

通过人为地控制养分或培养条件，使目的菌种增殖培养后，在数量上占优势。

4. 培养分离

利用分离技术得到纯种。

5. 筛选

测定目的菌种的发酵生产性能，包括形态、培养特征、营养要求、生理生化特性、发酵周期、产品的品种和产量、耐受最高温度、生长和发酵最适温度、最适 pH、提取工艺、毒性等。

自然界的一些微生物在一定条件下是产毒的，将其作为生产菌种应当十分小心，尤其与食品工业有关的菌种，更应慎重。据有的国家规定，微生物中除啤酒酵母、脆壁酵母、黑曲霉、米曲霉和枯草杆菌作为食用无需做毒性试验外，其他微生物作为食用均需通过两年以上的毒性试验。

(二) 诱变育种

诱变育种分为诱变和筛选两部分。出发菌株指用于育种的起始菌株，通常有三种：野生型菌株、自发突变的高产菌株和诱发突变的高产突变菌株。

诱变剂包括物理诱变剂和化学诱变剂但必须是有效诱变剂(正突变率较高)。物理诱变剂包括紫外线、X 射线、 γ 射线、快中子等，目前使用最方便而且十分有效的是紫外线。化学诱变剂主要是亚硝基胍 (NTG) 和亚硝基甲基脲 (NMU) 等。化学诱变剂在大多数情况下就突变数量而言比电离辐射更有效，也很经济；但大部分诱变剂是致癌剂。

诱变育种步骤如下：

1. 出发菌株的选择

自然界新分离的野生型菌株，对诱变处理较敏感，容易达到好的效果。在生产中经生产选种得到的菌株与野生型较相像，也是良好的出发菌株。每次诱变处理都有一定提高的菌株，往往多次诱变能积累较多的提高。出发菌株开始时可以同时选 2~3 株，在处理比较后，将更适合的出发菌株留作继续诱变。由于变异性状特别是高产基因大部分是隐性的，要尽量选择单倍体细胞、单核或核少的多细胞体作为出发诱变细胞。同一诱变剂的重复处理会使细胞产生抗性，诱变效果下降，应根据细胞生理状态选择诱变剂。有的诱变剂是作用于营养细胞，应选对数期同步生长的细胞；有的诱变剂作用于休止期，应选用孢子。

2. 处理菌悬液的制备

这一步骤的关键是制备单细胞和单孢子状态的、活力类似的菌悬液。要进行合适培养基的培养，并进行离心、洗涤和过滤。

3. 诱变处理

根据前面有关诱变剂及诱变处理的介绍，结合诱变对象的实际，设计诱变处理方案。

4. 中间培养

由于在发生了突变尚未表现出来之前，有一个表现延迟的过程，即细胞内原有酶量的稀释过程（生理延迟），需 3 代以上的繁殖才能将突变性状表现出来。让变异处理后细胞在液体培养基中培养几小时，使细胞的遗传物质复制，细胞繁殖几代后，得到纯的变异细胞。若不经液体培养基的中间培养，直接在平皿上分离，就会出现变异和不变异细胞同时存在于一个菌落内的可能，形成混杂菌落，导致筛选结果不稳定和将来的菌株退化。

5. 分离和筛选

筛选分初筛和复筛。初筛是以迅速筛出大量达到初步要求的分离菌落为目的，以量为主。复筛是精选，以筛选精确度为主。例如，可以在平皿上直接以菌落的代谢产物与某些染料或基质的作用形成的变色圈或透明圈的大小来挑取参加复筛者，淘汰 90% 的菌落。在数量减少后就要仔细比较参加复筛和再复筛的菌株，才能选得优秀菌株。在以后的复筛阶段，还应不断结合自然分离，纯化菌株。

四、工业发酵生产菌种保藏

在生产发酵中高产、有重要经济价值的微生物菌种的保存和长期保藏对于一个成功的工业发酵过程极为重要。菌种退化是指优良菌种的群体中出现某些生理特征和形态特征逐渐减退或丧失，导致目的代谢产物合成能力下降的现象，是一个从量变到质变的过程，退化的主要原因为自发突变、回复突变、培养条件不良等。分离复壮是指通过分离出单菌落，通过菌落和菌体特征分析和性能测定，从中筛选出具有原来性状或性状更好的菌株。

影响微生物菌种稳定性的因素有变异（自发突变，不可避免但可降低）、杂菌污染（无菌操作不当，可避免）、死亡（培养条件不当，可避免）等。

（一）常见的菌株退化现象

菌株原来的形态和性状变得不典型，表现在菌落和细胞形态改变，如放线菌和霉菌产孢量减少；生长速度缓慢；代谢产物生产能力下降，如黑曲霉的糖化能力和放线菌抗生素的发酵单位下降；对外界不良条件的抵抗力减弱或其对宿主寄生能力下降，如球孢白僵菌对宿主

的致病性下降。

(二) 防止衰退的措施

创造良好的培养条件；采用有效的菌种保藏方法，减少传代次数；利用不易退化的细胞(单核体)传代(对丝状微生物而言)；经常进行纯种分离，并对相应的性状指标进行检测(主动预防)。

(三) 理想的菌种保藏方法所具备的条件

经长期保藏后菌种仍存活健在；保证高产突变株不改变表型和基因型，特别是不改变初级代谢产物和次级代谢产物生产的高产能力。

(四) 菌种保藏的主要方法

1. 低温保藏

普通冷冻保藏技术(4℃；-20℃)：普通冰箱保存，平板、斜面或菌液(4℃)、菌液(-20℃)；超低温冷冻保藏技术(-60~-80℃)：超低温冰箱保存，菌液(需加保护剂，10%~40%甘油)；液氮冷冻保藏技术(-196℃)：液氮罐保存，菌液(需加保护剂，5%二甲亚砜或10%甘油)。

2. 防水密封保藏

悬液保藏法：寡营养、密封保藏，保存放线菌、霉菌和酵母菌等；石蜡油低温保藏法：密封(橡皮塞取代棉塞)、保水(加石蜡油)、低温(4℃)保藏，保存不以石蜡为碳源的微生物。

3. 干燥保藏

干燥保藏法（国内常用）：采用干燥器、试管（含干燥载体）保存菌液，将菌种置于土壤、细沙、滤纸、硅胶等干燥材料上保藏；真空冷冻干燥法：采用真空冷冻干燥机，保存菌液。

第三节 发酵培养基

工业发酵培养基的功能是满足菌体的生长、促进产物的形成。对工业发酵培养基的要求为：培养基能够满足产物最经济的合成；发酵后所形成的副产物尽可能少；培养基的原料应因地制宜，价格低廉，且性能稳定，资源丰富，能保证生产上的供应；所选用的培养基应能满足总体工艺的要求，不影响通气、提取、纯化及废物处理等。

一、工业发酵培养基的成分及来源

（一）碳源

碳源是提供微生物菌体的生长繁殖所需的能源、合成菌体细胞和代谢产物所必需的碳成分。其来源主要有糖类、油脂、有机酸、醇类、碳氢化合物等，还有蛋白质水解产物或氨基酸。由于菌体所含酶系统不完全相同，各种菌种对不同碳源的利用速率和效率也不一样。速效碳源：快速被菌体利用，参与代谢、合成菌体和产生能量，并产生分解产物，因此有利于菌体的生长，但对产物的合成有阻遏作用，如葡萄糖、其他单糖、低级碳类物质等；缓效碳源：需要微生物产生酶来分解，被菌体利用速率慢，但有利于产物的合成，如蔗糖、乳糖、麦芽糖和糖蜜等二糖以及糊精和淀粉等多糖。工业发酵中，一般将两种碳源配合使用，以分

别满足微生物生长和产物合成的需要。

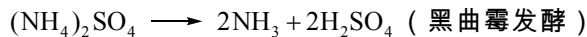
工业发酵中常用的碳源有葡萄糖(单糖)、糖蜜(含双糖成分,制糖生产时的副产物结晶母液)、淀粉、糊精及其水解液(多糖)、油脂(霉菌、放线菌可以利用)、有机酸、醇及碳氢化合物。

(二) 氮 源

主要用于构成菌体细胞物质和含氮代谢产物(氨基酸、蛋白质、核酸等)。常用的氮源可分为两大类:有机氮源和无机氮源。速效氮源:直接被利用的氨基氮或铵基氮,有利于微生物生长,如氨基酸和铵盐等;缓效氮源:不能直接被利用,需要微生物产生酶来分解利用,有利于产物的合成,如黄豆饼粉、花生饼粉等。

1. 无机氮源(速效氮源)

无机氮源包括铵盐、硝酸盐和氨水,能被微生物快速吸收;但无机氮源的迅速利用常会引起 pH 的变化,如



无机氮源被菌体作为氮源利用后,培养液中留下了生理酸性或碱性物质。正确使用生理酸碱性物质,对稳定和调节发酵过程的 pH 有积极作用。选择合适的无机氮源有两层意义:一是满足菌体生长,二是稳定和调节发酵过程的 pH。使用氨水既可调节 pH 又可充当速效氮源,应少量多次使用,防止局部碱性过程,注意过滤除菌。

2. 有机氮源(缓效氮源)

常用的有机氮源是一些廉价的原料，如花生饼粉、黄豆饼粉、玉米浆、蛋白胨、酵母粉、鱼粉、蚕蛹粉、尿素等，被微生物分泌的胞外蛋白酶分解成氨基酸后再利用。这些有机氮源还含有少量糖类、脂肪、无机盐、维生素及某些生长因子等，能够引起菌体旺盛生长。有机氮源成分复杂，来源具有不稳定性，选取和使用时必须考虑原料波动对发酵的影响。

(三) 无机盐及微量元素

无机盐及微量元素主要作为生理活性物质或生理活性调节物，使用应考虑其他渠道有可能带入过多的某种无机离子和微量元素，注意使用浓度和可能发生的化学反应，避免产生沉淀。

(四) 生长因子、前体、抑制剂和促进剂

1. 生长因子

生长因子是指微生物生长不可缺少的微量有机物质，如氨基酸、嘌呤、嘧啶、维生素等。有机氮源是这些生长因子的重要来源，多数有机氮源含有较多的维生素 B、微量元素及一些微生物生长不可缺少的生长因子。

2. 前体

前体是指在产物的生物合成过程中，被菌体直接用于产物的合成而自身结构无显著改变的物质，能明显提高产物的产量。前体一般都有毒性，浓度过大对菌体的生长不利，而且价格较高，添加过多，容易引起挥发和氧化，因此常采用流加的方法添加。

3. 促进剂和抑制剂

促进剂和抑制剂是指发酵中为了促进菌体生长或产物合成、抑制不需要的代谢产物合成，

向培养基添加的物质。促进剂提高产量的机制还不完全清楚，有些促进剂本身是酶的诱导物；有些促进剂是表面活性剂，可改善细胞的透性、细胞与氧的接触，从而促进酶的分泌与生产；也有人认为表面活性剂对酶的表面失活有保护作用；有些促进剂的作用是沉淀或螯合有害的重金属离子。

抑制剂用来抑制发酵过程中杂菌的生长，如在谷氨酸发酵时通过添加氯霉素、植酸或多聚磷盐等减少杂菌污染；有些抑制剂也可减少营养缺陷型发酵菌株发生回复突变的可能性。

(五) 水

水源质量的主要考虑参数包括 pH、溶解氧、可溶性固体、污染程度以及矿物质组成和含量。

(六) 消沫剂

发酵过程中产生的泡沫容易引起逃液和染菌。使用的消沫剂类型有植物油脂（玉米油、豆油）、动物油脂（鲸鱼油、猪油）和高分子化合物。

二、工业发酵培养基的类型及配方设计

微生物的营养活动是依靠向外界分泌大量的酶，将周围环境中大分子的蛋白质、糖类、脂肪等营养物质分解成小分子化合物，借助细胞膜的渗透作用吸收小分子营养来实现的。所有发酵培养基都必须提供微生物生长繁殖和产物合成所需的能源，包括碳源、氮源、无机元素、生长因子、水、氧气等。对于大规模发酵生产，除考虑上述微生物的需要外，还必须重视培养基原料的价格和来源。

(一) 培养基分类

1. 按纯度分类

(1) 合成培养基

其原料化学成分明确、稳定(如药用葡萄糖),适合于研究菌种基本代谢和过程的物质变化规律;但培养基营养单一,价格较高,微生物在合成培养基上生长较慢,有些微生物在合成培养基上不能生长,不适合用于大规模工业生产。

(2) 天然培养基

采用天然原料(花生饼粉、蛋白胨),原料来源丰富(大多为农副产品)、营养丰富、价格低廉,适合工业化生产;但原料质量会影响生产稳定性。适合各类异养微生物生长,而一般自养微生物都不能生长。

(3) 半合成培养基

采用一部分天然有机物作为碳源、氮源和生长因子的来源,再适当加入一些化学药品以补充无机盐成分,使其更能充分满足微生物对营养的需要。大多数微生物都能在此培养基上生长繁殖,在微生物工业生产和试验研究中被广泛使用。

2. 按状态分类

(1) 固体培养基

适合于菌种和孢子的培养和保存,也广泛应用于有子实体的真菌类,如香菇、白木耳等的生产。

(2) 半固体培养基

在配好的液体培养基中加入0.5%~0.8%的琼脂,主要用于微生物的菌种鉴定,观察细

菌运动特征及噬菌体效价测定。

(3) 液体培养基

其中 80%~90% 是水，配有可溶性的或不溶性的营养成分。它是发酵工业大规模使用的培养基，常用于大规模的工业生产及生理代谢等基本理论研究工作。

3. 按用途分类 (从发酵生产应用考虑)

(1) 孢子 (斜面) 培养基

菌种繁殖，营养不丰富，能使菌体快速生长，产生孢子数量大、质量好，不会引起菌种变异。

(2) 种子培养基

孢子发芽、生长和大量繁殖菌丝体，使菌体强壮，成为活力强的“种子”。

(3) 发酵培养基

菌体生长、繁殖和合成产物，使接种菌丝生长并能高效表达，获得高的发酵产量。其组分应尽可能单一，以保证高得率。

(二) 培养基配方设计

目前还不能完全从生化反应的基本原理来推断和计算出适合某一菌种的培养基配方，只能用生物化学、细胞生物学、微生物学等的基本理论，参照前人所使用的较适合某一类菌种的经验配方，再结合所用菌种和产品的特性，采用摇瓶、玻璃罐等小型发酵设备，按照一定的实验设计和实验方法选择较为适合的培养基。

1. 培养基设计的原则

了解菌种的来源、生活习惯、生理生化特性和一般的营养要求，根据不同类型微生物的生理特性考虑培养基的组成。其次对生产菌种的培养条件，生物合成的代谢途径，代谢产物的化学性质、分子结构、一般提炼方法和产品质量要求等也应有所了解。先选择一种较好的化学合成培养基为基础，先做摇瓶试验，然后做小型发酵罐培养试验，摸索菌种对各种主要有机碳源和氮源的利用情况和产生代谢产物的能力。每次只限一个变动条件，确定培养基配比，再确定各种重要的金属和非金属离子对发酵的影响，对各种无机元素试验其最高、最低和最适用量。通过中间补料法，一边对碳、氮的代谢予以适当的控制，一边间歇添加各种养料和前体类物质，引导发酵走向合成产物的途径。应根据生产和科学研究的需要选择培养基，发酵工业大多采用液体培养基培养种子和进行液体发酵，并根据微生物对氧气的要求，分别做表面静止培养或深层通气培养。根据经济效益选择培养基原料，考虑经济节约，尽量少用或不用主粮，节约用粮，以其他原料代替粮。

2. 培养基设计的一般步骤

根据前人的经验、菌种特性、发酵工艺要求、后提取工艺要求和经济可行的培养基成分来源，初步确定可能的培养基成分，通过单因子实验摇瓶确定最适宜的培养基成分。当培养基成分确定后，采用正交设计、均匀设计等实验方法确定各成分最适的浓度，优化培养基配方。从摇瓶层次优化培养基配方后，再通过反应器最终优化基础配方。

第四节 工业发酵灭菌

发酵过程中发生污染产生的危害主要有：杂菌消耗营养，降低生产效率；杂菌合成新产