

乔宾福

主编

邱蔚然

陆

刚

高大忻

编著



实用 微生物 技术

上海科学技术文献出版社

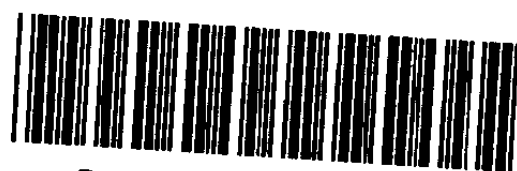
33

Q23-37
26F

实用微生物技术

乔宾福 主编
邱蔚然 陆 刚 高大忻 编著

Y4111/01



A0097702

上海科学技术文献出版社

(沪)新登字301号

责任编辑：叶德仁

封面设计：狄 华

实 用 微 生 物 技 术

乔宾福 主编

*

上海科学技术文献出版社出版发行
(上海市武康路2号 邮政编码 200031)

全 国 各 书 店 经 销

宜兴市第二印刷厂印刷

*

开本 787×1092 1/32 印张 8.125 字数 194,000

1994年1月第1版 1994年1月第1次印刷

印数：1—5,000

ISBN 7-5439-0273-7/Q·15

定价：6.70元

《科技新书目》 298-300

内 容 提 要

本书介绍现代发酵工业所涉及的微生物实用技术。作者从科研和生产实际需要出发,叙述了酒精、单细胞蛋白、酶制剂、有机酸、核酸、抗生素、激素、维生素、免疫抑制剂及污水处理等方面的微生物分离、鉴定、筛选、育种、基因重组、培养、生产的基本操作和注意要点,内容全面,图表丰富,是从事生物工程技术人员的实验室案头的一本简明工具书。

前 言

生物工程已列为我国高新技术领域之一，许多研究人员正从事着基因工程、酶工程、发酵工程和细胞工程领域中新产品、新工艺的探索。目前，国内外生物工程的研究成果首先在医药、保健、食品、轻工领域取得显著经济效益和深远的社会影响。

尽管生物工程的研究素材可取自动、植物细胞和微生物，但由于微生物生长速度快，每一个细胞都可比拟为生物工程“产品的基地”，因此大量工作以微生物发酵为基础。在组成近代发酵工业的氨基酸、核酸类物质、抗生素、生理活性物质等的发酵生产研究中，得到一株高产菌株是重要的，但更期望掌握高产菌株的筛选、分类、保藏，获得优良性状的诱变育种方法、培养条件、从发酵液中分离获得高纯度产品等实践操作技术。在目前市场经济形势下，一个企业必须有若干个具有很好效益的产品，但更期待掌握更多产品的工艺技术。作者从科研和生产实际需要出发，在本书中介绍上述领域的实用微生物技术，并力求简明扼要，通俗实用。

本书由乔宾福先生审定、主编。第一、二、三、四章由华东化工学院邱蔚然先生编写，第五章由原上海市工业微生物研究所陆刚和高大忻二位先生编写，第六、七、八、九章由上海市工业微生物研究所乔宾福先生编写。本书出版得到上海长阳生化制药厂和天津纺织工学院实验总厂支持，在此表示衷心感谢。

由于编者水平有限，书中错漏之处，望同仁批评指正！

编著者

1993 年 10 月

目 录

前 言

第一章 基础技术	(1)
第一节 培养基的种类和配制.....	(1)
第二节 无菌和除菌方法.....	(7)
第三节 灭菌操作.....	(13)
第四节 培养方法.....	(16)
第二章 微生物的分离	(21)
第一节 细菌的分离.....	(21)
第二节 酵母的分离.....	(23)
第三节 真菌的分离.....	(26)
第四节 放线菌的分离.....	(28)
第五节 噬菌体的分离.....	(34)
第三章 微生物的鉴定	(37)
第一节 细菌的鉴定.....	(37)
第二节 酵母的鉴定.....	(42)
第三节 真菌的鉴定法.....	(45)
第四节 放线菌的分类.....	(53)
第五节 微生物的保藏法.....	(56)
第四章 微生物的观察	(55)
第一节 肉眼观察法.....	(55)
第二节 光学显微镜观察法.....	(66)
第三节 电子显微镜观察法.....	(70)

第五章 有用微生物的筛选——从自然界筛选	(74)
第一节 抗生素生产菌种的筛选	(74)
第二节 抗肿瘤抗生素生产菌的筛选	(84)
第三节 酶抑制剂生产菌的筛选	(90)
第四节 维生素、辅酶生产菌的筛选	(96)
第五节 有机酸生产菌的筛选	(101)
第六节 蛋白质生产菌的筛选	(103)
第七节 核酸生产菌的筛选	(106)
第八节 酶生产菌的筛选	(108)
第九节 抗病毒类物质生产菌的筛选	(110)
第十节 免疫激活剂生产菌的筛选	(112)
第十一节 多糖类生产菌的筛选	(115)
第十二节 特殊能力微生物的筛选	(119)
第十三节 植物激素生产菌的筛选	(122)
第十四节 废水处理微生物的筛选	(125)
第十五节 用酶法生产有用物质	(129)
第六章 有用微生物的筛选——变异株的选育	(132)
第一节 耐性(抗性)变异株的筛选	(132)
第二节 营养缺陷型变异株的筛选	(135)
第三节 敏感性变异株的筛选	(138)
第四节 代谢调控变异株的筛选	(139)
第五节 用基因重组法选育	(142)
第六节 氨基酸产生菌选育实例	(145)
第七节 核酸类物质产生菌的选育	(147)
第八节 肌苷和鸟苷产生菌的选育	(153)
第九节 高产辅酶 A(CoA) 菌种的选育	(158)
第十节 棒状杆菌素生产菌的选育	(160)

第七章 微生物的培养	(162)
第一节 大肠杆菌的培养.....	(162)
第二节 谷氨酸发酵和赖氨酸发酵.....	(164)
第三节 产氨短杆菌的培养——肌苷酸发酵、三磷酸腺苷(ATP)发酵.....	(167)
第四节 放线菌——抗生素生产菌菌体的培养法...	(172)
第五节 酵母培养.....	(176)
第六节 霉菌的培养和酶的生产.....	(178)
第七节 重组工程菌——细菌的培养.....	(180)
第八章 工业规模发酵生产	(186)
第一节 赖氨酸的生产(用细菌发酵).....	(186)
第二节 抗生素的生产(用放线菌发酵).....	(188)
第三节 酵母及面包酵母的生产.....	(190)
第四节 用霉菌生产酶制剂.....	(191)
第九章 我国核酸类物质的研究和生产	(195)
第一节 核糖核酸(RNA)的生产.....	(195)
第二节 脱氧核糖核酸(DNA)和脱氧核苷酸的生产.....	(209)
第三节 酶解法生产核苷酸.....	(212)
第四节 双酶法生产肌苷酸和鸟苷酸(I + G).....	(214)
第五节 碱水解 RNA 生产 2', 3' 核苷酸	(218)
第六节 化学水解法制备核苷.....	(219)
第七节 核苷类抗病毒药物.....	(223)
第八节 发酵法生产肌苷.....	(225)
第九节 发酵法生产肌苷酸.....	(228)
第十节 三磷酸腺苷(ATP)的生产.....	(232)
第十一节 辅酶 I(NAD ⁺)的生产.....	(235)

第十二节 辅酶 A(CoA) 的生产	(237)
附录——培养基组成	(242)
(一) 细菌用培养基	(242)
(二) 放线菌用培养基	(246)
(三) 霉菌、酵母用培养基	(247)

第一章 基础技术

第一节 培养基的种类和配制

培养基是由人工配制供微生物生长繁殖或积累代谢产物所用的营养物质。它根据微生物的种类、实验目的可以设计各种配方,但是必须含有微生物生长所必需的碳源、氮源、无机盐、水和生长因子(如维生素、氨基酸、碱基等)。

1. 培养基的分类

1) 根据培养基成分

培养基营养成分以天然物质为主的,称天然培养基;以化学试剂组合的,称合成培养基;以化学试剂为主,并含有少量天然物的,称半合成培养基。

2) 根据培养基物理性状

根据物理性状可以分为液体培养基、固体培养基和半固体培养基。液体培养基常用于微生物生理代谢研究和工业发酵。固体培养基是在液体培养基中加入0.5~2.5%琼脂或15~25%明胶等凝固剂固化的培养基,常用于微生物分离、鉴定、计数和菌种保藏等。此外,用天然物质如麸皮等固形物配制的培养基也称固体培养基,亦在生产中使用。在液体培养基中加入少量凝固剂(0.2~0.5%琼脂)的培养基称半固体培养基,常用于观察细菌的运动、鉴定菌种和测定噬菌体效价等。

3) 根据使用目的

在一般实验中,微生物是通过保藏培养基→活化培养基

——>斜面培养基——>种子培养基——>发酵培养基 逐级培养放大。保藏培养基用于菌种保藏；活化斜面是为获得用于种子培养的增殖力旺盛的菌体而制作的斜面培养基；发酵培养基也称生产培养基，是以生产为目的的培养基。其他，有为观察微生物生长、增殖用的增殖培养基，有从众多微生物中寻找产生某种物质菌株的筛选培养基。此外，根据用途还有基础培养基、富集培养基以及选择培养基等。

2. 培养基的配制

培养基的配制一般按下列顺序：(1) 选定培养基成分，(2) 配试剂，(3) 调节pH，(4) 分装，(5) 灭菌。有时(2)、(3)或(4)、(5)要颠倒次序，有时要灭菌后再调节pH。微生物代谢除本身生理特性外，在很大程度上受环境影响，有时培养基成分稍有不同，培养结果就有很大差异，所以必须充分注意。

1) 器具

玻璃器皿(包括各种大小试管、三角烧瓶、培养皿等)、广口保温瓶、罐、称量匙、各种塞子等。使用的器具必须十分洁净。

2) 材料

(1) 水：除特殊情况，在小规模试验中都去离子水。根据需要，也有将去离子水蒸馏后使用。去离子水中往往含有原水的有机物，故必须注意原水的成分。对于霉菌，使用微量元素少的合成培养基会影响色素产生，使分类鉴定困难，所以往往用自来水来配制培养基。

(2) 试剂：应该根据实验的需要使用不同级别的试剂。通常都使用一级试剂，但是如混有微量无机物会影响培养结果，在确定微生物营养要求等试验中，往往要用特级试剂。不纯碳酸钙与培养基一起灭菌时，培养基pH会发生变化，所以碳酸钙用特级试剂较好。

(3) 天然营养源：它的分析值可查阅有关资料，但批差很大，应加以注意。主要天然营养源有：

肉膏：动物肉的热热水抽提物，含有较多的氨基酸、多肽、糖和无机物。

蛋白胨：动植物蛋白质的酶解产物，含有较多氨基酸和多肽。

酵母膏：酵母的热热水抽提物，含有较多的氨基酸和维生素。

酪蛋白氨基酸：酪蛋白的酸水解物，含有除色氨酸和半胱氨酸以外的氨基酸，以及氯化钠。亦有不含盐类和维生素的制品。

玉米浆：是抽提玉米淀粉后所得废液浓缩而成的产物，主要含有氨基酸、维生素和无机物。

可溶性植物蛋白：是以玉米为原料经酒精发酵的蒸馏残渣，主要含有蛋白质、维生素和无机物（特别是钾、磷）。

麦芽汁：麦芽糖化后的热热水抽提物，主要含糖类。

废糖蜜：砂糖结晶后的母液，除含蔗糖、葡萄糖和果糖外，还含较多维生素和无机物。

琼脂：是作为固体培养基的凝固基，但不能含不纯物质，否则会影响微生物生长。

3) 培养基的组成

培养基的组成应根据微生物特性来决定，代表性的配方已在本书后附录中列出，读者可根据要求查阅。

4) 配制与蒸煮灭菌

(1) 培养基的配制：先在预定液量一半以上的水中，依次加入培养基成分，溶解（此时可加温或搅拌），调整pH后，再加水到预定体积。

(2) 溶解培养基成分时,为不使其产生沉淀,可以在某一成分溶解后,再加入另一成分。在含磷酸根离子(PO_4^{3-})溶液中,镁(Mg^{2+})、钙(Ca^{2+})、铁(Fe^{2+})和锰(Mn^{2+})离子容易产生沉淀,可以另外溶解后加入。有时在蒸煮前没有沉淀,而一加热就产生沉淀,此时可在培养基中加入柠檬酸等螯合剂,或将某一成分单独蒸煮后加入。

(3) 经常使用且添加量少的成分,可预先配制成 50~1000 倍的浓溶液,使用时用移液管定量添加浓溶液即可。有些物质在溶液状态容易分解,可以在冷暗处保存。

(4) 调节 pH:调节 pH 通常用 1~2 mol/L 氢氧化钠或盐酸。除特殊情况外,应在预定液量一半以上的溶液中调节 pH。天然培养基的缓冲能力比较强,合成培养基则较弱,故在稀释到最终预定液量时,pH 可能会发生变化。含糖、碳酸钙、尿素、有机酸的培养基蒸煮后 pH 往往发生变化,在灭菌后要重新调整,可用灭菌的 0.1~0.001mol/L 的氢氧化钠或盐酸(硫酸)校正。

(5) 分装时沾在容器口壁附近的培养基,往往是以后污染的原因,所以要特别注意(尤其是固体培养基)。

(6) 蒸煮灭菌后,另外添加的或必须另外添加的物质有:

① 容易沉淀的物质: Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Mn^{2+} 、 PO_4^{3-} 、 SO_4^{2-} 。

② 加热后引起变色的物质:糖等。

③ 加热后容易分解的物质:尿素、抗生素、一部分维生素、pH5.5 以下的琼脂等。

④ 容易引起 pH 变化的物质:糖、尿素、碳酸钙、有机酸等。

⑤ 低沸点物质:乙醇、甲醇等。

5. 固体培养基的制备方法

1) 一般注意事项

(1) 琼脂在 96℃ 溶解, 约在 43℃ 左右凝固, 且根据浓度和种类略有上下。琼脂在 pH5.5 以下蒸煮灭菌就难以凝固, 所以制备 pH 值低的琼脂培养基时, 要将不含琼脂的培养基先调节到要求 pH 值, 而将琼脂 pH 值调节至 5.5~6.0, 然后分别蒸煮, 冷至 60℃ 后, 再将两者混合。此方法也可用于制备 pH3.0 的琼脂培养基。

(2) 即使在中性 pH, 由于反复蒸煮, 琼脂也会逐渐变得难以凝固。

(3) 对于能分解琼脂的微生物, 或会受有机酸抑制的微生物, 其固体培养基可用硅胶(5~6%)、Gelrite (假单孢菌产生的杂聚糖)、合成聚合物(聚环氧丙烷和环氧乙烷的共聚物)等。

(4) 明胶在 25℃ 溶解, 20℃ 凝固, 长时间加热会变得难以凝固。

(5) 琼脂培养基如冷却过快, 凝集水会增多。故在分注平板培养基时, 蒸煮无菌后的培养基要稍加冷却后再分装。固体培养基在使用前先放入干燥器或恒温箱除去凝集水, 待表面干后再使用。

2) 平板培养基

(1) 将液体培养基和琼脂(1.5~2.5%)加入三角烧瓶或试管中, 若是制备大量培养基可以用水壶, 装液量不超过容器容量 $\frac{3}{4}$, 通常在 $\frac{2}{3}$ 以下。

(2) 蒸煮: 装液量多时, 培养基中部受热慢, 所以要延长有压力前的蒸煮时间, 或延长 120℃ 的压力保持时间。

(3) 蒸煮后迅速减压, 瓶(或管)塞容易冲落。即使高压灭菌器内温度已降至 100℃ 以下, 由于培养基温度降得较慢, 往往还

在 100°C 以上,此时容器稍一振动,就会引起突沸而使人烫伤,所以应加以注意。

(4) 培养基冷至 $60\sim 70^{\circ}\text{C}$ 后,将底部浓融的琼脂摇匀,然后倒入干热灭菌过的培养皿中,并放置到完全固化即可。

(5) 分注培养基的量,对于 9 cm 直径的培养皿约为 $15\sim 20\text{ ml}$ 。

3) 斜面培养基(图 1.1)

(1) 培养基配制与平板培养基相同,配制后在高压灭菌器内加温(不超过 5 min),使其溶解。

(2) 趁培养基为液状时,用分装器注入试管,普通试管装液量为 $7\sim 8\text{ ml}$ 。

(3) 塞上棉塞之后,蒸煮灭菌,趁其呈溶解状态,如图 1.1 那样倾斜试管固化。

(4) 含碳酸钙的培养基蒸煮后用混合器迅速混匀后再倾斜放置。

(5) 在所有操作中要注意不使棉塞沾染上培养基。

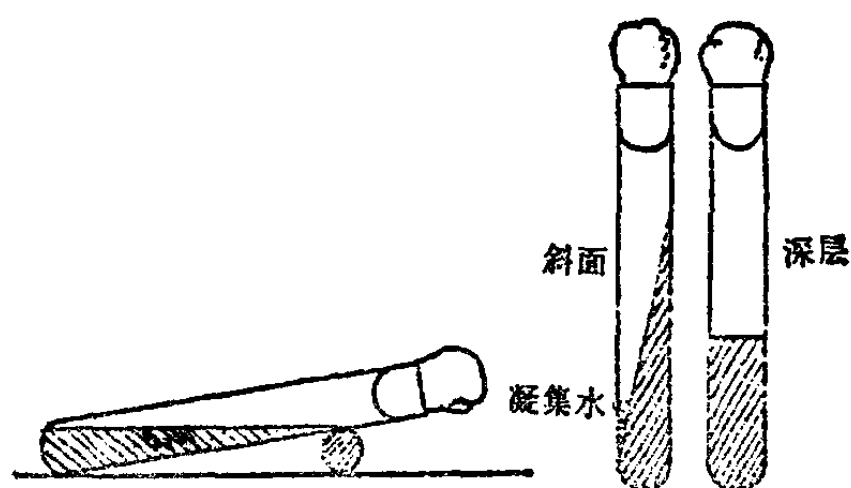


图 1.1 斜面培养基和深层培养基

4) 深层培养基

培养基的量比斜面培养基多 10 ml 左右,如图 1.1 右那样

垂直放置凝固。

5) 半固体琼脂培养基

(1) 琼脂浓度为 0.5%，与3)中(2)、(4)一样操作。

(2) 尽量做成透明。

(3) 这是非常脆弱的培养基，因此固化后必须小心操作。

第二节 灭菌和除菌方法

在微生物实验中为进行某种微生物的纯培养，必须不污染其他杂菌，因此所用的培养基必须无菌，并且还要防止大气中其他微生物混入。为达到这一目的，器具、培养基要进行灭菌，容器口都要塞上棉塞或盖上绒布。

1. 高压灭菌器*

用高压灭菌器可对一般培养基、生理盐水、器具，以及含耐热性孢子的谷类、薯类等进行灭菌。高压灭菌器有许多种类，现在一般都是使用加压蒸汽或电热式灭菌器。

高压灭菌器的操作方法和注意事项：

(1) 将要灭菌的物质，如棉塞等要用油纸包住不使其沾湿，如过滤器等灭菌时在器具内部开口部要用牛皮纸或铝箔包起来，装入高压灭菌器时不要让纸等东西堵塞排气口。

(2) 盖上高压灭菌器，拧紧盖子，盖得不紧会漏气，盖得过紧会损坏衬垫。

(3) 打开排气口阀门。

(4) 转动定时器，对准所定时间（一般 15~20min）。

(5) 以上操作完后，通入蒸汽，温度逐渐上升，并将内部空气排除。当内部温度达 100℃ 时，关闭排气阀。此后蒸气压和温

* 适合少量培养基等灭菌，要注意不要空烧，不要超过规定压力。

度继续上升,达到 $118\sim 120^{\circ}\text{C}$ 时($0.9\sim 1.0\text{ kg/cm}^2$),转动定时器使其回到最初设定时间,并维持温度,到达时间后停止通入蒸汽。此后,由于外界温度影响,锅内蒸气压和温度自然下降。

(6) 灭菌结束,放置 $20\sim 30\text{ min}$,当高压灭菌器的压力为零,温度在 100°C 以下时,逐渐打开排气口阀门。⁷² 不能在 100°C 以上打开排气阀,否则培养基会沸腾,使塞脱落或引起烫伤。

(7) 打开盖,此时仍然相当热,取出时要注意。

2. 紫外线灭菌

它是使用低电压汞灯以杀菌力最强的 $2600\sim 2800\text{\AA}$ 波长照射灭菌。一般用于无菌室、无菌箱等。此方法的缺点是只有表面的杀菌作用,不能渗透到内部。

不能直视汞灯,否则会伤害眼睛。汞灯长期使用杀菌力会逐渐下降,必须定期(约半年左右)更换新灯。

3. 气体灭菌

气体灭菌是使用气态化学试剂对固型材料等灭菌的方法。此方法适用于不耐热或不宜沾水的材料,但是气体(环氧乙烷)是可燃性的,毒性很强,使用时要特别注意。

气体灭菌器操作法:

(1) 将要灭菌的材料放入耐压容器内,容器与气体出口处相接(图 1.2 的 H),容器内用真空泵减压。

(2) 连通钢瓶(A),闭合仪表板电源和加热器(C)的开关。

(3) 打开钢瓶阀门。液化气体被加热器气化进入储气罐(D)。当储气罐的压力达 2 kg/cm^2 时,压力开关(F)启动,电磁阀(B)自动关闭,如此储气罐内压经常维持在 2 kg/cm^2 。

(4) 仪表板前面的阀一打开,气体就流入容器内。容器内压力计(P-3)达到设定值后,关闭阀(G)和容器侧阀,并放置一