

研究型综合实验教学改革

——关于酒酿制作和关键微生物分离实验的探讨

王英明^{1,2}(✉), 肖义平^{1,2}, 刘明秋², 徐德强^{1,2}, 乔守怡^{1,2}

1. 生物科学国家级实验教学示范中心(复旦大学), 上海, 200433
2. 复旦大学生命科学学院, 上海, 200433

摘要: 随着教学改革的不断深入, 综合性大学微生物学实验课程教学在强调技能培养和操作训练同时, 越来越重视解决典型问题的科研能力的培养, 为本科生开设研究型综合实验是必然选择。开设的研究型实验应接近科研, 难度适当。因此, 我们开设了酒酿制作和关键微生物分离实验, 要求学生分离和研究发酵过程中的关键真菌, 使学生了解传统的饮食文化, 认识酒酿制作微生物学原理的同时, 强化微生物学实验技术, 熟悉典型的功能微生物研究路线。

关键词: 酒酿, ITS, 研究型综合实验, 米根霉, 酵母

Reform of Research-based Comprehensive Experimental Teaching: Exploration of Making Jiuniang and Separating Key Microorganisms

Wang Ying-ming^{1,2}(✉), Xiao Yi-ping^{1,2}, Liu Ming-qi^{1,2}, Xu De-qiang^{1,2}, Qiao Shou-yi^{1,2}

1. National Demonstration Center for Experimental Biology Education (Fudan University), Shanghai 200433, China
2. School of Life Sciences, Fudan University, Shanghai 200433, China

1 引言

微生物学实验是以微生物为研究对象的实验课程, 操作多, 技能要求高, 有助于养成生物学研究的良好习惯, 是细胞生物学、基因工程等诸多生命科学实验课程的重要基础, 在生命科学人才培养中

占有重要地位。国内综合性大学的生物科学和生物技术专业一般都开设了微生物学实验课, 开设的课程内容大致包括两类: 基础实验和综合实验。基础实验大多是简单的验证性实验, 培养学生严格、规范和准确地进行各类操作, 包括操作训练和微生物的特征观察等, 前者如材料准备、灭菌、微生物的分离、培养、染色和显微镜观察等, 后者如微生物的计数、生理生化特征和生物学活性研究等。综合实验是综合运用所学技能和方法的实验, 但大部分属于测定或分离等工作, 如 MPN 法测定水中总大肠菌群等。这些教学内容主要在教师全程指导下完成, 工作不连续, 内容较零散, 结果可预期, 和科研工

收稿日期: 2018-12-05; 修回日期: 2019-01-21

基金项目: 国家基础学科人才培养基金项目(J1210012); 上海市教委本科教学质量和教学改革计划

通讯作者: 王英明, E-mail: yingming_w@fudan.edu.cn

作的相对独立性、内容的延续性和完整性、结果的不确定性等特点差距很大，不利于培养优秀的科研人才。因此，开设接近科研、解决具体问题、强化研究能力培养的综合型研究实验是综合性大学微生物学实验课程必不可少的教学内容。以学生独立完成为主的研究型综合实验，还要考虑内容的代表性、安全性、可行性、趣味性、先进性等方面。

酒酿是我国传统的高糖低酒精发酵食品，是把糯米或大米蒸熟，拌上小曲（酒药），适温发酵制得，霉菌〔主要是根霉（*Rhizopus* spp.）和毛霉（*Mucor* spp.）等〕和多种酵母发挥了主要作用。国内很多普通微生物学实验课教材都介绍了用小曲制备酒酿的实验^[1-3]，或进一步分离其中根霉^[4-6]，还有个别教材介绍了从酒曲中分离酵母^[7]。通过这个实验，能够了解我国悠久的饮食文明历史和利用微生物的科技史，制作的酒酿可以食用，并学习分离和观察根霉，是一个非常好的教学实验。在酒酿发酵过程中，最初霉菌〔特别是米根霉（*Rhizopus oryzae*）〕快速生长，水解淀粉产糖；随后主要是酿酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）利用糖发酵产酒精^[8]；此外，其他真菌和多种细菌活动，有助于形成复杂、醇厚的风味。小曲种类、用量、糯米饭的含水量、透气性、发酵温度和时间等多种因素都影响着发酵过程中微生物的活动。因此，我们在微生物学实验课中开设了综合型研究实验——酒酿制作和关键微生物分离，并根据文献资料和实验教学的客观情况，对部分内容进行了充实和改进，使之成为一个典型的功能微生物研究实验：既分离和观察霉菌，也分离和观察在酒酿发酵中发挥重要作用的酵母；既观察个体形态、菌落特征等表型特征，又采用了分子生物学和生物信息学技术研究基因型特征——用 ITS 序列鉴定酵母；最后，用实验中分离到的霉菌和酵母制作酒酿，观察霉菌水解淀粉和酵母发酵产酒精的活性。

2 实验设计

2.1 实验材料

糯米、小曲（蜜蜂牌甜酒曲）、马铃薯葡萄糖琼脂（PDA）培养基^[4]、WL 营养琼脂培养基^[9]、植物直接 PCR 试剂盒（包括裂解试剂 PD1、中和

试剂 PD2 和 2×PCR 预混液）、引物 ITS1 和 ITS4（20 μmol/L）、EB 溶液（5 mg/mL）、50×TAE 电泳缓冲液、DNA Marker。

2.2 实验步骤和方法

实验的主要流程见图 1。

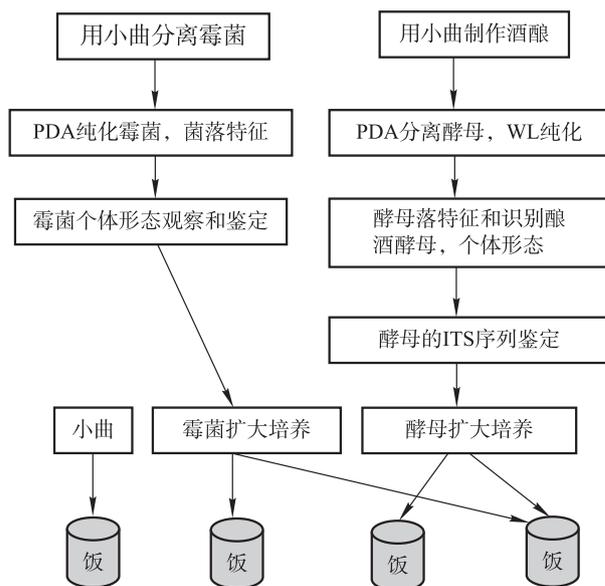


图 1 酒酿制作和关键微生物分离实验流程

① 根霉的分离：用小曲在 PDA 平板上画线，培养过夜后，采用菌落前端切割法分离快速生长的霉菌。观察菌落特征和个体形态，初步确定是否为米根霉^[10]。扩大培养，作为制作酒酿的菌种。

② 酒酿的制作：烧杯中加浸泡充分、淘洗干净的糯米和适量清水，用蒸锅隔水蒸至糯米饭熟透。冷却后拌入研细的小曲，28℃ 发酵，逐日观察，一般 1 d 后出现醪液，2 d 后气味醇正，醪液量较多，可以用来分离酵母。

③ 酵母的分离：取醪液在 PDA 平板上画线分离酵母，随机挑菌落，用 WL 营养琼脂平板纯化，4 d 后观察菌落特征，根据菌落特征判别是否为酿酒酵母。酵母接种 PDA 斜面，培养 1 d 后观察个体形态。选一株酵母提取基因组 DNA 进行鉴定，选一株用来制作酒酿。

④ 酵母的 ITS 鉴定：适量酵母用无菌水洗涤后，离心收集沉淀，用植物直接 PCR 试剂盒的 PD1 溶液加热裂解，再加 PD2 溶液中和，得到总 DNA。

用引物 ITS1 和 ITS4 作为引物进行 PCR 扩增，产物经琼脂糖电泳，确定目的条带的有无和 PCR 产物的量。成功扩增的 PCR 产物送生物技术公司测序。测序结果在 WESTERDIJK 研究所网站 (<http://www.westerdijk.nl/Collections/>) 进行在线鉴定。

⑤ 用纯化的真菌制作酒酿：4 杯糯米饭中分别加入小曲、根霉、酵母、根霉加酵母，发酵 3 d，观察结果，比较用不同霉菌和酵母制作酒酿的品质。

3 实验设计的分析和讨论

3.1 实验内容的安排

霉菌和酵母是两类在酒酿发酵中发挥关键作用的微生物，其中米根霉最重要。很多学校都开设了有关的实验，但一般只用小曲制作酒酿，或分离和观察霉菌。从 2002 年我们在微生物学实验课上开设了酒酿制作和分离霉菌、酵母的实验，实验从制作酒酿开始，然后分离霉菌和酵母，观察其形态特征，并用分离到的霉菌和酵母制作酒酿；2012 年又增加了 WL 营养琼脂鉴定酿酒酵母和 ITS 鉴定酵母的内容，在传统的微生物学研究路线中引入新的研究方法。至此，我们开设的酒酿制作和关键微生物分离实验成为一个综合型研究实验，从分离微生物开始，随后进行菌落特征和个体形态观察，最后是分子鉴定和活性研究。实验内容比较全面，完整，是典型的微生物学研究路线。

3.2 曲的选择

市场上的小曲可分三类，传统小曲、浓缩甜酒曲（米根霉）和改良小曲（传统小曲额外接种米根霉），这些小曲中都容易分离到米根霉。用浓缩甜酒曲制作酒酿容易成功，但不易分离到酵母。因为这个实验既要制作酒酿，也需要分离米根霉和酵母，因此选择了蜜蜂牌甜酒曲，这是一种改良小曲，制作酒酿比较容易成功，也容易从醪液中分离到多种酵母。

3.3 用 WL 营养琼脂鉴别酿酒酵母

酵母不易从小曲中直接画线分离到，特别是酿

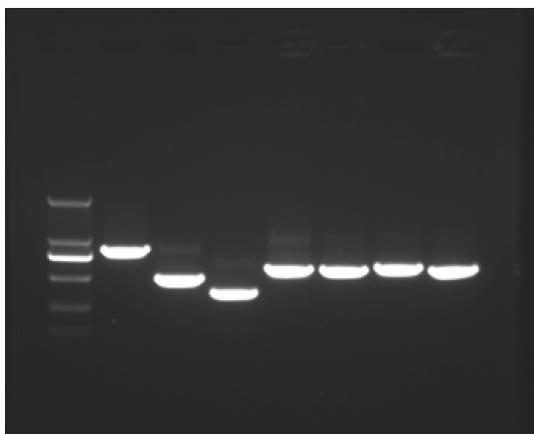
酒酵母更少，所以用 PDA 平板从醪液中画线分离。根据个体形态和 PDA 平板上菌落特征难以区分酿酒酵母 (*Saccharomyces* sp.) 和毕赤酵母 (*Pichia* sp.) 等，因此采用 WL 营养琼脂平板纯化分离到的酵母。WL 营养琼脂培养基在葡萄酒发酵工业上用于同时计酿酒酵母、非酿酒酵母和细菌的活菌数^[9, 11]。根据菌落特征（菌落圆形，边缘整齐，黄绿色，圆锥形突起，表面比较湿润，光滑，明亮），可以挑选酿酒酵母进行发酵实验，选择感兴趣的菌株进行 ITS 序列鉴定。

3.4 酵母的 ITS 鉴定

微生物的分类鉴定是微生物学科研工作的基础，基于遗传特征的分子鉴定已经是目前微生物学实验教学不可缺少的内容，用代表性片段同源性分析进行微生物鉴定（16s rDNA、ITS rDNA 等）比较可行，实验内容包括：提取微生物基因组，PCR 扩增代表性片段，测序，序列和数据库进行比对和分析等。ITS 序列是真菌鉴定最常用的代表性片段，多拷贝，采用保守的通用引物进行扩增，长度合适（350 ~ 1 000 bp），网上数据也比较全面。

酵母基因组 DNA 的提取方法大都比较繁琐，如用蜗牛几丁质酶消化细胞壁，或用液氮冷冻、研磨破壁等，并不适合学时有限的本科生实验。这里采用了植物直接 PCR 试剂盒提取基因组 DNA，并用配套的 2 × PCR 预混液进行扩增。基因组 DNA 提取约需 0.5 h，PCR 扩增耗时约 2 h，琼脂糖电泳检测约需 0.5 h，这部分实验内容可以在半天内完成。分离到的所有种类酵母都可以扩增到产物，PCR 扩增效率较高（部分分离酵母的 PCR 扩增结果见图 2）。测序时绝大部分实验组的酵母菌株（95% 以上）可以得到良好的测序结果，只有少部分酵母菌株因各种原因导致测序结果不可用。

得到 ITS 序列以后，由于实验的工作量已经较大，因此只要求在 WESTERDIJK 研究所网站进行在线鉴定，给出最后的结果。WESTERDIJK 研究所是著名的真菌研究机构，网站的数据比较齐全和专业。分离得到的大部分酵母可以鉴定到属（酿酒酵母和毕赤酵母数量较多），部分可以鉴定到种（如 *Clavispora lusitaniae*）。鼓励学生构建系统发育树，这样结果更准确。



M 1 2 3 4 5 6 7

图2 部分分离酵母的PCR扩增结果

1. *Saccharomyces* sp.; 2. *Pichia* sp.; 3. *Clavispora lusitanae*;
4. *Cyberlindnera fabianii*; 5. *Wickerhamomyces anomalus*;
6. *Saccharomycopsis fibuligera*; 7. *Rhodotorula* sp.; M, Marker-D
(100, 250, 500, 750, 1000, 2000 bp)

3.5 时间安排

实验的主要内容安排在两个半天的课堂上完成,第一个半天,教师讲解后,学生制作酒酿,准备各种培养基,分离霉菌,利用教师提供的酒酿画线分离酵母。一周后的第二个半天,安排提取酵母基因组DNA、PCR扩增和电泳检测,并进行真菌发酵实验和形态观察,其他实验内容由学生在课外时间完成。

4 结语

微生物的分离、形态特征观察和功能研究传统的微生物学研究内容,而分子生物学技术和生物信息学技术是现代微生物学研究的重要手段,是目前的微生物学实验教学中不可或缺的内容。我们在微生物学实验课开设了研究型综合实验——酒酿制作和关键微生物的分离,将这些内容有机结合在一起。学生制作酒酿,分离酒酿发酵中发挥关键作用的霉菌和酵母,进行菌落和个体形态观察,根据个体形态和菌落特征确定是否分离到米根霉;利用WL营养琼脂筛选酿酒酵母,并用ITS序列鉴定;最后,用分离到的霉菌和酵母制作酒酿,研究它们在酒酿发酵中的活性。这是一个比较完整的微生物学研究

课题,实验内容贴近生活,有趣,安全,具有一定的探究性,比如有学生评课时说:“(微生物)实验课上我们做了许多有意思的实验,比如制作酒酿的时候,我们大家一起比较谁的酒好喝,大家加的菌差不多,味道却相差很大。”这个实验采用经典方法和研究路线,解决有代表性的微生物学问题,工作较为完整和系统,实验结果具有一定的开放性,着力于培养和训练科研创新能力,兼具安全、有趣等特征,适合在本科生的微生物学实验课程中开设,已取得了良好的教学效果。

参考文献

- [1] 陈珊,刘东波,李凡.微生物学实验指导[M].北京:高等教育出版社,2012.
- [2] 戚洪泉,郭立忠.微生物学实验教程[M].北京:高等教育出版社,2010.
- [3] 袁丽红.微生物学实验[M].北京:化学工业出版社,2010.
- [4] 周德庆,徐德强.微生物学实验教程[M].3版.北京:高等教育出版社,2013.
- [5] 闵航.微生物学实验[M].杭州:浙江大学出版社,2005.
- [6] 朱旭芬.现代微生物学实验技术[M].杭州:浙江大学出版社,2011.
- [7] 杜连祥,路福平.微生物学实验技术[M].北京:中国轻工业出版社,2005.
- [8] 任飞,韩珍琼.甜酒酿发酵机理的初步研究[J].中国酿造,2012,31(8):140-144.
- [9] 福杰桑.葡萄酒酿造微生物学——实验技术与规程(第2版)[M].徐岩,康文怀,译.北京:中国轻工业出版社出版,2010.
- [10] 中国科学院微生物研究所编写组.常见与常用真菌[M].北京:科学出版社,1983.
- [11] 杨莹,徐艳文,薛军侠,等.WL营养琼脂对葡萄酒相关酵母的鉴定效果验证[J].微生物学杂志,2007,27(5):75-78.
- [12] KURTZMAN C P. The yeasts: a taxonomic study[M]. 5th ed. Amsterdam: Elsevier Science, 2011.

(责编 张磊 李光跃)