



食品发酵

理论与技术研究

刘晔◎著

我国地域广阔，
农产品种类和气候差异较大，
发酵食品种类多，
口感和风味多样，
极大地丰富了我国人民的日常生活。



中国水利水电出版社
www.waterpub.com.cn

食品发酵理论与技术研究

刘晔 著



中国水利水电出版社
www.waterpub.com.cn

· 北京 ·

内 容 提 要

本书主要以食品发酵研究为基本点,分别从基本原理、现代物流、发酵食品有害物质研究、发酵食品与健康的研究等全方面对食品发酵进行具体分析。本书主要内容有食品发酵的理论基础、食品发酵的种类与技术研究、食品发酵的微生物学原理基础研究、食品发酵有害物质研究与消除策略、发酵食品与健康、发酵食品的保鲜技术与贮藏技术等。

本书内容涵盖面广,逻辑紧密,深入浅出,适合作为现代食品研究技术人员的参考用书,同时也为对食品安全感兴趣的人员提供有益的参考资料。

图书在版编目(CIP)数据

食品发酵理论与技术研究 / 刘晔著. — 北京: 中国水利水电出版社, 2018.8
ISBN 978-7-5170-6370-4

I. ①食… II. ①刘… III. ①食品—发酵—研究
IV. ①TS201.3

中国版本图书馆CIP数据核字(2018)第211236号

责任编辑: 陈 洁 封面设计: 王 伟

书 名	食品发酵理论与技术研究 SHIPIN FAJIAO LILUN YU JISHU YANJIU
作 者	刘晔 著
出版发行	中国水利水电出版社 (北京市海淀区玉渊潭南路1号D座 100038) 网址: www.waterpub.com.cn E-mail: mchannel@263.net (万水) sales@waterpub.com.cn 电话: (010) 68367658 (营销中心)、82562819 (万水)
经 售	全国各地新华书店和相关出版物销售网点
排 版	北京万水电子信息有限公司
印 刷	三河市元兴印务有限公司
规 格	170mm×240mm 16开本 12印张 219千字
版 次	2018年9月第1版 2018年9月第1次印刷
印 数	0001—2000册
定 价	48.00元

凡购买我社图书,如有缺页、倒页、脱页的,本社营销中心负责调换

版权所有·侵权必究



作者简介

刘晔，生于1969年，副教授，山东大学发酵工程学硕士，山东省工业微生物协会会员，现任教于齐鲁工业大学生物工程学院酿酒工程系。任职期间参与国家自然科学基金《难降解水溶性木素及衍生物的氧化酶催化》中氧化酶的催化工作，多次参与山东省自然科学基金课题及《综合香型白酒的研制》等横向课题，授权实用新型专利五项，先后发表中文核心期刊论文数篇，参与编写高等教育出版社教材《发酵工程原理与技术》中的第十六章固定化酶和固定化细胞技术原理。

前 言

发酵食品历史悠久且具有丰富的营养价值和保健功能，深受广大消费者的喜爱，在食品工业和人们的日常生活中占据重要地位。我国地域广阔，农产品种类和气候差异较大，发酵食品种类多，口感和风味多样，极大地丰富了我国人民的日常生活。然而，我国发酵食品生产多采用传统工艺，总体技术含量及工业化程度低，劳动强度大，产品质量不稳定，技术发展相对滞后，亟须对传统的发酵工艺进行技术革新，整体提升水平，特别是在液体发酵中，采用无菌管道输送、自动接种、智能控制发酵、全自动灌装等技术，既能提高生产效率及产品品质，又能更好地保证产品安全。近年来，生物技术、机械制造技术得到了迅猛发展，大批具有生产潜力的微生物菌种以及自动化程度高的发酵设备相继应用于发酵领域，极大地推动了传统发酵食品的工业化进程。

本书共分为6章。第一章介绍食品发酵的理论基础，包括食品发酵的特点、分类、研究现状以及菌种的选育和保藏。第二章介绍食品发酵的技术，阐述了酒类发酵技术、调味品发酵技术、蔬果发酵技术以及肉制品发酵技术，本章是本书的重点内容。第三章介绍食品发酵的微生物学原理基础，包括微生物的生化机理、代谢类型、物质转化等。第四章介绍食品发酵有害物质的消除策略，主要阐述了食源性致病微生物的消除方法。第五章介绍发酵食品与健康，阐述了酵素的来源、酵素对不同人群的功效以及不同酵素的混搭使用效果。第六章介绍发酵食品的保鲜技术与贮藏技术，包括发酵食品保鲜技术的发展及趋势和发酵食品的具体贮藏方法，在此主要介绍了空气调节保鲜技术、低温贮藏技术、灌装贮藏技术以及干制贮藏保鲜技术。

本书参考并引用了大量相关文献，在此我们对相关作者深表感谢。由于作者学识与经验有限，加之时间匆促，书中谬误之处难以避免，恳请同行专家和读者不吝指正。

齐鲁工业大学（山东省科学院）

刘 晔

2018年4月

目 录

前言

第一章 食品发酵的理论基础	1
第一节 发酵食品分类特点及质量标准	2
第二节 我国发酵食品产业的现状研究	4
第三节 发酵食品生产菌种的选育与保藏	5
第二章 食品发酵的种类与技术研究	17
第一节 酒类发酵及工艺研究	18
第二节 调味品发酵及工艺研究	36
第三节 酵素发酵及工艺研究	42
第四节 酸乳制品及肉制品发酵工艺研究	50
第三章 食品发酵的微生物学原理基础研究	61
第一节 食品发酵微生物生化机理研究	62
第二节 食品微生物的主要代谢及发酵类型	75
第三节 食品发酵主要大分子物质的微生物利用及转化	82
第四章 食品发酵有害物质研究与消除策略	89
第一节 发酵食品的安全性概述	90
第二节 发酵食品中有害微生物的控制——开放混菌体系	97
第三节 发酵食品生物危害物合成途径的阻断与抑制	101
第四节 基因工程微生物应用于发酵食品生产的安全性政策	102
第五节 发酵食品生产环境污染治理	106
第五章 发酵食品与健康	113
第一节 食品发酵中的酵素来源与生命原动力	114
第二节 食品发酵酵素对不同人群的功效	115

第三节	食品发酵酵素的其他功效·····	123
第六章	发酵食品的保鲜技术与贮藏技术·····	127
第一节	发酵食品保鲜技术的内容与发展趋势·····	128
第二节	发酵食品的空气调节保鲜技术·····	130
第三节	发酵食品的低温贮藏技术·····	141
第四节	发酵食品的罐藏技术·····	155
第五节	发酵食品的干制贮藏保鲜技术·····	159
第六节	现代物流与发酵食品的关系·····	172
参考文献	·····	178

第一章

食品发酵的理论基础

在中国，发酵食品已有很长的历史，其内涵非常丰富。发酵食品的口味和质地较好，比较适合中国人的口味，国人对其比较喜爱，现在逐渐向其他地区和国家传播，在一定程度上影响了世界饮食结构和文化。通过多种试验证明，发酵食品同样具有多种营养保健功能。发酵食品的制作离不开微生物。发酵食品的传统生产是通过自然控制生产条件从而促使多种微生物在原料中生长、作用的过程。先辈们经过多年的生活经验总结出了上述方法，但是这种方法存在一些缺点，如它对自然环境的依赖程度太高，不可以连续生产；多为家庭式作坊生产，产品质量很难保持一致；不利于规模化和现代化生产，等等。

第一节 发酵食品分类特点及质量标准

发酵食品是指加工制造过程中用到微生物的一类食品。对于发酵食品来说,全世界许多国家都有自己独特风味的产品。相对来说,东方国家更喜欢发酵食品,知名的有韩国泡菜、日本纳豆、印度丹贝等。发酵食品具有一些特点,比如,制作成本较低、容易保藏、风味独特以及具有一定营养价值等。除此之外,有些食品原本具有植酸、单宁、多酚类物质等有毒成分或抗性因子,对其进行发酵处理可以清除某些原料中的抗性因子和有毒成分。

我国发酵食品历史悠久,有着丰富的种类,多数发酵食品都具有独特的风味。许多材料都可以作为食品发酵的原料,包括水果、蔬菜、肉类、粮食谷物、乳品等。每种原料的营养特性不同,发酵时需要使用不同的微生物,当然制作出来的成品也具有不同的风味,包括酱油、醋等调味品,白酒、啤酒、黄酒等酒类,等等。我国已经对发酵食品进行了深入、广泛的研究,包括发酵食品的安全性、生产特点、营养保健性等多个方面。

功能性发酵食品主要是以高新生物技术(包括发酵法、酶法)形成具有某种生理活性的成分,生产出能调节机体生理功能的食品,使消费者在享受美味食物的同时,也达到调节自身生理机能,甚至辅助治疗某些疾病的效果。目前,对大部分发酵食品的生化过程、代谢作用机制尚不清楚,而功能发酵食品的生理调节机制仍需探讨,对基础理论知识的掌握,可为食品新功能、新工艺、新产品的开发创造条件和奠定基础。

一、发酵食品的分类及特点

(一) 发酵食品的分类

发酵食品的分类标准主要有三个,分别是原料种类、微生物种类及发酵概念。

1. 按照所利用原料的种类分类

- (1) 谷物发酵制品。如面包、黄酒、白酒、啤酒、食醋等。
- (2) 发酵豆制品。如酱油、豆腐乳、纳豆、豆豉、丹贝等。
- (3) 发酵果蔬制品。如果酒、果醋、果蔬发酵饮料、泡菜、果汁发酵饮料等。
- (4) 发酵肉制品。如发酵香肠、发酵干火腿、培根等。

(5) 发酵水产品。如鱼露、蟹酱、酶香鱼等。

2. 按照所利用主要微生物的种类分类

(1) 酵母菌发酵食品。如面包、啤酒、葡萄酒及其他果酒、食醋、面酱、食用酵母等。

(2) 霉菌发酵食品。如白酒、糖化酶、果胶酶、柠檬酸、豆豉、酱油等。

(3) 细菌发酵食品。如谷氨酸、淀粉酶、豆腐乳、豆豉、酱油、黄原胶、味精等。

(4) 酵母、霉菌混合发酵食品。如酒精、绍兴酒、日本清酒等。

(5) 酵母、细菌混合发酵食品。如腌菜、奶酒、果醋等。

(6) 酵母、霉菌及细菌混合发酵食品。如食醋、大曲酒、酱油及酱类发酵制品等。

3. 按照传统发酵食品和现代发酵食品的概念分类

(1) 传统发酵食品。如发酵面食、发酵米粉、醪糟、白酒、啤酒、酱油、面酱、豆豉、食醋、豆酱、泡菜、纳豆、丹贝、鱼露、发酵香肠等。

(2) 现代发酵食品。如柠檬酸、苹果酸、醋酸、真菌多糖、细菌多糖、维生素C、发酵饮料、微生物油脂、食用酵母、单细胞蛋白等。

(二) 发酵食品的特点

发酵与酿造工业本质是利用生物体或生物体产生的酶进行的化学反应，其主要特点如下：

(1) 安全简单。常温常压是大多数食品发酵和酿造的环境，生产过程不存在危险。

(2) 原料广泛。淀粉、蜜糖是食品发酵与酿造的主要原料，许多作物都含有这两种原料，原料来源广泛。

(3) 反应专一。食品发酵与酿造过程是通过生物体的自动调节方式完成的，反应的专一性强。因此，得到的代谢产物也比较单一，降低了混入有害副产物的可能性。

(4) 代谢多样。每种微生物的代谢方式与过程都不一样，生物体进行化学反应时具有高度的选择性，这就使得可以在自然界中找到多数化合物的代谢产物，即使是非常复杂的化合物。因此，发酵与酿造适应范围很广。

(5) 易受污染。发酵时使用的培养基具有各种营养物质，可以满足大多数微生物的生长需求。因此，在发酵与酿造的过程中，对于杂菌的污染要严格控制，有很大一部分反应需要在密闭的环境下进行。在接种前，需要对各种设备和培养基进行灭菌处理；反应中，若是添加液体营养物质，也要保证无菌。发酵成功与否的重点是发酵过程是否有杂菌污染。

二、发酵食品典型产品质量标准

发酵食品生物工艺产品的质量标准有酒、酒精、发酵调味品、有机酸、氨基酸等几类。酒类质量标准包括啤酒、白酒、葡萄酒、黄酒等，酒精质量标准包括食用酒精和工业酒精等，发酵调味品质量标准包括酿造酱油、酿造食醋和酱等，以及柠檬酸、味精质量标准。发酵食品标准绝大多数为国家标准，也有部分为行业标准。食品标准的具体内容可从“食品伙伴网”下载。现选取部分典型发酵食品的质量标准编号列举如下：GB 4927—2008《啤酒质量标准》；GB/T 10781.1—2006《浓香型白酒质量标准》；GB/T 10781.2—2006《清香型白酒质量标准》；GB/T 10781.3—2006《米香型白酒质量标准》；GB/T 23547—2009《浓酱兼香型白酒质量标准》；GB 15037—2006《葡萄酒质量标准》；GB/T 13662—2008《黄酒质量标准》；GB 10343—2008《食用酒精质量标准》；GB/T 394.1—2008《工业酒精质量标准》；GB 18186—2000《酿造酱油质量标准》；GB 18187—2000《酿造食醋质量标准》；GB 2718—2014《酿造酱质量标准》；GB/T 8269—2006《柠檬酸质量标准》；GB/T 8967—2007《谷氨酸钠（味精）质量标准》等。

第二节 我国发酵食品产业的现状研究

近年来，我国发酵食品产业取得了长足进步。据不完全统计，全国固态发酵食品企业共计45000余家。2011年，我国白酒、酱油、食醋的产量分别为1026万t、663万t和330万t，比2010年分别提高15%、11%和32%。2011年，上述产业共实现总产值约4200亿元，约占当年国内生产总值的0.9%，利税总额达1500亿元，直接就业人数150余万人，间接带动上下游相关产业规模10000亿元以上。

虽然我国发酵食品产业取得了一些成绩，但我国传统发酵食品总体工业化程度不高，大多数传统发酵食品企业规模小、技术管理落后，很大一部分传统发酵食品的加工手段比较原始或工业化程度较低，没有足够的竞争力进军国际市场，在国内市场竞争中也不占优势。

使用传统的食品发酵技术生产出来的产品质量参差不齐，目前我国大多数的发酵食品生产企业采用的还是传统的天然发酵工艺，发酵过程多依

赖技术人员的经验，外界因素对产品质量的影响很大。在产品品质、风味方面，同一批次的产品也具有较大的差异，很难实现标准化生产。传统的发酵技术很难控制发酵过程中的菌群，很容易造成杂菌污染，产生有毒副作用的物质，威胁到食品发酵的安全。传统发酵产业的发展依赖于工艺技术革新，这类似于大多数的食品产业。

在我国，有一部分传统发酵食品企业生产工艺落后，对于传统发酵工艺中的不利因素没有及时去除，仍使用老旧的生产工艺；有一部分企业为了追求利益和效率，胡乱革新工艺技术，丧失了产品的传统特色，如此工艺革新对我国传统食品发酵产业造成了极大的负面影响。

第三节 发酵食品生产菌种的选育与保藏

一、菌种的选育技术

菌种是发酵食品生产的关键，性能优良的菌种才能使发酵食品具有良好的色、香、味等食品特征。菌种的选与育是一个问题的两个方面，没有的菌种要向大自然索取，即菌种的筛选；已有的菌种要改造，以获得更好的发酵食品特征，即育种。因此，菌种选育的任务是不断发掘新菌种，向自然界索取发酵新产品；改造已有的菌种，达到提高产量、符合生产要求的目的。

育种的理论基础是微生物的遗传与变异，遗传和变异现象是生物最基本的特性。遗传包含变异，变异也包含遗传，遗传是相对的，变异则是绝对的。微生物由于繁殖快速，生活周期短，在相同时间内，环境因素可以相当大地重复影响微生物，使个体较易变异，变异后的个体可以迅速繁殖而形成—个群体并表现出来，便于自然选择和人工选择。

（一）自然选育

自然选育是菌种选育的最基本方法，它是利用微生物在自然条件下产生自发变异，通过分离、筛选，排除劣质性状的菌株，选出维持原有生产水平或具有更优良生产性能的高产菌株的方法。因此，通过自然选育可达到纯化与复壮菌种、保持稳定生产性能的目的。当然，在自发突变中正突变概率是很低的，选出更高产菌株的概率一般来说也很低。由于自发突变的正突变率很低，多数菌种产生负变异，其结果使生产水平不断下降。因此，在生产中需要经常进行自然选育工作，以维持正常生产的稳定。

自然选育也称自然分离，主要作用是对菌种进行分离、纯化，以获得遗传背景较为单一的细胞群体。一般的菌种在长期的传代和保存过程中，由于自发突变使其变得不纯或生产能力下降，因此在生产和研究时要经常进行自然分离，对菌种进行纯化。其方法比较简单，尤其是单细胞细菌和产孢子的微生物，只需将它们制备成悬液，选择合适的稀释度，通过平板培养获得单菌落就能达到分离目的。而那些不产孢子的多细胞微生物（许多是异核的），则需要用原生质体再生法进行分离、纯化。自然选育分以下几步进行：

（1）通过表现形态来淘汰不良菌株。菌落形态包括菌落大小、生长速度、颜色、孢子形成等可直接观察到的形态特征。通过形态变化分析判断去除可能的低产菌落，将高产型菌落逐步分离筛选出来。此方法适用于那些特征明显的微生物，如丝状真菌、放线菌及部分细菌，而对外观特征较难区分的微生物就不太适用。以抗生素菌种选育为例，一般低产菌的菌落不产生菌丝，菌落多为光秃型；生长缓慢，菌落过小，产孢子少；孢子生长及孢子颜色不均匀，产生白斑、秃斑或裂变；生长过于旺盛，菌落大，孢子过于丰富等。这类菌落中也可能包含高产型菌，但由于表现出严重的混杂，其后代容易分离和不稳定，也不宜于做保存菌种。判断高产菌落的依据：孢子生长有减弱趋势，菌落中等大小，菌落偏小但孢子生长丰富，孢子颜色有变浅趋势，菌落多、密、表面沟纹整齐，分泌色素或逐渐加深或逐渐变浅。

（2）通过目的代谢物产量进行考察。这种方法是建立在菌种分离或者诱变育种的基础上的，在第一步初筛的基础上对选出的高产菌落进行复筛，进一步淘汰不良菌株。复筛通过摇瓶培养（厌氧微生物则通过静置培养）进行，可以考察出菌种生产能力的稳定性和传代稳定性，一般复筛的条件已较接近于发酵生产工艺条件。经过复筛的菌种，在生产中可表现出相近的产量水平。复筛出的菌种应及时进行保藏，避免过多传代而造成新的退化。

（3）进行遗传基因型纯度试验，以考察菌种的纯度。其方法是将复筛后得到的高产菌种进行分离，再次通过表现形态进行考察，分离后的菌落类型越少，则表示纯度越高，其遗传基因型越稳定。

（4）传代的稳定性试验。在生产中活化、逐级扩大菌种，必然要经过多次传代，这就要求菌种具有稳定的遗传性。在试验中一般需要进行3~5次的连续传代，产量仍保持稳定的菌种方能用于生产。在传代试验中，要注意试验条件的一致性，以便能准确反映各代间生产能力的差异。

通过自然发生的突变，筛选那些含有所需性状得到改良的菌种。随着

富集筛选技术的不断完善和改进,自然育种技术的效率有所提高,如含有突变基因 naE 、 $mutD$ 、 $mutT$ 、 $mutM$ 、 $mutH$ 、 $mutI$ 等的大肠杆菌突变率相对较高。酒精发酵是最早把微生物遗传学原理应用于微生物育种实践而提高发酵产物水平的成功实例。自然选育是一种简单易行的选育方法,可以达到纯化菌种、防止菌种退化、提高产量的目的,但发生自然突变的概率特别低。这样低的突变率导致自然选育耗时长、工作量大,影响了育种的工作效率。

(二) 诱变育种

在现代育种领域,诱变育种主要是提高突变菌株产生某种产物能力的手段。

1. 诱变育种的基本方法

诱变育种的方法主要有3种,具体如下:

(1) 物理因子诱变。物理诱变剂有很多种,包括紫外线、激光、低能离子、X射线、 γ 射线等。在上述物理诱变因子中,最常使用的是紫外线,它在诱变微生物突变方面可以发挥非常大的作用。DNA和RNA的嘌呤和嘧啶在吸收紫外光方面具有很强的能力,一定程度下还可致死。相比X射线和 γ 射线来说,紫外线具有较少的能量,可以对核酸造成比较单一的损伤。故紫外线不仅可以造成转换、移码突变或缺失等,还可以在DNA的损伤与修复中发挥重要作用。

近些年,出现了新的物理诱变技术——低能离子的使用。该方法对生物的生理损伤较小,同时还可以得到较高的突变率和更广的突变谱;使用的设备比较简单,成本较低;不会对人体和环境造成危害和污染。目前,在微生物菌种选育中,选择注入的离子多为气体单质正离子,最常使用的是 N^+ ,除此之外,还有 H^+ 、 Ar^+ 、 O^{6+} 以及 C^{6+} 。

(2) 化学因子诱变。化学因子是一类引起DNA异变的物质,通过与DNA发生作用,将其结构改变。化学诱变剂有很多种,包括烷化剂、金属盐类等。其中,应用最广泛的化学诱变剂是烷化剂,它也是最有效的诱变剂。在突变率方面,化学诱变剂高于电离辐射;在经济方面,化学诱变剂优于电离辐射。但需要注意的是,无论是化学诱变剂还是电离辐射,它们都有致癌作用,使用的时候需要小心。

(3) 复合因子诱变。对于那些长时间使用诱变剂的菌株来说,它们会有一些副作用,包括诱变剂“疲劳效应”、延长生长周期、引起代谢速度缓慢、减少孢子量等。上述副作用非常不利于生产,因此在实际中菌株进行诱变的时候,通常采用多种诱变剂复合、交叉使用。复合诱变方法有很多种,包括重复使用同一种诱变剂、同时使用两种或两种以上诱变剂、先后使用两种或两种以上诱变剂。通常情况下,复合诱变剂的使用效果优于

单一诱变剂，复合诱变剂具有协同效应。

2. 诱变育种的影响因素

影响诱变育种的因素主要有5个，具体如下：

(1) 诱变剂的种类非常多，在实际选用诱变剂的时候，需要根据实际情况选择简便有效的诱变剂。使用诱变剂处理的微生物也要符合一定的要求，最好是以悬浮液状态呈现，细胞需要尽量分散。这种状态下可以使细胞诱变更加均匀，也有利于后期单菌落的培养，避免形成不纯的菌落。

(2) 使用诱变剂处理的细胞最好是单核细胞，核质体越少越好。

(3) 影响诱变效果的因素有很多种，微生物的生理状态是其中一种，微生物对诱变剂最敏感的时期是对数期。

(4) 诱变剂的剂量。大多数诱变剂都具有杀菌作用，还可做杀菌剂使用。诱变剂合适的剂量是指在诱变育种的时候，在提高诱变率的基础上，还可以提高变异幅度，同时还能使得异变向正变范围偏移的用量。若使用的诱变剂剂量过低，那么发生的异变率过低；若使用的诱变剂剂量过高，那么会杀死大量的细胞，影响特定的筛选。

(5) 出发菌株是指用于育种的原始菌株，合适的出发菌株可以提高育种效率。一般多用生产上正在使用、对诱变剂敏感的菌株。

3. 高产菌株筛选

诱变育种的目的在于提高微生物的生产量，但对于产量性状的突变来说，不能用选择性培养的方法筛选。因为高产菌株和低产菌株在培养基上同样地生长，也无一种因素对高产菌株和低产菌株显示差别性的杀菌作用。

测定菌株的产量高低采用摇瓶培养，然后测定发酵液中产物数量的方法。如果把经诱变剂处理后出现的菌落逐一用上述方法进行产量测定，工作量很大。如果能找到产量和某些形态指标的关联，甚至设法创造两者间的相关性，则可以大大提高育种的工作效率。因此在诱变育种工作中应利用菌落可以鉴别的特性进行初筛。例如，在琼脂平板培养基上，通过观察和测定某突变菌菌落周围蛋白酶水解圈的大小、淀粉酶变色圈的大小、色氨酸显色圈的大小、柠檬酸变色圈的大小、抗生素抑菌圈的大小、纤维素酶对纤维素水解圈的大小等，估计该菌落菌株产量的高低，然后再采用摇瓶培养法测定实际的产量，可以大大提高工作效率。

上述这类方法所碰到的困难是对产量高的菌株来说，作用圈的直径和产量之间并不呈直线关系。为了克服这一困难，在抗生素生产菌株的育种工作中，可以采用抗药性的菌株作为指示菌，或者在菌落和指示菌中间加

一层吸附剂吸去一部分抗生素。一个菌落的产量越高，它的产物必然扩散得也越远。对于特别容易扩散的抗生素，即使产量不高，同一培养皿上各个菌落之间也会相互干扰，可以采用琼脂挖块法克服产物扩散所造成的困难。该方法是在菌落刚开始出现时就用打孔器连同一块琼脂打下，把许多小块放在空的培养皿中培养，待菌落长到合适大小时，把小块移到已含有供试菌种的一大块琼脂平板上，分别测定各小块抑菌圈大小并判断其抗生素的效价。由于各琼脂块的大小一样，且该菌落的菌株所产生的抗生素都集中在琼脂块上，所以只要控制每一培养皿上的琼脂小块数和培养时间，或者再利用抗药性指示菌，就可以得到彼此互不干扰的抑菌圈。

（三）杂交育种

杂交育种是指两个基因型不同的菌株通过接合使遗传物质重新组合，从中分离和筛选具有新性状菌株的方法。杂交育种往往可以消除某一菌株在诱变处理后所出现的产量上升缓慢的现象，因而它是一种重要的育种手段。但杂交育种方法较复杂，许多工业微生物有性世代不是十分清楚，故没有像诱变育种那样得到普遍推广和使用。

杂交育种的方法有4种，具体如下：

（1）细菌杂交。将两个具有不同营养缺陷型、不能在基本培养基上生长的菌株，以 10^5 cfu/mL的浓度在基本培养基中混合培养，结果有少量菌落生长，这些菌落就是杂交菌株。细菌杂交还可通过F因子转移、转化和转导等方式发生基因重组。

（2）放线菌的杂交育种。放线菌杂交是在细菌杂交基础上建立起来的，虽然放线菌也是原核生物，但它有菌丝和孢子，其基因重组方式类似于细菌，育种方法与霉菌有许多相似之处。

（3）霉菌的杂交育种。不产生有性孢子的霉菌是通过准性生殖进行杂交育种的。准性生殖是真菌中不通过有性生殖的基因重组过程。准性生殖包括三个相互联系阶段：异核体形成、杂合二倍体的形成和体细胞重组（即杂合二倍体在繁殖过程中染色体发生交换和染色体单倍化，从而形成各种分离子）。准性生殖具有和有性生殖类似的遗传现象，如核融合，形成杂合二倍体，接着染色体分离，同源染色体间进行交换，出现重组体等。

霉菌的杂交通过四步完成：选择直接亲本、形成异核体、检出二倍体和检出分离子。

1) 选择直接亲本。两个用于杂交的野生型菌株即原始亲本，经过人工诱变得到的用于形成异核体的亲本菌株即称为直接亲本，直接亲本有多种遗传标记，在杂交育种中用得最多的是营养缺陷型菌株。

2) 异核体形成。把两个营养缺陷型直接亲本接种在基本培养基上, 强迫其互补营养, 使其菌丝细胞间吻合形成异核体。此外, 还有液体完全培养基混合培养法、完全培养基混合培养法、液体有限培养基混合培养法、有限培养基异核丛形成法等。

3) 检出二倍体。一般有3种方法: 一是将菌落表面有野生型颜色的斑点和扇面的孢子挑出进行分离、纯化; 二是将异核体菌丝打碎, 在完全培养基和基本培养基上进行培养, 出现异核体菌落, 将具有野生型的斑点或扇面的孢子或菌丝挑出, 进行分离、纯化; 三是将大量异核体孢子接种于基本培养基平板上, 将长出的野生原养型菌落挑出分离、纯化。

4) 检出分离子。将杂合二倍体的孢子制成孢子悬液, 在完全培养基平板上分离成单孢子菌落, 在一些菌落表面会出现斑点或扇面, 每个菌落接种一个斑点或扇面的孢子于完全培养基的斜面上, 经培养纯化、鉴别而得到分离子。也可用完全培养基加重重组剂对氟苯丙氨或吡啶黄类物质制成选择性培养基, 进行分离子的鉴别检出。

(四) 基因工程育种

基因工程育种是指利用基因工程方法对生产菌株进行改造而获得高产菌株, 或者是通过微生物间的转基因而获得新菌种的育种方法。人们可以按照自己的愿望进行严格的设计, 通过体外DNA重组和转移等技术, 对原物种进行定向改造, 获得对人类有用的新性状, 大大缩短了育种时间。

1. 基因工程育种的过程

重组DNA技术一般包括4步, 即目的基因的获得、与载体DNA分子的连接、重组DNA分子引入宿主细胞及从中筛选出含有所需重组DNA分子的宿主细胞。作为发酵工业的工程菌株在此四步之后还需加上外源基因的表达及稳定性的考虑。

2. 基因工程育种的关键步骤

基因工程育种的关键步骤有4步, 分别是获取目的基因、基因表达载体的构建、将目的基因导入受体细胞以及检测并鉴定。

(1) 获取目的基因。实施基因工程的第一步有两条途径: 一是从供体细胞的DNA中分离基因; 二是人工合成基因。

通常使用“鸟枪法”对基因进行直接分离。该方法使用限制酶对DNA进行切割, 分为多个片段, 然后将片段分别载入运载体中, 之后转入受体细胞, 使得DNA片段在受体细胞内扩增, 最后再分离出带有目的基因的DNA片段。该方法操作简单, 但工作量大、盲目性强。

对于含有不表达DNA片段的真核细胞基因, 通常使用的方法是人工合成。目前, 人工合成基因有两条途径: 一是通过基因的转录与反转录形成