

安徽省高等学校“十二五”规划教材

发酵工程综合实训

王娣 许晖 主编



北京师范大学出版集团
BEIJING NORMAL UNIVERSITY PUBLISHING GROUP
安徽大学出版社

发酵工程综合实训

主 编：王 娣 许 晖

副主编：张雪锋 柯春林

编 委：（以姓氏笔画为序）

王改玲 任茂生 李 妍

李 慧 张家泉 唐 浩

秦 晴 曹珂珂 韩 卓

谢海伟



北京师范大学出版集团
BEIJING NORMAL UNIVERSITY PUBLISHING GROUP

安徽大学出版社

图书在版编目(CIP)数据

发酵工程综合实训/王娣,许晖主编. —合肥:安徽大学出版社,2016.6

ISBN 978-7-5664-1129-7

I. ①发… II. ①王… ②许… III. ①发酵工程—高等学校—教材 IV. ①TQ92

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2016)第 124246 号

Fajiao Gongcheng Zonghe Shixun

发酵工程综合实训

王娣 许晖 主编

出版发行:北京师范大学出版集团

安徽大学出版社

(安徽省合肥市肥西路3号 邮编 230039)

www.bnupg.com.cn

www.ahupress.com.cn

印刷:安徽省人民印刷有限公司

经销:全国新华书店

开本:184mm×260mm

印张:10.75

字数:258千字

版次:2016年6月第1版

印次:2016年6月第1次印刷

定价:28.00元

ISBN 978-7-5664-1129-7

策划编辑:李梅 武溪溪

责任编辑:武溪溪

责任校对:程中业

装帧设计:李军

美术编辑:李军

责任印制:李军

版权所有 侵权必究

反盗版、侵权举报电话:0551-65106311

外埠邮购电话:0551-65107716

本书如有印装质量问题,请与印制管理部联系调换。

印制管理部电话:0551-65106311

前 言

发酵工程是一个由多学科交叉、融合而形成的技术性和应用性较强的开放性学科。自20世纪20年代生产酒精、甘油等产品的厌氧发酵技术兴起以来,发酵工程得到不断的完善和发展。随着科学技术的进步,发酵技术已经进入现代发酵工程阶段,能够人为控制和改造微生物,使用基因工程、细胞工程等先进生物工程技术进行菌种改造,使这些微生物为人类生产产品。现代发酵工程作为现代生物技术的一个重要组成部分,具有广阔的应用前景。目前,发酵工业涉及医药、食品、化工、环境治理、石油开采等多种工业部门,在国民经济中的地位日趋重要。

本书是与发酵工程相关理论课配套的实训教材,内容涵盖发酵工程基本技术、发酵工程基本技能实训和发酵工程综合实训。本书主要介绍了发酵工程的内容、特点、要求、发酵过程和提取过程;发酵基本操作技能训练,包括菌种选育和优化技术、培养基配制、灭菌及设计训练、菌种扩大培养技术、发酵罐实操实训和发酵生化参数的检测;发酵工程综合实训,该部分涵盖了常见的发酵产品,包括厌氧发酵产品中的酸奶酿制和酒精发酵,好氧发酵的柠檬酸生产等。本书内容既有发酵全过程的训练、参数检测、过程动力学分析,也有知识的拓展。本书紧密围绕企业的生产实际,有助于提高学生对所学知识的感性认识,注重培养学生的实际动手能力,充分体现“工程化”教育教学特色,对学生了解社会、接触生产实际、加强劳动观念、培养动手能力、提高理论与实践相结合的能力等具有重要的意义。

本书可作为高等学校生物工程、发酵工程等相关专业的实训教材,也可作为相关企业员工的技能培训教材,亦可供从事相关产品生产的技术人员参考。



本书各单元的主要编写人员如下:第一单元由谢海伟编写;第二单元由柯春林编写;第三单元由李慧编写;第四单元由韩卓编写;第五单元由曹珂珂、李妍编写;第六单元由王改玲编写;发酵工程综合实训中酒精、谷氨酸、赖氨酸、柠檬酸等部分由发酵技术国家级工程研究中心(依托单位:安徽丰原发酵技术工程有限公司)张雪峰、秦晴、唐浩和张家泉编写,啤酒、果醋、酸奶等部分由王娣、许晖和任茂生编写。

本书在编写过程中力求理论和实践相结合,突出“工程化”特点,体现科学性和创新性,但由于编者水平和时间有限,书中缺点和错误之处在所难免,恳请广大读者和同行专家提出宝贵意见。

编者

2016年5月

目 录

69	实训十三	碱性蛋白酶活力的测定	129
75	实训十四	原子吸收分光光度法测定啤酒液中铜含量	131
77	第七单元	发酵工程综合实训案例	135
77	综合实训一	小量啤酒生产操作	135
80	综合实训二	酒精发酵生产	147
84	综合实训三	食醋发酵生产	147
91	综合实训四	酸奶发酵生产	153
91	综合实训五	谷氨酸发酵生产	153
92	综合实训六	赖氨酸发酵生产	157
93	综合实训七	柠檬酸发酵生产	160
	第一单元	发酵工程基本技术	1
	第二单元	菌种选育和优化技术	17
	实训一	产胞外多糖乳酸菌的分离纯化和自然选育	17
	实训二	产纤维素酶木霉的分离纯化和自然选育	20
	实训三	L-精氨酸产生菌的诱变育种	23
	实训四	产果胶酶黑曲霉的诱变育种	26
	实训五	产蛋白酶菌原生质体育种	29
	实训六	产纤维素酶木霉的原生质体诱变育种	34
	实训七	高产果胶酶黑曲霉基因组改组技术	36
	实训八	产多糖啤酒酵母基因组改组技术	39
	第三单元	培养基配制、灭菌及设计训练	44
	实训一	微生物培养基的配制	44
	实训二	高压灭菌锅的使用训练	49
	实训三	利用正交试验设计优化培养基	52
	第四单元	菌种扩大培养技术	59
	实训一	接种和移种训练	59
	实训二	啤酒酵母的扩大培养	64



实训三 厚层通风制曲培养技术	69
实训四 小曲制作	72
实训五 液体曲的生产	74
第五单元 发酵罐实操实训	77
实训一 液态发酵罐操作训练	80
实训二 固态发酵罐操作训练	84
第六单元 发酵生化参数的检测	91
实训一 比浊法测定发酵液中大肠杆菌浓度	91
实训二 菌体干重的测定	92
实训三 紫外分光光度法定量测定细胞总核酸	93
实训四 发酵液糖度的测定	95
方法一 3,5-二硝基水杨酸比色法	95
方法二 菲林试剂比色法	97
方法三 高效液相色谱法(HPLC)	100
实训五 麦芽糖化力检测	103
实训六 酒精含量的测定	106
方法一 密度瓶法	106
方法二 酒精计法	108
实训七 啤酒酸度的测定	109
实训八 发酵液蛋白质浓度的测定	110
方法一 微量凯氏(Kjeldahl)定氮法	110
方法二 双缩脲反应	114
方法三 Folin-酚试剂法(Lowry法)	115
方法四 考马斯亮蓝法(Bradford法)	118
实训九 发酵液氮含量的测定	120
实训十 氨基酸自动分析仪分析发酵液中的氨基酸	122
实训十一 糖化酶活力的测定	124
实训十二 脂肪酶活力的测定	126



实训十三 碱性蛋白酶活力的测定	129
实训十四 原子吸收分光光度法测发酵液中的微量元素	131
第七单元 发酵工程综合实训案例	135
综合实训一 小型啤酒生产线操作	135
综合实训二 酒精发酵生产	143
综合实训三 食醋发酵生产	146
综合实训四 酸奶发酵生产	150
综合实训五 谷氨酸发酵生产	153
综合实训六 赖氨酸发酵生产	157
综合实训七 柠檬酸发酵生产	160

发酵工程是应用现代工程技术手段，利用微生物等生物催化剂进行高效转化，为人类生产有用的产品，或直接把微生物应用于工业生产过程的一种技术。发酵工程的内容包括菌种选育、培养基的配置、灭菌、种子扩大培养和接种、发酵过程和产品的分离提纯(生物分离工程)等方面。

发酵工程由三部分构成：上游工程、中游工程和下游工程。其中，上游工程包括优良菌株的选育、最佳发酵条件(pH、温度、溶氧和营养组成)的确定以及培养基的准备等；中游工程主要指在最佳发酵条件下，发酵液中大量增殖细胞和生产代谢产物的工艺技术；下游工程

狭义的“发酵”是指生物化学或生理学上的发酵，是微生物在无氧条件下，分解各种有机物产生能量的一种方式。更严格地说，发酵是以有机物作为电子受体的氧化还原产能反应。例如，葡萄糖在无氧条件下被微生物利用，产生酒精并放出二氧化碳，同时获得能量。

广义的“发酵”是指工业上所称的发酵，泛指利用生物细胞制造某些产品或净化环境的过程，包括厌氧培养的生产过程，如酒精、丙酮、丁醇、乳酸等的生产，以及通气(有氧)培养的生产过程，如抗生素、氨基酸和酶制剂等的生产。发酵产品既包括细胞代谢产物，也包括菌体细胞和菌毛。

发酵工程的定义

发酵工程是采用现代工程技术手段，利用微生物等生物催化剂进行高效转化，为人类生产有用的产品，或直接把微生物应用于工业生产过程的一种技术。发酵工程的内容包括菌种选育、培养基的配置、灭菌、种子扩大培养和接种、发酵过程和产品的分离提纯(生物分离工程)等方面。

发酵工程由三部分构成：上游工程、中游工程和下游工程。其中，上游工程包括优良菌株的选育、最佳发酵条件(pH、温度、溶氧和营养组成)的确定以及培养基的准备等；中游工程主要指在最佳发酵条件下，发酵液中大量增殖细胞和生产代谢产物的工艺技术；下游工程

第一单元 发酵工程基本技术

一、发酵工程的基本概念

1. “发酵”一词的来源

发酵现象早已被人们所认识,但了解它的本质却是近 200 年来的事。“发酵”一词的英文单词 fermentation 是从拉丁语 *fervere* 派生而来的,它描述了酵母作用于果汁或麦芽浸出液时产生的现象。在生物化学中,把酵母的无氧呼吸过程称作“发酵”。现在所指的“发酵”早已被赋予了不同的含义。发酵是生命体进行的化学反应和生理变化,是多种多样的生物化学反应,根据生命体本身所具有的遗传信息去不断地分解合成,以取得能量来维持生命活动的过程。发酵产物是指在反应过程中或反应到达终点时所产生的能够调节代谢使之达到平衡的物质。实际上,发酵也是呼吸作用的一种,只不过呼吸作用最终生成二氧化碳和水,而发酵最终获得各种不同的代谢产物。因此,现在对发酵的定义是:通过微生物(或动植物细胞)的生长培养和化学变化,大量产生和积累专门的代谢产物的反应过程。

2. 发酵的定义

狭义的“发酵”是指生物化学或生理学上的发酵,是微生物在无氧条件下,分解各种有机物质产生能量的一种方式。更严格地说,发酵是以有机物作为电子受体的氧化还原产能反应。例如,葡萄糖在无氧条件下被微生物利用,产生酒精并放出二氧化碳,同时获得能量。

广义的“发酵”是指工业上所称的发酵,泛指利用生物细胞制造某些产品或净化环境的过程,包括厌氧培养的生产过程,如酒精、丙酮、丁醇、乳酸等的生产,以及通气(有氧)培养的生产过程,如抗生素、氨基酸和酶制剂等的生产。发酵产品既包括细胞代谢产物,也包括菌体细胞和酶等。

3. 发酵工程的定义

发酵工程是指采用现代工程技术手段,利用微生物等生物细胞进行酶促转化,为人类生产有用的产品,或直接把微生物应用于工业生产过程的一种技术。发酵工程的内容包括菌种选育、培养基的配置、灭菌、种子扩大培养和接种、发酵过程和产品的分离提纯(生物分离工程)等方面。

发酵工程由三部分组成:上游工程、中游工程和下游工程。其中,上游工程包括优良菌株的选育、最适发酵条件(pH、温度、溶氧和营养组成)的确定以及营养物的准备等;中游工程主要指在最适发酵条件下,发酵罐中大量培养细胞和生产代谢产物的工艺技术;下游工程



是指从发酵液中分离和纯化产品的技术,包括固液分离技术(离心分离、过滤分离和沉淀分离等)、细胞破壁技术(超声、高压剪切、渗透压、表面活性剂和溶壁酶等)、蛋白质纯化技术(沉淀法、色谱分离法和超滤法等)以及产品的包装处理技术(真空干燥和冷冻干燥等)。

4. 发酵的特点

发酵和其他化学工业的最大区别在于它是生物体所进行的化学反应,反应体系复杂,涉及的学科多。要想全面掌握发酵工程技术,必须掌握的知识有生物化学、微生物学、化工原理、物理化学、分析化学和应用数学(数理统计)等。其主要特点如下:

(1)一般来说,发酵过程都是在常温常压下进行的生物化学反应,反应安全,要求条件也比较简单。

(2)发酵所用的原料通常以淀粉、糖蜜或其他农副产品为主,只要加入少量的有机氮源和无机氮源就可进行反应。不同类别的微生物可以有选择地利用它所需要的营养。基于这一特性,可以利用工业废水和废物等作为发酵的原料,进行生物资源的改造和更新。

(3)发酵过程是通过生物体的自动调节方式来完成,反应的专一性强,因而可以得到较为单一的代谢产物。

(4)由于生物体本身具有一定的反应机制,因此能够专一性和高度选择性地对某些较为复杂的化合物进行特定部位的氧化、还原等化学转化,也可以产生比较复杂的高分子化合物。

(5)发酵过程中对杂菌污染的防治至关重要。除了必须对设备进行严格消毒处理和空气过滤外,反应还必须在无菌条件下进行。如果污染了杂菌,生产上就会遭到巨大的经济损失,要是感染了噬菌体,发酵就会遭到更大的危害,因此,保持无菌条件是发酵成败的关键。

(6)微生物菌种是发酵的根本因素,通过变异和菌种筛选,可以获得高产的优良菌株,并使生产设备得到充分利用,也可以获得按常规方法难以生产的产品。

(7)工业发酵与其他工业相比,投资少,见效快,且可以取得显著的经济效益。

基于以上特点,工业发酵日益引起人们的重视。和传统发酵工艺相比,现代发酵工程除了具有上述发酵特征外,还有其他优越性。除了使用微生物外,还可以用动植物细胞和酶,也可以用人工构建的“基因工程菌”来进行反应;反应设备也不只是常规的发酵罐,而是以各种各样的生物反应器取而代之,自动化、连续化程度高,使发酵水平在原有基础上有所提高。

5. 发酵的类型

根据发酵的特点和微生物对氧的不同需要分类,可以将发酵分成若干类型。

(1)按发酵原料分类 一般可分为糖类物质发酵、石油发酵及废水发酵等。

(2)按发酵产物分类 一般可分为氨基酸发酵、有机酸发酵、抗生素发酵、酒精发酵和维生素发酵等。

(3)按发酵形式分类 一般可分为固态发酵和深层液体发酵。



的人(4)按发酵工艺流程分类 一般可分为分批发酵、连续发酵和流加发酵。

(5)按发酵过程中对氧的不同需要分类 一般可分为厌氧发酵和通风发酵。

6. 发酵工程的内容

(1)发酵工程的基本内容 发酵工程的基本内容包括以下方面:发酵菌种的选育;繁殖种子和发酵生产所用培养基组分的设定;各种培养基的配置;培养基、发酵罐及其附属设备的灭菌;培养出有活性、适量的纯种,并接种到生产容器中;在最合适的条件下,微生物在发酵罐中生长和发酵;产物萃取和精制;发酵过程中产生的废弃物的处理。

(2)发酵的基本过程 在建立发酵过程以前,首先要分离出产生菌,并改良菌种,使所产生的产物符合工业要求;然后测定微生物培养的需求,设计包括提取过程在内的发酵工厂。发酵生产过程中的基本条件包括:某种适宜的微生物;保证或控制微生物进行代谢的各种条件(培养基组成、温度、溶氧量、pH等);微生物发酵需要的设备;提取菌体或代谢产物;精制产品的方法和设备等。如图 1-1 所示。

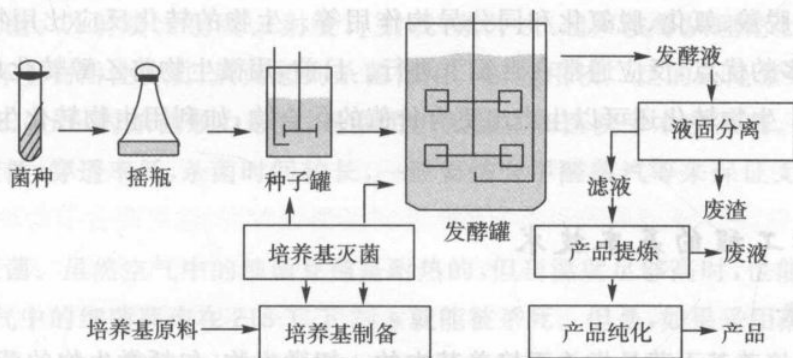


图 1-1 典型的发酵过程示意图

7. 发酵工程的主要产品

工业上的发酵产品主要有 4 个类别。

(1)以菌体为产品 此类产品包括单细胞蛋白(SCP)、藻类、食用菌、人畜防治疾病用的疫苗、生物杀虫剂等。早在 1900 年,面包酵母已经有较大规模的生产。作为人类食物的酵母的生产,则是在第一次世界大战时的德国发展起来的。作为食用蛋白质来源的微生物细胞生产,直到 1960 年才有比较深入的研究。

(2)以微生物的酶为产品 工业上,曾用植物细胞、动物细胞和微生物来生产酶制剂。微生物的酶可以用发酵技术大量生产,这也是其最大的优点。同时,与植物细胞或动物细胞相比,改进微生物的生产能力也方便得多。酶的生产是受到微生物本身的严格控制的。为改进酶的生产能力,可以改变这些控制,如在培养基中加入诱导物,或采用菌株的诱变和筛选技术,消除反馈阻遏作用。

近年来,已获得提纯结晶的酶制剂有上百种。例如,广泛用于食品加工、纤维脱浆、葡萄糖生产的淀粉酶就是一种最常用的酶制剂。其他如可用于澄清果汁、精炼植物纤维的果胶酶,以及在皮革加工、饲料添加剂等方面用途广泛的蛋白酶等,都是工业和医药上十分重要



的酶制剂。此外,还有一些在医疗上作为诊断试剂或分析试剂用的特殊酶制剂,也在深入的研究和广泛的应用中。

(3)以微生物的代谢产物为产品 微生物的生长过程可分为以下几个阶段:菌种被接到培养基中后,并不是立即开始生长,而是需要一个适应时期,这个阶段称为“延缓期”;然后细胞的生长率逐渐增加,逐步达到最大生长率,并成为一常数,这时称为“对数生长期”;接着细胞生长停滞,进入了稳定期;随后活细胞数量下降,细胞进入死亡期。除以动力学描述微生物的生长外,还可以按生长曲线中不同时期所产生的产物来划分时期。在对数生长期中,所产生的产物主要是供给细胞生长的物质,如氨基酸、核苷酸、蛋白质、核酸、脂类和碳水化合物等,这些产物称为“初级代谢产物”;而进入稳定期才大量累积的产物,如抗生素等,则称为“次级代谢产物”。

(4)生物转化过程中的产品 生物细胞或其产生的酶能将一种化合物转化成另一种化学结构相似,但在经济上更有价值的化合物,这就是生物转化。生物转化反应包括脱氢、氧化、羟化、缩合、脱羧、氨化、脱氨化和同分异构作用等。生物的转化反应比用特定的化学试剂反应具有更多的优点,反应通常在常温下进行。目前,用微生物将乙醇转化成乙酸已是成熟的生产方法。生物转化还可以生产出更有价值的化合物,如利用生物转化生产甾体、手性药物、抗生素等。

二、发酵工程的基本技术

1. 灭菌技术

(1)灭菌 培养基灭菌是指杀灭培养基中的一切微生物,包括微生物的营养体和芽孢,或将其从中除去。工业规模的液体培养基灭菌中,杀灭比除去杂菌更为常用。

(2)灭菌与消毒的区别 灭菌是指用物理或化学方法杀死环境中所有微生物(包括营养细胞、细菌芽孢和孢子)的过程。消毒是指用物理或化学方法杀死病原微生物的过程。

(3)灭菌的方法。

①化学法,也称“化学药品灭菌法”。一些化学药剂能使微生物中的蛋白质、酶及核酸发生反应而具有杀菌作用。常见的化学试剂有甲醛、高锰酸钾、次氯酸钠等,一般不用于培养基灭菌,但是染菌后的培养基可以用化学试剂处理。

②物理法,包括干热灭菌法、湿热灭菌法和射线灭菌法。在培养基灭菌和设备管道灭菌时,常使用湿热灭菌法。湿热灭菌的原理是每一种微生物都有一定的最适生长温度范围,当温度超过最高限度时,微生物细胞中的原生质体和酶就会发生不可逆的凝固变性,使微生物在很短的时间内死亡。加热灭菌就是根据微生物的这一特性而进行的。杀死微生物的极限温度称为“致死温度”,在致死温度以上,温度越高,致死时间越短。工厂里通常采用蒸汽(121℃,30~40 min)进行培养基及发酵罐的灭菌。

湿热灭菌具有以下优点:蒸汽容易获得,操作费用低,本身无毒;蒸汽有很强的穿透力,易于灭菌彻底;蒸汽有很大的潜热,操作方便,易于管理。



(4) 发酵罐的空消 发酵罐在加入培养基前应先进行清洗灭菌,即空消。通常用蒸汽先加热发酵罐的夹套或相关的管道,从空气分布管中向发酵罐内通入蒸汽,蒸汽充满整个容器后,再从排气管中缓缓排出。在蒸汽灭菌结束后,一定要立刻通入无菌空气,使容器保持正压,目的是防止形成真空而吸入带菌的空气。

(5) 补料液的灭菌 在发酵过程中,往往要向发酵罐中补入各种料液。这些料液都必须经过灭菌处理。灭菌的方法视料液的性质、体积和补料速率而定。如果补料量较大,且具有连续性时,则采用连续灭菌较为合适。也可利用过滤法对补料液进行除菌。补料液的分批灭菌方法,通常是向盛有物料的容器中直接通入蒸汽。应注意,所有的附属设备和管道都要经过蒸汽灭菌。

(6) 空气除菌技术 由于所用菌种的生长能力、生长速度、产物性质、发酵周期、基质成分及 pH 存在差异,所以不同的发酵过程对空气无菌程度的要求也不同。生物工业生产中对无菌空气的要求是:1000 次使用周期中只允许有一个菌通过,即无菌程度为 $N=10^{-3}$ 。

① 辐射灭菌。X 射线、 α 射线、 β 射线、 γ 射线、紫外线、超声波等从理论上讲都能破坏蛋白质结构,破坏生物活性物质,从而起到杀菌作用。但应用较广泛的还是紫外线,它在波长为 226.5~328.7 nm 时杀菌效力最强,通常用于无菌室和医院手术室灭菌。但紫外线的辐射灭菌效率较低,穿透率低,杀菌时间较长,一般要结合甲醛蒸汽等来保证无菌室达到相应的无菌水平。

② 加热灭菌。虽然空气中的细菌芽孢是耐热的,但当温度足够高时,也能将其破坏。例如,悬浮在空气中的细菌芽孢在 218 °C 下 24 s 就能被杀死。但是,如果采用蒸汽或电热来加热大量空气的方法来达到灭菌的目的,则太不经济。利用空气压缩时产生的热进行灭菌,对于无菌要求不高的发酵来说是一个经济合理的方法。

采用加热灭菌法时,要根据具体情况适当增加一些辅助措施,以确保安全。由于空气的导热系数低,受热很不均匀,同时,在压缩机与发酵罐之间的管道难免有泄漏,这些因素很难排除,因此,通常在发酵罐前装一台空气过滤器。

③ 静电除菌。近年来,一些工厂使用静电除尘器除去空气中的水雾、油雾和尘埃,同时也能除去空气中的微生物。对 1 μm 微粒的去除率达 99%,消耗能量小,每处理 1000 m^3 的空气耗电量为 0.4~0.8 kWh。空气的压力损失小,一般仅为 $(3\sim 15)\times 133.3$ Pa,但对空气设备维护和安全技术措施的要求则较高。静电除菌是利用静电引力来吸附带电粒子,从而达到除尘、除菌的目的。悬浮于空气中的微生物,其孢子大多带有不同的电荷。不带电荷的微粒进入高压静电场时,都会被电离成带电微粒。但对于一些直径很小的微粒,它所带的电荷很小,当产生的引力小于或等于气流对微粒的拖带力或微粒布朗扩散运动的动量时,则微粒就不能被吸附而沉降,所以静电除尘对很小的微粒的去除率较低。

④ 介质过滤。介质过滤是目前发酵工业上最常使用的空气除菌方法。它采用定期灭菌的干燥介质来阻截流过的空气中所含的微生物,从而获得无菌空气。常用的过滤介质有棉花、活性炭、玻璃纤维、有机合成纤维、有机和无机烧结材料等。由于被过滤的空气中微生物



的粒子很小,一般只有 $0.5\sim 2.0\ \mu\text{m}$,而过滤介质材料的孔径一般都大于微粒直径几倍到几十倍,因此,过滤机理比较复杂。随着工业的发展,过滤介质逐渐由天然材料棉花过渡到玻璃纤维、超细玻璃纤维、石棉板、烧结材料(烧结金属、烧结陶瓷和烧结塑料)、微孔超滤膜等。同时,过滤器的形式也在不断发生变化,出现了一些新形式和新结构,可以把发酵工业中的染菌几率控制在极小的范围内。

2. 微生物分离与纯培养技术

(1) 分离操作 在无菌条件下,把微生物由一个培养器皿转接到另一个培养容器进行培养,是微生物学研究中最常用的基本操作。由于打开器皿后可能会被环境中的其他微生物污染,因此,微生物实验的所有操作均应在无菌条件下进行。其要点是在火焰附近进行熟练的无菌操作,或在无菌箱或操作室内的无菌环境中进行操作。操作箱或操作室内的空气可使用紫外灯或化学药剂进行灭菌。有的无菌室依靠通入无菌空气来维持无菌状态。操作中用以挑取和转接微生物材料的接种环和接种针,一般采用易于迅速加热和冷却的镍铬合金等金属制成,使用时先用火焰灼烧灭菌。转移液体培养物一般采用无菌吸管或移液枪。

① 稀释倒平板法。先将待分离的材料用无菌水作一系列的稀释(如 $1:10$ 、 $1:100$ 、 $1:1000$ 、 $1:10000$ ……),然后分别取不同稀释液少许,与已熔化并冷却至 $50\ ^\circ\text{C}$ 左右的琼脂培养基混合,摇匀后,倒入灭过菌的培养皿中。待琼脂凝固后,制成可能含菌的琼脂平板,保温培养一段时间即可长出菌落。如果稀释得当,在平板表面或琼脂培养基中就可出现分散的单个菌落,这个菌落可能就是由一个细菌细胞繁殖形成的。随后挑取单个菌落,或重复以上操作数次,便可得到纯培养物。

② 涂布平板法。由于将含菌材料先加到还较烫的培养基中再倒平板易造成某些热敏感菌的死亡,而且采用稀释倒平板法也会使一些严格好氧菌因被固定在琼脂中间缺乏氧气而影响其生长,因此,在微生物学研究中,更常用的纯种分离方法是涂布平板法。其做法是先将已熔化的培养基倒入无菌平皿,制成无菌平板,冷却凝固后,将一定量的某一稀释度的样品悬液滴加在平板表面,再用无菌玻璃涂棒将菌液均匀地分散至整个平板表面,经培养后挑取单个菌落,或重复以上操作数次,便可得到纯培养物。

③ 平板划线分离法。用接种环以无菌操作方式蘸取少许待分离的材料,在无菌平板表面进行平行划线、扇形划线或其他形式的连续划线。微生物细胞数量将随着划线次数的增加而减少,并逐渐分散开来。如果划线方法适当,微生物能逐一分散,经培养后,可在平板表面得到单菌落。

④ 稀释摇管法。用固体培养基分离严格厌氧菌有其特殊之处。如果该微生物暴露于空气中不立即死亡,可以用常规的方法制备平板,然后放置在封闭的容器中培养,容器中的氧气可采用化学、物理或生物的方法清除。对于那些对氧气更为敏感的厌氧性微生物,纯培养的分离则可采用稀释摇管培养法进行,它是稀释倒平板法的一种变通形式。先将一系列盛有无菌琼脂培养基的试管加热,使琼脂熔化后冷却并保持在 $50\ ^\circ\text{C}$ 左右,将待分离的材料用这



些试管进行梯度稀释,迅速将试管摇动均匀。冷凝后,在琼脂柱表面倾倒一层灭菌液体石蜡和固体石蜡的混合物,将培养基和空气隔开。培养后,菌落形成在琼脂柱的中间。进行单菌落的挑取和移植时,需要先用一根灭菌针将液体石蜡—石蜡盖取出,再用一支毛细管插入琼脂和管壁之间,吹入无菌无氧气体,将琼脂柱吸出,放在培养皿中,用无菌刀将琼脂柱切成薄片,观察移植和菌落。

(2)微生物的保藏技术 通过分离纯化得到的微生物纯培养物,还必须采用各种保藏技术使其在一定时间内不死亡,不会被其他微生物污染,不会因发生变异而丢失重要的生物学性状,否则,就无法真正保证微生物研究和应用工作的顺利进行。微生物菌种是珍贵的自然资源,菌种或培养物保藏是一项重要的微生物学基础工作,具有重要意义。

微生物的生长一般都需要一定的水分、适宜的温度和适量的营养。菌种保藏就是根据菌种特性及保藏目的不同,给微生物菌株以特定的条件,使其存活而得以延续。例如,利用培养基或宿主对微生物菌株进行连续移种,或改变其所处的环境条件,例如干燥、低温、缺氧、避光、缺乏营养等,使菌株的代谢水平降低,甚至完全停止,达到半休眠或完全休眠的状态,而在一定时间内得到保存,有的菌种可保藏几十年或更长时间。在需要时,再通过提供适宜的生长条件使保藏物恢复活力。

①传代培养保藏。传代培养与培养物的直接使用密切相关,是进行微生物保藏的基本方法。常用的有琼脂斜面培养、半固体琼脂柱培养及液体培养等。采用传代法保藏微生物时,应注意针对不同的菌种选择适宜的培养基,并在规定的时间内进行移种,以免菌株接种后不生长或超过时间不能接活,丧失微生物菌种。在琼脂斜面上保藏微生物的时间因菌种的不同而有较大差异,有些可保存数年,而有些仅可保存数周。一般来说,通过降低培养物的代谢或防止培养基干燥,可延长传代保藏的保存时间。例如,当菌株生长良好后,改用橡皮塞封口或在培养基表面覆盖液体石蜡,并放在低温环境保存;将一些菌的菌苔直接刮入蒸馏水或其他缓冲液中,密封并置 4°C 保存,也可以大大提高某些菌种的保藏时间及保藏效果,这种方法有时也被称为“悬液保藏法”。

②冷冻保藏。冷冻保藏是指使微生物处于冷冻状态,使其代谢作用停止,以达到保藏的目的。大多数微生物都能通过冷冻进行保存,细胞体积大者要比体积小者对低温更敏感,而无细胞壁者则比有细胞壁者敏感。其原因是低温会使细胞内的水分形成冰晶,从而引起细胞尤其是细胞膜的损伤。进行冷冻时,适当采取速冻的方法,可使产生的冰晶尽量小,从而减少对细胞的损伤。当从低温环境中移出并开始升温时,冰晶又会会长大,故快速升温也可减少对细胞的损伤。冷冻时使用的介质对细胞的损伤也有显著的影响。

③干燥保藏法。水分对各种生化反应和一切生命活动至关重要。干燥,尤其是深度干燥,是微生物保藏技术中另一种经常采用的方法。

沙土管保藏和冷冻真空干燥保藏是最常用的微生物干燥保藏技术。沙土管保藏主要适用于产孢子的微生物,如芽孢杆菌、放线菌等。一般将菌种接种至斜面,培养至长出大量的孢子后,洗下孢子制备孢子悬液,加入无菌的沙土试管中,减压干燥,最后用石蜡、胶塞等封



闭管口,置冰箱中保存。此法简便易行,并可以将微生物保藏较长时间,适合一般实验室及以放线菌等为菌种的发酵工厂使用。

冷冻真空干燥保藏是将加有保护剂的细胞样品预先冷冻,使其冻结,然后在真空下通过冰的升华作用除去水分。达到干燥状态的样品可在真空或惰性气体的密闭环境中进行低温保存,从而使微生物处于干燥、缺氧及低温环境,生命活动处于休眠状态,可以达到长期保藏的目的。用冰升华的方法除去水分,手段比较温和,细胞受损伤的程度相对较小,存活率及保藏效果均较好,而且经抽真空封闭的菌种安瓿管的保存、邮寄、使用等均很方便。因此,冷冻真空干燥保藏是目前使用最普遍、最重要的微生物保藏方法,大多数专业的菌种保藏机构均将此法作为主要的微生物保存手段。

除上述方法外,微生物菌种保藏的方法还有很多,如纸片保藏、薄膜保藏、寄主保藏等。由于微生物的多样性,不同的微生物往往对不同的保藏方法有不同的适应性,所以,迄今为止,尚没有一种菌种保藏方法能适用于所有的微生物。因此,在具体选择保藏方法时,必须对菌株的特性、保藏物的使用特点及现有条件等进行综合考虑。对于一些比较重要的微生物菌株,则要尽可能采用不同的方法进行保藏,以免因某种方法的失败而导致菌种的丧失。

3. 微生物育种基本技术

微生物育种是运用遗传学原理和技术对某种具有特定生产目的的菌株进行改造,去除不良性质,增加有益新性状,以提高产品的产量和质量的一种育种方法。微生物的育种技术已从常规的突变和筛选技术发展到了基因诱变、基因重组和基因工程等,育种技术的不断成熟,大大提高了微生物的育种效率。但是有时候微生物育种也不是单一地采用某一种方法,有时需要多种方法综合使用。

(1) 常规育种 常规育种是指不经过人工处理,利用微生物的自发突变,从中筛选出具有优良性状菌株的一种育种方法。一般情况下,由于 DNA 的半保留复制以及校正酶系的校正作用和光修复、切除修复、重组修复、诱导修复等作用,发生自然突变的几率特别低,一般为 $10^{-10} \sim 10^{-6}/\text{bp}$,而用于工业生产的菌株的性状往往由单一或少数基因控制,所以常规育种所需时间较长,工作量较大。通过常规育种提高菌种生产能力、筛选高产菌株的效率较低,效果不明显。因此,在生产实践中,常规育种的主要目的是用于纯化、复壮和稳定菌种。

(2) 诱变育种 1927年,Miller发现X射线能诱发果蝇基因突变之后,人们发现其他一些因素也能诱导基因突变,并逐渐弄清了一些诱变因素的机理,为微生物诱变育种提供了前提条件。根据育种需要,有目的地使用诱变因素,可使菌株的基因发生突变,以改良其生产性状。凡能诱发基因突变,并且突变频率远远超过自发突变的物理因子或化学因子称为“诱变剂”。根据诱变剂的不同,可以将诱变育种的方法分为物理因子诱变育种和化学因子诱变育种。前者包括激光、X射线、 γ 射线、快中子等,后者包括烷化剂(如EMS、EI、NMU、DES、MNNG、NTG等)、天然碱基类似物、亚硝酸和氯化锂等。在物理诱变因素中,紫外线相对比较有效、适用和安全,其他几种射线都是电离性质的,具有穿透力,使用时有一定的危险性。



化学诱变剂的突变率通常要比电离辐射的高,并且十分经济,但这些物质大多是致癌剂,使用时必须十分谨慎。目前,多种诱变剂的诱变效果、作用时间和方法都已基本确定,人们可以有目的、有选择地使用各种诱变剂,以达到预期的育种效果。

①物理因子诱变。

a. UV 诱变。所有传统的物理诱变手段中,使用最为普遍的就是紫外线辐照,它是诱发微生物突变的一种非常有用的工具。对于紫外线的诱变作用有很多解释,但研究最清楚的是它可引起 DNA 结构的变化,尤其是可使 DNA 分子形成胸腺嘧啶二聚体,即两个相邻的嘧啶共价连接。二聚体的出现会减弱氢键的作用,引起双键结构变形,就可能影响胸腺嘧啶(T)和腺嘌呤(A)的正常配对,破坏腺嘌呤的正常掺入,复制就在这一点上突然停止或错误地进行。利用紫外诱变的方法可选育出大量产量高、活性强的菌种,该方法因设备简单、诱变效率高、操作安全而被广泛应用。

b. 微波诱变。微波作为一种高能电磁波,能刺激水、蛋白质、核酸、脂肪和碳水化合物等极性分子快速震动,可以使单孢子悬液内 DNA 分子强烈摩擦,胞内 DNA 分子氢键和碱基堆积力受损,使得 DNA 结构发生变化,从而引发遗传变异。微波育种现在研究的很多,成功的例子也很多。该技术操作方便,设备简单,一般用家用微波炉即可,诱变的效果很好。下面以宇佐美曲霉为例,简要介绍一下微生物微波育种的一般操作方法。

取恒温箱内 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下培养 4 d 的菌种斜面,用 0.85% 生理盐水洗下孢子,置于无菌并盛有玻璃珠的三角烧瓶中,在 210 r/min 的旋转式摇床上振荡 5 h。使孢子活化和分散,然后用生理盐水将孢子悬液稀释到 10^6 个/mL,得孢子悬液备用。吸取制得的孢子悬液,注入底部平整的平皿中,每个平皿的悬液量为 10 mL。调微波炉功率为 700 W,按不同的处理时间,对孢子悬液进行辐照处理。然后分别从每个平皿中取出 0.1 mL 菌悬液进行适当稀释,得到不同稀释度的菌悬液。取菌悬液 0.3 mL,涂布在分离培养基平板上。然后置于 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温箱培养 3 d,对活菌计数,计算致死率。以分离平板上透明圈直径和菌落直径的比值作为初筛标志,挑取比值大的菌落,在斜面上传代 3 次,然后进行摇瓶发酵复筛。

②化学因子诱变。常用化学诱变剂包括碱基类似物、烷化剂、移码诱变剂以及其他类诱变剂,如亚硝酸及其盐类和部分金属化合物。作为化学诱变剂的碱基类似物主要有嘧啶类类似物和嘌呤类类似物两大类。其中,常用嘧啶类类似物有 5-溴尿嘧啶(5-BU)、5-氟尿嘧啶(5-FU)、6-氮杂尿嘧啶(6-NU)等;嘌呤类类似物有 2-氨基嘌呤(2-AP)、6-巯基嘌呤(6-MP)、8-氮鸟嘌呤等。烷化剂类化学诱变剂种类较多,如硫芥(氮芥)类、环氧衍生物类、乙撑亚胺类、硫酸(磺酸)酯类、重氮烷类等。其中,亚硝基脲、亚硝基胍、硫酸二乙酯、甲基磺酸甲酯、甲基磺酸乙酯等较为常用。移码诱变剂是指能够引起 DNA 分子中组成遗传密码的碱基发生移位复制,致使遗传密码发生相应碱基位移重组的一类化学诱变物质,主要为吡啶类杂环化合物,常用的有吡啶橙和原黄素 2 种。

化学诱变的方法有单一诱变和复合诱变。单一诱变是指在菌株选育中用一种诱变因子致突变的育种实验方法。在化学诱变育种研究中,当仅用一种诱变剂就能达到所需选育目