

# 实 验 八

## 大分子物质的水解实验 及糖发酵实验

孔召玉

[kongzhaoyu@hotmail.com](mailto:kongzhaoyu@hotmail.com)

南昌大学生命学院

# 一、实验目的

1. 证明不同微生物对各种有机大分子的水解能力的不同，从而说明不同微生物有着不同的酶系统。
2. 掌握进行微生物大分子水解实验的原理和方法。
3. 了解糖发酵的原理和在肠道细菌鉴定中的重要作用。
4. 掌握通过糖发酵鉴别不同微生物的方法。

## 二、实验原理

- ❧ 微生物代谢与其他生物代谢有着许多相似之处，也有不同之处。
- ❧ 微生物代谢重要特征之一，就是**代谢类型的多样性**，因此使得微生物在自然界的物质循环中起着重要的作用，同时也为人类开发利用微生物资源提供更多的机会与途径。
- ❧ 在微生物的分类鉴定工作中，常利用其生理生化反应作用作为重要依据。

# ◆ 淀粉水解试验

- ❧ 微生物对大分子的淀粉、蛋白质和脂肪**不能直接**利用，必须靠产生的**胞外酶**将大分子物质分解才能被微生物吸收利用。胞外酶主要为水解酶，通过加水裂解大的物质为较小的化合物，使其能被运输至细胞内。
- ❧ 微生物**不能直接利用淀粉**，必须靠自身产生胞外**淀粉酶**将大分子淀粉分解成糊精、双糖和单糖才能进入细胞内，细菌是否能产生淀粉酶可通过观察细菌**菌落周围的淀粉是否被水解**来证实。淀粉遇碘液会产生蓝色，但细菌水解淀粉的区域，用碘测定**不再产生蓝色**，表明细菌产生**淀粉酶**。

# ◆ 明胶水解试验

- ❧ 微生物**不能直接利用明胶**这种蛋白质，必须靠自身产生的胞外**明胶酶**将大分子蛋白质水解成蛋白胨或氨基酸才能进入细胞内，细菌能否产生明胶酶可通过明胶穿刺培养来证实。
- ❧ 明胶是由胶原蛋白经水解产生的蛋白质，在25℃以下可维持凝胶状态，以固体形式存在，在微生物产生的**明胶酶作用下**，**明胶**失去凝固性，**呈液化状态**。

# ◆ 糖发酵

- ❧ 糖发酵试验是常用的**鉴别微生物**的生化反应，在肠道细菌的鉴定上尤为重要。
- ❧ 绝大多数细菌都能利用糖类作为碳源和能源，但是它们在**分解糖类物质的能力上有很大的差异**。不同的细菌含有发酵不同糖的酶，因而发酵糖的能力各不相同，其产生的代谢产物亦不相同，如有的产酸产气，有的产酸不产气。
- ❧ **产酸**时，溴甲酚紫指示剂可由**紫色**（pH6.8）变为**黄色**（pH5.2）。
- ❧ **产气**时，可通过倒置小**试管内的气泡**来判断。

# 三、实验材料

## 1. 培养基（7-8人/组，7组）

- 淀粉水解培养基：3个培养皿/每组
- 明胶液化培养基：4支试管/每组
- 葡萄糖发酵培养基：3支试管/每组
- 乳糖发酵培养基：3支试管/每组

## 2. 试剂：碘液

## 3. 接种用具：培养箱、水浴锅、接种环（针）、酒精灯、标签纸、试管架等

## 4. 实验菌种：枯草芽孢杆菌、大肠杆菌、普通变形杆菌、金黄色葡萄球菌

# 四、实验内容

试验名称	培养基名称	接种菌名称	接种方式	每组个数
淀粉水解	淀粉培养基	枯草/大肠/金葡/变形	平板	3
明胶水解	明胶培养基	枯草/变形/金葡	穿刺	4
葡萄糖发酵	葡萄糖发酵培养基	大肠杆菌和变形杆菌	液体	3
乳糖发酵	乳糖发酵培养基	大肠杆菌和变形杆菌	液体	3



# 1. 淀粉水解试验

- (1) 将固体淀粉培养基溶化后冷却至 $50^{\circ}\text{C}$ ，无菌操作倒平板。
- (2) 用记号笔在平板背面划成四部分，将枯草芽孢杆菌、大肠杆菌、普通变形杆菌、金黄色葡萄球菌用**接种环**分别在不同部分划线接种（划十字），并在平板的背面分别记下四部分的菌名（贴标签）。
- (3) 将接完种的平板**倒置于** $37^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱，培养24h。
- (4) 滴加碘液鉴别有无淀粉水解圈。

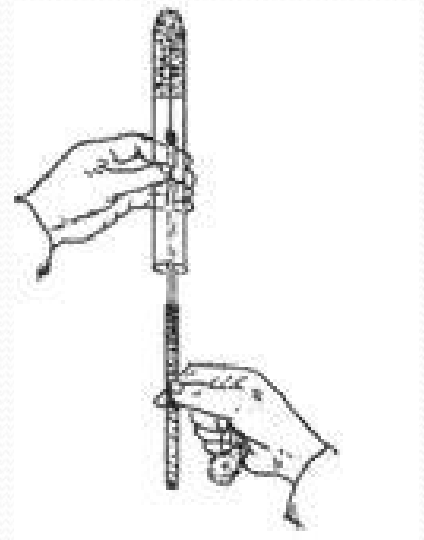
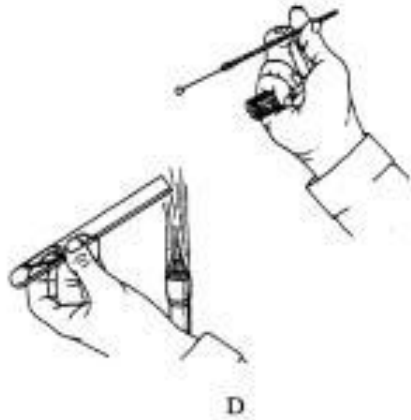
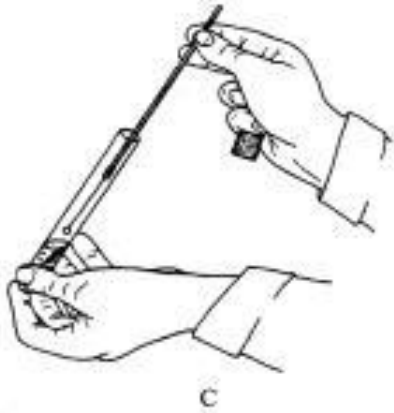
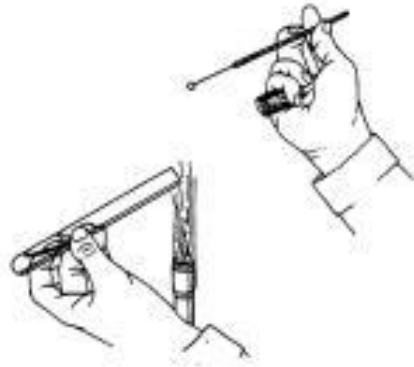
## 2. 明胶液化试验

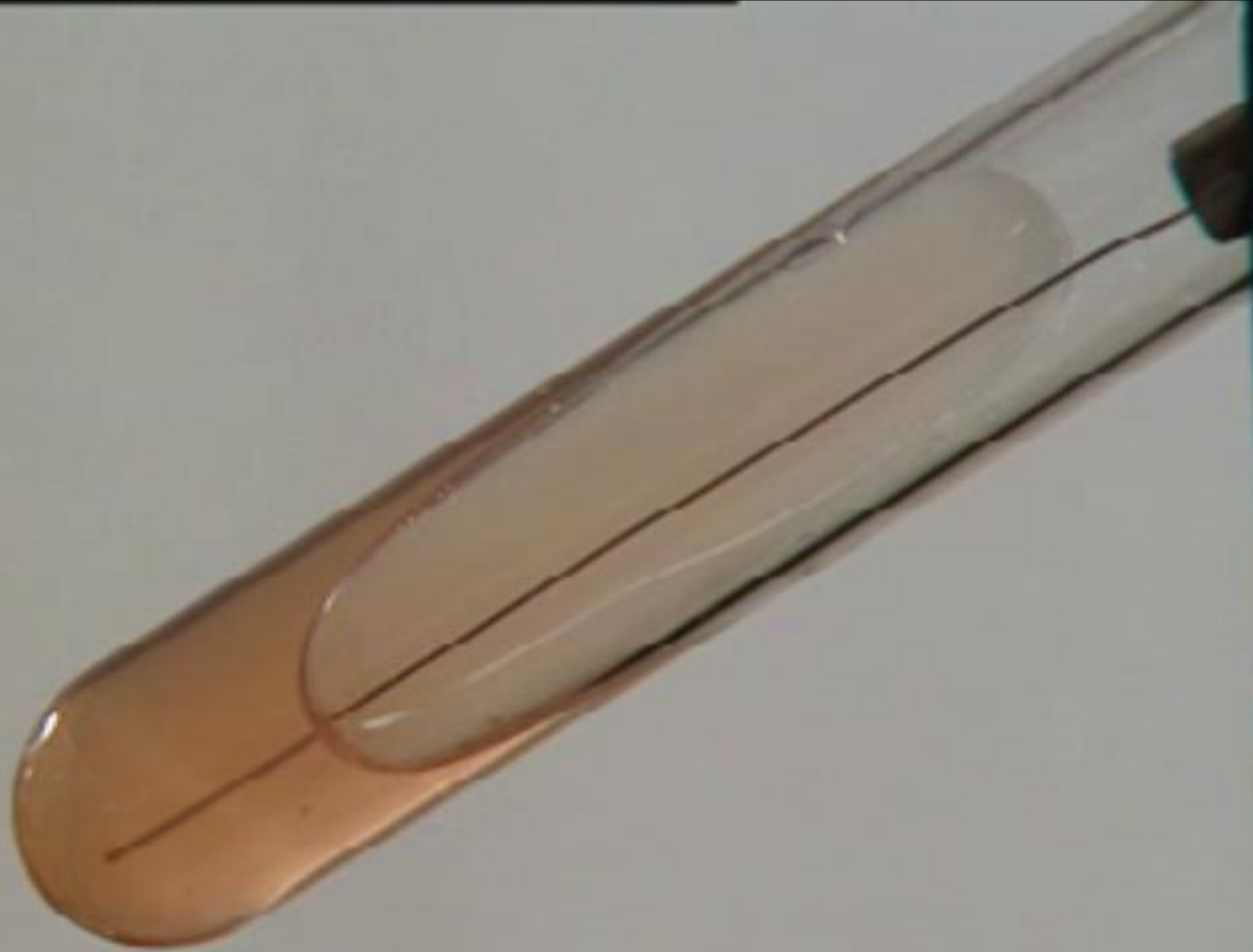
- (1) 取4支明胶培养基试管，用接种针分别以穿刺接种法接种枯草芽孢杆菌、普通变形杆菌和金黄色葡萄球菌，另一支不接菌为空白对照管，贴好标签。
- (2) 接种后置于20℃恒温培养箱，培养2-5d（或37℃培养2d，取出置冰浴冷却后），观察明胶液化情况。

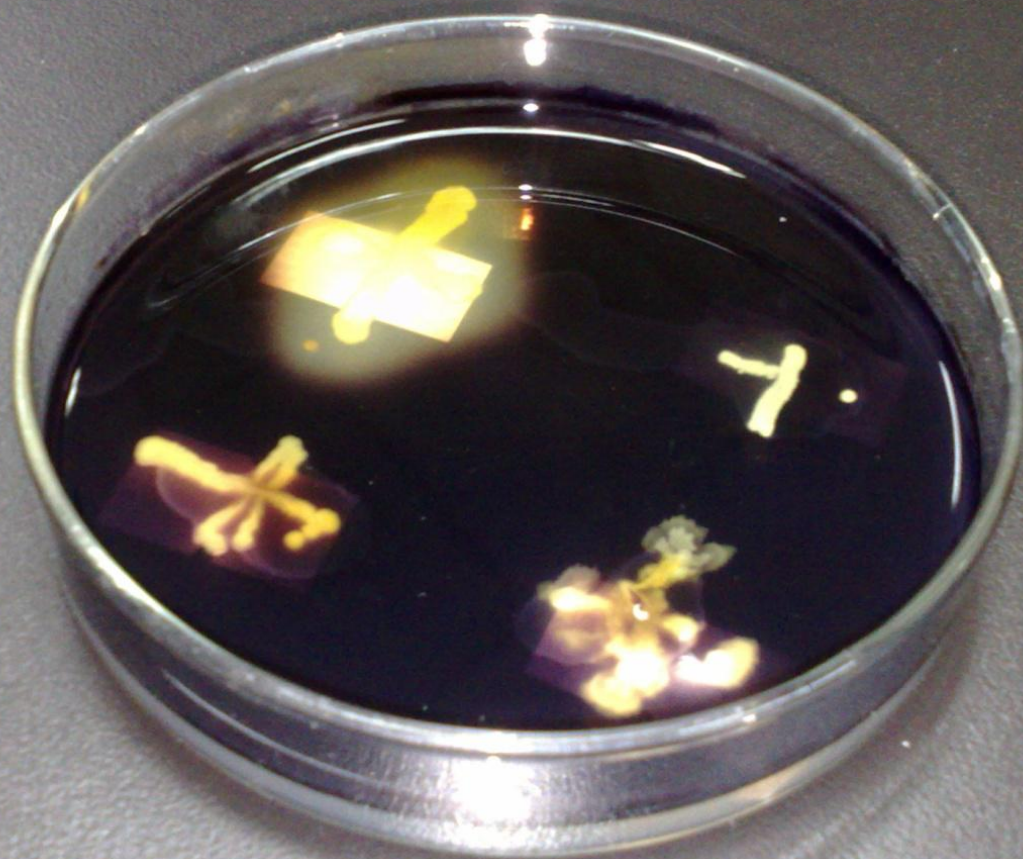
# 3.糖类发酵试验

- (1) 取葡萄糖发酵培养基试管3支，分别接种普通变形杆菌和大肠杆菌，第三支不接种，作为空白对照。另取乳糖发酵培养基试管3支，同样分别接入普通变形杆菌和大肠杆菌，第三支不接种，作为空白对照。接种后，轻缓摇动试管，使其均匀，防止倒置的小试管进入气泡。
- (2) 贴好标签（培养基、菌种、班级及组号）。
- (3) 将接种过和作为对照的6支试管置于37℃恒温培养箱培养24h，观察产酸、产气情况。

# 无菌接种操作









# 五、实验数据及处理结果

## 1、大分子物质水解试验

将结果填入下表。“+”表示阳性，“-”表示阴性

菌名	淀粉水解试验	明胶水解试验
枯草芽孢杆菌		
普通变形杆菌		
金黄色葡萄球菌		
大肠杆菌		



## 2、糖发酵试验

将结果填入下表。“⊕”表示产酸产气，“+”表示产酸，“-”表示阴性

糖类发酵	大肠杆菌	普通变形杆菌	对照
葡萄糖发酵			
乳糖发酵			

# 注意事项：

1. 注意无菌操作，勿染杂菌。
2. 接好菌的平板一定要**倒置**放入培养箱中。

## 六、思考与讨论

- 1、你怎么解释淀粉酶是胞外酶而非胞内酶？
- 2、接种后的明胶试管也可以在35<sup>0</sup>C培养，在培养后你必须做什么才能证明水解的存在？

# 五、实验结果

## (1) 大分子物质水解实验结果

将结果填入下表。“+”表示阳性，“-”表示阴性

**注意：**观察结果时，可打开皿盖，滴加碘液于平板上，轻轻旋转，使碘液均匀铺满整个平板。如菌苔周围出现无色透明圈，则说明淀粉已被水解，为阳性。透明圈的大小，说明该菌水解淀粉能力的强弱，即产生胞外酶活力的高低。（以“+”、“-”表示有无透明圈）

菌名	淀粉水解试验	明胶液化试验
枯草芽孢杆菌		
大肠杆菌		

## (2) 糖发酵实验结果

将结果填入下表。“+”表示产酸或产气，“-”表示不产酸或不产气。

糖类发酵	大肠杆菌		变形杆菌		对照	
	产酸	产气	产酸	产气	产酸	产气
葡萄糖发酵	++	++	+	+ / d	-	-
乳糖发酵	++	++	-	-	-	-

菌株	淀粉水解	明胶液化
大肠杆菌	-	-
变形杆菌	-	+
金黄葡萄球菌	+	+
枯草杆菌	++	++