
第七章

生产菌种的扩大培养与保藏

定 义

- 种子扩大培养：是指将保存在砂土管、冷冻干燥管中处于休眠状态的生产菌种接入试管斜面活化后，在经过扁瓶或摇瓶及种子罐逐级放大培养而获得一定数量和质量纯种的过程。这些纯种培养物称为种子。

作为种子的准则

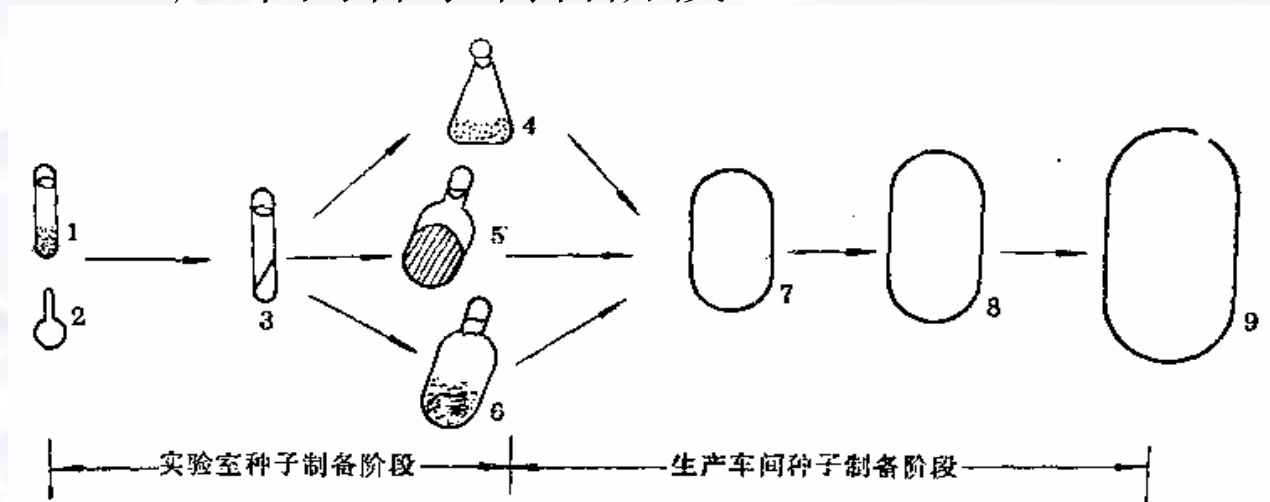
- 菌种细胞的生长活力强，移种至发酵罐后能迅速生长，迟缓期短；
- 生理形状稳定；
- 菌体总量及浓度能满足大容量发酵罐的要求；
- 无杂菌污染；
- 保持稳定的生产能力。

本章讲述的内容

- 第一节 种子的制备过程
- 第二节 种子质量的控制
- 第三节 实例
- 第四节 生产发酵罐的无菌接种
- 第五节 菌种的保藏与复壮

第一节 种子的制备过程

- 种子制备的过程大致可分为：
 - 实验室种子制备阶段
 - 生产车间种子制备阶段



1—砂土孢子；2—冷冻干燥孢子；3—斜面孢子；4—摇瓶液体培养(菌丝体)；
5—茄子瓶斜面培养；6—固体培养基培养；7、8—种子罐培养；9—发酵罐

一、实验室种子的制备

- 实验室种子的制备一般采用两种方式
 - 对于产孢子能力强的及孢子发芽、生长繁殖快的菌种可以采用固体培养基培养孢子，孢子可直接作为种子罐的种子，这样操作简便，不易污染杂菌。
 - 对于产孢子能力不强或孢子发芽慢的菌种，可以用液体培养法。

(一) 孢子的制备

1, 细菌孢子的制备

- ✓ 细菌的斜面培养基多采用碳源限量而氮源丰富的配方。
- ✓ 培养温度一般为37°C。
- ✓ 细菌菌体培养时间一般为1~2天，产芽孢的细菌培养则需要5~10天。

2, 霉菌孢子的制备

- ✓ 霉菌孢子的培养一般以大米、小米、玉米、麸皮、麦粒等天然农产品为培养基。
- ✓ 培养的温度一般为25~28°C。
- ✓ 培养时间一般为4~14天。

3, 放线菌孢子的制备

- ✓ 放线菌的孢子培养一般采用琼脂斜面培养基，培养基中含有一些适合产孢子的营养成分，如麸皮、豌豆浸汁、蛋白胨和一些无机盐等。
- ✓ 培养温度一般为28°C。
- ✓ 培养时间为5~14天。

（二）液体种子制备

1, 好氧培养:

对于产孢子能力不强或孢子发芽慢的菌种, 如产链霉素的灰色链霉菌 (*S. griseus*)、产卡那霉素的卡那链霉菌 (*S. Kanamuceticus*) 可以用摇瓶液体培养法。将孢子接入含液体培养基的摇瓶中, 于摇瓶机上恒温振荡培养, 获得菌丝体, 作为种子。

试管→三角瓶→摇床→种子罐

2, 厌氧培养: 对于酵母菌 (啤酒, 葡萄酒, 清酒等)

试管 → 三角瓶 → 卡式罐 → 种子罐

二、生产车间种子制备

- 实验室制备的孢子或液体种子移种至种子罐扩大培养，种子罐的培养基虽因不同菌种而异，但其原则为采用易被菌利用的成分如葡萄糖、玉米浆、磷酸盐等，如果是需氧菌，同时还需供给足够的无菌空气，并不断搅拌，使菌（丝）体在培养液中均匀分布，获得相同的培养条件。

1, 种子罐的作用:

- 主要是使孢子发芽, 生长繁殖成菌(丝)体, 接入发酵罐能迅速生长, 达到一定的菌体量, 以利于产物的合成。

2, 种子罐级数的确定

- 种子罐级数：是指制备种子需逐级扩大培养的次数，取决于：
 - 菌种生长特性、孢子发芽及菌体繁殖速度；
 - 所采用发酵罐的容积

✓ 细菌：生长快，种子用量比例少，级数也较少，二级发酵。

茄子瓶→种子罐→发酵罐

✓ 霉菌：生长较慢，如青霉菌，三级发酵

孢子悬浮液→一级种子罐（27°C,40小时孢子发芽，产生菌丝）→二级种子罐（27°C,10~24小时，菌体迅速繁殖，粗壮菌丝体）→发酵罐

✓ 放线菌：生长更慢，采用四级发酵

✓ 酵母：比细菌慢，比霉菌，放线菌快，通常用一级种子

- 确定种子罐级数需注意的问题
 - 种子级数越少越好，可简化工艺和控制，减少染菌机会
 - 种子级数太少，接种量小，发酵时间延长，降低发酵罐的生产率，增加染菌机会
 - 虽然种子罐级数随产物的品种及生产规模而定。但也与所选用工艺条件有关。如改变种子罐的培养条件，加速了孢子发芽及菌体的繁殖，也可相应地减少种子罐的级数。

第二节 种子质量的控制

一、影响孢子质量的因素及控制

- 培养基
- 培养条件
- 培养时间和冷藏时间

1, 培养基

- 生产过程中经常出现种子质量不稳定的现象，其主要原因是原材料质量波动。
 - 例如在四环素、土霉素生产中，配制产孢子斜面培养基用的麸皮，因小麦产地、品种、加工方法及用量的不同对孢子质量的影响也不同。
 - 蛋白胨加工原料不同如鱼胨或骨胨对孢子影响也不同。
- 原材料质量的波动，起它要作用的是其中无机离子含量不同，如微量元素 Mg^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Ba^{2+} 能刺激孢子的形成。磷含量太多或太少也会影响孢子的质量。

- 水质的影响：地区不同、季节变化和污染源污染，均可造成水质波动，影响种子质量。
- 菌种在固体培养基上可呈现多种不同代谢类型的菌落，氮源品种越多，出现的菌落类型也越多，不利于生产的稳定。

- 措施

- 培养基所用原料要经过发酵试验合格才可使用
- 严格控制灭菌后培养基的质量
- 斜面培养基使用前，需在适当温度下放置一定时间
- 供生产用的孢子培养基要用比较单一的氮源，作为选种或分离用的培养基则采用较复杂的有机氮源

2, 培养条件

(1) 温度

温度对多数品种斜面孢子质量有显著的影响。如土霉素生产菌种在高于 37°C 培养时, 孢子接入发酵罐后出现糖代谢变慢, 氨基氮回升提前, 菌丝过早自溶, 效价降低等现象。一般各生产单位都严格控制孢子子斜面的培养温度。

(2) 湿度

制备斜面孢子培养基的湿度对孢子的数量和质量有较大的影响。例如土霉素生产菌种龟裂链霉菌，孢子制备时发现：在北方气候干燥地区孢子斜面长得较快，在含有少量水分的试管斜面培养基下部孢子长得较好，而斜面上部由于水分迅速蒸发呈干疤状，孢子稀少。在气温高含湿度大的地区，斜面孢子长得慢，主要由于试管下部冷凝水多而不利于孢子的形成。从表中看出相对湿度在40%~45%时孢子数量最多，且孢子颜色均匀，质量较好。

不同相对湿度对龟裂链霉菌斜面生长的影响

相对湿度 (%)	斜面外观	活孢子计数(亿/支)
16.5-19	上部稀薄,下部略黄	1.2
25-36	上部薄,中部均匀发白	2.3
40-45	一片白,孢子丰富	5.7

3, 培养时间和冷藏时间

(1) 培养时间

- 一般来说, 衰老的孢子不如年轻的孢子, 因为衰老的孢子已在逐步进入发芽阶段, 核物质趋于分化状态。过于衰老的孢子会导致生产能力的下降。
- 措施: 孢子培养的时间应该控制在孢子量多、孢子成熟、发酵产量正常的阶段终止培养。

(2) 冷藏时间

- 斜面冷藏对孢子质量的影响与孢子成熟程度有关。如土霉素生产菌种孢子斜面培养4天左右即于4°C冰箱保存，发现冷藏7~8天菌体细胞开始自溶。而培养5天以后冷藏，20天未发现自溶。
- 冷藏时间对孢子的生产能力也有影响。例如在链霉素生产中，斜面孢子在6°C冷藏两个月后的发酵单位比冷藏一个月降低18%，冷藏3个月后降低35%。

4，接种量

- 接种量大小影响到培养基中孢子的数量，进而影响菌体的生理状况。

二、影响种子质量的因素及控制

- 孢子的质量
- 培养基
- 培养条件
- 种龄
- 接种量

1, 培养基

- 营养成分适合种子培养的需要
 - 选择有利于孢子发芽和菌体生长的培养基；
 - 营养上要易于被菌体直接吸收和利用；
 - 营养成分要适当丰富和完全，氮源和维生素含量要高
- 营养成分要尽可能与发酵培养基相近。

2, 培养条件

(1) 温度

(2) 通气量

在种子罐中培养的种子除保证供给易被利用的培养基外, 有足够的通气量可以提高种子质量。例如, 青霉素的生产菌种在制备过程中将通气充足和不足两种情况下得到的种子分别接入发酵罐内, 它们的发酵单位可相差1倍。但也有例外, 例如土霉素生产菌, 一级种子罐的通气量小对发酵有利。

3, 种龄

- 种龄：是指种子罐中培养的菌丝体开始移入下一级种子罐或发酵罐时的培养时间。
- 通常种龄是以处于生命力极旺盛的对数生长期，菌体量还未达到最大值时的培养时间较为合适。时间太长，菌种趋于老化，生产能力下降，菌体自溶；种龄太短，造成发酵前期生长缓慢。
- 不同菌种或同一菌种工艺条件不同，种龄是不一样的，一般需经过多种实验来确定。嗜碱性芽孢杆菌生产碱性蛋白酶，12小时最好。

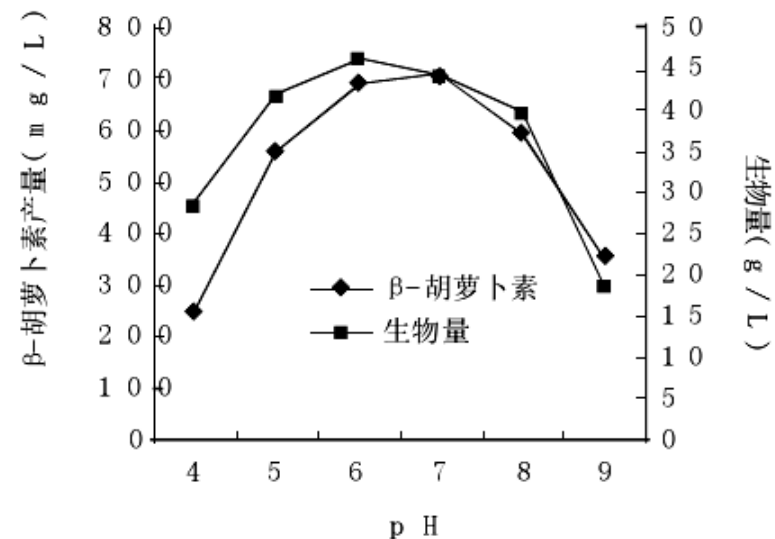


图5 初始 pH 对 β-胡萝卜素产量及生物量的影响

4, 接种量

- 接种量：是指移入的种子液体积和接种后培养液体积的比例。
- 接种量的大小决定于生产菌种在发酵罐中生长繁殖的速度，采用较大的接种量可以缩短发酵罐中菌丝繁殖达到高峰的时间，使产物的形成提前到来，并可减少杂菌的生长机会。但接种量过大或者过小，均会影响发酵。过大会引起溶氧不足，影响产物合成；而且会过多移入代谢废物，也不经济；过小会延长培养时间，降低发酵罐的生产率。
- 通常接种量，细菌1~5%，酵母菌5~10%，霉菌7~15%，有时20~25%

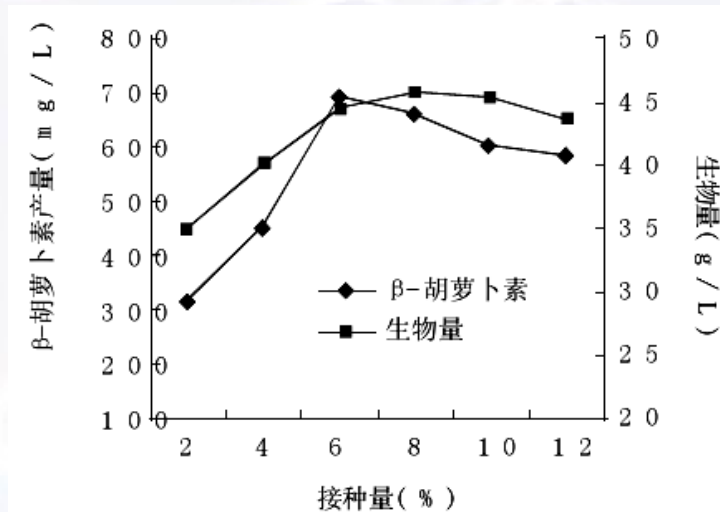


图3 接种量对β-胡萝卜素产量及生物量的影响

三、种子质量的控制措施

- 种子质量的最终指标是考察其在发酵罐中所表现出来的生产能力。因此首先必须保证生产菌种的稳定性，其次是提供种子培养的适宜环境保证无杂菌侵入，以获得优良种子。
 - 菌种稳定性的检查
 - 无（杂菌）检查

四、种子质量标准

1, 细胞或菌体

- 菌丝形态、菌丝浓度和培养液外观（色素、颗粒等）
 - 单细胞：菌体健壮、菌形一致、均匀整齐，有的还要求有一定的排列或形态；
 - 霉菌、放线菌：菌丝粗壮、对某些染料着色力强、生长旺盛、菌丝分枝情况和内含物情况好。

2, 生化指标

- 种子液的糖、氮、磷的含量和pH变化
 -

3, 产物生成量

- 在抗生素发酵中，产物生成量是考察种子质量的重要指标，因为种子液中产物生成量的多少间接反映种子的生产能力和成熟程度。

4, 酶活力

- 种子液中某种酶的活力, 与目的产物的产量有一定的关联。

五、种子异常分析

- 菌种生长速度，过快或过慢(培养基)
- 菌丝结团(溶氧)
- 菌丝粘壁(搅拌)

第三节 实例

一、谷氨酸发酵的菌种扩大培养

斜面菌种 → 一级种子培养 → 二级种子培养 → 发酵罐

1, 斜面菌种的培养

- 菌种的斜面培养必须有利于菌种生长而不产酸，并要求斜面菌种绝对纯，不得混有任何杂菌和噬菌体，培养条件应有利于菌种繁殖，培养基以多含有机氮而不含或少含糖为原则。

(1) 斜面培养基组成

葡萄糖 0.1% 蛋白陈 1.0% 牛肉膏 1.0% 氯化钠 0.5%
琼脂 2.0~2.5% PH 7.0~7.2

(传代和保藏斜面不加葡萄糖)

(2) 培养条件: 33~34℃, 培养18~24h

2, 一级种子培养

- 一级种子培养的目的在于大量繁殖活力强的菌体，培养基组成应以少含糖分，多含有机氮为主，培养条件从有利于长菌考虑。

(1) 培养基组成

葡萄糖 2.5% 尿素 0.5%

硫酸镁 0.04% 磷酸氢二钾 0.1%

玉米浆 2.5~3.5%(按质增减)

硫酸亚铁、硫酸锰 各2ppm

pH 7.0

(2) 培养条件 用1000mL三角瓶装入培养基200mL, 灭菌后置于冲程7.6cm、频率96次 / min的往复
式摇床上振荡培养12h, 培养温度33~34℃

(3) 一级种子质量要求

种龄: 12h pH值: 6.4 ± 0.1

光密度: 净增OD值0.5以上

残糖: 0.5%以下 无菌检查: (-)

噬菌体检查: (-)

镜检: 菌体生长均匀、粗壮, 排列整齐

革兰氏阳性反应。

3, 二级种子培养

- 为了获得发酵所需要的足够数量的菌体, 在一级种子培养的基础上进而扩大到种子罐的二级种子培养。种子罐容积大小取决于发酵罐大小和种量比例。

(1) 培养基组成

培养基成分	T6-13	B9	7338	AS1.299
水解糖(%)	2.5	2.5	2.5	2.5
玉米浆(%)	2.5~3.5	2.5~3.5	2.5~3.5	2.5
磷酸氢二钾(%)	0.15	0.15	0.2	0.1
硫酸镁(%)	0.04	0.04	0.05	0.04
尿素(%)	0.4	0.4	0.5	0.5
Fe ⁺⁺ (ppm)	2	2	2	2
Mn ⁺⁺ (ppm)	2	2	2	2
pH	6.8~7.0	6.8~7.0	7.0	6.5~6.8

(2)培养条件

接种量：0.8~1.0%

培养温度：32~34℃

培养时间：7~8h

通风量

- 50L种子罐1:0.5
- 搅拌转速340r / min;
- 250L种子罐1:0.3
- 搅拌转速300r / min
- 500L种子罐1:0.25
- 搅拌转速230r / min

(3)二级种子的质量要求

种龄 7~8h

pH 7.2左右

OD值 净增0.5左右

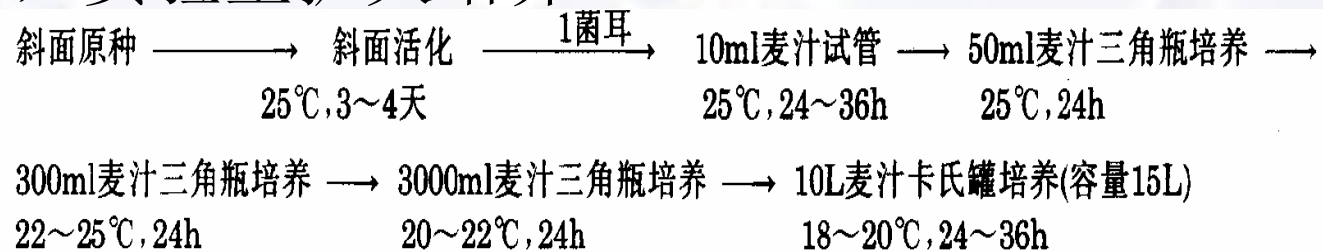
无菌检查 (-)

噬菌体检查(-)

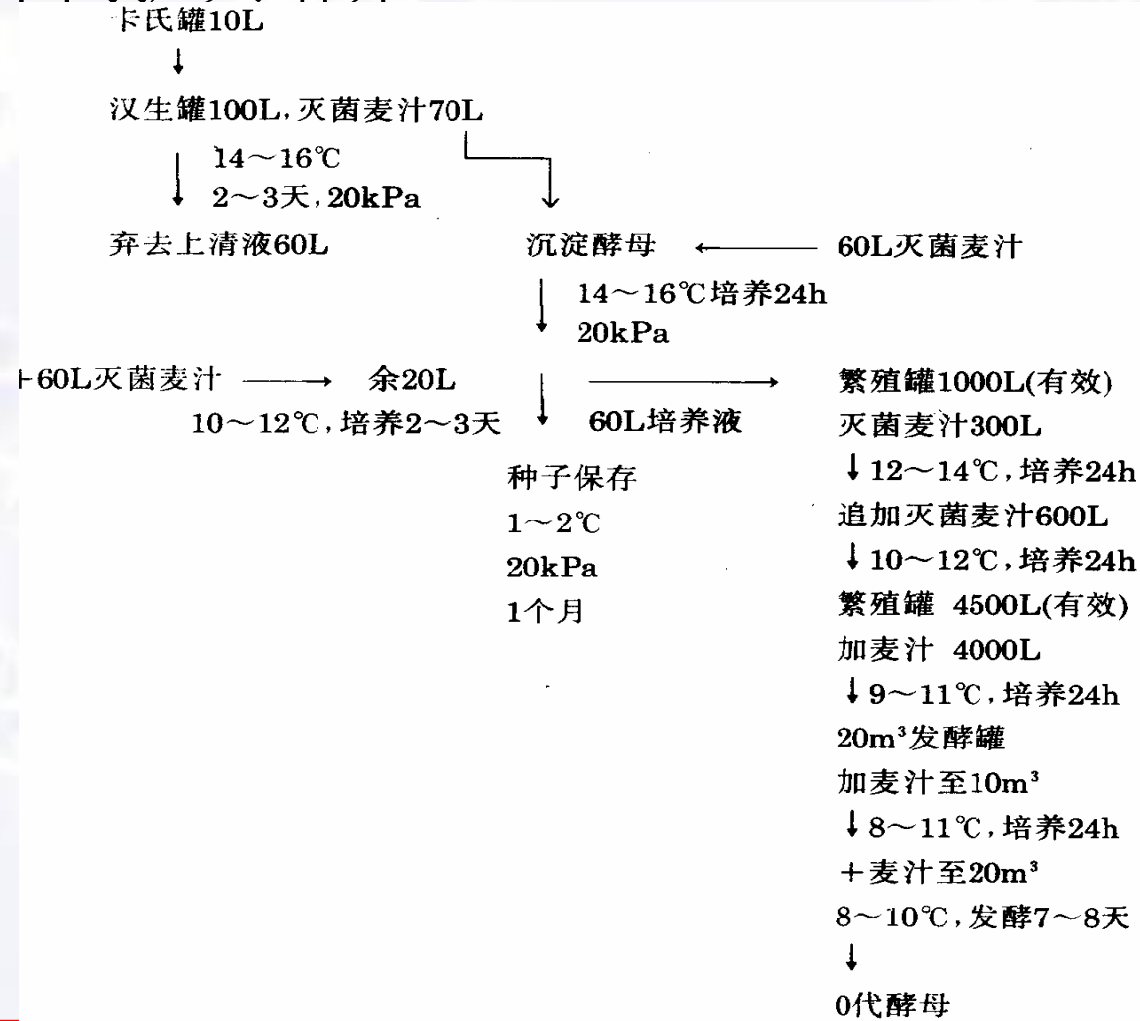
二、啤酒酵母的扩大培养

- 一般可采用三级扩大培养，扩大倍数：第1级到第2级为8-10倍，第2级到第3级为4-6倍。

1, 实验室扩大培养



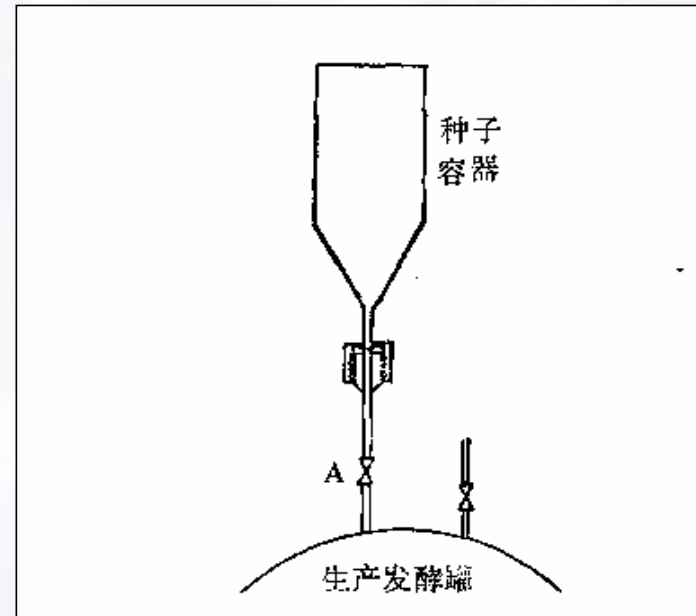
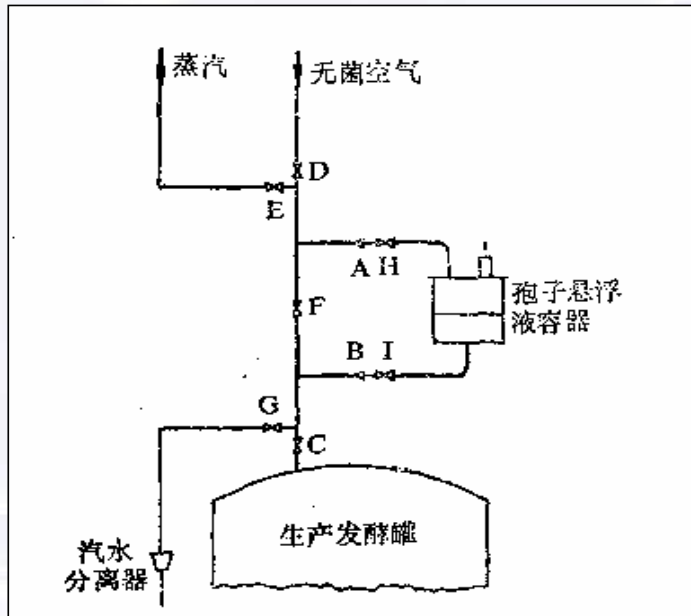
2, 车间扩大培养



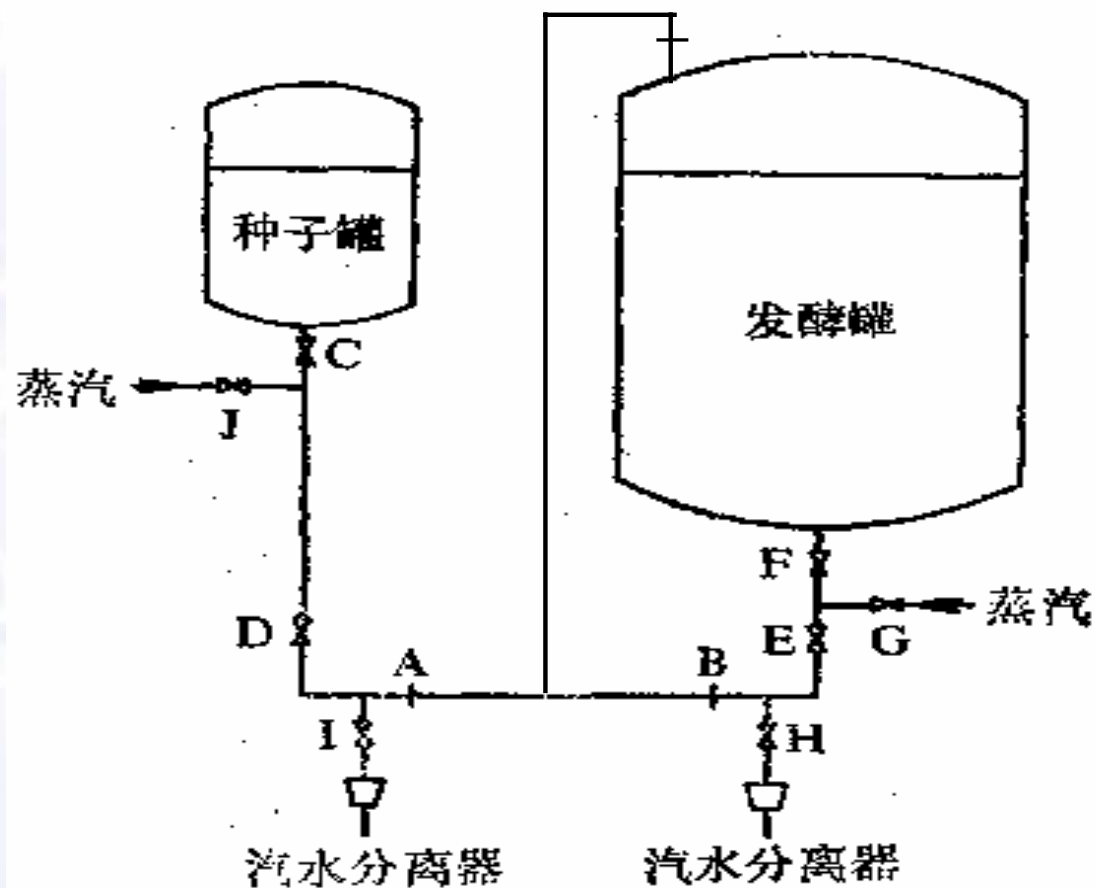
第三节 生产发酵罐的无菌接种

- 生产规模发酵罐的接种，包括两个方面：
 - 从实验室摇瓶或孢子悬浮液容器中移种入一个种子罐，
 - 从一个种子罐移入另一个生产发酵罐中。

从实验室摇瓶或孢子悬浮液容器接种



从种子罐接种



第四节 菌种的保藏与复壮

一、菌种保藏的意义

菌种是从事微生物学以及生命科学研究的基本材料，特别是利用微生物进行有关生产如抗生素、氨基酸、酿造等工业，更离不开菌种。所以菌种保藏是进行微生物学研究和微生物育种工作的重要组成部分。其**任务**首先是使菌种不致死亡，同时还要尽可能设法把菌种的优良特性保持下来而不致向坏的方面转化。

二、菌种保藏的原理

- 菌种保藏主要是根据菌种的生理生化特点人工创造条件使孢子或菌体的生长代谢活动尽量降低，以减少其变异。一般可通过保持培养基营养成分在最低水平缺氧状态，干燥和低温，使菌种处于“休眠”状态，抑制其繁殖能力。
- 一种好的保藏方法首先应能长期保持菌种原有的优良性状不变，同时还需考虑到方法本身的简便和经济，以便生产上能推广使用。

三、菌种保藏的方法

- 斜面低温保藏法：酵母菌
- 石蜡油封保藏法：酵母菌
- 砂土管保藏法：细菌，霉菌，放线菌
- 硅胶保藏法：细菌
- 冷冻干燥法：细菌，放线菌
- 液氮超低温冻结法：细菌，真菌

四、菌种的衰退与复壮

- 1, 菌种衰退：菌种经过长期人工培养或保藏，由于自发突变的作用而引起某些优良特性变弱或消失的现象。

2, 菌种退化的原因:

- 基因突变;
- 变异菌株性状分离;
 - 诱变的单菌落是由一个以上孢子或细胞形成
 - 菌落由一个孢子或单个细胞形成, 但它是多核细胞
 - 单核孢子发生突变时, 双链DNA上仅一条链上某个位点发生变化

剂量 (以存活率计, %)	菌落总数	突变菌落数		突变频率 (突变菌落/10 ⁹)	不纯菌落 (%)
		纯	不纯		
100 (对照)	12165	1	—	0.08	—
80~100	12060	13	12	2	43
60~80	8553	46	20	27	30
20~60	4922	65	17	16.7	21
1~20	9884	195	28	22.6	13

- 连续传代

实验	移代数	每代斜面保存时间 (天)	回复子比数	腺苷产量 (g/L)
1	0	147	$1/4.5 \times 10^5$	13.5
2	2	133, 14	$1/2.4 \times 10^5$	14.9
3	6	47, 3, 9, 3, 71, 14	$1/2.2 \times 10^5$	10.7
4	7	47, 3, 9, 3, 13, 58, 14	$1/3.5 \times 10^5$	13.1
5	9	47, 3, 9, 3, 13, 8, 3, 47, 4	$1/5.3 \times 10^5$	8.1
6	12	47, 3, 9, 3, 13, 8, 3, 4, 14, 6, 6, 31	$1/1.0 \times 10^5$	7.4

- 其它因素

- 菌种保藏不当
- 生长条件不满足 (培养基组成、培养条件)

- 防止菌种退化的措施
 - 控制传代次数
 - 选择合适的培养条件
 - 选择合适的保藏方法
 - 菌种稳定性检查
 - 分离复壮

- 菌种复壮：使衰退的菌种重新恢复原来的优良特性。
- 复壮措施：
 - 对已衰退菌种配合一定培养条件进行单细胞分离纯化
 - 淘汰衰退的个体
 - 选择合适的培养基

