

第一章 微生物发酵技术概论

第一节 发酵技术的定义

提到发酵，在生活中往往会让人联想到发面制作馒头、面包，酿造醋、酱油、酒类，或者联想到食品霉烂。很早以前人们就在生产实践活动中广泛地运用发酵相关的技术，但是人们真正认识发酵的本质却是近 200 年的事情。

发酵（fermentation）一词最初来源于拉丁语“发泡、沸涌（*fervere*）”，是派生词，是用来描述酵母菌作用于果汁或发芽谷物（麦芽汁）进行酒精发酵时产生气泡的现象。这种现象实际上是由于酵母菌作用果汁或麦芽汁中的糖，在厌氧条件下代谢产生二氧化碳气泡引起的。人们把这种现象称为“发酵”。传统的发酵概念只是对酿酒这类厌氧发酵现象的描述。生化和生理学意义的发酵是指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，或者更严格地说，发酵是以有机物作为电子受体的氧化还原产能反应。如葡萄糖在无氧条件下被微生物利用产生酒精并放出 CO_2 。

工业上的发酵泛指大规模的培养微生物生产有用产品的过程，既包括微生物的厌氧发酵，如酒精，乳酸等，也包括微生物好氧发酵，如抗生素、氨基酸、酶制剂等。产品有细胞代谢产物，也包括菌体细胞、酶等。

发酵工程是指利用微生物的生长繁殖和代谢活动，通过现代工程技术手段，进行工业化生产人们所需产品的理论和工程技术体系。是生物工程与生物技术学科的重要组成部分。发酵工程也称为微生物工程，该技术体系主要包括菌种选育和保藏、菌种的扩大生产、微生物代谢产物的发酵生产和纯化制备，同时也包括微生物生理功能的工业化利用等。发酵工程是一门多学科，综合性的科学技术，既是现代生物技术的重要分支学科，又是食品工程的重要组成部分。^①

① 臧学丽，李宁.实用发酵工程技术 [M].第 2 版.北京：中国医药科技出版社，2021：34.

第二节 发酵技术的特点和组成

微生物的发酵方式很多，这里主要介绍六种基本发酵方式，即分批发酵、补料分批发酵、连续发酵、固态发酵、高密度发酵和工程菌发酵。

一、分批发酵

分批式发酵（batch fermentarion）又称间歇式发酵（intermittent fermentation）或不连续式发酵（discontinuous fermentation），也称原位发酵，是把培养液一次性装入发酵罐，灭菌后接入一定量的种子液，在最佳条件下进行发酵培养。经过一段时间完成菌体的生长和产物的合成积累后，将全部培养物取出，结束发酵培养。然后清洗发酵罐，装料、灭菌后再进行下一轮分批操作。每一个分批发酵过程都经历发酵罐的清洗、装料、灭菌、接种、生长繁殖、菌体衰老进而结束发酵，最终放罐提取产物。分批式发酵的操作时间由两部分组成，一部分是进行发酵所需的时间，即从接种后开始发酵到发酵结束为止所需的时间；另一部分为辅助操作时间，包括装料、灭菌、卸料、清洗等所需的时间总和。

分批式发酵菌体培养过程一般可粗分为四期，即适应期（停滞期）、对数生长期、生长稳定期（静止期）和死亡期；也可细分为六期：停滞期、加速期、对数期、减速期、稳定期和死亡期。在分批式发酵的操作过程中，无培养基的加入和产物的输出，发酵体系的组成如基质浓度、产物浓度及细胞浓度都随发酵时间而变化，经历不同的生长阶段。物料一次性装人，一次性卸出，发酵过程是一个非衡态过程。

二、补料分批发酵

所谓补料分批发酵是指在微生物发酵的过程中，以一定的方式向系统中补加一定物料的技术。通过在培养系统补加物料，就可以较长时间的将底物浓度维持在一定的范围内，从而保证了微生物正常的生长需求，达到了高产的目的。

（一）补料分批发酵技术的优势

补料分批培养（fed-batch fermentation）同分批培养、连续培养都是微生物细胞培养的一种方式，它兼备了分批发酵与连续发酵的优点，并且有效地避免了它们的缺点。补料添加的意义主要有：①维持菌体正常代谢，推迟自溶期。②可以解除培养过程中的阻遏效应，延长产物的合成期；③能够保证产量的增长；④有效增加了发酵液总体积。⑤有效的避免异常发酵的发生，实现 pH 和代谢方向的控制。⑥对耗氧过程而言，补料分批培养可有效避免因一次投料过多而引起的细胞大量增长，造成耗氧过多，以至于通风搅拌设备不能够完全匹配的情况。在某种程度上可减少微生物细胞的生产量.提高目的产物的转化率。

（二）补料分批发酵技术的类型

根据补入物料的组成成分可以将分批式发酵分为完全补料培养与半分批补料培养。所谓完全补料培养是指加入的补料与培养基中营养成分完全相同。半分批式补料方式是指加入的成分是一种或者几种限制性营养成分；根据物料流入和流出发酵罐的速率，补料分批发酵分为多种形式。

三、连续发酵

连续发酵（continuous fermentation）是指以某一速度向培养基系统中添加新鲜的培养基，同时以相同的速度流出培养液，从而使培养系统内培养液的体积维持恒定，使微生物细胞处于近似恒定状态下生长的微生物发酵方式。以菌体或与菌体相平行的代谢产物为发酵产品时，常用恒浊连续培养装置进行连续发酵，该装置以维持恒定的高密度的菌体细胞为控制目标。

当流入培养基的速度低于菌体生长速度时，装置内的菌体密度提高，即经光电控制系统促使培养液流出以降低其菌体密度。反之，当流入培养基的速度高于菌体生长速度时，装置内的菌体密度降低，即经光电控制系统弱化培养液流出以提高其菌体密度。饲料酵母、乙醇、乳酸等经该装置进行连续发酵。

连续发酵的最大特点是微生物细胞的生长速度、产物的代谢均处于恒定状态，可达到稳定、高速培养微生物细胞或产生大量代谢产物的目的。

根据反应器的类别将连续发酵分为罐式连续发酵和管式连续发酵。罐式连续发酵可以是单罐，也可以是多罐串联进行操作；而管式反应器无法单独使用，必须与其他形式的反

应器联合使用。

连续发酵的技术优势是简化了菌种的扩大培养，不需要发酵罐的多次灭菌、清洗、出料等操作，缩短了发酵周期，提高了设备利用率，降低了人力、物力的消耗，增加了生产效率，使产品更具商业竞争力。其不足之处是菌体较长时间连续增殖生长易产生突变细胞。

四、固态发酵

所谓固态发酵（solid state fermentation）是指微生物在几乎没有游离水的固态的、较湿的培养基上进行发酵的过程。根据成分的不同，固态的湿培养基的含水量一般控制在40%~80%，无游离水流出。在我国民间的堆肥、青饲料发酵与酿酒制曲都是典型的固态发酵。固态发酵有节能、环保的优势，因此受到很多企业的认可。例如，以产朊假丝酵母（*Candida utilis*）、面包酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）和啤酒酵母（*Saccharomyces carlsbergensis*）为复合发酵菌种，以麸皮、大豆饼和少量脱毒棉籽饼为原料，经固态发酵法生产饲料蛋白添加剂得到快速发展。目前，伴随着发酵工程机械化、自动化、化工技术和设备的改进，在传统固态发酵的基础上发展到现代固态发酵。现代固态发酵在发酵工程的作用和地位正逐步提升，特别是有些发酵产品采用现代固态发酵比液态发酵效果更好。新型固态反应器的研究与开发应用，使许多生物活性物质已成功采用固态发酵方式进行了小批量生产。例如，利用龟裂链霉菌（*Streptomyces rimosus*）为发酵菌种，以玉米穗为主要原料固态发酵生产土霉素；以枯草芽孢杆菌（*Bacillus subtilis*）为发酵菌种，以黏土及稻草复合培养基固态发酵生产抗真菌素。

现代固态发酵与传统固态发酵相比，具有以下特点：①在密闭的固态发酵反应器中进行；②采用单一纯种菌株或混合菌株发酵；③扩大了固态发酵的应用范围；④操作能耗高，设备投资较大；⑤需要无菌处理发酵原料；⑥适宜于分离纯化高附加值产品。

五、工程菌发酵

随着分子生物学技术特别是重组 DNA 技术的快速发展，众多的基因工程产品相继问世。基因工程菌发酵生产的产品越来越多，如用于治疗风湿的促肾上腺皮质激素（adrenocorticotrophic hormone）、治疗血液病的集落刺激因子（colony stimulating factor）、治疗糖尿病的胰岛素（insulin）以及抗肿瘤巨噬细胞激活因子（macrophage activating factor）等。

（一）适于发酵生产的工程菌应具备的条件

用于发酵生产的基因工程菌应该具备下列条件：①其产物可分泌、非致病性，不产生内毒素、外源基因整合在受体菌 DNA 上；②能利用糖蜜、淀粉等常规的碳源，并可进行连续培养；③发酵温度适当；④代谢过程易于控制；⑤基因工程技术日趋成熟，所构建的工程菌已经实现了发酵量产化，许多产品已经投入市场，常见的有胰岛素、干扰素、生长激素，乙型肝炎疫苗等。甚至有的工程菌的产量已超过普通菌种。一种带有头孢菌素生物合成限制性扩环酶外源基因的工程菌，其头孢菌素 C 的产量比原有菌种提高 15%。

（二）工程菌的培养

（1）工程菌的培养。通常工程菌以大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、某些假单胞菌等作为外源基因受体，其培养发酵与普通的菌种的发酵没有本质的区别。通常基因工程菌采用二阶段发酵工艺进行培养，首先在一定时间内提高菌体的浓度，然后添加诱导物或者改变培养温度以诱导外源基因的产物表达，并以综合评价决定产物表达的最佳诱导条件。

（2）基因工程菌的发酵设备。基因工程菌常用的发酵设备主要是机械搅拌发酵罐和气升式发酵罐。基因工程菌因大量合成异源蛋白，可直接或间接地干扰工程菌细胞壁的正常合成，使其细胞壁变软。因此，工程菌对外界的剪切力更敏感，大剪切力容易使工程菌细胞破碎。所以，用没有机械搅拌装置、剪切力较小的气升式发酵罐比机械搅拌发酵罐更利于基因工程菌发酵培养。

（3）基因工程菌的高密度发酵及控制。高密度发酵工艺已成为基因工程菌发酵生产的主要工艺。该工艺与非高密度发酵相比，其发酵周期不仅缩短一半以上，且菌体产量和产物表达量是普通发酵的 10~50 倍，蛋白活性可提高 2~3 倍。

在基因工程菌的高密度发酵中，要尽量选择容易被工程菌利用的营养物质作为培养基成分。例如，普通发酵培养基一般是以葡萄糖为碳源，而工程菌则常以甘油作为碳源，用甘油作碳源可提高工程菌的繁殖速度。同时还要对培养基的成分进行优化、组合，并借助于选择压力，以淘汰非目的基因工程菌。

基因工程菌发酵培养多采用补料分批发酵。在高密度培养工程菌生产谷胱甘肽(GSH)时，用指数流加补料方式可显著提高细胞产率、细胞干重和 GSH 产量。

第三节 发酵技术的应用和发展

我国生物化工行业经过长期发展，已有一定基础。特别是改革开放以后，生物化工的发展进入了一个崭新的阶段。目前生物化工产品也涉及医药、保健、农药、食品与饲料、有机酸等各个方面。

随着科技创新和技术进步的推进，科技推广应用和产业化步伐的加快，发酵产业产品空间进一步拓展、产业链不断延伸，发展前景更加广阔。

一、发酵技术的应用

自然界中微生物的资源丰富，而目前已发现的微生物种类不到自然界存在微生物的2%。发现未知的微生物，是利用微生物资源的前提。同时开发已发现微生物的使用价值，也是微生物资源开发利用的前提和基础。迄今，人类大规模利用微生物资源的历史不过60年。虽然已取得了显著的成果和社会效益，但微生物资源开发利用的潜力仍然很大，发展空间十分宽广。

微生物制药是微生物发酵工业应用最广、成绩最显著、发展最迅速、潜力最大的领域。目前由微生物生产的各种药物已超过1000多种，为人类的保健事业做出了不可磨灭的贡献。但仍然有大量“不治之症”，如心血管、癌症、艾滋病等许多常见多发病无良药可治。利用微生物发酵工业从各方面改进医药的生产，研究开发新的医药产品，以进一步改善医疗手段和提高人类的医疗水平，仍然是微生物发酵工业的热点。

环境生物工程在防治各种污染中将起重要作用，如超级细菌的运用。化学农药对土壤的污染、河流、湖泊水域的污染防治、酸雨危害以及城市垃圾处理等，也都是亟待解决的难题。

随着化石能源的逐年减少，再生能源研制与开发已备受关注。氢气是无污染的清洁能源，燃烧后不产生二氧化碳、硫化物、氮氧化物等有害物质，国外的氢燃料电池汽车已研制成功。产氢的微生物甚多，值得重视的是光合细菌，该菌可利用工业废气产氢。产氢微生物的开发和应用具有战略性的意义。酒精也是可再生的能源。在汽油中掺入一定比例的酒精可提高汽油的辛烷值，减少尾气中一氧化碳、 NO_x 等污染物的排放量。酒精燃烧所产生的二氧化碳和作为原料的生物量生长所消耗的二氧化碳的数量基本一致，不会额外增加大气中二氧化碳含量，对控制大气污染具有重要意义，因此，燃料酒精被称作“清洁

燃料”。自 20 世纪 70 年代以来，世界上很多国家通过立法积极推广燃料酒精的应用，其中美国的“汽油醇计划”和巴西的“酒精汽油计划”使世界酒精产量迅速增长。目前燃料酒精占世界酒精产量的 70%以上。在我国，发酵酒精的生产成本大大高于汽油价格，成为制约燃料酒精发展的主要障碍。进行酒精发酵的研究，降低发酵酒精生产成本，是发展燃料酒精的关键所在。

二、发酵技术的发展趋势

微生物发酵经历了数千年的发展，具有悠久的历史。曾在人们生活和国民经济中发挥了重要的作用。随着基因工程、细胞工程、代谢工程等现代生物技术的发展，赋予微生物发酵工业新的内容，是微生物发酵工业发展的强大推动力，形成了现代微生物发酵工业，也是当前微生物发酵工业主要的发展趋势。^①

基因工程技术是采用人工方法将来源于不同生物体的基因进行分离、剪切、连接和转化，使基因重新组合，产生出人类所需的新的产物，或创建新的生物类型。目前，基因工程在微生物发酵工业中的应用包括两个方面，一是改造传统的微生物工业的菌种，研究人类所需产物的基因结构、基因调控和表达方式，对生产微生物进行基因重组，使产物高效表达，增加产物的产率，提高原有微生物工业的生产水平；二是构建转基因菌株，生产转基因产品，尤其是动、植物细胞产品。虽然通过动、植物细胞培养可得到各种动植物细胞产品，但动、植物细胞培养存在培养基成分复杂、培养基成本高，对环境条件敏感、生长速率慢，培养过程中极易污染等缺点。而微生物细胞具有结构简单、体积小、表面积大、繁殖迅速、容易培养等特点，使之成为良好的转基因受体细胞。已有研究证明，将动、植物细胞的基因转入微生物细胞（细菌、酵母），通过微生物发酵的方法生产，要比动植物细胞的培养方便得多。

^① 孙勇民，殷海松.食品发酵技术 [M].北京：中国轻工业出版社，2018：123.

第二章 发酵微生物的选育与保藏技术研究

以微生物为基础的发酵技术，首先必须具备优良的生产菌种。在生产实践中，菌种的来源是多方面的，有了菌种还要改造与提高，使之更加符合人们的要求。所以，要对工业微生物菌种进行选育。育种的目的是使微生物菌种的生长代谢符合人们生产的要求，然后应用于工业生产，为人类服务，为企业产生效益。

各类微生物广泛存在于包括土壤、空气、水和各种动植物表面和部分器官的自然界中。在长期的进化过程中，微生物与其他生物一样，经受着各种环境条件（包括各种十分弱的诱发突变的物理、化学甚至生物因子）的考验，最后适者生存，形成了由各种微生物物种组成的微生物资源。因此人们可以从这些环境中直接分离那些为适应环境而建立了非常完善的或特殊的代谢调控能力的微生物，通过进一步筛选，用于工业生产，或作为出发菌株，选育高产或特殊代谢产物的菌种，即工业微生物的分离与筛选。这是获得各种工业微生物优良菌种的重要手段与有效途径之一。另外，也常被用作发酵工业日常生产过程对菌种进行纯化复壮的有效手段。人们应该尽量采用从自然界直接分离获得的符合目的的微生物菌种，因为它们的遗传性状往往是十分稳定的。但是微生物的自然资源因突变率低，且不定向而难以满足人类生产的需要。所以为了加快微生物的定向进化，就必须主动改造微生物，即微生物的育种。随着科学研究技术的不断发展，微生物的育种已越来越成为发酵工业获得优良生产菌种的重要手段。

第一节 工业发酵微生物菌种的分离筛选

一、工业发酵微生物菌种分离筛选的基本步骤

菌种的分离在工业生产中具有重要的作用，目前应用的优良菌种，绝大多数都是从自然界中分离，再经过筛选及培养条件优化而应用于生产的。如第一株青霉素生产菌就是从美国伊利诺斯州的葡萄柚中分离的；第一株头孢霉素生产菌是分离自意大利撒丁岛的污水。一般的，获得菌种的途径是菌种保藏机构提供或自行从自然界以及发酵制品中分离，其中，

自然界蕴藏着极其丰富的微生物资源，而目前人类研究过的微生物不及总数的 1%。因此，自然界成为具有巨大潜力的菌种宝库。但是微生物在自然环境中是混杂生长的，要获得理想的菌种，就必须采用一定的方法将他们从中分离出来，这就是菌种的分离。然后根据不同目的，进行筛选。

菌种分离常规步骤为采样、富集、培养、筛选和产物分析。^①

（一）采样

即分离样品的采集。含微生物样品的采集是菌种分离中的重要工作，如何选择与采集样品是决定菌种分离成败的关键之一。土壤是各种微生物最集中的地方，因而被认为是最普遍的采集样品来源。一般来说，土壤中细菌最多，其次是放线菌、霉菌和酵母菌。但是由于生理特性不同，随着土壤中的养分、通气、酸碱度及其所处的季节和地理条件不同，微生物的分布有很大的变化，如耕作土、菜园土微生物数量就多，枯叶多、阴暗潮湿，霉菌、酵母菌则含量多；一般取土层在 5~25 cm 的样品，可以容易分离到各种微生物，酵母菌、霉菌和好氧芽孢杆菌一般分布在浅层土中；偏碱土多分布细菌、放线菌，偏酸土则是霉菌、酵母菌居多；南方的地理条件更适合于微生物特别是霉菌、酵母菌的生长；冬季气温低、气候干燥，微生物数量少，春季雨水多，土壤通气不良，不利微生物生长，经过夏季较高温度和湿度的生长条件，使秋季微生物数量最多，此时采集样品最为理想。所以，要根据分离的目的结合实际条件进行样品采集。另外可以根据目的微生物的生理特点，如营养类型、生理特性等对样品进行理性定向采集，这样就可以提高菌种的分离效率。不同营养类型的微生物与其生长环境有着明显的相关性，特异的营养类型微生物从对应特定的环境中分离成功率较高，如分离分解酶类微生物工作中，从肉类加工厂附近和饭店排污水、污泥中易分离到蛋白酶和脂肪酶的产生菌；在面粉加工厂、酒厂、糕点厂等场所易分离到淀粉酶、糖化酶菌株；糖分比较高的环境易分离到酵母菌；水果及其加工场所和果园土中易分离到果胶酶产生菌；同样的，对于要分离合成某种化合物的微生物，从大规模使用、生产和处理这种微生物的场所采样，容易获得成功。高温菌易从热带地区或温泉、火山地带及堆肥中采样；耐压菌则通常在海底采样；在甜果、花蜜或甘蔗渣中易分离到耐高渗酵母菌。

（二）富集培养

① 李钟庆.微生物菌种保藏技术 [M].北京：科学出版社，2000：66.

是指样品中目的微生物含量较少时,根据该微生物的生理特点,人为创建一种培养条件,使样品中的目的微生物在最适的环境下生长繁殖,相对数量快速增加,以利于菌株分离的手段。任何一种微生物的正常生长都有其特定要求的生理及环境条件,包括碳源、氮源、酸碱度、温度、空气等要求,富集培养就是通过控制这些条件达到目的。一般微生物可以通过以下方法进行富集培养。

(1) 控制培养基的营养成分。自然条件下环境中含有丰富的碳氮源营养种类,使各种微生物可以均衡生长。设计一种培养基以某一特定物质为唯一碳源或氮源,经过培养,就能打破这种平衡,使能利用该物质的微生物迅速繁殖,其他微生物的生长就受到限制,因此就达到富集目标微生物的目的。最简单的例子就是采用不同的培养基富集培养不同类的微生物,查氏培养基主要培养丝状真菌,肉汤培养基主要培养细菌,高氏一号培养基则培养放线菌,PDA 用来培养真菌。典型的例子有以油脂为唯一碳源富集脂肪酶产生菌。另外,由于微生物对环境因子具有较强的适应能力,通过不断强化的富集培养即连续富集培养,虽然耗时较长,但可以显著提高富集效果,这常被用于富集降解高浓度污染物的环保微生物。如将样品液连续移接培养在苯胺浓度逐步提高的富集培养基上,就能富集得到分解苯胺能力很强的微生物菌株。

(2) 控制培养的理化条件。除培养基营养成分外,pH、温度、通气量等环境因子也是微生物赖以正常生长的条件,根据目的微生物的特殊要求进行控制培养,也可以实现富集培养。偏碱(pH7.0~7.5)的条件利于细菌、放线菌的生长,偏酸(pH4.5~6.0)利于霉菌、酵母菌的生长;分离嗜热、嗜冷、耐热、抗寒微生物,都可以通过控制温度进行富集培养。通气条件下可分离好氧微生物,而在厌气条件下才能大量富集厌氧微生物。

(3) 抑制其他微生物的生长。通过高温、高压和加入抗生素等方法减少非目的微生物的数量,提高目标微生物的比例,同样可以达到富集的目的。如分离芽孢杆菌时利用芽孢耐高温的特点,在分离前先对样品进行高温处理,大量杀死其他非芽孢菌,使得芽孢菌变得容易分离。类似的措施还有,适量的胆酸盐和十二烷基磺酸钠可抑制革兰阳性菌的生长,可用于对革兰阴性菌的富集;加入四环素抑制细菌利于霉菌的富集;苯酚或青霉素、链霉素以及丙酸钠、重铬酸钾均能抑制细菌和霉菌,在放线菌的富集中经常采用。

总之,样品中目标微生物含量偏低时,采用富集培养对提高菌种分离的效率是非常必要的。但是,对于含量正常的样品,采用普通分离培养的方法即能获得目的微生物,则不必进行富集培养。

（三）分离培养

样品或经富集后的培养液，仍然是多种微生物混杂在一起，为了获得纯种，就必须继续采用特定有效的技术方法，把最需要的菌株从中分离出来，这种方法是分离单个微生物细胞，经分裂繁殖在固体培养基上形成肉眼可见的单菌落，通过在肉眼条件下获取该单菌落而获得该微生物的纯培养。随着微生物学技术的不断发展，已经建立了比较成熟的分离培养通用方法，即平板稀释分离培养法。对于大型真菌（能产生子实体的）还可以采用孢子分离法、组织分离法和枯（耳）木分离法。平板分离法通常包括稀释涂布法、划线分离法以及平板涂布法结合特异的生理生化反应而扩展的透明圈法、变色圈法、生长圈法和抑菌圈法。如在乳酸菌分离平板培养基中加入适量的碳酸钙，能产生乳酸的乳酸菌就可以因为酸解碳酸钙沉淀使其菌落周围形成透明圈而被鉴别分离；在分离氨基酸产生菌时，在含有高浓度相对应氨基酸营养缺陷型菌株——工具菌的分离平板上，涂布培养待分离菌液，若该菌株菌落周围出现浑浊的生长圈，说明是目的微生物；将敏感菌作为分离产抗微生物的指示菌与分离菌液一起涂布在分离平板上，经培养若发现单菌落周围有明显的抑菌圈，则说明该菌可以抑制敏感菌产生抗生素，从而可以达到分离的目的。随着现代实验设备研制技术的提高，人们可以应用一种显微操作仪，在显微镜下直接获取单个目的细胞而获得纯种。

（四）目的微生物的筛选

1. 初筛

初筛是指从大量分离到的微生物中将具有合成目的产物能力的微生物筛选出来的过程。一般采用平板筛选和摇瓶筛选的方法，随着先进科学仪器的应用，结合自动化技术的高通量筛选手段引入微生物菌种选育研究，受到人们的关注。

（1）平板筛选。这是最为常用的传统初筛方法。也通常在分离培养过程中就予以应用，就是将大量的待分离或待筛选的样品或菌株，培养在设计好的具有定性或半定量作用的琼脂平板培养基上，经过培养，通过对肉眼可见的形态或生理生化特征进行判断，从中初步选出一批目标菌株，缩小筛选目标的方法。此方法也可扩展为：先在平板上获得单菌落，通过菌落形态特征初选，再用无菌打孔器将其一一制成菌落块，然后，将其分别置于均匀制作的面积更大的检验平板上，于指定恒温条件下进行肉眼可见的目标产物快速检测，通过比较，就可以在较短的时间内从大量的分离菌株中选出相对高产的菌株。在菌种的分离筛选工作中，设计一套科学有效的平板快速检测筛选方法，将复杂费时的化学测定简

化为平板上肉眼可见的显色、透明圈等生化反应，能大幅度地提高筛选效率，减少育种工作量，这是所有从事育种工作的研究人员都极其重视的。如在筛选碱性蛋白酶产生菌时，将分离菌株培养在含有 0.3%~0.4%酪蛋白的琼脂平板上，适温培养后，测量菌落周围形成的水解圈的直径，通过比较就可以从中选出产酶能力较强的菌株。但是，并不是所有产生菌都可以简单地设计出一种快速检测的方法，快速方法的准确性问题以及菌株在平板上生长的发酵营养条件与实际的发酵条件存在较大差距，造成平板检验结果并不能客观反映菌株的发酵能力而影响筛选结果的准确性。这些缺陷使平板筛选法的应用产生很大的局限性，它只能大量应用于初筛工作，淘汰部分明显的低产菌株，为后续的摇瓶筛选降低工作量打好前期基础。

(2) 摇瓶筛选。就是通过摇瓶发酵，考察比较各分离或初筛菌株的发酵能力而进行的筛选方法。因为摇瓶液体发酵更接近实际生产的发酵罐发酵，所以，筛选结果相对更准确，更令人满意。但是明显的筛选工作量更大，结合快速检验板法，可以一定程度上提高工作效率：在一块约 300cm² 的玻璃平板上，制备含有一定浓度敏感菌或底物等反应物的琼脂平板上，先均匀打出直径 5mm 的小孔，每孔注入 10 mL 摇瓶发酵过滤液，适温温育后测定反应圈大小来判断发酵能力予以取舍。也可以用无菌的圆滤纸片来替代打孔，每片滤纸可吸附 1~2μL。确定可比较的反应圈大小，可以通过调节发酵液或底物的浓度以及琼脂检验板厚度来完成。

(3) 高通量筛选。高通量筛选 (high throughput screening, HTS) 技术可以一次同时对近 1500 个样品进行检测与筛选。它首先是在药物大规模筛选研究中获得应用，对提高筛选效率降低筛选成本发挥了重要的作用。该筛选技术系统还未在微生物菌种选育中获得直接应用，但是其筛选研究的原理以及强大的筛选功能和产生的巨大效益预期，对微生物筛选工作产生极大的吸引力。

2. 复筛

通过初筛工作，一般可以淘汰 85%~90% 不符合要求的微生物。余下的菌株则需再次进行摇瓶培养，用精确的化学分析方法测定发酵液中的目的产物水平，进行比较，最后从中选出较为优质可靠的菌株 2~3 株，这就是菌种的复筛。与初筛相比，复筛的再一个差别就是复筛实验的重复实验组数提高到 3~5 瓶，以保证结果的客观性，但整个操作繁琐，分析测定时间长、工作量大。所以，在实际筛选中往往还结合应用琼脂平板快速检测法，来降低复筛工作强度，提高工作效率。

二、微生物的分离

不同微生物在特定培养基中形成的菌落一般具有稳定的特征，可成为分类鉴定微生物的重要依据。大多数酵母菌、细菌和许多单细胞藻类和真菌可以在固体培养基上形成分离的菌落，并且通过合适的平板分离法很容易地被纯化培养。所谓平板法，即培养板简称，是指将固体培养基熔化成无菌板，冷却固化，含固体培养基盘子。该方法包括在固体培养基中或表面上分离和固定单个微生物。固体培养基是用琼脂或其他凝胶材料固化的培养基。每个分离的活的微生物生长并繁殖，形成殖民地，用于移植。最常见的分离培养微生物固体培养基是琼脂固体培养基。这种由 Koch 使用平板培养的微生物建立的技术简单易用，一直是细菌分离超过 100 年的最常用手段。^①

（一）平行划线分离法

平板法采用 Petri 培养皿（简称培养皿），它是互扣的玻璃平面盘。互扣的培养皿经过灭菌，内部保持无菌。将经过灭菌的培养基注入无菌的培养皿中，培养基内含有凝固剂（最常用的琼脂），可制成固体培养基平板。

用接种环以无菌操作沾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，如图 2-1 所示，微生物细胞数量将随着划线次数的增加而逐渐减少，并逐步分散开来，如果划线适宜的话，微生物能一一分散，经培养后，可在平板表面得到单菌落，获得纯培养物。

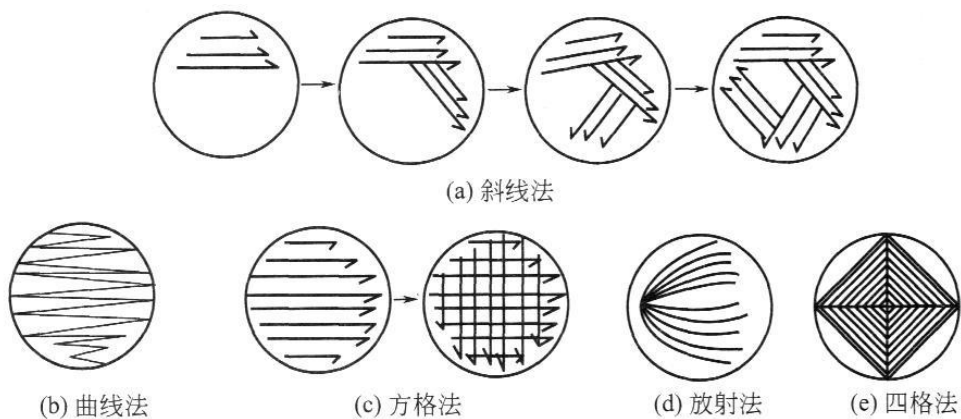


图 2-1 平板划线分离法示意图

^① 李钟庆.微生物菌种保藏技术 [M].北京：科学出版社，2000：98.

(二) 稀释法

稀释法是一种将样品梯度稀释，直至能在平板培养基上形成单菌落，再挑取单菌落进行培养以获得纯培养物的方法。

(1) 稀释倒平板法先将待分离的材料用无菌水做一系列的稀释（如 1: 10、1: 100、1: 1000、1: 10000 等，如图 2-2 所示），然后分别取不同浓度的稀释液少许，与已融化并冷却至 45℃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出现菌落。

(2) 稀释混合平板法稀释混合平板法是将待分离的样品进行一系列的梯度稀释（如 1: 10; 1: 100; 1: 1000 等），后用无菌吸管吸取经过稀释的菌悬液 1ml 注入培养皿，再倒入已融化并冷却到 45℃左右的培养基中，加盖后轻轻摇动培养皿，使培养基均匀分布，平置于桌面上，待凝固后在一定的温度下培养，若出现单菌落，则可挑取单个菌落重复以上操作或划线，即可得到纯培养，如图 2-2 所示。

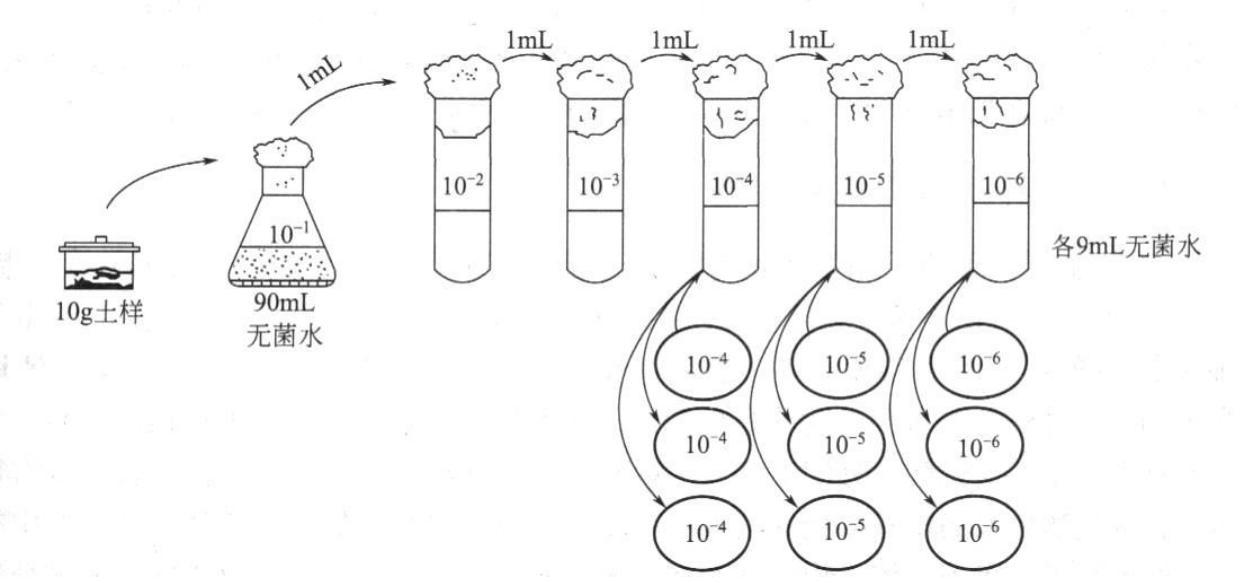


图 2-2 样品的稀释和稀释液的取样培养

(3) 稀释涂布平板法此法与稀释混合平板法大致相同，如图 2-3 所示。所不同的是，此法先将高温的液态固体培养基摇匀，在火焰旁注入培养皿，静置冷却后制成平板，然后用无菌吸管吸取不同稀释度的菌悬液 0.1ml 对号放入已写好稀释度的平板中，用无菌玻璃涂布器在培养基表面轻轻涂布均匀，置于适宜条件下，倒置培养一段时间，出现分散菌落后，再挑取单个菌落，划线直至获得纯培养。

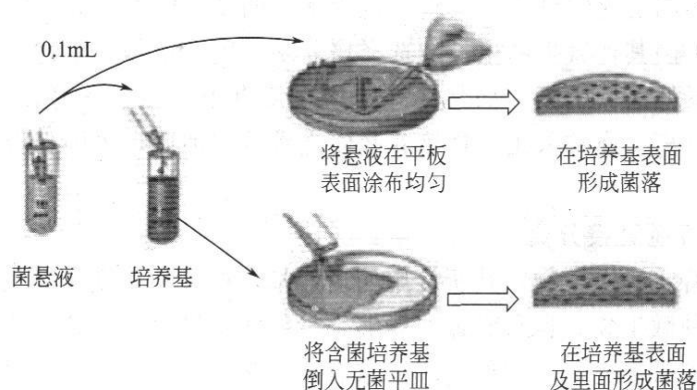


图 2-3 涂布法和倾注平板法操作示意图

以上稀释方法均适用于好氧微生物的纯培养分离。

（三）用液体培养基分离纯培养物

对于大多数细菌和真菌，通过平板法分离通常是令人满意的，因为它们的大部分物质在固体培养基上生长良好。然而，并不是所有的微生物迄今为止都能够在固体培养基上生长，如一些大细菌，许多原生动物和藻类等，并且这些微生物仍然需要通过液体培养物分离以获得纯培养物。

常用的液体培养基分离纯化方法是稀释法。将接种物在液体培养基中依次稀释以实现高度稀释的效果，在一个管中留下不到一个微生物。如果在稀释后大部分稀释液中没有微生物生长，则通过微管生长管获得的培养物可以是纯培养物。如果稀释管中微生物生长的比例增加，则获得纯培养物的可能性急剧降低。因此，使用稀释法进行液体分离时，必须在同一稀释度的许多平行试管中，多数则（一般应超过 95%）显示为无生长。

（四）单孢子或单细胞分离法

使用单细胞（单孢子）分离方法通过显微分离从混合群体中分离个体细胞或个体以获得培养物。单细胞分离的难度与细胞或个体的大小成反比。较大的微生物如藻类，原生动物更容易，较小的个体更难。使用单个孢子分离器在显微镜下机械操作细胞，并挑取单个孢子或单细胞进行培养。还可以使用特制的毛细管来选择载玻片琼脂涂层上的单孢子并将其切下，然后移至合适的培养基进行培养。单细胞分离方法对操作技术的需求很高，仅限于应用高度专业化的科学研究。

三、工业发酵微生物菌种的分离筛选实例

（一）乳酸菌的分离

乳酸菌是应用于食品工业重要的微生物之一，著名的乳酸菌有保加利亚乳杆菌、德氏乳杆菌、乳链球菌、嗜热链球菌、嗜酸乳杆菌等。乳酸菌是一类微需氧球状或杆状细菌，具有在厌氧条件下发酵产生乳酸等有机酸的生理特征。在自然生态环境分布很广，在果蔬汁等植物体液体浸汁、啤酒汁、牛奶、奶酪中普遍存在各种乳酸菌。在分离样品采集过程中，如是非乳酸菌制品，一般含量较少，要进行富集培养。由于乳酸菌是微需氧的，按常规微生物培养方法一般不生长或只生长微小菌落，所以，要设计特殊的方法进行富集培养。一是选择合适的培养基，如保加利亚乳杆菌的增殖培养基为（%）：蛋白胨 1.0，牛肉膏 1.0，酵母膏 0.5，葡萄糖 2.0，吐温 80 0.1，磷酸氢二钾 0.2，乙酸钠 0.5，柠檬酸氢二铵 0.2，硫酸镁 0.005，pH6.2~6.6 装 10ml/试管。二是厌氧条件，针对厌氧菌的分离，构建厌氧条件的方法有很多，包括焦性没食子酸法、加还原剂法、平板厌气培养法、试管厌氧法、生物吸氧法等。对于微需氧的乳酸菌，较为简便和有效的是平板、试管法结合细菌焦性没食子酸法，即富集或分离培养均是在密闭的具有焦性没食子酸和碳酸钠的干燥器中进行，40℃下富集培养 2d，在平板上涂布分离培养 2d，挑取单菌落涂片镜检特征形态，如保加利亚乳杆菌在显微镜下呈细短杆菌，菌体两端圆形，单个，成双呈短链排列。并在上述液态培养基中于 40℃静置厌氧发酵 2d，用 0.1 mol / L 的氢氧化钠溶液滴定发酵液，检测其产酸能力。结合镜检筛选产酸能力高的纯菌株进行穿刺培养低温保藏。

（二）枯草芽孢杆菌的分离

枯草芽孢杆菌能产生多种淀粉酶和蛋白酶以及枯草芽孢杆菌素等，因此也是重要的工业用菌之一。枯草芽孢杆菌多为产芽孢需氧杆菌，在自然界中多分布于土壤或枯草中。由于芽孢是特殊的休眠体，可抗高热，特定的加热处理可杀死不产芽孢的菌类，而使芽孢菌得到纯化。也常利用该原理来分离枯草芽孢杆菌。具体方法是：将适量枯草切碎加入水中，煮沸 20min，取出置 37℃培养 24~48h，液面即产生黄白色皮膜，分离该皮膜细菌培养于肉汤平板上，挑取单菌落涂片镜检，确认具芽孢后移接培养于试管斜面，并进一步观察其营养细胞形状、大小和排列，芽孢形状、部位等形态特征以及进行生理生化试验鉴定。^①

① 李钟庆.微生物菌种保藏技术 [M].北京：科学出版社，2000：188.

第二节 工业发酵微生物菌种选育技术

从自然界分离获得的野生菌种，必须通过人工的遗传改造，改变和操纵微生物基因，大幅度提高菌株产量水平，改善产物性能，进而选育出符合工业化生产的菌种。这一综合技术是工业微生物菌种选育技术的核心，它包括诱变育种、基因重组育种、代谢调控育种以及基因工程育种等技术体系。其中诱变育种是最早实施也是最为有效的育种手段，它包括单一诱变和复合诱变技术，诱变剂有物理诱变剂、化学诱变剂和生物诱变剂，前两者为常见诱变剂；基因重组育种是在原核微生物的接合作用和真菌的有性生殖以及准性生殖基础上发展起来的育种技术，是两亲本发生基因重组产生杂合后代，通过筛选获得目的菌种，也称杂交育种。随着原生质体技术的发展，该育种技术的应用范围得到扩大，使基因重组技术由种内杂交发展成种间杂交、属内杂交，甚至是属间杂交，因此原生质体杂交育种成为目前被采用的最为普遍的工业微生物基因重组育种技术。随着对微生物代谢途径的深入研究，调控微生物合成和积累代谢产物的关键酶相继予以揭示，以代谢调控为原理的工业微生物育种技术得到不断应用，逐步形成了组成型突变株的育种、抗分解调节突变株的育种、营养缺陷型突变株的育种、渗漏型突变株的育种、抗反馈调节突变株的育种、细胞膜透性突变株的育种等技术体系。随着分子生物学技术的高速发展，基因工程育种技术不断成熟，许多工程菌作为工业微生物菌种在各发酵品种和行业中得到极其成功的应用，基因工程育种技术将逐步成为工业微生物育种的主流技术。本节将重点介绍诱变育种和原生质体融合育种技术并简要介绍基因工程育种。^①

一、诱变育种

基因突变是微生物变异的主要依据，人工诱变是加速微生物基因突变的重要手段之一。突变育种是诱变微生物基因突变，改变其遗传结构和功能的人工诱变手段。

诱变育种是工业微生物优良菌种选育的重要途径，在世界发酵工业的发展中发挥了重要的作用，发酵工业中所使用的菌种大多数是通过诱变育种获得的。我国的抗生素包括青霉素、链霉素、金霉素、四环素、土霉素、红霉素、灰黄霉素等的工业生产，都是随着菌种选育取得的重要成就而得到快速的发展。而这些菌种的选育几乎都是与诱变育种分不开的。从实际工业生产上看，诱变育种具有重要的意义，包括可以提高有效产物的产量，有

^①王有志.环境微生物技术 [M].广州：华南理工大学出版社，2008：103.

效提高产物产品的质量，简化生产工艺条件，有助于开发新产品等。对主要抗生素产生菌进行连续反复的诱变育种，使其发酵效价提高上千倍，甚至上万倍。对青霉素原始产生菌产黄青霉进行诱变，获得一株无色突变株，使其发酵液不产生原来的黄色素，有效地提高了青霉素的产品质量，也简化了提取工艺，降低了生产成本。通过诱变可获得低泡沫变株、低发酵液黏度变株、抗噬菌体变株、低发酵热变株等，使发酵控制大大简化，降低了生产成本。诱变红霉素产生菌获得了能产生抗癌作用的阿霉素变株，开发出新的抗生素品种。

诱变育种的步骤一般包括：出发菌株的选择、单孢子（单细胞）菌悬液的制备、诱变剂及其剂量的选择、诱变、分离筛选等。

（一）出发菌株的选择

研究经验表明，诱变处理前对出发菌株的遗传背景、稳定性、形态以及生理生化等特征的掌握，并加以选择，对提高诱变效果具有重要意义。不同来源的出发菌株将满足不同的育种目的，也将产生不同的诱变效果：以野生菌株为出发菌，产量低，但对诱变剂敏感，突变株变异幅度大，正变率高；以生产菌为出发菌，产量基础水平高，易获得高产变株，但可能对诱变剂不敏感，要精心选择诱变剂；具有生产有利性状的菌株做出发菌，如生长快、营养要求低以及产孢早而多的菌株做出发菌，易获得优良变株；选择已发生其他变异的生产菌株作为出发菌，往往易获得高产菌株；选择单倍体、单核的细胞做诱变出发菌材料，容易获得稳定性状的变异株。在连续诱变育种中，应挑选每代诱变处理后均有一些表型变异的菌株做出发菌，因为那些表型改变的菌株，已动摇了其遗传稳定性，对诱变剂敏感性增加，继续诱变处理，就更容易发生变异而最终达到目的。

（二）菌悬液的制备

为了便于被处理细胞能够均匀接触诱变剂，必须将出发菌株用生理盐水或缓冲液制成分散均匀的单细胞悬液。一般选择单细胞的营养体或单核孢子做菌悬液，产孢子的丝状真菌制备孢子悬液时一定要将混入其中的菌丝片段过滤除去，因为一般菌丝是多核细胞的，其变株性状易发生分离而不稳定。菌悬液要选择年轻健壮的细胞或成熟新鲜的孢子进行制备，所以，诱变细菌时往往要进行摇瓶震荡预培养或称前培养，来供给对数生长期的年轻细胞制备菌悬液，因为这一时期的菌体细胞正处于旺盛分裂期，DNA 复制过程容易发生变异，是诱变的良好时机。诱变产孢的丝状微生物则以单孢子为诱变材料，进行适宜的预培养制成菌悬液同样有利于提高诱变育种的效果，只是将单孢子在液体培养基中进行萌发培养至萌芽阶段，此时因产生芽体使细胞对诱变剂的敏感性显著提高。如果条件允许，技术

成熟，还可以用原生质体来制备菌悬液，这样可以大大增强诱变效应，而一般丝状真菌则多采用菌丝体制备原生质体。菌悬液的细胞浓度一般以 $10^6 \sim 10^7$ 个/ml 为好。

（三）诱变剂及其剂量的选择

并非所有的诱变剂对某个出发菌株都是有效的。不同的微生物对同一种诱变剂敏感性也有很大区别，这不仅取决于出发菌本身，还与诱变剂进入细胞后的作用有关。所以，在诱变育种之前要对使用的诱变剂种类进行适当的选择。

1. 根据诱变剂的作用机制选择诱变剂

不同的诱变剂其作用机制不同，有的是引起基因突变等微小突变，有的是染色体畸变、缺失等大的突变。所以要根据育种的目标来选择确定诱变剂，某些产物质量的变异是由单基因控制的，那么就选择某一多引起单基因突变的诱变剂结合剂量控制予以实施，如紫外线即是引起二聚体形成继而产生基因突变的。而许多产量变异是由多基因控制的，如次生代谢产物的合成是由复杂的酶促反应完成的，这些就要选择多种诱变剂的复合处理或选择引起较强突变的诱变剂。灰黄霉素产生菌的诱变选择紫外线加氯化锂处理，效果明显；青霉素产生菌则以 NTG、氮芥、乙烯亚胺等烷化剂处理更为适宜。

2. 根据出发菌特性和遗传稳定性选择诱变剂

诱变作用是诱变剂和出发菌相互作用的结果，包括出发菌的表面透性以及对外诱变剂的敏感性。不同的诱变剂对出发菌所表现出的特性是不一样的，导致最终的诱变效果的不同。对遗传稳定的出发菌，宜选择以前未使用过的、突变谱较宽的、诱变率高的弱诱变剂进行复合处理；对遗传性不稳定的出发菌，宜采用温和诱变剂或对该类菌曾经有效的诱变剂。

3. 参考原诱变系谱选择诱变剂

对于诱变史短的出发菌，采用其中敏感的诱变因子进行处理；对诱变史长的出发菌则相反，不宜采用其长期使用的诱变因子。因为，该出发菌可能对该诱变剂产生“钝化”而出现“饱和现象”，所以要重新采用新的不同的诱变剂。

要选择最佳诱变效果的诱变剂，最好事先要做预备实验，从中选择正突变率高、变异幅度大的诱变剂。总之，诱变剂的选择是影响诱变育种成效的重要因素之一，在育种工作中应引起极大的重视。当然，诱变剂还依据于其来源的难易、成本和操作的经验等因素予以选择。另外诱变剂量也是诱变剂选择的重要因素之一。适宜的诱变剂剂量，应该是使所希望的突变株在存活群体中占有最大比例，就可以减少往后的筛选工作量，育种工作容易获得成功。从理论上讲，比较可靠的是要通过制作相应的突变剂量曲线来确定特定的诱变剂量，如图 2-4 所示。但是，由于检测工作量的原因，实际诱变育种中，都以致死率与变