

NAU



南京农业大学
NANJING AGRICULTURAL UNIVERSITY

发酵工程



主讲人：陈晓红

电 话：13951009867

E-mail: xhchen@njau.edu.cn

第三章 菌种及种子制备

❧ 第一节、菌种选育

❧ 第二节、菌种的衰退、复壮及保藏

❧ 第三节、国内外菌种保藏机构

❧ 第四节、种子制备

第一节 菌种选育

- ✦ **菌种选育的理论基础：**微生物遗传学、分子遗传学
- ✦ **质粒 (plasmid)：**有时也称作核外基因，为非核染色体的共价闭环状DNA分子，具有自主复制功能，并带有某些特殊遗传性状的基因。质粒据其所具有的性状分为致育因子（F因子）、耐药因子（R因子）等
- ✦ **基因(gene)：**一个含有特定的遗传信息的核苷酸序列，是遗传物质最小功能单位，其物质基础是DNA或RNA

一、基于基因突变理论的育种技术

1、自然选育：利用微生物在一定条件下产生自发变异，通过分离、筛选，排除劣质性状的菌株，选择出维持原有生产水平或具有更优良生产性能的高产菌株，达到纯化与复壮菌种、保持稳定生产性能的目的。其主要原理是把微生物群体分离。

自然选育的方法与步骤：

- (1) 通过表现形态淘汰不良菌株**
- (2) 考察目的代谢产物产量**
- (3) 进行遗传基因型纯度试验，考察菌种纯度**
- (4) 传代稳定性试验：斜面传3-5代**

2、诱变育种：指人为地、有意识地将对象生物置于诱变因子中，使该生物体发生突变，从这些突变体中筛选具有优良性状的突变株的过程（提高了菌种发生突变的频率和变异幅度，提高获优机率）

常用的诱变剂：

- ✦ **物理诱变因子：**紫外线、X射线、快中子等
- ✦ **化学诱变因子：**硫酸二乙酯（DES）、亚硝酸、吖啶橙
- ✦ **生物诱变因子：**噬菌体、转座子等

影响诱变效果的因素：

外部环境条件： 如温度、氧气、pH、水分

出发菌株的选择： 生产菌株、野生菌株

合适的诱变剂量： 大多采用70-80%或更低的致死剂量

出发菌株的生理状态： 细菌-对数生长期；幼年孢子；营养体；湿态敏感（ 10^6 个/mL孢子悬浮液或 10^8 个/mL的菌液）

诱变效应的测定： 直接法和浓缩法，培养后测定菌株的目的代谢产物量

诱变方法： 单因子、复合诱变

优良突变株的筛选方法： 随机筛选或半理性化筛选

二、基于基因重组理论的育种技术

1、杂交育种：两个基因型不同的菌株通过接合使遗传重新组合，从中分离和筛选具有新性状的菌株。

原始亲本：用来杂交的野生型菌株，可以是不同谱系的，也可以是相同谱系但代数相差较多的，遗传基础差别要大，特性清楚，遗传标记明显。

直接亲本：直接用于配对的菌株，一般由原始亲本经诱变剂处理得到，一般要做遗传标记，常用的标记有营养（用得较多）、形态、抗性、敏感性、产量、酶活等

杂交育种常用的几种培养基：

完全培养基：含有糖类、多种氨基酸、维生素及核酸碱基及无机盐等比较完全的营养基质，野生型、营养缺陷型菌株均可生长

基本培养基（要求严格）：只含纯的碳源、无机氮、无机盐类，不含有氨基酸、维生素及核酸碱基等有机营养物，只允许野生型菌株生长、营养缺陷型菌株不能生长

有限培养基：在基本培养基或蒸馏水中含有10-20%完全培养基成分的

补充培养基（鉴别培养基）：在基本培养基中加入已知成分的氨基酸、维生素及核酸碱基等

2、原生质体融合：

通过酶解作用将两个亲株的细胞壁去除，在高渗条件下释放出只有原生质膜 包被着的球状原生质体，然后将两个亲株的原生质体在高渗透条件下混合，加入融合促进剂或电融合等助融，使它们相互凝集，从而促使两套基因组之间的接触、交换、遗传重组，在适宜条件下使细胞壁再生，在再生细胞中获得重组体

原生质体融合的一般程序：

- (1) 标记菌株的筛选：营养缺陷、抗药、某特征产物、菌落形态、培养特征等**
- (2) 原生质体的制备：酶解去除两个亲株的细胞壁，细菌、放线菌采用溶菌酶（Lysozyme），酵母菌用蜗牛酶，丝状真菌用蜗牛酶、纤维素酶（一般用复合酶）**
- (3) 原生质体的再生**
- (4) 原生质体的融合**
- (5) 融合子的选择：融合子的遗传分析**
- (6) 优良菌株的筛选**

3、基因工程育种：

又称遗传工程、DNA重组技术、基因克隆。指将某一生物体（供体）的遗传信息（基因）在细胞外与载体相连接（重组），构建成一个新的重组DNA分子，然后将其转入另一些生物体（受体）细胞中，使引入的供体DNA片段成为受体遗传物质的一部分，其所带的遗传信息得以表达或创建出一个新的物种，经改造过的菌称为“工程菌”。

基因克隆基本程序：

- 1) 含目的基因DNA的制备
- 2) 选择合适的载体
- 3) 带有目的基因的DNA片段与载体连接
- 4) 将重组的DNA分子转入受体细胞，在受体细胞内扩增
- 5) 筛选出具有重组DNA分子的转化细胞
- 6) 表达，鉴定外源基因的表达产物

第二节 菌种的衰退、复壮及保藏

由于微生物传代过程中不断产生变异，即**遗传变异是绝对的，而稳定是相对的**。菌株的优良性状不可能永久保持下去，即发生衰退（或退化）。这就需要通过创造适宜的环境来限制退化速度，并且要掌握如何让退化的菌种恢复其原来的优良性状（复壮）的方法。

一、菌种的衰退

◆衰退（退化）：

由于菌种的自发突变使其典型性状，特别是产量性状发生负变的现象。

这是一种群体现象，伴随营养物质代谢和生长繁殖能力下降、发酵周期延长、抗不良环境条件性能减弱等。

一、菌种的衰退

◆ 引起菌种退化变异的因素：

❖ 遗传基因型的分离

❖ 丝状真菌、多细胞组成、有的单核、有的多核，遗传物质基础有多样性的复杂性，为群体繁殖，往往出现遗传基因型的分离，这是数量遗传的自体调节现象。

❖ 自发变异的产生：负向变异为多数，结果：目的代谢产物产量下降，生长逐步变弱变慢，孢子形成能力低下等。

❖ 原因可能有：长期保藏；频繁传代（例：斜面保藏；发酵厂种子制备）；菌体在代谢过程中产生具有诱变作用的物质；存在增变

❖ 人工诱变导致的退化变异

一、菌种的衰退

◆衰退的防止：

- ❖ 控制传代次数：不超过7代，易变异的不过5代
- ❖ 砂土管、冻干管保藏的原种，开启不能超过3次，以防污染。
- ❖ 选择良好的保藏方法：保证菌不死、不衰、保存活性及原有典型性状
- ❖ 良好的培养条件：注意斜面菌株的培养条件。（保藏培养基、活化培养基）
- ❖ 采用不同类型的细胞进行接种
 - ❖ 产孢子霉菌
 - ❖ 细菌

二、菌种的复壮

❖ 复壮：

广义——是指在菌种的生产性状尚未衰退前，就经常有意识的进行纯种分离和生产性能的测定，从而使菌种的生产性能逐步提高的一种措施。

狭义——指菌种已经发生衰退后，再通过纯种分离和性能测定的办法从衰退的群体中找出尚未衰退的个体，以达到保持该菌种原有典型性状的一种措施。

二、菌种的复壮

复壮的方法通常有两种

❖ 纯种分离

❖ 淘汰已衰退的个体

三、菌种保藏

- ❖ **根本目的**是保持原有典型形状，防止退化、死亡及杂菌污染
- ❖ **途径**：挑取其休眠体（分生孢子、芽孢），在其休眠后停止生长的条件下保藏。即缺乏营养、缺水、缺氧、低温等。
- ❖ **重要因素**：低温
- ❖ **要求不损伤细胞**，缓冻易使细胞死亡，速冻利于细胞保护。

(一) 冻干保藏

❖ 适于98%以上各类别的微生物，但不适于不产孢子的丝状真菌的菌丝体

❖ 原理:在低温下快速将细胞冻结，然后在真空条件下干燥，使微生物的生长和酶活动停止，为防止冷冻和水分升华中对细胞的损害，采用保护剂代替干燥中丢失的结合水而稳定细胞的构型。防止细胞膜因冻结而破坏，还可以起支撑作用，使微生物疏松的固定在上面。

(一) 冻干保藏

步骤:

❖ 安瓿管准备

❖ D=8mm, H=100mm的中性安瓿管, 用2%HCL浸泡24小时
→自来水冲净→蒸馏水洗1-2次→烘干→管口塞上棉塞→168-170℃, 干热灭菌2小时。

❖ 保护剂制备:

❖ 脱脂牛乳或血清、乳糖、葡萄糖等 (不含抗生素), 蒸馏水配成17%-20%的脱脂乳 (在无菌的干燥三角瓶中) →121℃,5min or 108℃,15min 杀菌 (血清等用过滤除菌)

(一) 冻干保藏

❖ 菌种准备及分装

菌悬液的制备：

❖ 斜面（稳定期）

❖ 斜面菌种或培养皿培养菌体细胞→每个斜面加2-3ml**灭菌保护剂**→用接种环将菌苔刮起（若液体培养，则应离心收集菌体，并经灭菌生理盐水洗涤，收集的菌体用保护剂制成菌悬液）制成**菌悬液**（ 10^9 - 10^{10} CFU/mL）→用灭菌的滴管将菌悬液滴加至**安瓿管**底部，装量一般为球体的2/3左右位置（视干燥剂性能而定）→管口塞好**灭菌棉**

(一) 冻干保藏

❖ 预冻：-70℃至全部冻结

❖ 冷冻干燥：

❖ 冷冻干燥器密封→开启降温至-50℃→开真空泵→冷干块或松散片状（1%-3%水分）→停机，放气（传感器）

❖ 取出，用酒精喷灯烧焙密封，低温保藏（-18℃）

冻干菌种



冻干管的启用：

取出安瓿管

酒精表面消毒

近顶部在酒精灯火焰上灼烧

迅速滴上冷无菌水

管破裂（敲或掰）

加入0.3-0.5ml液体培养基溶解冻干菌块成悬液

用无菌滴管或接种环移至液体或斜面上进行培养

(二) 低温保藏法:

- ❖ **斜面孢子, 液态孢子, 斜面种子→4℃保藏**
- ❖ **一般只宜1-2个月 (水分浓度较高)**
- ❖ **注意: 不宜用于生产菌种保藏, 也不适于名贵菌种保藏。**
- ❖ **适用于临时周转**

(三) 低温定期移植法:

❖ **传统方法:** 少数冷冻保存易死亡的菌种用此法

❖ **步骤与方法:**

❖ 斜面菌种→低温干燥处→每3-6个月移植

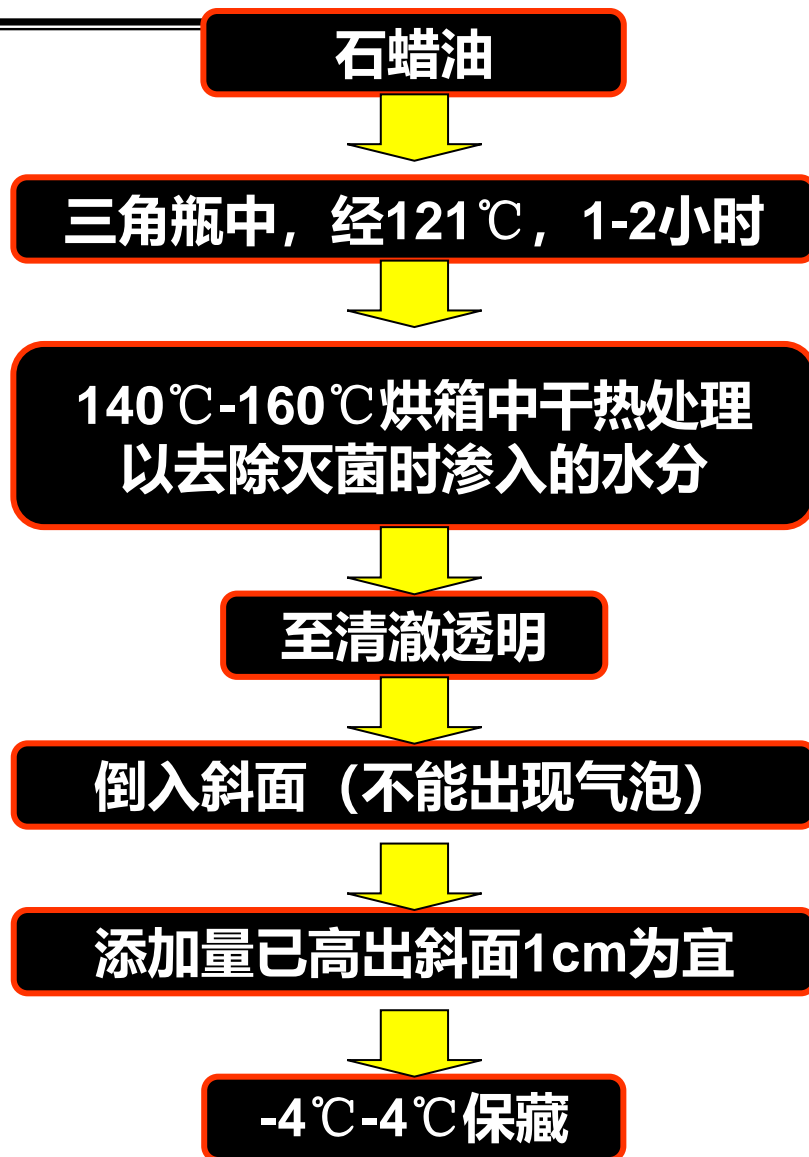
❖ 穿刺培养: 含0.6%-0.8%琼脂培养基装试管灭菌→用接种针尖挑取少量菌体, 垂直刺入琼脂培养基中心→适温培养→长好后低温保存

❖ 大肠杆菌此法可保藏两年以上, 不发生明显变异。

❖ **缺陷:** 易发生遗传变异 (连续传代丢失或减弱形状, 也易污染杂菌)。不宜用于贵重菌株或生产优良菌株。

(四) 石蜡油低温保藏

适用于不产孢子的菌种
(如：平菇菌种)
不适用于利用石蜡的石油微生物
斜面菌种(斜面不宜过长)



(五) 砂土管保藏

❖ 方法:

❖ 河砂→40目筛→加入1%HCL置30分钟→蒸馏水冲洗至中性→烘干黄土（地表1尺以下，瘦）→晒干磨细，过120目筛，砂：土=4：1（若土粗些，可3：2或1：1）→溶入小试管（50*80）装量1cm，塞棉塞→121℃，1小时或170℃，2小时→制菌悬液（孢子液）→每增加0.1ml悬液→真空干燥3-4小时用 P_2O_5 或 $CaCO_3$ 作干燥剂→保存与真空干燥状态下，4℃

❖ 适用于保藏产孢子的放线菌，霉菌及产芽孢的细菌（孢子、芽孢）

(六) 甘油管保藏

80%甘油高压蒸汽灭菌 (121℃, 30min, 一小时) 斜面菌种用无菌水制成高浓度 (10^8 - 10^{10} /ml) 菌悬液, 液体菌种离心并用无菌生理盐水洗涤→各取等体积入菌种管或离心管 (甘油终浓度约40%) , -20℃保存 (冻存)

——细菌 (LAB)、酵母应用均较好。

(七) 液氮超低温保藏

10%甘油或
5-10%的二甲亚砷
做保护剂

每分钟下降1℃

冻结

移入液氮

第三节 国内外菌种保藏机构

- **职能:**

从事微生物菌种的收集、保藏、管理、供应与交流，促进中国微生物菌种保藏的合作、协调与发展，以便更好地利用微生物资源

第三节 国内外菌种保藏机构

- **国内现有的菌种保藏管理机构：**

中国微生物菌种保藏管理委员会（CCCCM） 办事处：中国科学院微生物研究所内

普通微生物菌种保藏管理中心（CCGMC）： 中国科学院微生物研究所（AS）：真菌、细菌；中国科学院武汉病毒研究所（AS-IV）：病毒

- ❖ **国外主要菌种收集保藏机构：**

美国标准菌种收藏所（ATCC），美国马里兰州罗克维尔市

- ❖ **保藏菌种类型：**

模式菌种（标准菌种）、普通菌种、生产应用菌种

第四节 种子及种子制备

- 种子制备:

指用一定量菌种（孢子或菌体）在一定条件下经过逐步扩大繁殖成为具有一定数量和质量纯种供给下一步发酵及合成代谢产物使用，这一过程称种子制备。

一、种子制备及质量基准

❖ 种子的质量基准：

- ❖ 数量：要求能满足发酵罐接种后菌体浓度的需求
- ❖ 质量：活力强，无污染，生理性状稳定。

种子制备过程

❖ 实验室种子制备：

❖ 活化、纯化、复壮→生产用斜面

❖ 生产大量孢子的孢子制备或摇瓶菌丝体或一般菌体的制备

❖ 生产车间种子制备：

生产大量菌丝体或菌体的种子制备

例：啤酒酵母种子制备

斜面原种 → 10mL试管, 10-12度麦芽汁5mL
(25 °C, 24-36h) → 250mL三角瓶, 10-
12度麦芽汁50mL (25 °C, 24-36h) → 3L
三角瓶, 10-12度麦芽汁500mL (20 °C,
24-36h) → 20L卡氏罐, 10-12度酒花麦芽
汁10L (15-18 °C, 24-36h) → 200L密闭
罐, 10-12度酒花麦芽汁100L (10 -15°C,
24-36h) → 1.5-2.0立方酵母罐 → 发酵罐

例：摇瓶种子制备

斜面原种 —— 液态或固态活化（液体试管、斜面） —— 250mL三角瓶扩培（往复式、振荡式摇床） —— 1L三角瓶扩培（往复式、振荡式摇床） —— 一级种子罐 —— 二级种子罐
罐 —— 发酵罐

例：孢子制备

斜面原种 —— 固态活化（试管斜面） —— 茄
子瓶扩培（孢子房，温度、湿度控制） ——
孢子悬浮液制备 —— 一级种子罐 —— 二级种
子罐 —— 发酵罐

(一) 孢子制备 (放线菌、霉菌)

- ❖ **孢子处于休眠状态，对外界抵抗力较强，制备较为方便。**
- ❖ **发酵生产中,当菌种满足以下条件时则可用孢子的则可用孢子形态接种:**
 - ◆ **产孢子丰富**
 - ◆ **孢子发芽率高,发芽速度快**

影响孢子质量的因素

培养基要求：

❖培养基水分要求：

- ❖人工琼脂斜面

- ❖农副产品(麸皮、大小麦、玉米碎粒等)制孢子
(对培养基水分要求高)

- ❖培养基C、N比：限制N源对产孢子比较有利。

影响孢子质量的因素

❖外部条件要求:

❖ 温度:

- ❖放线菌：温度一般28℃，少数37℃；时间：5-14天
- ❖霉菌：温度一般25-28℃，时间：4-14天
- ❖孢子：5℃保存备用，可连续使用半年左右
- ❖对不同菌种而言,提高或降低温度都可能促进孢子产生(如少孢根霉RT-3、腐乳毛霉等)

❖ 湿度:

- ❖较低的湿度利于孢子形成

影响孢子质量的因素

❖ **孢子龄**：要处于成熟期，效价正常平稳

❖ 太嫩，冷藏中易死亡，也会延长发酵周期，易染菌

❖ 太老，生产力弱

❖ **孢子数量**：孢子悬浮液中的孢子浓度

❖ 接种时接种量大一些，可形成较多的小球体

❖ **保藏方法**：必须低温，尽可能干燥

❖ 砂土管：打开次数不能多于3次，不能受潮，升温变异

❖ 米粉保藏法

孢子质量控制

- ❖ 合适的孢子龄
- ❖ 保藏方法：无论何法保藏，均须低温保存，1年要进行一次自然分离
- ❖ **培养方法**：配制培养基的主要原料最好能保持稳定，或经成分分析、试验后才使用
- ❖ 制备的各类孢子在外观上要求：均匀、色泽正常，经摇瓶试验
- ❖ 注意孢子的生理形状和产量的相关性，（菌丝很短，分布均匀）

(二) 摇瓶菌（丝）体制备

❖ 影响因素：

❖ 培养基的组成、配比

❖ 培养温度

❖ 溶氧（摇床转速（振幅、频率））——旋转、往复

❖ 装液量——好氧菌的瓶塞，如红曲

❖ pH

❖ 种龄，要求处于对数生长期，但注意装液量对生长及次级代谢产物的影响不一定同步。发酵过程中由于染菌把发酵次序打乱。



二、生产车间种子制备

(一) 接种方法:

- ✧ 火焰接种: 摇瓶种子→种子罐(实验室种子接入种子罐)
- ✧ 双种: 两个种子罐, 一个发酵罐
- ✧ 倒种: 两个种子罐若污染了, 从一个发酵罐到另一个发酵罐
- ✧ 压差法: 种子罐→发酵罐
- ✧ 孢子接种: 微孔接种法 (或以孢子悬浮液接种, 10^6 个/mL以上)

(二) 种子级数 (代数)

❖ **种子级数：指制备种子需逐级扩大培养的次数。**

❖ **一级种子制备：孢子、摇瓶菌丝体接入种子罐
→ 发酵罐 (称二级发酵)**

❖ **二级种子制备：孢子 (摇瓶) → 种子罐 → 种子
罐 → 发酵罐 (称三级发酵)**

❖ **三级种子制备：孢子 (摇瓶) → 种子罐 → 种子
罐 → 种子罐 → 发酵罐 (称四级发酵)**

(三) 车间种子制备考虑的因素

❖ **菌种特性（遗传稳定性）：**级数少些，稳定性高

❖ **孢子发芽及菌体繁殖速度：**

❖ 生长快的细菌，级数少些，二级；慢的如链霉菌，则可四级

❖ 一般级数越少，可减少因多次接种染菌的机会，但会延长发酵罐生产产物的时间、发酵罐中孢子萌发、菌体生长占用时间。

❖ **孢子瓶中孢子或菌体数量**

❖ **最低接种量**

❖ **生产规模**

接种龄：

- ❖ **发酵罐中培养的菌体开始移入下一级种子罐或发酵罐时经过的培养时间。**
- ❖ **以菌体处于生命力极为旺盛的对数生长期、且培养液中菌体量尚未达到高峰为宜。**
 - ❖ **太年轻：**前期生长缓慢而延长发酵周期，产物形成推迟，甚至因菌量减少而在罐内生球，造成异常发酵
 - ❖ **太老：**生产能力下降，过早自溶。

接种量

❖ 为进一步扩大菌体量，种子液需从一级种子罐移入二级种子罐，或从种子罐到发酵罐所接入的种子液体积与接种后发酵液体积之比。

❖ **最低接种量：**

❖ 细菌1%左右

❖ 霉菌10%左右

❖ 放线菌7-15%

❖ 酵母菌4-6%

接种量

❖ 接种量大的往往是产胞外酶少的或不易吸收培养基中的养分。 (大多抗生素接种量7-15%，特殊情况 20-25%，而棒状杆菌只有1%)

接种量

❖ **小接种量**, 缺点: 发酵周期长, 能耗多, 染菌机会多

❖ **大接种量**, 优点: 易适应, 立即进入对数生长期, 分泌的胞外酶多, 有利于对原料的充分利用, 有群体优势, 减少杂菌污染, 缩短发酵周期, 提高发酵生产率。

❖**生长过快：**使溶解氧不足，菌体自溶，代谢物过少（可通过加大通风量来弥补溶解氧不足）。

❖**现代工业发酵趋势：**大多数为大接种量，丰富培养基，大通风量。

车间种子罐级数确定方法（倒推法）：

- ❖ 指制备种子需逐级扩大培养的次數。
 - ❖ 生产规模→发酵罐的容积→最低接种量→最后一級种子罐所要求的接种量（不能超过孢子制备或摇瓶生产能力）
- 注：** 摇瓶最好不要超过10个。

影响种子质量的主要因素

- ❖ 培养基
- ❖ 种龄与接种量
- ❖ 温度
- ❖ pH
- ❖ 通气和搅拌
- ❖ 泡沫
- ❖ 染菌的控制
- ❖ 种子罐级数的确定

种子异常

1) 生长过慢或过快。

原因： a.培养温度是否是最适温度，
b.通氧量不够，过快主要是速效N过多

2) 结团。影响呼吸和营养物质吸收

原因： a.接种量不够（措施：加适量表面活性剂）
b.通气搅拌速度不够。

3) 粘壁。营养不够，水分不够，丝状真菌发酵易出现此现象

原因： a.异常代谢杂质增多，产量下降
b.搅拌通气不够
c.泡沫过多（措施：消泡，改善溶解氧）。

4) 代谢异常。判断方法是镜检菌体形态

提高种子质量的措施

- 遗传本质上：筛选优良菌株

内因： (1) 菌株的优良性（自然界筛选，遗传育种）
(2) 在对数生长期，但未达到高峰期

外因： (1) 适宜的培养基

- a. 比较高的N和P含量
- b. 与发酵培养基相近，使种子适应
- c. 注意营养缺陷型和反馈抑制（如：lys 缺陷，加入适量lys；流加解除反馈抑制）
- d. 注意抗性物质产物

(2) 适宜的条件：温度、pH值、溶解氧、接种量

三、种子制备的培养类型

❖ 工业微生物培养的方法分为**静置培养**和**通气培养**两大类型

❖ **静置培养**：啤酒、酒精、丙酮、丁醇、乳酸等，称**厌氧发酵**

❖ **通气培养**：谷氨酸、核苷酸、有机酸、酶制剂等，又称**好气性发酵**，分为**液态培养**和**固态培养**

通常的种子扩大培养

- ❖ **液体培养法：**摇床（回转式、往复式）

- ❖ 如：红曲摇瓶获得均一大小的菌球

- ❖ 摇床转速：太慢或接种量太少

- ❖ **表面法培养：**茄子瓶、克氏瓶、瓷盘

- ❖ **固态法培养：**三角瓶、蘑菇平、克氏瓶、培养皿等，

- ❖ 麸皮或其他农副产品制曲或种曲

大规模工业发酵常用的培养方法

❖ 曲法培养：

- ❖ 浅盘固体培养（固体曲）

- ❖ 深层固体培养（机械通风制曲，或圆盘制曲（机轮））

- ❖ 特点：固体曲的酶活力高，源于中国

❖ 浅盘液体培养

大规模工业发酵常用的培养方法

❖ 深层液体通气培养

❖ **特点**是对于代谢的营养要求以及不同生理时期的通气、搅拌、温度与培养基中氢离子浓度等影响，选择最佳条件。

❖ **易染菌**

大规模工业发酵常用的培养方法

❖ 载体培养

❖ 脱胎于曲法培养，又吸收了液体培养的优点，以天然或人工合成的多孔材料代替麸皮制来的固态基质作为微生物的载体，发酵结束后只需将菌体和培养液挤压出来进行抽提，载体又可重新使用。

❖ 用以培养霉菌、酵母、放线菌等→色素、肌苷酸、酶等

大规模工业发酵常用的培养方法

❖ 两步法液体深层培养

❖ 酶、氨基酸多用，便于研究微生物细胞的酶系统及氨基酸的合成途径

❖ **原理**：微生物生长与产酶的最适条件有很大差异

❖ **如**：往培养基中添加葡萄糖→大大促进菌体生长，但严重阻碍许多酶的合成（反馈抑制）

❖ **步骤**：菌种在丰富培养基上大量繁殖→收集菌体浓缩物→洗涤→转接入添加诱导物的产酶培养基。