

重庆工信职业学院
2026 年合同制工作人员招聘
药学教研室药品生物技术专任教师试讲内容

试讲题目：种子的扩大培养

主要内容：

- 1.孢子制备
- 2.种子制备

参考资料：

项目四 种子的扩大培养

学习引导



种子的扩大培养是菌种进行发酵生产的第一道工序，是菌种大规模培养的起步阶段，在整个微生物发酵过程中处于非常重要的地位，如何获得高质量的生产种子一直是工艺的核心。随着现代科学的进步，工业发酵规模越来越大，所以制备出发酵产量高、生产性能稳定、数量足且不被其他杂菌污染的生产菌种，是保证发酵生产水平的重要因素。种子质量主要受孢子质量、培养基、培养条件等因素影响。要获得质量优异的发酵种子液，如何对孢子质量进行控制？如何对种子培养基、培养条件等进行控制？

本项目主要介绍孢子及种子的制备过程、孢子质量与种子质量的影响因素与控制。

学习目标

1. 掌握 发酵种子扩大培养的制备过程及操作要点。
2. 熟悉 种子的质量标准；影响种子质量的因素。
3. 了解 种子异常分析。

种子的扩大培养又称为种子制备，指的是从保藏的休眠状态的菌种开始，经过试管斜面活化后，再经过摇瓶及种子罐逐级扩大培养而获得足够数量和优等质量纯种的过程。

种子制备是发酵制药工艺的关键步骤，发酵工业生产的种子必须满足以下条件：生长活力强，移种至发酵罐后能迅速生长，延滞期短；菌体的生理特性及生产能力稳定；菌体总量及浓度能满足发酵罐接种量的要求；无杂菌污染；能保持稳定的生产能力，保证终产物的合成量稳定。

种子制备一般包括两个过程：在固体培养基上生产大量孢子制备过程和液体培养基中生产大量菌丝的种子制备过程。

种子的制备采用两种方式：对于产孢子能力强及孢子生长繁殖快的菌种可用固体培养基培养孢子，孢子直接进罐作为种子罐的种子。这种方式操作简便，减少污染，而且固体孢子直接入罐优于菌丝进罐，因为分生孢子处于半休眠状态，入罐后每个个体都从同一水平起步生长繁殖，更易取得同步生长状态，后代菌丝的繁殖也比较一致；对于细菌、酵母菌、产孢子能力不强和孢子发芽慢的菌种可以采用液体摇瓶培养法。

任务一 生产菌种的制备过程



PPT

一、孢子制备

孢子制备是种子制备的开始,是发酵生产的一个重要环节。孢子的扩大繁殖可经过斜面培养基生长或谷物固体培养基生长,不同菌种的孢子制备工艺有不同的特点。

(一) 霉菌孢子制备

霉菌孢子的制备一般采用大米、小米、玉米、麸皮、麦粒等天然农产品为培养基,这些农产品中的营养成分适合霉菌的孢子繁殖,培养基的表面积大,获得孢子数量要比营养琼脂斜面多。而且培养简单易行、成本低。霉菌孢子的制备首先将保存的菌种接种到斜面培养基上,孢子成熟后制成孢子悬浮液接种于大米等培养基中,培养温度 $25\sim 28^{\circ}\text{C}$,培养时间一般为 $4\sim 14$ 天,待孢子成熟后,放置 4°C 冰箱中保存备用。

(二) 放线菌孢子制备

放线菌的孢子培养多数采用琼脂斜面培养基,培养基中含有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类物质等,一般情况下,干燥和限制营养可直接或间接诱导孢子的形成,放线菌孢子培养温度一般为 28°C ,培养时间为 $5\sim 14$ 天。培养基含碳源和氮源不应过于丰富,碳源过多($>1\%$)容易造成酸性环境,不利于放线菌的孢子繁殖;氮源过多($>0.5\%$)有利于菌丝繁殖而不利于孢子形成。如灰色链球菌在葡萄糖、硝酸盐的培养基上能很好地生长和产孢子,而加入 0.5% 酵母膏或酪蛋白后就只长菌丝而不长孢子。

放线菌发酵生产的工艺流程表示如下。

(1) 保存菌种→母斜面(孢子)→子斜面(孢子)→种子罐→发酵罐。

(2) 保存菌种→母斜面(孢子)→摇瓶菌丝→种子罐→发酵罐。

采用哪一种形式的斜面孢子接入种子罐进行培养,视菌种特性而定。采用母斜面孢子有利于防止菌种的变异,而采用子斜面孢子可节省菌种用量。

(三) 细菌孢子制备

细菌的菌种一般保藏在冷冻干燥管内,产芽孢的芽孢杆菌有的也保存在砂土管中。细菌的斜面培养基多采用碳源限量而氮源丰富的配方,牛肉膏、蛋白胨常用作有机氮源。细菌的培养温度多数为 37°C ,少数为 28°C 。培养时间随菌种的不同而异,一般为 $1\sim 2$ 天,产芽孢的细菌需培养 $5\sim 10$ 天。

(四) 孢子制备的技术要点

制备霉菌类孢子时,为便于挑选理想的菌落,母斜面上的菌落要求分散。挑单菌落种子斜面时,要挑取菌落中央部位的孢子。斜面制备大米孢子时,孢子悬液的浓度应适当,接种后将大米等固体培养基与孢子悬液混合均匀,待孢子生长成熟后,在真空下将水分含量抽至 10% 以下,密封后置 4°C 冰箱中保存备用。放线菌类孢子的制备,灭菌后的培养基如有不溶解的原材料,应轻轻摇匀,注意不要产生气泡,经检查无杂菌和无冷凝水后备用。

二、种子制备

液体种子的制备是将固体培养基上培养出的孢子或菌体转入液体培养基中培养,使其繁殖成大量菌丝或菌体的过程。种子制备的目的是为发酵生产提供一定数量和质量种子。种子制备所使用的培养基和工艺条件,要有利于孢子发芽和菌丝的繁殖。生产种子制备包括摇瓶种子制备和种子罐种子制备。

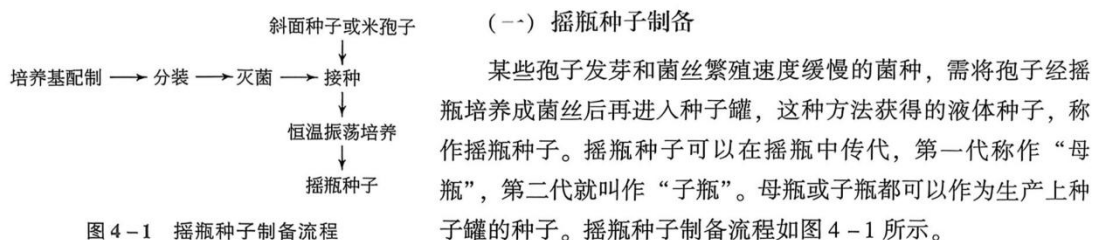


图4-1 摇瓶种子制备流程

1. 培养基配制 摇瓶相当于微缩了的种子罐,培养基配方和培养条件都与种子罐相似。培养基成分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,原则上各种营养成分不宜过浓,子瓶培养基浓度比母瓶略高,更接近种子罐的培养基配方。此外,摇瓶种子在培养过程中因不便于调节pH,所以在培养基成分的选择时应考虑培养过程中pH的稳定性,可以通过生理酸、碱性物质的平衡搭配及加入磷酸盐、碳酸钙等缓冲剂来调节。

2. 接种 摇瓶种子的接种方法包括斜面种子挖块法、米孢子粒计数接入法和菌悬液接种法。前两种接种法难以掌握一致的接种量,可能影响种子质量的稳定。因此最好采用菌悬液接种法,方法如下:向琼脂斜面培养物上加入无菌蒸馏水,将斜面种子或米孢子粒上的细胞或孢子洗下,制成细胞或孢子悬液,用无菌吸管接种至摇瓶种子培养基中。

3. 培养 摇瓶种子在恒温摇床上进行培养。摇床分旋转式和往复式,多采用旋转式。根据菌种不同的生长特性控制其在最适的温度和湿度环境下,同时设定一定的摇床转速,保证摇瓶种子具有较合适的溶解氧。

4. 保存 摇瓶种子最好培养成熟后立即使用,如暂时不用,需放置4℃冰箱环境保存,时间最好小于3天。经过保存的摇瓶种子一般不用作生产种子,可用于摇瓶发酵实验或小型发酵罐实验。

(二) 种子罐种子制备

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,达到一定的菌体数量和浓度,利于产物的合成。种子罐种子的制备工艺过程因菌种不同而异,一般可分为一级种子、二级种子、三级种子。孢子或者摇瓶菌丝接入体积较小的种子罐中,经过培养后形成大量的菌丝,该种子称为一级种子,把一级种子转入发酵罐内发酵,称为二级发酵。如果将一级种子接入体积较大的种子罐内,经过培养形成更多的菌丝,这样制备的种子称为二级种子;将二级种子转入发酵罐内发酵,称为三级发酵;依此类推,使用三级种子的发酵称为四级发酵。

种子罐的级数主要取决于菌种的性质、菌体生长速度及发酵罐的容积。孢子发芽和菌体开始繁殖时,菌体量很少,在小型罐内即可进行,而发酵时为了获得大量发酵产物,需要在大型发酵罐内进行。生长速度慢的菌种常常采用较多的发酵级数,如生产链霉素的灰色链霉菌,因菌种生长慢采取了四级发酵。同样的菌种,发酵罐的体积越大,需要的种子也越多,故需要较多级数的种子扩大培养,才能达到接种量的要求。