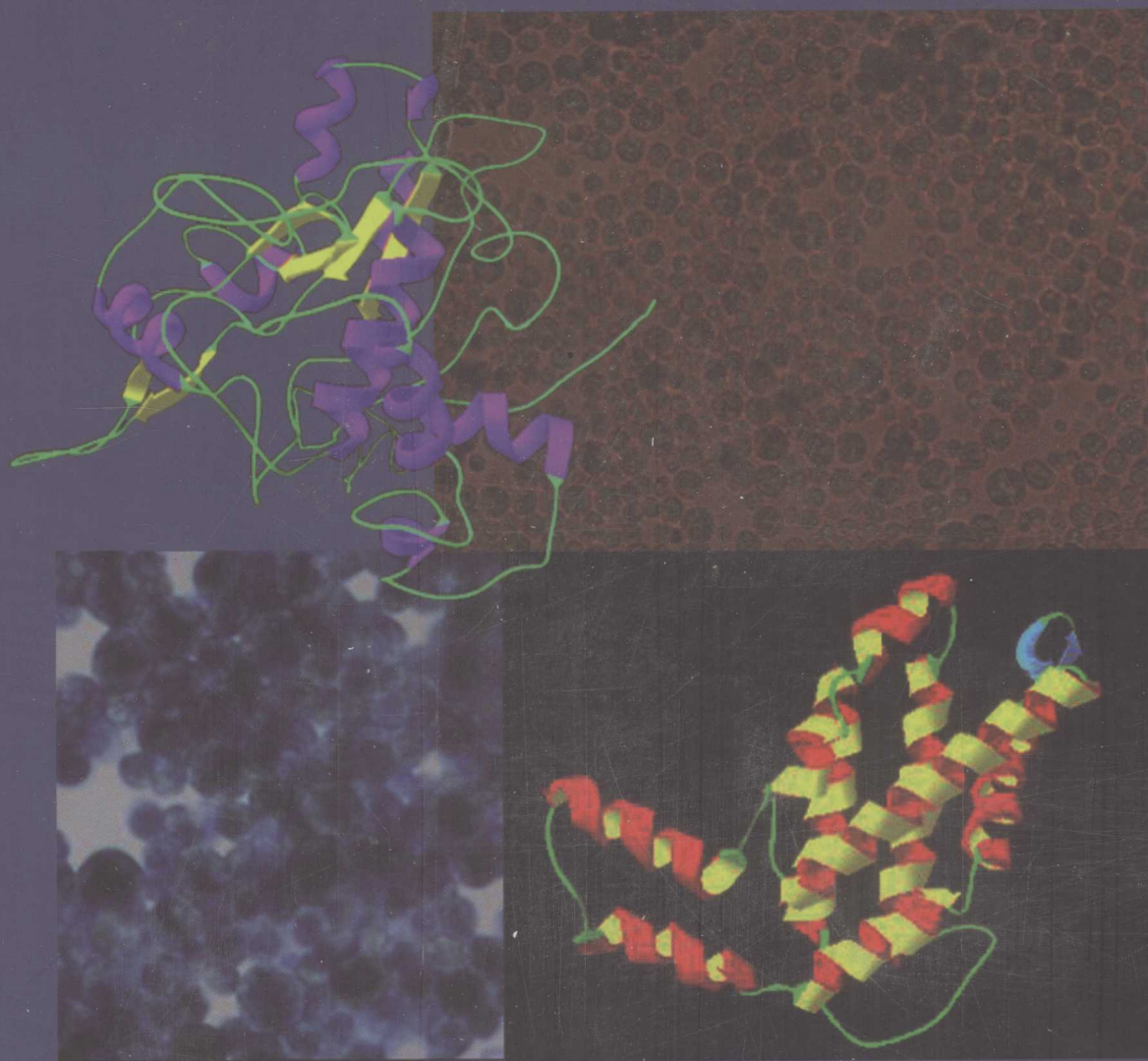


陈必链 主编

微生物工程

Microbial Engineering



科学出版社
www.sciencep.com

微生物工程

陈必链 主编

科学出版社

北京

内 容 简 介

本书按照微生物工程工业生产流程进行编排,全书共分12章,内容包括微生物工程的概念、发展史、微生物菌种选育的原理和方法、培养基的设计、微生物发酵过程的基本原理、发酵过程的参数控制原理、基因工程菌的培养、动植物和微藻细胞培养、清洁生产、生物炼制,扼要介绍了典型微生物发酵产品如抗生素、酶制剂、氨基酸、酒精等的生产工艺。

本书可供师范院校、农林院校、综合性大学的生物工程、生物技术专业的专业教材,也可作为生物制药、食品科学与工程、生物科学等专业的教学参考书,同时也适合相关领域的专业人员参考。

图书在版编目(CIP)数据

微生物工程/陈必链主编. —北京: 科学出版社,
2010. 7
高等师范院校生命科学规划教材
ISBN 978-7-03-028326-9

I. ①微… II. ①陈… III. ①微生物—生物工程—师
范大学—教材 IV. ①TQ92

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2010)第 137659 号

责任编辑: 陈 露 谭宏宇 / 责任校对: 刘珊珊
责任印制: 刘 学 / 封面设计: 殷 颀

科 学 出 版 社 出 版

北京东黄城根北街16号

邮政编码: 100717

<http://www.sciencep.com>

南京展望文化发展有限公司排版

江苏省句容市排印厂印刷

科学出版社出版 各地新华书店经销

*

2010年9月第 一 版 开本: A4(890×1240)

2010年9月第一次印刷 印张: 21

印数: 1—3 200 字数: 585 000

定价: 40.00 元

《高等师范院校生命科学规划教材》

编写委员会

主任委员 王全喜

副主任委员 安利国 何奕騏

委员 (按姓氏笔画排序)

马伯军 王全喜 王宝山 王曼莹

卢龙斗 安利国 朱 笃 杨 玲

何奕騏 张飞雄 张红绪 张恒庆

张彦定 林跃鑫 侯和胜 聂刘旺

徐来祥 彭贤锦 魏学智

秘 书 陈 露

《微生物工程》编写委员会

主 编 陈必链

副 主 编 朱 笃 杨 革

主 审 梁世中

编写人员 (按姓氏汉语拼音排序)

蔡海波 陈必链 陈 军 戴美学

胡青平 蓝灿华 刘 峰 刘 艳

石贤爱 唐良华 王白杨 王明兹

王筱兰 张秀红 谢必峰 杨 革

郑 毅 朱 笃

前 言

生物工程具有悠久的历史,在食品、医药、化工、能源、材料、环境保护和冶金采矿等领域为人类作出了巨大的贡献。从生物工程的发展过程,可以看出生物工程一直在起带头作用,它是现代生物工程的组成部分,是基因工程、酶工程、细胞工程等生物技术实现产业化的桥梁和关键技术。近年来随着基因组学、组合生物合成、蛋白质组学、代谢组学等的融入,微生物工程内涵也日益丰富,特别是利用代谢组学进行代谢工程研究,结合生物信息学和计算生物学的研究,可达到改造和控制细胞性质、提高底物利用及产品收率、促进微生物工程发展的目的。

由于生物工程涉及面广,现有教材各有侧重点,适用范围各异。编写一部适合高师和理工院校自身实际教学情况同时又能兼顾其他方面内容的教材显得十分重要。正是基于此,在科学出版社上海分社、高等师范院校新世纪教材筹委会的指导倡议下,约请全国部分高师院校、理工大学的老师编写了本教材,参加编写的人员都是多年教授本门课程的一线教师。本书的编排格式按照微生物工程工业生产流程,根据学科发展情况新增一些内容,全书共分 12 章,内容包括微生物工程的概念、发展史、微生物菌种选育的原理和方法、培养基的设计、微生物发酵过程的基本原理、发酵过程的参数控制、基因工程菌的培养、动植物和微藻细胞培养、清洁生产、生物炼制,扼要介绍了典型微生物发酵产品如抗生素、酶制剂、氨基酸、酒精等的生产工艺。考虑到微生物发酵产品的分离精制理论和技术在生物工程下游加工工艺的教科书如《生物分离技术》、《生化分离工程》等已有详尽的叙述,本书不再介绍。本教材采用了较多的图和表,以便于教和学;每章附有知识点和复习思考题,希望有助读者理解和掌握有关概念、原理和方法。

本教材编写的具体分工如下:第 1 章,第 6 章第 1、2、3 节和第 9 章第 2 节由福建师范大学陈必链编写,第 2 章第 1、3 节和第 12 章第 1 节由福建师范大学郑毅编写,第 2 章第 2、4 节由福建师范大学谢必峰编写,第 3 章第 1、2、3 节和第 9 章第 1 节由山西师范大学张秀红编写,第 3 章第 4 节和第 12 章第 3 节由上海师范大学陈军编写,第 4 章由福建师范大学唐良华编写,第 5 章由江西师范大学朱笃编写,第 6 章第 4、5、6、7 节由山东师范大学戴美学编写,第 7 章由福建师范大学刘峰编写,第 8 章由江西师范大学王筱兰编写,第 9 章第 2 节由福建师范大学王明兹编写,第 9 章第 3 节由华东理工大学蔡海波编写,第 10 章由曲阜师范大学刘艳和杨革编写,第 11 章由福州大学石贤爱编写,第 12 章第 2 节由山西师范大学胡青平编写,第 12 章第 4 节由福建师范大学蓝灿华和王明兹编写,第 12 章第 5 节由南昌大学王白杨编写。研究生吴义诚协助本书部分章节的整理和制图。全书由陈必链负责统稿和定稿,华南理工大学博士生导师梁世中教授担任主审。

生物工程发展快速,因此难以完整地把国内外有关的先进技术反映出来,加之编者的水平有限,难免存在错漏和不足之处,欢迎专家、同行和使用本教材的教师、学生和其他读者提供宝贵的批评、建议与具体的修改意见,以便再版时加以修改和补充。在编写本教材过程中,参考了许多国内外相关的教材和文献资料,引用了一些图表,在此向有关作者表示感谢!特别感谢福建师范大学吴松刚教授和施巧琴教授的支持和厚爱!向为本教材的编写和出版提供指导、支持和帮助的各级领导、同行表达衷心的感谢!

陈必链

Email: chenbil@fjnu.edu.cn

福建师范大学

2010 年 1 月

目 录

前言

第 1 章 微生物工程概论	1
1.1 微生物工程的概念和特点	1
1.1.1 微生物工程的概念	1
1.1.2 微生物工程的特点	2
1.2 微生物工程的发展简史	3
1.2.1 微生物工程的自然发酵时期	4
1.2.2 微生物工程的近代时期——纯培养时期	5
1.2.3 微生物工程的发展时期——深层培养(通气搅拌)和代谢控制发酵时期	6
1.2.4 微生物工程的现代时期——基因工程时期	7
1.3 微生物工程的发展趋势	8
1.3.1 微生物工程的现状	8
1.3.2 微生物工程发展趋势	9
第 2 章 工业微生物菌种的选育及扩大培养	13
2.1 工业微生物菌种	14
2.1.1 工业发酵对微生物菌种的要求	14
2.1.2 工业微生物常用菌种	14
2.2 工业微生物菌种的分离和选育	19
2.2.1 工业微生物菌种的分离与筛选	19
2.2.2 工业微生物菌种的选育	23
2.3 种子的扩大培养	37
2.3.1 种子扩大培养的作用与目的	37
2.3.2 优质种子的标准	37
2.3.3 种子扩大培养的工艺流程	37
2.3.4 实验室菌种扩大培养	37
2.3.5 生产车间菌种扩大培养	38
2.3.6 种子质量的检查	38
2.3.7 影响种子质量的因素	39
2.3.8 种子异常分析	39
2.3.9 种子质量的控制措施	39
2.4 工业微生物菌种的保藏	40
2.4.1 斜面保藏法	40
2.4.2 液体石蜡油保藏法	41
2.4.3 干燥保藏法	42
2.4.4 冷冻干燥保藏法	43
2.4.5 真空干燥法	46
2.4.6 液氮超低温保藏法	46

2.4.7	液相保藏法	46
第3章	工业微生物的代谢调节和代谢工程	48
3.1	微生物的代谢与代谢调节	49
3.1.1	微生物代谢	49
3.1.2	微生物代谢调节的方式	49
3.1.3	酶活性的调节	50
3.1.4	酶合成的调节	52
3.2	初级代谢及代谢调节	56
3.2.1	初级代谢	56
3.2.2	初级代谢调节	56
3.3	次级代谢及次级代谢调节	61
3.3.1	次级代谢产物的特征	61
3.3.2	次级代谢产物的类型	62
3.3.3	次级代谢产物的生物合成	63
3.3.4	次级代谢的调节	64
3.4	微生物代谢工程及其应用	67
3.4.1	代谢工程概述	68
3.4.2	代谢工程的研究方法	70
3.4.3	代谢工程的应用	72
第4章	培养基的设计与灭菌	76
4.1	工业微生物培养基的成分	76
4.1.1	碳源	77
4.1.2	氮源	78
4.1.3	能源	79
4.1.4	无机盐	79
4.1.5	生长因子	80
4.1.6	水分	81
4.2	工业微生物培养基的种类	82
4.2.1	按培养基成分分类	82
4.2.2	按培养基外观的物理状态分类	83
4.2.3	按培养基的用途分类	84
4.3	工业微生物培养基的设计和优化	86
4.3.1	设计培养基的四个原则	86
4.3.2	设计工业微生物培养基的三道程序	88
4.4	工业微生物培养基的灭菌	89
4.4.1	湿热灭菌法	90
4.4.2	过滤除菌法	93
4.4.3	微波灭菌法	93
第5章	微生物发酵过程原理	95
5.1	微生物反应动力学概述	96
5.1.1	微生物反应动力学与发酵过程控制	96
5.1.2	微生物反应过程计量学	96

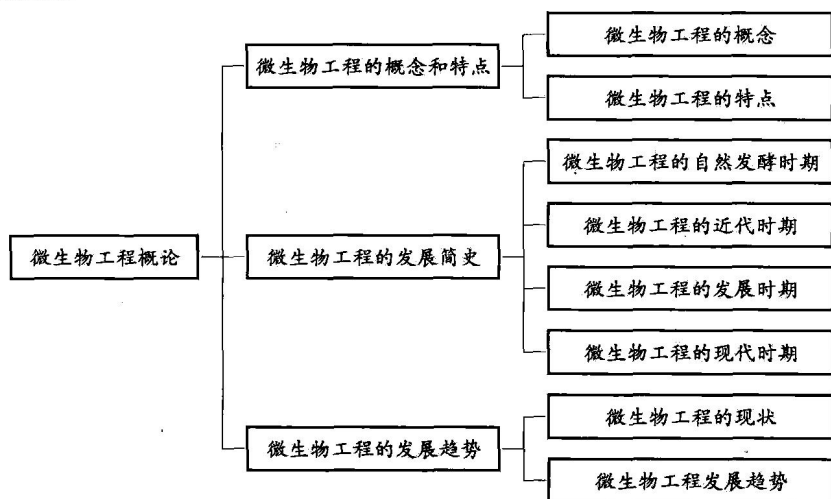
5.1.3 微生物反应动力学	100
5.2 微生物发酵操作方式	102
5.2.1 分批式操作	102
5.2.2 补料分批式操作	103
5.2.3 连续式操作	104
5.2.4 三种操作方式比较	106
5.3 微生物发酵动力学	106
5.3.1 分批培养动力学	106
5.3.2 补料分批培养动力学	111
5.3.3 连续培养动力学	113
第6章 发酵过程工艺的优化与控制	120
6.1 温度对微生物发酵的影响及控制	121
6.1.1 温度对发酵的影响	121
6.1.2 影响发酵温度的因素——发酵热	122
6.1.3 发酵过程温度的控制	123
6.2 pH对发酵的影响和控制	124
6.2.1 pH对发酵过程的影响	124
6.2.2 发酵过程中影响pH变化的因素	125
6.2.3 发酵过程pH的选择与控制	125
6.3 溶解氧对发酵的影响及控制	127
6.3.1 氧的传质阻力与传质方程式	127
6.3.2 影响氧传递速率的主要因素	129
6.3.3 发酵液中溶解氧浓度的控制	133
6.4 基质浓度控制	134
6.4.1 基质浓度对发酵的影响	134
6.4.2 补料的方式及控制	134
6.5 二氧化碳对发酵的影响及控制	138
6.5.1 二氧化碳对发酵的影响	138
6.5.2 二氧化碳浓度的控制	139
6.5.3 呼吸商与发酵的关系	139
6.6 泡沫对发酵的影响及控制	140
6.6.1 泡沫对发酵的影响	140
6.6.2 泡沫的形成和性质	140
6.6.3 发酵过程中泡沫的消长规律	140
6.6.4 泡沫的控制	141
6.7 发酵过程的优化与控制	144
6.7.1 发酵过程的优化	144
6.7.2 发酵过程自控	146
第7章 发酵染菌及其防治	149
7.1 染菌对发酵生产的影响	150
7.1.1 染菌对不同产品发酵过程的影响	150
7.1.2 不同时间发生染菌对发酵的影响	150
7.1.3 染菌程度对发酵的影响	151

7.2	发酵染菌的途径分析	151
7.2.1	发酵染菌后的异常表现	151
7.2.2	染菌的检查判断	153
7.2.3	染菌原因分析	155
7.3	发酵染菌原因及防治对策	156
7.3.1	种子带菌及防治	156
7.3.2	空气带菌及防治	157
7.3.3	操作失误导致染菌及其防治	159
7.3.4	设备因素造成的染菌及其防治	163
7.3.5	噬菌体的污染及防治	165
第8章	基因工程菌的培养	168
8.1	概述	169
8.2	宿主-载体系统	169
8.2.1	宿主系统	169
8.2.2	表达系统	169
8.2.3	微生物表面表达系统	170
8.2.4	低等真核细胞	170
8.2.5	哺乳动物细胞	171
8.3	基因工程菌生产的特性	171
8.3.1	基因工程菌的不稳定性	171
8.3.2	分离丢失	172
8.3.3	质粒结构不稳定性	172
8.3.4	宿主细胞突变	172
8.4	重组大肠埃希菌的高密度培养策略	172
8.4.1	控制基质浓度流加	173
8.4.2	恒 pH 流加	173
8.4.3	恒溶氧流加	173
8.4.4	控制比生长速率的葡萄糖流加	173
8.4.5	D-氨基酸氧化酶在大肠埃希菌中高效表达	174
8.5	基因工程菌生长与表达的影响因素	174
8.5.1	溶氧浓度对工程菌发酵的影响	175
8.5.2	pH 对工程菌生长和表达的影响	175
8.5.3	诱导时间对外源蛋白表达的影响	176
8.5.4	诱导时机对表达的影响	176
8.5.5	乙酸对生长和表达的影响	177
8.6	毕赤酵母(<i>Pichia pastoris</i>)表达策略	178
8.6.1	酵母作为宿主菌的优点	178
8.6.2	三角酵母 D-氨基酸氧化酶在毕赤酵母中表达	179
8.6.3	重组质粒	179
8.6.4	重组毕赤酵母菌株发酵	179
8.6.5	重组菌株在 5 L 发酵罐中培养	180
第9章	植物动物细胞和微藻培养	183
9.1	植物细胞培养	183

9.1.1	概述	183
9.1.2	植物细胞培养方法	185
9.1.3	植物细胞规模培养技术	187
9.2	微藻细胞培养	193
9.2.1	概述	193
9.2.2	微藻的培养	197
9.2.3	微藻的大规模培养	202
9.3	动物细胞培养	208
9.3.1	动物细胞培养的发展历史	209
9.3.2	动物细胞的特征	210
9.3.3	培养基	212
9.3.4	动物细胞系的获得与保存	215
9.3.5	动物细胞培养方法	217
9.3.6	动物细胞培养生物反应器	218
9.3.7	动物细胞培养过程参数的控制与检测	220
第 10 章	生物炼制	222
10.1	生物炼制概述	223
10.1.1	生物炼制的基本定义	223
10.1.2	生物炼制与石油炼制	223
10.2	生物炼制系统	225
10.2.1	木质纤维素原料的生物炼制	226
10.2.2	全谷物生物炼制	229
10.2.3	绿色生物炼制	230
10.3	生物炼制的核心技术	231
10.3.1	微生物细胞工厂	231
10.3.2	系统生物技术	233
10.3.3	五碳糖和六碳糖的等效代谢	234
10.4	生物基化学品制备技术	235
10.4.1	乙醇脱水技术	235
10.4.2	L-乳酸提取技术	236
第 11 章	微生物工程清洁生产	239
11.1	清洁生产的由来	240
11.2	清洁生产的基本概念	240
11.2.1	清洁生产的定义	240
11.2.2	清洁生产的目标	242
11.2.3	清洁生产的内容	242
11.2.4	清洁生产的特征	244
11.2.5	实施清洁生产的意义	244
11.3	清洁生产国内外发展概况	245
11.3.1	国际发展概况	245
11.3.2	国内发展概况	245
11.4	清洁生产与微生物工程可持续发展	246
11.4.1	可持续发展的基本概念	246

11.4.2	微生物工程清洁生产与可持续发展	246
11.5	微生物工程清洁生产的基本对策	247
11.5.1	更新观念	247
11.5.2	研究开发和推广新型清洁生产技术	248
11.5.3	发展新型环保技术	248
11.5.4	限制有毒、有害化学品的生产和使用	248
11.5.5	实施资源化工程	248
11.5.6	开展企业清洁生产审核	249
11.6	清洁生产审核	249
11.6.1	清洁生产审核的定义	249
11.6.2	清洁生产审核类型	249
11.6.3	清洁生产审核标准	249
11.6.4	微生物工程行业清洁生产评价指标体系	249
11.7	微生物制药行业的清洁生产实例	250
11.7.1	微生物制药行业概况	250
11.7.2	微生物制药行业存在的主要环境问题	250
11.7.3	微生物制药行业清洁生产审核实例	251
第 12 章	微生物工程生产实例简介	254
12.1	酒精发酵工艺	254
12.1.1	酒精性质与用途	255
12.1.2	酒精生产概况	255
12.1.3	发酵法生产酒精机制	255
12.1.4	酒精发酵常用的微生物	256
12.1.5	酒精的生产原料与辅料	257
12.1.6	酒精生产工艺	258
12.1.7	酒精发酵工艺中的新技术	262
12.2	氨基酸生产工艺	263
12.2.1	氨基酸的用途	265
12.2.2	氨基酸的生产方法	266
12.2.3	氨基酸的发酵生产过程	267
12.2.4	谷氨酸的发酵生产工艺	272
12.3	微生物酶制剂生产工艺	279
12.3.1	概述	279
12.3.2	酶制剂生产过程	282
12.3.3	酶制剂产品生产工艺及其工艺操作的关键点	284
12.4	抗生素生产工艺	291
12.4.1	概述	292
12.4.2	抗生素生产的一般工艺过程	302
12.4.3	头孢菌素 C 生产工艺	305
12.5	废水微生物处理技术	313
12.5.1	概述	313
12.5.2	赤霉素生产废水处理工艺	315
12.5.3	乳酸生产废水处理工艺	317
	参考文献	320

知识框架图



内容摘要

本章简要介绍微生物工程的概念和特点,微生物工程的四个发展时期,国内外微生物工程的现状和发展趋势。

1.1 微生物工程的概念和特点

1.1.1 微生物工程的概念

微生物工程是生物工程的重要组成部分和基础,也是生物工程产业化的重要环节。它是将微生物学、生物化学、化学工程的基本原理有机地结合起来的学科,是一门利用微生物的生命活动来生产人们所需的有用物质的工程技术。微生物工程的主体是利用微生物生长代谢活动产生的各种生理活性物质来生产商业产品,由于它是在酵母发酵生产饮料酒的基础之上发展起来的,所以又称发酵工程。

发酵(fermentation)一词来自拉丁语“fervere”即“发泡”,这种发泡现象是由果汁、麦芽

Note

汁或谷类发酵果酒、啤酒、黄酒时产生的二氧化碳气泡引起的。由于当时对微生物缺乏认识,发酵的本质长时间没有被揭示,直到 19 世纪中叶巴斯德(Louis Pasteur)经过长期研究,认为发酵是微生物作用的结果,他宣告发酵是酵母菌进行“无氧呼吸”,酒精发酵过程是在厌氧条件下向菌体提供能量,并且经过原料的分解,得到的产物是酒精和二氧化碳。这一解释与在酒精、乳酸、乙酸、丙酸等厌氧条件下发酵的情况完全适合。随着微生物技术的发展,在丙酮-丁醇、抗生素、酶制剂、氨基酸、核苷酸等发酵中,人们发现有的是厌氧,有的是好氧;有的有发泡现象,有的却无发泡现象。基于历史原因,人们把利用微生物在有氧或无氧条件下的生命活动所生产微生物菌体或代谢产物的过程统称为发酵。由于“发酵”一词产生于微生物被发现之前,因而它不可能包含微生物的所有生命活动,也不可能确切反映现代微生物工业。作为现代科学概念上的微生物工业,是 20 世纪 40 年代随着抗生素工业的兴起而得以迅速发展。微生物工程的内容随着科学技术的发展不断扩大和充实。因此微生物工程就是研究和发​​展微生物产业的有用产品和有益活动的学科,它是利用微生物的特定性状和机能,在人工控制条件下通过微生物的生命活动而获得代谢产物的过程。

现代微生物工程所利用的生物,除传统的微生物外,还包含两类的生物形态:一是通过生物工程特别是基因工程构建的微生物,简称“工程微生物”,利用它们生产人类所需要的产品,包括自然界尚未发现的新型“生物工程产品”;二是利用某些源于动物、植物细胞或“工程细胞”来生产原来很难获得的有用产物。因此,随着研究的深入,“发酵”的实质含义应该是培养不同生命体获取所需要有用产品的过程。把微生物发酵技术、基因工程、细胞工程、代谢工程、生物信息学和计算机控制等新技术与工程技术有机结合起来,大量生产有价值产品以服务于工业、农业、医药卫生、能源、环保以及人类日常生活之所需,这正是微生物工程的现代目标。微生物工程的基本过程如图 1-1 所示。

1.1.2 微生物工程的特点

由于微生物工程是利用微生物进行生产的一门工程技术,所以它不同于化学工程等其他工程学科。一般来说微生物工程具有如下的特点。

1) 原料来源广,价格低。微生物生长所需的主要原料为碳源,生产所用的原料通常以淀粉、糖蜜等碳水化合物为主。可从农副产品(淀粉、纤维素等)、工业废水或者二氧化碳(如光能自养菌和藻类等)中获取。也可利用石油、醇类、醋酸及其他再生能源等。辅料包括有机或无机氮源和少量的无机盐。这些原料来源广、产量大、价格低廉,只要不含有毒物质,所用原料一般没有精制的必要,微生物本身能有选择地摄取其中的有用物质,符合可持续发展战略的要求。

2) 微生物种类多,分布广,具有易变性。人们可有目的地从自然界中筛选有用的微生物菌种,通过物理和化学诱变、细胞融合、基因工程和蛋白质工程等方法,改变微生物的遗传性质,调节和控制代谢途径,获得高产菌株或得到原来不能生产的产品。从分子生物学的观点来看,微生物的基因组较小,调控系统相对简单,进行基因操作比动植物要容易。例如最初从微生物生产青霉素,其产率不到 0.01%,经过人们的不断改造,现在已达到 5%以上,产率提高 500 多倍。

3) 反应条件温和,微生物发酵过程是在生物体内利用酶的催化作用下进行的,因此生产过程所控制的温度、pH、压力等都与细胞内进行的生化反应相似,反应条件温和(如常温、常压、弱酸、弱碱等),能耗少,生物转化反应专一性强,产品的转化率高,生产过程安全。

4) 微生物发酵代谢途径多样化,产品多样化。微生物种类繁多,代谢途径多样化,微生物反应过程以生命体的自动调节方式进行,数十个生化反应过程能通过单一微生物的代谢活动来完成。微生物能利用简单的原料生产出复杂的化合物,能高度选择地在复杂化合物的特定部位

Note

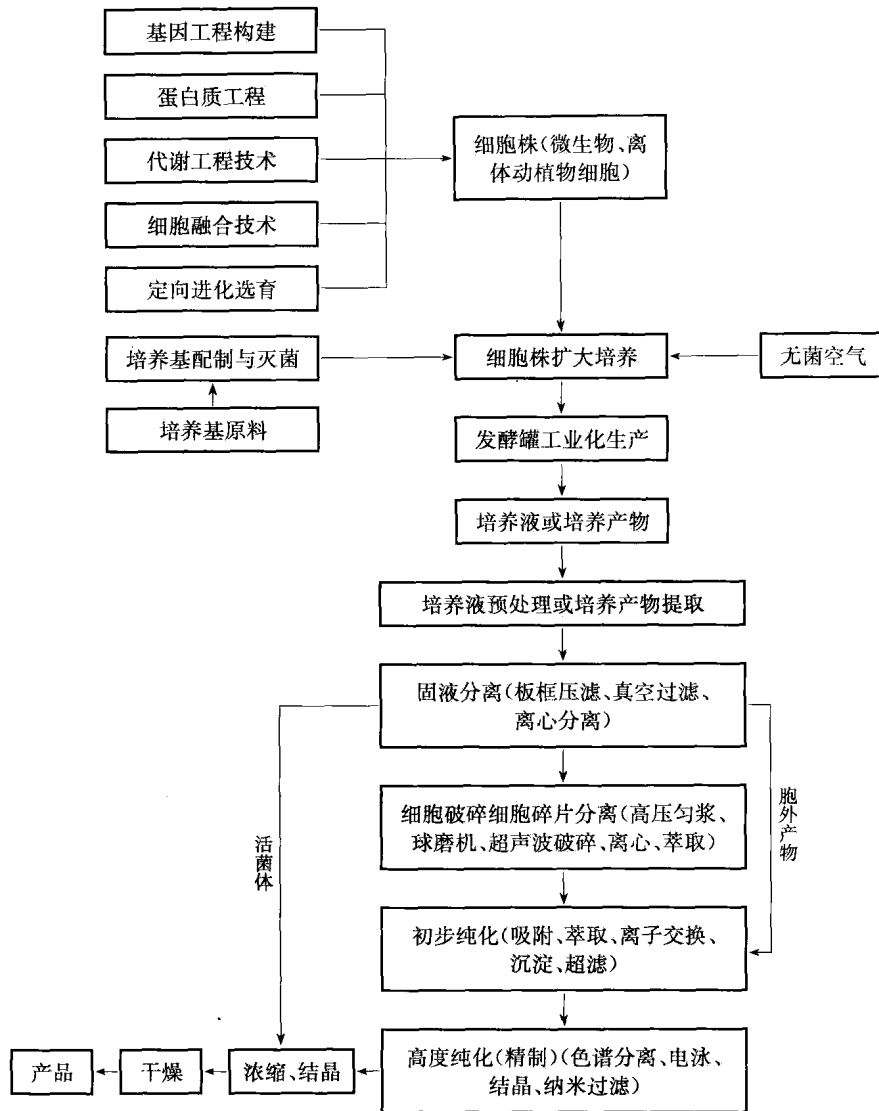


图 1-1 微生物工程流程示意图(改自陈洪章等,2004)

进行氧化、还原、官能团引入或去除等反应。微生物工程产业已为人类提供了种类繁多的产品，同时通过代谢工程还可以发现新的化合物。

5) 微生物生长繁殖速度快、发酵时间短，可以缩短生产周期，提高设备利用率，降低生产成本。

6) 微生物发酵过程是一个纯培养过程，发酵过程需防止杂菌污染，生产过程所需的设备、培养基和空气都需要进行严格的无菌处理，一旦杂菌入侵就有可能导致发酵生产的失败。

1.2 微生物工程的发展简史

从微生物的活动开始被认识起，它就被人类密切关注，人们逐渐认识到，有的微生物对人类有益，有的对人类有害。100 多年来，由于工程技术的介入，人们利用微生物的能力逐步加强，从原始手工小作坊逐步发展到现代化的大规模生产，形成了微生物工程。而与其他学科(生物化学、遗传学、基因工程、化学工程以及生物经济学等)相互渗透，大大促进了微生物工程的发展。为了更好地了解微生物工程的过去与现状，有必要回顾微生物工程发展的整个进程，表 1-1 列出了微生物工程发展过程的重要时期。

表 1-1 微生物工程发展简史

Note

年代	时期	重大事件	产 品
公元前 4000~ 公元前 1000 年	自然发酵		果汁酿酒、醋、酱、酱油、原始啤酒、面包发酵、奶酪、干酪等
1675 年	纯培养	荷兰 Leeuwenhoek 显微镜发明	乳酸、酒精、面包酵母、甘油、丙酮、丁醇、淀粉酶、转化酶等
1857 年		法国 Pasteur 证明发酵由于微生物的作用	
1897 年		德国 Buchner 证明发酵是酶的作用	
1905 年		德国 Koch 应用固体培养基分离培养微生物	
1929 年		英国 Fleming 发现青霉素	青霉素、短杆菌肽、链霉素、金霉素、新霉素、两性霉素、衣康酸、纤维素酶、果胶酶、淀粉酶
1938 年	深层培养	英国 Florey, Chain 形成青霉素工业化生产工艺	
1944 年		Waksman 发现链霉素	
1959 年		Batchelor 发现青霉素母核-6-氨基青霉烷酸	
1955 年	代谢调控	日本木下祝郎进行谷氨酸发酵生产	谷氨酸、赖氨酸、土霉素、四环素、新生霉素、红霉素、制霉菌素、卡那霉素、丝环氨酸、曲酸、柠檬酸、葡萄糖酸、过氧化氢酶、甾体氧化产物、赤霉素、葡聚糖、单细胞蛋白、水杨酸
1966 年	固定化酶	日本千铎一郎进行酰化酶的固定化	葡萄糖酸、糖化酶、氨基酰化酶、脂肪酶、乳糖酶、头孢霉素、林可霉素、利福霉素、万古霉素、核糖霉素、杀稻瘟菌素、多氧霉素、泰勒霉素、缬氨酸、甾体氧化产物、核苷酸、生物杀虫剂、黄原胶、石油发酵、污水处理、能源开发、细菌冶金、单细胞蛋白等
1969 年	酶抑制剂	日本梅泽浜夫从放线菌发酵液分离亮肽素	
1973 年	基因工程	美国 Cohen 和 Boyer 将卡那霉素和四环素抗性基因重组质粒转入大肠埃希菌	参见表 1-2
1975 年		德国 Kohler 和阿根廷 Milstein 建立单克隆抗体技术	
1978 年		Genentech 公司在大肠埃希菌中表达出胰岛素	
1982 年		美国 Eli-Lilly 药厂生产第一个基因工程产品——胰岛素	
1982 年		用 DNA 重组技术生产的第一个动物疫苗在欧洲获得批准	
1983 年		基因工程 Ti 质粒用于植物转化	
1980 年代		计算机控制与传感器技术在发酵工业中的应用	
1994 年		基因重组技术(DNA shuffling)	
1997 年		啤酒酵母基因组测序完成	
2002 年		泰乐菌素产生菌弗氏链霉菌的基因组重组技术(Genome shuffling)	

1.2.1 微生物工程的自然发酵时期

微生物的发酵作用是从数十亿年前地球上出现微生物时就存在的,这就是自然发酵或天然发酵。人类利用微生物的代谢产物作为食品和医药,已有几千年的历史。古埃及人在公元前 40 世纪时开始用经发酵的面团制作面包,公元前 20 世纪已掌握了用裸麦制作啤酒的技术,公元前 25 世纪古巴尔干人开始制作酸奶,公元前 20 世纪古希腊人和古罗马人已会利用葡萄酿造葡萄酒,公元前 17 世纪古西班牙人曾用类似目前细菌浸取铜矿的方法获取铜。

据考古证实,我国在距今4 000~4 200年前的龙山文化时期已有酒器出现,在2 500年前的春秋战国时期,已知制酱和醋。在宋代,已采用老的曲子——“曲母”来进行接种,还根据红曲菌有喜酸和喜温的生长习性,利用酸大米和明矾水在较高温度下培养,以制造优良的红曲。制曲和酿酒技术在《齐民要术》(公元6世纪)和《天工开物》(1637)等典籍中都有详尽的记载。在3 500多年前的商代,开始用人畜的粪便和秸秆、杂草等沤制堆肥;在2 000年前,已发现豆科植物的根瘤有增产作用,并采用积肥、沤粪、压青和轮作等农业措施,来利用和控制有益微生物的生命活动,从而提高作物产量。在3 000多年前的商代后期人们发现发霉的豆腐可以治疗外伤,在2 500年前就知道利用麦曲治疗腹病。在900年前,利用自养细菌生命活动的胆水浸铜法(类似于今日的细菌沥滤)用于生产铜。但那时人们并不知道微生物与发酵的关系,因而很难人为控制发酵过程,生产也只能凭经验,口传心授,所以被称为天然发酵时期。

1.2.2 微生物工程的近代时期——纯培养时期

1680年荷兰人安东尼·列文虎克(Anthony van Leeuwenhoek, 1632~1723)用自制的显微镜发现了微生物(当时称微动物),观察到细菌和原生动物,并对杆菌、球菌、螺旋菌等作了相当正确的描述,从而解决了认识微生物的世界的第一个障碍。在列文虎克发现微生物世界以后的200年间,人们对微生物的研究仅停留在形态描述的低级水平上,而对它们的生理活动及其与人类实践活动的关系却未加研究,也未能把微生物的活动与发酵联系起来。直到19世纪中期,以法国的巴斯德(Louis Pasteur, 1822~1895)和德国的科赫(Robert Koch, 1843~1910)为代表的科学家才将微生物的研究从形态描述推进到生理学研究阶段,揭示了微生物是造成腐败发酵和人畜疾病的原因,建立了分离、培养、接种和灭菌等一系列独特的微生物技术。

巴斯德在前人工作的基础上,进行了许多试验,其中的曲颈瓶实验证实空气内含有微生物,它们引起有机物质的腐败。巴斯德自制了一个具有细长而弯曲颈的玻璃瓶,其中盛有有机物水浸液,经过加热灭菌后,瓶内可一直保持无菌状态,有机物不发生腐败,因为弯曲的瓶颈阻挡了外面空气中微生物直达有机物浸液内,一旦将瓶颈打破,瓶内浸液中才有了微生物,有机质发生腐败。他还研究证明了酒精发酵是由于酵母菌的作用,指出发酵现象是微小生命体进行化学反应的结果。其后,他又研究了乳酸发酵、葡萄酒发酵、食醋酿造和丁酸发酵等,明确了这些不同类型的发酵是由不同形态类群的微生物引起的。这时微生物才从形态描述阶段进入到生理研究阶段,促进了微生物工业的发展。一直沿用至今的巴斯德消毒法和家蚕软化病问题的解决也是巴斯德的重要贡献,他在实践上解决了当时法国葡萄酒变质和家蚕软化病的实际问题,挽救了法国葡萄酒酿造业。巴斯德被誉为“发酵的奠基人”。

巴斯德的发现使人类认识了微生物与发酵的关系,但他没有建立纯培养技术,即只含有一种微生物的培养方法。科赫等建立了研究微生物的一系列重要方法,尤其在分离微生物纯种方面,他们把早年在马铃薯块上的固体培养基技术改为明胶平板培养技术(1881),并进而提高到琼脂平板培养技术(1882)。在1881年前后,科赫及其助手们还创立了许多显微镜技术,包括细菌鞭毛染色在内的许多染色方法、悬滴培养法以及显微摄影技术。他们还利用平板分离方法筛选并分离到多种传染病的病原菌,例如炭疽杆菌(1877)、结核杆菌(1882)、链球菌(1882)和霍乱弧菌(1883)等。与此同时,丹麦人汉逊(Christian Hansen)建立了啤酒酵母的纯培养方法,并于1878年确定了“汉逊稀释法”纯粹培养原理。1881年Jargensen采用“汉逊稀释法”选择优良酵母菌株用于啤酒发酵。1897年德国人Buchner用无细胞酵母菌压榨汁中的“酒化酶”(zymase)对葡萄糖进行酒精发酵成功,从而开创了微生物生化研究的新时代。

巴斯德、科赫的工作为微生物发酵奠定了坚实的科学基础。微生物纯培养技术的建立,开创了人为控制微生物发酵进程的时代,促进近代微生物发酵工业的形成。通过上述原理的应用,发酵管理技术得到巨大的改进,酒类、酱油等的变质现象大大减少。发酵技术的进步始终和社会需求相关。第一次世界大战中,德国需求大量甘油用于制造炸药,从而使甘油发酵工业化。英国需求大量的优质丙酮,制造无烟火药的硝化纤维,促进了丙酮-丁醇发酵的发明。后来,又

Note

采用灭菌操作技术,发明了简便的密闭式发酵罐。此时的发酵产品有乳酸、酒精、面包酵母、丙酮、丁醇等厌氧产品和柠檬酸、淀粉酶、蛋白酶等耗氧产品。发酵工业逐渐进入到近代化学工业的行列。

1.2.3 微生物工程的发展时期——深层培养(通气搅拌)和代谢控制发酵时期

1928年英国细菌学家弗莱明(Alexander Fleming, 1881~1955)发现青霉素,他在研究金黄色葡萄球菌时发现有一个能引起化脓性炎症的金黄色葡萄球菌的培养皿被空气中夹带的青霉菌污染。奇怪的是在那个青霉菌菌落周围的金黄色葡萄球菌都长不出来,而形成透明的抑菌圈。他分离出这种青霉菌株并加以培养,从中提取出一种能杀死金黄色葡萄球菌的化学物质,即青霉素(Penicillin)。由于青霉素是微生物所产生的次级代谢产物,其产量比乙醇、有机酸等初级代谢产物低,结构也复杂,性能又不够稳定,且青霉菌为好氧微生物,当时只能采用表面培养法生产,因此大规模生产还存在很多困难。第二次世界大战(1939~1945)的爆发,前线和后方的伤员都希望能有一种比当时磺胺类药物更为有效和安全的治疗外伤炎症及其继发性传染病的药物。这时英国政府派药理学家弗洛里(H. W. Florey)和钱恩(E. B. Chain)参加到弗莱明的研究队伍中加速对青霉素的研究开发,经过他们的实验证明青霉素具有卓越的效能且毒性小。当时由弗洛里为首的一批研究人员在美国一些研究单位和药厂的支持下,分别采用化学合成和微生物发酵法生产青霉素。微生物发酵法以大量的扁瓶为发酵容器,湿麦麸为主要培养基,用表面培养法生产青霉素。发酵法生产青霉素虽然获得成功,但当时是由被称为“瓶子工厂”中生产出来,不能满足要求,于是决定请工程技术人员来共同改造原有生产线,以大型的带机械搅拌和无菌通气装置的发酵罐取代扁瓶,并对下游提炼技术和培养基配方进行改进,筛选适合液体培养的产黄青霉菌株(*Penicillium chrysogenum*)使青霉素的发酵效价提高10倍。随后,辉瑞(Phizer)药厂建立了一座具有14个约26 m³发酵罐的青霉素生产车间。1945年,弗莱明、弗洛里和钱恩因发明和开发青霉素被授予诺贝尔医学奖。

青霉素的工业化生产,成为抗生素发酵工业的里程碑,这是微生物工程技术上的一大飞跃,其中的显著成就就是把化学工业的通风搅拌技术引入到发酵工业,从此好氧菌的发酵生产走上大规模工业化生产途径,随后链霉素、氯霉素、金霉素、土霉素、四环素等好氧发酵的次级代谢产物相继投产。深层通气搅拌技术是现代微生物工程的主要生产方式,一直延续到现在还是好氧发酵的主要方法。同时由于抗生素工业兴起而诞生的大型发酵罐,为微生物工程的发展提供了关键的设备,也为许多微生物发酵产品如酶制剂、维生素、有机酸、氨基酸等相关物质的发酵生产奠定了基础,后来以石油为原料生产饲料酵母、柠檬酸、水杨酸、长链二羧酸等有机酸沿用了这些设备。

抗生素工业的发展促进了其他发酵产品的出现。1955年日本微生物学者木下祝郎成功地用谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)发酵生产获得谷氨酸,以后鸟氨酸(1957)、赖氨酸(1958)、异亮氨酸(1959)、缬氨酸(1960)、高丝氨酸(1960)等相继投产,目前几乎所有的氨基酸均可用微生物发酵法生产。氨基酸发酵的迅速发展与采用营养缺陷型突变株的筛选方法分不开。在营养缺陷型菌株选育基础上发展起来的代谢控制发酵技术,是以动态生物化学和微生物遗传学的理论为基础,将微生物进行物理或化学诱变,得到适合于生产某种产品的突变株,再在人工控制条件下培养,即可选择性地大量生产人们所需的代谢产物。代谢控制发酵技术最初应用于氨基酸生产菌种的选育,后来被广泛应用于各种微生物产品生产菌种的选育,其选择性标记包括营养缺陷型、药物抗性、结构类似物抗性、产物抗性、病毒抗性、温度敏感性、耐高渗和噬菌体抗性等。人工诱变育种与代谢控制发酵技术的建立,使人们可以有目的地改良和筛选微生物菌种,以获得较高产量。自20世纪60年代开始至70年代末,原有微生物产品的生产水平和产量不断提高,新的微生物发酵产品,包括氨基酸、核苷酸、维生素、抗生素、有机酸、新型酶制剂等不断涌现,新技术、新工艺、新设备不断出现,微生物工程应用范围也日益扩大,如广泛应用于能源开发、环境保护、细菌冶金和石油勘探等,形成了微生物工程的鼎盛发展时期。