



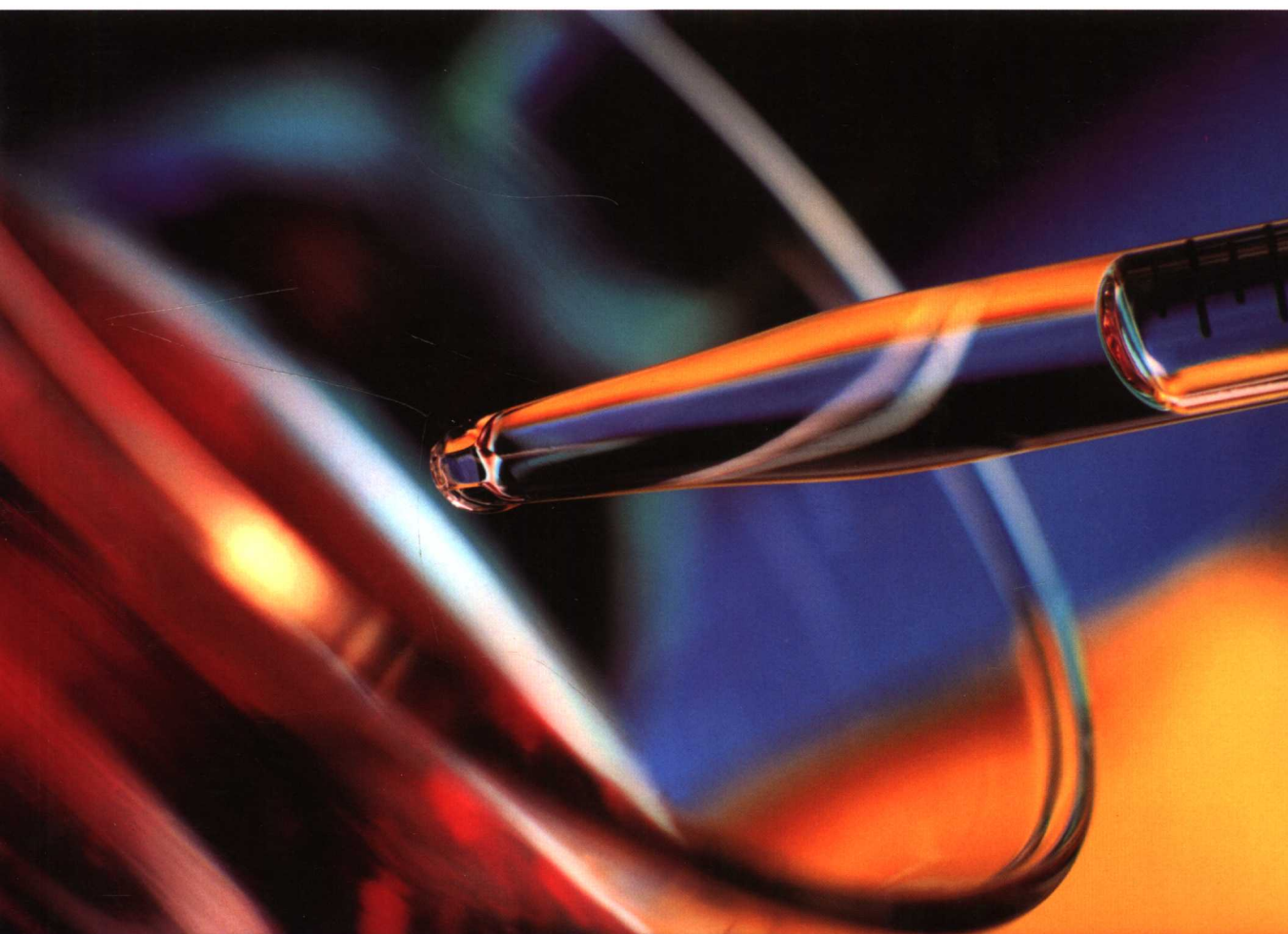
GAODENG XUEXIAO ZHUANYE JIAOCAI

• 高等学校专业教材 •

生物工艺技术

s h e n g w u g o n g y i j i s h u

王福源 主编



中国轻工业出版社

高等学校专业教材

生物工艺技术

王福源 主编

 中国轻工业出版社

图书在版编目(CIP)数据

生物工艺技术/王福源主编. —北京: 中国轻工业出版社, 2006. 9

高等学校专业教材

ISBN 7-5019-5524-7

I. 生... II. 王... III. 生物制品-生产工艺-高等学校-教材 IV. TQ464

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2006)第 081293 号

责任编辑: 李亦兵 李海燕 责任终审: 滕炎福 封面设计: 王佳凡
版式设计: 马金路 责任校对: 燕 杰 责任监印: 胡 兵 张 可

出版发行: 中国轻工业出版社(北京东长安街 6 号, 邮编: 100740)

印 刷: 利森达印务有限公司印刷

经 销: 各地新华书店

版 次: 2006 年 9 月第 1 版第 1 次印刷

开 本: 787×1092 1/16 印张: 20.25

字 数: 498 千字

书 号: ISBN 7-5019-5524-7/Q·029 定 价: 35.00 元

读者服务部邮购热线电话: 010-65241695 85111729 传真: 85111730

发行电话: 010-85119817 65128898 传真: 85113293

网 址: <http://www.chlip.com.cn>

Email: club@chlip.com.cn

如发现图书残缺请直接与我社读者服务部联系调换

50349K1X101ZBW

序 言

本书阐述将生产原料通过微生物发酵转变成产品的有关技术,其内容包括:菌种及种子扩大培养;种子和发酵培养基;发酵工艺及发酵过程中的物质变化;目的产物分离提取和纯化;发酵染菌及防治。

本书的编著旨在简明阐述生物工艺的基本原理和技术要点,以及介绍微生物工程领域里的一些基本技术,并在此基础上通过典型实例,让读者进一步加深对基本原理的理解。

本书适用于高等学校生物技术专业、生物工程专业、食品专业、生物化工专业和发酵专业。

本书由王福源主编。参加编写的有:上海大学文铁桥、陈宇光、陈振风、王沂和黄筱颖;华东理工大学陈长华、刘叶青和沈亚领;上海交通大学赵凤生;上海医药工业研究院赵文杰;复旦大学任大名、陈丽珊和符薇;浙江工业大学钱峻青、林陈水;上海工业微生物研究所雷肇祖。本书内容除署名外,其余均由王福源撰写。郝海永负责全书整理工作。

上海大学生命科学学院

王福源

2006年正月初六

目 录

第一章 菌种及种子扩大培养	1
第一节 自然接种的微生物	3
一、白酒大曲中的菌种	3
二、黄酒生麦曲中的菌种	5
第二节 从自然界中分离的菌种	8
一、概述	8
二、缩水甘油丁酸酯消旋体水解酶产生菌的筛选	10
三、纤维素酶产生菌绿色木霉的筛选	13
四、 β -葡萄糖苷酶产生菌的筛选	14
五、酸性 α -淀粉酶产生菌的筛选	14
六、L-乳酸生产菌株的选育	15
七、生产干酪用的乳酸菌的特性	17
八、啤酒酵母	21
九、小曲中微生物的特性	24
十、酱油酿造用菌种及种子扩大培养	27
十一、制醋用菌种及种子扩大培养	31
第三节 诱变育种	36
一、概述	36
二、D-核糖生产菌株的选育	43
三、枯草芽孢杆菌营养缺陷型突变株的选育	45
四、啤酒酵母营养缺陷型突变株的选育	46
五、黄色短杆菌抗性突变株的选育	47
六、生物絮凝剂高产菌的选育	48
七、灵菌红素生产菌株的选育	49
八、螺旋霉素生产菌株的选育	50
九、头孢菌素C生产菌的选育	54
十、柠檬酸生产菌株的选育	59
十一、谷氨酸生产菌的特性	64
第四节 原生质体融合菌株	67
一、概述	67
二、小单胞菌原生质体融合株	69
三、芽孢杆菌原生质体转化株	70
四、整肠生菌原生质体融合株	71
五、顶头孢霉菌原生质体融合株	72

第五节 基因工程菌	75
一、概述	75
二、PFK 融合蛋白基因工程菌的构建	83
三、乙型肝炎病毒(HBV)颗粒性抗原转基因番茄植株的构建及鉴定	90
四、细菌荧光酶基因工程菌的构建	100
五、顶头孢霉菌基因工程菌的构建	107
第二章 种子和发酵培养基	109
第一节 概述	109
第二节 固态发酵培养基	111
一、制作大曲和大曲白酒的原料	111
二、制作麦曲和黄酒原料	115
三、薯渣原料柠檬酸发酵培养基	116
四、酱油生产的原料和醅	118
五、食醋生产的原料和醅	123
第三节 液态发酵培养基	125
一、谷氨酸发酵培养基	125
二、啤酒发酵培养基	136
三、葡萄酒发酵培养基	153
四、糖蜜原料柠檬酸浅盘发酵培养基	156
五、柠檬酸深层发酵培养基	156
六、干酪生产培养基	157
七、螺旋霉素发酵培养基	159
八、头孢菌素 C 发酵培养基	161
九、环己烯亚胺产生菌培养基	162
十、地衣芽孢杆菌产碱性蛋白酶培养基成分配比研究	162
十一、嗜热毛壳菌产纤维素酶培养基成分配比研究	163
第三章 发酵工艺及发酵过程中的物质变化	165
第一节 概述	165
第二节 固态法发酵	174
一、大曲白酒发酵	174
二、黄酒发酵	179
三、薯渣原料柠檬酸发酵	185
四、酱油发酵	186
五、食醋发酵	195
六、组织型纤维酶原激活剂发酵的研究	199
第三节 液态法发酵	200
一、啤酒发酵	200
二、液态白酒发酵	211
三、糖蜜原料柠檬酸浅盘发酵	214

四、柠檬酸深层发酵	217
五、灵菌红素发酵研究	219
六、干酪生产	220
七、螺旋霉素发酵	227
八、头孢菌素 C 发酵	234
九、以淀粉水解糖液为原料的谷氨酸发酵	235
十、以糖蜜为原料的谷氨酸发酵	243
十一、环己烯亚胺的发酵条件研究	245
十二、MTSase 和 MTHase 双酶的产酶条件研究	247
十三、重组 α -干扰素的发酵研究	248
第四节 半固态发酵	249
第四章 目的产物的分离提取	251
第一节 概述	251
第二节 间歇精馏法	254
一、间歇精馏法概述	254
二、大曲白酒醪的蒸馏	255
第三节 离子交换树脂法	257
一、离子交换树脂法概述	257
二、谷氨酸的分离提取	262
三、柠檬酸的分离提取	269
四、头孢菌素 C 的分离提取	270
五、谷氨酰胺的分离提取	272
第四节 沉淀法	275
一、沉淀法概述	275
二、谷氨酸的分离提取	280
三、酸性 α -淀粉酶的分离提取	283
四、钙盐法分离提取柠檬酸	284
五、锌盐法分离提取谷氨酸	285
第五节 溶媒萃取法	287
一、溶媒萃取法概述	287
二、螺旋霉素的分离提取	289
三、青霉素的分离提取	293
第六节 吸附法	293
一、吸附法概述	293
二、灵菌红素的分离提取研究	296
第七节 亲和层析	297
一、亲和层析概述	297
二、胸腺素 α_1 融合蛋白的分离和纯化	302
三、结核分枝杆菌 Rv1884 基因表达产物的纯化	303

四、截断型人可溶性 CD40L 的纯化	304
第五章 发酵染菌及对策	305
第一节 发酵不同时期的染菌及对策	305
第二节 染菌的征兆及检查	306
第三节 染菌的原因及防治	307
第四节 感染噬菌体的表现及防治	308
第五节 培养基和设备的灭菌	311
第六节 供发酵用空气的除菌	313
参考文献	315

第一章 菌种及种子扩大培养

所谓发酵,其实就是借助微生物细胞这部机器将原料(培养基的营养成分)加工成人们需要的各种有用物质(如抗生素、氨基酸、有机酸等等)。而发酵过程的控制,则是为了保证机器正常运转所采取的一些人为措施。

使用什么样的机器(微生物细胞)以及机器的质量(微生物菌种的性能),是在决定生产哪种产品之后首先需要考虑的问题。

用于工业生产的菌种应该具有以下特点:

- ① 种子和发酵培养基的组成原料价廉,且取材容易,发酵成本不高。
- ② 对糖浓度、pH、温度、溶氧和渗透压等的要求不苛刻,生产上容易控制。
- ③ 生长和发酵速度快,发酵周期短。
- ④ 目的产物产量高。
- ⑤ 发酵液中副产物少。
- ⑥ 抗噬菌体感染的能力强。
- ⑦ 菌种具有较好的生产稳定性,不容易发生自然变异。
- ⑧ 菌体不是病原菌,不产生有害物质和毒素。
- ⑨ 从发酵液中分离提取目的产物的方法简便,操作成本低,成品纯度高。

用来生产有用物质的微生物,其来源有三个途径:①直接使用存在于自然界中的微生物或从自然界中分离得到的微生物;②使用经物理诱变剂、化学诱变剂处理过的改良菌种;③使用采用细胞融合技术或基因工程技术构建的新菌种。

筛选具有工业生产应用价值的菌种,一般先从有微生物生存的环境中进行分离,然后考察菌种特性、发酵条件、目的产物的产率、副产物的种类和数量、菌种稳定性等,最后用于生产。但是,从自然界中分离得到的菌种有的还不能满足人们的需要,为了进一步提高其生产性能,往往对现有菌种进行改造,采取的手段包括:物理、化学诱变剂的诱变处理,杂交育种方法,原生质体融合技术培育重组株,DNA 重组技术构建基因工程菌。

由于筛选到的菌种性状的稳定是相对的,变异是绝对的;自然变异的正突变是个别的,负突变是大量的,因此菌种性能的衰退是随时可能发生的。菌种性状的衰退表现为菌落和细胞形态的改变,芽孢和伴孢晶体变得小而少,细胞生长速度变慢,产孢子数量减少,生产目的产物的能力降低,抗环境条件改变的能力下降等等。

菌种的衰退是一个逐步发生的过程,是发生在细胞群体中由量变到质变的过程。一个细胞群体中,开始时仅个别细胞发生负突变,经过几次移种传代后,负突变细胞的数目不断增多,最后占为多数,此时,整个细胞群体出现衰退性状,呈现菌种衰退的“症状”。发生菌种衰退,必须立即进行分离纯化,也就是从衰退的群体中寻找出少数尚未衰退的个体,然后将它扩大培养,在确定其性状跟原种无异后,保藏在斜面。

由于自然变异造成菌种衰退是随时发生的,因此在出现衰退迹象之前,有必要对保藏的菌种定期进行上述分离纯化工作,确保保藏的菌种具有优良的性能。像这样称之为菌种复

壮的工作,已成为各个实验室、菌种保藏室的常规工作。

为了防止菌种衰退,延迟菌种优良性能的退化,应注意以下几点:

① 因为微生物的自发突变是在微生物繁殖过程中发生的,菌种移接传代的次数越多,产生突变的几率就越高,因而发生菌种性状衰退的机会也就越多。所以,对移接次数要加以控制。

② 提供微生物生长的条件要合适,要尽量避免容易引起菌种发生自然变异的因子存在。

③ 选择恰当的接种物。放线菌和霉菌的菌丝细胞含几个核甚至是异核体,因此用菌丝接种可能就会出现细胞的不纯和衰退;而孢子是单核的,用孢子接种就不会发生这种现象。

④ 选择恰当的菌种保藏方法。保藏菌种,就是将微生物细胞,最好是休眠体的分生孢子、芽孢,保存在一个适合它们休眠的环境中,达到不死、不衰的保藏目的。常用的保藏方法有5种:固体培养基斜面的定期移接法(5℃以下保藏);石蜡油封藏法(室温下保藏);冷冻干燥保藏法(10℃以下保藏);砂土管法(适用于产芽孢或孢子的微生物,5℃以下保藏);液氮超低温保藏法(-130℃以下保藏)。

摇瓶发酵用的菌种,可以使用活化后的斜面菌种;然而发酵罐发酵用的菌种,因为接种量大,需要将斜面菌种扩大培养后使用。任何规模的发酵,摇瓶发酵或发酵罐发酵都希望接种的细胞种子数量多,使发酵周期变短,这对于降低发酵成本、提高设备利用率和防止发酵期间杂菌污染有极大的好处。但是,种子的接入量大,培养种子需要花费的成本相应提高,而且接种量增加到一定程度,发酵周期的缩短不再变得十分明显,因此选择一个恰当的接种量是明智之举。要获得足够数量的种子,即使提供一个小型发酵罐发酵用的种子,仅依靠使用斜面的菌种是不能够满足发酵需要的,更不要说是大型发酵罐发酵了,这就引出了种子扩大培养的话题,也就是说,必须从斜面菌种出发,通过逐级扩大培养的手段最终获得能满足发酵所需的种子数量。

种子扩大培养的目的,就是为发酵提供足够数量健壮的种子培养物。对不同产品的发酵来讲,种子扩大培养的级数是由菌种细胞生长繁殖的速度来决定的。生长繁殖慢的,需要的级数多;生长繁殖快的,扩大培养的级数就少。例如谷氨酸发酵采用二级种子扩大培养,即:斜面菌种→摇瓶一级种子扩大培养→种子罐二级种子扩大培养→发酵罐。而抗生素发酵采用三级种子扩大培养,即斜面菌种→摇瓶一级种子扩大培养→小型种子罐二级种子扩大培养→大型种子罐三级种子扩大培养→发酵罐。

要得到量大质优的种子,除了斜面菌种要有质量保证之外,培养基、培养温度、好氧培养时的溶氧水平、培养时间等这些种子扩大培养的条件也是十分重要的。

① 培养基:扩大培养种子的目的是为了获得量大质优的菌种细胞,因此种子培养基成分中的氮源要比发酵培养基中的氮源量多。另外,为了使种子能尽快适应发酵环境,缩短发酵周期,最后一级种子扩大培养的条件及其培养基的组成成分应该跟发酵培养基一致。培养基成分的组成及其配比,是在培养条件确定之后,通过多因素优选的实验来确定的。

② 培养时间:种子的培养时间称为种龄。用于发酵的种子都是处在对数生长期的细胞,健壮而有活力。种龄过长或过短的细胞均对发酵结果不利。

③ 培养温度:任何微生物都有自身的最适生长温度,在此温度范围内生长繁殖的速度最快。另外,各种微生物都有自己的最高生长温度和最低生长温度,如果培养温度超过其最

高生长温度,微生物就要死亡;如果培养温度低于其最低生长温度,则微生物生长将受到抑制。

④ pH: 培养基的 pH 关系到微生物的代谢活动,关系到微生物细胞酶系的形成。培养过程中培养基的 pH 发生波动是极其正常的现象。引起 pH 上升的原因是磷酸根、醋酸根被细胞吸收或者氮源被利用产生出氨;而 pH 下降,是因为 NH_4^+ 、 K^+ 被细胞吸收或者有 CO_2 产生,或者有机酸在培养基中积累之故。一般来说,碳氮比高的培养基,培养过程的 pH 容易下降;反之,pH 容易升高。如果需要稳定培养过程 pH,就得用碱性物质或酸性物质来调节。

⑤ 搅拌与转速: 培养基中的溶氧水平,在摇瓶培养时主要取决于摇床的转速和偏心距或振幅,而用种子罐培养的话,则主要与搅拌器的转速及通风量有关。需氧菌或兼性需氧菌的培养需要不断地供给氧气。在液体培养时,微生物靠摄取溶解在培养基中的氧气来满足自身的需要。不同的微生物,同一菌种处在不同生理期的细胞,对氧气的摄取量是不同的,因此对培养基的供氧要合理。如果培养基的溶氧水平过低,处在细胞对氧需求的临界点以下,细胞生长就减慢;但高溶氧水平也会抑制细胞的生长。培养过程中的溶氧水平,要根据培养基的性质、菌种的特性和种子罐的结构等因素通过实验来确定。

通气可以供给大量的氧气,而搅拌则能提高氧气在培养液中的浓度。超过一定范围,单一增大通风量或单一提高搅拌器转速都不能提升溶氧水平,合适的通气量与搅拌转速的搭配是保证氧气最大限度地溶入培养液的有效途径,过度剧烈的搅拌不仅损伤微生物细胞,也会引起培养液泡涌。

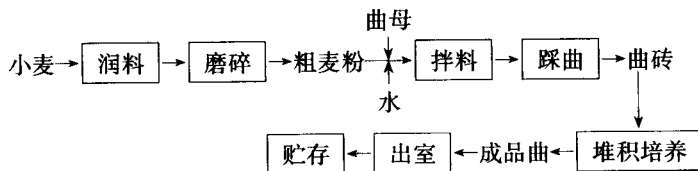
第一节 自然接种的微生物

一、白酒大曲中的菌种

生产曲酒用的发酵剂叫曲,其微生物直接来自于自然界。曲,是由自然界中的微生物附着于固体制曲原料上,通过人工培养,微生物在制曲原料中从外到里生长繁殖,再经过风干、贮藏而成的多种微生物集合体。根据制曲原料不同,可将曲分为大曲、麸曲和小曲。大曲中的微生物种类繁多,主要有霉菌、酵母菌和细菌。原料中的淀粉主要靠霉菌来分解,酒精发酵和酒香的产生是由酵母完成的。

(一) 高温大曲的制作

1. 工艺流程



2. 生产方法

(1) 选料、润料 要求麦粒干燥,无霉变,无农药污染。麦粒经除杂后,加入 5%~10% 水,拌匀,润料 3~4h。完全用小麦制的曲品质最好。

(2) 磨碎 用钢磨将麦粒粉碎,要求麦皮呈薄片,麦心呈粗粉和细粉状,两者比例为 1:1。

(3) 拌料 将水、曲母和麦粉按一定比例混合,配成曲料。加水量一定要适当,一般为麦粉质量的 37%~40%。水量大,曲砖容易被压制过紧,微生物不易从表及里生长,且曲砖升温快,容易引起腐败细菌繁殖。水量少,曲砖不易黏合,而且失水也快,不利于微生物生长繁殖。

生产高温曲与生产中温曲不一样,制曲过程中的最高品温会超过 60℃。为了保证有足够数量微生物,在配料时特意加入曲母。曲母应选用隔年陈曲,用量一般为麦粉质量的 4%~8%。夏季拌料时,曲母用量可少些;冬季时,曲母用量就得多些。

(4) 踩曲 踩曲的季节,以春末夏初到中秋节前后这段时间适宜,根据气温、湿度以及空气中酵母菌和霉菌的数量而定。踩曲,就是使用踩曲机将用水和好的曲料压制成砖块。

(5) 曲的堆积培养 此过程可分为 4 个操作步骤:堆曲、盖草及洒水、翻曲、拆曲。

① 堆曲:将刚压制好的曲砖放置 1~2h 使表面干燥,曲砖略变硬,然后移入曲室培养。曲砖移入前,在曲室的地面上铺上一层 15cm 厚的稻草,然后从靠墙的一边开始堆曲。将曲砖三横三竖相间排列,构成第 1 行。曲砖间距离为 2cm,空间用干稻草填充。当排满一层后,在曲砖上铺一层 7cm 厚的稻草,然后在其上面以三竖三横形式排列第 2 层曲砖,操作要求与上一次相同。如此重复,堆 4~5 层。每层曲砖的横竖排列应与下层错开,目的是便于空气在曲砖间流通。排完第 1 行后,间隔 2cm 再排第 2 行。最后留出 2 行空地,作以后翻曲时堆放曲砖用。堆曲完成后,在门窗直对处悬挂草席,防止风直接吹到砖曲而引起水分蒸发过快。

曲砖堆好后即用乱稻草盖上,起保温作用。以后,不时在草层上洒些水,水量不能大,以水不流入草下的曲砖为适宜。

② 翻曲:洒水后,将曲室门窗关闭,任微生物在曲砖上生长繁殖。在此过程中,曲砖温度开始逐渐升高,一般冬季 7~9d,夏季 5~6d,曲砖堆内温度高达 60℃ 左右,此时在曲砖表面可看到霉菌斑点,口尝曲砖有甜香味,此时应把握时机,立即进行第 1 次翻曲。再过 1 周左右时间进行第 2 次翻曲。翻曲的目的是调节曲砖的温湿度,使每块曲砖均匀成熟。翻曲时应把曲砖间以及地面的湿草取出,更换干草。为了便于空气流通,促进曲砖成熟和干燥,翻曲时可将曲砖间距加大,改原来的平放堆积式为侧放堆积。

生产上要求曲砖内部黄色曲居多,而这与翻曲时间是否掌握恰当有关。翻曲过早,造成白色曲多;翻曲过迟,黑色曲占多数。据分析,这是曲砖温度过低或过高引起的。

③ 拆曲:在第 2 次翻曲后 15d 左右,可稍开门窗进行换气。夏季再过 25d、冬季再过 35d 后,曲砖大部分已干燥,品温接近室温,此时可将曲砖搬出曲室。如果曲堆下层有含水量高(较正常的曲砖重)的曲砖,可将其放置在通风良好的地方继续干燥。成品曲呈黄、白、黑 3 种颜色,以红心的金黄色曲的质量为上乘。

(6) 成曲的贮存 拆曲后的成品曲应贮存 3~4 个月后才可使用。在贮存期间,曲砖中的产酸细菌因环境干燥而停止繁殖甚至死亡,所以使用陈曲酿酒,酒醅的 pH 不会太低。另外,陈曲的酶活力较低,酵母的数目较少,酿酒时间相对较长,但酒的质量较好。

(二) 说明

为了保存原料中的水解酶类,制曲原料不经过加热处理,直接使用生料制曲。

大曲一般用小麦或大麦和豌豆为原料,压制成砖块状的曲坯后,再采用自然接种的方法,让自然界各种微生物在其上面生长繁殖,为了确保成曲中有足够数量的有益微生物,以

保证酒的发酵顺利进行,一般在制曲原料中添加一定量的曲母粉。

由于制曲原料、工艺和操作环境不同,成曲中各种微生物的种类和数量也会有很大差异,最终影响到大曲酒的质量和产量。

微生物生长繁殖快慢和曲中菌数多少与生长环境的温度、水分、养分和氧气的供应情况有关。在制曲培菌阶段的低温期,由于曲砖的条件适合微生物生长,因此长菌迅速,此时期菌体数量最多。其中细菌的量最多,酵母次之,霉菌的数量最少。进入高温期,由于不耐热细菌的死亡,细菌数量明显减少,酵母菌减少也较多,而霉菌数量的减少却不多。

二、黄酒生麦曲中的菌种

(一) 生麦曲的制备

1. 工艺流程

小麦 → 过筛 → 轧碎 → 拌曲 → 制曲块 → 堆曲 → 培养 → 通风干燥 → 成品曲

2. 生产方法

(1) 过筛和轧碎 经过筛处理后,得到大小均匀、无杂物的麦粒,用轧碎机将麦粒轧碎。一粒小麦碎成 3~4 片较适当,过大或过小都影响曲的质量。轧碎的好处:麦粒中的淀粉外露,水分容易进入淀粉粒,糊化淀粉彻底;麦粒总表面积增加,且碎麦粒间空隙增大,对曲霉菌生长有利。

(2) 拌曲 在小麦碎片中加入适量水,堆积 3~4h 后制曲块。加水量要恰当,以小麦片湿润为妥,一般每 100kg 小麦加水 50kg 左右。倘加水不足,曲霉菌不易生长;如加水过量,曲霉菌生长过于迅速,品温难以控制,容易造成烧曲。曲霉菌是从自然环境中进入曲块的,也可以在拌曲时加入少量陈曲作为种子。

(3) 制曲块和堆曲 用制曲机将曲料压成砖块,然后移入曲室,堆放在铺有稻壳的地面上,铺成丁字形,以利于曲块间空气流通。

(4) 培养 曲块入室后,关闭门窗,此时室内温度在 26℃ 左右。随着霉菌生长繁殖,品温逐渐升高,3~5d 可达到 50℃ 左右。此时应及时开窗通风,降低曲块温度,等待温度降低至 35~40℃,再关窗培养。在培养期间进行 2~3 次翻曲,使各块曲块的曲霉菌生长情况基本相似。整个培养时间约需 20d。培养结束,将曲块贮存在阴凉处,使其自然干燥。培养好的块曲,要求坚韧而疏松,有适量黄绿色分生孢子。孢子量过多,麦曲的淀粉酶活力就下降。

(二) 酒母的制备

黄酒酿制的特点是边糖化边发酵,因此,在向醪(冷却的米饭和米浆水的混合物)中加入麦曲的同时,还得添加酒母。酒母按制备方法不同,可分为淋饭酒母、速酿酒母和高温糖化酒母 3 种。醪的传统发酵,无论是摊饭法、淋饭法,还是喂饭法,都是使用淋饭酒母。大罐发酵新工艺生产黄酒则使用纯种培养的速酿酒母和高温糖化酒母。

1. 淋饭酒母的制备

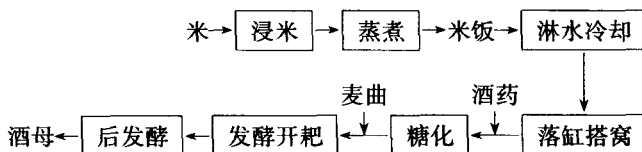
淋饭酒母是用酒药制造的,含根霉、毛霉和酵母等多种微生物,它既能糖化淀粉,又能将可发酵性糖转变成酒精,在糖化过程中产生的乳酸有抑制细菌生长繁殖的作用,从而使酵母的发酵顺利进行。

淋饭酒母制备的特点是,采用冷水下淋的方法将米饭冷却,同时使用麦曲和酒药。

(1) 原料配比

糯米 125kg, 麦曲块 19.5kg, 酒药 0.18~0.25kg, 加水至总量为 375kg。

(2) 工艺流程



(3) 生产方法

① 精米：用精米机将米粒外层碾去，通常米的精米率越低（即米的精白度越高），发酵过程越易控制。但黄酒的酿制对米的精白度要求并不高，质量精米率达到 90% 左右即可，也可直接以标一粳米或标二粳米作投料用米。

$$\text{质量精米率} = \frac{\text{白米总质量}}{\text{米总质量}} \times 100\%$$

② 洗米：用洗米机除去精白米上的糠、尘土等。

③ 浸米：浸米目的是使米中的淀粉粒子吸水膨胀，淀粉颗粒变得容易糊化。浸米时间一般为 1~3d，温度为 10~13℃。当用手指捏米粒成粉状时，即可结束浸米。传统工艺浸米时间长达 18~28d，目的是取得浸米浆水，因浆水含大量乳酸，可用来调节发酵醪酸度。

④ 蒸煮：蒸煮一方面是为了杀菌，另一方面是使淀粉糊化，便于下一步酶的水解，一般蒸煮方法是：在常压下蒸煮 15~20min，蒸煮过程中喷洒 85℃ 左右的热热水并搅拌米饭，对米饭的质量要求是外硬内软，内无白心，疏松不糊，透而不烂。

⑤ 淋饭：将冷水从米饭上面淋下，使米饭温度下降至 30℃ 左右，与此同时米饭含水量上升，对微生物生长有利，米饭表面经水淋后也变得光滑。淋饭水的温度可以按需而定。冷却的时间不宜太长，否则容易招致杂菌污染，而且糊化了的淀粉容易失水形成晶体结构，对于这种老化淀粉，酶很难作用，导致淀粉水解不完全。

⑥ 落缸搭窝：将米饭和酒药充分拌匀，搭成倒喇叭形的凹圆窝，以增加米饭和空气的接触，有利微生物生长，同时也便于取样了解糖化的情况。窝搭成后，在上面再撒一些酒药粉末。

⑦ 糖化：控制品温在 27~30℃。经糖化 36~48h 后，在饭面上有白色菌丝出现，圆凹形窝内有糖积聚。

⑧ 加曲冲缸：当窝内糖液的高度超过饭窝高度的大半时，按原料配比的规定量加入麦曲和水，充分搅匀，让发酵继续进行。麦曲和水的添加，以及物料搅拌所提供的充足氧气，都会促进酵母的大量增殖。

⑨ 开耙：所谓开耙，就是用木耙搅拌发酵物料，让物料散热降温。由于霉菌和酵母的增殖，品温逐渐升高，为了防止高温引起的糖化酶活力下降和酵母细胞衰老，同时也为了排出物料中的二氧化碳，换进新鲜空气，当品温超过 30℃ 时就要进行开耙。整个主发酵期间，大约开耙 4 次。

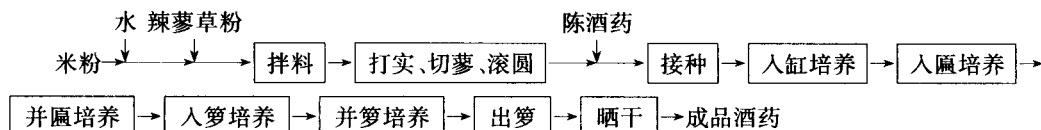
⑩ 后发酵：自落缸搭窝第 7 天左右，发酵进入后发酵阶段，经过 20~30d，发酵醪成熟，酵母细胞即可作为酒母使用。醪中的酒液因风味单调，可作烧菜时的料酒用。发酵醪中酒精含量在 15% 以上，这些酒精的存在既起到抑制杂菌生长的作用，又起到筛选耐酒精酵母

母的作用。

(4) 酒药的制备 淋饭酒母是将酒药作为种子经扩大培养得到的。酒药的制备特点：用于制造酒药的大米一般都选用富含蛋白质和灰分等营养成分的早粳糙米；辣蓼草含丰富的生长素，有促进微生物生长的作用，制造酒药时掺入新鲜的辣蓼草。

原料配比：籼米粉 100kg，辣蓼草粉 0.75kg，种药 3kg，水 50kg。

工艺流程如下：



① 原料的选择：米粉是选用当年产的早粳糙米加工制成的。早粳糙米富含蛋白质和灰分，有利于根霉、毛霉和酵母的生长。辣蓼草含生长素，而且能起疏松作用，因此在米粉中加入少量的辣蓼草粉末可促进微生物的生长繁殖。辣蓼草在每年7月前收割，挑选色绿、尚未开花的辣蓼草，并于当天晒干，然后取叶磨成粗粉。接种用的微生物可使用质量上乘的陈酒药，也可选用优良的纯种根霉、毛霉和酵母。配料用的水为清洁的河水。

② 成形和接种：生产酒药的时间一般选在立秋前后，此时籼米上市，辣蓼草已收割，而且气温在30℃上下，适合微生物生长。

按原料配比将物料混合，然后用棒捣拌数十下，以增强黏性，制成面团。接着将面团置于筛眼为2mm²的竹筛上，用手捻压面团，收集通过筛眼的料粒，最后将料粒放到木框内（高13cm，宽55cm，长70cm）压实成形。脱去木框，将料块切成小块，然后利用竹匾将小块滚成圆形，撒入种药粉末，摆动竹匾，使种药充分粘附在圆形物料上，完成接种操作。

③ 入缸培养：在缸内装入清洁的砻糠至离缸口30cm处，然后用干净的稻草遮住砻糠，将酒药置于稻草上，酒药间间隔3mm左右，以利通气，防止黏合。为了充分利用空间，在酒药上方悬挂一铺有干净稻草的竹匾，在稻草上再排放酒药，然后用稻草盖住，开始进行微生物培养。经过16~18h，品温升到38℃左右，在酒药表面出现白色菌丝，并有香气发出，此时可将草盖撑高10cm，让热量和潮气散发，再经过2h左右可取走草盖，并把竹匾移置缸外，隔3~4h，将缸内和竹匾内的酒药移放在空竹匾内，送保温室培养。

④ 保温室培养：将竹匾内的酒药置于保温室的木架上继续培养，每层竹匾相距30cm。当品温升高到39℃左右时，将竹匾上下调换位置，继续培养4~5h后开始并匾，一般3匾并成2匾，并匾后再培养4h左右，将酒药装入竹箩培养。入箩时，先在竹箩中央放一束干净的稻草，然后再将酒药装入，这样有利通风散热。每只竹箩盛酒药25kg。酒药在竹箩内培养5~6h后倒入空箩内继续培养，控制品温不超过37℃，以后每隔6h左右倒箩1次。在竹箩中培养24h后，可开始并箩，一般每箩盛酒药45kg。并箩后的培养期间，一般24h倒箩2次，培养48h后将酒药移至室外晒干。

⑤ 晒干：并箩培养结束后，将酒药置于水泥场地上晒2~3h，然后收进室内，隔24h后再取出倒在场地上日晒至干，即为成品酒药。

2. 速酿酒母的制备

以优良黄酒酵母为种母，经逐级扩大培养得到足够数量的酒母，因为每一级培养的时间都较短，所以将这种酒母称为速酿酒母。种母的选择十分重要，因为它直接关系到黄酒的质

量和出酒率高低。

速酿酒母的制备方法如下：在米饭中加入大米用量 1 倍量以上的净水和大米用量 13% 的麦曲，有时为了提高酵母发酵能力，可往水中添加磷酸二氢钾，用量为每 100L 水加入 24~28g。米饭、水和麦曲三者混匀后，用乳酸将物料的 pH 调至 4.0，再接入 2%~5% 纯粹培养的酵母菌，在 26~30℃ 培养，当品温超过 30℃ 时，即开耙散热，培养时间为 2~3d。对酒母的质量要求是：酵母粗壮，大小均匀，酵母细胞数 3×10^8 个/mL 以上，杂菌很少。制造速酿酒母过程中用来抑制杂菌生长的乳酸是人工添加的，这与淋饭酒母的制法不同。

3. 高温糖化酒母的制备

在米饭中加入大米用量 3 倍量的净水和大米用量 15% 的麦曲，混匀，保持温度在 55~60℃，静置糖化 4~6h。由于采用高温糖化，原料中的细菌和野生酵母就不能生存，对纯粹培养酒母有利。糖化结束，添加乳酸将糖化醪 pH 调至 4.0，并降温至 28~30℃，接入 2%~5% 纯粹培养的酵母菌，保温培养 20h 左右，即得酒母。这与制造速酿酒母相同，也是由人工加入乳酸来调节物料 pH。

(三) 说明

让曲霉菌在小麦上生长繁殖，用这样方法制得的曲称为麦曲。曲霉菌含淀粉酶、酸性蛋白酶和脂肪酶，因此麦曲能将原料中的淀粉、蛋白质和脂肪分解，在酒母协同作用下，生成有机酸、醇和酯等代谢产物，使黄酒具有独特的风味。

制麦曲一般都选用小麦为原料，这是因为它具有以下优点：①小麦含有丰富的蛋白质、碳水化合物和适量的无机盐等成分，这些成分的比例很适合曲霉菌生长的要求；②小麦比较松散，不黏结，透气性好，使曲霉菌能得到生长所需要的氧气，同时曲霉菌生长时产生的热量可散发开来，不会发生烧曲现象；③小麦对影响麦曲中微生物的集聚种类和数量以及黄酒独特风味的形成有很大作用。

小麦品质的优劣对麦曲质量有很大影响。制曲用的小麦应符合以下要求：麦粒完整、饱满、颗粒均匀，无霉烂、虫蛀，无农药污染；当年收获的新小麦；麦粒的品种单一；麦粒的外皮薄，呈淡红带黄色；麦粒中不混有杂物。

第二节 从自然界中分离的菌种

一、概 述

筛选具有潜在工业应用价值的微生物的手段之一，就是从自然界中去寻找并分离获得。自然界中存在着 10 万种以上的微生物，它们种类多，性能不同，又因为微生物在自然界中受着各种因素的影响发生着自然变异产生新菌株，所以说自然界中的菌种资源十分丰富。因此，从自然界中分离获得优良菌种的方法沿用至今。

微生物在自然界中总是以一定几率发生着自然突变的现象早已被人们所熟知。自然突变的发生，一般认为是由两个原因引起的：①自然突变是一些低剂量诱变因素引起的长期综合效应，例如宇宙空间的各種短波辐射、微生物自身代谢活动中所产生的一些诱变物质和自然界中存在的一些低浓度诱变物质对微生物长期作用的结果。②DNA 中的胸腺嘧啶(T)和鸟嘌呤(G)以酮式或烯醇式出现，胞嘧啶(C)和腺嘌呤(A)以氨基形式或亚氨基形式出现。在 DNA 双链结构中以 AT 和 GC 碱基对为主。如果当 T 在某一时刻以烯醇式形式出现，而

DNA 复制刚好到达这一位置时,在它对应的位置上就不出现 A 而出现 G。同样,如果胞嘧啶以亚氨基形式出现,就在嘧啶 C 的对应位置上出现 A 而不是 G。这种互变异构效应的发生,是造成子细胞具有跟母细胞性能不同的原因。

自然突变现象使我们有可能从有微生物存在的环境中分离到所需要的有特殊性能的微生物细胞或者是生产上性能优良的细胞。例如,从污染噬菌体的发酵液中有可能分离到抗噬菌体的自然突变菌株;在酒精发酵醪中可分离到分生孢子为白色的自然变异菌株,不仅分生孢子颜色跟生产菌株分生孢子的黑色不同,而且糖化力比生产菌株强,培养条件也变得粗放。

进一步采用定向培育的方法,利用自然突变也可能获得理想的菌株。例如:先在培养皿上加入适量的基本培养基,然后将皿底斜放,待凝固形成斜面后把培养皿放平,接着再倒入含有异烟肼的基本培养基并将原先的斜面覆盖住,这样就得到了异烟肼浓度有梯度的平板。由于皿底斜面厚的部分其上面覆盖着的含异烟肼的培养基层薄,皿底斜面薄的部分其上面有较厚的含异烟肼的培养基,借助异烟肼的扩散作用,含异烟肼层厚的平板表面跟含异烟肼层薄的平板表面有着十分明显的异烟肼浓度差。当在上述培养基平板上涂以酵母菌悬液,培养后,在含低浓度异烟肼的部位其平板表面有较多的酵母菌出现;在含高浓度异烟肼部位的平板表面,因生长受到抑制没有酵母菌出现;只有在异烟肼浓度适中部位的平板表面,才出现仅仅几个酵母菌菌落,这是抗异烟肼的细胞所形成的菌落。这些抗性菌落是酵母细胞在含异烟肼的培养基平板上培养时,细胞发生自然变异后才形成了抗异烟肼的能力。

许多有应用价值的微生物是直接从自然界分离得到的。例如:生产 α -淀粉酶的 JD32 枯草芽孢杆菌是从地瓜表土分离得到的,生产脂肪酶的 A. S1203 假丝酵母是从缙纺厂的污水中分离得到的,生产纤维素酶的许多菌种是从枯枝落叶的烂泥、腐烂木材上找到的。

从自然界中选育菌种,首先是要将众多微生物逐个分开得到单菌落,然后确定单菌落菌株的产物性质和产物数量。

筛选生物物质产生菌的步骤为:含微生物材料的选择→材料的预处理→目的菌种的分离→目的菌种的培养→菌落的选择和纯化。

(一) 菌样的采集

对于自然界材料,样品来源越广泛,越有可能获得新菌种。

从同一生态环境中的不同环境条件下,有可能分离出更多种类的菌株。例如,在酸性土壤的放线菌类群与其紧接的下层中性土的有很大不同。因此在采集含菌样品前,先要调查一下打算筛选的微生物在哪些地方分布最多。由于在土壤中几乎可以找到任何微生物,因此土壤是首选的采集目标。另外,根据目的微生物的特性去相应的材料上寻找,譬如在油田、炼油厂附近的土壤中寻找分解石油的微生物;在果园的土壤和腐木中会有较多的分解纤维素和木质素的微生物;在蜜饯和果实表面,酵母菌较多;在牛奶中和蔬菜表面有较多的乳酸菌;在谷物种子上,青霉、曲霉和镰孢霉的数量较多;在动物肠道和粪便中,肠道细菌较多。

在目标材料确定之后,还应注意采集技巧,以土样采集为例:

① 有机物含量高的土壤,其中微生物数量就多。一般肥沃的土壤中,细菌数量最多;园林土或耕作过的农田土含放线菌较多;枯枝落叶层下的土壤中容易找到真菌。

② 土壤深度不同,其水分、养分和通气的情況也不同。表层的土壤因其直接受阳光照射,所以比较干燥,含微生物少。在离表层土 5~20cm 处的土壤中,含微生物最多,是采集