

微生物与生物工业

# 微生物与生物工程

门大鹏 张震元 张启先 编著

科学出版社

1989

## 内 容 简 介

微生物在现代生物工业中占据重要位置。本书主要介绍：基因工程、细胞融合等生物技术在改良微生物生产菌株和构建新性状菌株中的应用；生物发酵在大量培养动植物细胞中的应用；微生物发酵产品，如酒精、有机酸、氨基酸、酶抑制剂和甾体化合物、多糖、单细胞蛋白等的生产菌和工艺条件。

本书材料新颖、内容丰富。全书附图83幅。

本书可供生物技术、发酵工程的科研人员、有关厂家和企业的技术人员，以及相关专业的师生参考。

## 微 生 物 与 生 物 工 业

门大鹏 张震元 张启先 编著

责任编辑 王伟济

科 学 出 版 社 出 版

北京东黄城根北街16号

邮政编码：100707

中国科学院印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

\*

1989年12月第一版 开本：787×1092 1/32

1989年12月第一次印刷 印张：9 1/2

印数：0001-1 376 字数：213 000

ISBN 7-03-001421-9/Q·207

定价 7.80 元

# 前 言

生物工程(生物工艺学或生物技术学)是近年来发展起来的一个高科技领域。微生物发酵工程是其重要组成部分,它是在工业微生物学和应用微生物学的基础上建立起来的,是在微生物学、分子生物学、特别是分子遗传学的一些重大研究成果的基础上发展起来的。在微生物发酵的菌种选育中,应用生物技术的新方法,已经得到和将要得到性状优良、高产的菌株,或构建具有新性状的菌株。同时应用生物技术的新方法也改进了原有的生产工艺,提高了生产效率。按照深层培养微生物的原理,发展了大量培养动植物细胞的新技术,获得了大量的细胞代谢产物,从而突破了传统的发酵概念,扩大了发酵工程的范畴。应用以上新理论、新工艺、新产品于工业生产,叫做生物工业(bioindustry)。这样发酵工业的生产工艺便由传统劳力密集型,向高技术密集型生物工业发展。因之,它的发展前景广阔,潜力很大。但是,它现在还不够完善,尚有不少课题有待于完善和探索,巨大的微生物资源有待于开发。微生物是生物工业的主角。本书着重阐述微生物发酵在生物工业中的应用,故取名为《微生物与生物工业》。

生物工业涉及的面很广,进展很快,报道的文献很多,本书只能选择其中一部分,希望读者能从中得到启示,不断追踪其前沿工作,为发展新兴的生物工业作出贡献。

由于编者的知识有限,缺点错误在所难免,真诚地希望广大读者批评指正。

编 者

1987年7月于北京

# 目 录

## 前言

<b>第一章 绪言</b> .....	1
一、微生物与发酵.....	1
二、微生物的特点.....	2
三、微生物的产物类型.....	2
四、工业微生物学发展的主要阶段.....	4
五、微生物和生物工业.....	7
<b>第二章 原生质体融合</b> .....	8
一、原生质体融合.....	8
二、酵母原生质体融合.....	14
三、霉菌原生质体融合.....	17
四、放线菌原生质体融合.....	19
五、细菌原生质体融合.....	22
<b>第三章 基因工程</b> .....	25
一、基因工程的关键步骤.....	25
二、基因工程在实践中的应用.....	30
<b>第四章 基因重组菌的培养</b> .....	44
一、重组DNA实验准则.....	45
二、基因重组菌的培养装置.....	46
三、基因重组菌的培养工程.....	58
<b>第五章 动物细胞大量培养</b> .....	65
一、培养细胞的性质.....	66
二、培养基.....	69
三、动物细胞大量培养技术.....	73
四、动物细胞大量培养技术的展望.....	82
<b>第六章 植物细胞大量培养</b> .....	85
一、植物细胞的特性.....	87

二、植物细胞培养技术	90
三、植物细胞培养方法	96
四、植物细胞大量培养的应用	101
五、植物细胞培养的现状与展望	111
<b>第七章 发酵生产酒精</b>	<b>115</b>
一、原料	115
二、菌种	125
三、发酵方法	127
四、酵母的固定化	130
五、酒精蒸馏	136
<b>第八章 发酵生产有机酸</b>	<b>141</b>
一、乳酸	141
二、柠檬酸	145
三、衣康酸	148
四、延胡索酸(富马酸, 反丁烯二酸)	149
五、琥珀酸(丁二酸)	150
六、苹果酸	151
七、 $\alpha$ -酮戊二酸	152
八、酒石酸	153
九、醋酸	154
十、葡糖酸	156
十一、2-酮基-L-古龙酸(2KLG)	157
十二、长链二羧酸	160
<b>第九章 发酵生产氨基酸</b>	<b>166</b>
一、氨基酸的生产方法	168
二、L-谷氨酸发酵	172
三、L-赖氨酸发酵	179
四、氨基酸的酶法合成	188
<b>第十章 酶抑制剂和甾体化合物</b>	<b>199</b>
一、酶抑制剂和免疫调节剂	199

二、 $\beta$ -内酰胺酶抑制剂	206
三、器官移植免疫系统抑制剂	213
四、微生物对甾体化合物的转化	215
<b>第十一章 微生物多糖</b>	<b>223</b>
一、微生物多糖的种类	224
二、重要的微生物多糖	228
<b>第十二章 单细胞蛋白的开发</b>	<b>251</b>
一、用微生物菌体作为单细胞蛋白的资源	252
二、单细胞蛋白生产的条件与工艺要点	255
三、用碳水化合物生产单细胞蛋白	262
四、用石油类及其化工产品生产单细胞蛋白	266
五、用自养微生物制取单细胞蛋白的开发	274
六、新技术在单细胞蛋白开发中的应用	276
<b>第十三章 高等真菌的利用</b>	<b>280</b>
一、食用真菌	280
二、药用真菌	282

# 第一章 绪 言

## 一、微生物与发酵

微生物是指分布广泛、种类庞杂、形态各异、代谢类型多样的一类生物。它包括病毒、细菌、放线菌、蓝绿藻、真菌和原生动物。这些微生物的进化程度差异很大。病毒是非细胞结构的生物；细菌、放线菌、蓝绿藻属原核生物，其染色体呈环状，在细胞中是裸露的；真菌属真核生物，其染色体呈线状，包在多孔双层的核膜中，组成细胞核，还有线粒体等细胞器，真菌包括单细胞的酵母及多细胞无明显组织分化的霉菌和担子菌；原生动物也是真核生物。

人类早在五六千年前就利用微生物制造食品和饮料，并采集蘑菇食用了。到17世纪，列文虎克(A. van Leeuwenhoek)发明了显微镜，人们才看见细菌的形态。19世纪下半叶，巴斯德(L. Pasteur)在研究啤酒变酸的原因中，发现啤酒酿造是一种严格厌氧发酵过程。巴斯德把酒精生成过程中产生二氧化碳而发泡的现象称为发酵。英文“Fermentation”一词来自拉丁文，即发泡(Ferrere)。巴斯德提出，发酵是向发酵的菌体提供能量。这也就是说发酵的过程是在厌氧条件下向菌体提供能量，从而得到原料分解的产物酒精和二氧化碳。这一论点导致巴克纳(Eduard Büchner)无意间发现了酵母无细胞代谢现象，即滤去完整细胞的酵母浸出液，仍具有将糖转化为酒精的能力。这一发现开辟了生物化学新领域。



## 二、微生物的特点

微生物的细胞非常小，因而具有最大的表面积/体积比。这样外界营养物质便能够迅速地转移到细胞内，以维持其高的代谢率。例如酵母合成蛋白质的速率比豆科植物高好几个数量级，豆科植物又比牛的蛋白质合成速率高10倍。微生物这样高的合成率是其他生物所不能及的。它的第二个特点是繁殖快。例如，大肠杆菌每45分钟分裂一次，由一个细胞变为两个细胞，一天24小时一个大肠杆菌细胞可以繁殖43亿个细胞。其他种类的微生物繁殖慢一些，但总的说来还是比动植物快得很多很多。第三个特点是代谢类型多。以对氧的需要来说，有严格厌氧、好氧和兼性厌氧3种类型。从对营养需要的类型来说，有的要求无机物作碳源，有的要求有机物作碳源，有些微生物甚至还利用低浓度的有毒物质。对温度的适应来说，从接近冰点到接近沸点。对酸碱度的适应，有的嗜酸，有的嗜碱，大多数微生物是适应中性的环境。正是由于以上的特点，微生物能够适宜于工业规模培养，产生出各式各样的产品。

## 三、微生物的产物类型

按微生物产物的性质来区分，一般分为：微生物菌体、初级代谢产物、次级代谢产物和合成大分子物质。

### (一) 微生物菌体

利用微生物菌体有多种方式。由于微生物的菌体，特别是酵母细胞富含蛋白质，可作为动物饲料添加剂，如现在全世界正在研究和生产的单细胞蛋白。其二是用于生物防治，如

苏云金杆菌、蜡样芽孢杆菌和侧孢芽孢杆菌,其细胞中的伴孢晶体可毒杀鳞翅目、双翅目的害虫。丝状真菌的白僵菌、绿僵菌可防治松毛虫等。第三是进行特异性的生物转化。如某些微生物具有某种酶,能对底物某一特定位置进行羟基化、脱氢等化学反应,使底物转变为另一种物质。这类反应主要用于甾体化合物的生产。第四是食用。一些高等担子菌含有丰富的氨基酸和蛋白质,是人们餐桌上的美味佳肴。闻名中外的口蘑,其蛋白质含量达30%,高于猪、牛、羊肉,与大豆相似。有些担子菌既能食用又能药用,是我国传统的膳疗药物。

## (二) 初级代谢产物

微生物产生的代谢产物是多种多样的,传统食品有啤酒、酒、酱、醋和乳酪,化工产品有乙醇、丙酮丁醇、柠檬酸、长链二元酸等,医药产品有维生素B<sub>2</sub>、维生素C、各种氨基酸和核苷酸等。

## (三) 次级代谢产物

这类产物是微生物细胞合成本身不需要的化合物,有抗生素、生物碱和毒素。它们的合成一般是在细胞生长的后期,分子结构变化大。在自然生态条件下,这类物质的功能有助于产生菌的生存与繁殖。

已发现的抗生素有5000多种,应用于临床的约100多种。人们一般都知道抗生素用于治疗疾病,很少知道它的另一大贡献,是作为分子生物学研究的一种有力工具,促进了分子生物学的发展。不同的抗生素分别作用于细胞的不同部位和生长周期中的不同阶段,如青霉素和头孢霉素作用于革兰氏阳性细菌细胞壁的合成,多烯大环内酯(两性霉素B)干扰细胞膜的功能,博莱霉素和蒽环类抗生素干扰DNA的复制,利福

(力复) 霉素阻碍DNA转录RNA,红霉素、四环素、氯霉素和链霉素使核糖体复合物(蛋白质合成位点)失去作用, mRNA便不能转译为蛋白质。抗生素对细菌的作用与对哺乳动物细胞的作用有细微的差别,这是用于治疗疾病的基础。另外,选育抗某种抗生素的突变株,可以得到细胞结构或酶反应改变的菌株,达到提高某种代谢产物的目的。

#### (四) 大分子物质

酶是一类蛋白质,具有生物催化活性。其催化特点是在常温常压下及水溶液中进行,对底物和催化的反应专一性很强。传统上酶制剂是从动植物中提取的,而微生物能合成种类繁多的酶,适宜于工业规模生产。因之,现在绝大多数的酶是用微生物生产的。微生物酶制剂广泛用于酿酒、制糖、制革、加酶洗涤剂及干酪的生产。酶制剂用于临床诊断正越来越引起人们的重视,如胆固醇氧化酶用于检查血清中胆固醇的含量,尿酸酶用于测定尿中尿酸的含量,葡萄糖氧化酶用于检查血中葡萄糖的含量。用酶进行临床诊断不仅速度快,重要的是准确性高。

酶制剂的应用已发展为固定化酶和固定化细胞,并设计了相应的酶反应器,在我国称之为“酶工程”。

### 四、工业微生物学发展的主要阶段

传统的啤酒、酒、醋、乳酸发酵等都是厌氧发酵,以后工业化生产的丙酮丁醇也是厌氧发酵。这种类型发酵工艺使用的年代最长。

1941年英国病理学家弗洛里(H. Florey)和化学家钱恩(E. Chain)到美国进行青霉素工业化生产的研究,随之兴起

抗生素工业,它不仅对医疗事业产生了巨大的影响,迎来了化学医疗的黄金时代,它还导致微生物学和微生物工业的大发展。抗生素生产的特点是用密封式发酵罐,进行通气和搅拌培养微生物,这是通气培养微生物的开端。在生产中培养微生物与工程学进行了结合,设计了不同容量的发酵罐,最大容量可达10万升。在微生物培养过程中的温度、pH、通气量产养物的供给都受到严格控制。这些都为以后的微生物工业规模提供了新的概念和模式。遗传学的方法应用于抗生素营生菌的诱变育种,不断提高了抗生素单位体积的产量,使成本逐渐下降。这一点是微生物工业可以与一般化学工业竞争的原因之一。产品的后处理与化学工程结合起来了,后处理的不断改进,也是促进抗生素工业发展的重要因素。由此可以看出,抗生素工业是多学科相互渗透、融合的边缘学科。

微生物产酶以其是否能分泌到细胞外而分为胞内酶和胞外酶两种类型。当有某种酶的诱导物存在时,微生物产生该酶的量便迅速增加,这种酶叫做诱导酶。胞外酶大多是诱导酶。这种现象叫做诱导。有些诱导酶的诱导物往往是它作用的底物,或其类似物。在没有诱导物存在时,微生物合成相应酶的量极少。当酶作用的终产物达到一定浓度时,酶的合成就受到影响,这种效应称为阻遏作用。微生物的代谢过程是由许多种酶来催化的。在通常情况下由于酶的诱导和阻遏,使代谢产物保持平衡状态,没有过剩的产物积累。细胞是通过什么途径对代谢进行调控的呢? 1961年雅各布(Jacob)和莫诺(Monod)提出了代谢的遗传调控模式。当微生物不与诱导物接触时,酶的结构基因(DNA)不能转录为mRNA。这是因为结构基因附近的操纵基因为阻遏蛋白堵塞, RNA聚合酶不能合成mRNA。当培养基中加入诱导物后,诱导物与阻遏蛋白结合,解除了堵塞, RNA聚合酶就能正常地工作,转录和转译

过程也就按顺序进行,合成酶的分子。由于对代谢过程遗传调控的了解,人们对微生物代谢活动的控制就深入了一大步。根据这一理论,研制出非代谢终产物的氨基酸类和核苷酸产品,使工业微生物学的技术趋向于分子水平的控制。

重组DNA又叫基因工程,在欧美叫做遗传工程。重组DNA是把不同来源(外源)的DNA片段,在体外用酶学方法与运载体DNA重组为一个新的DNA分子。转化受体细胞后,外源DNA的性状就能在宿主细胞中进行复制,并表达出来,给宿主细胞以新的性状,构建出某一特定目的基因的纯系菌株。利用重组DNA技术已使动物、植物和微生物的基因转入大肠杆菌、枯草杆菌和酵母等,使宿主菌产生出它们原来根本不能合成的物质,或者提高宿主菌某种代谢产物的产量。这是微生物学的一场革命,并将冲击着未来微生物学的发展。如用大肠杆菌生产人胰岛素、牛和鸡的生长激素。在改进微生物性状方面重组DNA技术可大幅度提高产物的产量,如克隆了苏氨酸、色氨酸、 $\alpha$ -淀粉酶、 $\beta$ -青霉素酰化酶等。仔猪痢疾疫苗是第一个市售的重组DNA技术的新产品。同时对基因重组工程菌的工业生产也进行了系统研究。这些进展表明,人们对微生物性状的控制和构建具有新性状菌株已经在分子水平上操纵了。

对高等生物细胞融合导致了免疫学的重大突破。用小白鼠骨髓瘤细胞和一个产生抗体的白细胞融合,形成了杂交瘤(hybridoma)。它可以在试管里生长,并产生特异抗体。用传统方法制备的抗体都是混杂着其他蛋白抗体,而杂交瘤产生的却是单一的单克隆抗体,现已生产并作为临床诊断用试剂,其准确性高,所需时间也短。单克隆抗体用于临床治疗进行了大量研究,并已有所突破。

采用细胞融合技术可以进行微生物种内、种间和属间的

遗传重组,它克服了细胞壁阻碍遗传物质交换的屏障,为微生物育种提供了一个新的途径。目前的研究多是基础性的,随着融合的技术不断提高,可望用于生产的融合重组菌株不久将会实现。

目前正在研究开发的新领域是利用工业规模培养微生物的原理,大量培养动植物细胞,生产它们特定的代谢产物,如人参碱、紫草素和干扰素等,现在已达到中试规模。这一新领域的开发潜力是巨大的。

为了使优良菌种的性状得到充分的发挥,最佳培养环境是至关重要的。传统的培养是靠人工操作和经验进行各种因素的调节,这样就难以提供良好的环境条件,影响着微生物的代谢过程。近些年来电子学、计算数学(计算机)和生物工程学中的新成果应用到微生物工业,使生产进行自动调控各种参数,如温度、pH、通气量、搅拌速度、溶解氧等,为获得产品高产提供了最佳条件,甚至改革了传统的生产工艺。

## 五、微生物和生物工业

发酵工程是生物工程的组成之一。它是利用生物技术对微生物进行质的改造,或构建出微生物原来不具有新性状的菌株,同时,在开发微生物资源和改进传统微生物生产工艺中广泛采用新技术和新方法。这些都标志着传统的劳力密集型微生物工业正在向技术密集型的生物工业发展。

我国的生物工业已初具规模,某些项目和生产水平已居世界领先或接近世界先进水平。国家已把生物工程列为重大科技发展项目,初步取得了一些新的进展。发酵工程的前景是宽广的,将对人们的生活、健康产生深远的影响。

## 第二章 原生质体融合

微生物育种对于提高微生物在发酵过程中代谢产物的产量、改进产品质量和简化生产工艺起着重要作用。近些年来分子生物学和分子遗传学的发展,开拓了新的育种思想和方法,原生质体融合和基因工程就是其中的两个方面。本章和三四两章分别阐述这些问题。

以往微生物的杂交育种困难较多,成效不大。其中最主要的问题是,细胞壁成为遗传物质交换的屏障,使不少种间、属间难以进行基因重组。原生体融合就是用酶学方法把微生物细胞的细胞壁除去,形成原生质体,然后再进行种内、种间和属间的细胞融合,得到基因重组的融合子。原生质体融合就是细胞融合。

### 一、原生质体融合

#### (一) 原生质体

植物细胞和微生物细胞在原生质的外面有细胞膜和细胞壁包裹着。不同种属的微生物其细胞壁组分也不相同。在适当条件下用分解细胞壁的酶将细胞壁除去,剩下由细胞膜包裹的球状体叫做原生质体。原生质体融合是1974年首先用于植物细胞,此后才用于微生物。用原生质体融合进行基因重组,与通常的杂交育种比较有如下优点:(1)遗传物质交换没有细胞壁的障碍,即使是相同结合型的真菌也能进行原生质体融合。(2)原生质体融合后,二株亲株的整套基因组进行接

触,可以随机发生各种染色体交换,产生各种基因组合的融合细胞。对于所期望得到的某一性状基因,在不知道其在染色体上位置时也可通过筛选得到。(3)在融合过程中使用聚乙二醇(PEG)和 $Ca^{++}$ ,可提高重组的频率。(4)可用温度、药物或紫外线钝化(灭活)一个亲株或两个亲株,然后再进行原生质体融合,这样可以除去非重组的细胞,以提高筛选效率。

## (二)原生质体融合的步骤

1.原生质体的制备 微生物细胞的原生质体制备,首先必须有效地除去细胞壁。各种微生物细胞壁的组成不同,除去细胞壁的方法也不一样。一般用溶菌酶或细胞壁合成抑制剂。如霉菌用壳多糖酶、纤维素酶;酵母用蜗牛的消化酶或酵母裂解酶(Zymoloase)。为了使这些酶的作用更为有效,对菌体进行预处理。如粟酒裂殖酵母用 $\alpha$ -脱氧葡萄糖处理,可抑制葡聚糖层的重新合成。放线菌用溶菌酶或溶解酶2号,或在培养液中加入1—4%的甘氨酸。细菌用溶菌酶或溶葡萄球菌素(lysostaphin)处理。细菌细胞壁除去后,细胞以球状体存在。这时原生质体对溶液和培养基的渗透压很敏感,必须在高渗透压或等渗透压的溶液或培养基中才能维持其生存,在低渗透压溶液中将会破裂而死亡。对于不同的微生物其高渗稳定液的组成也不同(表2-1)。为使菌体易于原生质化,一般用生长对数中期的菌体。

不同微生物或不同种的微生物其原生质体形成率是不相同的,有的形成率高,有的形成率低。在制备原生质体的过程中,于不同处理时间取样,用相差显微镜观察原生质体形成的大概情况。计算原生质体的形成率,可将原生质体在水中悬浮,使原生质体在低渗溶液中破坏,其残余的细胞接种到普通培养基上,培养后计算菌落数,即为残余细胞数。或者将原生



表2-1 常用的原生质体稳定液及再生培养基的主要成分

微生物	原生质体稳定剂	再生培养基
枯草杆菌	SMMP + BSA 溶液; 蔗糖 0.5mol/L 顺丁烯二酸 0.02mol/L MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O 0.02mol/L 抗生素 3* 培养基 牛血清白蛋白	DM3 培养基: 琥珀酸钠 1mol/L 酸解酪素 5g 酵母粉 5g 3.5%K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 1.5%KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 100ml 葡萄糖 5g MgCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O 0.05mol/L 牛血清白蛋白 1g 琼脂 8g
酵母	0.1%β-巯基乙醇 0.7mol/L KCl	0.8mol/L山梨糖醇, 或17%蔗糖加入完全培养基或基础培养基
霉菌	0.6mol/L NaCl	0.6mol/L NaCl 加入完全培养基或基础培养基
链霉菌	蔗糖 0.3—0.5mol/L	蔗糖: 103—171g (0.3—0.5mol/L), KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0.05g <sup>①</sup> , K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0.25g, MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O 4.07g, CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O 7.37g <sup>①</sup> , 葡萄糖10g, L-天冬酰胺2g <sup>①</sup> , 酪蛋白氨基酸0.1g, TES缓冲液(pH 7.2)100ml, 微量元素溶液 <sup>②</sup> 2ml, 琼脂22g, 蒸馏水1L <sup>①</sup>

注: ①分别灭菌。②微量元素溶液(每升): ZnCl<sub>2</sub>40mg; FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O, 200mg;  
CuCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 10mg; MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 10mg; Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>·10H<sub>2</sub>O, 10mg;  
(NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>·4H<sub>2</sub>O, 10mg。

质体直接接种在普通培养基上, 由于原生质体的细胞壁不能再生, 从而不形成菌落, 而长出来的菌落即为残余细胞。可是残余细胞可以在再生培养基上形成菌落(加选择标记排除杂株细胞生长除外), 所以总菌落数中包括一部残余细胞形成的菌落数。因此, 原生质体数 = 再生菌落总数 - 残余菌落数。用选择再生培养基生长的菌落数即为原生质体数。原生质体形成率的计数方法: (1) 适用于芽孢杆菌: