

第一章 绪 论

生物技术（又称生物工艺学，biotechnology）被世界各国视为一项高新技术，它对于提高国力，迎接人类所面临的食物短缺、健康及经济问题的挑战至关重要，许多国家都将生物技术确定为增强国力和经济发展的关键技术之一。生物技术是解决全球性经济问题的关键技术。在迎接人口、资源、能源、食物和环境等五大危机的挑战中将大显身手。生物技术广泛应用于医药卫生、农林牧渔、轻工食品、化工和能源等领域，促进传统产业的技术改造和新兴产业的形成，对人类社会生活将产生深远的影响。生物技术是 21 世纪高新技术革命的核心内容，生物技术产业将是 21 世纪的支柱产业。在世界各国普遍重视高科技发展的今天，生物技术对经济建设和社会进步的深远影响，已越来越被人们所认识。

生物技术是一个高度跨学科与跨行业的领域，从不同的学科和行业去理解生物技术，难免带有不同侧重点，因为生物技术涉及多种学科和多个行业。从而强调准确理解生物技术就显得十分必要。生物技术有时也称生物工程（bioengineering），是指“应用自然科学及工程学的原理，依靠生物催化剂（biocatalyst）的作用，将物料进行加工以提供产品或为社会服务”的技术。生物技术的依据和出发点是生物有机体本身的各种机能，是各类生物在生长、发育与繁殖过程中进行物质合成、降解和转化的能力。一切类型生物的各式各样的生物化学反应又受细胞产生的各种各样的酶所催化，而各类酶的特异结构与功能又受特定的遗传基因所决定。

生物技术是以现代生命科学为基础，结合基因工程、细胞工程技术手段和其他基础科学的科学原理，按照预先设计获得优良品质的动物、植物或微生物以及加工生物原料，为人类生产出所需要的产品，包括粮食、医药、化工原料、能源、金属等各种产品，达到预防、诊断、治疗疾病和检测、治理环境的目的。

生物技术的渊源可以追溯到公元前酿造技术。这种原始的技术一直持续 2000 多年，直到法国微生物学家巴斯德揭示了发酵原理，从而为发酵技术的发展提供了理论基础。20 世纪初，出现了化工原料丙酮丁醇的发酵生产。20 世纪 50 年代在抗生素工业的带动下，发酵技术和酶技术被广泛应用于各种产业部门。20 世纪 70 年代初，分子生物学的某些突破使人们能够分离基因，并在体外进行重组，从而迎来了生物技术的新时代。

一、国内外生物技术产业的发展现状

随着分子生物学的突破而诞生的基因（gene）操作技术、细胞融合技术（cell fusion technology）等赋予了生物技术新的生命力，引起了科技界和企业界的高度重视并给予巨额投入。从世界范围的发展情况来看，生物技术已成为发达国家科技竞争的热点，美国、日本、欧洲等主要发达国家和地区竞相开展生物技术的研究和开发工作，许多国家纷纷建立了独立的政府机构，成立了一系列的生物技术研究组织，制定了近期即 2010 年或 2020 年的中长期发展规划，在政策、资金上给予大力支持。同时这些国家的企业界也纷纷投入巨资进行生物技术的开发研究，取得了一系列重大成果，从而使生物技术产业化得到迅速发展。成功开发了诸如促红细胞生成素（EPO）、粒细胞集落刺激因子（G-CSF）等一批基因工程药物，占领了世界市场，取得了巨大的经济效益，使得这些国家在世界生物技术产业化方面占有绝对的优势。

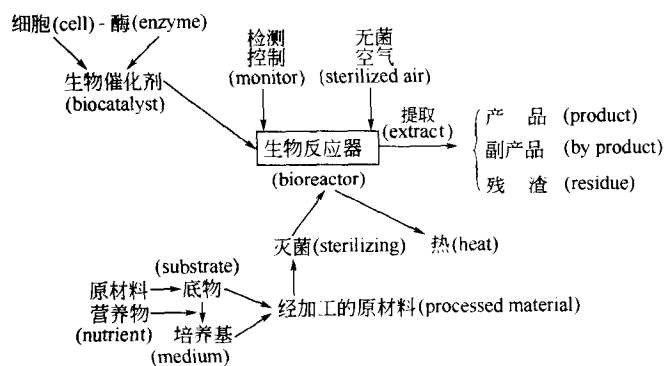
中国是最早利用生物技术的国家之一。最近十年来生物技术产业得到了迅速发展，已经成为世界发酵产品市场的重要竞争者，多种发酵产品的产量和出口剧增。柠檬酸（citric acid）的生产工艺、技术已进入世界先进行列，产量居世界首位；谷氨酸（Glu）和赖氨酸（Lys）的生产工艺和技术水平及产量也有一定优势。与此同时，现代生物技术的研究和开发也取得了丰硕的成果，中国首创的两系杂交水稻已推广种植 200km²（200 万亩），平均单产提高 10% 以上；植物转基因技术取得成功；重组联合共生固氮菌、防病工程菌开始大面积田间实验；试管牛羊、转基因鱼已进入中间试验，动物生物反应器取得了可喜进展；已有四种基因工程药物获准投放市场；抗体工程已取得多项成果并开始在临床上应用；某些基因治疗达到了国际水平；人胰岛素、人尿激酶、葡萄糖异构酶、凝乳酶的蛋白质工程已达到世界水平。但从总体上看，无论是对传统生物技术产业的改造或是对现代生物技术的研发及产业化，我国都还处于起步阶段，与发达国家相比还存在一定的差距。

生物技术的产生和发展涉及许多学科，包括生物化学、分子生物学、细胞生物学、遗传学、微生物学、动物学、植物学、化学与化学工程学、应用物理学、电子学以及计算机科学等基础和应用学科。现代生物技术虽来源于原始的、传统的生物生产技术，但它们之间在内容和手段上均有质的区别。现代生物技术能够带来的好处是十分巨大的，正在或即将使人们的某些梦想和希望变为现实。当前，生物技术已在医药和化工等领域中崭露头角，一批生物工程药物，如人生长激素（growth hormone）、胰岛素（insulin）、干扰素（interferon）和各类细胞生长因子与调节因子等已陆续投放市场。

近年来，人们逐渐认识到现代生物技术的发展越来越离不开诸如化学工程等工程技术学科。在生物技术与现代化工程技术相结合的基础上发展起来的新型工程技术——生物化工技术，不仅为传统发酵工业、传统医药工业的改造及新兴的生物技术工业提供了高效率的生物反应器、新型分离技术和介质以及现代的工程装备技术，还提供了生产设备单元化、工艺过程最优化、在线控制自动化、系统综合设计等工程概念与技术以及用于生物过程优化控制的基础理论。生物化工技术在生物技术产业化方面起着重要的作用，使生物技术的应用范围更加广泛，下游技术不断更新，同时大大提高了生物技术产品的产量和质量。生物化学工程技术已成为生物技术产业化的桥梁和瓶颈。其生产过程和工艺的研究已成为加速生物技术产业化的一个重要方面。

二、生物反应过程的特点

生物反应过程的实质就是利用生物催化剂从事生物技术产品的生产过程。一般生物反应过程示意图如下。



可见，通常的生物反应过程由四个部分组成。

(1) 原料的预处理及培养基的制备发酵原料是很丰富的，如薯类、谷类等，但许多工业微生物都不能直接利用这些原料，通常需要将它们进行粉碎、蒸煮、水解成葡萄糖以供给微生物利用。还可以利用废糖蜜、工农业的下脚料等，根据不同微生物和发酵产品的类型调配一定成分的培养基。在发酵前将培养基装入发酵罐中，通入 98kPa 的蒸汽高温灭菌，冷却后，在无菌条件下接入菌种。在发酵过程中要绝对保证无杂菌，即没有目标微生物以外的微生物存在，这是发酵成功与否的关键。

(2) 生物催化剂的制备发酵过程中，首先应在传统诱变育种或用现代生物技术的手段进行菌种改造的基础上，选择高产、稳产、培养要求不甚苛刻的菌种。发酵前必须经过多次扩大培养达到足够数量和一定质量后即作为种子接种至发酵罐中，满足大罐发酵的要求。如果是酶反应过程，则需选择一定量的活力强的酶制剂。

(3) 生物反应器及反应条件的选择由于使用的生物类型不同，其代谢规律不一样，因而有厌氧发酵和好氧发酵两种方式。厌氧发酵亦称静置发酵，如酒精 (alcohol)、啤酒 (beer)、丙酮 (acetone) 丁醇 (butanol) 及乳酸 (lactic acid) 等，发酵过程不需供氧，设备和工艺都较好氧发酵简单。好氧发酵过程中需要消耗大量的氧气，因此需要通入无菌空气，以供代谢需要，如氨基酸、抗生素、赤霉素等的生产都属此类。不管是好氧发酵还是厌氧发酵，均应根据菌种的特点、代谢规律和产品的特点，选择合适的发酵条件。

(4) 产品的分离与纯化分离与纯化是从发酵液中提取符合质量指标的制品。应根据产品的类型、特点选择合适的下游技术 (down stream processing) 的组合。采用吸附法、溶媒萃取法、离子交换法、沉淀法或蒸馏法、双水相萃取法、色谱法等，提取、分离和纯化产品，得到符合要求的目标产品。

不管是微生物培养，还是动植物细胞培养、污水的生化处理以及从天然物质中应用生物技术提取有效成分均为生物反应过程。如果过程使用的生物催化剂是酶，通常叫酶反应过程。如果是生物细胞，则叫做发酵过程。生物反应过程的特点简述如下。

生产过程通常在常温下进行，操作条件温和，不需考虑防爆问题，一种设备具有多种用途。原料以碳水化合物为主，不含有毒物质。

生产反应过程是以生命体的自动调节方式进行的，多个反应像一个反应一样，可在单一设备中进行。

能容易进行复杂的高分子化合物的生产，如酶、光学活性体等。

能够高度选择性地进行复杂化合物在特定部位的反应，如氧化、还原、官能团的导入等。

生产产品的生物体本身也是产物，富含维生素、蛋白质、酶等；除特殊情况外，培养液一般不会对人和动物造成危害。

⑥ 生产过程中需要注意防止杂菌污染，尤其是噬菌体的侵入，以免造成很大的危害。

⑦ 通过改良生物体生产性能，可在不增加设备投资的条件下，利用原有的生产设备使生产能力飞跃上升。

实际生产中，可以通过改进工艺和改善设备的研究，在很大程度上改善产品的质量，提高生产效益。随着生物技术的发展，对生产过程提出了更高的要求，使工艺的研究和优化变得更加重要。

三、生物工艺过程的共性

虽然各种生物生产过程不完全相同，但都有相同之处，各种生物过程的共性如下。

如何选择作为培养基成分的碳源、氮源、微量元素及生长因子等，并确定培养基中各成分的含量及比例。

如何合理确定发酵级数，各级的培养条件、过程控制的参数以及种子培养系统与生产过程合理配套；保证细胞正常生长和所需产物的形成，以最低的消耗获得最大的得率。

如何防止生产过程的杂菌污染，保证生产过程正常进行。

如何选择合适的产品提取、分离、纯化工艺，使之高效率、低成本地从细胞或培养液中得到所需产品。

四、微生物工业产品类型

1. 微生物菌体的发酵

这是以获得具有多种用途的微生物菌体细胞为目的产品的发酵工业。传统的菌体发酵工业包括面包制作、菌体蛋白（人类或动物）食品。现代的菌体发酵包括药用真菌有香菇类，冬虫夏草，与天麻共生的密环菌，以及从多孔菌科的茯苓菌获得名贵中药茯苓和从担子菌获得灵芝等药用菌。生物防治剂如苏云金杆菌、蜡样芽孢杆菌，其细胞中的伴孢晶体（parasporal inclusions）可杀死鳞翅目、双翅目的害虫；丝状真菌的白僵菌、绿僵菌可防治松毛虫，制成新型的微生物杀虫剂。活性乳酸菌制剂，用于改善人体肠道微生态环境，这也是一种菌体的直接利用。

这类产品发酵的特点是细胞的生长与产物的积累成平行关系，生长速率最大的时期也是产物合成速率最高阶段，生长稳定期细胞物质浓度最大，同时也是产量最高的收获时期。

2. 微生物酶发酵

酶（enzyme）普遍存在于动物、植物和微生物细胞中。酶的最初来源是从动植物组织中提取，但目前工业应用的酶大多来自微生物发酵。从19世纪日本学者利用米曲霉制造淀粉酶以来，利用发酵法生产制备并提取微生物生产的各种酶，已是当今发酵工业的重要组成部分。微生物种类多、产酶品种多、生产容易、成本低。

微生物酶制剂有广泛的应用。在食品和轻工行业中，如用于生产葡萄糖的淀粉酶（amylase）和糖化酶（saccharifying enzyme）；用于DL氨基酸的光学拆分的氨基酰化酶（amino acylase）酶也用于医药生产和医疗检测中，如胆固醇氧化酶（cholesterol oxidase）用于检测血清中胆固醇（cholesterol）的含量，葡萄糖氧化酶（glucose oxidase）用于检测血液中葡萄糖的含量等。另外还有纤维素酶（cellulase）、蛋白酶（proteinase）、果胶酶（pectinase）、脂酶（lipase）、过氧化氢酶（catalase）、药用酶（pharmaceuticals enzyme）等。

这里所说的酶大部分是利用微生物生产的菌体胞内酶（endoenzyme）和菌体胞外酶（exoenzyme）并用现代生物技术的方法提取得到的酶纯品，称酶制剂（enzyme preparation）以供各行业使用。

3. 微生物代谢产物发酵生产

以微生物代谢产物作为产品是发酵工业中种类最多，也是最重要的部分。这类产品可分为两类。初级代谢物（primary metabolite），如氨基酸、核苷酸、蛋白质、核酸等，它们是菌体生长所必需的，是在对数生长期所产生的物质，受许多调节机制的控制。许多初级代谢产物在经济上有相当的重要性。次级代谢产物（secondary metabolite），如抗生素、生物碱、细菌素、植物生长因子（plant growth factor）等，这些产物与菌体的生长繁殖无明显关

系，是菌体在生长的稳定期合成的具有特定功能的产物，也受许多调节机制的控制，如诱导调节、分解代谢产物阻遏等。

由于抗生素不仅具有广泛的抗菌作用，而且还有抗病毒、抗癌、镇咳等其他生理活性，因而得到了大力发展，已成为发酵工业的重要组成部分。

4. 微生物的生物转化

微生物的生物转化作用是利用微生物细胞的一种或多种酶，作用于一些化合物的特定部位（基因），使它转变成结构相类似但具有更大经济价值的化合物的生化反应。

生物转化的最终产物并不是微生物细胞利用营养物质经细胞代谢产生，而是微生物细胞的酶或酶系作用于底物某一部位，进行特定部位化学反应而形成。细胞的作用仅仅相当于生物催化剂，反应最显著的特点是特异性强，包括反应特异性、结构位置特异性和立体特异性。生物工业中最重要的生物转化是甾体转化。

5. 微生物特殊机能的利用

利用微生物消除环境污染；

利用微生物发酵保持生态平衡；

利用微生物进行金属的浸沥回收；

利用基因工程菌株开拓发酵工程新领域。

五、生物工艺发展简史

1. 传统生物技术的追溯

酿酒制醋是人类最早通过实践所掌握的生物技术之一。在西方，苏美尔人和巴比伦人公元前 6000 年会制作啤酒，考古发掘证实中国在龙山文化（距今 4000~4200 年）已有酒器出现。公元前 221 年，中国人民已经懂得制酱、酿醋、制作豆腐。除食物外，人类祖先必须面对的另一项严酷挑战就是与疾病作斗争。公元 10 世纪，中国就有预防天花的活疫苗。属于古老的生物技术产品的实例还有酱油（sauce）、泡菜（pickled vegetables）、奶酒（milk liquor）、干酪（cheese）制作以及面团发酵（dough fermentation）、粪便（excrement and urine）和秸秆（straw）的沤制等。

2. 初期出现的生物技术产品

1680 年，荷兰人 Leenvenhoek 制成显微镜，首先观察到了微生物（microbe）。19 世纪 60 年代，法国科学家 L. Pasteur 首先证实酒精发酵是由酵母菌引起的，其他不同的发酵产物是由不同的微生物作用而形成的，由此建立了纯种培养技术。

1897 年，德国人 Buchner 进一步发现磨碎的酵母仍能使糖发酵而形成酒精，并将此具有发酵能力的物质称为酶。这样发酵现象的真相才真正被人们了解。19 世纪末到 20 世纪 20~30 年代，发酵工业过程陆续出现，这时期的发酵产品有丙酮丁醇（acetone-butanol）、乳酸（lactic acid）、酒精（alcohol）、面包酵母（bread yeast）、柠檬酸（citric acid）、淀粉酶（amylase）、蛋白酶（proteinase）等。这些产品大多是嫌气发酵（anaerobic fermentation）过程的产物，产物的化学结构比起原料来更为简单，属于初级代谢产物（primary metabolite）。

3. 近代生物技术产品

近代生物技术产品出现于 20 世纪 40 年代，是以抗生素的生产为标志。最初采用表面培养法（surface cultures）生产，以麸皮（wheat bran）为培养基（medium），发酵效价单位（fermentation titer unit）约为 40U/mL，纯度 20%，收率 30%。1943 年，美英科学家研究出 5m³ 的机械通风发酵罐，进行深层通风发酵（submerged fermentation），发酵效价单位提

高到 200U/mL，纯度 60%，收率 75%。不久其他抗生素（antibiotic）如链霉素（streptomycin）、新霉素（neomycin）相继问世。抗生素生产的经验有力地促进了其他发酵产品的发展，最突出的就是 50 年代氨基酸（amino acid）发酵工业和 60 年代酶制剂（enzyme preparation）工业、有机酸（organic acid）工业的发展。这个时期产品种类多，既有初级产物又有次级产物（secondary metabolite）如抗生素、多糖（polysaccharide）等，还有生物转化，酶反应等。大多为好气发酵（aerobic fermentation），规模大，技术要求高。

4. 现代生物技术产品

现代生物技术产品的特点是运用了现代生物技术——DNA 重组技术（recombinant DNA technology）和原生质体融合技术（protoplast fusion）等的成果进行生产的产品。

1953 年，美国人 J. Watson 和英国人 F. Crick 在《Nature》杂志上发表“核酸的分子结构”一文，阐明了 DNA 的双螺旋（double-helices）结构。1973 年，美国的 S. Cohen 领导小组开创了体外重组 DNA 并成功转化大肠杆菌的先河。由于 DNA 双螺旋结构的发现和实验室中基因转移的实现，使人们有可能按人类意志设计出新的生命体。基因工程就是按人类的意志将外源（目标）基因（特定的 DNA 片段）在体外与载体 DNA（质粒、噬菌体等）嵌合后导入宿主细胞，使之形成能复制和表达外源基因的克隆（clone），这样，我们就可以通过这些重组体的培养而“借腹怀胎”地获得所需要的目标产品。1975 年英国的 Kohler 及 Milstein 发明了杂交瘤技术，他们用淋巴细胞（来自脾脏，能产生抗体）与骨髓瘤细胞（能在体外无限繁殖）用原生质体融合（protoplast fusion）技术进行细胞融合而获得在体外培养能产生单一抗体的杂交细胞——特称杂交瘤细胞，其产品是单克隆抗体（monoclonal antibody），可用作临床诊断试剂或生化治疗剂。

1969 年，日本首先将固定化酶（immobilization of enzyme）用于 DL-氨基酸的光学拆分。目前，最多的是用固定化异构酶（immobilization of isomerase）生产果葡糖浆（fructose-glucose syrup）和固定化酰化酶（immobilization of acylase）生产 6-氨基青霉烷酸（6-amino penicillanic acid）。固定化酶在临床诊断和治疗上有一定的用途。也可用于生物传感器（biosensor）以测定酶的底物浓度。

1977 年，波依耳首先用基因操作（gene manipulation）手段获得了生长激素抑制因子（growth hormone inhibitor）的克隆。1978 年，吉尔勃脱（Gilbert）接着获得了鼠胰岛素（mouse insulin）的克隆。1982 年，第一个基因工程产品——利用重组体微生物生产的人胰岛素（human insulin）终于问世了。

现代生物技术给生物反应过程赋予新的生命力，但从培养液中将目标产物提取出来并加以纯化，并非易事。因为目标产物浓度低，有时还包含在细胞中。另外在重组菌的培养中，为了获得重组菌体，往往采用高密度培养。但实际中，通过研究高密度培养的工艺条件，获得高浓度的菌体，却得不到高浓度的目标产物。因为重组菌存在不稳定性，导入的嵌有外源基因的质粒容易从宿主细胞内脱落而使外源基因不表达。因此，除了在 DNA 重组过程中本身设法提高其在宿主内的稳定性以增加表达量外，还需要研究提高稳定性的培养工艺条件。

植物细胞大规模培养历史早于动物细胞，利用植物细胞培养可以生产某些珍贵的植物次生代谢产物，如生物碱、甙体化合物等，这也是属于现代生物技术范围内的产品。

现代生物技术产品虽然种类不多，但价值很大，社会效益巨大，是方兴未艾的高新技术产业。今后现代生物技术产品将不但用来生产一些贵重或有特殊功效的药物，在农业和化工

原料的应用开发中显示巨大的潜力，另外用现代生物技术对传统的发酵工业进行改造也有很大潜力。

六、生物工艺原理课程的内容和任务

生物工艺原理是一门以生物代谢过程和对代谢过程的控制，获得生物产品共性原理为研究对象的学科。探讨生物产品生产过程中的共性为目的，从工艺角度阐明细胞的生长和代谢产物与细胞的培养条件之间的相互关系，为生产过程的优化提供理论依据。

课程内容包括工业微生物菌种的选育与种子培养、发酵，培养基的配制，培养基和空气的灭菌，发酵的机理，生物反应动力学，生产过程的检测与控制，发酵生产染菌及防治，固定化酶和固定化细胞及应用，动植物细胞大规模培养等内容。

课程的任务使学生在已学过微生物学、生物化学、化工原理等课程的基础上，深入理解生产过程的工艺原理，进一步深化和提高所学的基本知识，从而使学生具有选育新菌种，探求新工艺、新设备和从事生物产品研发的能力。并能够应用基本理论去分析和解决生产过程中的具体问题，改造原有不合理的生产过程，使之更符合客观规律。

第二章 生物工业菌种与种子的扩大培养

第一节 工业生产常用的微生物及要求

微生物的资源非常丰富，广泛分布于土壤、水和空气中，尤以土壤中最多。有的微生物从自然界中分离出来就能被利用，有的需要对分离到的野生菌株进行人工诱变，得到突变株才能被利用。当前发酵工业所用的菌种总趋势是从野生菌转向变异菌，自然选育转向代谢育种，从诱发基因突变转向基因重组的定向育种。由于发酵工程本身的发展以及遗传工程的介入，藻类、病毒等也正在逐步地变为工业生产用的微生物。尽管如此，目前人们对微生物的认识还是十分不够的。已经初步研究的不超过自然界微生物总量的 10% 左右。微生物的代谢产物据统计已超过一千三百多种，而大规模生产的不过一百多种；微生物酶有近千种，而工业利用的不过四五十种。可见潜力是很大的。

微生物的特点是种类多，分布广；生长迅速，繁殖速度快；代谢能力强；适应性强，容易培养。工业生产中，也可根据微生物的特点选择适宜的微生物。

一、工业生产常用的微生物

1. 细菌

细菌 (bacteria) 是自然界分布最广、数量最多的 类微生物，属单细胞原核生物，以较典型的二分分裂方式繁殖。细胞生长时，环状 DNA 染色体复制，细胞内的蛋白质等组分同时增加一倍，然后在细胞中部产生一横段间隔，染色体分开，继而间隔分裂形成两个相同的子细胞。如间隔不完全分裂就形成链状细胞。

工业生产常用的细菌有：枯草芽孢杆菌、醋酸杆菌、棒状杆菌、短杆菌等。用于生产淀粉酶、乳酸、醋酸、氨基酸和肌苷酸等等。

2. 酵母菌

酵母菌 (yeast) 为单细胞真核生物，在自然界中普遍存在，主要分布于含糖较多的酸性环境中，如水果、蔬菜、花蜜和植物叶子上，以及果园土壤中。石油酵母较多地分布在油田周围的土壤中。酵母菌多为腐生，常以单个细胞存在，以发芽形式进行繁殖，母细胞体积长到一定程度时就开始发芽。芽长大的同时母细胞缩小，在母子细胞间形成隔膜，最后形成同样大小的母细胞，如果子芽不与母细胞脱离就形成链状细胞，称为假菌丝。在发酵生产旺期，常出现假菌丝。

工业上用的酵母菌有：啤酒酵母、假丝酵母、类酵母等。分别用于酿酒、制造面包、生产脂肪酶 (lipase) 以及生产可食用、药用和饲料用酵母菌体蛋白等。

3. 霉菌

霉菌 (mould) 不是一个分类学上的名词。凡生长在营养基质上形成绒毛状、网状或絮状菌丝的真菌统称为霉菌。霉菌在自然界分布很广，大量存在于土壤、空气、水和生物体内等处。它喜欢偏酸性环境，大多数为好氧性，多腐生，少数寄生。霉菌的繁殖能力很强，它以无性孢子和有性孢子进行繁殖，多以无性孢子繁殖为主。其生长方式是菌丝末端的伸长

和顶端分支，彼此交错呈网状。菌丝的长度既受遗传性的控制，又受环境的影响，其分支数量取决于环境条件。菌丝或呈分散生长，或呈菌丝团状生长。

工业上常用的霉菌有：藻状菌纲的根霉、毛霉、犁头霉，子囊菌纲的红曲霉，半知菌类的曲霉、青霉等。它们可用于生产多种酶制剂、抗生素、有机酸及甾体激素（steroid hormone）等。

4. 放线菌

放线菌（actinomycetes）因菌落呈防线状而得名。它是一个原核生物类群，在自然界中分布很广，尤其在含有机质丰富的微碱性土壤中较广。大多腐生，少数寄生。放线菌主要以无性孢子进行繁殖，也可借菌丝片段进行繁殖。后一种繁殖方式见于液体沉没培养中。其生长方式是菌丝末端伸长和分支，彼此交错成网状结构，成为菌丝体。菌丝长度既受遗传性的控制，又与环境相关。在液体沉没培养中由于搅拌器的剪应力作用，常常形成短的分支旺盛的菌丝体，或呈分散生长，或呈菌丝团状生长。它的最大经济价值在于能产生多种抗生素（antibiotic）。从微生物中发现的抗生素，有60%以上是放线菌产生的，如链霉素、红霉素、金霉素、庆大霉素等。常用的放线菌主要来自以下几个属：链霉菌属、小单孢菌属和诺卡菌属等。

5. 担子菌

所谓担子菌（basidiomycetes）就是人们通常所说的菇类（mushroom）微生物。担子菌资源的利用正引起人们的重视，如多糖、橡胶物质和抗癌药物的开发。近几年来，日本、美国的一些科学家对香菇的抗癌作用进行了深入的研究，发现香菇中1,2-β-葡萄糖苷酶及两种糖类物质具有抗癌作用。

6. 藻类

藻类（alga）是自然界分布极广的一类自养微生物资源，许多国家已把它用作人类保健食品和饲料。培养螺旋藻，按干重计算每公顷（1ha = 10⁴m²）可收获60t，而种植大豆每公顷才可收获4t；从蛋白质产率来看，螺旋藻是大豆的28倍。培养珊列藻，从蛋白质产率计算，每公顷珊列藻所得蛋白质是小麦的20~35倍。此外，还可通过藻类将CO₂转变为石油，培养单胞藻或其他藻类而获得的石油，可占细胞干重的5%~50%，合成的油与重油相同，加工后可转变为汽油、煤油和其他产品。有的国家已建立培植单胞藻的农场，每年每公顷地，培植的单胞藻按5%干物质为碳水化合物（石油）计算，可得60t石油燃料。此项技术的应用，还可减轻因工业生产而大量排放CO₂造成的温室效应。国外还有人从“藻类农场”获取氢能的报道，大量培养藻类，利用其光合放氢来获取氢能。

二、微生物工业对菌种的要求

目前，随着微生物工业原料的转换和新产品的不断出现，势必要求开拓更多新品种。尽管微生物工业用的菌种多种多样，但作为大规模生产，对菌种则有下列要求。

原料廉价、生长迅速、目的产物产量高。

易于控制培养条件，酶活性高，发酵周期较短。

抗杂菌和噬菌体的能力强。

菌种遗传性能稳定，不易变异和退化，不产生任何有害的生物活性物质和毒素，保证安全生产。

第二节 工业微生物菌种的衰退、复壮与保藏

一、微生物菌种的衰退

1. 菌种衰退的原因

菌种衰退的原因有两个方面：一是菌种保藏不妥；二是菌种生长的条件要求没有得到满足，或是遇到不利的条件，或是失去某些需要的条件。此外还有经诱变得来的新菌株发生回复突变，从而丧失新的特征等情况。

菌种的退化会使微生物个体和群体特征的各个方面发生变化，其中最重要的是使所需产物的生产产量下降、营养物质代谢和生长繁殖能力下降、发酵周期延长、抗不良环境条件的性能减弱等。菌种的退化不同于培养过程中由环境条件变化引起的表面的、暂时的变化，而是由个别、少数菌体细胞衰退后逐渐导致整个菌株退化的一个从量变到质变的遗传变异过程。

菌种连续传代是菌种发生退化的直接原因。由于连续传代使培养物经常处于旺盛的生长状态，且每次传代时营养和环境等培养条件都是在不断地变化，与处于休眠状态的培养物相比，细胞的自发突变率要高得多。因此，菌株经过连续传代后，含突变基因的个体在数量上逐渐占优势，退化现象就逐渐显露出来。培养基灭菌、降温的不同，培养基存放时间的不同，采用老龄菌和多核菌丝传代等都比较容易引起菌种退化。

菌种的保藏主要是通过控制低温、干燥、缺氧等条件，使微生物营养体或休眠体处于不活泼的状态，维持最低代谢水平，尽可能保证活力和不发生变异。但是，各种菌种的保藏法对阻止菌种变异的效果不尽相同，用效果较差的条件保藏菌种时，菌种就较易发生退化。此外，保藏操作不当也会影响保藏效果，会影响到菌种的变异。

菌种自身突变引起菌种退化。菌种的自发突变和回复突变是引起菌种自身退化的主要原因。微生物细胞在每一世代中的突变概率一般为 10^{-8} — 10^{-9} ，保藏在 0~4 时这一突变概率更小，但仍然不能排除菌种退化的可能。诸如对营养缺陷型菌种未充足供给所需营养物，菌种就会发生突变而丧失已有的特性。

菌种的回复突变是指变异菌株因遗传组成的自身修复，使原有的遗传障碍解除，代谢途径发生变化，从而恢复原有的特性，表现出原育种过程中已获得的优良性状的退化。

突变不完全造成菌体遗传组成的差异。对于单核细胞的菌株，菌体内的 DNA 双链中仅有一条链发生位点突变，并复制成变异菌的 DNA 链，而未发生变化的一条链，复制成原菌的 DNA 链，结果形成不纯的菌落，经移植后表现出菌种的退化现象。同样，对于具有两个核以上细胞的菌株，如果只有一个或几个核发生变异，将会产生异核菌丝，不纯的异核菌丝分裂，便会形成性状不同的菌丝，而一旦性状不同的菌丝占优势，就将表现出菌株的退化，而不再具有优良的性状。

如果菌落不是由一个孢子或一个细胞形成，当其中只有一个高产突变的孢子或细胞，通过移植后，高产菌株数量就比较少，表现出菌种退化。

2. 菌种性能的改变

(1) 菌种遗传特性的改变从菌种遗传机理这一微观角度来看，菌种遗传特性的改变主要有如下三个原因。①异核现象导致微生物群体发生变异。某些菌丝生长时会和邻近的菌丝细胞间发生吻合，形成异核菌丝体（简称异核体），即在一条菌丝里含有几个遗传特性不同

的细胞核，共同生活在均一的细胞质里。异核体可以由遗传性不同的菌丝吻合后形成，也可由多核菌丝中个别核发生突变而产生。异核体所产生的单核或多核的孢子具有不同的遗传特性和不同的生长繁殖速度，其结果是伴随着菌种传代培养，菌种的遗传特性发生改变。在菌种选育过程中，许多从培养基中新分离出来的丝状菌是异核体。在抗生素生产中，从产生单核分生孢子的异核体进行单孢子自然分离，可以得到同核的单菌落，其中很多表现出稳定的生产能力。②自发突变导致菌种遗传特性改变。由于DNA在复制过程中会出现偶然的差错，以及环境中某些物质和某些微生物自身的代谢产物对微生物有刺激作用，菌种以很低的频率发生自发突变。③突变所产生的变种或杂交重组所形成的杂种往往不稳定，容易发生回复突变或产生分离子，以致在菌种这一群体中形成具有不同基因型的个体。

以上是导致菌种变异的遗传因素，这些因素将通过环境得以表现。生产菌种在使用过程中，需要在人工培养条件下进行传代，虽然原始斜面菌种是由单菌落发育而来，但菌落上的许多分生孢子已经具有不同的遗传基础，所以菌种的性状实际上是孢子群体的特征。较纯的群体，传代后变异较少；不纯的群体，传代后变异较多。在菌种传代培养过程中，导致菌种遗传特性改变的以上几个原因都可起作用，其结果使群体中变异菌株增多。传代培养还具有某种选择作用。通常所说的菌种优良性状和大量生成目的产物有关的高产菌株往往表现出生活力弱、生长繁殖速度慢的特点。这些特点使得传代培养实质上具有富集低产菌株的作用。所以，菌种传代次数过多会导致菌种衰退。此外，菌种保藏条件不当也会使菌种发生变异。在菌种保藏过程中采用的一些手段，例如冷冻干燥，会对菌体细胞的结构和DNA造成损伤，在修复这些损伤时，菌体就可能发生变异。

(2) 菌种生理状况的改变菌种的遗传特性需要在一定条件下才能表现出来。由于培养条件不适当，使菌种处于不利于发酵生产的生理状况，其结果也表现为菌种衰退。菌种处于不利于发酵的生理状况有以下三个方面的原因。①一个菌种不是纯的群体，而是由一些变异株混合组成，这些变异株所占的比例决定该菌种的特性。一个由单菌落发育而来的菌种在固体培养基上分离，可以长出许多种形态培养特征的菌落。这些不同的菌落类型在代谢和生长繁殖速度等方面有一定差异。培养条件可以影响各变异株在培养物中的比例而改变该菌种的特性。同一个菌种的单孢子分离在不同的培养基上，所生长出的单菌落，其形态培养特征有显著差异，各种类型菌落所占的比例也不同。如灰色链霉菌 (*Streptomyces griseus*) 在豌豆琼脂培养基上，单孢子分离呈现出3~4种菌落类型，而在黄豆粉培养基上仅出现两种菌落类型。在开始菌种选育工作时，要研究单菌落的分离培养基，找出能呈现较多菌落类型的分离培养基。菌落类型和发酵产量之间存在着某种程度的相关性。在选种实践中，人们经过对菌落形态的考察，有意识地丢弃一些被认为是低产的菌落，挑选那些可能为高产的菌落。②菌种培养基可通过影响菌种的生理状况而影响发酵产量。菌种培养基营养过于丰富不利于孢子形成，因而影响发酵。菌种培养基营养贫乏也同样不利于发酵。因为菌种在营养贫乏的培养基中多次传代，会使菌体细胞内缺乏某些生长因子而衰老甚至死亡。因此，自然选育或菌种培养所用的培养基应选择具有传代后生产能力下降不明显、菌落不易衰老和自溶的正常形态菌落、孢子丰富等培养基。③在某些培养条件下，菌体的某些基因处于活化状态或阻遏状态，而使菌种的生理状态改变。这种改变可能以类似于生理性延迟或细胞分化的机制保持较长一段时间。

由于菌种的退化将会引起发酵过程的产量急剧下降，一旦发生菌种退化，就必须采取有效的预防和防治措施，防止菌种的优良性能发生退化。同时若发现某些优良性状退化，应及时进行分离纯化，使生产菌种保持稳定的优良特性。防止菌种退化的措施主要有菌种的复

壮、提供良好的环境条件、定期纯化菌种、防止自身突变等各个方面。

3. 防止菌种衰退的措施

要防止菌种衰退，应该作好保藏工作，使菌种优良的特性得以保存，尽量减少传代次数。如果菌种已经发生退化，产量下降，则要进行分离复壮。

(1) 菌种的分离菌种发生衰退的同时，并不是所有的菌种都衰退，其中未衰退的菌体往往是经过环境条件考验的、具有更强生命力的菌体。因此，采用单细胞菌株分离的措施，即用稀释平板法或用平板划线法，以取得单细胞所长成的菌落，再通过菌落和菌体的特征分析和性能测定，就可获得具有原来性状的菌株，甚至性能更好的菌株。如对芽孢杆菌，可先将菌液用沸水处理几分钟，再用平板进行分离，从所剩下的孢子中挑选出最优的菌体。如果遇到某些菌株即使进行单细胞分离仍不能达到复壮的效果，则可改变培养条件，达到复壮的目的。如 AT3.942 栖土曲霉的产孢子能力下降，可适当提高培养温度，恢复其能力。同时通过实验选择一种有利于高产菌株而不利于低产菌株的培养条件。菌种分离方法如下。

配合一定的培养条件，对退化菌株进行单菌落或单细胞分离，淘汰退化的个体，保留纯化菌种。

将芽孢杆菌的悬液加热至 90℃ 处理数分钟，杀灭已退化的菌体，保留芽孢；再将芽孢或孢子进行传代，以淘汰退化的个体。

提供特殊的培养条件，使环境有利于优良性状菌株的生长而不利于退化菌株的生长，从而淘汰已退化的菌株个体。

将分离后得到的初筛菌株先保藏，再进行复筛考察，从中选出稳定性较好的菌种。

同时应用上述方法的两种或两种以上的方法，会收到更好的复壮效果。

(2) 菌种的复壮菌种的复壮有狭义的复壮和广义的复壮。狭义的复壮指的是菌种已经发生衰退后，再通过纯种分离和性能测定等方法，从衰退的群体中找出尚未衰退的少数个体，以达到恢复该菌种原有典型性状的一种措施。而广义的复壮应该是一种积极的措施，即在菌种的生产性能尚未衰退前就经常有意识地进行纯种分离和生产性能的测定工作，使菌种的生产性能逐步提高，所以，这实际上是一种利用自发突变（正变）从生产中不断进行选种的工作。

(3) 提供良好的环境条件进行合理的传代，减少传代次数可防止由于菌种的遗传稳定性变化而引起的自发突变，以及由于环境条件变化导致的退化。菌种允许使用的传代次数必须通过传代的稳定性试验确定。发酵生产上一般只用三代内的菌种。采用合适的传代条件使培养条件有利于高产菌的生长，而不利于低产菌的生长，减少突变的发生。

(4) 用优良的保藏方法尽可能采用诸如斜面冰箱保藏法、砂土管保藏法、真空冷冻干燥保藏法以及采用干孢子保藏等优越的保藏方法保藏菌种，以防止菌种的退化。

(5) 定期纯化菌种对菌种进行定期的分离纯化，可减少其中共存的自发突变菌或“突变不完全”产生的退休型菌株的增殖机会，保持原来的优良特性。诸如对营养缺陷型菌种在纯化过程中提供足够的营养物，以保持菌株的优势，避免回复突变体的竞争。同样在进行抗性突变的菌种纯化时在培养基中加入对应于抗性的药物，可保持菌株的抗性优势，避免产生无抗性的回复突变体。

遗传性稳定的菌体作为菌种、采用合适的接种物传代等可减少和防止菌种的自身突变。

二、菌种的复壮

(1) 纯种分离通过纯种分离 可把退化菌种中的一部分仍保持原有典型性状的单细胞

分离出来，经过扩大培养，就可恢复原菌株的典型性。常用的菌种纯化方法很多，大体上可把它们归纳成两类：一类较粗放，只能达到“菌落纯”的水平，即从种的水平上来说是的，例如在琼脂平板上进行划线、表面涂布或与琼脂培养基混匀以获得单菌落等方法；另一类是较精细的单细胞或单孢子分离方法，它可以达到“细胞纯”即菌株纯的水平。后一类方法应用较广，种类很多，既有简单的利用培养皿或凹玻片等作分离室，也有利用复杂的显微操纵器的菌株分离方法。如果遇到不长孢子的丝状菌，则可用无菌小刀取菌落边缘的菌丝尖端进行分离移植，也可用无菌毛细管插入菌丝尖端以截取单细胞而进行纯种分离。

(2) 通过寄主体进行复壮对于寄生性微生物的退化菌株，可通过接种到相应昆虫或动物寄主体内以提高菌株毒性。如经过长期人工培养的杀螟杆菌，会发生毒力减退、杀虫率降低等现象，这时可将退化的菌株去感染菜青虫的幼虫，然后再从病死的虫体内重新分离菌株。如此反复多次，就可提高菌株的杀虫率。

(3) 淘汰已衰退的个体有人曾对“5406”菌种采用在低温（ $-30 \sim -10^{\circ}\text{C}$ ）下处理其分生孢子 7 天，使其死亡率达到 80%，结果发现在抗低温的存活个体中留下了未退化的健壮个体。

以上综合了在实践中收到一定效果的一些防止衰退和达到复壮的措施。但是，在使用这类方法之前，还得仔细分析和判断菌种究竟是衰退、污染还是仅属一般性的表型改变。只有对症下药才能使复壮工作奏效。

三、菌种的保藏

一个优良的菌种被选育出来以后，要保持其生产性能的稳定、不污染杂菌、不死亡，这就需要菌株进行保藏。

1. 菌种保藏的原理

菌种保藏主要是根据菌种的生理、生化特性，人工创造条件使菌体的代谢活动处于休眠状态。保藏时，一般利用菌种的休眠体（孢子、芽孢等），创造最有利于休眠状态的环境条件，如低温、干燥、隔绝空气或氧气、缺乏营养物质等，使菌体的代谢活性处于最低状态，同时也应考虑到经济、简便方法。由于微生物种类繁多，代谢特点各异，对各种外界环境因素的适应能力不一致，一个菌种选用何种方法保藏较好，要根据具体情况而定。

2. 菌种保藏方法

(1) 斜面低温保藏法本方法是利用低温降低菌种的新陈代谢，使菌种的特性在短时期内保持不变。将新鲜斜面上长好的菌体或孢子，置于 4°C 冰箱中保存。一般的菌种均可用此方法保存 1~3 个月。保存期间要注意冰箱的温度，不可波动太大，不能在 0°C 以下保存，否则培养基会结冰脱水，造成菌种性能衰退或死亡。

影响斜面保存时间的突出问题是培养基水分蒸发而收缩，使培养基成分浓度增大，造成“盐害”，更主要的是培养基表面收缩造成板结，对菌种造成机械损伤而使菌种致死。为了克服斜面培养基水分的蒸发，用橡皮塞代替棉塞，有比较好的效果，也可克服棉塞受潮而长霉污染的缺点。有人将 2 株枯草杆菌、1 株大肠杆菌和 1 株金黄色葡萄球菌，分别接种在 $18\text{mm} \times 180\text{mm}$ 试管斜面上，当培养成熟后将试管口用喷灯火焰熔封，置于 4°C 冰箱中保存了 12 年后，启封移种检查，结果除 1 株金黄色葡萄球菌已死亡，其余 3 株仍生长良好，这说明对某些菌种采用这种保藏方法，可以保存较长的时间。

(2) 液体石蜡封存保藏法在斜面菌种上加入灭菌后的液体石蜡，用量高出斜面 1cm，使菌种与空气隔绝，试管直立，置于 4°C 冰箱保存。保存期约 1 年。此法适用于不能以石蜡为碳源的菌种。液体石蜡采用蒸汽灭菌。

(3) 固体曲保藏法这是根据我国传统制曲原理加以改进的一种方法，适用于产孢子的真菌。该法采用麸皮、大米、小米或麦粒等天然农产品为产孢子培养基，使菌种产生大量的休眠体（孢子）后加以保存。该法的要点是控制适当的水分例如在采用大米孢子保藏时，先取大米充分吸水膨胀，然后倒入搪瓷盘内蒸 15min（使大米粒仍保持分散状态）。蒸毕，取出搓散团块，稍冷，分装于茄形瓶内，蒸汽灭菌 30min，最后抽查含水量，合格后备用。将要保存的菌种制成孢子悬浮液，取适量加入已灭菌的大米培养基中，敲散拌匀，铺成斜面状，在一定温度下培养，在培养过程中要注意翻动，待孢子成熟后，取出置冰箱保存，或抽真空至水分含量在 10% 以下，放在盛有干燥剂的密封容器中低温或室温保存。保存期为 1~3 年。

(4) 砂土管保藏法本方法是用人工方法模拟自然环境使菌种得以栖息。适用于产孢子的放线菌、霉菌以及产芽孢的细菌。

砂土是砂和土的混合物，砂和土的比例一般为 3:2 或 1:1，将黄砂和泥土分别洗净，过筛，按比例混合后，装入小试管内，装料高度约为 1cm 左右，经间歇灭菌 2~3 次，灭菌烘干，并作无菌检查后备用。将要保存的斜面菌种刮下，直接与砂土混合；或用无菌水洗下孢子，制成悬浮液，再与砂土混合。混合后的砂土管放在盛有五氧化二磷或无水氯化钙的干燥器中，用真空泵抽气干燥后，放在干燥低温环境下保存。此法保存期可达 1 年以上。

(5) 冷冻干燥法此法的原理是在低温下迅速地将细胞冻结以保持细胞结构的完整，然后在真空下使水分升华。这样菌种的生长和代谢活动处于极低水平，不易发生变异或死亡，因而能长期保存，一般为 5~10 年。此法适用于各种微生物。具体的做法是将菌种制成悬浮液，与保护剂（一般为脱脂牛奶或血清等）混合，放在安瓿瓶内，用低温酒精或干冰（-15℃ 以下）使之速冻，在低温下用真空泵抽干，最后将安瓿瓶真空熔封，低温保存备用。

(6) 液氮超低温保藏法前面几种菌种保藏方法，在保存过程中菌种都有不同程度的死亡，特别对一些不产孢子的菌体保存的效果不够理想。微生物在 -130℃ 以下，新陈代谢活动停止，这种环境下可永久性保存微生物菌种。液氮的温度可达 -196℃，用液氮保存微生物菌种已获得满意的结果。

液氮超低温保藏法简便易行，关键是要有液氮罐、冰箱设备。该方法要点是：将要保存的菌种（菌液或长有菌体的琼脂块）置于 10% 甘油或二甲基亚砷保护剂中，密封于安瓿瓶内（安瓿瓶的玻璃要能承受很大温差而不致破裂），先将菌液降至 0℃，再以每分钟降低 1℃ 的速度，一直降至 -35℃，然后将安瓿瓶放入液氮罐中保存

3. 菌种保藏的注意事项

菌种保藏要获得较好的效果，需注意如下三个方面

(1) 菌种在保藏前所处的状态绝大多数微生物的菌种均保藏其休眠体，如孢子或芽孢。保藏用的孢子或芽孢等要采用新鲜斜面上生长丰满的培养物。菌种斜面的培养时间和培养温度影响其保藏质量。培养时间过短，保存时容易死亡，培养时间长，生产性能衰退。一般以稍低于生长最适温度培养至孢子成熟的菌种进行保存，效果较好。

(2) 菌种保藏所用的基质斜面低温保藏所用的培养基，碳源比例应少些，营养成分贫乏些较好，否则易产生酸，或使代谢活动增强，影响保藏时间。砂土管保藏需将砂和土充分洗净，以防其中含有过多的有机物，影响菌的代谢或经灭菌后产生一些有毒的物质。冷冻干燥所用的保护剂，有不少经过加热就会分解或变性的物质，如还原糖和脱脂乳，过度加热往往形成有毒物质，灭菌时应特别注意。

(3) 操作过程对细胞结构的损害冷冻干燥时，冻结速度缓慢易导致细胞内形成较大的

冰晶，对细胞结构造成机械损伤。真空干燥程度也将影响细胞结构，加入保护剂就是为了尽量减轻冷冻干燥所引起的对细胞结构的破坏。细胞结构的损伤不仅使菌种保藏的死亡率增加，而且容易导致菌种变异，造成菌种性能衰退。

第三节 工业微生物菌种的选育

用发酵法生产产品，首先要有一个良好的菌种。因此必须进行菌种选育工作。菌种选育工作大幅度提高了微生物发酵的产量，促进了微生物发酵工业的迅速发展。通过菌种选育，抗生素、氨基酸、维生素、药用酶等产物的发酵产量提高了几十倍、几百倍、甚至几千倍。菌种选育在提高产品质量、增加品种、改善工艺条件和产生菌的遗传学研究等方面也发挥了重大作用。菌种选育的目的是改良菌种的特性，使其符合工业生产的要求。

菌种选育包括自然选育和诱变选育。在生产过程中，不经过人工诱变处理，根据菌种的自发突变而进行菌种筛选的过程，叫做自然选育或自然分离。由于野生菌株生产能力低，往往不能满足工业上的需要。因为在正常生理条件下，微生物依靠其代谢调节系统，趋向于快速生长和繁殖。但是，发酵工业生产，需要培养微生物使之积累大量的代谢产物。为此，采用种种措施来打破菌的正常代谢，对菌进行调节控制，从而大量积累我们所需要的代谢产物。例如青霉素的原始生产菌种产生黄色色素，使成品带黄色，经过菌种选育，产生菌不再分泌黄色色素；土霉素产生菌在培养过程中产生大量泡沫，经诱变处理后改变了遗传特性，发酵泡沫减少，可节省大量消泡剂并增加培养液的装量；红霉素等品种发酵遇有噬菌体侵袭时，发酵产量大幅度下降，甚至被迫停产，菌种经诱变处理获得抗噬菌体的特性，就可保证发酵生产的正常进行。

一、自然选育

自然选育包括从自然界分离获得菌株和根据菌种的自发突变进行筛选而获得菌种。

1. 从自然界分离获得菌株

从自然界分离新菌种一般包括以下几个步骤：采样、增殖培养、纯种分离和性能测定等。菌种分离的程序如图 2-1 所示。

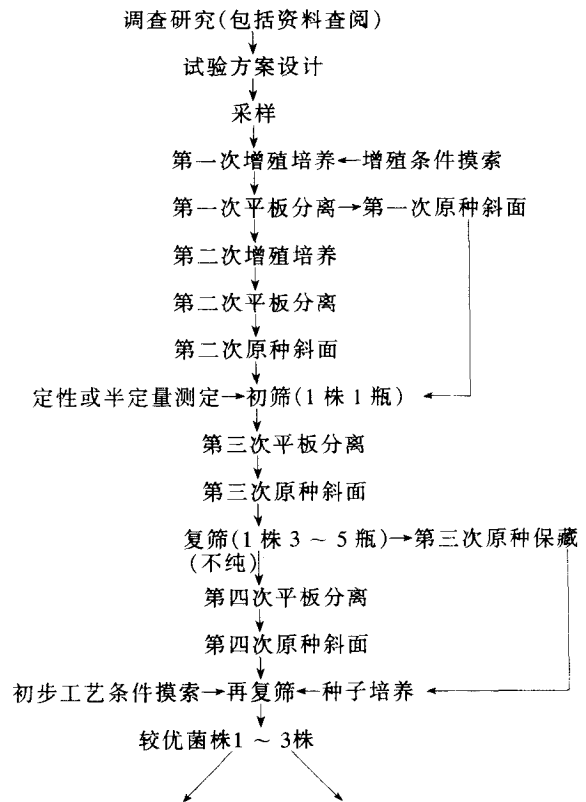


图 2-1 菌种分离的程序

(1) 采样地点的确定要根据筛选的目的、微生物的分布概况及菌种的主要特征与外界环境关系等，进行综合、具体地分析来决定。如果预先不了解某种生产菌的具体来源，一般可从土壤中分离。

采样的方法多是在选好地点后，用小铲去除表土，取离地面 5—15m 处的土壤几十克，盛入预先消毒好的牛皮纸袋或塑料袋中，扎好，记录采样时间、地点、环境情况等，以备考查。一般土壤中芽孢杆菌、放线菌和霉菌的孢子忍耐不良环境的能力较强，不太容易死亡。但是，由于采样后的环境条件与天然条件有着不同程度的差异，一般应尽快分离。对于酵母类或霉菌类微生物，由于它们对碳水化合物的需要量比较多，一般又喜欢偏酸性环境，所以酵母类、霉菌类在植物花朵、瓜果种子及腐殖质含量高的土壤等上面比较多。

(2) 增殖培养收集到的样品，如含目标菌株较多，可直接进行分离。如果样品含目标菌种很少，就要设法增加该菌的数量，进行增殖（富集）培养。所谓增殖培养就是给混合菌群提供一些有利于所需菌株生长或不利于其他菌型生长的条件，以促使目标菌株大量繁殖，从而有利于分离它们。例如筛选纤维素酶产生菌时，以纤维素作为惟一碳源进行增殖培养，使得不能分解纤维素的菌不能生长；筛选脂肪酶产生菌时，以植物油作为惟一碳源进行增殖培养，能更快更准确地将脂肪酶生产菌分离出来。除碳源外，微生物对氮源、维生素及金属离子的要求也是不同的，适当地控制这些营养条件对提高分离效果是有好处的。另外，控制增殖培养基的 pH 值，有利于排除不需要的、对酸碱敏感的微生物；添加一些专一性的抑制剂，可提高分离效率，例如在分离放线菌时，可先在土壤样品悬液中加入 10% 的酚数滴，以抑制霉菌和细菌的生长；适当控制增殖培养的温度，也是提高分离效率的一条好途径。

(3) 纯种分离通过增殖培养还不能得到微生物的纯种，因为生产菌在自然条件下通常是与各种菌混杂在一起的，所以有必要进行分离纯化，才能获得纯种。纯种分离方法常选用单菌落分离法。把菌种制备成单孢子或单细胞悬浮液，经过适当的稀释后，在琼脂平板上进行划线分离。划线法是将含菌样品在固体培养基表面作有规则的划线（有扇形划线法、方格划线法及平行划线法等），菌样经过多次从点到线的稀释，最后经培养得到单菌落。也可以采用稀释法，该法是通过不断地稀释，使被分离的样品分散到最低限度，然后吸取一定量注入平板，使每一微生物都远离其他微生物而单独生长成为菌落，从而得到纯种。划线法简单且较快，稀释法在培养基上分离的菌落单一均匀，获得纯种的概率大，特别适宜于分离具有蔓延性的微生物。采用单菌落分离法有时会夹杂一些由两个或多个孢子所生长的菌落，另外不同孢子的芽管间发生吻合，也可形成异核菌落。要克服这些缺点，就要特别重视单孢子悬浮液的制备方法。为使单孢子悬浮液有良好的分散度，力求去除菌丝断片或粘接在一起的成串的孢子，可采用如下方法制备单孢子悬浮液：对于细菌，因其在固体斜面培养基上常粘在一起，故要求转到新鲜肉汤液体中进行培养，以取得分散且生长活跃的菌体；对放线菌和霉菌的孢子，采用玻璃珠或石英砂振荡打散孢子后，用滤纸或棉花过滤；对某些黏性大的孢子，常加入 0.05% 的分散剂（如 Tween 80）以获得分散的单个孢子。

为了提高筛选工作效率，在纯种分离时，培养条件对筛选结果影响也很大，可通过控制营养成分、调节培养基 pH 值、添加抑制剂、改变培养温度和通气条件及热处理等来提高筛选效率。平板分离后挑选单个菌落进行生产能力测定，从中选出优良的菌株。

(4) 生产性能的测定由于纯种分离后，得到的菌株数量非常大，如果对每一菌株都作全面或精确的性能测定，工作量十分巨大，而且是不必要的。一般采用两步法，即初筛和复筛。经过多次重复筛选，直到获得 1~3 株较好的菌株，供发酵条件的摸索和生产试验，进

而作为育种的出发菌株。这种直接从自然界分离得到的菌株称为野生型菌株，以区别于用人工育种方法得到的变异菌株。

2. 从自发突变体中获得菌株

一般微生物可遗传的特性发生变化称为变异，又称突变，是微生物产生变种的根源，同时也是育种的基础。自然突变是指在自然条件下出现的基因变化。目前，发酵工业中使用的生产菌种，几乎都是经过人工诱变处理后获得的突变株。这些突变株是以大量生成某种代谢产物（发酵产物）为目的筛选出来的，因而它们属于代谢调节失控的菌株。微生物的代谢调节系统趋向于最有效地利用环境中的营养物质，优先进行生长和繁殖，而生产菌种常常是打破了原有的代谢调节系统的突变株，因此常常表现出生活力比野生菌株弱的特点。此外，生产菌种是经人工诱变处理而筛选获得的突变株，遗传特性往往不够稳定，容易继续发生变异，使得生产菌株呈现出自然变异的特性；如果不及及时进行自然选育，通常会导致菌种性能变化，使发酵产量降低，但也有变异使菌种获得优良性能的情况。

自发突变的频率较低，因此自然选育筛选出来的菌种，不能满足育种工作的需要，不完全符合工业生产的要求，如产量低、副产物多、生长周期长等。因而不能仅停留在“选”种上，还要进行“育”种。如通过诱变剂处理菌株，就可以大大提高菌种的突变频率，扩大变异幅度，从中选出具有优良特性的变异菌株，这种方法就称为诱变育种。

二、诱变育种的程序

诱变育种和其他方法相比较，人工诱变能提高突变频率和扩大变异谱，具有速度快、方法简便等优点，是当前菌种选育的一种主要方法，在生产中使用得十分普遍。但是诱发突变随机性大，因此诱发突变必须与大规模的筛选工作相配合才能收到良好的效果。如果筛选方法得当，也有可能定向地获得好的变异株。

诱变育种的主要环节是 ①以合适的诱变剂处理大量而均匀分散的微生物细胞悬浮液（细胞或孢子）以引起绝大多数细胞致死的同时，使存活个体中 DNA 碱基变异频率大幅度提高；②用合适的方法淘汰负效应变异株，选出极少数性能优良的正变异株，以达到培育优良菌株的目的。诱变育种的程序如图 2-2 所示。

1. 出发菌株的选择

工业上用来进行诱变处理的菌株，称为出发菌株（parent strain）。在许多情况下，微生物的遗传物质具有抗诱变性，这类遗传性质稳定的菌株用来生产是有益的，但作为诱变育种材料是不适宜的。

出发菌株通常有三种：从自然界分离得到的野生型菌株；通过生产选育，即由自发突变经筛选得到的高产菌株；已经诱变过的菌株，这类菌株作为出发菌株较为复杂。一般认为诱变获得高产菌株，再诱变易产生负突变，再度提高产量比较困难。采用连续诱变的方法，在每次诱变之后选出 3~5 株较好的菌株继续诱变，如果遇到高产菌株再诱变进一步提高产量效果不佳时，可以先行杂交，再作为诱变的出发菌株，这样有可能收到比较好的效果。

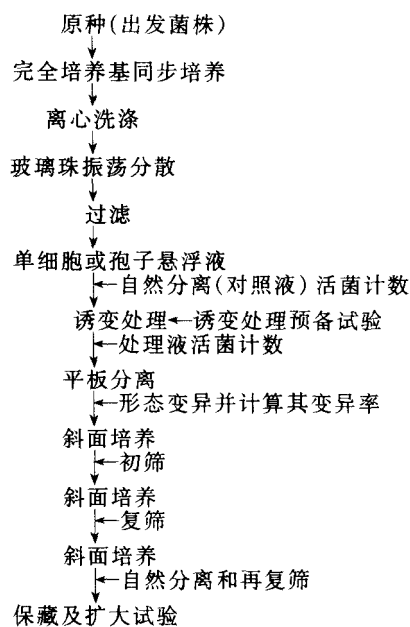


图 2-2 诱变育种的程序