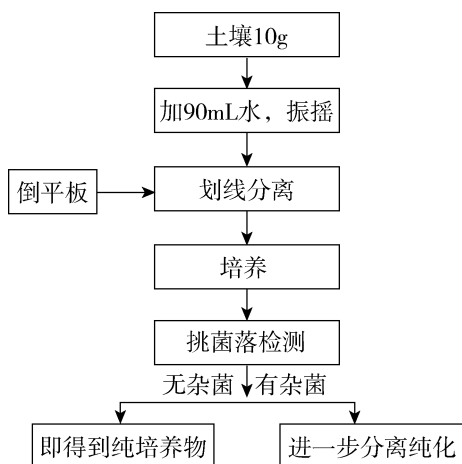


图 9-18 划线分离法分离流程图

### 三、操作规程

#### 1. 稀释涂布平板法

(1) 倒平板 将牛肉膏蛋白胨琼脂培养基、高氏 I 号琼脂培养基、马丁氏琼脂培养基加热熔化，待冷却至  $55\sim 60^{\circ}\text{C}$  时，向高氏 I 号培养基中加入 10% 酚液数滴，向马丁氏培养基中加入链霉素溶液（最终浓度为  $30\ \mu\text{g}/\text{mL}$ ），混合均匀后分别倒平板，每种培养基倒三皿。

倒平板的方法：右手持盛培养基的试管或三角瓶置火焰旁边，用左手将试管塞或瓶塞轻轻地拔出，试管或瓶口保持对着火焰；然后左手拿培养皿并将皿盖在火焰附近打开一条缝，迅速倒入培养基约 15mL，加盖后轻轻摇动培养皿，使培养基均匀分布在培养皿底部，然后平置于桌面上，待凝固后即成平板。

(2) 制备土壤稀释液 称取土样 10g，放入盛 90mL 无菌水并带有玻璃珠的三角烧瓶中，振摇约 20min，使土样与水充分混合，将细胞分散。用一支 1mL 无菌吸管从中吸取 1mL 土壤悬液加入盛有 9mL 无菌水的大试管中充分混匀，然后用无菌吸管从此试管中吸取 1mL，加入另一盛有 9mL 无菌水的试管中，混合均匀，以此类推制成  $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$  不同稀释度的土壤溶液（见图 9-19）。注意：操作时管尖不能接触液面，每一个稀释度换一支试管。

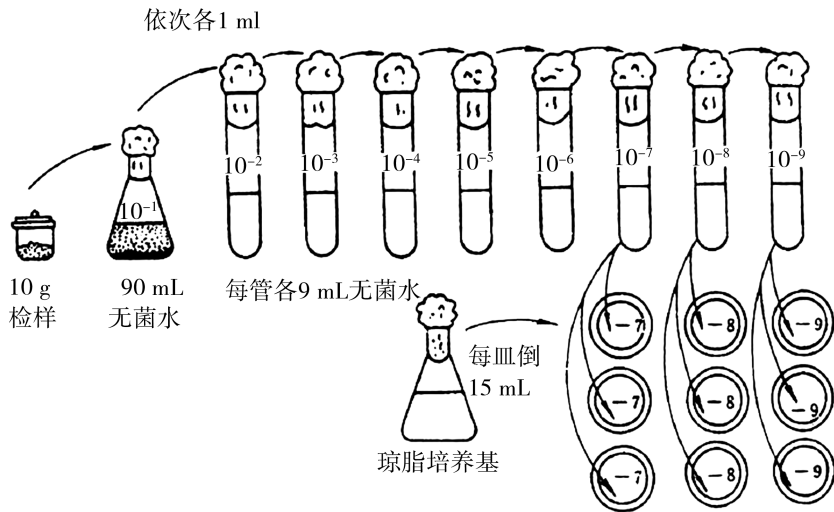


图 9-19 土壤稀释液的制备和稀释液的取样

(3) 涂布 将上述每种培养基的三个平板底面分别标记  $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$  三种稀释度，然后用无菌吸管分别由  $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$  三管土壤稀释液中各吸取 0.1mL 或 0.2mL，小心地滴在对应平板培养基表面中央位置。

用右手拿无菌玻璃涂棒平放在平板培养基表面上，将菌悬液先沿同心圆方向轻轻向外扩展，使之分布均匀。室温下静置 5~10min，使菌液侵入培养基。

(4) 培养 将高氏 I 号培养基平板和马丁氏培养基平板倒置于  $28^{\circ}\text{C}$  温室中培养 3~5 天，将牛肉膏蛋白胨平板倒置于  $37^{\circ}\text{C}$  温室中培养 2~3 天。

(5) 挑菌落 将培养后长出的单个菌落分别挑取少许细胞接种到上述三种培养基斜面上，分别置  $28^{\circ}\text{C}$  和  $37^{\circ}\text{C}$  培养箱中培养。若发现有杂菌，需再一次进行分离、纯化，直到获得纯培养。

## 2. 平板划线分离法

(1) 倒平板 按稀释涂布平板法倒平板，并用记号笔标明培养基名称、土样编号和实验日期。

(2) 划线 在近火焰处，左手拿皿底，右手拿接种环，挑取上述  $10^{-1}$  的土壤悬液一环在平板上划线。划线的方法很多，但无论采用哪种方法，其目的都是通过划线将样品在平板上进行稀释，使之形成单个菌落。常用的划线方法有下列几种（见图 9-20）。

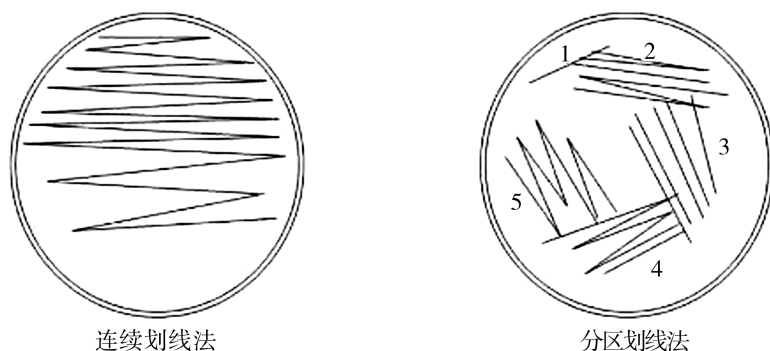


图 9-20 几种平板划线的方法

连续划线法：先将一环土壤悬液在琼脂平板上 1/5 处轻轻涂抹，然后用接种环在平板表面曲线连续划线接种，直至划满琼脂平板表面。此法常用于含菌量不多的标本。

分区划线分离法：用接种环以无菌操作挑取土壤悬液一环，先在平板培养基的一边做第一次平行划线 3~4 条，再转动培养皿约 70°角，并将接种环上的剩余物烧掉，待冷却后通过第一次划线部分做第二次平行划线，再用同样的方法通过第二次划线部分做第三次划线和通过第三次平行划线部分做第四次平行划线。划线完毕后，盖上培养皿盖，倒置于培养箱中培养。此法适用于杂菌量较多的标本。

(3) 挑菌落 同稀释涂布平板法，一直到认为分离的微生物纯化为止。

#### 四、结果与报告

- ①记录土壤稀释分离结果，并计算出每 1g 土壤中的细菌、放线菌和霉菌的数量。
- ②分别记录平板划线、斜面接种植的结果，并自我评价。

#### 五、操作要点

- ①一般土壤中细菌最多，放线菌及霉菌次之，而酵母菌主要见于果园及菜园土壤中，故从土壤中分离细菌时要取较高的稀释度，否则菌落连成一片不能计数。
- ②在土壤稀释分离操作中，每稀释 10 倍，最好更换一次移液管，使计数准确。

#### 六、思考题

- ①如何确定平板上某单个菌落是否为纯培养？请写出实验的主要步骤。
- ②为什么高氏 I 号培养基和马丁氏培养基中要分别加入酚液和链霉素？如果用牛肉膏蛋白胨培养基分离一种对青霉素具有抗性的细菌，你认为应如何做？
- ③试设计一个实验，从土壤中分离酵母菌并进行计数。

## 任务九 食品菌落总数的测定

### 一、准备工作

#### (一) 培养基和试剂

##### 1. 平板计数琼脂培养基 (PCA)

(1) 成分 胰蛋白胨 5.0g、酵母浸膏 2.5g、葡萄糖 1.0g、琼脂 15.0g、蒸馏水 1000mL。

(2) 制法 将上述成分加于蒸馏水中，煮沸溶解，调节 pH 值至  $7.0 \pm 0.2$ 。分装试管或锥形瓶， $121^\circ\text{C}$  高压灭菌 15min。

##### 2. 菌落总数测试片

应符合 GB 4789.28—2024《培养基和试剂的质量要求》中平板计数琼脂培养基质量控制要求，且主要营养成分与平板计数琼脂培养基配方一致。

##### 3. 无菌磷酸盐缓冲液

(1) 成分 磷酸二氢钾 ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )、34.0g 蒸馏水 500mL。

(2) 制法 贮存液：称取 34.0g 的磷酸二氢钾溶于 500mL 蒸馏水中，用大约 175mL 的 1mol/L 氢氧化钠溶液调节 pH 值至 7.2，用蒸馏水稀释至 1000mL 后贮存于冰箱。

稀释液：取贮存液 1.25mL，用蒸馏水稀释至 1000mL，分装于适宜容器中， $121^\circ\text{C}$  高压灭菌 15min。

##### 4. 无菌生理盐水

(1) 成分 氯化钠 8.5g、蒸馏水 1000mL。

(2) 制法 称取 8.5g 氯化钠溶于 1000mL 蒸馏水中， $121^\circ\text{C}$  高压灭菌 15min。

#### (二) 仪器

① 恒温培养箱： $36^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ ， $30^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 。

② 冰箱： $2 \sim 5^\circ\text{C}$ 。

③ 恒温装置： $48^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ 。

④ 天平：感量为 0.1g。

⑤ 均质器。

⑥ 振荡器。

⑦ 无菌吸管：1mL（具 0.01mL 刻度）、10mL（具 0.1mL 刻度）或微量移液器及吸头。

⑧ 无菌锥形瓶：容量 250mL、500mL。

⑨ 无菌培养皿：直径 90mm。



食品菌落总数的测定

⑩pH计或pH比色管或精密pH试纸。

⑪放大镜或/和菌落计数器。

### (三) 参考标准

GB 4789.2—2022《食品安全国家标准 食品微生物学检验 菌落总数测定》。

## 二、检验程序

菌落总数的检验程序如图9-21所示。

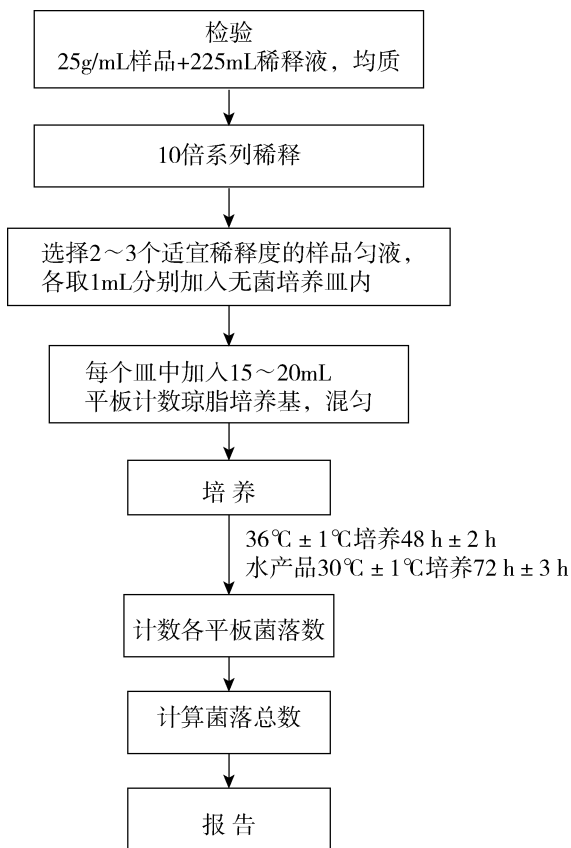


图 9-21 菌落总数的检验程序

## 三、操作规程

### (一) 样品的稀释

①固体和半固体样品：称取25g样品置于盛有225mL无菌磷酸盐缓冲液或无菌生理盐水的无菌均质杯内，8000~10000 r/min均质1~2min，或放入盛有225mL稀释液的无



菌均质袋中，用拍击式均质器拍打 1~2min，制成 1:10 的样品匀液。

②液体样品：以无菌吸管吸取 25mL 样品置于盛有 225mL 磷酸盐缓冲液或生理盐水的无菌锥形瓶（瓶内预置适当数量的无菌玻璃珠）中，充分混匀，制成 1:10 的样品匀液。

③稀释：用 1mL 无菌吸管或微量移液器吸取 1:10 样品匀液 1mL，沿管壁缓慢注于盛有 9mL 稀释液的无菌试管中（注意吸管或吸头尖端不要触及稀释液面），振摇试管或换用一支无菌吸管反复吹打使其混合均匀，制成 1:100 的样品匀液。

④按上述操作程序制备 10 倍系列稀释样品匀液。

⑤根据对样品污染状况的估计，选择 1~3 个适宜稀释度的样品匀液（液体样品可包括原液），在进行 10 倍递增稀释时，吸取 1mL 样品匀液于无菌培养皿内，每个稀释度做两个平皿。同时，分别吸取 1mL 空白稀释液加入两个无菌培养皿内作空白对照。

⑥及时将 15~20mL 冷却至 46℃ 的平板计数琼脂培养基（可放置于 46℃ ± 1℃ 恒温水浴箱中保温）倾注平皿，并转动平皿使其混合均匀。

## （二）培养

①待琼脂凝固后，将平板翻转，36℃ ± 1℃ 培养 48h ± 2h。水产品 30℃ ± 1℃ 培养 72h ± 3h。如果样品中可能含有在琼脂培养基表面弥漫生长的菌落时，可在凝固后的琼脂表面覆盖一薄层琼脂培养基（约 4mL），凝固后翻转平板，进行培养。

②如果使用菌落总数测试片，应按照测试片所提供的相关技术规程操作。

## （三）菌落计数

可用肉眼观察，必要时用放大镜或菌落计数器，记录稀释倍数和相应的菌落数量。菌落计数以菌落形成单位（CFU）表示。

①选取菌落数在 30~300CFU 之间、无蔓延菌落生长的平板计数菌落总数。低于 30CFU 的平板记录具体菌落数，大于 300CFU 的可记录为“多不可计”。每个稀释度的菌落数应采用两个平板的平均数。

②其中一个平板有较大片状菌落生长时，则不宜采用，而应以无片状菌落生长的平板作为该稀释度的菌落数；若片状菌落不到平板的一半，而其余一半中菌落分布又很均匀，即可计算半个平板后乘以 2，代表一个平板菌落数。

③当平板上出现菌落间无明显界线的链状生长时，则将每条单链作为一个菌落计数。

## 四、结果计算

①若只有一个稀释度平板上的菌落数在适宜计数范围内，计算两个平板菌落数的平均值，再将平均值乘以相应稀释倍数，作为每 g (mL) 样品中菌落总数结果。

②若有两个连续稀释度的平板菌落数在适宜计数范围内时，按下面公式计算：

$$N = \Sigma c / (n_1 + 0.1n_2) d$$

式中：

$N$  ——样品中菌落数；

$c$  ——平板（含适宜范围菌落数的平板）菌落数之和；

$n_1$  ——第一稀释度（低稀释倍数）平板个数；

$n_2$  ——第二稀释度（高稀释倍数）平板个数；

$d$  ——稀释因子（第一稀释度）。

③若所有稀释度的平板上菌落数均大于 300CFU，则对稀释度最高的平板进行计数，其他平板可记录为“多不可计”，结果按平均菌落数乘以最高稀释倍数计算。

④若所有稀释度的平板菌落数均小于 30CFU，则应按稀释度最低的平均菌落数乘以稀释倍数计算。

⑤若所有稀释度（包括液体样品原液）平板均无菌落生长，则以小于 1 乘以最低稀释倍数计算。

⑥若所有稀释度的平板菌落数均不在 30~300CFU 之间，其中一部分小于 30CFU 或大于 300CFU 时，则以最接近 30CFU 或 300CFU 的平均菌落数乘以稀释倍数计算。

⑦菌落总数的报告。

a. 菌落数小于 100CFU 时，按“四舍五入”原则修约，以整数报告。

b. 菌落数大于或等于 100CFU 时，第 3 位数字采用“四舍五入”原则修约后，取前 2 位数字，后面用 0 代替位数；也可用 10 的指数形式来表示，按“四舍五入”原则修约后，采用两位有效数字。

c. 若空白对照上有菌落生长，则此次检测结果无效。

d. 称重取样以 CFU/g 为单位报告，体积取样以 CFU/mL 为单位报告。

## 五、操作要点

①稀释样液时，注意吸管或吸头尖端不要触及稀释液面。

②每递增稀释一次，换用一次 1mL 无菌吸管或吸头。

③将平板计数琼脂培养基倾注平皿时，要转动平皿使其混合均匀。

④平板凝固后，将平板翻转倒置培养，这样水分就不会滴在培养基上。

## 六、思考题

### （一）填空题

1. 根据菌落总数的报告原则，某样品经菌落总数测定的数据为 3775 个/mL，应报告为 \_\_\_\_\_ 个/mL。

2. 微生物检验培养基等含有水分物质只能采用 \_\_\_\_\_ 灭菌。

3. 高压蒸汽灭菌时，温度 121℃ 维持 \_\_\_\_\_ min。

4. 采用高压蒸汽灭菌，\_\_\_\_\_是影响灭菌质量的关键。
5. 含糖类或明胶的培养基，\_\_\_\_\_℃灭菌\_\_\_\_\_min；对于无糖培养基，\_\_\_\_\_℃灭菌\_\_\_\_\_min。
6. 微生物增殖培养时一般选用\_\_\_\_\_培养基。
7. 琼脂在培养基中的作用是\_\_\_\_\_。
8. 带菌的吸管处理应当是\_\_\_\_\_。
9. 剪刀、镊子、接种针，使用前后都应当采用\_\_\_\_\_方式灭菌。
10. \_\_\_\_\_方法保藏菌种效果最好。

## （二）简答题

1. 什么是菌落？什么是菌落总数？
2. 菌落总数检测的卫生学意义是什么？
3. 培养微生物的培养基应具备哪些条件？为什么？
4. 在配置培养基的操作过程中应注意些什么问题？为什么？
5. 培养基配好后，为什么必须立即灭菌？
6. 如何检查灭菌后的培养基是无菌的？
7. 高压蒸汽灭菌前，为什么要将锅内冷空气排尽？
8. 灭菌完毕后，为什么在要待压力降到0时才能打开排气阀开盖取物？
9. 平板计数琼脂培养基与营养琼脂培养基相比，有哪些优势？
10. 测定过程中为什么要进行空白对照试验？

# 任务十 大肠菌群的检测

## 一、准备工作

### （一）培养基和试剂

①月桂基硫酸盐膜蛋白胨（LST）肉汤：胰蛋白胨或胰酪胨 20.0g、氯化钠 5.0g、乳糖 5.0g、磷酸氢二钾（ $K_2HPO_4$ ）2.75g、磷酸二氢钾（ $KH_2PO_4$ ）2.75g、月桂基硫酸钠 0.1g、蒸馏水 1000mL。

将上述成分溶解于蒸馏水中，调节 pH 值至  $6.8 \pm 0.2$ ，分装到有玻璃小倒管的试管中，每管 10mL。121℃ 高压灭菌 15min。

②煌绿乳糖胆盐（BGLB）肉汤：蛋白胨 10.0g、乳糖 10.0g、牛胆粉溶液 200mL、0.1%煌绿水溶液 13.3mL、蒸馏水 800mL。

将蛋白胨、乳糖溶于约 500mL 蒸馏水中，加入牛胆粉溶液 200mL（将 20.0g 脱水牛



大肠菌群的检测

胆粉溶于 200mL 蒸馏水中, 调节 pH 值至 7.0~7.5), 用蒸馏水稀释到 975mL, 调节 pH 值至  $7.2 \pm 0.1$ , 再加入 0.1% 煌绿水溶液 13.3mL, 用蒸馏水补足到 1000mL, 用棉花过滤后, 分装到有玻璃小倒管的试管中, 每管 10mL。121℃ 高压灭菌 15min。

③ 结晶紫中性红胆盐琼脂 (VRBA): 蛋白胨 7.0g、酵母膏 3.0g、乳糖 10.0g、氯化钠 5.0g、胆盐或 3 号胆盐 15g、中性红 0.03g、结晶紫 0.002g、琼脂 15~18g、蒸馏水 1000mL。

将上述成分溶于蒸馏水中, 静置几分钟, 充分搅拌, 调节 pH 值至  $7.2 \pm 0.1$ 。煮沸 2min, 将培养基冷却至 45~50℃ 倾注平板。使用前临时制备, 不得超过 3h。

④ 磷酸盐缓冲液: 磷酸二氢钾 ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 34.0g、蒸馏水 500mL。

贮存液: 称取 34.0g 的磷酸二氢钾溶于 500mL 蒸馏水中, 用大约 175mL 的 1mol/L 氢氧化钠溶液调节 pH 值至 7.2, 用蒸馏水稀释至 1000mL 后贮存于冰箱。

稀释液: 取贮存液 1.25mL, 用蒸馏水稀释至 1000mL, 分装于适宜容器中, 121℃ 高压灭菌 15min。

⑤ 无菌生理盐水: 氯化钠 8.5g、蒸馏水 1000mL, 称取 8.5g 氯化钠溶于 1000mL 蒸馏水中, 121℃ 高压灭菌 15min。

⑥ 1mol/L 氢氧化钠: 氢氧化钠 40.0g、蒸馏水 1000mL。

称取 40g 氢氧化钠溶于 1000mL 蒸馏水中, 121℃ 高压灭菌 15min。

⑦ 1mol/L 盐酸: 盐酸 90mL、蒸馏水 1000mL, 移取浓盐酸 90mL, 用蒸馏水稀释至 1000mL, 121℃ 高压灭菌 15min。

## (二) 仪器

① 恒温培养箱:  $36^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 。

② 冰箱:  $2\sim 5^\circ\text{C}$ 。

③ 恒温水浴箱:  $46^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 。

④ 天平: 感量 0.1g。

⑤ 均质器。

⑥ 振荡器。

⑦ 无菌吸管: 1mL (具 0.01mL 刻度)、10mL (具 0.1mL 刻度) 或微量移液器及吸头。

⑧ 无菌锥形瓶: 容量 500mL。

⑨ 无菌培养皿: 直径 90mm。

⑩ pH 计或 pH 比色管或精密 pH 试纸。

## (三) 参考标准

GB 4789.3-2016 《食品安全国家标准 食品微生物学检验 大肠菌群计数》。

## 二、大肠菌群 MPN 计数法

### (一) 检验程序

大肠菌群 MPN 计数法的检验程序如图 9-22 所示。

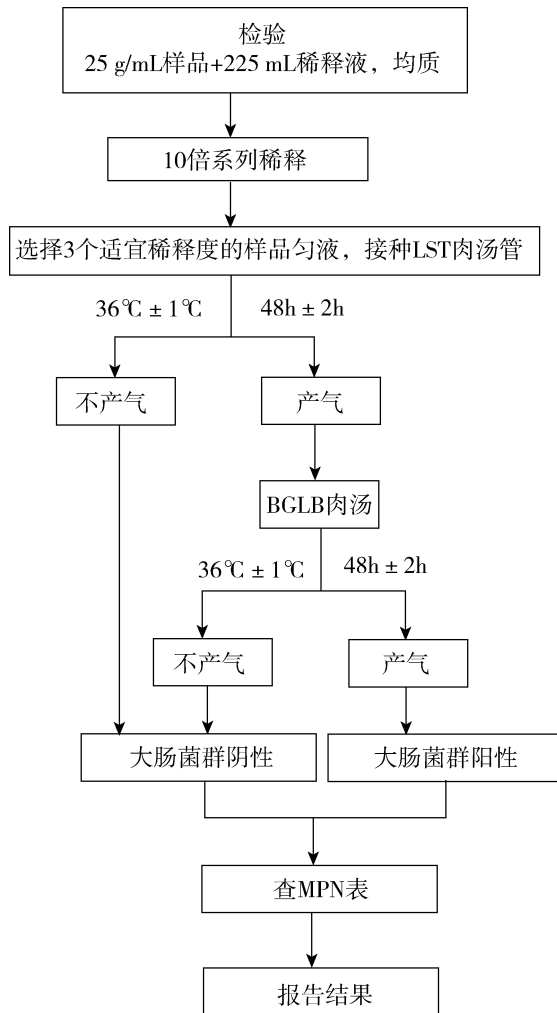


图 9-22 大肠菌群 MPN 计数法的检验程序

### (二) 操作规程

#### 1. 样品的稀释

① 固体和半固体样品：称取 25g 样品，放入盛有 225mL 磷酸盐缓冲液或生理盐水的无菌均质杯内，8000~10000 r/min 均质 1~2min，或放入盛有 225mL 磷酸盐缓冲液或生

理盐水的无菌均质袋中，用拍击式均质器拍打 1~2min，制成 1 : 10 的样品匀液。

②液体样品：以无菌吸管吸取 25mL 样品置于盛有 225mL 磷酸盐缓冲液或生理盐水的无菌锥形瓶（瓶内预置适当数量的无菌玻璃珠）中，充分混匀，制成 1 : 10 的样品匀液。

③样品匀液的 pH 值应在 6.5~7.5 之间，必要时分别用 1mol/L 氢氧化钠或 1mol/L 盐酸调节。

④用 1mL 无菌吸管或微量移液器吸取 1 : 10 样品匀液 1mL，沿管壁缓缓注入 9mL 磷酸盐缓冲液或生理盐水的无菌试管中（注意吸管或吸头尖端不要触及稀释液面），振摇试管或换用一支 1mL 无菌吸管反复吹打，使其混合均匀，制成 1 : 100 的样品匀液。

⑤根据对样品污染状况的估计，按上述操作，依次制成十倍递增系列稀释样品匀液。每递增稀释一次，换用一支 1mL 无菌吸管或吸头。从制备样品匀液至样品接种完毕，全过程不得超过 15min。

## 2. 初发酵试验

每个样品，选择三个适宜的连续稀释度的样品匀液（液体样品可以选择原液），每个稀释度接种三管月桂基硫酸盐胰蛋白胨（LST）肉汤，每管接种 1mL（如接种量超过 1mL，则用双料 LST 肉汤），36℃±1℃培养 24h±2h，观察管内是否有气泡产生，24h±2h 产气者进行复发酵试验，如未产气则继续培养至 48h±2h，产气者进行复发酵试验。未产气者为大肠菌群阴性。

## 3. 复发酵试验

用接种环从产气的 LST 肉汤管中分别取培养物一环，移种于煌绿乳糖胆盐肉汤（BGLB）管中，36℃±1℃培养 48h±2h，观察产气情况。产气者，计为大肠菌群阳性管。

### （三）大肠菌群最可能数（MPN）的报告

按复发酵试验确证的大肠菌群 BGLB 阳性管数，检索 MPN 表（表 9-1），报告每 g（mL）样品中大肠菌群的 MPN 值。

表 9-1 大肠菌群最可能数（MPN）检索表（报告单位：g 或 mL）

阳性管数			MPN	95%可信限		阳性管数			MPN	95%可信限	
0.10	0.01	0.001		下限	上限	0.10	0.01	0.001		下限	上限
0	0	0	<3.0	—	9.5	2	2	0	21	4.5	42
0	0	1	3.0	0.15	9.6	2	2	1	28	8.7	94
0	1	0	3.0	0.15	11	2	2	2	35	8.7	94
0	1	1	6.1	1.2	18	2	3	0	29	8.7	94
0	2	0	6.2	1.2	18	2	3	1	36	8.7	94
0	3	0	9.4	3.6	38	3	0	0	23	4.6	94

续表

阳性管数			MPN	95%可信限		阳性管数			MPN	95%可信限	
0.10	0.01	0.001		下限	上限	0.10	0.01	0.001		下限	上限
1	0	0	3.6	0.17	18	3	0	1	38	8.7	110
1	0	1	7.2	1.3	18	3	0	2	64	17	180
1	0	2	11	3.6	38	3	1	0	43	9	180
1	1	0	7.4	1.3	20	3	1	1	75	17	200
1	1	1	11	3.6	38	3	1	2	120	37	420
1	2	0	11	3.6	42	3	1	3	160	40	420
1	2	1	15	4.5	42	3	2	0	93	18	420
1	3	0	16	4.5	42	3	2	1	150	37	420
2	0	0	9.2	1.4	38	3	2	2	210	40	430
2	0	1	14	3.6	42	3	2	3	290	90	1000
2	0	2	20	4.5	42	3	3	0	240	42	1000
2	1	0	15	3.7	42	3	3	1	460	90	2000
2	1	1	20	4.5	42	3	3	2	1100	180	4100
2	1	2	27	8.7	94	3	3	3	>1100	420	—

注：1. 本表采用三个稀释度 [0.1g (mL)、0.01g (mL) 和 0.001g (mL) ]，每个稀释度接种三管。  
2. 表内所列检样量如改用 1g (mL)、0.1g (mL) 和 0.01g (mL) 时，表内数字应相应降低 10 倍；如改用 0.01g (mL)、0.001g (mL)、0.0001g (mL) 时，则表内数字应相应增高 10 倍，其余类推。

### 三、大肠菌群平板计数法

#### (一) 检验程序

大肠菌群平板计数法的检验程序如图 9-23 所示。

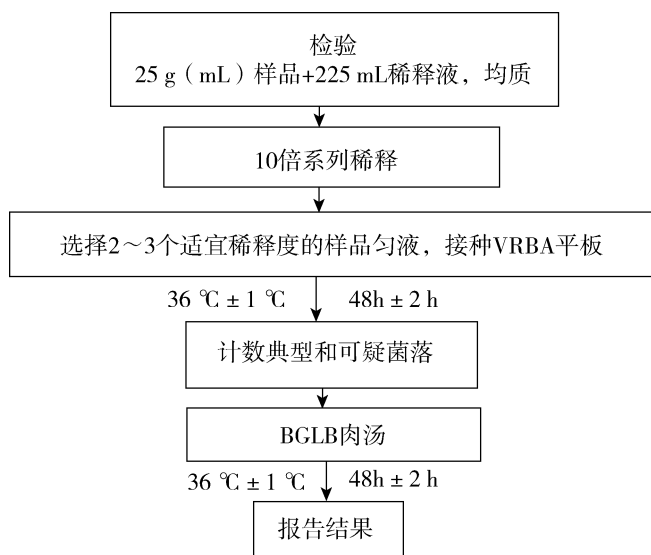


图 9-23 大肠菌群平板计数法的检验程序

## (二) 操作规程

### 1. 样品稀释

同上。

### 2. 平板计数

①选取 2~3 个适宜的连续稀释度，每个稀释度接种 2 个无菌平皿，每皿 1mL。同时取 1mL 生理盐水加入无菌平皿作空白对照。

②及时将 15~20mL 冷至 46℃ 的结晶紫中性红胆盐琼脂 (VRBA) 约倾注于每个平皿中。小心旋转平皿，将培养基与样液充分混匀，待琼脂凝固后，再加 3~4mL VRBA 覆盖平板表层。翻转平板，置于 36℃±1℃ 培养 18~24h。

③平板菌落数的选择。选取菌落数在 15~150CFU 之间的平板，分别计数平板上出现的典型和可疑大肠菌群菌落（如菌落直径较典型菌落小）。典型菌落为紫红色，菌落周围有红色的胆盐沉淀环，菌落直径为 0.5mm 或更大，最低稀释度平板低于 15CFU 的记录具体菌落数。

④证实试验。从 VRBA 平板上挑取 10 个不同类型的典型和可疑菌落，少于 10 个菌落的挑取全部典型和可疑菌落，分别移种于 BGLB 肉汤管内，36℃±1℃ 培养 24~48h，观察产气情况。凡 BGLB 肉汤管产气，即可报告为大肠菌群阳性。

⑤大肠菌群平板计数的报告。经最后证实为大肠菌群阳性的试管比例乘以平板菌落数，再乘以稀释倍数，即为每 g (mL) 样品中大肠菌群数。例： $10^{-4}$  样品稀释液 1mL，在 VRBA 平板上有 100 个典型和可疑菌落，挑取其中 10 个接种 BGLB 肉汤管，证实有 6 个阳性管，则该样品的大肠菌群数为： $100 \times 6 / 10 \times 10^4 / \text{g (mL)} = 6.0 \times 10^5 \text{CFU/g (mL)}$ 。

若所有稀释度（包括液体样品原液）平板均无菌落生长，则以小于 1 乘以最低稀释倍数



计算。

#### 四、操作要点

- ①稀释样液时，注意吸管或吸头尖端不要触及稀释液面。
- ②每递增稀释一次，换用一次 1mL 无菌吸管或吸头。
- ③如接种量超过 1mL，则用双料 LST 肉汤。
- ④平板凝固后，将平板翻转倒置培养。

#### 五、思考题

##### (一) 填空题

1. 在检验肠道细菌时应将培养物置于\_\_\_\_\_中培养。
2. 检测大肠菌群时，待检样品接种 LST 发酵管，经培养如不产气，则大肠菌群\_\_\_\_\_。
3. 检测粪大肠菌群时，如 LST 肉汤管产气者，将产气的 LST 肉汤管分别接种\_\_\_\_\_，然后置培养箱内培养。
4. 某样品经增菌后，取增菌液一环，接种 VRBA 平皿，其培养温度是  $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ，培养时间是\_\_\_\_\_。
5. 肉汁培养基一般用于培养\_\_\_\_\_。
6. 平板上出现典型和可疑大肠菌群菌落，典型菌落为\_\_\_\_\_，菌落周围有红色的胆盐沉淀环。
7. 接种后的平板应该需要及时倾注 15~20mL 冷至  $46^{\circ}\text{C}$  的\_\_\_\_\_培养基。
8. 初发酵试验中，选择\_\_\_\_\_个适宜稀释度的样品均液。

##### (二) 简答题

1. 什么是大肠菌群？大肠菌群测定的卫生学意义是什么？
2. MPN 技术法的检验原理是什么？
3. 平板计数法的检验原理是什么？
4. 从制备样品匀液至样品接种完毕，为什么全过程不得超过 15min？

## 参考文献

- [1] 陈建军. 微生物学基础 [M]. 南京: 江苏科学技术出版社, 2007.
- [2] 贾英民. 食品微生物学 [M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2007.
- [3] 杨洁彬. 食品微生物学 [M]. 2 版. 北京: 北京农业大学出版社, 1999.
- [4] 翁连海. 食品微生物基础与应用 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2005.
- [5] 薛泉宏. 微生物学 [M]. 西安: 世界图书出版公司, 2000.
- [6] 周德庆. 微生物学教程 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2002.
- [7] 朱乐敏. 食品微生物 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2006.
- [8] 何国庆, 贾英民. 食品微生物学 [M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2005.
- [9] 郑晓冬. 食品微生物学 [M]. 杭州: 浙江大学出版社, 2000.
- [10] 谢梅英. 食品微生物学 [M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2000.
- [11] 纪铁鹏, 崔雨荣. 乳品微生物 [M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2007.
- [12] 杨玉红. 食品微生物学 [M]. 2 版. 北京: 中国轻工业出版社, 2020.
- [13] 唐艳红, 王海伟. 食品微生物 [M]. 北京: 中国科学技术出版社, 2013.
- [14] 胡希荣. 食品微生物学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 1990.
- [15] 贾洪锋. 食品微生物 [M]. 重庆: 重庆大学出版社, 2015.
- [16] 江汉湖. 食品微生物学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2005.
- [17] 王淑艳, 袁静宇. 食品营养与检测作业指导书 [M]. 北京: 科学出版社, 2018.