

食品科学与工程实验教学中心视频案例简介

目 录

一、《细菌的革兰氏染色》	1
二、《苹果酒的酿制》	3
三、《牛奶中钙含量的测定》	6

《细菌的革兰氏染色》

一、实验目的

1. 掌握细胞的革兰氏染色方法。
2. 了解革兰氏染色的原理及其在细菌分类鉴定中的重要性。

二、实验原理

革兰氏染色法是 1884 年由丹麦病理学家 C. Gram 所创立的。革兰氏染色法可将所有的细菌区分为革兰氏阳性菌(G^+)和革兰氏阴性菌(G^-)两大类,是细菌学上最常用的鉴别性染色法。

革兰氏染色法的主要步骤是先用结晶紫进行初染;再加媒染剂--碘液,以增加染料与细胞间的亲和力,使结晶紫和碘在细胞膜上形成分子量较大的复合物;然后用脱色剂(乙醇或丙酮)脱色;最后用蕃红复染。凡细菌不被脱色而保留初染剂的颜色(紫色)者为革兰氏阳性菌,如被脱色后又染上复染剂的颜色(红色)者为革兰氏阴性菌。

该染色法所以能将细菌分为 G^+ 菌和 G^- 菌,是由这两类菌的细胞壁结构和成分的不同所决定的。 G^- 菌的细胞壁中含有较多易被乙醇溶解的类脂质,而且肽聚糖层较薄、交联度低,故用乙醇或丙酮脱色时溶解了类脂质,增加了细胞壁的通透性,使结晶紫和碘的复合物易于渗出,结果细菌就被脱色,再经蕃红复染后就成红色。 G^+ 菌细胞壁中肽聚糖层厚且交联度高,类脂质含量少,经脱色剂处理后反而使肽聚糖层的孔径缩小,通透性降低,因此细菌仍保留初染时的颜色。

三、实验仪器及材料

牛肉膏琼脂斜面 28℃培养 24h 的大肠杆菌(*Escherichia coli*)斜面菌种,牛肉膏琼脂斜面 28℃培养 16h 的枯草杆菌(*Bacillus subtilis*)斜面菌种;显微镜;载玻片;香柏油;二甲苯;擦镜纸;吸水纸;染色缸;草酸铵结晶紫染色液;路哥氏(Lugol)碘液;95%乙醇;0.5%番红染色液。

四、操作步骤

1. 涂片

在一张载玻片上加两滴蒸馏水后,分别涂布枯草芽孢杆菌和大肠杆菌(注意涂片切不可过于浓厚)。

2. 固定

将制成的涂片干燥固定，固定时通过火焰 1-2 次即可，不可过热，以载玻片不烫手为宜。

3. 染色

(1)初染 将玻片置于玻片搁架上，加草酸铵结晶紫染色液(加量以盖满菌膜为度)，染色 1-2min。倾去染色液，用自来水小心地冲洗。

(2)媒染 滴加(Lugol)碘液，染 1-2min，水洗。

(3)脱色 滴加 95%乙醇，脱色 20-25s 立即水洗，以终止脱色。

(4)复染 滴加蕃红，染色 2-3min，水洗。最后用吸水纸轻轻吸干。

4. 镜检

干燥后，置油镜观察。被染成紫色者即为革兰氏阳性菌(G^+)；被染成红色者是革兰氏阴性菌(G^-)。

五、注意事项

1. 革兰氏染色成败的关键是脱色时间。如脱色过度，革兰氏阳性菌也可被脱色而被误认为是革兰氏阴性菌；如脱色时间过短，革兰氏阴性菌也会被认为是革兰氏阳性菌。脱色时间的长短还受涂片厚薄、脱色时玻片晃动的快慢及乙醇用量多少等因素的影响，难以严格规定。一般可用已知革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌作练习，以掌握脱色时间。当要确证一个未知菌的革兰氏反应时，应同时做一张已知革兰氏阳性菌和阴性菌的混合涂片，以资对照。

2. 染色过程中勿使染色液干涸。用水冲洗后，应吸去玻片上的残水，以免染色液被稀释而影响染色效果。

3. 选用培养 16-24h 菌龄的细菌为宜。若菌龄太老，由于菌体死亡或自溶常使革兰氏阳性菌转呈阴性反应。

《苹果酒的酿制》

一、实验目的

了解苹果酒酿制原理，学习苹果酒酿制技术。

二、实验原理

苹果酒是一类营养丰富、含酒精度低的上乘饮料。它是用含一定糖分和水分的果汁压汁，经微生物发酵而成。其生化作用，除酒精发酵的主产物外，还有甘油、醋酸、琥珀酸、杂醇油等的形成；同时，陈酿期中，各种酸类与醇类的酯化反应，赋予果酒特殊的香味；果酒中的单宁、色素、果屑微粒及蛋白质（包括酵母尸体）等的氧化和下沉，使酒液澄清、风味增浓。

各种果酒以原料而称名。除坚果外，所有栽培果、野生果均可做酿果酒的原料。本实验以苹果酒为例，学习其酿制方法。

三、实验仪器及材料

菌种 在 7°Be' 麦芽汁琼脂斜面培养基上的葡萄酒酵母 (*S.cerevisae.var ellipsoideus*)；苹果汁培养基（附录一）；7°Be' 麦芽汁培养基；10ml/管、100ml/三角瓶等装置；白糖；食用酒精；亚硫酸；果胶酶；发酵缸；破碎机；果汁分离器等。

四、实验过程

1. 酒母培养

(1) 菌种活化（一级种） 取装有 10ml 苹果汁或 7°Be' 麦芽汁培养基 1 支，按无菌操作法接种葡萄酒酵母菌一环，混匀后置 28~30℃ 下培养 2-5 天（用苹果汁活化菌种时需培养 5 天以上），镜检酵母繁殖良好，无杂菌即可。

(2) 母发酵剂制备（二级种） 在装有 100ml 苹果汁培养基的三角瓶中，接入 1-2ml 经活化的葡萄酒酵母菌液，于 28℃ 下培养 2-3 天，当培养液表面有气泡产生，嗅之有酒香味、取样镜检无杂菌时即可使用。

(3) 生产发酵剂的制备（三级种） 方法与母发酵剂相同，只是采取更大的容器。一般采用 500-1000ml 的三角瓶或卡氏罐，盛装占容积 1/2—3/5 的果汁培养液，灭菌冷却后，按 10% 接种量接入母发酵剂，在 25~28℃ 下培养 24—48 小时，待发酵正常，镜检无杂菌方可使用。

2. 果酒生产

工艺流程：

活化酵母 → 母发酵剂 → 生产发酵剂 → 苹果 → 分选除杂 → 清洗 → 破碎 → 压榨 → 粗果汁 → 发酵 → 皮渣分离 → 后发酵 → 原酒 → 换桶除渣(2-3次) → 贮存陈酿 → 配制 → 贮存 → 澄清过滤 → 装瓶 → 巴氏杀菌 → 封口 → 成品。

操作要点：

(1) 分选 取成熟苹果，除去腐烂、干疤和伤果。

(2) 清洗 清水充分洗涤，除去果皮上的污物、杂质及药剂，以保证原料干净卫生。

(3) 破碎 为易于压榨，提高出汁率，需进行破碎。用破碎机破碎至果块粒度 0.5cm^2 左右，并除去果籽。

由于苹果汁易被自身含有的多酚氧化酶氧化，故破碎时需加 SO_2 还原剂抑制酶活性，同时 SO_2 也具有杀菌、防腐和澄清果汁作用。 SO_2 来源，除工厂应用液态 SO_2 外，实验室常加入亚硫酸(H_2SO_3)和重亚硫酸盐($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ 或 $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_6$)，其用量为果汁量的 0.02%即可。

(4) 压榨分离 破碎后立即进行压榨分离。分离出的果汁中不得夹带果肉，同时需添加适量柠檬酸及单宁调整含量(要求果汁总酸含量为 5g/L ，单宁为 0.5g/L)，并加入 $0.1\text{—}0.15\text{g/L}$ 的果胶酶促进果胶分解，使果汁澄清并提高酒的风味。

(5) 前发酵 取澄清果汁放入经干热灭菌的发酵缸中，装量占缸容积的 $4/5$ ，按 $3\text{—}5\%$ 的接种量接入酵母生产发酵剂进行发酵，保持品温在 $18\text{—}22^\circ\text{C}$ 之间，最高勿超过 25°C ，发酵应在 $7\text{—}12$ 天内结束。一般苹果汁糖分约为 11% ，经发酵后，酒精含量约达 6% 以上，但此酒度仍低，易变质腐败，故需用食用酒精调整酒度。前发酵结束后，原酒度应大于 $13\%(\text{V})$ ，残糖 $<20\text{g/L}$ ，总酸(苹果酸) $>5\text{g/L}$ 。

(6) 后发酵 前发酵结束后，迅速将酒液与皮渣分离，酒汁转入经干热灭菌的发酵缸中，进行后发酵，使残糖继续分解。期间，控制品温在 $18\text{—}22^\circ\text{C}$ 之间，不要超过 25°C ，时间 1 个月，即得原酒。(要求残糖含量小于 2g/L ，挥发酸[以醋酸计]小于 0.6g/L ，总酸[以苹果酸计]大于 5g/L)

(7) 换桶除渣 为使已澄清的原酒与酒脚(沉淀物)及时分离，以免酒脚产

生异味而影响酒质，故需进行换桶（缸）。换桶次数新酒每年换三次。第一次换桶时需添加食用酒精，使原酒酒度达 14 度以上，才能安全存放。

(8) 贮存陈酿 应满桶贮存。陈酿即酒的老熟，经长期密闭贮存，可使酒质澄清、风味醇厚。贮存室温 8~16℃，存期 2 年以上。

(9) 配制 原酒贮存一年半后可开始配制。配制时，按工艺规定将不同原酒按一定配比相混，然后添加适量的糖、酒精，继续贮存半年以上。

(10) 澄清过滤 可采用冷冻法使其澄清，即于-10℃左右存放 7 天，然后冷过滤。澄清后的酒置-5~-7℃下冷冻 3 天不发生混浊沉淀，或暴露空气中氧化 4 天不变混浊即为合格。

(11) 装瓶灭菌 装瓶后需进行巴氏杀菌，即在 70℃下处理 15 分钟，冷却后封口保存。

五、实验报告

1. 简述苹果酒的酿制法。
2. 二氧化硫在果酒酿制中的作用是什么？生产中如何加入二氧化硫？

六、思考题

1. 酵母菌酿酒的原理是什么？
2. 果酒酿制中为何加入果胶酶？

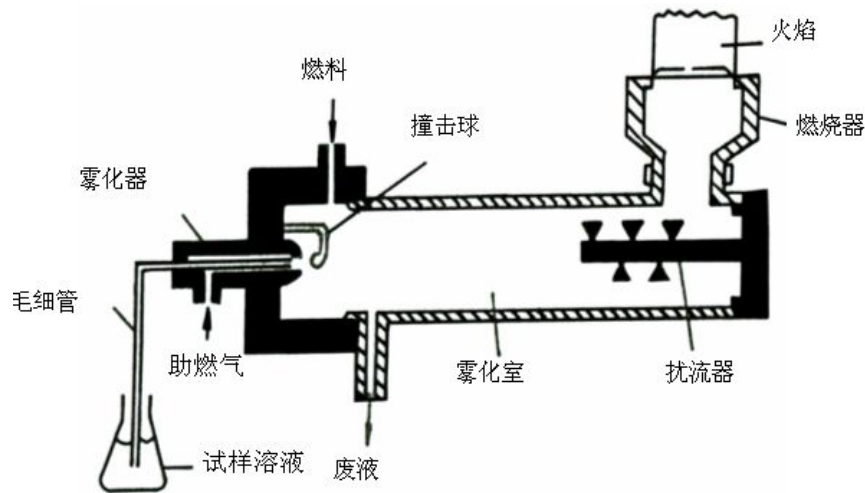
《食品中钙含量的测定》

一、实验目的

1. 学习和了解火焰原子吸收法的测试基本原理。
2. 掌握火焰原子吸收的使用方法及注意事项。

二、实验原理

火焰原子化器：原子化器的功能是提供能量，使试样干燥、蒸发和原子化。入射光束在这里被基态原子吸收，因此也可把它视为“吸收池”。对原子化器的基本要求：必须具有足够高的原子化效率；必须具有良好的稳定性和重现性；操作简单及低的干扰水平等。其结构如下图所示。



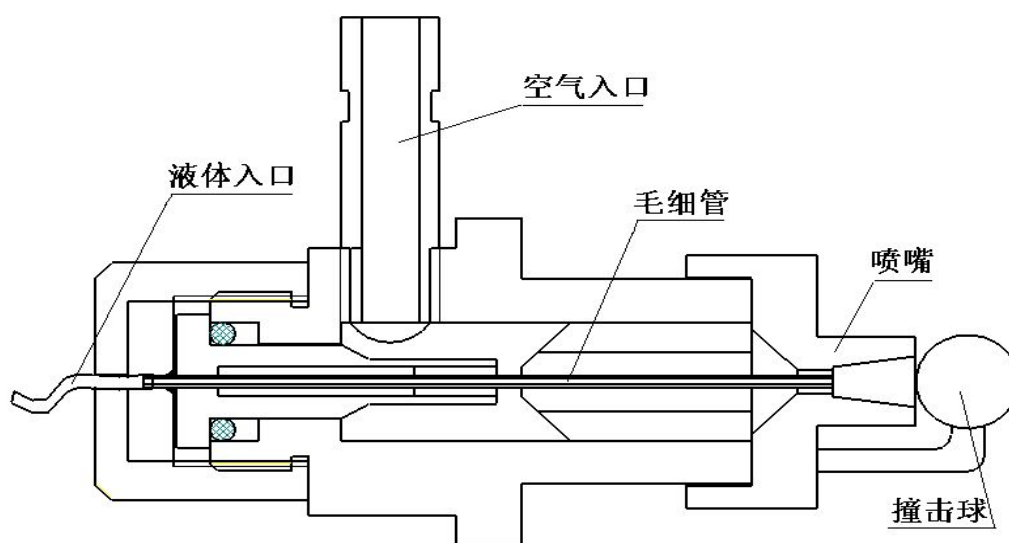
火焰原子化器结构示意图

火焰原子化法中，常用的是预混合型原子化器，它是由雾化器、雾化室和燃烧器三部分组成。用火焰使试样原子化是目前广泛应用的一种方式。它是将液体试样经喷雾器形成雾粒，这些雾粒在雾化室中与气体（燃气与助燃气）均匀混合，除去大液滴后，再进入燃烧器形成火焰。此时，试液在火焰中产生原子蒸气。

雾化器：原子吸收法中所采用的雾化器是一种气压式、将试样转化成气溶胶的装置。当气体从喷嘴高速喷出时，由于伯努利(Bernoulli)效应的作用，在喷嘴附近产生负压，使样品溶液被抽吸，经由吸液毛细管流出，并被高速的气流破碎成为气溶胶。气溶胶的直径在微米数量级。直径越小，越容易蒸发，在火焰中就能产生更多的基态自由原子。雾化器的雾化效率对分析结果有着重要影响。在原子吸收分析中，对试样溶液雾化的基本要求是：喷雾量可调，雾化效率高且稳定；气溶胶粒度细,分布范围窄。一个质量优良的雾化器，产生直径在 5~10 μm 范围

的气溶胶应占大多数。调节毛细管的位置即可改变负压强度而影响吸入速度。装在喷雾头末端的撞击球的作用就是使气溶胶粒度进一步细化，以有利于原子化。

雾化器是火焰原子化器中的重要部件。它的作用是将试液变成细雾。雾粒越细、越多，在火焰中生成的基态自由原子就越多。目前，应用最广的是气动同心型雾化器。喷出的雾滴碰到玻璃球上，可产生进一步细化作用。生成的雾滴粒度和试液的吸入率，影响测定的精密度和化学干扰的大小。目前，雾化器多采用不锈钢、聚四氟乙烯或玻璃等制成。



雾化器结构图

雾化室：雾化室的作用主要是去除大雾滴，并使燃气和助燃气充分混合，以便在燃烧时得到稳定的火焰。其中的扰流器可使雾滴变细，同时可以阻挡大的雾滴进入火焰。一般的喷雾装置的雾化效率为 5 ~ 15%。

燃烧器：试液的细雾滴进入燃烧器，在火焰中经过干燥、熔化、蒸发和离解等过程后，产生大量的基态自由原子及少量的激发态原子、离子和分子。通常要求燃烧器的原子化程度高、火焰稳定、吸收光程长、噪声小等。燃烧器有单缝和三缝两种。燃烧器的缝长和缝宽，应根据所用燃料确定。目前，单缝燃烧器应用最广。

燃烧器多为不锈钢制造。燃烧器的高度应能上下调节，以便选取适宜的火焰部位测量。为了改变吸收光程，扩大测量浓度范围，燃烧器可旋转一定角度。

三、实验仪器及材料

TAS-990AFG 系列原子吸收分光光度计，钙空心阴极灯，钙标准储备液

(1mg/mL)，优级纯硝酸，50mL 容量瓶 6 个，样品瓶 2 个

四、实验步骤

4.1 溶液配制

4.1.1 标准使用液

移取钙标准储备液（1mg/mL）按照 10 倍的体积关系（最大不可超过 100 倍）逐级稀释至 100ug/ml。

4.1.2 标准系列

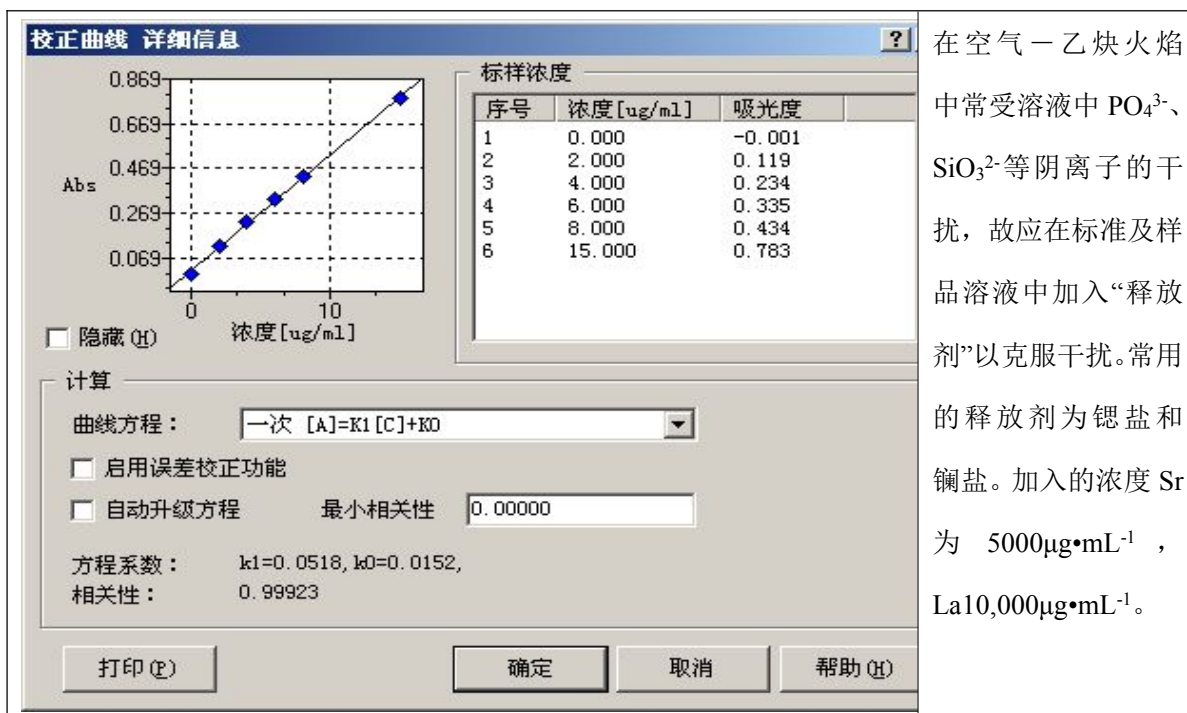
用含量为 100ug/mL 标准使用液按下表配制标准溶液各浓度梯度溶液。

标准系列序号	浓度 mg/L
S0	0.000
S1	5.000
S2	10.000
S3	15.000
S4	20.000

4.2 测试条件的设置

原子吸收测定条件如下图所示：

分析参数：						
波长 (nm)	光谱带宽 (nm)		灯电流 (mA)	滤波系数	积分时间 (秒)	燃烧器高度 (mm)
422.7	0.4		3.0	0.3	3	6
火焰类型		Air (Mpa,mL/min)		C ₂ H ₂ (Mpa,mL/min)		N ₂ O(Mpa, mL/min)
Air-C ₂ H ₂ ,富燃焰		0.20		0.05, 1700		
标准曲线						注意



测试表格

序号	测量对象	样品编号	Abs	浓 度 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$	SD	RSD[%]
1	标准样品	Ca1	-0.001	0.0	0.0003	—
2	标准样品	Ca2	0.119	2.0	0.0003	0.27
3	标准样品	Ca3	0.234	4.0	0.0019	0.82
4	标准样品	Ca4	0.335	6.0	0.0011	0.33
5	标准样品	Ca5	0.434	8.0	0.0022	0.50
6	标准样品	Ca7	0.783	15.0	0.0020	0.26

分析结果：

线性相关系数	特征浓度 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	检出限 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	相对标准偏差
0.9992	0.084	0.017	0.27

注意事项：必须注意分析试剂、器皿及室内环境造成的污染。溶液应保持一定酸度。

4.3 注意仪器能量值的变化，将能量控制在 90%以上。

五、实验注意事项

1. 实验过程中使用的容器均使用 20%的硝酸（优级纯）浸泡过夜，再用去离子水冲洗干净，以防影响实验结果的准确性。
2. 原子吸收分光光度计使用前预热 30 分钟以上。