

工業微生物學專業試用教材

工 业 微 生 物 学

(供學員学习討論用)

武汉大学六大队二十三連編

一九七一年三月

毛主席语录

鼓足干劲，力争上游，多快好省地建设社会主义。

中国人民有志气，有能力，一定要在不远的将来，赶上和超过世界先进水平。

马克思主义者认为，只有人们的社会实践，才是人们对于外界认识的真理性的标准。

我们的实践证明：感觉到了的东西，我们不能立刻理解它，只有理解了的东西才更深刻地感觉它。感觉只解决现象问题，理论才解决本质问题。这些问题的解决，一点也不能离开实践。

目 錄

第三章 抗 菌 素 发 酵

第一部分 抗菌素发酵生产	(1)
第一节 前言	(1)
第二节 发酵生产中土霉菌的生长和发育特征	(5)
一、斜面培养	(5)
二、平板菌落	(6)
三、在固体培养基上生长发育周期性及对生产能力的影响	(7)
四、深层培养过程中菌絲生长发育	(9)
五、土霉素发酵的质量标准	(10)
第三节 培养基及生产中的设备消毒灭菌	(10)
一、抗菌素产生菌的营养要求	(10)
二、土霉素生产培养基	(14)
三、培养基及生产中各种设备的消毒灭菌	(15)
第四节 土霉素发酵生产工艺条件	(16)
一、温度	(16)
二、通气与搅拌	(17)
三、pH	(18)
四、通氮补料	(18)
五、消沫	(19)
六、发酵过程中的检验	(20)
第五节 提炼	(20)
一、土霉素的提炼	(21)
二、抗菌素提炼的常用方法及有关原理	(24)
第六节 成品检验	(31)
一、抗菌素的特性和质量要求	(31)
二、检验用抗菌素标准品	(32)
三、成品检验方法	(33)
第二部分 抗菌素发酵设备简介	(35)
第一节 发酵缶的结构及其作用	(36)
一、缶体	(36)
二、管件和阀门	(36)
三、搅拌器	(40)
四、挡板	(40)

五、空气分布器	(41)
六、传热装置	(42)
七、传动部分	(42)
八、附属发道	(43)
九、附属设备	(44)
十、仪表	(44)
十一、空气系统	(44)
第二节 发酵设备的检修与保养	(47)
第三节 提炼设备	(47)
一、泵	(47)
二、过滤器与离心机	(51)
三、蒸发与蒸馏设备	(55)
四、干燥设备	(59)
第四节 设备的防腐蚀与附腐蚀材料	(64)
一、防腐蚀的重要意义	(64)
二、发酵生产中常用防腐蚀方法	(64)
第三部分 发酵工业中微生物代谢生理	(66)
第一节 微生物对碳水化合物的分解代谢	(67)
一、微生物对淀粉的分解	(67)
二、微生物对单糖的分解	(68)
三、微生物对脂肪的分解	(88)
四、微生物对烃类化合物的分解	(90)
第二节 生物氧化和能量代谢	(91)
一、生物氧化概念	(91)
二、生物氧化特点	(92)
三、组成生物氧化体系的重要酶系	(92)
四、微生物的氧化作用	(98)
五、微生物体内能量的产生、储存和利用	(102)
第三节 微生物对氮化物的分解代谢	(112)
一、蛋白质的分解	(112)
二、氨基酸的分解	(114)
三、核酸的分解	(121)
第四节 微生物的合成代谢	(127)
一、抗菌素的合成	(127)
二、多醣的合成	(129)
三、氨基酸的合成	(130)
四、蛋白质的合成	(137)
四、核酸的合成	(138)

第三章 抗菌素發酵

微生物在工业上用途很广。有的是利用微生物的活动加工某些产品，如石油发酵脱蜡、脱硫等；有的利用微生物的菌体，如食用酵母、青虫菌剂等的生产；有的利用微生物产生的酶，如淀粉酶、蛋白酶制剂等；有的则利用微生物生命活动中产生的代谢产物，如抗菌素、酒精、甘油、氨基酸、核苷酸等的生产。

毛主席教导我们：“就人类认识运动的秩序说来，总是由认识个别的和特殊的事物，逐步地扩大到认识一般的事物。”

本章主要通过抗菌素发酵生产的学习，了解工业上如何利用、控制微生物的生命活动生产我们所需要的代谢产物，以及微生物某些重要代谢产物形成的基本原理。

第一部分 抗菌素發酵生產

第一节 前 言

抗菌素是微生物和动、植物生命活动中产生的某些代谢产物，它具有抑制或杀死另一些微生物的作用。目前所知的抗菌素绝大部分来源于微生物，特别是土壤中的放线菌类。抗菌素的生产大多采用微生物发酵法，少数可用化学合成法生产。

伟大领袖毛主席教导我们：“人们为着要在自然界里得到自由，就要用自然科学来了解自然，克服自然和改造自然，从自然界里得到自由。”自抗菌素发现以来，特别是近30多年里，抗菌素越来越被人们所重视，在国民经济中越来越显示其重要地位。目前抗菌素已广泛应用于医、农、工等各个方面。

阶级斗争的事实表明：抗菌素掌握在那个阶级手里，就为那个阶级服务，按照那个阶级的需要而发展。帝、修、反，资产阶级把抗菌素对内作为为一小撮特权阶层服务和残酷压榨劳动人民的工具，对外作为垄断市场，牟取暴利，侵略别国人民的武器。

我们学习、研究和生产抗菌素是社会主义革命和社会主义建设的需要，是为了保障人民身体健康，支援工农业生产，作好反对帝修反发动侵略战争的准备，支援世界革命。

我们伟大领袖毛主席对广大人民身体健康非常关心，发出了：“把医疗卫生工作的重点放到农村去”的伟大指示。在毛主席的英明领导下，我国抗菌素事业获得了飞速的发展，在我国，抗菌素用量约占西药使用总量的50%。由于抗菌素的大量生产及广泛使用，传染病已基本上得到了根治。例如青霉素到目前为止仍是治疗球菌性感染病的主要有效剂。土霉素等广谱抗菌素能治疗多种革兰氏阳性及阴性菌、某些立克次氏、较大病毒和部分原虫所感染的疾病。最近以毛主席为首的无产阶级司令部发出了对肿瘤“应研究根治办法”，“癌症不是地方病，而是一种常见病，我国医学一定要战胜它”的伟大号令，全国已掀起了一个向肿瘤开

战的人民战争，并已筛选和制造了不少品种的抗肿瘤病抗菌素。被资产阶级“权威”认为“不治之症”的肿瘤，将要被用毛泽东思想武装起来的中国人民彻底根治。总之，抗菌素在减少疾病，保障人民身体健康方面起了极重要的作用。

“以农业为基础”是发展国民经济的伟大战略方针。抗菌素在支援农业生产方面也起了很重要的作用，目前抗菌素已广泛用于刺激植物生长和防治植物病虫害方面。例如固氮抗生菌肥(5406)在增强植物抗病力，刺激植物生长，促进作物发育，提高农业产量方面效果十分显著，深受广大贫下中农欢迎，在农业上已普遍进行生产和使用。又如春雷霉素对水稻稻瘟病的防治效果也很好，在我国农村也已在大力推广。

在伟大领袖毛主席关于“农业和畜牧业互相依存，互相促进，同时并举”的伟大方针指引下，我国畜牧业生产得到了很大发展。抗菌素对畜牧业产生促进很大，它可以防治牲畜疾病和刺激性畜生长。此外，抗菌素也用于食品防腐和罐头消毒等方面。

毛主席教导我们：“历史的经验值得注意。一个路线，一种观点，要经常讲，反复讲。只给少数人讲不行，要使广大革命群众都知道。”我国抗菌素工业是在两个阶级、两条道路、两条路线激烈斗争中发展起来的。

解放前，在帝国主义、封建主义和国民党反动派的统治下，我国抗菌素工业完全是空白，用药依赖进口，而且少量昂贵进口的抗菌素也被国民党、官僚、地主、资本家所占用，广大工人、贫下中农完全处于一无医二无药的悲惨境地，有多少阶级兄弟因病得不到治疗而愤愤死去！解放后，在伟大领袖毛主席英明领导下，我国抗菌素工业获得了飞速发展。在毛主席无产阶级革命路线指引下，从事抗菌素工作的广大工人和革命技术人员，发扬敢想、敢说、敢干和“自力更生”的革命精神，冲破叛徒、内奸、工贼刘少奇反革命修正主义路线的干扰，克服重重困难，终于从无到有，从小到大地建立了我国独立的抗菌素工业和抗菌素研究体系。在伟大领袖毛主席亲切关怀下，新中国一诞生，就自己设计，施工，建立起了我国第一座青霉素工厂，1955年，1957年氯霉素、金霉素相继正式投入生产。在党的三面红旗光辉照耀下，大搞群众运动，破除迷信，解放思想，土法上马，土洋结合，抗菌素工业更是突飞猛进地向前发展。全国新建了很多大、中、小型抗菌素工厂，生产青霉素、金霉素、土霉素、四环素，链霉素和氯霉素等常用抗菌素。现在抗菌素工厂遍布全国城乡各地，品种已近30种之多。常用的，比较常用的抗菌素，外国有的，我国基本上都有了。我国人民一无医二无药的时代已经一去不复返了。不仅七亿中国人民都能用到国产抗菌素，而且还遵照伟大领袖毛主席关于“已经获得革命胜利的人民，应该援助正在争取解放的人民的斗争，这是我们的国际主义义务”的教导，我国抗菌素还出口到亚、非、拉等地区去支援世界被压迫人民和被压迫民族反对美帝、苏修和各国反动派的革命斗争。解放以来我国抗菌素工业的飞速发展，完全是毛主席革命路线指引的结果，正如林副主席教导的：“我们的一切成就，一切胜利，都是在毛主席英明领导下取得的，都是毛泽东思想的胜利。”

“革命就是解放生产力，革命就是促进生产力的发展。”

伟大领袖毛主席亲自发动和领导的震撼世界的无产阶级文化大革命彻底摧毁了以叛徒、内奸、工贼刘少奇为首的资产阶级司令部，大大推动了我国抗菌素工业的飞速发展。在工人阶级领导下，抗菌素工业战线上的广大工人和革命技术人员夺回了被刘少奇及其代理人所窃取的那一部分权力，猛揭狠批了刘少奇所推行的“爬行主义”、“洋奴哲学”、“专家治厂”、“利

润挂帅”、“物质刺激”等反革命办企业路线，批判了反动技术“权威”所散布的“生产神秘”、“生产到顶”、“技术到顶”等反动论调，极大地激发了工人阶级和革命技术人员的革命热情和创造精神，他们高举毛泽东思想伟大红旗，全面贯彻落实伟大领袖毛主席“抓革命，促生产”，“备战、备荒、为人民”的伟大战略方针，革命和生产形势一片大好，越来越好，生产记录不断刷新，使我国抗菌素事业很快就跃为世界先进行列。

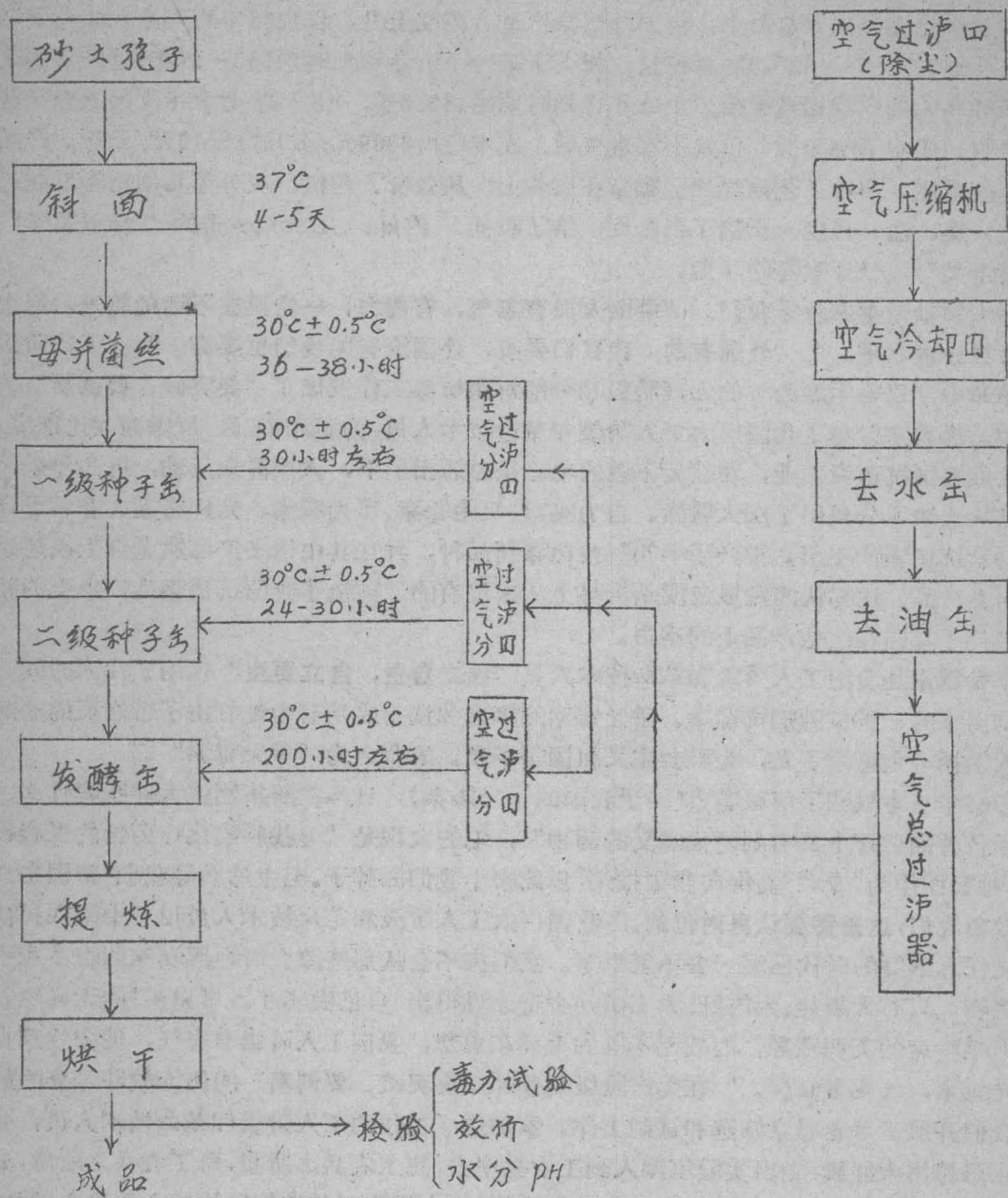
在无产阶级文化大革命中，我国抗菌素产量大幅度上升，仅1968年的产量就相当于第二个五年计划时期(58—62年)的总产量，相当于第一个五年计划时期(53—57年)总产量的27倍。1969年的总产量相当于第二个五年计划时期的146.5%，伟大的七十年代第一春又获得了大丰收。成本不断降低，仅就土霉素来看，成本已由3800元/公斤降至70元/公斤。产品质量也不断提高。用新工艺提纯的链霉素在质量上，从效价、色级、灰分等几项指标都超过了日、美、英、法、丹麦，压倒了帝修反，给了叛徒、内奸、工贼刘少奇的“洋奴哲学”、“爬行主义”，一计响亮的耳光。

伟大领袖毛主席教导我们：“中国人民有志气，有能力，一定要在不远的将来，赶上和超过世界先进水平。”“外国有的，我我们要有，外国没有的我们也要有。”在无产阶级文化大革命中，以毛主席为首的无产阶级司令部对菌抗素工作发出了“要突破、要创新”的伟大指示，极大的鼓舞了我国广大工人阶级和革命技术人员，为了和帝、修、反争时间比速度，尽快地发展我国抗菌素工业，在战无不胜的毛泽东思想指引下，大搞群众运动，近几年来，我国自己从土壤里分离出了庆大霉素、自力霉素、更生霉素、争光霉素、光辉霉素、春雷霉素等近20种新抗菌素产生菌。投产了十几种抗菌素新品种，并且其中很多产品质量赶上或超过了国外同类产品。这样快的发展速度是世界上从来没有的，创造了我国抗菌素生产史上的新纪录，填补了我国在这些产品上的空白。

争光霉素是我国工人阶级和革命技术人员“独立自主，自力更生”仅用了72天时间筛选和试制出来的一种抗肿瘤抗菌素。争光霉素的筛选和试制成功有力地打击了帝修反的垄断，为伟大领袖毛主席争了光，为社会主义祖国争了光。故命名为“争光霉素”。

1969年日本找到了博莱霉素(同于我国的争光霉素)，日本垄断集团就大肆吹嘘什么“博莱霉素是肿瘤化疗上具有划时代意义的药物”，它的发现是“寻找肿瘤化疗药物的里程碑”等等；并妄图作为“专利”高价向我国推销，以此来卡我们的脖子。毛主席教导我们“帝国主义者如此欺负我们，这是需要认真对付的。”我国广大工人阶级和革命技术人员说“中国人民被帝国主义任意欺侮的时代已经一去不复返了。我们决不会从那些散发着血腥臭味的资本家手里乞求医物，只有大叛徒、大内奸、大工贼刘少奇才说得出口‘自己做不了，可以买’的无耻烂言。我们有毛主席的英明领导，有战无不胜的毛泽东思想，我们工人阶级有志气，能力找到自己的争光霉素，气死帝修反。”在无产阶级司令部“要突破、要创新”的伟大战斗号令的鼓舞下，我们开展了争光霉素筛选和试制工作。参加这一工作的工人阶级和革命技术人员，高举毛泽东思想伟大红旗，走出实验室深入到工农兵中去，想工农兵之所想，急工农兵之所急，充分调动和激发了对工农兵患者的深厚无产阶级感情，大大增强了筛选新抗的信心和决心；同时深入开展革命大批判，狠批了大叛徒刘少奇所推行的“爬行主义”、“洋奴哲学”，从立足于“仿”变成了立足于“超”，发扬了敢想、敢说、敢干，敢于压倒一切敌人的大无畏英雄气概，“打破洋框框，走自己工业发展道路；”大破了苏修塞给我们的“天热、下雨不能采土样，”

土霉菌生产工艺流程图示意图



的清规戒律，七、八月份大热天，不管刮风下雨照常采样，充分发扬了“一不怕苦，二不怕死”的彻底革命精神。在党中央亲切关怀和兄弟单位大力协助下，终于在短短72天时间内筛选和试制成功，为伟大领袖毛主席争了光，向国庆廿周年献了厚礼，狠狠地打击了帝修反。

上述事实充分说明，用毛泽东思想武装起来的中国无产阶级和革命技术人员最聪明、最能干。

伟大领袖毛主席教导我们：“中国应当对于人类有较大的贡献。”我国无产阶级文化大革命所焕发出来的无穷无尽的精神力量已初步显示出巨大的物质效果。西方资产阶级能做到的我们东方无产阶级能做到，西方资产阶级做不到的我们东方无产阶级也一定能够做到。用战无不胜的毛泽东思想武装起来的中国人民将继续创造出越来越多帝修反望尘莫及的奇迹来。可以断言，在伟大的毛泽东思想光辉照耀下，在轰轰烈烈七十年代大跃进声中，我国抗菌素工业将一日千里飞速发展，将为世界无产阶级革命事业作出更大的贡献，让帝修反在用毛泽东思想武装起来的中国人民面前发抖吧！

“我们正在做我们的前人从来没有做过的极其光荣伟大的事业。”“我们的目的一定要达到。”“我们的目的一定能够达到。”

遵照伟大领袖毛主席“一个正确的认识，往往需要经过由物质到精神，由精神到物质，即由实践到认识，由认识到实践这样多次的反复，才能够完成。”的教导，我们首先通过土霉素具体生产实践，学习和掌握抗菌素生产的一般规律。

抗菌素整个生产流程可以分为发酵和提炼两大步骤。在发酵过程中又可分为种子繁殖（种子扩大培养）和发酵两个阶段。

第二节 发酵生产中土霉菌的生长和发育特征

土霉素是土霉菌（龟裂链丝菌 *Actinomyces rimosus*）所产生的，土霉菌是属于放线菌类。目前生产上所用的菌株，是经过多次自然和人工选育分离出来的高产菌株，其产量提高百倍之多，其形态及生理特征与原菌株也有很大变化。

一、斜面培养

砂土孢子种移斜至斜面培养基上（斜面培养基：麸皮 6 % W/V，琼脂 2 %），于 37°C 培养通过外观观察和显微镜检查，其形态及其变化见表 I：

表 1

斜面生长时间 (日)	斜面外观变化	镜检气生菌丝, 孢子发育过程。
1	长出一层棕黄色营养菌丝。	
2	开始出现薄薄一层白色气生菌丝。	出现螺旋形孢子丝, 孢子丝内含物开始凝聚尚未形成孢子链。
3-4	表面长了一层较厚的粉状物, 下部出现极少数黄斑点。	出现粗壮嗜碱性强的气生菌丝, 螺旋孢子丝整齐而紧密, 孢子链占整个视野的绝大部分, 有少数游离孢子。
5-6	表面菌苔增厚, 黄斑点显著增加, 占整个斜面50%左右。	孢子链显著减少, 出现部分自溶菌丝和嗜碱性弱的气生菌丝, 孢子丝; 游离孢子增多, 并有新生的较细的气生菌丝出现。
7	斜面表面绝大部分转为黄色, 粉状物较厚。	再次出现粗壮而嗜碱性强的气生菌丝; 孢子链又占整个视野的绝大部分。
8	与第7天相似, 黄色斑点转为暗黄色, 培养基背面色素加深。	出现与第5-6天相似的情况, 孢子链显著减少, 并有较细的气生菌丝出现。
9-10	暗黄色斑点增加, 下半部变成光秃斑点。	出现与第7天相似的情况, 孢子链又占一整个视野的绝大部分。
11	斜面表面一层暗黄色斑点。	有一部分孢子链, 绝大部分模糊不清, 出现自溶现象。
12	同第11天	显微镜下一片模糊, 看不到孢子及孢子丝等物。

从上面的观察可以看出, 土霉菌的基内菌丝呈黄色, 并分泌色素, 使培养基变成黄色。土霉菌的气生菌丝比较细, 呈灰白色。气生菌丝顶端的孢子丝呈比较紧密的螺旋形。繁殖方式为无性繁殖, 由孢子丝凝聚成孢子链, 孢子成熟后再从孢子链上游离出来, 常使斜面菌苔呈粉状。孢子为椭圆形。

二、平板菌落:

土霉菌单孢子接种于葡萄糖琼脂平板培养基上, 于37℃培养3-4天, 长出大小介于细菌和霉菌, 酵母菌菌落的菌落。菌落圆形, 边缘不整齐, 中间突起, 表面有放射形皱裂纹, 呈龟裂状(龟裂链丝菌由此而得名)。菌落为灰白色, 背面呈黄褐色, 并分泌色素, 使培养基

变黄。因为气生菌絲比较纤细，所以菌落结构比较紧密。并且菌落与培养基紧密结合，不易挑起，因此当由固体培养基上接种土霉菌至另一新鲜培养基而接种量又需要大时，常常连同培养基一起挖下一块进行接种。由于气生菌絲上端产生孢子，因此菌落表面呈粉状。应当指出，菌落特征随培养基成份，培养条件，培养时间不同而有差异。例如：我们在前面所谈到的，斜面孢子培养过久，菌苔(菌落也是)就会产生暗黄色斑点。

三、在固体培养基上生长发育周期性及对生产能力的影响：

前面我们已经谈过了土霉菌在孢子斜面上的形态特征，从中我们可以找到土霉菌在固体培养基上的生长发育规律。土霉菌在固体培养基上培养，可以出现交叉的几个生长发育环，若以孢子发芽长出菌絲再产生孢子作为一个生长发育周期，则生长1—4天为第一周期，5—8天为第二周期，8—10天为第三周期，11—12天为第四周期。第一周期的生长发育时间比其它周期稍长，以后几个周期的生长速度愈来愈快，第三周期以后，不再产生孢子。必须说明，土霉菌在固体培养基上生长发育各周期的天数是随着条件的不同而有延长或缩短的可能，如温度，接种孢子数量，培养基的改变等等，对生长速度都有较大的影响。以上所述的周期性，是以前面斜面孢子培养条件为基础的。

从表2，表3可以看出，土霉菌在固体培养基上不同的生长发育周期无论在抗菌素合成能力，冷藏保存，砂土传代或斜面传代方面均显示出第一周期的优越性。因此发育周期掌握不当会导致其产生抗菌素能力和菌种的优良生物特性的衰退。

表2 各周期合成抗菌素能力的比较
(以第一周期的效价为作为100%计算效价基准)

实验方法*	发育周期 效价(90)		
	一	二	三
A	100	95	98.4
B	100	96.8	94.7
C	100	96.9	88.8

- ※ A：一、二、三周期的斜面孢子，二级发酵产生抗菌素的能力。
- B：一、二、三周期的斜面冷藏一个月后，二级发酵产生抗菌素的能力。
- C：一、二、三周期的斜面孢子，制成砂土孢子，将砂土孢子移种斜面培养8天，取该斜面进行二级发酵产生抗菌素的能力。

表 3 各周期传代后的结果

周 期	传代次数	一			二			三			四			五			六			七		
		效 百分率	价 斜 外	面 观	效 百分率	价 斜 外	面 观	效 百分率	价 斜 外	面 观	效 百分率	价 斜 外	面 观	效 百分率	价 斜 外	面 观	效 百分率	价 斜 外	面 观	效 百分率	价 斜 外	面 观
一		100	正 常	正 常	—	正 常	正 常	101.6	正 常	正 常	101.6	正 常	正 常	98.2	有 斑 点	88.1	半 光 秃	86.5	光 秃			
二		100	正 常	正 常	—	半 光 秃	65	光 秃	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

四、深层培养过程中菌丝生长发育的五个阶段：

毛主席教导我们：“不但要研究每一个大系统的物质运动形式的特殊的矛盾性及其所规定的本质，而且要研究每一个物质运动形式在其发展长途中的每一个过程的特殊的矛盾及其本质。一切运动形式的每一个实在的非臆造的发展过程内，都是不同质的。我们研究工作必须着重这一点，而且必须从这一点开始。”

土霉菌不仅在固体培养基上培养存在着几个不同的生长发育周期，而且在深层培养条件下也同样存在着几个生长发育阶段。土霉菌在发酵缶中，由于供给了适合的培养基和适当的发酵条件，由种子缶进入发酵缶后，立即开始生长繁殖。每隔一段时间取出发酵液涂片用美兰染色镜检，可见土霉菌的生长发育有一定规律。根据菌丝生长发育情况，现在生产上将菌丝生长发育分为五个阶段。

开始几小时菌丝粗短，分节尚不明显，或分节较长，菌体粗糙，着色深浅不均，分佈稀疏，被称为第一阶段。

进缶12小时左右，随着土霉菌的生长，增殖，菌丝变得粗壮，光滑，分节明显，均匀，分枝由少至多，美兰染色着色力极强，开始综合土霉素，称为第二阶段。

随着培养时间的延长，菌丝生长旺盛，粗细一致，分枝交织成网，有断片产生，分节长短不一，着色较浅，大量合成土霉素，称为第三阶段。

若不采取特殊措施，发酵100小时左右可见菌丝逐渐衰老，菌丝变细，断片很多，分佈零乱，着色力显著减弱，部分菌丝开始自溶，仍大量合成土霉素，称为第四阶段。

随着培养时间的继续延长，最后菌丝大部分自溶，成形菌丝不多，绝大部分是零乱的断片，着色力极弱，菌丝模糊不清，仍能合成一段时间土霉素，最后效价不再增高，称为第五阶段。

正常发酵情况下都出现这五个阶段，不过各阶段之间也没有绝然的界线，而且随着生产上的菌株不同，所控制的发酵条件不同或培养基成份的改变，都会影响到这五个阶段时间的长短。

一般看来，发酵前期(30小时前)，主要是菌丝生长繁殖期，菌丝体急剧增长，呼吸作用特别旺盛，对于培养基中糖，氮迅速利用而土霉素合成甚少，这包括前面讲到的菌丝第1、2阶段。发酵30小时后，为土霉素大量合成期，此期可延续100多小时，表现为菌丝体生长逐渐缓慢，对糖、氮利用速率逐渐降低。但由于此期菌丝量特别多所以从总的情况反映出，代谢最旺盛，糖、氮消耗最快，PH下降最快，此期包括菌丝第3、4阶段。菌丝的第五阶段即为菌丝自溶期，到效价单位不再增加时，便可结束发酵，放缶。

“马克思主义的哲学认为十分重要的问题，不在于懂得了客观世界的规律性，因而能够解释世界，而在于拿了这种对于客观规律性的认识去能动地改造世界。”我们掌握了土霉菌在发酵过程中的生长发育规律，就可以根据其生长发育阶段，有意识地控制其代谢，确定通氨补料及放罐时机。譬如，在发酵早期增加容易被利用的碳源葡萄糖和氮源 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ，使菌丝大量生长繁殖，迅速进入第三阶段。尽量采取措施延长土霉素大量合成期（主要是第三、四阶段）。近年来采用中间通氨补料的先进技术，就是为了补充营养以延长土霉菌菌丝生长的第三、四阶段，对提高产量起到了极其良好的作用，使效价单位提高十倍甚至几十倍。

五、土霉素发酵的质量标准:

1. 斜面孢子的质量要求: 孢子生长丰富、均匀, 孢子颜色一致, 斑点少, 分泌的色素使培养基呈黄色, 镜检时孢子链及游离孢子量大而且孢子整齐。
2. 母瓶菌丝的质量要求: 菌丝生长为第三阶段, 糖氮代谢旺盛期快停止, 残糖含量2.0%左右, 残氮含量在0.03%以下, 效价单位500r/mr左右。符合此标准就可接入一级种子罐。母瓶菌丝一般在 $30^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 情况下, 培养36-38小时左右。
3. 一级种子的质量要求: 当糖、氮、磷代谢旺盛期快要结束, 残糖含量2.0%左右, 残氮含量0.04%左右, 菌丝浓度2/3左右, 发酵液颜色是浅黄色, 效价单位200-300r/ml。就可接入二级种子罐。一般用母瓶菌丝进罐在 $30^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 培养24小时左右。
4. 二级种子的质量要求: 二级种子培养主要是起进一步扩大培养的目的, 其质量标准与一般种子标准相同。效价单位一般在1000r/ml以上。 $30 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 培养30小时左右。
5. 发酵效价质量标准。培养基中营养物质大量消耗, 即糖氮基本耗尽, 菌丝为第五阶段, 效价单位上升幅度不大, 或不再上升, 此情况可以决定放罐。一般在 $30 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 发酵200小时左右, 效价单位可达25000r/ml左右。

第三节 培养基及生产中的设备消毒

一、抗菌素产生菌的营养要求:

抗菌素的主要产生菌是放线菌和真菌, 它们对营养都没有苛刻的要求, 能利用各种有机物作炭源和能源, 如糖、蛋白质及其分解产物, 也能利用各种有机和无机含氮化合物作氮源。培养这两类微生物通常不需要加入维生素和生长因素, 因为它们能自己合成生长发育所必需的生长因素和维生素。至于对各种无机元素的需要, 通常农村产品及水中已可满足。抗菌素产生菌对营养的要求虽然不高, 但是对于提高抗菌素的产量来说, 根据各个产生菌的生理特征及该抗菌素的化学性质选择最适合的培养基成份及其配比仍然具有极其重要的意义。

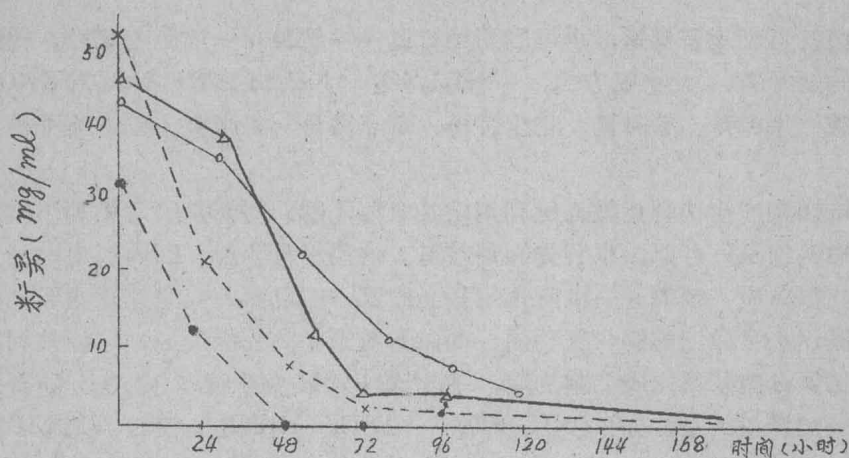
微生物利用营养物质有三个去向: 一部分用来构成细胞体物质, 一部分被氧化成最终产物 CO_2 和水, 最后一部分变成各种代谢产物。为了保证抗菌素产生菌的正常生长发育和产生抗菌素, 需要供给足够的碳源、氮源和无机元素。

碳源:

各种糖是最有意义的碳源: 放线菌和真菌善于利用各种单糖和多糖。戊糖、已糖、双糖(蔗糖、麦芽糖、乳糖等)和某些多糖可以单独地成为上述两种微生物的碳源。在抗菌素发酵工业中最常用的碳源有: 葡萄糖、蔗糖、饴糖、麦芽糖、淀粉和淀粉的不完全水解产物——糊精。在个别情况下也用其他的糖, 例如: 在青霉素和灰黄霉素生物合成的培养基(即发酵培养基)中用乳糖。这些糖都是通过氧化的方式被微生物所利用, 为微生物生长发育和合成抗菌素提供碳源和能源。当通气充足时, 正常的最终产物是 CO_2 和水: $(\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 6\text{O}_2 \rightarrow 6\text{CO}_2 + 6\text{H}_2\text{O} + 673000\text{卡})$ 但是在发酵过程中, 由于pH不适合, 通气不足等条件影响下, 培养基中可能积聚中间产物——糖氧化不完全的产物。例如: 如果培养青霉菌(*Penicillium chrysogenum*)的合成培养基变成碱性, 则在发酵液中积聚草酸。在金霉素发酵中,

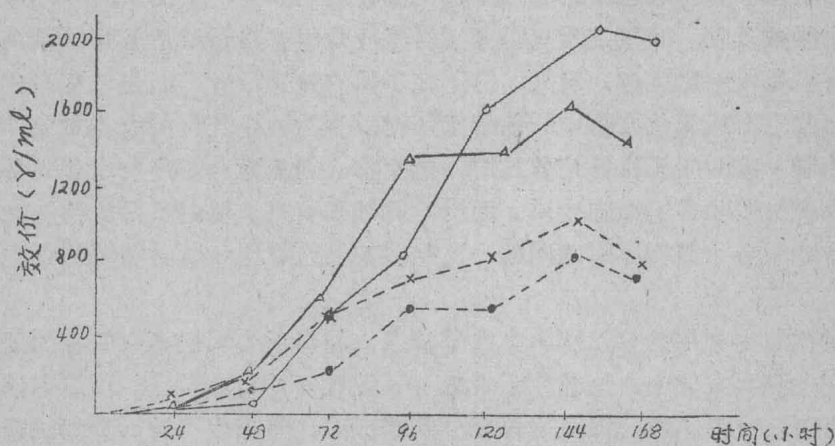
如果通气不足或培养基中磷的含量过高，则培养基中积聚葡萄糖的降解产物——丙酮酸。

放线菌和真菌虽善于利用各种单糖和多糖，但是对于不同的菌种，甚至不同的菌株，利用各种糖的速度并不相同。而且，微生物在不同生长发育阶段对外界条件要求并不一样，适合于微生物生长的条件和适合于抗菌素生物合成的条件有相当大的差别，对微生物生长有利的条件并不一定对抗菌素的生物合成也有利。在有些培养基中，菌丝体生长很好，而抗菌素几乎不产生。例如：土霉素不能在乳糖、蔗糖培养基上生长，在葡萄糖培养基中生长很快，但几乎不产生土霉素，而在淀粉培养基中产量相当高。因此，在土霉素发酵工业生产中，常以淀粉为碳源和能源。发酵早期供给葡萄糖可被迅速利用，促使菌丝迅速大量生长。把青霉菌（*P. chrysogenum* NH）培养在合成培养基中，用葡萄糖、麦芽糖、乳糖和淀粉四种糖类为碳源进行



图I 糖的利用曲线

• 葡萄糖。 ○ 乳糖。 × 麦芽糖。 △ 淀粉。



图II 效价曲线

• 葡萄糖。 ○ 乳糖。 × 麦芽糖。 △ 淀粉。

发酵，从图 I 可以看出，该菌株对四种糖的利用，以葡萄糖最快，麦芽糖、淀粉次之，乳糖最慢，从图 II 可以看出，以葡萄糖为碳源，青霉素产量最低，以淀粉为碳源比以麦芽糖为碳源产量高，以乳糖为碳源，青霉素产量最高。

另一个碳源是脂肪和油。在土霉素和其它抗菌素的发酵中，常用植物油或动物油进行消沫，这些油类除起消沫作用外，同时还是很好的碳源。

此外，有机酸也可作为一种碳源。放线菌和真菌氧化许多有机酸的能力很强。有机酸在调节发酵过程中的 pH 上起着重要作用。一般使用的是有机酸盐，有机酸盐的氧化常使培养基变碱，如 $\text{CH}_3\text{COONa} + 2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} + \text{NaOH}$ 。必须指出，有机酸对某些放线菌有毒，有机酸的毒性很大程度上与培养基的 pH 有关系：pH 愈低，毒性愈大。

氮源：

抗菌素产生菌既可利用有机氮，也可利用无机氮——铵氮和一部分硝基氮。在抗菌素工业生产中常用的氮源有：无机氮方面， $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ， NH_4Cl ， NH_4NO_3 和 KNO_3 等，有机氮方面，蛋白胨、牛肉膏、酵母膏、花生饼粉、黄豆饼粉、玉米浆、玉米油饼粉、向日葵油饼粉等。

无机氮源：抗菌素产生菌利用铵氮比利用硝基氮要优越。即使是很容易利用硝基氮的微生物，当培养基中两种氮并存时，也首先利用铵氮。这很容易解释，因为细胞内的含氮有机物质——氨基酸、蛋白质、核酸——中所含的是还原氮，它以氨基或亚氨基的形式存在。所以，铵氮可以直接用来合成细胞的含氮物质，而硝基氮则必须先经还原，才能被利用。

微生物利用铵氮或硝基氮构成细胞物质，使培养基 pH 发生很大变动。随着铵氮的同化，与铵结合的酸被释放出来，如： $(\text{NH}_4)\text{SO}_4 \rightarrow 2\text{NH}_3 + \text{H}_2\text{SO}_4$ ，使培养基 pH 降低。在硝基氮同化时，硝酸盐被还原，这时培养基 pH 上升，如： $\text{KNO}_3 + 4\text{H}_2 \rightarrow \text{NH}_3 + 2\text{H}_2\text{O} + \text{KOH}$ 。因此，当微生物在代谢过程中利用某些化合物时，培养基 pH 有上升或下降的现象。

有机氮源：各种形式的有机氮——蛋白质及其水解产物——多肽和氨基酸，都是良好的氮源。微生物利用氨基酸和肽的速度比利用蛋白质快。这是因为，蛋白质必须经过微生物的酶系统水解后，才能被吸收，而氨基酸只需经过转氨或脱氨初步分解后就可以被利用。

微生物利用有机氮较铵氮优越。看来，这不在于氮的特异形式，而是与这些化合物中碳架有关。氨基酸和其它有机氮化合物中的碳架无疑对微生物的生长过程有着重要作用。在以葡萄糖或其它糖为唯一碳源的无机氮培养基中，微生物必须从糖分解产物中生成各种化学结构，然后才能合成蛋白质和其它细胞物质。而当培养基中有有机氮时，微生物就能利用氨基酸和其它有机化合物中各种结构不同的碳架，这些碳架是合成生命所必需的细胞物质的现成半成品。

根据微生物对氮源的利用情况及抗菌素发酵特点，如何适当调配不同氮源的配比，是十分重要的。例如在土霉素发酵中，速效性无机氮——铵氮 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ，可以迅速地被土霉菌利用，使土霉菌生长发育迅速，促使菌丝提早衰老自溶。而花生饼粉，黄豆饼粉是属于迟效性氮源，土霉菌对它们代谢缓慢，可维持较长时间，从而使土霉素发酵第二阶段（土霉素合成阶段，也即菌丝第 3、第 4 阶段）时间增长，有利于土霉素大量综合。土霉素的大量合成是以大量菌丝生长为前提的。为此，在培养基中，适当地调配速效性氮源 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ，玉米

浆和迟效性氮源花生饼粉，黄豆饼粉的配比，可达到提高产量的目的。

无机元素：

微生物在生长发育和产生抗菌素过程中，除了需要碳源，能源和氮源外，还需要许多无机元素。在非金属元素中需要磷和硫，这两种元素存在于重要的细胞物质——核蛋白类，蛋白质和类脂中。此外，磷化合物在细胞代谢的各个环节中起着极其重要的作用。在金属离子中需要 K、Na、Mg 和其它许多微量元素，如：Fe、Zn、Cu 等。这些微量元素都包含在某些酶和酶系统中，所以是必需的。例如，细胞色素，细胞色素氧化酶，过氧化氢酶，过氧化物酶和其它酶含 Fe，碳酸酐酶含 Zn，多酚氧化酶含 Cu，而对传递磷酸根过程中有催化作用的酶含 Mg。Mg、Mn、Fe、Zn 和其它二价金属离子还是许多酶的激活剂。但微生物对微量元素要求甚微，超过一定范围时，微量元素就表现出强烈毒性，必须很好控制。下面我们仅以磷和铁的含量加以说明。

在土霉素发酵中，磷对土霉素合成影响极大，磷是土霉菌细胞重要组成元素，而且对菌丝生长发育，呼吸，糖、氮代谢起着重要调节作用。磷又是 ATP 的重要组成成份，而 ATP 的合成速率直接影响着土霉素的合成。实践证明：培养基中含溶磷量过高，土霉菌糖、氮代谢快，pH 下降快，菌丝生长快，土霉素产量低；溶磷量过低，糖、氮代谢慢，菌丝生长慢，土霉素产量亦低。培养基中含磷酸二氢钾的量以 0.02%—0.04% 最为适宜。一般玉米浆中含大量磷酸盐，土霉菌培养基中的玉米浆除提供氮源外，也提供磷源，故只在加入少量磷酸盐 (KH_2PO_4) 即可满足土霉菌对磷的要求。

在金霉素发酵中，从图 III 可以看出，磷酸盐的浓度对金霉素 (*S. aureofaciens* 2U—84) 发酵效价影响很大。培养基中磷酸盐浓度，对金霉素的糖代谢途径有密切关系。金霉素的糖代谢途径已证明有糖酵解途径及单磷酸已糖途径存在，当培养基中磷酸盐含量过高时，6-磷酸葡萄糖脱氢酶的活力受到抑制，使单磷酸已糖途径受到阻碍，糖类的分解代谢就转向糖酵解途径系统。同时，磷酸盐能促进丙糖-3-磷酸的氧化，因此在发酵过程中就有大量丙酮酸的堆积，抑制金霉素的合成。

在抗菌素发酵中，铁离子对抗菌素合成的影响必须引起我们很好地重视。因为，目

前抗菌素的工业生产，均是以低碳钢制发酵罐进行发酵。在土霉素发酵中，培养基中铁离子浓度高于 50 γ/ml ，将大大降低土霉素产量。在链霉素发酵中，改变培养基中铁离子浓度可使链霉素产量发生很大变化，但对菌丝的影响较少。（见图 IV）。铁离子对抗菌素发酵的影响，特别是当培养基中有植物油存在时更为显著，因为铁离子能促使植物油形成过氧化物，抑制抗菌素的生物合成。

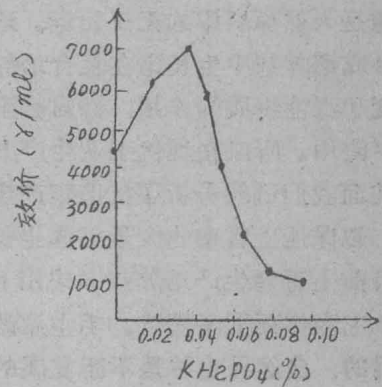


图 III 磷酸盐对金霉素 2U—84 发酵效价的影响