

TIAOWEIPIN
FAJIAO GONGYIXUE



调味品 发酵工艺学

宋安东 主编



化学工业出版社

图书在版编目(CIP)数据

TIAOWEIPIN
FAJIAO GONGYIXUE



调味品发酵工艺学 / 宋安东主编. — 北京: 化学工业出版社, 2009.2
ISBN 978-7-122-04920-2

Ⅰ. 调… Ⅱ. 宋… Ⅲ. 发酵食品—调味品—生产工艺—Ⅳ. TS264

中国版本图书馆CIP数据核字(2009)第038834号

调味品 发酵工艺学

宋安东 主编



化学工业出版社

· 北京 ·

图书在版编目 (CIP) 数据

调味品发酵工艺学/宋安东主编. —北京: 化学工业出版社, 2009. 5
ISBN 978-7-122-04950-6

I. 调… II. 宋… III. 发酵食品: 调味品-生产工
艺 IV. TS264

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2009) 第 029824 号

调味品发酵工艺学

主编 宋安东

责任编辑: 刘 畅 赵玉清

文字编辑: 张春娥

责任校对: 吴 静

装帧设计: 史利平

出版发行: 化学工业出版社 (北京市东城区青年湖南街 13 号 邮政编码 100011)

印 装: 大厂聚鑫印刷有限责任公司

720mm×1000mm 1/16 印张 17½ 字数 349 千字 2009 年 7 月北京第 1 版第 1 次印刷

购书咨询: 010-64518888 (传真: 010-64519686) 售后服务: 010-64518899

网 址: <http://www.cip.com.cn>

凡购买本书, 如有缺损质量问题, 本社销售中心负责调换。

定 价: 35.00 元

版权所有 违者必究

前 言

发酵调味品工业是我国食品工业的一个重要组成部分。发酵调味品生产在我国具有悠久的历史，很多独特的酿造工艺起源于我国，凝聚着中华民族的勤劳与智慧，是中华民族灿烂文化长河中一颗璀璨的明珠。随着生物技术和发酵工程的不断发展，调味品发酵技术也日新月异，新理论、新技术、新工艺、新设备以及新产品不断涌现。为了继承和发扬我国悠久的食品文化，同时适应日新月异的调味品发酵的新形势和新任务，以及为发酵调味品工业生产发展和培养高素质的工程技术人员服务，在校、院、系领导的支持和关心下，我们在原有的《新编发酵调味品工艺学》教材的基础上，总结长期的教学、科研和技术服务与推广的成果，组织了河南农业大学和商丘职业技术学院的有关人员重新编写了该书，定名为《调味品发酵工艺学》。

本书在编写过程中，参阅了大量的国内外文献资料，并结合教学、科研的实践和工作经验，力求全面反映国内外发酵调味品生产的历史、现状和最新进展，同时体现实用性、前瞻性、系统性。以期使该书成为发酵调味品工作者适用的参考书，作为相关专业的学生学习与巩固基础理论、基本知识和基本技术的教材，成为调味品工作者和学生分析问题和解决问题的参考资料。

本书由宋安东（第2、5章）、徐淑霞（第1、6章）、高玉千（第3、4、7章）、戚元成（第3、4、7章）、张建威（第1、6章）、刘全军（第1、6章）和杨铭（第3、4、7章）等同志共同撰写。三位副主编做了大量的撰写、修订工作，主编宋安东统稿并加以润色，最后由邱立友教授审定。

本书中凡成分的含量、浓度等以%表示的，一般指质量分数；酒精含量以%表示的，指体积分数。

鉴于编者水平有限，再加上时间比较仓促，书中难免有不妥之处，敬请有关专家和广大读者批评指正。

编者

2009年5月于郑州

目 录

1 味精	1
1.1 概述	1
1.1.1 谷氨酸和味精的用途	1
1.1.2 味精工业生产发展概况	2
1.2 谷氨酸生产菌	5
1.2.1 谷氨酸生产菌的种类及其特征	5
1.2.2 谷氨酸生产菌的筛选	7
1.2.3 谷氨酸生产菌的遗传育种	9
1.2.4 谷氨酸生产菌的保藏和分纯复壮	11
1.3 谷氨酸的代谢控制发酵	13
1.3.1 谷氨酸的生物合成途径	14
1.3.2 谷氨酸生物合成的调节机制	15
1.3.3 谷氨酸的代谢控制育种	16
1.3.4 谷氨酸发酵环境条件的控制	22
1.4 谷氨酸发酵	32
1.4.1 菌种的扩大培养及质量要求	33
1.4.2 淀粉水解糖的制备	35
1.4.3 发酵培养基的配制、灭菌和空气净化	43
1.4.4 谷氨酸发酵动力学和发酵过程自动化控制	45
1.4.5 谷氨酸发酵工艺	47
1.5 杂菌和噬菌体污染的防治	51
1.5.1 杂菌污染的防治	51
1.5.2 噬菌体污染的防治	54
1.6 谷氨酸的提取	59
1.6.1 谷氨酸的性质	59
1.6.2 谷氨酸发酵液的主要成分和菌体分离方法	62
1.6.3 一次低温等电点法提取谷氨酸	64
1.6.4 离子交换法提取谷氨酸	67
1.6.5 等电点-离子交换法提取谷氨酸	71
1.6.6 浓缩等电点法提取谷氨酸	73

1.6.7	锌盐法提取谷氨酸	74
1.6.8	电渗析法提取谷氨酸	74
1.7	谷氨酸制造味精	75
1.7.1	味精的性质	75
1.7.2	精制工艺流程	76
1.7.3	谷氨酸的中和	76
1.7.4	中和液除铁、除锌	77
1.7.5	中和液的脱色	79
1.7.6	中和液的浓缩和结晶	80
1.7.7	味精的分离与干燥	84
1.7.8	粉末味精的混盐和磨粉	86
1.8	味精质量标准和技术经济指标	86
1.8.1	味精质量标准	86
1.8.2	主要技术经济指标及生产计算	87
2	5'-肌苷酸和5'-鸟苷酸	89
2.1	呈味核苷酸的性质	89
2.2	呈味核苷酸的生物合成途径及代谢控制	90
2.2.1	呈味核苷酸的生物合成途径	90
2.2.2	5'-肌苷酸和肌苷发酵的代谢控制	92
2.2.3	5'-鸟苷酸和鸟苷发酵的代谢控制	98
2.3	呈味核苷酸的发酵生产	99
2.3.1	5'-肌苷酸的发酵生产	99
2.3.2	5'-鸟苷酸的发酵生产	103
2.4	呈味核苷酸的质量标准	105
2.5	呈味核苷酸的应用	106
2.5.1	在味精中添加呈味核苷酸生产强力味精	106
2.5.2	呈味核苷酸在酱油中的应用	107
3	酱油	109
3.1	概述	109
3.1.1	酱油的起源	109
3.1.2	我国酱油生产工艺沿革	109
3.2	酱油的化学成分	110
3.2.1	含氮化合物	111
3.2.2	碳水化合物	112
3.2.3	有机酸	112
3.2.4	香味成分	113

3.2.5	色素成分	114
3.3	原料及其处理	116
3.3.1	原料	116
3.3.2	原料选择	120
3.3.3	原料处理	121
3.4	种曲制备	127
3.4.1	菌种选择	127
3.4.2	种曲制备	129
3.5	制曲	131
3.5.1	厚层机械通风制曲	131
3.5.2	液体曲	135
3.5.3	旋转圆盘式自动制曲机制曲	136
3.6	发酵	136
3.6.1	酱油发酵原理	136
3.6.2	发酵条件讨论	140
3.6.3	发酵设备	143
3.6.4	发酵工艺	144
3.7	酱油的提取	148
3.7.1	浸出法	148
3.7.2	压榨法	149
3.8	酱油的加热、配制、防腐、贮存及包装	151
3.8.1	酱油的加热	151
3.8.2	配制	152
3.8.3	防腐	154
3.8.4	贮存与包装	156
3.9	酱油生产的技术经济管理	157
3.9.1	建立健全化验室	157
3.9.2	技术经济指标与定额管理	157
4	食醋	161
4.1	概述	161
4.2	食醋酿造原理	162
4.2.1	原料中大分子物质的降解	162
4.2.2	酒精发酵作用	165
4.2.3	酒精氧化生成醋酸的氧化作用	167
4.2.4	有机酸与醇类结合生成芳香酯类的酯化作用	168
4.2.5	食醋陈酿的后熟作用	168

4.2.6	原料在蒸煮过程中发生的变化	169
4.3	原料	170
4.3.1	主料	170
4.3.2	辅料、填充料和添加剂	172
4.4	发酵剂的制备	173
4.4.1	糖化剂	173
4.4.2	酒母	180
4.4.3	活性干酵母	183
4.4.4	醋酸菌	183
4.5	食醋酿造工艺	188
4.5.1	固体发酵工艺	188
4.5.2	液体发酵工艺	198
4.6	食醋的成分	205
4.6.1	含氮化合物	205
4.6.2	有机酸	206
4.6.3	糖分	207
4.6.4	无机物	207
4.6.5	香气成分	208
4.7	食醋质量规格和技术经济指标	209
4.7.1	食醋质量规格	209
4.7.2	食醋技术经济指标	211
5	酱类、豆腐乳、豆豉	214
5.1	酱类	214
5.1.1	黄豆酱	214
5.1.2	蚕豆酱	217
5.1.3	蚕豆辣酱	219
5.1.4	甜面酱	220
5.1.5	酱类加工制品	222
5.2	豆腐乳	222
5.2.1	豆腐乳生产原理	223
5.2.2	豆腐乳生产工艺	224
5.2.3	豆腐乳质量标准	235
5.3	豆豉	236
5.3.1	毛霉型豆豉生产工艺	236
5.3.2	曲霉型豆豉生产工艺	238
5.3.3	豆豉质量标准	239

6 酱腌菜	240
6.1 概述	240
6.1.1 酱腌菜生产历史	240
6.1.2 酱腌菜的分类	241
6.2 酱腌菜生产原理	243
6.2.1 酱腌菜的防腐机理	243
6.2.2 酱腌菜的保色和保脆	245
6.2.3 酱腌菜的风味形成机理	246
6.2.4 酱腌渍过程中蔬菜化学成分的变化	247
6.2.5 酱腌菜中亚硝酸和亚硝胺的产生和预防	248
6.3 酱腌菜生产工艺	249
6.3.1 酱渍菜生产工艺	249
6.3.2 糖醋渍菜生产工艺	251
6.3.3 酱油渍菜生产工艺	252
6.3.4 清水渍菜生产工艺	254
6.3.5 盐水渍菜生产工艺	255
6.3.6 盐渍菜生产工艺	258
7 HACCP 体系及其 HACCP 体系在调味品酿造中的应用	261
7.1 HACCP 体系简介	261
7.1.1 HACCP 系统包括七大基本原理	261
7.1.2 HACCP 的产生与发展概况	262
7.1.3 HACCP 运作模式	264
7.1.4 HACCP 体系架构	264
7.1.5 HACCP 体系与常规质量控制模式的区别	264
7.1.6 HACCP 评估面临的问题	266
7.2 HACCP 体系在调味品酿造中的应用	267
7.2.1 HACCP 在酿造调味品生产卫生质量控制中的应用	268
7.2.2 HACCP 在腐乳生产过程中的应用	269
参考文献	270

1 味精

1.1 概述

味精是含一个结晶水的 L-谷氨酸一钠的晶体，溶于水后具有强烈的肉类鲜味，是深受人们喜爱的鲜味调味品。其发酵生产可分为两大步骤，即由原料发酵生产出 L-谷氨酸，再通过谷氨酸的提取和精制制成味精。自 1909 年味精作为商品问世以来，其生产工艺和装备技术等都发生了巨大变化，味精工业生产发展迅速，已成为发酵工业重要的组成部分。我国味精生产后来居上，目前已成为世界上最大的味精生产国。

1.1.1 谷氨酸和味精的用途

谷氨酸和味精不仅用作调味品，在医药和工农业生产中也有着广泛的用途。

1.1.1.1 食品鲜味调味品

谷氨酸及其水溶液并没有鲜味，但谷氨酸与适量的碱发生中和反应生成的谷氨酸一钠，不仅酸味消失，而且有很强的鲜味，其鲜味阈值为 0.03%。在食品加工中使用味精，可使食品原味更为浓郁、协调、圆润，并可克服异味，如菠菜的金属味、豆腐的腥苦味和罐头肉类的铁腥味等，对酸、甜、苦和咸四个基本味道的强度没有影响。家庭和餐馆调味用的添加量一般为食品总量的 0.2%~0.5%。

关于味精的食用安全性，对小白鼠、大白鼠、兔和猴等的各种毒性试验，包括急性毒性、亚急性毒性、慢性毒性、致畸形性和突然变异性等实验证明，食用味精是安全的。如对小白鼠的急性毒性试验结果表明，小白鼠口服味精，其半致死剂量 LD_{50} 为 16200mg/kg，而食盐则为 5250mg/kg。根据毒性分级， $LD_{50} > 15000\text{mg/kg}$ ，即为绝对无毒。1987 年 3 月 17 日，在荷兰海牙召开的联合国 FAO/WHO 食品添加剂法规委员会第 19 届会议做出结论：作为一种增加食品风味的调味料味精，不再需要评价其每日容许摄入量，消费者可以放心食用。

1.1.1.2 在医药上的应用

谷氨酸对大脑有营养和保健作用。脑组织只能氧化谷氨酸，不能氧化其他氨基酸，所以谷氨酸能促进幼儿大脑智力发育，对神经系统疾病，如神经衰弱、癫痫、脑震荡和脑组织损伤等疾病具有良好的医疗效果。

谷氨酸具有解氨毒作用。蛋白质在人体内分解代谢的过程中会产生氨。若血液

中氨浓度高,会引起氨中毒,导致肝昏迷。谷氨酸可与氨结合生成谷氨酰胺,从而解除组织代谢过程中所产生的氨的毒害作用,预防和治疗肝昏迷。

1.1.1.3 在工业上的应用

谷氨酸可用于合成许多化工产品。用 D-谷氨酸聚合成的聚谷氨酸人造革,其质量接近天然皮革,且其强度、抗水性、透气性和耐老化性等都较好。

焦谷氨酸钠具有很强的吸湿性,其吸水性能比甘油高 50%,能保持皮肤湿润,防止干裂,并增强皮肤和毛发的柔性和弹力,可用于化妆品和医药品中,作为增湿剂和润肤剂。

十二烷基基谷氨酸钠肥皂以及用月桂酰氯与谷氨酸制成的月桂酰基谷氨酸钠肥皂,具有良好的洗净、起泡、乳化以及分散等性能,对皮肤和黏膜无刺激,可用作洗涤剂和化妆品。

1.1.1.4 在农业上的应用

氨基酸铜是新近开发的优良杀菌剂。谷氨酸铜可用作番茄的保护性杀菌剂,对防治果树腐烂病有特效。

用作植物生长调节剂,谷氨酸可增加柑橘果实的含糖量,降低酸度。

1.1.2 味精工业生产发展概况

1861 年,德国的 Ritthausen 从小麦面筋的硫酸水解液中分离到一种酸性氨基酸,根据原料的取材,将其命名为谷氨酸。1872 年,美国人 Ditter 推定出了谷氨酸的结构。1908 年,日本的池田菊苗为探究海带汁液的鲜味,从海带煮出汁中提取到了谷氨酸钠,由此创造了新的人工调味料,并获得了专利。1909 年,他与铃木三郎合作进行工业化生产商品味精——味之素,从此揭开了味精工业化生产的序幕。

1.1.2.1 味精生产方法沿革

在味精工业化生产过程中,其生产方法发生了很大变化,这个变化主要是在如何由原料生产谷氨酸方面。生产谷氨酸的方法可分为水解提取法、合成法和发酵法三大类。

(1) 水解提取法 1910 年,日本味之素公司采用酸水解面筋,后改用豆粕,将其中的蛋白质水解成多种氨基酸,然后提取出谷氨酸,再制成味精。该法是制造味精的最古老的方法,其优点是水解操作易于掌握,但原料来源少,价格高,得率低,每吨 99% 味精需耗用湿面筋(以含蛋白质 20.4% 计) 12t 或耗用豆粕(以含蛋白质 14.5% 计) 20t。对设备腐蚀性强,劳动繁重。目前已停用。

1936 年,美国从甜菜废液中提取出谷氨酸,每 200kg 废糖蜜可提取 5~6kg 谷氨酸,得率很低,工艺比较复杂,而且受地区性限制。所以,这种方法没能得到大规模生产应用。

(2) 发酵法 1946 年和 1948 年,美、日等国科学家先后选育出了能发酵葡萄

糖生成 α -酮戊二酸的菌株, 发酵得到 α -酮戊二酸, 再用酶法或化学法将之转变为 L-谷氨酸。所以, 这种方法又称为二步发酵法。该法由于操作工序烦琐, 生产成本低, 所以未能进行工业化应用。

1954 年, 多田和中山报道了直接发酵谷氨酸的研究。1956 年, 日本协和发酵公司分离选育出一株能利用葡萄糖在发酵液中直接积累 L-谷氨酸的细菌, 随后进行了工业化研究, 并于次年正式进行商业性生产。目前, 国内外味精生产厂家都用的是这种一步发酵法。这种方法的原料来源丰富, 含糖原料如淀粉水解糖和糖蜜、碳氢化合物、乙醇以及乙酸等都可用作发酵的原料。该法得率高, 成本低, 每 100kg 葡萄糖发酵可转化为谷氨酸达 55kg 左右。且其机械化、自动化程度高, 劳动强度低, 生产效率较高。但是, 发酵工厂的投资较大, 生产过程的操作和管理要求很严格, 否则会因污染杂菌和噬菌体而造成很大损失。此外, 还需要理想的生产菌种。

(3) 合成法 合成法是用碳化物、丙烯腈、丙烯醛、糠醛等为原料, 在高压下合成 DL-谷氨酸。1962 年, 日本味之素公司用该法生产谷氨酸, 其产量很小, 后因原料成本上升, 及其有毒副产物而使安全性受到怀疑, 于 1973 年停止生产。

1.1.2.2 世界味精工业生产概况

随着发酵法成功投产和不断革新完善, 全世界的味精工业生产发展很快。1957 年, 世界味精年产量仅有 3.05 万吨, 至 1965 年, 达到 10 万吨, 1987 年剧增到 55.8 万吨, 1992 年达到约 95.2 万吨, 2006 年味精产量约 220 万吨。世界味精生产主要集中在亚洲, 亚洲地区味精年产量占世界总产量的 90% 以上。

世界上主要的味精生产企业有日本味之素、韩国 CJ、中国台湾味丹和韩国的大象公司。2006 年日本味之素公司的味精生产量约占世界味精总产量的 30%, 约 58 万吨; 味丹国际公司是东南亚地区最大的味精生产企业之一, 2005~2006 年其味精及谷氨酸的总产量已超过 30 万吨。

国外味精生产一般以糖蜜为原料, 采用高糖、大接种量、添加青霉素(或表面活性剂)、低糖或高糖流加的发酵工艺, 产酸率高, 转化率高, 生产规模大, 自动化程度高, 能自动控制温度、压力、搅拌转速、空气流量、pH、溶解氧、消泡、补料、排气中的 CO_2 和 O_2 含量、体积溶氧系数等。提取工艺多采用除菌体、真空浓缩等电点法、连续等电点法, 得率高, 母液制肥料, 废水经生化处理, 化学需氧量(COD) 在 50mg/kg 以下。

1.1.2.3 我国味精生产概况

我国味精生产始于 1923 年, 最早是由上海天厨味精厂采用酸水解面筋法生产味精, 原料主要从澳洲进口, 生产成本低, 产量很小。1932 年, 沈阳味精厂用豆粕水解法生产味精。到 1949 年全国味精产量不足 500t。

1957 年开始发酵法生产谷氨酸的研究。1958 年, 北京大学的钱存柔等分离到一株谷氨酸发酵菌, 并对其发酵条件和生理代谢特性进行了研究。1961 年, 上海

市轻工业研究所采用一株谷氨酸生产菌短杆菌 617 进行谷氨酸发酵试验, 经过两年多的集中攻关, 于 1963 年通过 5000L 大型试验后, 由上海味精厂首先投产。由此, 我国开始了以发酵法工业生产谷氨酸。

1964 年, 中国科学院微生物研究所分离选育出高产谷氨酸产生菌北京棒状杆菌 AS1.299, 并对其发酵工艺进行了系统的研究。从此, 发酵法生产味精的工厂遍及全国, 味精产量大幅度提高。自 20 世纪 80 年代, 我国味精生产开始进入高速发展阶段, 1992 年成为世界味精生产的第一大国, 产量达 34 万吨。2006 年, 我国味精产量增长至 170 万吨, 占世界总产量的 75%。20 世纪 90 年代初, 我国约有味精生产厂家 200 余家, 由于原材料成本上升等因素, 至 2001 年生产厂家及企业为 130 家左右。2006 年我国的味精主要生产企业及产量情况见表 1-1。

表 1-1 2006 年我国味精主要生产企业产量

序号	企业名称	商品产量/万吨	产能/(万吨/年)	序号	企业名称	商品产量/万吨	产能/(万吨/年)
1	山东阜丰发酵有限公司	24.75	22.5	6	山东齐鲁味精集团公司	13.04	20
2	河北梅花味精集团公司	19.7	20	7	江苏菊花味精集团公司	11.15	10
3	河南莲花集团	16.79	20	8	山东铃兰味精工业公司	10.0	10
4	山东信乐味精有限公司	14.2	13	9	沈阳红梅集团有限公司	6.01	6
5	山东菱花集团公司	13.53	18	10	广州奥桑味精食品公司	5.32	5

注: 表中数据是根据中国发酵工业协会的不完全统计得出。

尽管我国是世界味精生产第一大国, 但并不是世界味精生产强国。我国的生产技术水平和世界先进水平相比, 还有相当大的差距。突出表现在生产分散, 规模小; 发酵技术水平低; 生产过程的自动化程度低, 劳动生产率低; 下游工程技术落后, 废水对环境污染严重。表 1-2 所列为我国味精生产的主要技术经济指标与国外先进水平的差距。

表 1-2 国内外味精生产的主要技术经济指标的比较 (以淀粉糖为原料)

项 目	世界先进水平	国 内	项 目	世界先进水平	国 内
产酸率/%	10~13	8~10	淀粉单耗/(t/t)	2.24	2.2~3.0
转化率/%	50~55	48~53	电耗/(kW·h/t)	1800~2000	2000~3000
提取率/%	去菌体浓缩等电点 88~90 带菌体浓缩等电点 85~88	低温等电点 78~80 等电点离子交换 88~92	单位发酵罐产量/[t/(m ³ ·a)]	16~20	6~15
精制收率/%	94~96	88~94	实物劳动生产率/[t/(人·年)]	20~50	5~15

当前, 我国味精行业要想提高生产技术水平 and 经济效益, 增强国内外市场竞争力, 应努力做到: 合理利用原材料, 选育和采用新菌种、新工艺、新技术、新装备, 节能降耗, 逐步实现自动控制, 提高劳动生产率, 搞好废水治理, 大力推行清洁生产、集约化生产, 提高环境和社会效益。

1.2 谷氨酸生产菌

1.2.1 谷氨酸生产菌的种类及其特征

1957年,日本学者发现两株细菌谷氨酸小球菌(后更名为谷氨酸棒杆菌)和另一种小球菌能够直接利用糖类产生谷氨酸。发酵法生产谷氨酸就是基于此而发现。之后,日本等国开展了大规模地从自然界筛选谷氨酸生产菌的工作,证实在芽孢杆菌属(*Bacillus*)、小球菌属(*Micrococcus*)、短杆菌属(*Brevibacterium*)、棒状杆菌属(*Corynebacterium*)、节杆菌属(*Arthrobacter*)和小杆菌属(*Microbacterium*)六个属中有许多菌株能产生谷氨酸。其中后四个属的微生物是研究和应用较多的谷氨酸生产菌。

到了20世纪60年代中后期,由于葡萄糖和糖蜜原料的价格上涨,人们开始研究用较为便宜的石油产品如烷烃作原料发酵生产谷氨酸,相继发现棒状杆菌属、节杆菌属、短杆菌属的一些菌株能够利用烷烃、乙醇、乙酸等原料发酵生产谷氨酸。

自1964年开始,我国的中国科学院微生物所、杭州味精厂等单位先后筛选出北京棒状杆菌(*C. pekinense*) AS1.299、钝齿棒状杆菌(*C. crenatum*) AS1.542和钝齿棒状杆菌 HU7251等多株谷氨酸生产菌并用于工业生产。

1.2.1.1 谷氨酸生产菌的分类和特征

(1) 棒状杆菌属 该属细胞的主要特征是,细胞为直到微弯的杆菌,常呈一端膨大的棒状,折断分裂形成“V”字形排列或栅状排列。不运动,少数植物致病菌能运动。革兰染色阳性,但亦有呈阴性反应者,菌体内常有着色不均一,常有横条纹或串珠状颗粒。细胞壁染色表明菌体由多细胞组成。抗酸染色阴性。好氧或厌氧。从葡萄糖发酵产酸,少数从乳糖发酵产酸。从自然界筛选得到的棒状杆菌谷氨酸生产菌大多属于腐生性细菌。大部分菌株利用糖质原料产生谷氨酸,一部分菌株能利用烷烃、乙酸产生谷氨酸。

棒状杆菌属中常用的谷氨酸生产菌有谷氨酸棒状杆菌(*C. glutamicum*)、北京棒状杆菌 AS1.299、钝齿棒状杆菌 AS1.542、糖蜜棒状杆菌(*C. melassecola*)、裂烃棒状杆菌(*C. hydrocarboclastus*)、嗜石油棒状杆菌(*C. petrophilum*)、解烷棒状杆菌(*C. alkanolyticum*)等。这些菌株中的大部分能发酵糖质原料产生谷氨酸,后三种棒状杆菌则能利用烷烃产生谷氨酸。

(2) 短杆菌属 短杆菌属的主要特征是,细胞为短的不分支的直杆菌,大小约为 $(0.5\sim1)\mu\text{m}\times(1\sim5)\mu\text{m}$ 。革兰染色阳性。大多数不运动,运动的种具有周生鞭毛或端生鞭毛。在普通肉汁蛋白胨培养基中生长良好。多数从葡萄糖发酵产酸,不发酵乳糖。有时产非水溶性色素,色素呈红、橙红、黄或褐色。大多数液化明胶;大多数还原石蕊并酪化牛奶,极少数能使牛奶变酸。可以从乳制品、土壤、昆虫、鱼及植物样品中分离得到。此外,该属菌株还不明显地从碳水化合物产生乳

酸、丙酸、丁酸或乙醇。接触酶阳性。菌体形态规则，非抗酸性菌，除分裂时菌体内形成隔壁外，菌体细胞内不具有隔壁。

短杆菌属的谷氨酸产生菌大多数是以糖质为原料，一部分能以乙酸、乙醇为碳源产生谷氨酸。该属中有许多谷氨酸产生菌，具代表性的有黄色短杆菌 (*B. flavum*)、乳糖发酵短杆菌 (*B. lactofermentum*)、产硫短杆菌 (*B. thiogenitalis*) 等。其中产硫短杆菌是能利用乙酸产生谷氨酸的高产菌株。

(3) 小杆菌属 该属细菌的分类特征是，杆状菌，形状和排列都和棒状杆菌相似， $(0.5\sim0.8)\mu\text{m}\times(1.0\sim3.0)\mu\text{m}$ 左右，有时呈球杆菌状。美蓝染色呈现颗粒，革兰染色阳性，不抗酸，无芽孢。在普通肉汁蛋白胨培养基上生长，补加牛奶或酵母膏则生长更好。产生带灰色或带黄色的菌落。发酵糖产酸弱，主要产乳酸，不产气。接触酶阳性。小杆菌属的谷氨酸产生菌主要是利用糖质原料产生谷氨酸。代表菌有嗜氨小杆菌 (*M. ammoniaphilum*)、水杨苷小杆菌 (*M. salicinovorum*) 等。

(4) 节杆菌属 本属细菌突出的特点是在培养过程中出现细胞形态或由球菌变杆菌、或由杆菌变球菌，革兰染色由阳性变阴性、又由阴性变阳性的变化过程。有的种细胞大小均匀，与小球菌形态上无明显区别；有的种大小不均一，大的球状细胞可比小的大几倍，称之为孢囊。移种到新鲜培养基上时，球状细胞萌发出杆状细胞。若有一个以上萌发点，则形成分枝的形态。新形成的杆菌延长并分裂。由分裂点又向外伸长，则与原来的杆菌形成角度，好像是分枝，实际上并没有什么分枝。革兰染色阴性或不定。杆状细胞随培养时间的延长而缩短，固体培养基上菌苔软或黏，液体培养生长旺盛。大部分的种液化明胶，从碳水化合物产酸极少或不产酸。还原硝酸盐，不产吡啶。好氧。大部分的菌种在 37°C 不生长或微弱生长， $20\sim25^{\circ}\text{C}$ 为适温。表现为典型的土壤微生物。

节杆菌属的谷氨酸产生菌除能利用糖质原料产生谷氨酸外，有些菌株还能以烃类为碳源产生谷氨酸。该属的谷氨酸产生菌常见的有石蜡节杆菌 (*A. paraffineus*)、裂烃谷氨酸节杆菌 (*A. hydrocarboglutamicus*) 等。

1.2.1.2 谷氨酸生产菌的共同特征

按照《伯杰氏系统细菌学手册》的分类，上述四个属的谷氨酸生产菌都属于第十五部分中的不规则、不形成芽孢的革兰阳性杆菌。通过对常用的糖质原料谷氨酸生产菌的研究发现，它们在形态、生理方面有许多共同之处，归纳起来主要如下所述。

- ① 细胞的形态为棒状、杆状、短杆状以至球形。
- ② 革兰染色呈阳性，无芽孢，无鞭毛不运动。
- ③ 都是需氧性微生物。
- ④ 都是生物素营养缺陷型，需要生物素作为生长因子。
- ⑤ α -酮戊二酸脱氢酶丧失或活性非常低，异柠檬酸脱氢酶和 L-谷氨酸脱氢酶活性强。

⑥ 发酵过程中,菌体发生明显的形态变化,同时发生细胞膜渗透性变化,可向环境中泄漏谷氨酸。

⑦ 培养液中积累谷氨酸在5%以上,不分解利用谷氨酸,并耐高浓度谷氨酸。

1.2.2 谷氨酸生产菌的筛选

生产上使用的谷氨酸生产菌很多是直接从自然界分离筛选得到的。随着生产的发展,对谷氨酸生产菌在原料、产酸率、便于提取和抗噬菌体等性能方面会提出一些新的要求,仍需要从自然环境中筛选出优良的谷氨酸生产菌。筛选工作一般有样品采集、平板分离、初筛、复筛、发酵试验和菌种鉴定、保藏等步骤。

1.2.2.1 样品采集

谷氨酸生产菌一般是好气性的腐生菌,所以,可从有机质含量丰富的土壤中采样分离,如林地、草地、农田、菜园、果园、动物园、植物园、堆肥以及食品厂、发酵厂的废弃物及其周围土壤等。但要注意味精厂现有菌种的污染。另外,还要注意取样环境生态的多样性,尽可能做到在寒带、温热带和热带地区都能取样。

取样时,取地表5~15cm处土样10g装入干净的塑料袋中,注明地点、时间。

北京棒状杆菌 AS1.299 是中科院微生物所从北京某食品厂的淀粉废浆水中分离得到的。钝齿棒状杆菌 AS1.542 则是从广州某酿酒厂的土壤中分离的。钝齿棒状杆菌 HU7251 是杭州味精厂从海南岛土壤中分离出来的。棒状杆菌 S-941 是沈阳味精厂从沈阳果酒厂储有葡萄残渣的土壤中分离得到的。天津短杆菌 T6-13 是天津市工业微生物研究所分离自天津大港油田的一株以醋酸为原料的谷氨酸生产菌,后移植用于淀粉糖原料生产谷氨酸。

1.2.2.2 平板分离

采集的土样应尽早从速分离。分离用培养基可用营养琼脂或半丰富培养基。营养琼脂营养丰富,利于各种类型的腐生菌生长,半丰富培养基则对许多腐生菌生长不利,而适于谷氨酸生产菌生长。

营养琼脂的配方是:牛肉膏1%,蛋白胨1%,NaCl 0.5%,琼脂1.8%~2.0%,pH 7.0~7.2。

半丰富培养基的配方是:葡萄糖2%, K_2HPO_4 0.1%, $MgSO_4$ 0.04%,玉米浆0.5%,尿素0.2%, Fe^{2+} 、 Mn^{2+} 各2mg/kg,溴百里酚蓝(bromothymol blue, BTB) 0.01%,琼脂1.8%~2.0%,pH 7.0~7.2。

为了控制霉菌的生长,还可在培养基中添加适量的灰黄霉素或制霉菌素。培养基中增加的溴百里酚蓝是一种酸碱指示剂,pH<6.0呈黄色,pH>7.6呈蓝色,pH6.0~7.6呈黄-绿-蓝色。生酸的细菌由于酸性而使菌落周围的培养基变为黄色,可以挑取这样的单菌落移植于营养琼脂斜面上,培养保存,供初筛使用。

1.2.2.3 初筛

为了从平板分离出的众多菌株中选出能够产生谷氨酸的菌株,淘汰其余的菌

株,可采用摇管发酵法进行初筛,以代替摇瓶加快筛选速度。方法是,取 $\phi 15\text{mm} \times 180\text{mm}$ 左右的试管,洗净后内装初筛培养基约 $1/4$ 管,塞上棉塞,灭菌备用。筛选用培养基可根据生产培养基或从表1-3中的几种培养基配方中选用。

表1-3 供谷氨酸生产菌筛选用的7种培养基

单位: %

成分	A	B	C	D	E	F	G
葡萄糖	5.0	5.0	5.0	1.0	5.0	2.0	5.0
硫酸铵		2.0					
磷酸铵					0.3		
尿素	0.8		0.8	0.5	0.5		0.5
牛肉膏	0.2	0.2	0.2				
蛋白胨	0.2	0.2		0.2			
酵母膏				0.5	0.5		
玉米浆						0.5	0.5
无机盐 ^①	添加	添加	添加	添加	添加	添加	添加
碳酸钙		3.0					
pH	7.2	7.2	7.2	7.2	6.0	6.0	

① 无机盐: K_2HPO_4 0.05%~0.1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02%~0.05%。

培养基灭菌冷却后,每管接入供试分离菌株斜面菌苔一环,横向斜置于冲程7.6cm、频率96r/min的往复式摇床上,恒温32~34℃发酵24h。发酵结束,发酵液经3000r/min离心5min,取上清液在色谱纸上点样进行纸上色谱分析。点样量5 μL ,并用1%谷氨酸溶液点样作为对照。色谱分析剂为正丁醇-冰醋酸-水4:1:1,显色剂为含0.5%茚三酮的正丁醇溶液。展层数小时后取出,标出溶液前沿,晾干,均匀喷上茚三酮液,稍干,60℃烘干。若呈现明显紫蓝色色斑,表明该菌株能产谷氨酸,与标准谷氨酸斑点比较,则可粗略知道该菌株谷氨酸或氨基酸产量。选出产酸较高的菌株供进一步复筛用。

1.2.2.4 复筛

复筛就是继续通过摇瓶试验从初筛出的菌株中选出谷氨酸产量较高的菌株,并优化其发酵培养基配方和工艺条件。

复筛可选用500mL或1000mL三角瓶,内装培养基25mL或50mL,培养基配方与初筛相同或根据供试菌株的特点组成新的配方。瓶口用6层纱布扎口。接入摇瓶培养的种子,接种量5%。然后,置于冲程7.6cm、频率96r/min的往复式摇床上,培养温度32~34℃,发酵过程中要检查培养液的pH变化情况,及时增加一定量的尿素。培养40~48h后取样测定发酵液中的谷氨酸含量。

测定谷氨酸含量采用华勃式呼吸仪法。在一定的温度、压力下,用大肠杆菌L-谷氨酸脱羧酶作用于发酵液中的谷氨酸,根据放出 CO_2 的体积换算出谷氨酸含量。

复筛选出能接近或超过现有生产菌种的产酸水平的菌株,接着进行优化培养基和发酵条件的试验。