

# 葡萄酒学实验指导书

袁春龙、刘树文、张艳芳、陶永胜主编

# 目 录

## 葡萄酒卫生学

实验一	显微镜的使用.....	1
实验二	灭菌与消毒.....	6
实验三	培养基的制备.....	11
实验四	微生物接种技术.....	14
实验五	显微镜下直接测数法—血球计数板法.....	18
实验六	细菌的革兰氏染色法.....	20
实验七	细菌培养特征的观察.....	22
实验八	酵母菌的培养及形态、菌落特征的观察.....	24
实验九	乳酸菌的培养及形态、菌落特征观察.....	26
实验十	葡萄酒中常见微生物的形态观察.....	27
实验十一	水质的卫生细菌学检验.....	28
实验十二	微生物的液体检验技术.....	31
实验十三	微生物的表面检验技术.....	33
实验十四	葡萄酒灌装卫生处理.....	34

## 葡萄贮藏加工学

实验一	酶促褐变的观察及防止.....	36
实验二	园产加工中半成品的保藏.....	38
实验三	园艺产品干制.....	39
实验四	园艺产品罐藏.....	41
实验五	园艺产品糖制.....	43
实验六	果品蔬菜制汁.....	46
实验七	果蔬加工品的感官检验.....	48

## 葡萄酒工艺学

实验一	酿酒葡萄成熟度的控制.....	50
实验二	不同澄清剂对葡萄汁的澄清效果.....	52
实验三	酵母的分离纯化与扩大培养.....	53
实验四	酵母菌的发酵性能测定.....	55
实验五	干白葡萄酒酿造.....	57
实验六	干红葡萄酒酿造.....	58
实验七	葡萄酒的苹果酸—乳酸发酵.....	59
实验八	葡萄酒的化学降酸.....	60
实验九	葡萄酒的下胶.....	61
实验十	葡萄酒的稳定.....	62
实验十一	葡萄酒的除铁—蓝色下胶法.....	65

实验十二	葡萄酒病害诊断.....	67
实验十三	葡萄酒的酿造.....	69
实验十四	葡萄酒的过滤和灌装.....	71
实验十五	《葡萄酒学》实习调查提纲.....	73

## 实验一 显微镜的使用

显微镜是一种精密的光学仪器，是学习和研究微生物的重要工具之一。实验室常用的是一种普通光学显微镜，只有了解它的原理和构造，才能正确地使用和充分发挥它的性能，从而得到良好的实验效果，并免于受损。

### 一、目的要求

了解普通光学显微镜的构造和原理，练习并掌握显微镜的正确使用方法，特别是油镜的使用技术与原理。

### 二、光学显微镜的构造和基本原理

#### (一) 光学显微镜的构造

光学显微镜由机械部分和光学部分组成(图 1-1)。

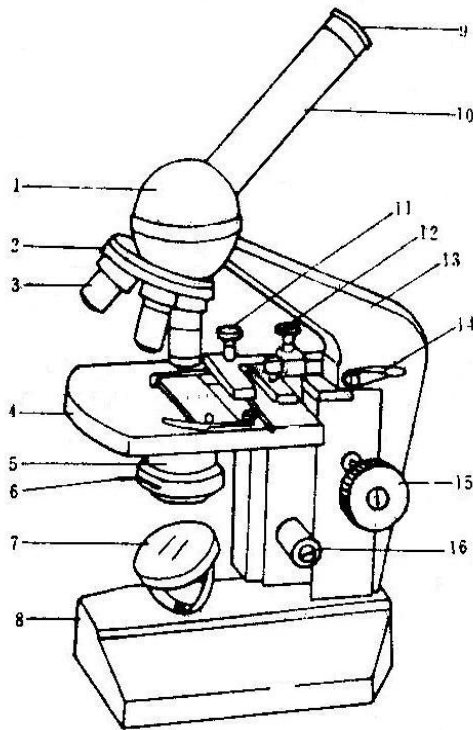


图 1-1 光学显微镜的构造

- |              |          |           |          |          |
|--------------|----------|-----------|----------|----------|
| 1. 棱镜套       | 2. 物镜转换器 | 2. 接物镜    | 4. 载物台   | 5. 聚光镜   |
| 6. 彩虹光圈      | 7. 反光镜   | 8. 镜座     | 9. 接目镜   | 10. 镜筒   |
| 11、12. 标本推动器 | 13. 镜臂   | 14. 粗动限位器 | 15. 粗动螺旋 | 16. 微动螺旋 |

1. 显微镜的机械部分 包括镜座、镜臂、镜筒、物镜转换器、载物台、推动器、粗动螺旋、微动螺旋。

(1) 镜座 即显微镜的底座，使显微镜稳立台面，有的显微镜镜座内装有照明光源及反光镜。

(2) 镜臂 弓形金属物，上接镜筒，下连镜座，可作为移动显微镜的把手。

(3) 镜筒 位于镜臂上方，圆筒形，上端装置目镜，下端连接物镜转换器，形成目镜与物镜间的暗室。一般镜筒多为 45° 倾斜式，便于使用。

(4) 物镜转换器 是由两个金属碟合成的转盘装置，其上安装有 3-4 个不同倍数的物镜，按照放大倍数高低顺序排列，旋转转换器时，物镜可挨个地被推到正确的使用位置上。物镜光轴与目镜光轴同轴，使用时应用手指捏住转换器转盘旋转，不要扳物镜旋转，否则日久易使光轴歪斜，成像质量变差。

(5) 载物台 即安放标本片的方形或圆形的工作台，中央有一通光孔为光线通路。台上装有一对弹簧标本夹或附有标本夹的十字推动器。有的载物台上还有纵横坐标的游标尺，一般读数为 0.1mm，用以测定标本的大小或对被检部分做标记，便于下次镜检。

(6) 推动器 是装在载物台两侧的螺旋或附在载物台上的标本推动器，用作移动标本，寻找物象。

(7) 粗动螺旋和微动螺旋 为得到清晰物像，需调节物镜与标本间的距离，使之与物镜的工作距离相等，这种操作叫调焦。在显微镜的镜臂下后方，装有大、小两个螺旋，大螺旋为粗动螺旋，操作时作快速调焦用。调到隐约可见标本物象为止，然后改用小的微动螺旋做精确调焦，使所观察的标本至最清晰为佳。在微动螺旋的外侧一般刻有刻度，每转一周，镜筒或载物台移动 0.1mm 或 0.2mm(依显微镜型号而定)。当标记达到极限时，可重新用粗动螺旋拉开物镜与标本片的距离，再行调节。

显微镜的调焦装置有镜筒升降式和载物台升降式二种。

2. 显微镜的光学部分 包括反光镜、聚光镜、光圈、接物镜和接目镜。

(1) 反光镜 装在聚光镜下面的镜座上，可以任意方向转动以对准光源。其一面为平面镜，另一面为凹面镜。其作用是使光源发出的光线射向聚光镜。在光线充足时用平面镜，反之用凹面镜。

(2) 聚光镜 位于载物台之下，是由一组透镜组成，作用是起汇聚光线成一束强的光锥，增强标本照明强度。使用时，用聚光镜升降螺旋调节，一般低倍镜观察时，应降低聚光镜位置，使光线减弱；用高倍镜或油镜时，应升高聚光镜位置，使光线增强。

(3) 光圈 也叫虹彩光圈或可见光阑，位于聚光镜下方，由十几张金属薄片组成，中心部分形成圆孔。推动侧面光圈把手，可随意调节大小，以变换通光量。推动调节把手时不可用力过猛，也不要用手指触摸光圈薄片，以免损坏。光圈作用是调节光强度和使聚光镜的数值孔径与物镜的数值孔径相适应，以充分发挥显微镜性能。在用低倍镜镜检时调小光圈，若用高倍镜和油镜时可开大光圈。在光圈下面，有一圆形滤光片托架，便于放置滤光片，供选择某波段的光线用。

(4) 接物镜 简称物镜，安装在转换器上，一般有 3~4 个物镜头。其作用是将标本作第一次放大，然后再由目镜作第二次放大，它是决定显微镜性能最重要的部件，关系到分辨力的高低。

表 1-1 常用接物镜的主要性能参数

接物镜	低 倍 镜		中倍镜	高倍镜		油 镜
放大倍数	8×	10×	20×	40×	45×	90~100×
工作距离(mm)	9.0	7.6	2.0	0.54~0.60	0.4	0.17~0.19
数值孔径(N.A.)	0.20	0.25	0.40	0.65	0.85	1.25

分辨力 (μm)	1.37	1.10	0.68	0.40	0.32	0.22
----------	------	------	------	------	------	------

注：物镜按放大倍数分为低倍镜，即8×、10×；高倍镜，40×、45×、65×；油浸镜(简称油镜)，90×、100×，油镜头上常刻有“HI”(homogeneous immersion)字样标记。

物镜按使用条件不同分为干燥物镜和油浸物镜。用干燥物镜观察标本时，在物镜与标本间不加任何液体介质，光线自标本射出后，经过空气折射再进入物镜；使用油浸物镜时，在标本片与物镜间加入一种与玻璃折射率( $\eta=1.52$ )相近的介质，可以避免光的散射。常用的介质为香柏油(cedar oil)，其折射率 $\eta=1.515$ 。

物镜的放大倍数、数值孔径和工作距离是物镜的主要性能参数(表 1-1)，通常标记于镜头上。如 10 倍物镜上标有 10/0.25 和 160/0.17 字样，10 为放大倍数、0.25 为数值孔径(N.A.)、160 为镜筒长度(mm)、0.17 为要求的盖玻片厚度(mm)。

(5) 接目镜 简称目镜，安装在镜筒上端。作用是将物镜放大的实像再放大形成虚像映入眼帘。其放大倍数有 8×、10×、15×或 16×，字样标记于目镜上，目镜不宜随意取下，以防尘埃落入镜筒。

## (二) 显微镜的基本原理

放大率，显微镜的总放大率等于物镜放大率与目镜放大率的乘积。观察物体时，总希望能看到放大率高且物象清晰的图像，即要求显微镜的分辨力要高。

分辨力(也称分辨率)，指显微镜分辨物体细微结构的能力，或者说分辨物体两点间的最短距离(D)的能力，分辨力的高低，首先取决于物镜的性能，其次为目镜和聚光镜的性能，

其公式如下：

$$D = \frac{\lambda}{2N.A.}$$

$\lambda$ ：可见光的波长(平均为 0.55μm)

N.A.：物镜的数值孔径

上式说明，分辨力与光源波长成正比，与数值孔径成反比，即光波愈短，数值孔径愈大，则分辨力愈高；而可见光的波长为 0.4~0.8μm，平均为 0.55μm，由于光的绕射现象，普通光学显微镜只能分辨等于或大于波长一半的物体，否则，即无分辨力。故需增大物镜的数值孔径来提高显微镜的分辨力。

## (三) 显微镜的保养

1. 显微镜不能在直射阳光下曝晒和靠近热源放置，以免引起透镜破裂或脱落。
2. 显微镜勿与挥发性、腐蚀性的药物(如碘片、酒精、酸类、碱类)同处存放。
3. 显微镜要安放于清洁的室内，注意防尘。再次使用前，应用绒布或绸布擦去机械部分和反光镜的灰尘，镜头则必须用擦镜纸擦拭，做到勿沾任何油迹、污迹和灰尘。
4. 显微镜应注意防潮，箱内防潮的硅胶布袋要定期烘烤干燥，以免失效。
5. 显微镜不准随意拆卸，机械部分应加润滑油，以减少磨擦。
6. 每次使用完毕，各部件复原，使之保持存放状态，即下降聚光镜，开大光圈，反光镜垂直于镜座，下降镜筒并使物镜头呈八字形。

### 三、实验材料

1. 菌种 细菌标本片
2. 显微镜及双层瓶(内瓶盛香柏油，外瓶盛二甲苯或酒精乙醚液(1:3)、擦镜纸、吸水纸。

### 四、实验步骤

#### 1. 取镜

打开镜箱，右手握镜臂，左手托镜座，轻放于实验台上，用绸布或绒布把镜身擦拭干净，但绝对不可用于擦目镜与物镜。

#### 2. 对光

将低倍物镜转至镜筒下方，转动粗动螺旋，使物镜的透镜镜面与载物台距离约 1cm 左右；上升聚光镜，开大光圈，调节反光镜对准光源，从旁观察使聚光镜面非常明亮，再以左眼从目镜中观察，并继续调节反光镜，直至视野内得到均匀明亮的照明为止。

光源中直射阳光不能采用，晴天散射光是良好的光源，实验室宜用 20~30W 的日光灯或 60~100W 的乳白电灯泡为光源。

#### 3. 低倍镜观察

低倍镜镜面大、视野宽，易于发现目标和确定待检位置，故任何被检标本都需先经低倍镜观察。

将标本片置于载物台上(正面朝上)，被检部位用推动器移至物镜正下方。旋转粗动螺旋下降物镜(或升高载物台)至距标本约 0.5cm 处，以左眼看目镜，同时用粗动螺旋反时针方向慢慢升起镜筒(或降低载物台)至视野内出现物象后，改用微动螺旋上下微调至视野内出现清晰物象，并将最好部位推至视野正中央，准备换高倍镜观察。

#### 4. 高倍镜观察

将高倍镜(40×)转至镜筒下方，操作时要从侧面注视，防止镜头与玻片相撞。调节光圈和聚光镜使光线亮度适中。观察时先用粗动螺旋慢慢升起镜筒(或下降载物台)至发现物象，再用微动螺旋调焦至物象清晰为止。仔细观察后，移动最好部位至视野中央，准备换油镜作进一步观察。

#### 5. 油镜观察

细菌或其它标本的细微结构都需要用油镜(90×或 100×)观察。一般油镜工作距离极短(0.19mm 左右)，使用时要特别小心。先用粗动螺旋将镜筒提起(或载物台降低)约 1.5~2.0cm，将油镜头转至镜筒下方，在标本片的镜检部位滴上一小滴香柏油)。眼睛从侧面注视，用粗动螺旋缓缓地将油镜头小心地浸在香柏油中，使物镜前端接近而又未触及标本片为止。这步操作要非常小心，防止发生油镜压破玻片或进一步发生玻片顶坏油镜前透镜的危险。从目镜中观察，先调节光线至明亮，即开大光圈、升高聚光器，用粗动螺旋十分缓慢地升高镜筒(或降低载物台)，直至视野出现模糊物象时，再改用微动螺旋调节工作距离，使物象十分清晰为止。如果上升镜筒时油镜头已离开油面，必须重新从侧面注视，将油镜头再次浸入油中，重复上面操作，直至看到物象为止。

#### 6. 镜检完毕

将镜筒提起，取下载玻片，将油镜镜头转离通光孔，先用一张擦镜纸擦去镜头上的油滴，再取另一张擦镜纸沾取一滴二甲苯，以直线方向擦拭镜头二次，最后再用一张干净的擦镜纸擦去二甲苯残渍。最后将显微镜各部位擦净，并使反光镜、聚光镜、镜筒、物镜等恢复存放状态，盖好绸布，

## 葡萄酒卫生学

放入镜箱，并填写“显微镜使用登记卡”后，锁好箱门。用过的标本片在涂面上滴一滴二甲苯，用吸水纸擦去油污至洁净后，放入标本盒中。

## 五、实验报告

绘出你所观察的细菌形态图 2-3 个，并注明细菌名称及放大倍数。

## 六、思考题

1. 显微镜的构造包括哪几部分？
2. 观察细菌标本时为什么要使用油镜？
3. 简述油镜使用原理。



## 实验二 灭菌与消毒

### 一、目的要求

了解灭菌、消毒的基本原理，学习并掌握实验室常用灭菌器的使用方法和消毒剂的常用浓度、应用范围及使用方法。

### 二、基本原理

灭菌是应用物理或化学的方法杀死物品上或环境中的所有微生物。灭菌后的物品即处于无菌状态。消毒是应用物理或化学的方法杀死物体上绝大部分微生物(特别是病原微生物)。物品经消毒处理后，虽仍有少数微生物未被杀死，但已不致引起有害作用，故消毒实际上是局部灭菌。

在微生物实验、生产和研究工作中，需要进行纯培养，要求不能有任何杂菌。因此，对所用器皿、培养基都需要进行严格的灭菌，工作场所也应进行消毒，才能保证工作进行顺利。

高温可以使细胞原生质变性而失去生命力，因此一般采用加热法进行灭菌和消毒。紫外线有强杀菌作用，常用于工作室的空气消毒。许多化学药剂对细菌有毒害和致死作用，也常用作灭菌及消毒剂。下面介绍几种常用的灭菌和消毒方法。

### 三、实验器材

高压蒸汽灭菌器、干热灭菌器、过滤除菌设备、紫外线灯、酒精灯、常压灭菌器、各种化学消毒剂等。

### 四、实验内容

#### (一) 高温灭菌法

##### 1. 火焰灭菌法

直接用火焰烧灼灭菌，此法迅速彻底。对于接种环、接种针等金属用具，可直接在酒精灯火焰上烧至红热进行灭菌。在接种过程中，试管或三角瓶口，也采用通过火焰达到灭菌的目的。沾污了病菌的残渣、废纸等用火烧掉，都属于火焰灭菌法。

##### 2. 干热灭菌法

利用干燥热空气(170℃)去杀灭细菌的方法称为干热灭菌法。凡不适于用其它方法灭菌而又能耐高温的物品都可用此法灭菌，如玻璃器皿(如吸管及培养皿等)、金属用具等，而培养基、橡胶、塑料制品等都不能用干热灭菌。

干热灭菌的方法，一般是把待灭菌的物品包装就绪后，放入电热干燥箱中烘烤，加热到 160-

170℃，维持 1-2 小时。

玻璃器皿如培养皿、吸管等在灭菌前应洗净、晾干(一定注意干燥，如有水滴，灭菌时易炸裂!)并包装停当。

### 3. 煮沸灭菌法

严格说此法属消毒作用。常用煮沸灭菌法来处理污染了菌类的瓶子、用具等，将其煮沸 30 分钟左右，杀死大部分菌后才能洗刷。一般海拔 1000m，水的沸点为 96.6℃，3000m 则为 90℃，故每升高 300m 延长煮沸 2 分钟为好。

巴氏灭菌法 即采用 60℃加热 30 分钟或 70℃加热 15 分钟的处理方法。灭菌后，立即冷却到 10℃左右，以免降温过程又引起一些微生物感染。这样可杀死其中病原菌和部分微生物繁殖体。此法适用于血清、牛奶、饮料及酱、醋调味品等的消毒处理。

### 4. 常压蒸汽灭菌法

常压蒸汽是指在不能密封的容器里，将水烧开产生蒸汽。在这种情况下，蒸汽的压力未超过大气压力，温度不超过 100℃。在不具备高压蒸汽灭菌设备的情况下，常压蒸汽灭菌是最常用的灭菌方法。另外，一些不宜用高压蒸煮的灭菌物品如糖液、牛奶等培养基的灭菌，应采用常压下间歇灭菌法。

### 5. 高压蒸汽灭菌

高压蒸汽灭菌是灭菌技术中应用最广、效果最好的湿热灭菌法。

(1) 灭菌原理 根据在密闭的环境下，蒸汽温度随压力的增加而提高，压力越大、温度越高的原理。高压蒸汽灭菌是在密闭的高压蒸汽灭菌器中进行的。

在密闭容器中，加热使水产生蒸汽，驱除器内的空气后，使蒸汽不能逸出，这样就增加了灭菌器中的压力。水的沸点和蒸汽的温度随之上升，因而能够获得比 100℃更高的蒸汽温度，用以进行有效的灭菌。一般将灭菌器中压力提高一个气压(1.05 kg/cm<sup>2</sup>)，灭菌 25-30 分钟，此时的温度是 121.5℃，则可达到彻底灭菌的目的。

在使用高压蒸汽灭菌器时，灭菌器内空气是否完全排除极为重要。因为空气的膨胀压大于水蒸汽的膨胀压，故当水蒸汽中含有空气时，在同一温度下所达到的压力高于不含空气的水蒸汽压力，也即在同一压力下的实际温度，含空气的蒸汽低于饱和蒸汽。在空气完全排除的情况下，一般培养基可在 1.05kg/cm<sup>2</sup> 下灭菌 30 分钟即可。但对物体较大或蒸汽不易穿透的灭菌物，如草炭、土壤、固体曲料、食用菌菌袋等，则应适当延长灭菌时间，或将气压提高到 1.4kg/cm<sup>2</sup>，使水蒸汽温度到 126.5℃保持 1-2 小时。

#### (2) 手提式灭菌器使用要点

加水：宜加入适量开水，以缩短预热时间。

装锅：将灭菌物品放在搁架上，不要过满，盖好锅盖。加盖时应先将金属软管插入内筒侧管中，注意盖正，然后将固定螺旋旋紧，打开排气阀。

加热排气：加热后，待锅内沸腾，排气阀有大量蒸汽冒出时，维持 2-3 分钟。如灭菌物品较大或放入不易透气物品时，可适当延长排气时间，务必使空气充分排除，然后关闭排气阀。

保温保压：当压力升到 1kg/cm<sup>2</sup>，温度达到 121℃时，应控制热源、保持压力，维持 30 分钟后，隔断热源。

出锅：当压力表降至“0”处，稍停，使温度降至 100℃以下后，打开排气阀，随即旋开固定螺旋，开盖取物。注意：切勿当锅内压力在“0”点以上、温度在 100℃以上时开启排气阀，否则压力骤然降低，会造成培养基剧烈沸腾而冲出管口或瓶口，污染棉塞，易引起杂菌污染。

保养：灭菌完毕，取出物品，将锅内余水倒出，以保持内壁及搁架干燥。盖好锅盖。

## (二) 紫外线灭菌

紫外线对微生物有致死作用，波长在 260-280nm 之间的紫外线，有很强的杀菌能力。阳光中紫外线并不太强，因为大部分紫外线为空气中云雾尘埃所吸收。阳光照射需要几小时才能取得消毒效果，而紫外线灯近距离(20-30cm)照射 3-5 分钟即可将细菌繁殖体杀死，十几分钟后芽孢也会死亡。

紫外线灭菌在生产实践中应用较广，例如常用紫外线进行空气消毒。电子通过水银蒸汽可产生长为 253.7nm 的紫外光，杀菌力强而稳定，但穿透力不大，一般只能消毒物体表面。接种室、接种箱、手术室、药厂包装室等可安装 30W 灯管，约可照射 9m<sup>3</sup> 空间。灯管以距地面约 2m 为最好，照射前可喷洒石炭酸、煤皂酚溶液等化学消毒剂以加强灭菌效果。普通的小型接种室，按空间容积 2×2×2.5=10m<sup>3</sup> 计算，在工作台上方距地面 2m 处悬挂 30W 紫外线灯一个，每次开灯照射 30 分钟，就能使室内空气灭菌，紫外线对眼粘膜及视神经有损伤作用对皮肤有刺激作用，所以不能在紫外线灯下工作。必要时需穿防护衣帽，并戴有色眼镜进行工作。

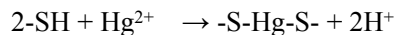
紫外线灯因用途不同而有许多规格及型号，常用于室内空气灭菌的多为直型灯管，220V、30W。带有漏磁变压器(220/550V)的高压紫外线灯，可以避免因电压低而普通紫外线灯往往不能启动的缺点。

## (三) 化学药剂消毒灭菌

微生物实验室中常用的化学杀菌剂有升汞、甲醛、高锰酸钾、酒精、碘酒、龙胆紫、石炭酸、煤酚皂溶液、漂白粉、新洁尔灭等。它们有的是杀菌剂，有的是抑菌剂。

### 1. 升汞

实验室内 0.1% 升汞溶液常用来进行非金属器皿和组织分离材料的表面消毒。0.1% 升汞溶液能在几分钟内杀死细菌的繁殖，其杀菌效力随温度升高而加强。升汞对人畜有毒，使用时应特加注意。升汞具有强杀菌作用，其原理，主要在于 Hg<sup>2+</sup> 可和某些酶的巯基 (-SH) 结合，使酶失去活性，细菌细胞中毒而死亡。



### 2. 甲醛

含有 37-40% 的甲醛溶液，商品名叫福尔马林，是一种强杀菌剂，常用于接种室或培养室的熏蒸灭菌。甲醛熏蒸是利用其挥发所产生的气体。通常用量按每 2-6ml/m<sup>3</sup> 计算。必要时可再加用量。挥发甲醛有两种方法：一种是直接加热法，一种是氧化加热法。

(1) 直接加热熏蒸 按熏蒸空间计算，量取甲醛溶液，盛在小铁筒内，用铁架或砖支好。把酒精灯灌上酒精(估计能蒸干甲醛溶液所需的量，不要超过太多)。将室内各种物品准备妥当后，点上酒精灯，关闭窗门，任甲醛溶液煮沸挥发。酒数灯最好能在甲醛完后即自行熄灭。如室内生有保温的火炉时，可将盛有甲醛溶液的铁筒直接放在炉盖上微火加热，任其蒸发。

(2) 氧化加热熏蒸 在瓷碗里铺上报纸。按甲醛溶液用量的 1/10 称取高锰酸钾(用工业原料品，勿用化学试剂)倒在碗内报纸上，再量取定量的甲醛溶液。室内准备妥当后，把甲醛溶液倒在高锰酸钾上，立即出屋关门几秒钟后，甲醛溶液即沸腾而挥发。高锰酸钾是一种氧化剂，当其与一部分甲醛作用时，由氧化作用产生的热，可使其余的甲醛挥发为气体。

## 葡萄酒卫生学

甲醛熏蒸应在使用前至少 24 小时进行，熏蒸后密闭保持 12 小时以上，再进行处理使用。

甲醛蒸汽对眼粘膜及呼吸道有强烈刺激性，且有致毒作用，经熏蒸后短时间内不能进室内工作。一般可于熏蒸后 2 小时，量取与甲醛溶液等量的氨水，倒入搪瓷盘或广口瓶中，迅速放入熏蒸室内，可以减弱对人的刺激作用。使用氨水中和时，至少应在工作前 2 小时进行。甲醛对微生物有极强的杀伤作用，主要在于甲醛与菌体蛋白质(包括酶)的氨基结合而使蛋白质变性，引起菌体和芽孢的死亡。

### 3. 高锰酸钾

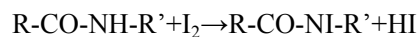
具有强氧化性，是高效的消毒剂。0.1%溶液可作皮肤、水果、器皿的表面消毒剂。2-5%溶液可在 24 小时杀死芽孢，3%溶液能杀死厌氧菌。1%高锰酸钾和 1%盐酸混合液能在 30 秒内破坏炭疽芽孢杆菌。高锰酸钾的杀菌作用在于它可将酶的巯基(-SH)氧化为硫醚键-S-S-，使酶失活，导致菌体和芽孢的死亡。

### 4. 酒精

无水酒精的杀菌力很低，70%的酒精杀菌力最强，10-20%的酒精无杀菌作用，1%酒精只能对某些菌有抑菌作用。酒精对芽孢杀菌作用不大或无作用，但 70%酒精加 1%硫酸或氢氧化钠则可于 1-2 天内杀死枯草杆菌的芽孢。通常 70%酒精用于皮肤消毒，其强的杀菌力在于酒精侵入菌体细胞，解脱蛋白表面的水膜，使它失去活性，引起代谢障碍；同时破坏蛋白质的肽键而使之变性。95-100%酒精杀菌力减弱，其原因在于酒精接触菌体后，立即引起菌体表层蛋白质凝固，形成保护膜，使酒精分子不能继续渗入，故杀菌力反而减弱。

### 5. 碘酒

1%碘酒 10 分钟内可杀死芽孢和真菌。碘酒通常用于皮肤消毒。碘酒的杀菌机制是：I<sub>2</sub>和菌体蛋白质的氨基结合，使菌体蛋白质和酶受到破坏，代谢机能发生障碍而死亡。其反应如下：



### 6. 龙胆紫(或结晶紫)

2-4%龙胆紫(紫药水)常用于浅皮创伤消毒，也可用来治疗鹅口疮。其杀菌作用机制是：由于脱水或由于它的阳离子和细胞的阴离子结合，破坏菌体的正常代谢；或由于抑制细菌细胞壁的合成作用使细菌死亡。

### 7. 石炭酸(苯酚)

白色或粉红色结晶，加温到 50℃即溶化成透明液体。配成 3-5%的水溶液，是一种常用的消毒剂。一般用于接种室内喷雾，对桌面、地面和墙壁的消毒。吸过菌液的吸管、加过菌液的血球计数板等玻璃器具，应先浸于 5%石炭酸溶液中，经 5 分钟后取出，再行冲洗吹干。石炭酸有较强的腐蚀性，使用时应注意勿沾着皮肤，更不能用来洗手。

### 8. 煤皂酚溶液(来苏儿)

煤皂酚溶液是微生物实验室中常用的消毒剂，但在水中的溶解度低，如和肥皂制成乳浊液，可以增强其悬浮性及吸附性，杀菌作用即大为提高。商品“来苏儿”就是含有 5%煤皂酚水溶液。再用来配制成 1-2%水溶液(按煤皂酚液计算)，常用于无菌操作前洗手消毒(浸泡 2 分钟)或用于室内喷雾消毒。也可用 3%溶液浸泡用过的吸管等玻璃器具(浸泡一小时)以进行消毒。

### 9. 漂白粉

为次氯酸钙盐，写作 Ca(OCl)<sub>2</sub>，商品出售的漂白粉为灰白色粉末，有氯气臭味。加水分解生成次氯酸(HOCl)，有较强的杀菌作用。适用于接种室和发酵室的墙壁、曲盘、曲架以及其它培养器具的洗刷灭菌。通常使用 2-5%的水溶液。新鲜而标准的漂白粉，含有 25-35%的有效氯。因有效氯极

## 葡萄酒卫生学

易挥发而失效，所以盛漂白粉的容器一定要密封，存放时间过长，则往往失效；配制漂白粉溶液，也应随配随用，不能久放。

漂白粉的杀菌力是由于它在分解时放出氯气和新生态氧[O]。[O]和Cl<sub>2</sub>的联合作用，可使细菌和病毒很快死亡。

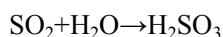
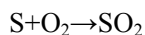
### 10. 新洁尔灭 化学名称是十二烷基二甲基苯甲基溴化铵

主要用于皮肤表面、医疗器械、器皿、接种室、空气等消毒灭菌。一般用0.1-0.25%的溶液，即对无芽孢病原菌、革兰氏阳性菌及阴性菌、霉菌等具有强杀菌作用，对革兰氏阳性菌杀菌力更大。

新洁尔灭是季铵盐类表面活性。多集中作用于菌体表面，通过阳电荷和阴电荷结合，破坏菌体外膜结构引起菌体蛋白变性，致使菌体死亡，由于革兰氏阳性菌比阴性菌所带的阴电荷多，所以更容易被杀死。

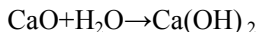
### 11. 硫磺(S)

市售土硫磺具有强的杀菌作用，适用于发酵室、接种室、接种箱的消毒。用量按室内空间3-5g/m<sup>3</sup>计。置硫磺于瓷碗或铁质容器内。加入少量引火材料如锯末、棉花、煤油等，点火后，使燃烧烟雾弥散于密闭的空间，达到熏蒸消毒目的。熏蒸时，室内喷水或借火炉蒸发水汽，可提高熏蒸效果。其杀菌机理是硫磺燃烧形成的SO<sub>2</sub>，遇水生成亚硫酸，使细胞脱氧而死亡。



### 12. 石灰水

2-3%的石灰水，2小时内可杀死生活细胞。适用于发酵室的墙壁、地面消毒。其杀菌作用是生石灰(CaO)与水作用生成熟石灰[Ca(OH)<sub>2</sub>]，具杀菌作用。



但熟石灰久贮空气中吸收CO<sub>2</sub>而生成CaCO<sub>3</sub>，即无杀菌作用。应用时需注意。

### 13. 环氧乙烷

环氧乙烷能破坏细胞蛋白质的活性基团，-COOH，-NH<sub>2</sub>，-OH，-SH等。宜用于精密仪器(如显微镜镜头，照像机等)的生霉处理及手术器械、滤膜等消毒灭菌。灭菌时，将仪器放入密闭容器中，充入环氧乙烷，密闭8小时左右即可，环氧乙烷有毒，常温下为无色气体，沸点104℃，易燃易爆，使用时应注意安全。

## 五、实验报告

1. 如何进行培养基的灭菌?
2. 微生物分离前所用实验用品各应采取什么方法灭菌?

## 六、思考题

1. 为什么干热灭菌比湿热灭菌的温度高、时间长?
2. 在什么条件下，压力表上的压力和温度才有一致的关系?

## 实验三 培养基的制备

### 一、目的要求

了解培养基的配制原理，掌握常用培养基的制备过程及方法。

### 二、基本原理

经人工配制适合微生物生长发育的营养基质称为培养基。良好的培养基应具备合理配比的各种营养物质，适宜的 pH 值和一定的缓冲能力，一定的氧化还原电位和合适的渗透压。

按照成分，培养基可分为天然培养基和合成培养基。前者应用的是化学成分不全了解的植物性或动物性的材料，如马铃薯、麦芽汁、豆芽汁、牛肉膏、蛋白胨等；后者是由已知成分的纯化学药品配成的。此外还有与二者掺和配制的半合成培养基。

培养基可做成液体、固体和半固体。在液体培养基中加入凝固剂，即可制得固体与半固体的培养基。常用的凝固剂是琼脂(也叫洋菜)。它是由海藻中的石花菜加工制成的藻胶。其成分主要为多糖类物质，少量的 CaO, MgO, 性质较稳定，一般微生物不能分解利用。它是一种可逆胶体，加热至 96℃ 以上时呈溶胶状态，降温冷却到 42℃ 以下时，则凝结成为固体。所以琼脂是微生物实验技术上理想的凝固剂。其加入量一般为 1.5-2%，半固体的加入量为 0.3-0.8%。

培养基用于微生物的分离、纯化、培养、保存和鉴定菌种等方面，学会培养基的制备是微生物工作中最基本的技术之一。

本次实验是微生物分离、培养、测数的准备工作内容。下面提供常见微生物分离用的常规培养基成分与制作方法，同时一并完成分离微生物所需用的器皿等其它准备工作。

### 三、实验材料

1. 药品 牛肉膏、蛋白胨、食盐、可溶性淀粉、蔗糖、豆芽汁、麦芽汁、1%的  $K_2HPO_4$ 、 $KH_2PO_4$ 、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、NaCl、KCl、 $NaNO_3$ 、 $KNO_3$ 、 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  等盐溶液，10%NaOH、10%HCl、琼脂。

2. 器材 小铝锅、烧杯、150ml 与 250ml 三角瓶、9cm 培养皿、1ml、10ml 吸管、刻度量杯、量筒、牛皮纸、硫酸纸、旧报纸、棉花、线绳(或橡皮圈)，pH 试纸、玻璃珠、托盘天平、角匙、玻璃棒、试管架、铁丝筐等。

### 四、实验步骤

制备培养基的基本程序：

药品称量→加水溶解→调 pH 值→分装→塞棉塞→包扎→灭菌。

## 葡萄酒卫生学

### (一) 分离用培养基制备

#### 1. 牛肉膏蛋白胨琼脂培养基(培养细菌用)

牛肉膏	3.0g
蛋白胨	10.0g
食盐	5.0g
琼脂	18—20g
自来水	1000ml

用 NaOH 调节 pH 为 7.0-7.2, 1kg/cm<sup>2</sup>(121℃)下灭菌 30 分钟;

制备方法:

(1) 在小铝锅中加入定量的(150ml)自来水, 于锅内壁贴湿纸一条。使纸条下端与液面相接, 即为液面高度的标记, 在电炉或酒精灯上加热。

(2) 称取琼脂, 用水洗净后(或不洗), 放入锅中煮沸, 用玻璃棒不断搅拌以免糊底烧焦。注意勿溢出锅外, 加热至琼脂完全溶化。

(3) 用一小片称样纸(或表面皿)称取牛肉膏, 连称样纸一起投入水中, 待药溶解后捞出, 称样纸弃去。另取一张称样纸称取蛋白胨、食盐放入锅中, 加热溶解、搅匀, 并加水补足因蒸发而失去的水分。

(4) 用玻璃棒蘸取培养基少许, 以 pH 试纸测定酸碱度。必要时以 10%NaOH 调整至 7.0-7.3。

(5) 趁热用漏斗分装入 15×150mm 试管中, 每管 4-5ml(做斜面用), 共装 6-8 支, 剩余培养基装入 150ml 三角瓶中(供分离用)。分装时, 勿使培养基沾污管口或瓶口, 以免浸湿棉塞, 引起杂菌污染。

(6) 分装完毕, 塞上棉塞, 包牛皮纸一层或旧报纸两层, 用线绳或橡皮圈扎紧(试管成把包扎), 以防灭菌时凝结水浸湿棉塞, 或存放时棉头易沾灰尘和杂菌。包扎好后, 做好标记, 置高压蒸汽灭菌锅中, 在 1kg/cm<sup>2</sup>(121℃)下, 灭菌 30 分钟。灭菌完毕, 将制作的斜面培养基试管, 趁热摆成斜面, 斜面长度以不超过试管长的 1/2 为宜。待培养基冷凝后, 挂好标签, 注明名称, 制作日期等, 及时收藏于清洁处备用。

(7) 棉塞制作 棉塞起着过滤空气作用, 避免杂菌污染培养基。制作时, 取普通棉花一小块置左手心中铺平, 大小、厚度适中, 然后以左手食指和拇指握成拳眼, 将棉花移至拳眼处, 以右手食指将棉花从中心压入拳眼, 随即换入右手握紧, 左手持试管右手持棉塞, 将棉塞以顺时针方向旋入试管中。要求棉塞紧贴管壁, 不留缝隙; 松紧适中, 手提棉头, 试管不掉, 又易转动; 深浅适度, 总长约 1.5cm, 1/3 在管外, 2/3 在管内, 头部园形, 略大。

#### 2. 豆芽汁蔗糖琼脂培养基(培养霉菌、酵母菌用)

豆芽汁	1000ml
蔗糖	20.0g
琼脂	18-20g

pH7.2 1kg/cm<sup>2</sup> 灭菌 30 分钟。

(注: 分离真菌时, 于临用前加入 0.3%的灭菌乳酸, 使 pH 降为 4.5)

制备方法:

(1) 豆芽汁制作 称取洗净的黄豆芽 200g, 加水 1000ml 煮沸半小时, 纱布过滤, 取汁液、加水补足总量备用。

(2) 量取豆芽汁一份, 放入三角瓶中, 加入蔗糖、琼脂, 调 pH, 加棉塞, 包扎, 灭菌。

## (二) 分离用其它物品的准备

### 1. 称样纸

用旧报纸或白光纸(必要时用硫酸纸)裁成 6cm<sup>2</sup> 大小的称样纸, 用报纸包裹, 湿热灭菌备用。

### 2. 无菌水瓶、水管的准备

量取 90ml(或 99ml, 或 100ml)自来水, 放入 250ml 的三角瓶中, 必要时加入玻璃珠约 30-40 粒, 加棉塞(下端最好垫一张玻璃纸或聚丙烯薄膜), 包扎, 灭菌备用。取 18×150mm 试管 5-7 支, 用 10ml 刻度吸管加入自来水 9ml, 加棉塞, 捆把包扎、湿热灭菌备用。

### 3. 无菌培养皿、无菌吸管、无菌玻璃刮铲等的准备。

(1) 取 9cm 培养皿若干副(按分离需要计算), 每 6 副为一包, 用报纸包裹, 干热灭菌备用。

(2) 取 1ml 吸管若干支、用尖头镊子由管口塞入少许普通棉花至深度 1cm 处, 然后逐个用报纸条包裹。注意两头包被严实, 不留破口, 捆扎。若用量多时, 可分为 5—10 支一包, 干热灭菌备用。

(3) 取玻璃刮铲若干个, 同法逐个用报纸包裹, 干热灭菌备用。

(4) 取称样勺和其它用具同法包裹, 干热灭菌或湿热灭菌备用。

## 五、实验报告

1. 小结微生物分离培养前的全部准备工作。
2. 分析你分离用的培养基各成分的作用, 指明适于培养何种营养类型的微生物。

## 六、思考题

1. 培养基配制的基本原则是什么?
2. 为什么管口、瓶口均要加塞棉塞?制作棉塞的方法、要求是什么?
3. 斜面培养基如何制作?分装时应注意什么问题?
4. 分离真菌时, 为何在临用前才能向培养基中加入灭菌乳酸进行酸化?



## 实验四 微生物接种技术

### 一、目的要求

了解微生物工作的基本接种法，建立纯培养技术中的“无菌”概念，掌握无菌操作技术。

### 二、基本原理

接种是微生物学实验技术中最基本的操作，即把已获得的纯种微生物，于无菌条件下移植于新鲜的无菌培养基的过程。在微生物的菌种保藏、分离培养、鉴定菌种，以及形态、生理等研究，都必须进行接种。接种时，接种者须有强烈的无菌概念，才能做到严格的无菌操作。无菌概念指的是严防外界杂菌侵入研究体系的思想概念。

无菌操作即防止外界杂菌污染，保证纯培养的技术操作。若操作不慎，污染杂菌，将导致实验失败或损坏菌种。

常用的接种工具有接种环、接种针、吸管、滴管、玻璃刮铲等；常采用的接种方法有斜面接种、液体接种、穿刺接种和平板接种等。

### 三、实验器材

1. 菌种 葡萄球菌、酵母菌，醋酸菌，大肠杆菌斜面菌种。
2. 器材 牛肉膏蛋白胨琼脂培养基(斜面、液体、柱状、平板等)，豆芽汁蔗糖琼脂培养基，接种环(针)，酒精灯。

### 四、实验步骤

#### (一) 接种工具准备常用的几种工具

1. 接种针、接种环、接种钩等由金属丝和柄组成。金属丝要求软硬度合适，传热和散热快，不易氧化。一般常用铂金丝、镍丝，也可用直径 0.5mm 左右的细电炉丝、铅丝代替。柄常用铝棒和胶木棒做成(市面有售)，也可用车条、玻璃棒代替，最简易的制法是：

用长 20cm、直径 0.6cm 的细玻璃棒一根，将一端用火焰烧红，迅速插入一根长 7-8cm 的细电炉丝，立即离开火焰，使其慢慢冷却，然后制成接种针、接种钩或接种环，环的直径一般为 0.5cm 左右，且必须封闭。

2. 玻璃刮铲 用直径 0.5cm 的玻璃棒烧灼弯曲而成。用纸包裹严实，干热灭菌备用。

3. 吸管 在干燥洁净的吸管上端 1-2cm 处，用尖头镊子塞入少许普通棉花(以防接种时将细菌吸入口中，或将口中细菌吹入管内)，达到过滤除菌目的。用纸条包裹，干热灭菌备用。

4. 滴管 用纸条包裹，干热灭菌备用。

### (二) 接种方法

#### 1. 斜面接种法

把各种培养条件下的菌，接入斜面上(包括从试管斜面、培养基平板、液体纯培养物等把菌移于斜面培养基上)。这是微生物学中最常用、最基本的技术之一。接种前，需在待接试管上贴好标签，注明菌名及接种日期。接种最好在无菌室或无菌箱内进行，若无此条件，可在较清洁密闭的室内进行。室内应事先消毒，桌面要清洁，除去灰尘和杂物，用5%来苏儿溶液擦洗桌面。本次用试管斜面菌种接入新鲜的斜面培养基进行练习，其基本操作方法及注意事项：

① 点燃酒精灯，灯焰周围的空间为无菌区，所以，在酒精灯火焰旁进行无菌操作法接种，可避免杂菌污染。

② 将菌种及接种用的斜面培养基(即两支试管)同时握在左手中，使中指位于两试管之间。管斜面向上，两试管之口平齐，两管处于接近水平位置，用右手的小指，无名指及手掌，在火焰旁同时拨去两支试管的棉塞，并使管口在火焰上通过，以烧去管口之杂菌。随后管口移至火焰近旁约1-2cm处。

③ 右手拿接种环，先垂直、后水平方向把接种环放在火焰上灼烧。凡在进入试管的部分均应通过火焰灼烧，顶部的环必须烧红，以彻底灭菌。灼烧时，应把环放在酒精灯之外焰(氧化焰)上，因外焰温度高，易于烧红。

④ 将烧过的接种环伸入菌种管内，先使环接触斜面上端的培养基或管壁，使接种环充分冷却，待培养基不再被接种环融化时，即可用环伸向斜面中部蘸取少量菌体，然后小心将接种环从试管内抽出。注意不能让环接触管壁和管口，取出后，接种环不能通过火焰，在火焰旁抽出迅速伸入新培养基管内，在斜面下1/5处，由下至上轻轻划线。注意不要把培养基划破，也不要使菌沾在管壁上。此过程要求迅速、准确完成。

⑤ 接种完毕，试管口须迅速通过火焰灭菌，在火焰旁塞入棉塞。注意不要使试管离开火焰去迎棉塞，以免进入带菌空气。操作中如不慎棉塞着火，只要迅速塞入试管内，由于缺氧火自然就会熄灭。若棉塞外端仍然着火，也不要用手吹，迅速用手捏几下棉塞，即可熄灭。

⑥ 划线完毕，接种环要灼烧灭菌，才能放回原处，以免污染环境。放回接种环后，再进一步把试管的棉塞塞紧。置于28℃以下培养2—3天，进行观察。

#### 2. 液体接种法

是将纯种微生物接入液体培养基的方法。在测定微生物生理特性及其代谢产物以及进行扩大培养时，常需将菌种接在液体培养基内进行培养。以下介绍从斜面及从培养液中把菌接入液体培养基的方法。

① 由斜面接入液体培养基中 其无菌操作过程与接入斜面的步骤基本相同。但此时所拿的装有液体培养基的三角瓶或试管不能放平，管口要略向上倾斜，以免培养液流出。在火焰旁拨出棉塞后，用接种环在固体斜面上蘸取少许菌种，同样要迅速移入液体培养基中，但无需把接种环伸至培养液之底部，而是把带菌的接种环在液体表面与试管壁交界处轻轻摩擦几下即可。某些不易产生孢子的放线菌或真菌，在培养基上由于菌丝交织生长形成皮膜状培养物，用接种环不易挑起，可用接种铲或钩进行移接。

② 以菌液接入液体培养基中 用液体培养物进行转接时，其操作过程与斜面接种基本相同。不同点在于不用接种环，而要用无菌的滴管或吸管进行接种，吸管等要事先灭菌。接种时用吸管从液体菌中吸取一定量菌液(吸入量之多少可按需要而定)，接入液体培养基中，塞紧棉塞即可培养。

根据接种需要也可用斜面制成菌悬液或孢子悬液，再接入液体培养基中。制作悬液的方法如下：在固体斜面上加入 1~数毫升无菌水，用接种环把斜面上的菌体或孢子洗下，混匀即成悬液。混匀的方法一般是采用振荡法或手搓法。

液体接种中所用的吸管用毕后，要注意不能随便放在工作台上，以免污染环境。可先把吸管放在吸管架上或高型玻璃筒中，工作完毕，再进行灭菌、清洗。

### 3. 穿刺接种

即把菌种接入柱状培养基的方法。经常应用的是半固体柱状培养基。此法可用于测定细菌的运动能力。例如，具鞭毛细菌接种培养后，在培养基内可见到沿穿刺线位置向边缘扩散，生长成波浪形的混浊形状；也可用于测定菌的生长与氧的关系，若此种微生物属好气性，则只在培养基上部生长，只见穿刺之上部变混浊；若属厌气性，则只见穿刺之下部变混浊，若属兼性厌气性，则沿着整条穿刺线均可见混浊，此外穿刺接种法还可用于菌种保藏等方面。其接种方法同前，只是不用接种环而用接种针接种。接种时，用接种针蘸取少量菌体后，直接从培养基中间插入，直插到接近管底但不要穿透培养基，再慢慢按原接种线拔出接种针。切勿搅动以免使接种线不整齐而影响观察，甚至会因用力搅动造成空隙太大进入空气，使结果不准确。接种完毕，试管放入试管架置 28℃ 下培养 2-4 天，观察结果。

### 4. 平板接种法

即用接种环将菌种接至平板培养基上。或用吸管接种定量的菌液至平板培养基上，再用无菌刮铲刮匀，然后培养。观察菌落形态、分离纯化菌种、活菌计数等常采用此方法。

根据实验的不同要求，可分为以下几种接种法。

#### (1) 斜面接平板

① 划线法 用接种环以无菌操作法从斜面菌苔上挑菌少许或以菌悬液接种。方法是用左手托培养基平板，以拇指和食指夹住皿盖两侧，其余三个手指托住皿底，拇指稍向上掀盖即可打开一缝隙。右手把已取好菌的接种环迅速由缝隙伸入平板内，在培养基一侧作第一次平行的(或连续的)划线。约划 4—5 条，然后取出接种环灼烧，左手随即将皿盖合上。并将皿向右转 60 度角，再按上法做第二次划线。划线时接种环须通过第一次划过的一条或二条线，即示稀释第一次接种的细胞，约划 3—4 条，再转平皿约 60 度角，灼烧接种环后再作第三次划线。同法亦可做第四次划线。接种完毕，灼烧接种环。将皿倒置于 28℃ 培养 2—3 天。

② 点接法 一般观察霉菌或酵母菌的较大菌落时多采用。方法是用接种环取菌体后，于平板上以三点的形式接种。由于霉菌孢子轻，易飞扬，宜先配成孢子悬浮液，再进行接种。

(2) 液体接平板 即用灭菌吸管或滴管吸取定量的菌液接至平板培养基上，然后用无菌刮铲涂匀后，倒置 28℃ 温度下培养。此法用于微生物的分离、测数。

(3) 平板接斜面 将平板上分离得到的单菌落，按无菌操作法分别移接到斜面培养基上以保存菌种。接种前，先选好典型单菌落，做好标记。以左手托住培养皿，并用拇指与食指掀起皿盖成缝隙，将灼烧过的接种环伸至菌落边的空白培养基处接触冷却，然后，挑菌后移出接种环(靠近火焰无菌区)，左手放下培养皿，换拿一支斜面培养基按斜面接种法进行接种。接种完毕，置 28℃ 下培养 2—3 天观察结果。

## 五、实验报告

记录几种接种操作练习的实验结果。

## 六、思考题

1. 何谓无菌操作与无菌概念?二者有何关系?
2. 总结几种接种技术的要求及注意事项。

## 实验五 显微镜下直接测数法—血球计数板法

### 一、目的要求

了解血球计数板的构造、原理和计数方法，掌握显微镜下直接计数的技能。

### 二、基本原理

血球计数板测数，一般适用于含菌体较大的单细胞的悬浮液，如酵母菌、霉菌孢子等，若有杂菌或杂质，则较难辨认。对个体小的细菌也不易辨清，则需采用彼德罗夫—霍瑟(Petroff—Hausser)细菌计数板，可在油镜下计数。

血球计数板的构造和使用原理：

血球计数板为一特制的厚型载玻片，在其中部有三条玻璃台(a, b, a')，b台上刻有一对每边长1毫米的大方格，大方格各边分为20等分，因此一平方毫米的大方格，等分为400个小方格，a, a'台比b台高出0.1mm，所以加盖玻片后，从盖玻片到b台台面之高度(即液层深度)也是0.1mm，由以上数据可得出：

$$\text{大方格面积} = 1\text{mm} \times 1\text{mm} = 1\text{mm}^2$$

$$\text{大方格体积} = 1\text{mm}^2 \times 0.1\text{mm} = 0.1\text{mm}^3$$

$$\text{一个小方格体积} = \frac{0.1}{400} \text{mm}^3 = \frac{1}{4000} \text{mm}^3$$

$$\text{已知：} 1\text{ml 体积} = 10\text{mm} \times 10\text{mm} \times 10\text{mm} = 1000\text{mm}^3$$

$$\text{所以，} 1\text{ml 体积中应含有小方格数} = \frac{1000\text{mm}^3}{\frac{1}{4000} \text{mm}^3} = 1000 \times 4000 = 4 \times 10^6 \text{ 个小方格}$$

$$\text{即系数 } K = 4 \times 10^6$$

$$\text{因此，} 1\text{ml 菌悬液中含有细胞数} = K \times d \times \bar{N}$$

$$\text{式中：} K: 4 \times 10^6$$

d: 菌液稀释倍数

$\bar{N}$ : 一个小方格中细胞平均数。

由上可知，用血球计数板在显微镜下直接测数时，首先数出一个小方格( $\frac{1}{4000} \text{mm}^3$ )均质菌液中的细胞数，然后根据公式求得1毫升菌液中的细胞数。

### 三、实验材料

1. 测试样品 酵母菌液或细菌悬液。

2. 器材 血球计数板, 盖玻片(22×22 毫米), 无菌滴管, 吸水纸, 擦镜纸, 显微镜等。

## 四、实验步骤

### 1. 准备工作

(1) 取血球计数板一块, 用无菌滴管吸取摇匀的菌悬液少许, 滴在 b 玻璃台网格上, 不要使 a, a'玻璃台沾上菌液, 以免加盖玻片后, 造成 b 台上液层深度的误差。

(2) 取干净的盖玻片一张, 盖在 a, a'玻璃台上, 勿使产生气泡, 使多余的菌液流入 a, b 和 a'b 玻璃台间之液槽内, 静置数分钟, 使菌细胞沉积于平面上。

### 2. 镜检测数

(1) 将血球计数板置载物台上夹稳, 先用低倍镜找到方格位置, 再用高倍镜测数, 由于生活细胞的折光率 and 水的折光率相近, 观察时应减弱光亮度。

(2) 在高倍镜下, 观察五个视野, 每个视野任意计数五个小方格内之细胞数。位于小方格四边的压线细胞, 只计两边, 另两边不计; 对于出芽的酵母, 以芽体与母细胞接近大小时, 按二个菌体计数。然后求出一个小方格的细胞平均数。在观察时, 应充分运用微动螺旋, 以便观察到处于不同液层的细胞, 以减少误差。

(3) 测数完毕, 取下盖玻片, 用清水把血球计数板冲洗干净, 用吸水纸轻轻吸去台上附着的水分, 再用擦镜纸小心地吸干计数板, 注意勿使网格受到磨损, 然后放入盒内保存。

### 3. 计算

将  $N$  值代入公式, 求出 1ml(g) 菌液中的细胞数。

## 五、实验报告

计算并报告所测样品每毫升(克)的含菌数。

## 六、思考题

1. 系数 K 值是如何求得的?
2. 血球计数板的显微镜直接测数法有何优缺点?

## 实验六 细菌的革兰氏染色法

### 一、目的要求

了解革兰氏染色的原理，掌握革兰氏染色的方法以鉴别细菌。

### 二、基本原理

革兰氏染色法是细菌学中一种重要的鉴别染色法。其方法是，细菌涂片先经结晶紫初染，加媒染剂碘液处理，再以脱色剂酒精脱色，最后用复染剂番红复染。若细菌不被脱色而保留紫红色者，称为革兰氏阳性菌或正反应( $G^+$ 表示)；若被脱色而染上复染剂的粉红色者，称为革兰氏阴性菌或负反应( $G^-$ 表示)。革兰氏染色常受菌龄、培养基的 pH 和染色技术等的影响，一般采用幼龄菌为宜。

革兰氏染色机理虽然至今还不完全清楚，但显然与两类细菌的细胞壁成分和结构有密切关系。革兰氏阴性菌的细胞壁中含较多的类脂质，而肽聚糖含量较少。当用酒精脱色时，类脂质被溶解，从而增加了细胞壁的通透性，使初染后的结晶紫与碘的复合物易于渗出，结果细胞被脱色，经复染后则呈现复染液的颜色。而革兰氏阳性菌细胞壁中肽聚糖的含量多且交联度大，类脂质含量少，经酒精脱色时，肽聚糖层的孔径变小，通透性降低，因而细胞仍保留初染时的颜色。

### 三、实验材料

1. 菌种 培养 24 小时的大肠杆菌(*E.coli*)和金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)。
2. 器材 结晶紫染色液，路哥(Lugol)氏碘液，95%酒精，番红或石炭酸复红染色液，载玻片，接种环，酒精灯及其它染色、镜检用物。

### 四、实验步骤

革兰氏染色的程序为：涂片 → 干燥 → 加热固定 → 冷却 → 结晶紫初染 → 水洗 → 碘液媒染 → 水洗 → 酒精脱色 → 水洗 → 番红复染 → 水洗 → 干燥 → 镜检。

1. 涂片、固定 取干净载玻片一张放在染色架上，分别在载玻片的两处各滴 1 小滴蒸馏水，按无菌操作法用接种环分别取大肠杆菌与葡萄球菌少许，各涂于一处的水滴内(作好标记)，涂匀、干燥、加热固定。

2. 染色 待涂片冷却后染色。先滴加结晶紫染色 1 分钟，用水冲去染液，控净水，再滴加碘液媒染 1 分钟，倾去碘液，水洗后，以 95%酒精脱色 20—30 秒(严格掌握时间)，水洗，最后滴加番红复染 2—3 分钟(或用石炭酸复红复染 30 秒)，水洗后，干燥。

3. 镜检 先用低倍镜寻找标本清晰部位，再换油镜观察细胞形态及染色结果。

## 五、实验报告

绘出油镜下的细胞形态图，注明细胞颜色，说明染色反应。

## 六、思考题

1. 革兰氏染色法哪一步最关键?为什么?
2. 革兰氏染色法为何要求用幼龄细胞进行染色?



## 实验七 细菌培养特征的观察

### 一、目的要求

学习微生物不同培养特征的接种技术，掌握细菌培养特征的观察内容，项目及观察方法。

### 二、基本原理

微生物的培养可分为好气性培养和厌气性培养两种类型。大多数细菌是好气性，培养时应注意通气。厌气性微生物培养时需隔除氧气。根据不同种类微生物的特点，需选好培养基、培养温度、通气条件及培养时间。

培养特征是指微生物在培养基上所表现的群体形态和生长状况。在一定的培养条件下，不同微生物形成的群体特征是不相同的，因此，培养特征是鉴定菌种的重要依据之一。它包括有：斜面培养基上的菌苔特征、平面培养基上的菌落特征、液体培养基上的生长特征、明胶穿刺培养及马铃薯块上的生长特征等。

### 三、实验材料

1. 菌种 粘质赛氏杆菌(*Serratiamarcescens*)、枯草芽孢杆菌、蕈状芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌。
2. 器材 牛肉膏蛋白胨琼脂培养基(平皿)4副。斜面培养基 4管，牛肉膏蛋白胨液体培养基(5ml)4管，明胶柱状培养基(7-8ml)4管，无菌皿 4副，1ml 无菌吸管，玻璃刮铲，接种针，接种环等。

### 四、实验步骤

#### (一) 斜面接种、培养及菌苔特征观察

1. 接种 用划线接种法在斜面培养基上接种。接种前，将试管贴上标签，注明菌名、接种日期及接种者等。按无菌操作法用接种环从斜面菌种管菌苔边缘取菌体少许，在新斜面培养基上作划线接种。要求是：从斜面 1/5 处向上划一条直线，不要划破培养基，也不要使菌种沾染管壁。

2. 培养 置 28-30℃温度下培养 2-5 天，取出观察菌苔特征。

3. 菌苔观察培养物生长量的多少，生长的快慢，菌苔形状、光泽、菌苔颜色和培养基颜色变化、粘稠度、气味、表面状况(光滑或粗糙)、皱折等，列表记录。

#### (二) 平面接种、培养及菌落形态观察

1. 点接法 用接种针按无菌操作手续，将四种菌分别点接在琼脂平板上，每皿点接四处(四个菌种)。接种时要避免接种针的弹动，以免菌细胞溅洒在整个平板上影响结果观察。接种完毕，在皿

## 葡萄酒卫生学

底背面接种点上注明菌号，写好接种日期及接种者。倒置平板于 28-30℃ 的温度下，培养 2-5 天进行观察。

2. 涂抹接种法 在凝成平板的琼脂培养基表面，滴一滴菌悬液(每 ml 菌悬液约 200-300 个菌细胞为宜)，用无菌玻璃刮铲涂抹均匀，注明菌号、接种日期及接种者，倒置培养皿于 28—30℃ 的温度下，培养 2-5 天进行观察。

3. 菌落特征的记载 取出培养皿，选定孤立的菌落，仔细观察菌落的形态、大小、颜色、光泽、湿润度、隆起度、透明度、边缘形状等。菌落表面状况、边缘可用放大镜或低倍镜观察。记载菌落特征。

### (三) 液体接种、培养及观察

1. 接种 按无菌操作法用接种环取菌体少许，移入装有液体培养基的容器(试管或三角瓶等)中，将接种环在液体表面处的器壁上轻轻磨擦，把菌研开。抽出接种环塞好棉塞，再摇动，菌体即均匀分散在液体中。如需大量接种，可先在斜面菌种管中加入定量无菌水，用接种环把菌苔刮下研开，再把菌悬液倒入液体培养基中，倒前试管口需进行火焰灭菌。

用液体培养物接种时，可根据条件采用以下不同方法：(1) 用滴管或吸管(经过灭菌的)吸取菌液接种。(2) 直接把液体培养物倒入液体培养基中。(3) 利用高压无菌空气通过特殊的注液装置把液体培养物注入液体培养基。(4) 利用负压将液体培养物抽到液体培养基中(如发酵缸的培养物接入种子菌液)。

2. 培养、观察 接种后，置 28-30℃ 温度下培养 2-5 天，观察液面是否生膜、混浊程度、环状生长或沉淀产生等特征，记录于表中。观察描述肉汁液体培养特征。

### (四) 穿刺接种、培养及观察

分别取柱状明胶培养基和牛肉膏蛋白胨琼脂培养基各 4 管，用接种针挑取少许菌种，穿刺于培养基中心，注明菌号、接种时间及接种者，明胶培养管置 22℃ 条件下培养 2-5 天，观察并记录培养基变色、液化情况及液化速度及明胶穿刺培养液化形态，琼脂培养管置 28℃ 下培养 2-3 天，观察结果。描述琼脂穿刺生长特征。

## 五、实验报告

将四种细菌的培养特征列表描述。

## 六、思考题

观察细菌培养特征有何意义?

# 实验八 酵母菌的培养及形态、菌落特征的观察

## 一、目的意义

学习酵母菌的培养方法，制片方法，观察酵母菌的形态及生殖方式，认识酵母菌的菌落特征。

## 二、基本原理

酵母菌是单细胞的真菌，细胞圆形、椭圆形或圆柱形，较细菌细胞大，为 4-15 微米，无性繁殖以芽殖为主，有的种可以形成芽簇。此外尚有裂殖酵母进行分裂繁殖。这些都是鉴定菌种的重要依据。

酵母菌的能源为已糖，氮源有铵态氮、氨基酸，对维生素的要求不严格，需氧或不需氧呼吸。常用的培养基有 YM 琼脂培养基、葡萄汁培养基、土豆培养基、豆芽汁培养基等。其生长温度为 5-40℃，最佳生长温度为 25-28℃，生长 pH 为 2.5-8.0，最佳为 2.8-7.0，接种后在 25-28℃ 下培养 4-5 天即可形成菌落进行观察。

酵母菌菌落特征：与细菌菌落相似。一般圆形、表面光滑、湿润、粘稠，用针易挑取，具油脂光泽，多数种为乳白色，少数种为红色。

观察酵母细胞时，常用路哥氏(Lugol)碘液制成水浸片，观察细胞形态并鉴别肝糖粒的存在；若区别死、活细胞时，可以美蓝液染色。由于活细胞的还原力强，美蓝着色后又被还原为无色，而死细胞则为蓝色。

## 三、实验材料

1. 菌种 葡萄酒酵母的斜面培养管
2. 器材 马铃薯浸汁琼脂斜面培养基或豆芽汁琼脂斜面培养基(每支 15ml)，无菌培养皿，路哥氏碘液、载玻片、无菌盖玻片、无菌镊子及接种、染色、镜检、培养用物。

## 四、实验步骤

### (一) 培养及菌落特征观察

1. 平板制作 取融化并冷却至 50℃ 左右的斜面培养基 1 支，倒入无菌培养皿中，使凝成平板。或培养基制备后制成平板灭菌后备用。
2. 接种 用划线法在斜面培养基上接种，用点接法在平板上接种。

## 葡萄酒卫生学

3. 培养 将斜面培养基及培养皿置于 25-28℃ 下培养 4-5 天后检查。
4. 菌落观察 仔细观察平板培养基上的孤立菌落，记载其菌落特征。

### (二) 形态观察

1. 制片 取干净载玻片一张，于中央滴加路哥氏碘液 1 滴，用接种环以无菌操作法取葡萄酒酵母菌体少许，放入碘液中混匀，然后在液滴上以倾斜式加盖玻片一张(注意勿使产生气泡)，待用。
2. 镜检 用低倍镜、高倍镜观察酵母菌的细胞形态及生殖方式，绘图。

## 五、实验报告

1. 图示镜检的酵母菌细胞形态及生殖方式。
2. 描述酵母菌的菌落特征。

## 六、思考题

你能准确地识别酵母菌与细菌的菌落吗?

## 实验九 乳酸菌的培养及形态、菌落特征观察

### 一、目的意义

学习乳酸菌的培养方法、制片方法、观察乳酸菌的形态特征、认识乳酸菌的菌落特征。

### 二、基本原理

乳酸菌是单细胞细菌，细胞球状或棒状，细胞大小为 0.5-1.0 微米。其无性繁殖为裂殖，有性繁殖少见。

乳酸菌以己糖、戊糖为能量，氮源是氨基酸，对营养的要求非常严格，常用的培养基有 lafon 乳酸菌培养基。其生长温度为 10-35℃，以 28-30℃最佳，生长 pH 为 2.9-8.0，以 4.5-7.0 最佳。接种后在 28-30℃下培养，即可形成菌落。

观察乳酸菌细胞时，常用革兰氏染色法制片，乳酸菌为革兰氏阳性菌，在显微镜下呈紫红色。

### 三、实验材料

1. 菌种 乳酸菌
2. 器材 lafon 乳酸菌斜面培养基(15ml)，平板培养基，结晶紫染色液，路哥氏碘液，95%酒精，番红或石炭酸复红染色液，载玻片，接种环，酒精灯及其它染色、镜检、接种、培养用物。

### 四、实验步骤

1. 培养及菌落特征观察
  - (1) 接种 用划线法在斜面培养基上接种。用点接或涂抹接种法在平板培养基上接种。
  - (2) 培养 置 28-30℃温度下培养 8-20 天，观察菌苔及菌落特征。
  - (3) 菌苔及菌落特征观察
2. 形态观察
  - (1) 制片 用革兰氏染色的程序进行涂片、固定、染色。
  - (2) 镜检 先用低倍镜寻找标本清晰部位，再换油镜观察细胞形态及染色结果。

### 五、实验报告

1. 乳酸菌的菌苔及菌落特征描述。
2. 绘出油镜下的细胞形态图，注明细胞颜色，说明染色反应。

# 实验十 葡萄酒中常见微生物的形态观察

## 一、目的要求

学习观察葡萄酒中常见微生物的方法，区别葡萄酒中常见微生物的形态特征。

## 二、基本原理

葡萄酒中主要的微生物有霉菌、酵母、醋酸菌和乳酸菌。当微生物的数量很大时，用肉眼即可观察到微生物，霉菌可在未发酵的葡萄汁表面，墙壁上以及设备上形成膜；酵母、醋酸菌可在葡萄酒表面形成膜或引起葡萄酒的浑浊、沉淀，乳酸菌引起葡萄酒的浑浊、沉淀。

霉菌为丝状，有隔或软菌丝，细胞大小为 5-20 $\mu\text{m}$ ；酵母菌为单细胞，4-15 $\mu\text{m}$ ；醋酸菌为单细胞，乳酸菌亦为单细胞，球状或棒状。在显微镜下，利用形状和大小很容易将霉菌与酵母菌和细菌分开，但是醋酸菌通常为两个细胞结合在一起形成双球状，很易与乳酸菌相混淆。

因此，可用革兰氏染色反应将它们区分开来，醋酸菌为阴性，乳酸菌为阳性。

## 三、实验材料

1. 材料 葡萄酒样若干。
2. 器材 路哥氏碘液，0.01%亚甲蓝，无菌载玻片及盖玻片、结晶紫染色液、番红或石炭酸复红染色液、95%酒精乳酸石炭酸棉蓝液、目镜及物镜测微尺、血球计数板、酒精灯、双层瓶等其它染色、镜检用物。

## 四、实验步骤

1. 取干净载玻片一张，于中央滴加待检葡萄酒样一滴，与一滴路哥氏碘液或 0.01%亚甲蓝混合，加盖玻片，5 分钟后用低倍镜及高倍镜(G $\times$ 400)进行镜检，观察酵母菌的大小及形态。  
测量细胞大小，显微计数。
2. 取另一载玻片，于中央滴加待检酒样一滴与一滴乳酸石炭酸棉蓝混合，加盖玻片，5 分钟后镜检，在低倍镜和高倍镜下观察霉菌的形态、大小。
3. 取待检酒样 1 滴与载玻片上，用革兰氏染色的程序进行涂片、固定、染色，然后镜检，先用低倍镜寻找标本的清晰部位，再换油镜观察乳酸菌和醋酸菌的细胞形态及染色结果。测量细胞大小。

## 五、实验报告

1. 图示显微镜下所见葡萄酒中微生物的形态、大小。

## 葡萄酒卫生学

2. 乳酸菌和醋酸菌如何区别?

# 实验十一 水质的卫生细菌学检验

## 一、目的要求

学习水质的细菌学检验法，了解水质状况同细菌数量的关系及大肠菌群的数量在饮水中的重要性。

## 二、基本原理

检测水中的细菌数量是评价水质状况的重要指标之一。饮水是否符合卫生标准，需要进行水中细菌数量及大肠杆菌群数量的测定。大肠菌群是肠道最普遍存在并且数量最多的一群细菌，由于大肠菌群能发酵乳糖，它们在乳糖培养基中经 37℃ 培养 24 小时即能产酸、产气，所以常将其作为水源被粪便污染的标志。

饮用水一般规定：1ml 自来水中总菌数不得超过 100 个；1000ml 自来水中大肠菌群数不得超过 3 个。

## 三、实验材料

1. 待检水样 生活用水
2. 器材 牛肉膏蛋白胨琼脂培养基、伊红美兰琼脂培养基无菌空瓶，无菌水，无菌培养皿，1ml 无菌吸管，试管等。

## 四、实验内容

### (一) 采取水样

1. 自来水 从各生活区取样，先将自来水龙头用火焰灭菌，再开放水龙头使水流 1-2 分钟后，用无菌空瓶接取水样。
2. 池水、湖水或河水 用无菌空瓶，取距离水面 10-15cm 深层水样。水样采取后应立即检验，不得超过 4 小时。

### (二) 水中细菌总数测定

1. 自来水取水样  
用无菌吸管分别吸取 1ml 水样，注入二个无菌培养皿中，每皿倒入已融化并保温在 50℃ 左右的牛肉膏蛋白胨琼脂培养基约 15ml，迅速摇动，使培养基与水样充分混匀，待凝固成平板后，将培养皿倒置于 37℃ 培养 24 小时，进行菌落计数。
2. 池水(湖水或河水)取水样



按其污浊程度进行适当稀释，选取三个稀释度，按两次重复，以倾注法进行接种培养，于 37℃ 培养 24 小时，进行菌落计数。

**3. 菌落计数方法**

(1) 平皿菌落选择选取 菌落数在 30-300 之间的平皿作为菌落总数测定标准。先计算同一稀释度的平均菌落数。若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皿作为该稀释度的平均菌数。若片状菌落的大小不到培养皿的一半，而其余的一半菌落分布又很均匀时，则可将此一半的菌落数乘 2 代表全平板的菌落数，然后再计算该稀释度的平均菌落数。

(2) 稀释度的选择 先选择平均菌落在 30-300 之间的平板，当只有一个稀释度的平均菌落符合此范围时，则以平均菌落数乘其稀释倍数即为该水样的细菌总数。

若有两个稀释度的菌落数都在 30-300 之间，则按两者菌落总数之比值来决定。若其比值小于 2，应取两者的平均数；若大于 2 则取其中较小的菌落总数。若所有稀释度的平均菌落数均大于 300，则应按稀释度最高的平均菌落数乘以稀释倍数。若所有稀释度的平均菌落均小于 30，则应按稀释度最低的平均菌落数乘以稀释倍数。若所有稀释度的平均菌落数均不在 30-300 之间，则以最接近 300 或 30 的平均菌落数乘以稀释倍数(表 4-1 中例 6)。

**表 4—1 计算菌落总数方法举例**

倒次	不同稀释度的平均菌落数			两个稀释度 菌落数之比	菌落数/毫升
	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>		
1	1365	164	20	—	16000 或 1.6×10 <sup>4</sup>
2	2760	295	46	1.6	38000 或 3.8×10 <sup>4</sup>
3	2890	271	60	2.2	27000 或 2.7×10 <sup>4</sup>
4	无法计数	4650	513	—	510000 或 5.1×10 <sup>5</sup>
5	27	11	5	—	270 或 2.7×10 <sup>2</sup>
6	无法计数	305	12	—	31000 或 3.1×10 <sup>4</sup>

\*两位数以后的数字采取四舍五入的方法。

**(三) 滤膜法检查大肠菌群**

滤膜法主要适用于杂质较少的水样，操作简单快速。

滤膜是一种微孔薄膜，将水样注入已灭菌的放有滤膜的滤器中，经过抽滤，细菌即被截留在膜上，然后将滤膜贴于伊红美蓝培养基上进行培养。再计数并鉴定滤膜上生长的大肠菌群菌落，计算出每升水样含有的大肠菌群数。

水样的检验步骤：

1. 滤膜灭菌 将滤膜放入烧杯中，加入蒸馏水，置于沸水浴中煮沸灭菌三次，每次 15 分钟，前两次煮沸后需换水洗涤 2—3 次。

2. 滤器灭菌 用点燃的酒精棉球火焰灭菌，或于 1kg/cm<sup>2</sup> 高压下灭菌 20 分钟。

3. 过滤水样 用无菌镊子夹取灭菌膜边缘部分，将粗糙面向上，贴放在已灭菌的滤床上，固定好滤器，将清洁水样 333ml 注入滤器中，加盖，打开滤器阀门，在 -0.5 大气压下进行抽滤。

4. 接种培养 水样滤完后再抽气约 5 秒钟，关上滤器阀门，取下滤器，用无菌镊子夹取滤膜边缘部分，移放在伊红美蓝培养基上，滤膜与培养基完全贴紧(截留细菌面向上)，两者间不得留有气泡，然后将培养皿倒置于 37℃ 培养 16-18 小时。

## 葡萄酒卫生学

5. 镜检 挑取符合大肠菌群特征的菌落涂片，进行革兰氏染色和镜检(参照发酵法)。

6. 发酵试验 镜检为革兰氏染色阴性无芽孢杆菌，每个菌落接种 1 支乳糖蛋白胨发酵管。经 37℃ 培养 24 小时产酸产气者，则定为大肠菌群阳性。

结果计算：

1L 水样中大肠菌群数= 滤膜上生长的大肠菌群菌落数×3。

## 五、实验报告

1. 在各生活区的水样中，细菌总数每毫升多少?经大肠菌群检查每升水中含有多少?水源若被污染，可能出现什么情况?

2. 在湖水(河水)水样中细菌总数及大肠菌群数是多少?不同区域取样有无区别?为什么?

## 六、思考题

大肠菌群中的细菌种类一般并非是病原菌，为什么要选大肠菌群作为水源被污染的指标?

## 实验十二 微生物的液体检验技术

### 一、目的要求

掌握微生物检验的基本原理及葡萄酒中微生物液体检验的基本方法。

### 二、基本原理

微生物液体检验的原理是将微生物接种在经杀菌后的固体培养基上，使之在培养基上繁殖生长，形成肉眼可见的菌落，计数所得的平均菌落数，乘以稀释倍数，即得每毫升活菌数；或在条件适宜时可以直接进行显微计数。

微生物液体检验的方法有活菌计数、显微计数、滤膜法等。

### 三、实验材料

1. 待检样品：葡萄酒(葡萄汁)。

2. 材料：YM 琼脂培养基(土豆培养基)、lafon 乳酸菌培养基、牛肉膏蛋白胨琼脂培养基、试管、生理盐水或 0.03M 磷酸盐缓冲液、培养皿、平底漏斗、橡胶盖、滤膜(0.45 $\mu$ m)、抽滤瓶、抽气机及高压灭菌锅、培养箱、显微镜等物。

### 四、实验步骤

#### 1. 活菌计数法

活菌计数法可较准确地测定每毫升液体中含有活菌的数量，是微生物鉴定消毒效果的基本操作之一。

以 10 倍递减法稀释样品悬浮液。定量吸取稀释液，用倾注法接种于琼脂平板，经培养后计数生长的菌落数，乘以稀释倍数，换算成每毫升悬浮液的活菌数。

① 液体的无菌取 样将取样阀或液体出口用酒精灯灼烧消毒，让液体在两个酒精灯的火焰之间流入经消毒的容器，取样结束后，对瓶口灼烧消毒，然后立即用消毒的锡纸封口。

② 分装 将大试管按需要量排列于试管架上，每管加入 9ml 生理盐水或 0.03M 磷酸盐缓冲液，由左起逐管标上  $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$  等。

③ 稀释 先将样品悬浮液用力摇匀，随即用经消毒的吸管吸取 1ml 加入到  $10^{-1}$  管内。将  $10^{-1}$  管敲打 80 次；再吸出 1ml 加入到  $10^{-2}$  管内，以此类推。

④ 接种 选择适宜浓度的试管，用吸管吸取混合均匀的混合液 1ml 加入灭菌平皿中，每一稀释度接种 3 个平皿。将已熔化的琼脂培养基冷至 45 $^{\circ}$ C，倾注于已接种的平皿内，每个平皿需 15-20ml，倾注时边倒边摇，使菌能均匀分布在琼脂内，加琼脂后，将平皿放于台上，待凝。当琼脂凝固后，

## 葡萄酒卫生学

翻转平皿，使底向上，置于 37℃ 温箱内培养，36-48 小时后，计数菌落。

⑤ 计数 计数时，选择平板菌落数在 30-300 之间的稀释度较为准确，将计数所得的平均菌数，乘以稀释倍数，即为每毫升活菌数。

在采用这种方法时，葡萄酒酿造的不同阶段可采用不同的稀释度：

—葡萄汁： $10^{-2}$ - $10^{-5}$ ；

—正发酵葡萄汁： $10^{-4}$ - $10^{-7}$ ；

—葡萄酒： $10^{-1}$ - $10^{-3}$ ；

—装瓶前的葡萄酒：可取 10ml 葡萄酒以计数每 10ml 葡萄酒的活菌数。

此外，为了研究特定的微生物种类，可用选择培养基进行接种，酵母菌培养需 36-48 小时，而乳酸菌则需培养 8-20 天。

### 2. 滤膜法

① 消毒将滤膜法所用的各种用具及滤膜用烘箱消毒(110℃，20 分钟)；或将用具与待检液和滤膜接触的部分用 95%酒精棉球擦拭后灼烧灭菌。

② 抽滤将待测样品倒入平底漏斗中，然后进行抽滤，再用无菌水冲洗漏斗继续抽滤。

③ 培养抽滤后用无菌水镊子将滤膜取出，置于平皿琼脂培养基上，并注意滤膜与培养基之间不能有气泡，然后将平皿翻转，置于 37℃ 的温箱中培养 48 小时后计数。

### 3. 显微计数法

这一方法只能用于含微生物 100000 个/ml 以上的葡萄汁和葡萄酒，而且不能区分死活细胞。

① 计数先将液体摇匀，然后用无菌吸管吸取几滴，置于计数载玻片上，用 G×400 进行镜检。计数时，应选取 5 个不同的视野，共计 20 个小格，然后用每立方厘米含有的细胞数表示结果。

如果细胞数量太多，则应进行稀释，其稀释倍数以使载玻片上的每个方格不超过 50 个细胞为宜。

② 酵母死活细胞辨别---染色法，取一滴葡萄酒于载玻片上，与一滴 0.01%亚甲兰混合。5 分钟后进行镜检，活细胞无色，死细胞被染成蓝色。

## 五、实验报告

几种不同液体检验方法中，待检样品所含的微生物数量。

## 实验十三 微生物的表面检验技术

### 一、目的要求

掌握微生物的表面检验方法。

### 二、基本原理

微生物的表面检验是待检表面进行取样后进行活菌计数或培养，以观察其所含的微生物数量。

### 三、实验材料

1. 待检表面：地区、墙壁、葡萄酒酿造设备、装瓶设备、工作人员的皮肤、服装、酒瓶样品等。
2. 材料：琼脂培养基及活菌计数所用物品、试管、培养皿及培养、消毒用品用具，生理盐水或0.03M 磷酸盐缓冲液。

### 四、实验步骤

#### 1. 可接触表面

棉拭子采样可用于平整表面，酿造设备、葡萄酒容器表面等的微生物采样。

① 采样 选取有代表性的部位，用灭菌棉拭子，沾取含中和剂的0.03M 磷酸盐缓冲剂或生理盐水，于划定的采样方格中均匀涂擦采样。

② 活菌计数 将采样后的棉拭子投入装有5ml 含中和剂的上述溶液中，进行活菌计数。

#### 2. 酒瓶的内表面---直接培养法

这一方法可用于白色的酒瓶和其它透明的酒瓶

① 培养基准备 预先制备灭菌琼脂培养基(40g/L)，并置于50℃水浴中，使之保持液态。

② 培养基装瓶 将酒瓶样品的温度用烘箱提高到40℃，然后在每个酒瓶中倒入50ml 培养基，转动酒瓶，以使培养基均匀地分布在酒瓶的内表面。然后将酒瓶浸入冷水浴中，使培养基冷却固化。

③ 培养 将酒瓶水平置于20℃的培养箱中培养2-4天，然后直接观察菌落数量。

### 五、实验报告

待检物品的微生物表面检验结果。

## 实验十四 葡萄酒灌装卫生处理

### 一、目的要求

葡萄酒在加工过程中，灌装是葡萄酒感染微生物的重要阶段之一，它影响到葡萄酒的质量和稳定性，本实验课开设的目的是使学生认识微生物对葡萄酒生产的重要意义，熟练地掌握微生物检验分析的基本理论和操作方法，掌握清洗、消毒的基本方法，加强装瓶前葡萄酒卫生的综合性试验技能，使瓶装的葡萄酒不致于出现病害。

主要内容是检验酒瓶的清洗程度、检验原酒中的细菌总数、检验装瓶前的葡萄酒是否符合卫生标准，从而分析在灌装时的卫生条件。

### 二、基本原理

检测灌装前葡萄酒、酒瓶的微生物数量，是鉴定葡萄酒、酒瓶中微生物感染的可能性，即预测装瓶后葡萄酒的微生物稳定性，因为，只有活的微生物才能感染葡萄酒。所以，将获得微生物植入选择培养基，并在适宜的条件下培养，微生物就会繁殖，并形成肉眼可见的菌落。

酒瓶的清洗主要是靠去污剂和机械作用，使酒瓶清洁、卫生，

### 三、实验材料

牛肉膏蛋白胨琼脂培养基，培养皿，电子天平，无菌吸管，高压灭菌锅，小铝锅，电炉，显微镜，恒温培养箱，超净工作台等；

小型超离心机或高速离心机，冰柜，酒瓶，5L 玻璃瓶，洗涤剂（氢氧化钠），6%的亚硫酸，葡萄酒原酒，灌装前葡萄酒等。

### 四、实验步骤

#### （一）检验刚发酵完的葡萄酒的细菌总数

##### 1. 培养基的制备

牛肉膏（0.6g）  
蛋白胨（2.0g）  
NaCl（1.0g）

→溶于 100ml 水中 → 加琼脂粉 → 煮沸溶解 → 加水至 200ml →

NaOH 调 pH7.2-7.4 → 灭菌（121℃，30min → 冷却（45-50℃ → 注入灭菌后的培养皿中（15ml）

##### 2. 接种培养

用无菌吸管取 1ml 酒样（原酒稀释 100 倍） → 注入培养皿 → 涂布均匀 → 37℃ 下，培养 24-48h → 计数（做空白对照）

## 葡萄酒卫生学

### （二）检验装瓶前葡萄酒（离心后稳定处理的葡萄酒）的细菌总数

#### 1. 培养基的制备

和（一）的步骤相同

#### 2. 接种培养

原酒经过澄清，贮藏→离心（14000 转/min， 5-10min）→用无菌吸管取 1ml 酒样→注入培养皿→涂布均匀→37℃下，培养 24-48h→计数（做空白对照）

### （三）检验清洗后酒瓶的细菌总数

#### 1. 酒瓶清洗

旧酒瓶→浸泡→2.5%NaOH 清洗、消毒 10-15min →冲洗（无菌水）3 次→待测

#### 2. 接种培养

取 50ml 无菌水均匀的冲洗待测酒瓶 3-5 次→倒入无菌三角瓶中→用无菌吸管取 1ml 水样→注入培养皿→涂布均匀→37℃下，培养 24-48h→计数（做空白对照）

以上操作应在无菌操作间中进行，每个试验至少 3 个重复，1 个对照。

## 五、实验报告

通过综合分析，检验葡萄酒、酒瓶的细菌数量是否在灌装前达到了卫生要求。

# 实验一 酶促褐变的观察及防止

## 一、目的及原理

园艺产品加工过程中常常发生褐变现象，其原因在于去皮切分等操作破坏了正常的物质分区，使原料中的氧化酶类在氧气作用下迅速与底物结合而产生褐色或黑色的物质。通过实验了解酶促褐变发生的机理，并进一步掌握防止酶褐变的方法。

酶褐变的发生是酶、底物和氧气共同作用的结果，三者缺一不可，凡能抑制或钝化酶活性、减少氧气和底物含量的措施均可抑制酶活性，从而防止加工中褐变的发生。

## 二、材料、仪器及试剂

新鲜马铃薯、苹果、梨、桃、藕、食用菌等原料；

电炉、不锈钢锅、水果刀、漏勺、烧杯、培养皿、镊子、真空泵、白瓷盘、

0.1%愈创木酚（或0.3%联苯胺），0.3%过氧化氢，1%邻苯二酚，0.2%亚硫酸钠（或亚硫酸氢钠、焦亚硫酸钠）、0.5%柠檬酸，1%食盐溶液，0.1%抗坏血酸。

## 三、操作方法

### （一）褐变的观察

（1）马铃薯、苹果等去皮，切成3mm厚的圆片，置于空气中观察颜色变化情况。

（2）取一片马铃薯在切面上滴1-2滴0.1%愈创木酚（或联苯胺），再滴0.3%的过氧化氢1-2滴，观察颜色变化情况。

（3）取一片苹果在切面上滴1%邻苯二酚2-3滴，观察颜色变化情况。

### （二）酶促褐变的防止

（1）热烫：将马铃薯片投入沸水中，待再次沸腾时开始计时，每隔30秒取出一片马铃薯，在切面上滴1-2滴0.1%愈创木酚和0.3%过氧化氢，观察并记录其变色的速度和程度，直至不变色为止，将剩余的马铃薯片捞出投入冷水中冷却。

（2）化学试剂处理：将2-3片苹果、马铃薯分别投入到1%NaCl、0.2%亚硫酸钠（或0.2%亚硫酸氢钠）0.5%柠檬酸和0.1%抗坏血酸溶液中护色20分钟，取出观察其色泽变化；

（3）将切分后的马铃薯片、苹果片分别浸泡在水、盐水或糖水中并置于真空泵中抽气（一般以87-90Kaf为宜），待组织半透明时取出沥干，观察色泽的变化。

（4）将上述几种处理的马铃薯及苹果片放入55-60℃烘箱，恒温干燥，观察其干燥前后色泽的变化情况，并进行记载。



## 四、结果分析

比较苹果及马铃薯切片发生褐变的速度及程度；  
列表比较几种护色方法的效果及优缺点。

# 实验二 园产加工中半成品的保藏

## 一、目的及原理

食盐溶液具有强大的渗透压力，一般果蔬用盐腌渍时，食盐用量为 8-15%，相当于 50-90 个大气压力，远远高于微生物细胞的渗透压，可以阻止其危害，再加上保藏时采用增加酸度，减少空气，低温等措施，就可以使原料较长时间保存。SO<sub>2</sub> 具有强烈的杀菌作用，当其浓度达到 0.2% 以上时，就可抑制多种微生物的生长发育，从而使原料得以较好的保存。本实验主要掌握园艺产品半成品的保藏方法。

## 二、材料、仪器及试剂

枣、苹果、李、杏、葡萄、蘑菇等园艺产品；  
水泥池（或缸）、熏硫箱、食盐、硫磺、亚硫酸盐、排针、锅、脱臭酒精等。

## 三、操作方法

### （一）枣的熏硫保藏

划缝：用排针在每个枣果上划 60-30 条缝。

预煮：将枣子投入沸水中煮 10-20min，然后投入冷水中冷却，捞出沥干。

熏硫：100kg 枣用硫磺 500g，熏硫处理 1h，取出放入缸中，上盖木盖，用麦草和泥密封，置阴凉处保藏。贮藏一段时间后，如果 SO<sub>2</sub> 含量降至 0.2% 以下时，取出再重新熏硫一次。

### （二）杏果的亚硫酸保藏

果实处理：将杏果用流动的清水洗净表面泥沙，去核（或不去核）。

装池：将 100kg 杏果装入水泥池或缸中，稍压，注入有效 SO<sub>2</sub> 含量为 0.6% 的亚硫酸盐溶液 50kg，上用竹竿加重物压住，防止原料上浮。

复盖：水泥池（或缸）上复盖厚塑料薄膜，并用泥土将周围压实，防止 SO<sub>2</sub> 散出。然后放到阴凉处进行保藏。

### （三）李子盐坯

按 100kg 李子用盐 16-18kg 将李果实腌渍入缸，腌时先放一层果，再撒一层盐，如此一层一层腌渍，三天后倒缸一次，使盐分溶解均匀，30-50 天后，出池晒干保存。

## 四、结果分析

列表比较几种半成品保藏的特点及优缺点。

# 实验三 园艺产品干制

## 一、目的及原理

园艺产品含水量很大，为新鲜易腐产品。干制通过各种方法减少产品中水分含量、提高可溶性固形物含量，降低水分活度，减少自由水分含量，使微生物生长受阻，同时抑制了酶的活性，从而使产品得以长期保藏。

通过实验主要掌握苹果干、杏干、干萝卜丝、辣椒干、干豇豆等常见干制品的制作方法。

## 二、材料、试剂及用具

苹果、梨、杏、萝卜、豇豆等；亚硫酸氢钠，硫磺粉；切菜刀，搪瓷盆，不锈钢锅，晒盘，烤箱。

## 三、制作方法

### （一）苹果干

#### （1）工艺流程

原料→清洗→去皮、切分→硫处理→干燥→均湿→整理、包装→成品

#### （2）操作要点

原料选择与处理：选择肉质致密，可溶性固形物含量高的品种，如国光、倭锦、红玉等果实，洗净削皮并去除果心，然后将苹果切成桔囊形或圆形的果片，片厚约 7-8mm，投入 1%食盐水中或直接进行硫处理。

硫处理：配制 0.5%亚硫酸氢钠溶液，将切好的苹果投入浸泡约 10min，（或直接进行熏硫处理，每 100kg 苹果用硫磺 2-3kg，处理时间 20-30min）。另外取一部分苹果不经此处理以作对照观察。

干燥：苹果浸泡后取出沥干即可铺盘，以果肉不叠压为原则，装好后置烤箱中烘干，以用手紧握时不粘着而有弹性为度，含水量大约为 20%，干燥率为 6-8:1。

均湿：干燥后的苹果干，先堆积在一起，经 1-2 天后，就可使制成品的含水量一致，然后再行挑选、分级、包装。

包装贮藏：将苹果干分别装在玻璃瓶或塑料袋中，并分别充入二氧化硫（使果实中  $\text{SO}_2$  含量为 0.1%~0.2%）另留部分果干散装，观察产品色泽的变化。

### （二）杏干

#### （1）工艺流程

原料选择→清洗→切半、去核→硫处理→干制→整理、分级→包装→成品

## (2) 操作要点

选果：选择果型大，肉厚、颜色深、味甜、纤维少的品种，成熟度以 8 成为宜。

处理：选好的杏果洗净，用小刀沿缝合线切成两半，挖去杏核，杏碗朝上，摆放在竹盘中送至室内熏硫，每 1000kg 杏用硫磺 3kg，熏硫 3-4h，待杏碗中水珠呈现白色时，即可取出。

干制：将装有杏果的竹盘送入烘房中烘烤，开始温度应较低为 50-55℃。一般烘烤约 10-12h，如果采取自然干制，则熏硫后置阳光下暴晒，待干至 5-7 成时，叠置阴干。

检查及贮藏：好的成品，肉质柔软不易折断，用手紧握然后松开时，彼此不相粘着，个别果片放在两指部捻压，没有汁液渗出。适宜含水量 16%-18%，干燥率为 5:1

将杏干整理分级，拣除破烂和干燥不足的果片，干燥不足者可再行入盘继续干燥。将良好的杏干堆放于洁净的盘上进行均湿，经 10-15 天后，放入垫有防潮纸的木箱或聚乙烯塑料袋中进行保藏。

## 四、结果分析

列表记录几种产品的外观指标并进行综合品质评定。

产品名称	原料重量	色泽	质地	形态	成品重量	干燥率	综合品质

# 实验四 园艺产品罐藏

## 一、目的及原理

罐藏，就是将园艺产品经预处理后密封容器或包装袋中，通过杀菌工艺，杀灭罐内大部分微生物或病原菌，并破坏原料本身所含各种酶的活性，使罐内的原料得以较长期的保存的一种食品保藏方法。罐藏基本原理在于杀菌消灭了有害微生物的营养体，同时应用密封包装，使可能残存的微生物芽孢在无氧的状态下无法生长活动、繁殖，从而使罐内的产品保持相当长的货架寿命，同时还可防止因氧化而引起的各种化学变化。本实验主要学习糖水梨罐头、桃罐头制作方法。

## 二、材料、试剂及用具

梨、苹果、桃、柑橘等、白糖、柠檬酸、食盐、异抗坏血酸等；玻璃罐或铁罐、夹层锅、封罐机、旋皮机、台称、比重计或折光仪、搪瓷盆等。

## 三、制作方法

### （一）糖水桃子罐头

#### 1、工艺流程

原料选择→洗涤→切半去核碱液去皮→热烫→修整→装罐加糖液→排气、密封→杀菌→冷却→处理→成品。

#### 2、操作要点

原料选择与处理：选取成熟度 7-8 成左右，无损伤、无虫害，果实大小均匀，果形整齐的果实，然后沿缝合线剖开，挖去果核和近核处的红色果肉部分。操作时为避免氧化变色，可暂浸入 1.5% 食盐水或 0.2% 柠檬酸液中进行护色处理。

去皮：碱液去皮，NaOH 浓度为 2-3%，90℃ 以上处理 1-2min，浸时应不停的左右晃动，然后迅速投入冷水中冲洗，至果片表面无果皮残迹为宜，碱液可连续处理桃片 2-3 次，以后则应添加碱液，保持一定的浓度。

热烫：冲洗洁净的桃片置于沸水中热烫，促其软化，热烫水用量为刚好淹没桃果为宜，2-3min 后取出冷却。

修整装罐：用小刀剔去桃片上的斑点及刀伤变色等不合格之处，并使切口无毛边，核洼光滑，装入事先充分洗净消毒的空罐内，装时注意排列整齐，不宜过紧或容量不够，以装至罐口留约 5mm 的空间为宜。

加罐液：配制 25-30% 的热糖液，根据情况添加 0.1%-0.2% 的柠檬酸和 0.02% 的异抗坏血酸钠，

罐液要淹没果实且液面距罐盖 2-3mm。

排气封罐：将罐头放入沸水中，排气时间为约 10-12min，待罐内中心温度达 70℃时取出，迅速拧紧玻璃瓶盖使趁热封罐。

杀菌冷却：一般于 100℃沸水中杀菌 10-12 min，取出后置于室内使自然冷却。

保温处理：在 20℃的室内放置 5-7 天，检验合格后贴标装箱。

## （二）糖水梨罐头

### 1、工艺流程

原料选择→洗涤→去皮→切分去心→修整护色→抽空→予煮→装罐→排气→密封→杀菌→冷却→检验→成品。

### 2、操作要点

原料选择：选择七八成熟，甜酸适口，风味浓郁的品种为原料，要求大小均匀，新鲜完整、如雪花梨、秋白梨及洋梨系统的巴黎等。剔除病虫害、腐烂、损伤及未熟的果实。

清洗、去皮：用清水洗净梨果表面的泥砂及污物，采前喷施农药的梨果在 0.15%的盐酸溶液中浸泡 5~6 min 再用清水冲干净。

切分去心、修整护色：用不锈钢刀将梨果纵切两半，并挖去果心，削去梨块上的机械伤、斑点及残留果皮，并投入 1%-2%食盐水或 0.1%的柠檬酸液中护色。

抽空：在密封容器内，将梨块浸泡在 1%~2%食盐水或此浓度食盐水中加 0.1%~0.2%的柠檬酸，在 20-50℃下抽空 5-10 min,罐内压力应为 66.7 千帕以上。抽空后的梨块可直接装罐，或再经予煮后装罐。

予煮：于沸水中煮 3-5min，以煮透不夹白心为度。予煮后应迅速投入冷水中冷却并进行修整。

装罐：装入同一罐内的果块要大小一致，色泽均一，不要把果屑和杂物带到罐内，并注入 35%的糖水，温度在 80℃以上，（含柠檬酸 0.1%）糖水距罐口 4-5mm。

排气杀菌：排气时温度为 90-95℃，时间 8-10min，中心温度到 70℃，随后立即封罐，于沸水是杀菌 15min。

# 实验五 园艺产品糖制

## 一、目的及原理

高浓度糖液具有较高的渗透压，能使微生物细胞脱水收缩，发生生理干燥而无法活动。同时，高浓度糖液具有降低水分活性和抗氧化作用，从而抑制微生物的活动，将园艺产品加工成各种类型的糖制品，一般使制品中糖液浓度达 60-70%，不仅增加营养和品质，而且延长保藏期，如果脯、蜜钱、果酱、果泥等。本实验主要掌握蜜枣、苹果脯、山楂糕、冬瓜条、果冻的一般加工方法。

## 二、材料、试剂及用具

山楂、苹果、梨、冬瓜、杏、桃等果蔬，夹层锅、打浆机、菜刀、漏勺、煤气炉、瓷盘、烘箱等，白砂糖、果葡糖浆、柠檬酸、黄原胶、明胶、氯化钙、亚硫酸氢钠。

## 三、制作方法

### (一) 苹果脯

#### 1、 工艺流程

原料选择→去皮→切分、去心→硫处理和硬化→调配糖煮→糖渍→烘干→包装→成品

#### 2、 操作要点

原料选择：选用大小适中，果心小，肉质致密，香味浓的品种，成熟度适宜。

去皮、切分、去心：用手工或机械去皮，将苹果对半纵切，挖去果心及损伤部分。

硫处理及硬化：将果块放入 0.1%的氯化钙和 0.2-0.3%的亚硫酸氢钠混合液中浸泡 4-8h，进行硬化和硫处理。肉质较硬的品种只需要进行硫处理。每 100kg 混合液可浸泡 20-130kg 原料，浸泡时上压重物，防止上浮。浸后取出用清水漂洗 2-3 次备用。

糖煮：在夹层锅内配成 40%的糖液 25kg，加热煮沸，倒入果块 30kg,以旺火煮沸后，改用小火煮制 15min 此时果肉软而不烂，并随糖液的沸腾而膨胀，表面出现细小的裂纹。次后再分五次加糖煮制，第一两次分别加糖 5kg，第三四次分别加糖 5.5kg,每次间隔 5min，第五次加糖 6kg，煮制 20min。全部煮制时间需 1-1.5h，待果块呈现透明时，即可出锅。

糖渍：趁热起锅，将果块连同糖液到入大缸中浸渍 24-48h。

烘干：将果块捞出，沥干糖液，摆放在烘盘上，送入烘房，在 60-65℃ 的温度下干燥至不粘手为度，大约需要 24h。

整形和包装：烘干后用于捏成扁圆形，去除黑点、斑疤等，装入食品袋或纸盒，低温保存。



## （二）冬瓜条

### 1、工艺流程

原料选择→去皮→切分→硬化→予煮→糖液浸渍→糖煮→干燥→包糖衣→成品

### 2、操作要点

原料选择：一般选用新鲜、完整、肉质致密的冬瓜为原料，成熟度以坚熟为宜。

去皮、切分：洗净冬瓜表面的泥沙用旋皮机或刨刀削去瓜皮，然后切成宽 5cm 的瓜圈，除去瓜瓢和种子，再将瓜圈切成 15cm 的小条。

硬化处理：将瓜条到入 0.5%-1.5%的石灰水或 0.2%的氯化钙溶液中，浸泡 8-12h，使瓜条质地硬化，能折断为度，取出用清水冲洗干净。

予煮：将漂洗干净的瓜条倒入预先煮沸的清水中热烫 5-10min，至瓜条透明为止，取出用水清洗 3-4 次。

糖液浸渍：将瓜条从清水中捞出，沥干水分，在 20%-25%的糖液中浸渍 8-12h，然后将糖液浓度提高到 40%，再浸渍 8-12h。为防止浸渍时糖液发酵，可在第一次浸渍时加 0.1%左右的亚硫酸钠。

糖煮：将处理好的瓜条称重，按 15kg 瓜条加糖 12-13kg，先将砂糖的一半配在 50%的糖液，放入夹层锅内煮沸，倒入瓜条续煮，剩余的糖分三次加入，至糖液浓度达 75%左右，瓜条饱满时即可出锅。

干燥及包糖衣：将瓜条捞出，沥净糖液，摆放在烘盘上，送入烘房，在 60-65℃的温度下干燥至不粘手为度，大约需要 24h。

整形和包装：烘干后用手捏成扁圆形，去除黑点、斑疤等，装入食品袋或纸盒，低温保存。

## （三）草莓酱

### 1、工艺流程

原料→漂洗→去梗去萼片→配料→浓缩→装罐、封口→杀菌→冷却→成品

### 2、操作要点

原料处理：草莓倒入流水中浸泡 3-5min 分装于有孔筐中，在流动水或通入压缩空气的水槽中淘洗，去净泥沙污物。然后捞出去梗、萼片和腐烂果。

配料：草莓 100kg，75%的糖液 120kg，柠檬酸 0.2kg，山梨酸 0.05kg。

浓缩：将草莓倒入夹层锅内，先加入一半糖液，加热软化后，边搅拌边加入剩余的糖液以及柠檬酸和山梨酸，继续浓缩至终点出锅。

装罐、密封：出锅后立即趁热装罐，封罐时酱体的温度不低于 80℃。

杀菌、冷却：沸水中杀菌 15min，自然冷却。

## （四）山楂糕

### 1、工艺流程

原料选择→清洗→切分→软化→过筛→配料→加热浓缩→入盘→冷却→成品

### 2、操作要点

原料选择：选取新鲜无病虫害的山楂，除去霉烂等不合格果，用清水洗净果面的泥沙污物，切分去蒂把，并将籽剥出（也不可剥籽）。

软化：加与果重等量的水，在夹层锅中煮沸 30-40min，边煮边搅拌，至果肉软烂为止。或者沸 15min 后，捞出果实，放入捣碎机中（或打浆机）捣烂，并将煮过山楂的沸水倒入搅拌均匀。

过筛：先以粗筛去皮、去籽，再以细孔筛压滤。

配料：40kg 山楂加糖 20kg，研细的明矾 1kg，或按果肉浆液的 60%-70%加入砂糖。

加热浓缩：按配料比例再夹层锅内加热浓缩，不断搅拌，以防焦糊，待水蒸发掉一部分后，开始分次加糖，继续搅拌，待可溶性固形物达 65%以上时，即可出锅。

入盘：将浓缩后的粘稠浆液趁热倒入搪瓷盘中，冷却凝固后即成品。

## 四、分析记录

列表记录实验名称、产品外观质量及综合品质评定

产 品 名 称	原 料 质 量	加糖量	色 泽	质 地	形 态	成 品 含糖量	综 合 品 质

# 实验六 果品蔬菜制汁

## 一、目的及原理

果蔬汁是指用未添加任何外来物质，直接从新鲜水果或蔬菜中用压榨或其他方法取得的汁液。以果汁或蔬菜汁为基础，加水、糖、酸或香料等调配而成的汁液称为果蔬汁饮料。本实验主要掌握果汁、葡萄汁、番茄汁、橘汁等常见果蔬的制汁方法。

## 二、材料、仪器及试剂

苹果、葡萄、番茄、甜橙等果蔬；

破碎机、过滤筛、榨汁机、温度计、杀菌锅、夹层锅、漏斗、罐头瓶、瓶盖、电动封盖机；乳酸钙、柠檬酸。

## 三、制作方法

### (一) 苹果汁

苹果既适合于制取澄清果汁，也用于制带肉果汁，极少量用于生产普通的混浊果汁，它是欧洲目前主要的浓缩果汁。

#### 1、工艺流程

原料→分选→清选→破碎→压榨→粗滤→澄清→精滤→调整混合杀菌→罐装→冷却→成品

若为浓缩果汁，则在调整混合后进行浓缩，至可溶性固形物 80%—70%时冷却贮藏，然后可散装成大包装形式贮存。

#### 19.3.1.2 操作要点

原料选择：选择风味浓，糖酸含量适宜的中晚熟品种为原料，如小国光、醇露、君袖，红玉；旭等。去除病虫、霉烂、机械伤果。

清洗：将苹果在水中浸洗或喷淋清水洗涤，也可用 1%的氢氧化钠或 0.1%—0.2%的洗涤剂中浸泡清洗的方法。

破碎、压榨：用磨碎机或破碎机至 3-8mm 大小的碎片，然后用板框压榨机或螺旋压榨机压榨。

过滤：压榨汁收集后用 100—150 目的筛中过滤。

澄清：采用明胶单宁法澄清，单宁 0.1g/L、明胶 0.2g/L，加入后在下静置 6-12h，取上清液和下部沉淀分别过滤。也可采用酶法或酶、明胶、单宁联合澄清法或超滤法。

精滤：用硅藻土过滤机和超滤机进行精滤。

调整混合：加糖酸调配成可溶性固形物 12%左右，酸 0.4%左右。

杀菌、罐装：在 93.9℃以上温度进行巴氏杀菌 10min，立即热装罐。自然冷却至室温贮藏。

## (二) 葡萄汁

### 1、工艺流程

原料→分选→清洗→破碎→预热→加酶和木纤维压滤→澄清去酒石→过滤→装罐→巴氏杀菌→成品

### 2、操作要点

原料选择：一般选用红色或紫色葡萄品种，如康可，也可用玫瑰香、佳利酿、黑虎香等，要求充分成熟、新鲜、无腐烂。酸度为 0.5-3.0%，含糖量为 12-18%。

清洗：将葡萄用清水喷淋洗涤，或先用 0.02%-0.04%的高锰酸钾浸泡消毒 2-3min，然后用清水漂洗至水中不带红色为止。

分选、破碎、挑出伤烂、未成熟、青色果粒，同时除去枝梗及杂质，然后用打浆机进行破碎处理。

预热：破碎后的果浆放入夹层锅内加热至 60-65℃，预热 20min，使果皮中的色素和单宁充分溶出。

压榨：趁热用压榨机压榨或用筛网过滤机进行粗滤，压榨时加入 0.2%果胶酶或 5%的精制木质纤维可提高出汁率。

澄清：葡萄汁的澄清方法有冷藏法、速冻法、加盐法、加酶法、加酪蛋白法、加酒石酸二氢钾法以及冷冻浓缩法。加盐法加入的盐有苹果酸钙、乳酸盐、磷酸盐以及偏酒石酸。一般按每 100kg 果汁中加 0.2%偏酒石酸等盐等和 5g 单宁，维持果汁温度在 10℃左右 8h，再加入 10g 明胶。待果汁出现沉淀分层时即可过滤装瓶。

巴氏杀菌：果汁用虹吸法吸出，以石棉过滤。一斤装的玻璃瓶、杀菌 85℃、10min，其法将果汁加热至 85℃,装入消过毒的玻璃瓶，封口，再在 85℃水中维持 10min，冷却，即成品。

## 四、结果记录

产品名称	出汁率	透明度	色泽	风味	综合评定

# 实验七 果蔬加工品的感官检验

## 一、目的及原理

产品的质量好坏，主要是通过感官鉴定和理化分析进行，而感官鉴定的方法，是评定质量的必要措施，感官鉴定记载的方法有两种，一是对产品质量进行描述记载，另一种是按一定的标准评分记载。爱过对果蔬加工品的品尝、观察，掌握果蔬加工品感官评定方法及质量标准。

## 二、材料及用具

各种果蔬加工品：小白瓷盘、匙子、叉子、烧杯、量筒、酒杯、小碟、卡尺、天平、大口漏斗、打检棒等

## 三、操作方法

### （一）罐头的检验

#### 1、内容物检验

##### （1）组织与形态检验

在室温下，将糖水水果及蔬菜类罐头打开，先滤去汤液，将内容物倒入白瓷盘中，观察其组织形态，果块软硬程度，果块是否完整。同一罐内果块大小是否均匀一致，有无病虫，斑点等杂物存在。

##### （2）色泽检验

将糖水水果蔬菜罐头的果蔬块和液汁分别收集在白瓷盘和烧杯中，观察果蔬块是否具有本品种应有的正常颜色，有无变色现象。如有变色严重程度；汤汁是否清晰透明，有无夹杂物及引起混浊之果碎屑等。

##### （3）香味检验

果蔬罐头打开后，用鼻闻和嘴尝等方法检验其是否具有与原果蔬近似的香味，香味的浓与淡，有无异味，是否适口等。

感官检验，除用文字叙述外，也可以采用打分的办法进行。在评定一个罐头质量等级时，首先要确定该罐头的感官指标体系及各个指标所占的分数，再确定等级标准与对应的总得分，之后根据果蔬罐头的实际存在情况，给每个指标一个适合的评分，然后将各指标得分相加得到总分，即可初步确定罐头的质量等级。例如，可将90分以上列为一等，80分以上列为二等，60分以上列为三等，60分以下为不合格。对于一等品除了总分规定外，还可以给予其也项目一定的限制等。如糖水橘子罐头滋味不低于30分，形态不低于30分，形态不低于10分，否则降为二等，如发现严重的涂料脱落及硫化现象或严重的杂质（如苍蝇，玻璃。头发等），均作不合格论：

## 2、罐头容器的检验

### (1) 容器外观检验

观察标签纸及罐盖硬印是否合格，瓶与盖结合是否紧密牢固，胶圈有无起皱，罐盖有无膨胀现象及罐外是否清洁等。

撕下标签纸观察接缝及卷边是否正常，焊锡是否完整均匀，卷边是否完整均匀，卷边外有无铁舌，裂隙或流胶现象，罐体及罐底有无锈斑，有无凹凸变形等。

用量罐卡尺检查卷边是否符合规定，用游标卡尺检查罐径与罐高是否合格。

对于罐盖外凸的，可用手指按压以确定胖听的性质，若手指按下罐盖稍下陷的罐头为正常罐；若用力压才下陷的，内容物可能开始变质，若用力压不下去或强行压下手离开又鼓起的，说明是胖听罐。

用打检棒敲击罐盖，以声音判断罐内的真空度，进而判断罐内食品的质量，一般规律是，凡是声音发实、清脆悦耳的，说明罐内气体少，真空度大，食品质量没什么变化，一般是好罐，若敲击声音发空，浑浊噪耳的，说明罐内气体多，真空度小，真空度底的罐头可能是工艺操作上的缺陷，也可能是缺内已有产气性细菌存在，或内容物已发生物理化学变化，该法系凭经验进行，精确度不很高，所以，必须与其他方法配合使用才行。

### (2) 重量检验

重量检验的主要目的是考虑消费者的利益，看罐头内容物重量和标签上所标重量是否一致，和罐头本身关系不大，包括净重和固形物两项指标。

擦净罐头外壁，用天平称取实际重量（g），打开果蔬罐头后，将内容物平倾于已知重量的金属网上，网搁于直径较大的漏斗上，下接一量筒，用来收集汁液。静置 2-3min，使液汁流完，然后分别进行称重。网上之果肉或蔬菜重量，即为果蔬罐头中全部果肉和蔬菜重量，但在有配料的蔬菜罐头中，还要减去小配料重量，才为蔬菜内容物的重量。

净重=毛重-空罐重

固形物重=筛及固形物重-筛重

液汁重=净重-固形物重

## (二) 果汁检验

(1) 色泽：从待检产品中抽取一定量具代表性的样品，防入洁净，干燥的玻璃杯中，观察其是否具有本品应有的颜色，是否有果肉及果肉大小等。

(2) 香味：将果汁放入尝试杯中，嗅其气味是否具有本果汁的香气，香气的浓淡。滋味：用口尝待检果汁是否具有本果汁应有的滋味，有无其他异味等。

## (三) 果脯蜜钱类检验

(1) 色泽：将制品置于白瓷盘中，观察色泽，透明度是否符合该产品的标准要求；

(2) 组织与形态：观其组织形态，饱和度是否符合要求；

(3) 味和香：嗅其气味，品尝风味和质地，检验是否符合标准要求；

## （四）果酱检验

（1）色泽检验：将酱体倒入白瓷盘中，观察其色泽是否具有本品应有的颜色

（2）组织与形态检验：在 15~20℃ 室温下开罐后，用勺子取果酱 20~50g 置于干燥的白瓷盘中，在 1min 内观察其酱体有无流散和汁液分泌现象。在 1min 内液汁很快从酱体中流出，称作汁液分泌；在 1min 内酱体很快向四周扩散，称作流散。

（3）味和香的检验：口尝是否具有该果酱良好的风味，嗅其是否具有香气。

# 实验一 酿酒葡萄成熟度的控制

## 一、目的与要求

成熟度是决定葡萄酒质量的重要因素。通过测定浆果的成熟度，了解原料的成熟质量，确定各品种的最佳工艺成熟度。并以此决定葡萄酒类型和相应的工艺条件。

## 二、材料与试剂

1. pH 计、手持糖量计、托盘天平、量筒、水浴锅、电炉、量筒、移液管、752 型分光光度计。
2. 裴林试剂：测酸试剂，95%酒精，盐酸等。

## 三、方法与步骤

1. 采样：从转色期开始每隔 5~7 天采样一次。对于大面积园，采用 250 株取样法：每株随机取 1~2 粒果实，共取 300~400 粒，面积较小的品种，可随机取 5~10 穗果实。装入塑料袋于水壶中，迅速带回实验室分析。
2. 百粒重与百粒体积：随机取 100 粒果实，称重，然后将 100 粒果实放入 250ml（或 500ml）量筒中，加入一定体积的水，至完全淹没果实，读取筒中水面读数，减去加入的水量，即为百粒体积。
3. 出汁率有测定：取果粒若干，放入小压榨机或大研钵中压碎，然后自然滴出其中的葡萄汁，称量，再进行压榨到流不出葡萄汁为止，称量。

$$\text{计算：自流汁率 (\%)} = \frac{W}{W_s} \times 100$$

$$\text{总出汁率 (\%)} = \frac{W_1 + W_2}{W_s} \times 100$$

式中  $W_1$ ——葡萄浆自流汁的重量，(g)。

$W_s$ ——试样重量，(g)

$W_2$ ——经压榨流出的葡萄汁重量，(g)。

4. 可溶性固形物与 pH 值：用手持糖量计测定葡萄汁的可溶性固形物 (%)，取 20ml 左右汁测 pH 值。
5. 还原糖与总酸：用裴林试剂法测定还原糖。用碱滴定法测定总酸。
6. 果皮色价测定：取 20 粒果实，洗净擦干，取下果皮并用吸水纸擦净皮上所带果肉及果汁，然后剪碎，称取 0.2 克果皮用盐酸乙醇液 (1M 盐酸：95%乙醇=15: 85) 50ml

浸泡，浸渍 20 小时左右，然后测定 540nm 下的吸光度，计算果皮色价  $\frac{A \times 10}{W}$  (XA



——吸光度、W——果皮重量 (g)。

## 四、结果及分析

1. 将上述指标绘制成随时间变化的曲线，了解各指标变化规律。
2. 比较不同品种曲线的异同。
3. 根据上述指标，评价浆果的成熟质量。

# 实验二 不同澄清剂对葡萄汁的澄清效果

## 一、目的与要求

经过破碎分离的葡萄汁，含有大含野生杂菌、悬浮物，如果用其直接发酵，则会给酒中带入一些不应用的怪味。（如土腥味、霉味）和不应有的成分（如：尘土中溶入的铁、杂菌繁殖使挥发酸增加等），使发酵不正常，生成的酒质量低劣。为此，利用澄清剂及不同的方法，对葡萄汁进行处理，以得到理想的葡萄汁。

## 二、材料与试剂

1. 膨润土、聚乙烯吡咯烷酮（PVPP）、亚硫酸等。
2. 量筒、具塞刻度试管，752 型分光光度计。

## 三、方法与步骤

1. 取葡萄酒 0.5L+80mg/LSO<sub>2</sub>，然后分别进行下列处理：  
处理 I： 1g/L 膨润土。  
处理 II： 1g/L 膨润土+0.2g/LPVPP  
处理 III： 果胶酶 20mg/L  
处理 IV： 果胶酶 20mg/+1g/L 膨润土。  
充分摇匀、静置，同时设置对照。
2. 分别于 1 小时、3 小时、6 小时、9 小时、12 小时、18 小时、24 小时、36 小时、48 小时后量取沉淀物的高度。
3. 处理 4~5 天后，取上清液测定总氮、多酚、澄清晰度，同时观察沉淀高度及表面平整、紧密度，上清液澄清状况及澄清速度。

## 四、结果与分析

1. 比较上述处理的澄清效果。
2. 各种处理的最佳作用范围。

# 实验三 酵母的分离纯化与扩大培养

## 一、目的与要求

酵母菌存在含糖较多的基质、土壤、发酵容器上，在成熟的葡萄果实表现均有存在，易于分离得到。酵母菌喜偏酸环境，适宜的 pH 值为 4.0~6.0，在液体培养基中，它比霉菌生长快。为防止细菌与霉菌的污染，采用酸性液体培养基进行选择分离，易获得纯种。分离纯化得到的优良酵母菌种，通常保存在固体斜面培养基上，在使用前，需要逐步扩大繁殖，待培养到足够的体积时，方可做为酒母在大生产中使用。

## 二、材料与仪器

1. 成熟的葡萄果实
2. 试剂：豆芽汁蔗糖琼脂培养基\*，路哥氏碘液\*\*，葡萄汁，VB1、硫酸铵、亚硫酸。
3. 高压灭菌锅：9cm 灭菌培养皿、恒温箱、无菌刮铲、小刀、接种针、酒精灯、三角瓶、血球计数板、盖玻片、染色及镜检等用物。

## 三、步骤与方法

1. 培养：选取新鲜、清洁、成熟无腐烂变质的葡萄果实适量，捣成浆后置于 50ml 三角瓶内，调整 pH 值为 4.0~5.0,添加 120mg/L 液体 SO<sub>2</sub>,搅匀,用纱布封口放入电热恒温箱中,于 28~30℃ 下进行培养。
2. 分离纯化：当酒度达 9~10%，在无菌室内，取三角瓶上部清液 10ml 放入 90ml 无菌水中，再吸取 1ml 稀释液放入 99ml 无菌水中，依次稀释成 10<sup>-3</sup>~10<sup>-6</sup> 共六种浓度，然后取 10<sup>-5</sup>~10<sup>-6</sup> 两种浓度各 1ml，做成两个稀释平板，培养基采用杀菌后的 10Be 的果汁，琼脂用量为 1.8%，在培养箱内于 28~30℃ 下培养 48 小时，再将培养皿内的单个酵母菌接入斜面试管内，每个菌落接两个试管，以识别编号培养。
3. 镜检：用路哥氏，碘液制成浸片，在低倍镜检下检查纯度，以识别纯培养体。
4. 保存：将充分生长的菌放入 4℃ 冰箱中，定期移接豆芽汁蔗糖琼脂培养基，每 2~4 个月移接一次。
5. 酒母\*\*\*的制备：取成熟度较好的葡萄榨汁，70~80℃ 加热 20~30min，取 3 支灭过菌的试管装汁 10ml，接入酵母菌，待发酵旺盛时，接入含 40mg/L SO<sub>2</sub> 的 200ml 左右葡萄汁中，待发酵旺盛时，再按上述接种量接入 SO<sub>2</sub> 浓度升高的葡萄汁中，依次类推，最后一次葡萄汁中的 SO<sub>2</sub> 量应高于生产中 SO<sub>2</sub> 用量 10~20mg/L，另外，葡萄汁中需加入 0.5 mg/L VB1 和 100~150mg/L 的硫酸铵。
6. 酵母计数：分别在发酵初期，旺盛期、后期，用血球计数板法进行酵母计数。

## 四、思考与练习

1. 镜检时，如何区分酵母菌和别的污染菌？
2. 图示镜检的酵母菌细胞形态和出芽生殖。并描述其菌落特征。
3. 酒母的制备中，逐步增加 SO<sub>2</sub> 浓度的作用是什么？

注：\* 豆芽汁蔗糖琼脂培养基（分离培养真菌）

豆芽汁 1000ml            蔗糖 20.0g

琼脂 18~20g            pH7.2

(分离时于临用前加入 0.3% 灭菌乳酸，使 PH 降为 5.0 左右)。

\*\*：路哥氏（Lugol）碘液

碘            1.0g

碘化钾      2.0g

蒸馏水      300ml

先溶碘化钾于少量蒸馏水中，再将碘溶于碘化钾溶液中，可稍加热，最后加足蒸馏水量，棕色瓶保存。

\*\*\* 酒母的质量标准：

- a 糖液消耗不超过原糖度的 2/5。
- b 酸度增加不超过原酸度的 0.15。
- c 气味正常。
- d 细胞数每毫升 1.1 亿以上。
- e 健壮整齐。
- f 无杂菌。

# 实验四 酵母菌的发酵性能测定

## 一、目的与要求

葡萄酒是酵母菌对葡萄原料发酵的产品，因此，酵母的特性决定了葡萄酒的质量及相应的工艺条件，对酵母的有关特性的测定，为选择和评价酵母提供依据。

## 二、材料与仪器

成熟良好的葡萄汁、亚硫酸、膨润土、试管、三角瓶、玻璃瓶、高压灭菌锅等。

## 三、方法

1. 抗 SO<sub>2</sub> 能力：用杀菌后的葡萄汁，在试管中培养酵母，然后在三角瓶中放入杀菌后的葡萄汁，分别加入 40mg/L, 70mg/L, 90mg/L, 100mg/L, 120mg/L, 140mg/L, 150mg/L SO<sub>2</sub>，于室温下定期观察，记录其开始发酵的时间。
2. 产酒精能力：在装有 250ml 葡萄汁的三角瓶中，接入 10ml 酵母液，于室温下发酵，待发酵旺盛时，分别于第二天、第三天两次将发酵葡萄汁的糖调至 340g/L，任其发酵，自然终止。澄清后，取样分析残糖、酒度及产酒精效率。
3. 不同温度下的发酵能力：在葡萄汁 250ml 中，接入 10ml 酵母液，分别在 10℃、20℃、30℃、下发酵，记录发酵时间。
4. 对于白葡萄酒的酿造性能：将酵母菌接入装有 5L 或 10L 葡萄汁的玻璃瓶中，将糖调至 210g/l，于 18℃~20℃下发酵，发酵结束后除沉淀、过滤，调 SO<sub>2</sub>，陈酿一个月后进行化学分析。感官品评，需分析和观察的指标见下表。

指 标	葡萄汁		葡萄酒成分							发酵后酒的澄 清状况	感官评语
	含 糖 量	含 酸 量	酒 度	总 酸	挥 发 酸	总 酯	二 氧 化 硫	总 酚	残 糖		
酵母											

5. 对于红葡萄酒的酿造性能：红葡萄酒破碎去梗后，取 10L，加二氧化硫 80mg/L，加入酵母，控制温度在 25~30℃下发酵，发酵结束后，分离、调 SO<sub>2</sub>，陈酿 1 月后，过滤，分析与感官品尝，记载标准同上表。
6. 耐酒精能力：试验采用 50Be 麦芽汁为培养基，接入酵母后静止培养，当达到对数生长期时加入酒精，使每个试样内酒精含量分别为 4、7、10、13、15 和 21% (v/v)，

此时，细胞浓度为  $40\sim 50\times 10^6$  个/ml。在加入酒精后 10、30、60、90、120、150、180 分钟时，分别取样，以次甲基兰为染色液，测定死亡细胞数量。计算细胞存活力。

#### 四、思考与练习

对所试验酵母进行综合评价。

# 实验五 干白葡萄酒酿造

## 一、目的与要求

通过对干白葡萄酒酿造过程中主要工艺环节的实际操作，掌握干白葡萄酒酿造方法及提高质量的措施。

## 二、仪器与试剂

1. 20L、10L、5L 玻璃瓶、塑料桶、小型压榨机、小型过滤机、抽气泵、砂布、澄清板、除菌板、膜过滤机。
2. 膨润土、聚乙烯吡咯烷酮、亚硫酸、白砂糖、CaCO<sub>3</sub>、斜面培养酵母。

## 三、操作步骤

1. 取成熟度良好的白色品种，含糖量>170/L，去除病虫、畸形、生青果实。
2. 手工去梗，用小型压榨机（板）进行压榨，勿撕烂果皮，压破种子。取汁测定含糖量、含酸量、比重、温度。
3. 在取汁的同时，迅速加入 60~80mg/L SO<sub>2</sub>，将葡萄汁温度降至 5~10℃。
4. 如葡萄汁的酸度高于 8g/L(H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)，则用 CaCO<sub>3</sub> 降酸至 7.5g/L，每克 CaCO<sub>3</sub> 可降 1g/L(H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)。同时，向汁中加入已处理好的 600~1000mg/L 膨润土和 50~200mg/L PVPP。
5. 放置 24~48 小时，根据汁澄清状况，分离清汁，加入已培养好的酵母菌，控制发酵温度于 18~20℃。
6. 待发酵旺盛时，按 17g/L 糖生成 1% (V/V) 酒精加糖至生成 12% (V/V) 酒度，每天两次测定比重与温度，绘制发酵曲线。
7. 当比重降至 0.993~0.996 时，测定还原糖。如小于 2g/L，则说明发酵停止。此时，分离酒液。同时，加入 60mg/L~80mg/L SO<sub>2</sub>。
8. 测定酒的糖、酒、酸、pH、挥发酸、总 SO<sub>2</sub>、游离 SO<sub>2</sub>，两周后，分离，调整酒液的游离 SO<sub>2</sub> 至 30~40mg/L，满瓶贮藏。
9. 当葡萄酒贮藏 6 个月左右时，下胶澄清、过滤、稳定性试验。
10. 已达到澄清稳定的葡萄酒，将酒温降至 5℃ 左右进行装瓶。同时加入 5mg/L SO<sub>2</sub>、10mg/L Vc，打塞、卧放贮藏。

## 四、思考与练习

制定干白葡萄酒生产工艺流程，并详述操作规范。





# 实验六 干红葡萄酒酿造

## 一、目的与要求

掌握干红葡萄酒酿造中浸渍程度的控制方法及相关的操作要求。

## 二、材料与仪器

材料与试剂：红色酿酒葡萄， $\text{KHCO}_3$ ，明胶，亚硫酸，白砂糖，斜面培养酵母，其余同实验五；

仪器与器皿：压帽柄，其余同实验五。

## 三、操作步骤

1. 成熟度控制：含糖量 $\geq 170\text{g/L}$ ，剔除生青、腐烂的果实。
2. 手工去梗、轻微破碎。
3. 装瓶：装量不超过瓶容的 75%，同时按汁量加入 50~80mg/LSO<sub>2</sub> 搅匀，并加入果胶酶 20mg/L（或按说明书）。同时取汁测糖、酸、比重、温度。
4. 浸渍发酵：采取自然酵母或红葡萄酒专用酵母发酵，当有帽形成时，加糖。按 18g/L 生成 1%酒精度加糖至生成 12%（V/V）。每天测三次比重、温度，并定期用压帽柄压“帽”、用冷水喷淋或在空调室内控温至 26~30℃。
5. 当比重降至 1010~1020 时，出酒，同时压榨皮渣，混合、控温 18~20℃，使其同白葡萄酒发酵，管理。
6. 当残糖 $< 2\text{g/L}$  时，酒精发酵结束，用  $\text{KHCO}_2$  调整  $\text{PH} \geq 3.2$ ，触发苹果酸——乳酸发酵，具体管理见实验八。
7. 贮藏：满瓶、调游离  $\text{SO}_2$  为 20~30mg/L。
8. 下胶与过滤：自然澄清半年后，用明胶下胶，通过下胶实验确定用量，然后用澄清板过滤。
9. 稳定性试验：检查酒的氧化、铁、铜、色素、微生物稳定性，若不稳定需要进行相应的处理。
10. 装瓶、将酒冷至其冰点以上 0.5℃左右,在同温和条件下进行澄清\除菌过滤,并加入 5~10g/LSO<sub>2</sub>,打塞、卧放贮存。

## 四、思考与练习

如何确定红葡萄酒的皮渣分离时间？

# 实验七 葡萄酒的苹果酸—乳酸发酵

## 一、目的与要求

了解苹果酸—乳酸发酵进行的条件，学习对其监测控制的技术方法。

## 二、材料与仪器

材料与试剂：未进行苹果酸—乳酸发酵的葡萄酒，丁醇，50%乙酸，溴酚蓝，苹果酸，乳酸，酒石酸（色谱纯），新红葡萄酒，活性干乳酸菌。

仪器与器皿：层析用滤纸，层析缸，5L、10L 玻璃瓶，电吹风，点样用吸管，滴定管，挥发酸测定装置，pH 计。

## 三、操作步骤

1. 取酒精发酵刚结束的红葡萄酒 5~10L，用  $\text{KHCO}_2$  调整酸度，使其  $\text{PH} \geq 3.2$ ，然后将活化后的乳酸菌接入，接种量 2~3%，控制温度 18~20℃。
2. 每天观察酒液状况，每隔 2~4 天取样一次，测定总酸，挥发酸、pH 值，同时按下法测苹果酸、乳酸。
3. 有机酸层析：在 1L 丁醇中加入 1g 溴酚蓝溶解（不能加热），然后取 50 ml 此液与 25ml 50%乙酸混合得到展开剂，将展开剂装入层析缸内，封严，在离滤约下端 4~5cm 处滴上待分析的样品。每滴样品之间的间距为 3~4cm，点样直径不超过 5mm；最中间的一滴为苹果酸，各样品的点样管不能混用，以免污染（每次点完后用电吹风使其干燥），重复 8~10 次，将滤纸卷成筒状，并用两个铝夹固定住，滤纸两端不能相互接触，将滤纸垂直放入层析缸内，样点不能浸入展开剂，盖严，层析时间约 4~6 小时，取出干燥，观察斑点的大小及距原点的距离，确定其种类和量。
4. 持续时间可达 15~20 天，甚至更长，当通过层析法确定苹果酸完全消失时，即说明发酵结束，加入 50mg/L  $\text{SO}_2$ ，酒进入贮藏阶段。
5. 将苹果酸—乳酸发酵的酒与对照酒（未进行）质量对比（酸、pH、色素、多酚、感官品评）。

## 四、思考与练习

1. 试评述苹果酸—乳酸发酵过程中发生的物理与化学现象。
2. 苹果酸—乳酸发酵对葡萄酒质量有何影响？

# 实验八 葡萄酒的化学降酸

## 一、目的和要求

有 100 吨白葡萄酒，酸含量偏高，想通过化学降酸法进行调整。现取回少量样品，请设计降酸实验来筛选出最佳的降酸剂，并确定出其实际的降酸能力。根据实验结果给出这 100 吨酒的处理方案。

## 二、材料与仪器

材料与药品：白葡萄酒、碳酸氢钾、碳酸钙、酒石酸钾

仪器与器皿：天平、0.5L 玻璃瓶、1L 玻璃瓶、量筒、pH 计、烧杯、玻璃棒、药勺、三角瓶、测定酸的装置及试剂等

## 三、实验步骤

1. 测定酒样原始酸度和 pH 值；
2. 目标的酸度和 pH 值；  
如何确定目标的酸度和 pH 值？
3. 设计实验比较不同的降酸剂的降酸效果  
——评价降酸效果包括哪些方面？  
——各种降酸剂的实际降酸效果与理论比较；  
——将 pH 升高单位值需要的降酸剂的量
4. 选择降酸剂，并给出这 100 吨酒的处理方案

## 四、注意

1. 降酸剂是否完全反应？如何解决这个问题？
2. 实验要设计重复；
3. 设计的实验要有可操作性。

## 五、思考

1. 如果不限定是化学降酸，还有哪些方法可以降低酒样的含酸量？
2. 如果是葡萄原料的含酸量高，应在何时用什么方法来调整？

# 实验九 葡萄酒的下胶

## 一、目的和要求

有葡萄酒若干吨，选择合适的下胶材料设计下胶实验，根据实验结果给出这批葡萄酒的处理方案。

## 二、材料与仪器

材料与药品：待下胶的葡萄酒，明胶，膨润土，酪蛋白，单宁，PVPP。

仪器与器皿：100mL 量筒，50mL 烧杯，千分之一天平，玻璃棒，移液管，分光光度计等。

## 三、实验步骤

1. 实验的设计；
2. 下胶剂的准备；
3. 根据设计的胶液浓度梯度进行下胶实验；
4. 每天观察记录下胶结果；
5. 回收上清酒。
6. 分析实验结果，得出最佳下胶方案。

## 四、思考

- 1.不同葡萄酒宜采用的澄清剂的种类？
- 2.如何对澄清剂的效果进行评判？
3. 如何同时使用两种澄清剂？

# 实验十 葡萄酒的稳定

## 一、目的和要求

通过对葡萄酒有关项目的稳定性试验，预测酒的稳定性，学习相关的试验方法，掌握葡萄酒稳定性的预测方法。

## 二、材料与仪器

材料与药品：红葡萄酒，白葡萄酒，酒石酸氢钾，氯化钠，饱和氯化钾溶液，酚酞，0.5mol/L NaOH，10%单宁， $H_2O_2$ ， $K_2S_2O_5$ ， $Na_2S_2O_4 \cdot 2H_2O$ ，5%硫氰化钾，浓盐酸，亚硫酸；

仪器与器皿：比色管（25ml 或 50ml），磁力搅拌器，冰箱，漏斗，水浴锅，电炉，烧杯，玻棒，温度计（ $-20 \sim 100^\circ C$ ），高压灭菌锅，恒温培养箱，挥发酸测定装置，有机酸层析装置。

## 三、操作步骤

### 1. 酒样的准备

用于稳定性试验的酒样必须是澄清，澄清是稳定性试验的前提。

红、白葡萄酒都需要进行的稳定性试验项目：氧化、微生物、铁、酒石

只是红葡萄酒需要进行的项目：色素

只是白葡萄酒需要进行的项目：蛋白质、铜

桃红葡萄酒容易出现与白葡萄酒相同的浑浊；而甜型葡萄酒和开胃酒容易出现红葡萄酒型的浑浊。

### 2. 冷冻试验

目的：用于检验葡萄酒的酒石稳定性和红葡萄酒的色素稳定性。

将葡萄酒装入无色透明的玻璃瓶中，加塞密封，然后放入温度为酒的冰点之上  $0.5^\circ C$  的冰箱中，保持 7 天，每天观察透明度变化情况。酒样仍然澄清，说明该酒在冷冻的情况下是稳定的。若有浑浊沉淀，说明该酒在冷冻的情况下是不稳定的，经离心分离，取其沉淀物于显微镜上检查。若有结晶析出即为酒石结晶；若为絮状沉淀，则多有蛋白质或胶体沉淀；若沉淀物带有色泽，则为单宁色素或单宁蛋白质沉淀物。

将酒样在结冰条件下维持 8—24hr，冰晶融化之后如果出现盐的结晶则意味着酒液不稳定。

#### 1) 检验酒石稳定性的方法

于 250ml 烧杯中注入 50ml 待测葡萄酒，准确称取 0.125—0.15 目的分析纯酒石酸氢钾 200mg，加入酒中，烧杯中放入磁力搅拌棒，然后将烧杯置于铜制水浴锅中，烧杯周围堆放

冰盐混合物（冰盐比为 5: 11），使温度保持在 0—1℃，水浴锅放在磁力搅拌器上，开动磁力搅拌器，烧杯中的葡萄酒得以匀速搅拌，经 2 小时的搅拌后，将析出的沉淀物倾至漏斗中的滤纸上，用 30ml 饱和氯化钾液洗涤，将滤纸及沉淀物移入 500ml 烧杯中，加入中性蒸馏水 50ml，加热待沉淀溶解后，加入酚酞指示剂，用 0.5mol/L NaOH 溶液滴定，然后计算出酒石酸氢钾值。

如果 50ml 葡萄酒中析出的酒石酸氢钾小于 200mg，则不会发生结晶性浑浊沉淀；如果超过 212mg，则表明酒石不稳定。

## 2) 通过测定葡萄酒的电导率来检验酒石稳定性

冷冻处理前后电导率的变化值若小于 25  $\mu$ s，葡萄酒是稳定的；若大于 25  $\mu$ s 小于 50  $\mu$ s，葡萄酒有酒石沉淀的危险；若大于 50  $\mu$ s，则葡萄酒酒石不稳定。

## 3) 通过分析酒石含量来预测酒石稳定性

若酒石含量低于 0.7g/L，则该葡萄酒酒石稳定。

测定饱和温度来判断酒石稳定性。

某温度下酒石的稳定性检测：100ml 酒样在搅拌下降至预定温度，加入 1.5g 粉状酒石酸氢钾晶种，记录初始电导率读数。大约 20 分钟后，记录平衡时的电导率读数。只有读数的变化超过仪表精度的 2 倍以上，才能表明电导率真正起了变化。

## 3. 热稳定性试验

目的：主要检验白葡萄酒的蛋白质稳定性。

将葡萄酒装入 500ml 无色透明的玻璃瓶中，瓶颈空隙只保留 15—20mm 的距离，放入 55℃ 保温箱中，24、48 和 72 小时后观察其清浑变化。如果在 24 小时热处理后失光变浑，白葡萄酒多为蛋白质不稳定；如果在 48 和 72 小时浑浊沉淀，则多为酚类化合物不稳定或单宁蛋白质不稳定。

另外，可取 200ml 烧杯，装满葡萄酒，加入 2ml 10%（或 0.5g/L）的单宁液，在 80℃ 水浴中加热 30 分钟，冷却后（24 小时后），如果葡萄酒出现絮凝沉淀，则表明它具有引起瓶内蛋白破败的过量蛋白。

## 4. 氧化试验

目的：检验葡萄酒的氧稳定性，包括氧化稳定性和铁稳定性。

在 3 个 100ml 的烧杯中各装入 30ml 酒样，一个为对照，另外 2 个分别加入 30%  $H_2O_2$  5ml, 3mg  $K_2S_2O_5$ ，用塞密封摇匀或用玻璃棒搅匀，用纸盖严，放置，每天观察其变化，以 4 天的变化为依据，继续观察至一周。

如果三者均澄清，未出现浑浊，说明该酒有较强的抗氧能力，可在较长时间内不出现氧化性浑浊沉淀；如果加  $H_2O_2$  者浑浊，另两者澄清，或空白有轻微失光，说明该酒有一定的抗氧能力；如果加  $K_2S_2O_5$  者澄清或轻度失光，空白失光或浑浊，说明该酒对氧极不稳定。

氧化条件下浑浊沉淀的葡萄酒可能是氧化破败，也可能是铁破败。

如果在氧化条件下葡萄酒变为乳色，甚至出现灰白色沉淀，且在加入少许连二亚硫酸钠后重新变为澄清状，则为铁破败。或者将最为浑浊的部分装入试管并加入 2ml 浓盐酸和 5ml 5% 的硫氰化钾，如果溶液变红，则为铁破败。

## 5. 铜稳定性试验

目的：检验白葡萄酒和桃红葡萄酒的铜稳定性。

如果葡萄酒中铜含量低于 0.5g/L，则不会出现铜不稳定性；如果高于 0.5g/L，就有产生

铜破败的危险。取一无色瓶，装满葡萄酒，加入 0.5ml 8%的亚硫酸，密封，水平置于非直射阳光下一周，如果葡萄酒变浑，并且在通气后重新变清，则为铜破败。

也可将葡萄酒平放于 30℃ 的恒温箱中 3—4 周进行检验。

#### 6. 微生物稳定性

目的：检验葡萄酒中微生物的稳定性。也可用于了解葡萄酒是否容易感染微生物病害，或检查过滤或离心效果。

还原糖的测定：用菲林试剂滴定葡萄酒中的还原糖。

苹果酸的测定：通过有机酸层析，判断苹果酸—乳酸发酵是否进行，或进行得是否彻底。

微生物计数：在显微镜下观察或通过培养对葡萄酒中的微生物进行计数。细菌 $\leq 50$ 个/ml，大肠菌群 $\leq 3$ 个/100ml。

温箱试验：醋酸菌试验（好气性微生物）、其他病害试验（厌气性微生物）P238

注意：保证是葡萄酒中的微生物在适宜的条件下进行的活动，而非来自于环境和容器等。

## 四、思考

葡萄酒在什么时间需要进行哪些项目的稳定性试验？对试验结果如何使用？

# 实验十一 葡萄酒的除铁—蓝色下胶法

## 一、目的和要求

学习黄血盐除铁的方法及操作技术

## 二、材料与仪器

材料与药品：干白葡萄酒（含铁量超过 20mg/L），

0.5%黄血盐标准液：准确称取黄血盐 0.5000g，用少量水溶解，加水定容至 100ml，盛于棕色瓶中，可存放 1 个月。

0.2%单宁液：称取单宁 2g,溶于少量水中，加 96%（v/v）酒精 120mL，加水定容至 1L。

0.2%明胶液：称取明胶 2g，用 200mL 水溶解，加 8g 酒石酸，96%（v/v）酒精 120mL，加水定容至 1L。

5%黄血盐与赤血盐混合液：称取 5g 黄血盐与 5g 赤血盐，溶于 100mL 水中，溶液保存于棕色瓶中。

饱和铁铵矾溶液

10%盐酸：量取浓盐酸 230mL，用水稀释至 1L。

测铁试剂

仪器与器皿：量筒，烧杯，三角瓶，玻棒，滴管等。

## 三、操作步骤

1. 在 5 个具塞试管中，分别加 40mL 葡萄酒，准确吸取 0.5%黄血盐标准液 0.4, 1.2, 2.0, 2.8, 3.6mL，分别加入上述试管中，相当于在 100L 葡萄酒中添加 5, 15, 25, 35, 45g 黄血盐。
2. 向每个试管中加入 4mL 单宁液，摇匀后加 4mL 明胶液，15 分钟后过滤或离心，溶液分 A、B 两组。
3. A 组滤液中各加 2 滴 5%黄血盐与赤血盐混合液，1mL10%盐酸。如果出现蓝色或青色，说明酒中还有剩余铁，显色不明显说明铁已除尽或黄血盐过量；B 组滤液中各加 2 滴铁铵矾液，1mL10%盐酸。如果出现蓝色或青色，证明黄血盐过量；显色不明显，说明黄血盐不足，或酒中有剩余的铁。
4. 如果确定出 100L 葡萄酒中应添加的黄血盐的量在 25—35g 之间，可取 4 个试管，装 40mL 葡萄酒，分别添加 2.16, 2.32, 2.48, 2.64mL0.5%黄血盐标准液,相当于在 100L 葡萄酒中添加 27, 29, 31, 33g 黄血盐，其余操作同前。
5. 如果此次实验得出的黄血盐的量在 31—33g，则取其平均值为 32g，为了不使黄血



盐过量，应将上述结果减去 3g，即每 100L 葡萄酒的下胶量为 29g，过滤，测定葡萄酒中的含铁量。

#### 四、思考

黄血盐除铁中，为什么其用量要比理论量小？

# 实验十二 葡萄酒病害诊断

## 一、目的和要求

学习对葡萄酒病害（浑浊沉淀）的鉴别、诊断方法。

## 二、材料与仪器

材料与药品：生病的葡萄酒，无水乙醇，5%亚铁氰化钾，6mol/L HCl，浓硫酸，Folin试剂，1mol/L 硫酸铜溶液，6mol/L NaOH，1mol/L KOH，硫氰化钾，亚硝酸钴钠，乙酸，1mol/L 酒石酸氢钠，6mol/L 氨水，30%过氧化氢，H<sub>2</sub>S，草酸铵溶液，3mol/L 硝酸，钼酸铵溶液  
仪器与器皿：离心机，显微镜，磁板，烧杯，比色管，电炉，水浴锅，冰箱，玻棒，胶管

## 三、操作步骤

### （一）外观检查

- 1 观察酒液清浑程度，有无沉淀，沉淀物的色泽和形状。
- 2 密闭加热实验：取病酒一瓶，除去标签，并摇动酒瓶使沉淀物均匀分布于酒中，然后将该酒放在水浴中，缓慢升温至 50-55℃，保温半小时，取出冷却至室温，与对照样品比较其浑浊度。如果浑浊减轻或消失，有可能是酒石酸盐或铁破败病；反之，可能有铜破败病。
- 3 开瓶观察：取病酒一瓶，翻转酒瓶使沉淀物均匀分布于酒中，仔细开启瓶盖，注意观察有无特殊情况，如果看到瓶口“冒烟”或看到起泡现象，说明酒中有微生物活动。

### （二）沉淀物的分离与检验

- 1 取病酒一瓶，用离心机仔细分离沉淀。沉淀物挑出少数进行镜检，其余的用冷的无水乙醇反复洗涤，直至洗涤液用亚铁氰化钾检查无 Fe<sup>3+</sup>反应为止，沉淀物用于分析检查。
- 2 沉淀物的镜检：把未经洗涤的沉淀物置于 600 倍左右显微镜下观察，并绘图记录有无微生物活动，一般加碘液染色，可容易镜检到流动的菌体；用次甲基兰染色可检验死、活酵母细胞，死细胞被染成深蓝色；镜检物出现稍大的无定形结晶颗粒并带有酒的颜色，则是酒石酸盐类；无定形颗粒可能是单宁铁、磷酸铁、铜类、单宁色素或蛋白质等物质。
- 3 主要的物理化学性沉淀的鉴别方法

浑浊类型	浑浊特点
铁破败病	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 在低温下溶于 HCl 稀溶液，加热融解加快；</li> <li>2. 加入 1g 连二亚硫酸钠立即融解（特殊反应）；</li> <li>3. 清洗后的沉淀物加入 HCl 和硫氰酸盐后呈红色。</li> </ol>
铜破败病	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 在低温下溶于 HCl 稀溶液，加热融解加快；</li> <li>2. 在空气中放置 24-48 小时后，葡萄酒重新变清（特殊反应）。</li> </ol>
蛋白质破败病	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 不溶于稀释 HCl 稀溶液；</li> <li>2. 加热至 80℃ 即融解。</li> </ol>
色素沉淀	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 在 40℃ 下融解或溶于酒精；</li> <li>2. 在显微镜下呈有色的细粒、堆状、片状。</li> </ol>
酒石沉淀	<p>酒石酸氢钾：溶于热水，结晶具酸味。</p> <p>中性酒石酸钙：不溶于热水；溶解于微酸性溶液中的结晶，可产生草酸钙沉淀反应。</p>

## 四、注意

- 1 从病酒中分离出的沉淀物应尽快地进行检验和分析，避免在保存时感染杂菌，影响结果的正确性。
- 2 定性检查所用试剂纯度越高越好，以免由于试剂不纯而引起的干扰，否则应做空白试验。

## 五、思考

- 1 各类葡萄酒容易出现哪些病害？
- 2 如何防治葡萄酒的病害？

# 实验十三 葡萄酒的酿造

## 一、目的和要求

有冷库贮藏的赤霞珠红葡萄酒 10Kg，欲生产红葡萄酒，请根据原料的状况决定做什么类型的红葡萄酒，在完成酿酒的过程中，还需要掌握活性干酵母的使用方法和发酵液中酵母菌的计数方法

## 二、材料与仪器

材料与药品：红色酿酒葡萄，白砂糖，菲林试剂 A、B，NaOH 溶液，亚硫酸，活性干酵母，果胶酶。

仪器与器皿：不锈钢桶，广口瓶，量筒，温度计，比重计，测定糖和酸的装置

## 三、实验步骤

1. 确定酿造红葡萄酒的类型
2. 确定工艺方案，制定工艺流程，记录发酵记录表，注意辅料使用的时间、方法和用量（SO<sub>2</sub>，果胶酶，单宁，干酵母），糖和酸调整的时间和方式
3. 浸渍发酵的管理
4. 子实验：活性干酵母的使用
5. 子实验：发酵液中酵母菌的计数
6. 分离时间的确定，发酵结束的判断

## 四、注意

比重计的使用

## 五、思考

根据原料的状况确定酒的种类和类型的依据？

附子实验：

### 活性干酵母的使用

## 一、目的和要求

了解活性干酵母的特性，能够正确使用商品化的活性干酵母。

## 二、材料与仪器

材料与药品：待发酵的葡萄醪，活性干酵母

仪器与器皿：千分之一天平，温度计，量筒，电炉，水浴锅等。

## 三、实验步骤

1. 按照葡萄醪的状况和活性干酵母的说明确定添加酵母的量；
2. 按照活化说明进行活化，活化剂的量、温度、时间、温差、是否搅拌；
3. 接种到发酵罐进行开放式倒罐。

## 四、思考

不同活性干酵母活化的共同之处？

# 发酵液中酵母计数—血球计数板法

## 一、目的和要求

学习血球计数板的构造、原理、计数的方法，掌握显微镜下直接计数的技能。

## 二、材料与仪器

正在发酵的葡萄醪，显微镜，血球计数板，盖玻片，吸水纸，擦镜纸，移液管，容量瓶等

## 三、实验步骤

1. 显微镜下观察血球计数板的网格情况
2. 把发酵液滴在网格上，盖上盖玻片，盖玻片两边所附载玻片台上不能沾上发酵液，要避免产生气泡，让多余的发酵酒流入液槽内。
3. 静置数分钟，使酵母菌细胞沉积在一个平面上，在低倍镜和高倍镜下观察。
4. 在高倍镜下选择 5 个视野，每个视野任意计数 5 个小方格内的细胞数，对于小方格四边压线的细胞，只计两个边。然后求出一个小方格的细胞平均数，计算每毫升发

酵液中的细胞数。

5. 计数完毕，取下盖玻片，用蒸馏水把血球计数板冲洗干净，用吸水纸吸去载玻片计数台上附着的水，再用擦镜纸擦干计数板，放入盒内保存。

## 四、思考

对发酵液中的酵母用血球计数板直接测数有什么优缺点？

# 实验十四 葡萄酒的过滤和灌装

## 一、目的和要求

要求学生熟悉各种过滤机的原理，掌握过滤操作的步骤和注意事项。对过滤后的葡萄酒进行灌装，掌握机械化灌装时重要的质量控制点，熟悉手工灌装的方法。

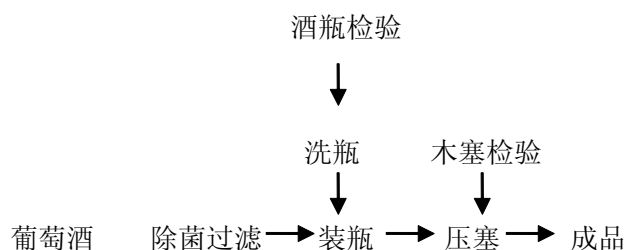
## 二、材料与仪器

材料与药品：葡萄酒，木塞，胶帽；

仪器与器皿：除菌过滤机，酒瓶，打塞机，游标卡尺，烘箱，天平，显微镜，培养皿，无菌过滤膜，血球计数板等。

## 三、实验步骤

### 1. 熟悉葡萄酒封装的步骤：



### 2. 对葡萄酒进行过滤；

了解灌装材料，熟悉除菌过滤机操作，过滤机的清洗、维护。

### 3. 对葡萄酒进行灌装。

- (1) 检查酒瓶和木塞是否合格；
- (2) 在实习酒厂观察机械过滤、灌装的流程，认真考虑灌装时的质量控制点；
- (3) 进行手工灌装，压塞操作，体会手工灌装方法的注意点。

### 4. 软木塞的检验

(1) 物理性质检验：检验软木塞的以下方面，并记录。

木塞尺寸：长度 $\pm 0.5\text{mm}$ ，直径 $\pm 0.4\text{mm}$ ，倒角 $45^\circ$ 。

印刷或烙印：正确、完整、清晰、油墨无气味。

塞体：涂层平整结实，色泽均匀，斑点、孔洞等缺陷符合等级要求，圆柱体无变形。

两端头：大于5个年轮，完整，沟槽缺陷 $< \text{直径} \times 1/3$ 。

气味：无霉味及其它异味。

(2) 湿度测定：天然塞为 $6.5 \pm 1.5\%$ ；复合塞 $6.0 \pm 2\%$

测定方法是，先将木塞称重后，将木塞在 $105^\circ\text{C}$ 的烘箱中烘24小时，在称重，直至

两次称重的结果一致。将称重前后的重量相减，即可计算出木塞的准确湿度。该方法非常精确，但所需时间很长。故常用带插入式电子探头的湿度计测定木塞湿度的近似值。

### (3) 木塞去尘检验

取 10 只木塞，在 200mL 蒸馏水或蒸馏水—酒精溶液（最好加点洗涤剂）中搅动清洗。将溶液过滤，待干燥后，木塞清洗前后的重量差，就是其灰尘的精确量。每个木塞的灰尘量不得超过 3mg。

检查打塞机是否会损坏木塞，酒瓶和打塞机口是否对齐。

### (4) 木塞的微生物检验

若干木塞在 200mL 的无菌水中搅拌清洗 15 分钟。为了将皮孔中的微生物洗出，最好在水中加入洗涤剂。将洗涤液用无菌过滤膜过滤，过滤膜在琼脂培养基上培养后计数。

### (5) 木塞的弹性

取三只木塞，测量其直径，然后从打塞机中经过，马上测量其直径，5 分钟后，10 分钟后，24 小时后再分别测量其直径，计算木塞在不同时间的回复性。

### (6) 打塞试验

选取 20 个具有代表性的软木塞打入瓶中，注意打塞过程中木塞是否有异常的破裂、掉渣现象，其中的 2 瓶在打入塞 5 分钟后用开瓶器打开，感觉木塞与瓶颈间的持着力（有条件的话，可用专门仪器检查）。

将剩余的 18 瓶中的 12 瓶卧放于室温条件下，3 瓶卧放于 3-5℃ 环境中，另外 3 瓶卧放于 35℃ 左右的环境中，8 小时过后，检查是否有渗漏现象以及木塞与瓶颈的持着力。如果上面质量检查良好的话，将室温条件下的 12 瓶继续保存以备更长时间的检查。

### (7) 浸泡试验

TCA (2, 4, 6-trichloroanisole, 三氯茴香醚) 是该项检验的主要目的。它常给酒带来不愉快的陈腐味。许多专家认为它与木塞加工过程中接触氯有关。

准备 11 只 250ml 的磨口瓶（或其它可以密闭的容器），刷净。选取有代表性的木塞 20 只，在其中的 10 只瓶中各放置 2 只木塞，然后在 11 只瓶中都加入干白葡萄酒，注意瓶内不能有空气。在室温 20℃ 左右下浸泡一天，浸泡结束后倒入洁净的品酒杯中，无木塞浸泡的酒作为对照，通过品尝确定木塞品质的好坏。

## 5. 酒瓶的清洗和检验

(1) 酒瓶的清洗：含 NaOH 1% 的碱液在 60℃ 浸泡 10 分钟，然后冲洗干净。

(2) 酒瓶的检验

酒瓶外观：检验酒瓶是否满足装酒适用，安放稳定，造型美观，清洗方便，贴标牢妥，使用顺手；是否周正，玻璃是否光洁、平滑，有无气泡，壁是否厚薄均一；是否容易破碎。

酒瓶的容积：20℃ 时要求的容积及应达到的高度。

酒瓶是否无菌包装。

## 四、思考

葡萄酒的过滤和封装中应注意哪些问题？



# 实验十五 《葡萄酒学》实习调查提纲

## 一、气候、土壤条件

### （一）地理位置

### （二）气候条件

1. 气候特点
2. 主要气候指标（温度、降水、日照、相对湿度等）的总量（多年平均）和在一年中的分布情况。
3. 当年的气候特点

### （三）土壤条件

1. 成土母质类型
2. 土壤的物理、化学特性
3. 地形、地貌

## 二、葡萄栽培

### （一）栽培品种及其表现情况

### （二）栽培技术

1. 砧木
2. 种植密度
3. 种植方式（架式）与冬季管理
4. 修剪
5. 施肥
6. 排灌系统
7. 埋土防寒情况（时期）及冻害情况

### （三）各品种、各年份的成熟状况及成熟度控制

1. 糖变化曲线
2. 酸变化曲线
3. 重量变化曲线
4. 体积变化曲线
5. 各品种的最佳成熟度指标
6. 出汁率

### （四）用于生产葡萄酒的类型、质量特点

### （五）主要病虫害及其发生规律、防治措施及效果

### （六）经济效益分析

1. 成本（包括建园、栽培、管理、病虫害防治等）
2. 产量（单产、总产和各品种的产量）
3. 销售价格
4. 平均单产效益
5. 鲜食与酿酒品种效益比较
6. 与当地主要农业产品的效益比较

### 三、葡萄酒厂的设计人员构造

#### （一）土建

1. 各车间的面积、构造及其分布和联系
2. 管理和清洁情况
3. 改造和扩大的可能性
4. 分析室（实验室）情况

#### （二）设备

1. 设备的种类、数量、生产厂家、型号、功能、结构、价格及维修等。
2. 所有设备是否与生产工艺要求相适应

#### （三）人员构成

1. 描绘人员结构图
2. 管理方式
3. 管理人员、生产人员、科研人员、供销人员的总和及比例
4. 固定人员、临时人员的总数和比例
5. 总工程师、副总工、高工、工程师、助工、技术工人的总数和比例

### 四、葡萄酒酿造

#### （一）发酵的准备

1. 设备、发酵容器的清洗和准备
2. 原料的健康与卫生状况
3. 采收依据
4. 原料的接收
  - 接收工地的组织
  - 运输方式
  - 原料的称重、分级、去处
  - （原料的快速分析）

#### （二）原料的机械处理

1. 破碎
  - 设备的流量
  - 破碎过程中存在的问题

2. 是否除梗

除梗比例、设备的流量  
果梗的利用

(三) 原料的改良

1. 测定糖、酸含量

2. 确定是否加糖、降酸等

3. 加糖时期、量的确定

4. 降酸剂的种类、使用时期

5. 葡萄汁的预处理, 使用试剂、种类、量

(四) 装罐的准备

1. 发酵罐的准备

2. 浸渍、发酵时间

3. 发酵记录、发酵曲线

4. 各酒种发酵温区、控温措施

(五) 出罐

1. 出罐时间的确定

2. 自流酒的利用

3. 出汁率

4. 出渣

(六) SO<sub>2</sub> 处理

1. SO<sub>2</sub> 的使用形态

2. SO<sub>2</sub> 溶液的制备

3. 使用方法和浓度

(七) 酵母菌

1. 使用类型

2. 酵母母液的制备

3. 使用方法、效果

(八) 苹果酸——乳酸发酵情况

1. 是否进行

2. 触发条件

3. 控制措施

(九) 压榨

1. 压榨酒的出汁率

2. 压榨酒的成分

3. 压榨酒的比重

4. 皮渣的利用

(十) 装灌葡萄酒及生产线情况

(十一) 各档次葡萄酒的生产比例及销售状况、市场分布、效益比较

## 五、葡萄酒厂的经济效益分析

1. 固定资产
2. 工作人员总数
3. 产量
4. 产值
5. 灌装损失率
6. 瓶子损失率
7. 吨酒耗煤、耗水、耗电量（合人民币）
8. 全员劳动生产率

## 六、葡萄酒厂的全面质量管理（TQC）

- （一）TQC 的实施情况
- （二）企业级别
- （三）优化组合情况

## 七、葡萄基地和葡萄酒一条龙生产情况

## 八、各环节的主要经验和存在问题