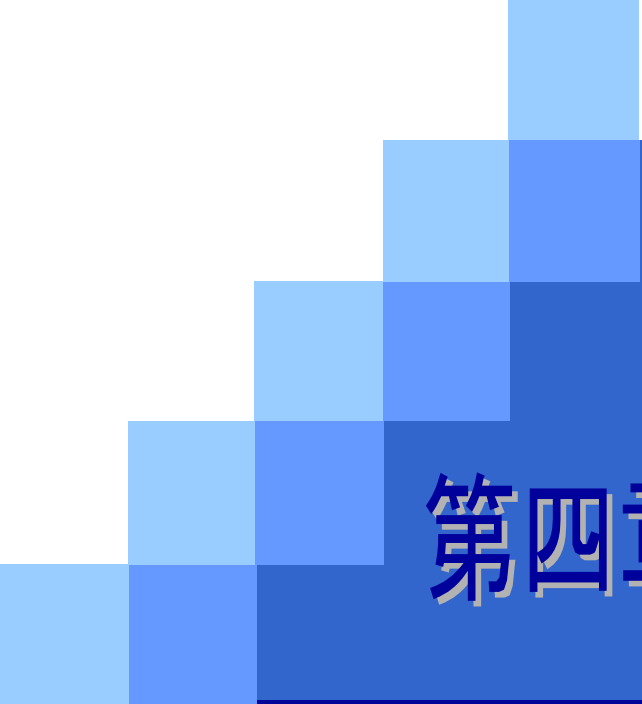




第四章 生产菌种的制备与保藏

生产菌种的制备：

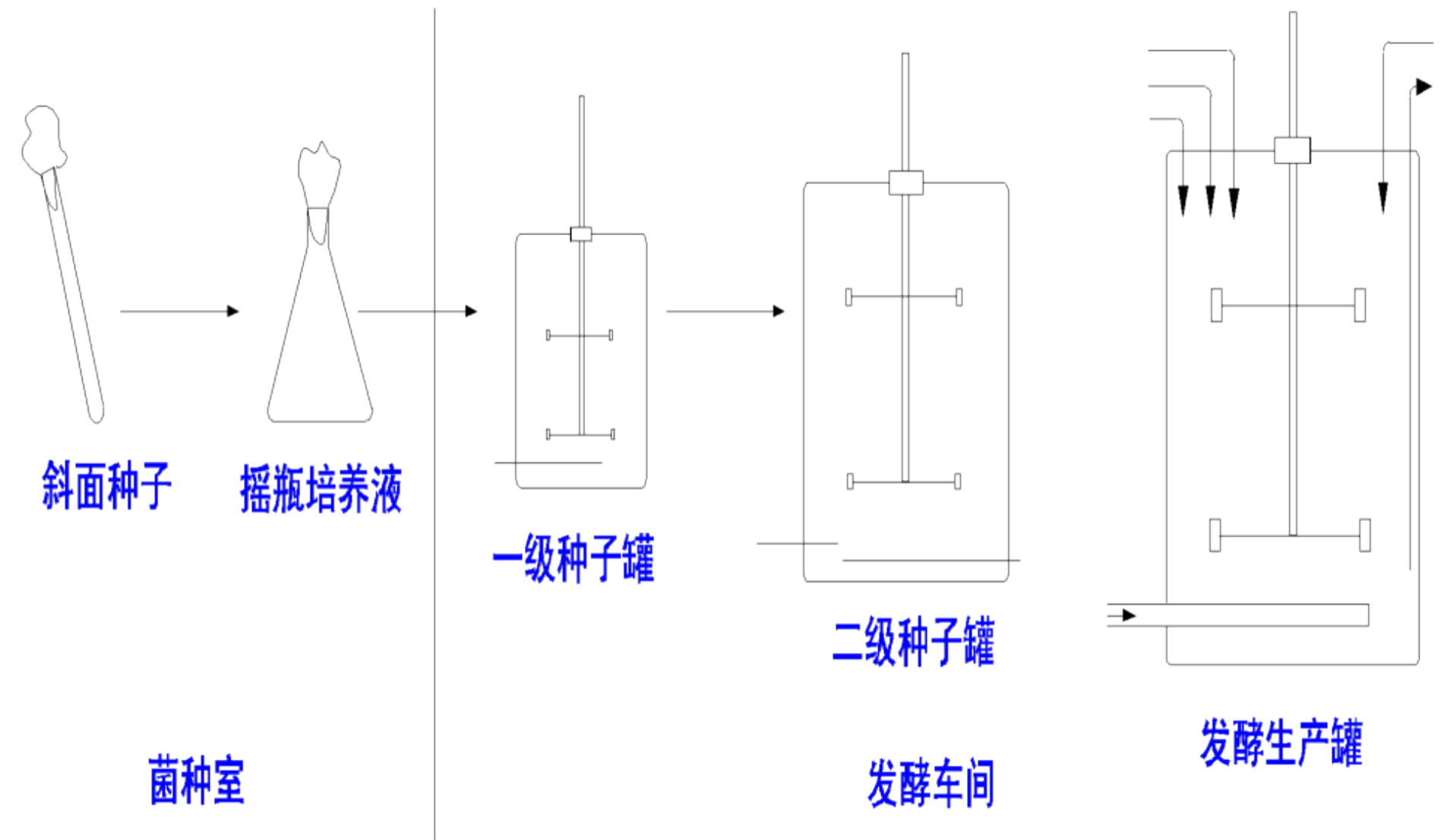
即种子制备，是发酵生产的第一道工序。即将保存在砂土管、冷冻干燥管中处休眠状态的生产菌种接入试管斜面活化后，再经过扁瓶或摇瓶及种子罐逐级扩大培养，最终获得一定数量和质量菌种的过程。

目的：

提供发酵产量高、生产性能稳定、数量充足、未被杂菌污染的生产用菌种

- 
- ❖ **第一节 种子制备的过程**
 - ❖ **第二节 种子质量控制**
 - ❖ **第三节 种子保藏与复壮**

第一节 种子制备的过程





两个过程：

孢子制备过程 - 固体培养基上培养孢子，

种子制备过程 - 液体培养基上培养菌丝。

一、孢子制备

(一) 放线菌孢子的制备

1. 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、无机盐
2. C和N源不要太丰富（C约为1%，N约为0.5%）
3. 干燥和限制营养可直接或间接诱导孢子形成。
4. 斜面培养温度大多为28℃，少数为37℃。
5. 培养时间5~14天。

一、孢子制备

（二）霉菌孢子的制备

1. 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。
2. 霉菌培养温度大多为25~28℃。
3. 培养时间4~14天。

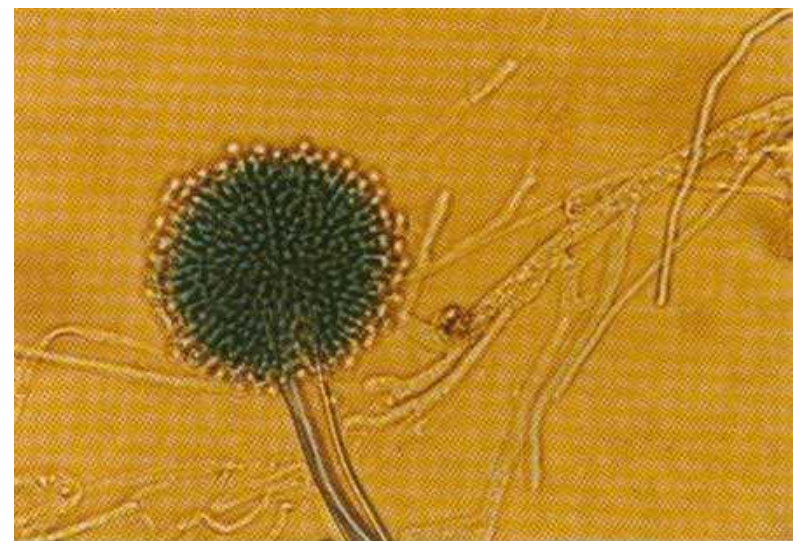


图 15-39 黑曲霉纯培养的镜下形态（乳酸酚棉蓝染色）

一、孢子制备

（三）细菌孢子的制备

1. 一般采用琼脂斜面培养基，碳源限量而氮源丰富，
如牛肉膏、蛋白胨作有机氮源
2. 细菌培养温度大多为 37 °C
少数为28 °C。
3. 细菌和菌体培养时间1~2天，
可产芽孢的菌则5~10天。



二、种子制备

是将固体培养基上培养出来的孢子或菌体转入到液体培养基中培养，使其繁殖成大量菌丝或菌体的过程。

目的：形成一定数量和质量菌体。

方法：摇瓶种子制备和种子罐种子制备

✶ 摇瓶种子制备：某些孢子发芽和菌丝繁殖速度缓慢的菌种，需将孢子经摇瓶培养成菌丝后再进入种子罐。培养基要求比较丰富和完全，并易被菌体分解利用，氮源丰富有利于菌丝生长。

✶ 种子罐种子制备：

一级种子、二级种子..... $N+1$ 级发酵

种子罐的级数主要决定于菌种的性质、菌体生长速度、发酵设备的合理应用。

- ✓ **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

确定种子级数需注意的问题

- 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；
- 种子罐级数：产物的品种、生产规模、工艺条件。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 种子质量控制

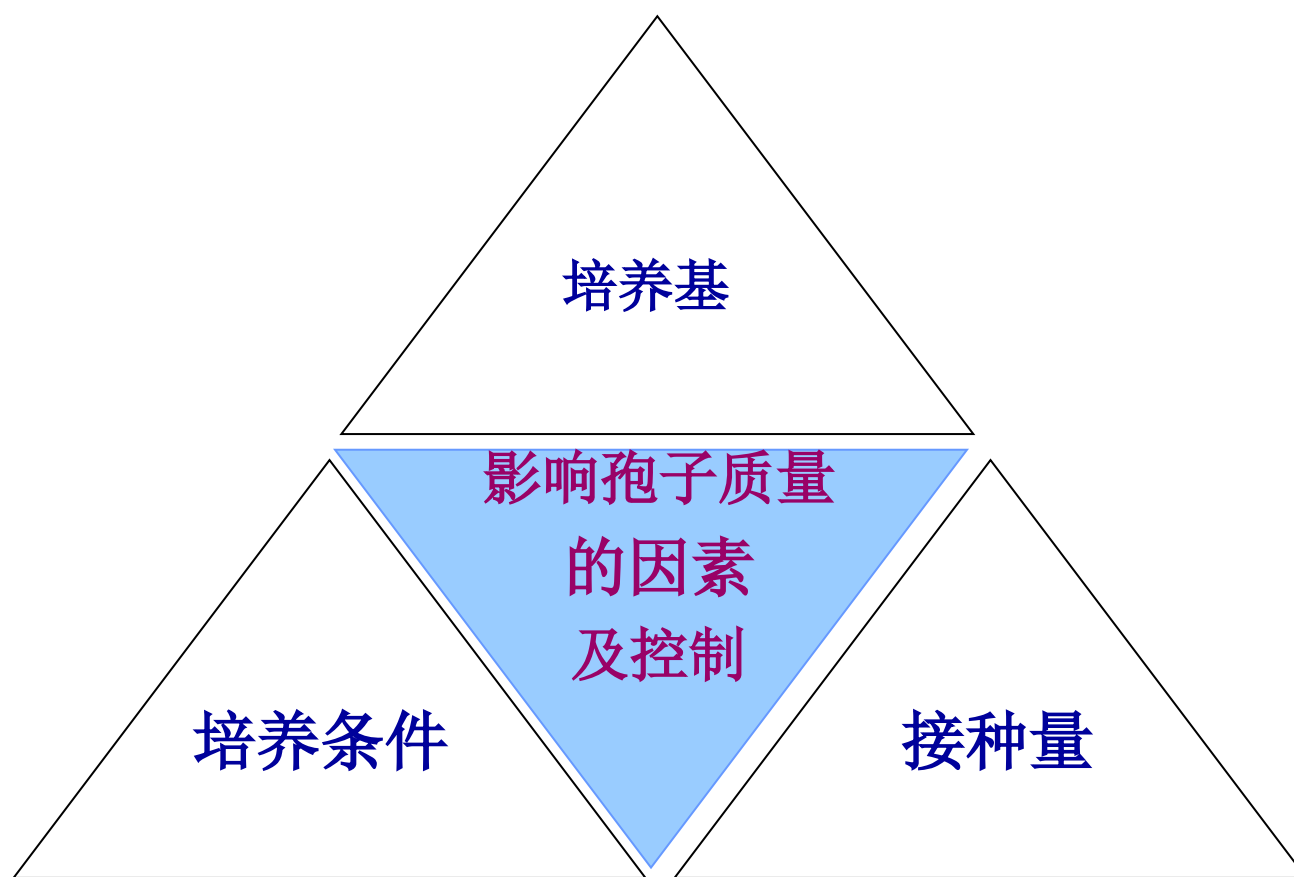
一、影响孢子质量的因素及其控制

培养基、培养温度和湿度、培养时间和接种量。

二、影响种子质量的因素及其控制

孢子质量、培养基、培养条件、种龄和接种量。

一、影响孢子质量的因素及其控制



(一)培养基

影响因素： 原材料；琼脂的牌号不同；水质的影响

注意事项：

- ✶ 原材料需经过化学分析及摇瓶发酵实验
- ✶ 严格控制灭菌后的培养基质量
- ✶ 使用前应在适当温度下放置一定时间
- ✶ 考虑不同代谢类型的菌落对多种氨基酸的选择

(二) 培养温度和湿度

 菌体的糖代谢和氮代谢的各种酶类，对温度的敏感性是不同的，培养温度不同，菌体的生理状态也不同。因此，需要用最适合孢子生长的温度进行培养。

龟裂链霉菌斜面最适温度为 $36.5 \sim 37^{\circ}\text{C}$

 培养室的相对湿度对孢子形成的速度、数量和质量有很大影响。

在北方相对湿度控制在 $40\% \sim 45\%$ ；而在南方则控制在 $35\% \sim 42\%$

(三) 培养时间和冷藏时间

1、孢子的培养时间

孢子的培养时间应控制在孢子量多、孢子成熟、发酵产量正常的阶段终止培养。

2、孢子的冷藏时间

冷藏时间宜短不宜长。

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天左右冷藏，发现冷藏7~8天菌体开始自溶。而培养5天后冷藏，20天未发现自溶。

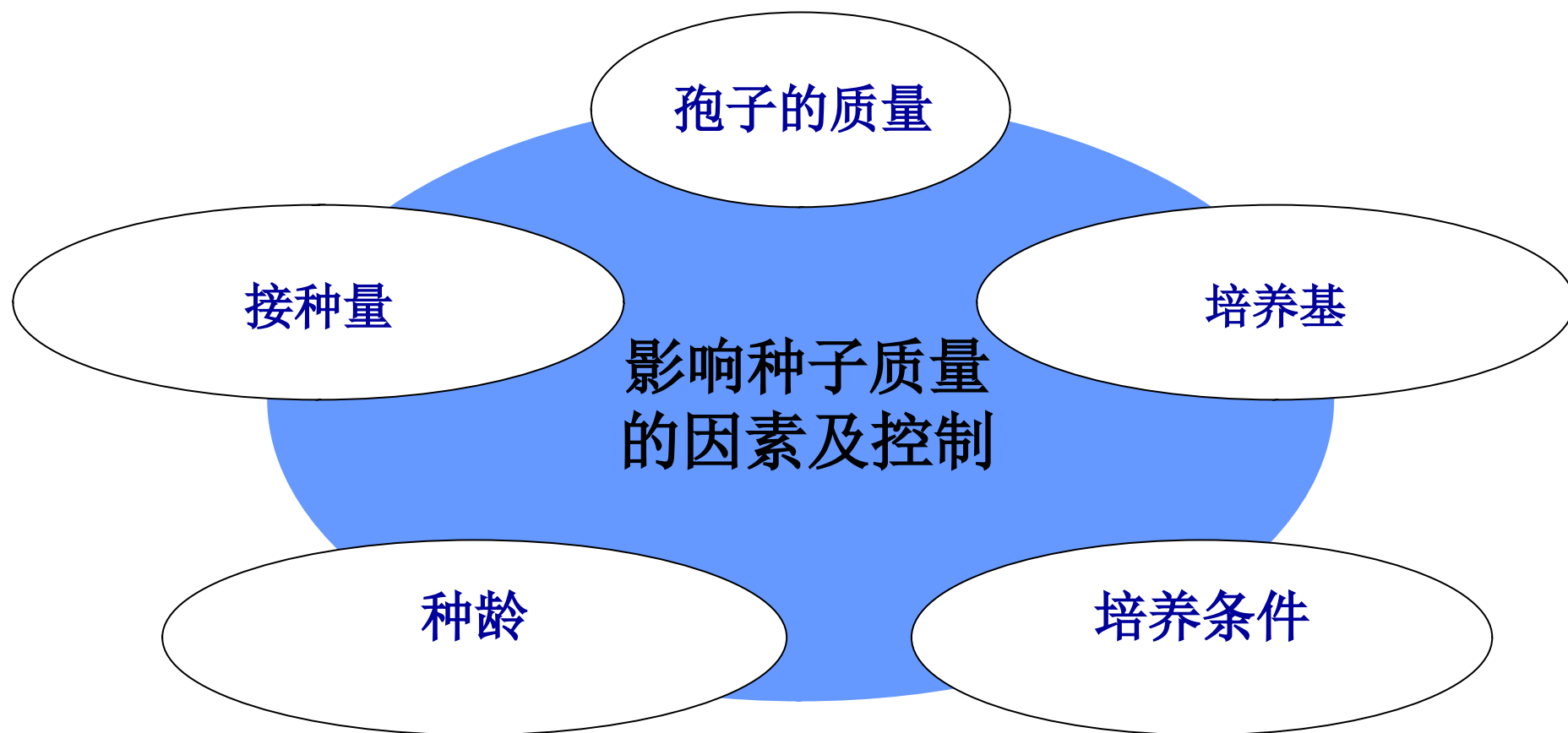
冷藏时间对孢子的生产能力也有影响。

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%。

(四) 接种量

- ✶ 制备孢子时的接种量要适中。接种量的大小影响到在一定量培养基中孢子的个体数量的多少，进而影响到菌体的生理状况。

二、影响种子质量的因素及其控制



(一) 培养基

主要是碳源、氮源、无机盐、生长素和水等。

选用原则：

- ✦ 营养成分适合种子培养的需要；
- ✦ 营养成分要尽可能地和发酵培养基接近；
- ✦ pH值要比较稳定

(二) 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。

(三) 种龄

种龄：种子罐中培养液从开始接种到移入下一级种子罐或发酵罐的培养时间。

★ 最适的种龄为生命力极为旺盛的对数生长期，菌体量尚未达到最高峰时移种。

★ 种龄过短——前期生长缓慢、整个发酵周期延长。
种龄过长——生产能力下降、菌丝过早自溶

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：<https://d.book118.com/918134007020006112>