

W

编著 宋小平

EISHENGWU FAJIAO HE
DONGWU XIBAO PEIYANG ZHIYAO
SHIYONG JISHU

微生物发酵和 动物细胞培养制药 实用技术



时代出版传媒股份有限公司
安徽科学技术出版社

图书在版编目(CIP)数据

微生物发酵和动物细胞培养制药实用技术/宋小平
编著. —合肥:安徽科学技术出版社,2013.5
ISBN 978-7-5337-6034-2

I. ①微… II. ①宋… III. ①微生物-发酵-应用-制
药工业-研究②动物-细胞培养-应用-制药工业-研究
IV. ①TQ460.38

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2013)第 109203 号

微生物发酵和动物细胞培养制药实用技术

宋小平 编著

出版人:黄和平 选题策划:期源萍 责任编辑:期源萍
责任校对:盛东 责任印制:李伦洲 封面设计:朱婧
出版发行:时代出版传媒股份有限公司 <http://www.press-mart.com>
安徽科学技术出版社 <http://www.ahstp.net>
(合肥市政务文化新区翡翠路1118号出版传媒广场,邮编:230071)
电话:(0551)63533330
印制:合肥新南印务有限公司 电话:(0551)65380318
(如发现印装质量问题,影响阅读,请与印刷厂商联系调换)

开本:710×1010 1/16 印张:13.75 字数:350千
版次:2013年5月第1版 2013年5月第1次印刷

ISBN 978-7-5337-6034-2

定价:30.00元

版权所有,侵权必究

前 言

《微生物发酵和动物细胞培养制药实用技术》(以下简称《实用技术》)一书系统地介绍了生物制药企业中微生物发酵和动物细胞培养新技术、新工艺与操作技能应用及设备运行维护。全书分上下两篇,共 12 章,上篇重点介绍微生物培养基的制备、工业微生物菌种及扩大培养、微生物发酵及工艺控制、发酵过程的检测与传感器、实验室规模生物反应器的使用、连续培养和补料分批培养操作技术、几种重要微生物药物的发酵工艺等内容,下篇主要介绍动物细胞培养室的建立、动物细胞培养的基本知识、动物细胞培养的基本技术、动物细胞的大规模培养、单克隆抗体制备等。

《实用技术》基于微生物发酵制药和细胞培养制药生产流程的相同和不同点,重点介绍生产流程的不同点在于培养的种子不同、培养条件不同、对环境要求不同及所需设备差异,实现了内容的融合。《实用技术》基于典型药物生产过程设计全书内容;以产品为载体,以项目导向任务驱动教学设计实践项目,融新工艺、新设备和新标准于全书。《实用技术》将国外最新实验技术、国内现有的实验材料以及作者自己的科研有机地结合起来,构成了其前沿性、实践性和系统性的特色。

《实用技术》既可供各高校生物制药、发酵工程、生化工程、生物工程和制药工程专业的师生作为课外阅读使用,也可供上述领域的企业生产、技术和管理人员作为参考用书。由于时间仓促,书中错误在所难免,敬请读者批评指正。

目 录

上篇 微生物发酵制药

第一章 发酵制药概述	2
第一节 发酵与发酵技术的概念	3
第二节 微生物发酵的工艺流程	3
第三节 发酵及其产物的类型和特点	5
第四节 发酵工业现状及发展趋势	7
第二章 工业微生物菌种	9
第一节 工业微生物常用菌种	10
第二节 工业微生物菌种选育	10
第三节 工业微生物菌种保藏	18
第四节 微生物菌种的接种与分离纯化	21
第三章 微生物培养基制备与灭菌	29
第一节 培养基的选择和确定	30
第二节 培养基的配制	34
第四章 微生物菌种的扩大培养	38
第一节 概述	39
第二节 菌种的制备	40
第三节 菌种质量的控制	41
第五章 发酵工程单元操作	46
第一节 灭菌工程	47
第二节 空气除菌	53
第三节 氧的供需与传递	56
第四节 发酵生产设备	58
第六章 微生物发酵及工艺控制	65
第一节 工业发酵的类型	66
第二节 发酵过程的主要影响因素及其控制	67
第三节 发酵终点的判断	76
实训项目一 发酵罐认知和使用	77
任务一 发酵罐认知	77

任务二 发酵罐实罐灭菌操作·····	78
任务三 发酵罐的使用·····	80
第七章 几种重要微生物药物的发酵工艺 ·····	83
第一节 氨基酸生产工艺·····	84
第二节 抗生素生产工艺·····	90
第三节 微生物酶制剂生产工艺·····	98
实训项目二 青霉素发酵生产仿真实训 ·····	106
任务 青霉素发酵工艺操作与控制·····	106
实训项目三 谷氨酸发酵生产过程及工艺控制 ·····	109
任务一 培养基的配制和灭菌·····	109
任务二 谷氨酸菌种的制备·····	112
任务三 谷氨酸发酵生产及控制·····	115
任务四 谷氨酸发酵液的预处理·····	122
任务五 谷氨酸发酵产物的检测·····	124
实训项目四 灰色链霉菌发酵生产实训 ·····	127
任务一 发酵准备·····	127
任务二 灰色链霉菌发酵生产链霉素的工艺控制·····	129
任务三 灰色链霉菌发酵生产链霉素的生物活性测定·····	132

下篇 动物细胞培养技术

第八章 动物细胞培养概述 ·····	136
第一节 动物细胞培养的概念及其优缺点·····	137
第二节 动物细胞培养的发展与应用·····	138
第九章 动物细胞培养的基本条件 ·····	141
第一节 细胞培养实验室的建立·····	142
第二节 培养仪器和使用·····	145
第三节 细胞培养用液·····	149
第十章 动物细胞培养的基本原理和技术 ·····	153
第一节 培养细胞的生物学特征·····	154
第二节 动物细胞培养的基本程序和技术·····	162
第三节 培养细胞的观察和检测技术·····	170
第四节 细胞的冻存、复苏和运输·····	172
第十一章 动物细胞的大规模培养 ·····	175
第一节 概述·····	176
第二节 培养方法和操作方式·····	177


第三节	动物细胞培养生物反应器	181
第十二章	杂交瘤技术制备单克隆抗体	185
第一节	概述	186
第二节	主要过程	187
实训项目五	动物细胞培养技术	193
任务一	培养器材的清洗与消毒、灭菌	193
任务二	细胞培养液配制	197
任务三	肿瘤细胞传代培养	199
任务四	肿瘤细胞药物干预技术(MTT 法)	203
任务五	细胞冻存技术	205
任务六	细胞复苏技术	208
任务七	台盼蓝活细胞计数技术	210

上篇

微生物发酵制药

第一章

发酵制药概述



学习目标

1. 理解发酵和发酵技术的概念。
2. 掌握微生物发酵制药的工艺流程。
3. 熟悉发酵和发酵产品的主要类型。
4. 了解发酵工业的特点和发酵工业发展简史。
5. 能利用数字化资源查阅有关发酵工业的成果和发酵工业的发展史。

第一节 发酵与发酵技术的概念

法国化学家巴斯德是世界首位发酵学者。巴斯德认为:酿酒是发酵,是微生物(酵母菌)在起作用;酒变质也是发酵,是另一类微生物(霉菌、细菌等)在作祟。发酵反应的过程依据对不同糖的利用与产物的生产而不同。

一、什么是发酵

发酵现象虽早已被人们所认识,但它真正被人们了解却是近 200 年的事。英语中的发酵一词“fermentation”是从拉丁语“fervere”派生而来的,原意为“翻腾”,它描述的是酵母作用于果汁或麦芽浸出液时的沸腾现象。沸腾现象是由浸出液中的糖在缺氧条件下降解而产生的二氧化碳所引起的。

从生物化学的角度来说,发酵是指在无氧条件下一个有机化合物能同时作为电子供体和最终电子受体并产生能量的过程。以酵母菌的乙醇发酵过程为例,酵母菌在无氧条件下作用于果汁或麦芽汁中的糖,将糖分子分解为乙醛,乙醛接受电子受体后被还原为乙醇;发酵条件:pH 3.5~4.5,厌氧。酵母菌的乙醇发酵过程为生物化学意义上典型的“发酵”。

从工业微生物的角度来说,发酵泛指利用微生物生产各种产物的过程,即指在人工控制的条件下,微生物通过本身新陈代谢活动,将不同的物质进行分解、转化或合成,生成人们所需要的酶、菌体或各种代谢产物的生产过程。微生物发酵作用有两个共同点:一是 NADH 被氧化成 NAD^+ ,二是电子受体通常是丙酮酸或其衍生物。在发酵过程中,底物仅被部分氧化,腺嘌呤核苷三磷酸通过底物磷酸化的方式被合成,而且不需要氧。

二、什么是发酵技术

人们利用微生物的发酵作用,运用一些技术手段控制发酵过程,大规模生产发酵产品的技术,称为发酵技术。抗生素(青霉素、链霉素、头孢菌素)、维生素、氨基酸、有机酸、酒及酒精饮料、核苷酸、酶制剂、多糖、色素生物农药、食品添加剂、饲料添加剂等,都是利用发酵技术生产的发酵产品。

第二节 微生物发酵的工艺流程

生物发酵工艺多种多样,主要包括菌种的选育、菌种培养基的配制、扩大培养和接种、发酵过程、下游处理即分离提纯等几个过程。生物发酵过程如图 1-1 所示。

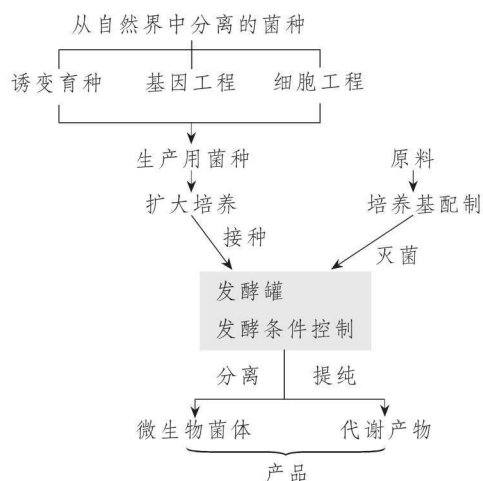


图 1-1 生物发酵过程示意

一、菌种的选育

合适的菌种是发酵工程的前提。人们最初从自然界中寻找发酵所需的菌种,如谷氨酸发酵时常用菌种有谷氨酸棒状杆菌等。但用这种方法得到的菌种,产量一般都比较低。20 世纪 40 年代,一些微生物学家开始用紫外线、激光、化学诱变剂等处理菌种,使菌种产生突变,以筛选出符合要求的优良菌种。随着细胞工程、基因工程等技术的日臻成熟,科学家开始构建工程细胞或工程菌,用它们进行发酵,甚至能生产出一般微生物所不能生产的产品。

二、菌种培养基的配制

培养基是选择出的菌种生活环境,因其对菌种有多方面的影响,所以至关重要。一般来说,培养基的配方要经过反复的试验才能确定。另外,发酵工程中所用的菌种多要求是纯培养的,即整个发酵过程不能混有杂菌,否则将导致产量大大下降,甚至得不到产品。例如,如果青霉素在生产过程中沾染了杂菌,这些杂菌就会分泌青霉素酶,将形成的青霉素分解掉。因此,培养基和发酵设备都必须经过严格灭菌。

三、扩大培养和接种

在大规模的发酵生产中,需要将选育出的优良菌种经过多次扩大培养,让它们在达到一定数量以后,再进行接种。

四、发酵过程

发酵过程一般是在发酵罐内进行的。发酵罐是一种圆柱形的容器,容量从几升到几百万升不等,罐上除有通气、搅拌、接种、加料、冷却等装置外,还有对温度、pH、通气量与转速等发酵条件进行检测和控制的装置。

发酵过程中环境条件的变化,不仅会影响菌种的生长繁殖,而且会影响菌种代谢产物的形成。为了使发酵过程能顺利进行,在发酵过程中要随时取样,检测培养液中的细菌数目、产物浓度,同时还要及时为发酵菌提供必需的营养,并严格控制温度、pH、溶氧、通气量与转速等发酵条件。

五、分离提纯

发酵结束后,要对发酵液或生物细胞进行分离和提取精制,将发酵产物制成合乎要求的产品。对发酵产品的要求不同,分离提纯的方法也相应有些区别。一般来说,利用发酵工程生产的产品有菌种代谢产物和菌种本身(如酵母菌和细菌)两大类。如果产品是菌种,则分离方法一般是通过过滤、沉淀从培养液中分离出;如果产品是菌种代谢产物,则可采用蒸馏、萃取、离子交换等方法提取。分离提纯后的产品,还要经过质量检验,合格后才能成为正式产品。

第三节 发酵及其产物的类型和特点

一、发酵类型

根据发酵的特点和微生物在发酵过程中对氧的不同需求,可以将发酵分成以下几个类型。

(1)按原料来分,发酵可分为糖类物质发酵、石油发酵、废水发酵。

(2)按产物来分,发酵可分为氨基酸发酵、有机酸发酵、抗生素发酵、酒精发酵、维生素发酵。

(3)按形式来分,发酵可分为固态发酵和深层液体发酵。

(4)按工艺流程来分,发酵可分为分批发酵、流加批量发酵和连续发酵。根据不同的需要,发酵工艺分为分批发酵,即一次投料发酵;流加批量发酵,即在一次投料发酵的基础上,流加一定量的营养,使细胞进一步生长,或得到更多的代谢产物;连续发酵,即在投料发酵的基础上,不断地流加营养,并不断地取出发酵液。

(5)按发酵过程中对氧的不同需求来分,发酵可分为厌氧发酵和通风发酵两大类。

二、发酵产物的类型

1. 微生物菌体发酵

微生物菌体发酵是指以获得具有某种用途的菌体为目的的发酵。其中,用于面包制作的酵母发酵及用于人类或动物食品的微生物菌体蛋白发酵是比较传统的菌体发酵。新的菌体发酵可用来生产药用真菌,如香菇菌、依赖虫蛹而生存的冬虫夏草菌、与天麻共存的蜜环菌等药用菌。

2. 微生物酶发酵

酶普遍存在于动物、植物和微生物中。因为微生物具有种类多、产酶的品种多、生产容易和成本低等特点,所以目前工业应用的酶大多来自微生物发酵,如 α -淀粉酶、糖化酶、异构酶、蛋白酶和脂肪酶等。

3. 微生物代谢产物发酵

微生物代谢产物很多。在菌体对数生长期所产生的产物,如氨基酸、核苷酸、蛋白质和糖类等是菌体生长繁殖所必需的,这些产物叫作初级代谢产物。在菌体生长稳定期,某些菌体能合成一些具有特定功能的产物,如抗生素、生物碱、植物生长因子等,这些产物与菌体生长繁殖无明显关系,叫作次级代谢产物。

4. 微生物的转化发酵

微生物的转化是利用微生物细胞的一种或多种酶,把一种化合物转变成结构相关的更有经济价值的产物。目前,微生物可进行的转化反应主要有脱氢反应、氧化反应、脱水反应、缩合反应、氨化反应、脱氨反应等。

5. 生物工程细胞的发酵

生物工程细胞的发酵是指利用生物工程技术所获得的细胞,如DNA(脱氧核糖核酸)重组的“工程菌”,融合所得的“杂交”细胞等进行培养的新型发酵。生物工程细胞发酵的产物多种多样,如用基因工程菌生产的胰岛素、干扰素等。

三、发酵的特点

发酵工业和其他化学工业的最大区别在于它是生物体所进行的化学反应,其主要特点如下。

(1)发酵过程一般都是在常温常压下进行的生物化学反应,这种反应相对安全,要求条件也比较简单。

(2)发酵所用的原料通常以淀粉、糖蜜或其他农副产品为主,只要加入少量的有机和无机氮源就可进行反应。微生物因不同的类别可以有选择地去利用它所需要的营养。基于微生物这一特性,可以利用废水和废物等作为发酵的原料进行生物资源的改造和更新。

(3)发酵过程是通过生物体的自我调节方式来完成,反应的专一性强,因而可以

得到较为单一的代谢产物。

(4)生物体本身所具有的反应机制,使其既能够专一性地、高选择性地对某些较为复杂的化合物进行特定部位的氧化、还原等化学转化反应,也可以产生比较复杂的高分子化合物。

(5)发酵过程中对杂菌污染的防治至关重要。除了必须对设备进行严格消毒处理和空气过滤外,反应还必须在无菌条件下进行。如果沾染了杂菌,生产上就要遭到巨大的经济损失;若是感染了噬菌体,对发酵就会造成更大的危害。因此,维持无菌条件是发酵成功的关键。

(6)微生物菌种是进行发酵的根本因素,通过变异和菌种筛选,既可以获得高产的优良菌株并使生产设备得到充分利用,也可以因此获得按常规方法难以生产的产品。

(7)发酵工业与其他工业相比,投资少,见效快,可以取得显著的经济效益。和传统的发酵工艺相比,现代发酵工业除了上述的发酵特征之外更有其优越性。现代发酵工业除了可以使用微生物外,还可以用动植物细胞和酶,或者使用人工构建的“工程菌”来进行反应;现代发酵工业的反应设备也不只是常规的发罐,而是以各种各样的生物反应器取而代之,自动化、连续化程度高,使发酵水平在原有基础上得到了提高和创新。

第四节 发酵工业现状及发展趋势

一、微生物发酵发展史

微生物发酵的发展是一个循序渐进的过程。

1857年,巴斯德提出著名发酵理论:一切发酵过程都是微生物作用的结果。

1929年,弗莱明发现了青霉素,增加一大类新产品——抗生素。

20世纪40年代,以获取细菌的次生代谢产物——抗生素为主要特征的抗生素工业成为微生物发酵工业技术的支柱产业。

20世纪50年代,氨基酸发酵工业成为微生物技术产业的又一个成员,实现了对微生物代谢的人工调节,这使微生物技术又前进了一步。

20世纪60年代,微生物技术产业又增加了酶制剂工业这一成员。

20世纪70年代,为了解决由于人口迅速增长而带来的粮食短缺问题,微生物工业进行了以非碳水化合物代替碳水化合物的发酵,如利用石油化工原料进行发酵生产、培养单细胞蛋白、进行污水处理、能源开发等。

20世纪80年代以来,随着重组DNA技术的发展,人类社会可以按照自身的需要,定向培养出有用的菌株,这为微生物发酵技术引入了遗传工程的技术,使微生物技术进入了一个崭新的阶段。

二、发酵工业发展

发酵工业的发展大致经历了以下几个阶段。

(1)原始发展阶段。这一阶段的发酵技术原始,多是家庭小制作,技术进步缓慢,完全是经验式的,并不知道其中的原理。

(2)传统发酵工业阶段。这一阶段,人们开始了解发酵现象的本质,并采用开放式的发酵方式,生产过程较为简单,对生产设备要求不高,规模一般不大。

(3)现代发酵工业阶段。这一阶段的生产技术要求高,生产规模大,技术发展速度快,菌种的生产能力大幅度提高,新产品、新技术、新设备的应用达到前所未有的程度。

(4)生物技术产业阶段。这一阶段已利用人工构建的基因工程菌进行生产。

思考题


1. 试述生物化学家与工业微生物学家对发酵的定义。
2. 试述微生物发酵的工艺流程。
3. 说说发酵和发酵产物的类型。
4. 发酵工业有哪些特点?
5. 请通过查阅文献介绍一个现代发酵技术应用的具体实例。



第二章

工业微生物

菌种



学习目标

1. 了解工业微生物常用菌种。
2. 熟悉工业微生物菌种的选育方法、菌种保藏的原理和常用方法。
3. 掌握微生物菌种退化的原因与复壮的主要措施。
4. 掌握微生物菌种的接种与分离纯化方法。

工业微生物育种对于提高发酵工业产品的产量和质量、进一步开发利用微生物资源,以及增加发酵工业产品的品种,有着极其重要的意义。因此,工业微生物的菌种选育在发酵工业中占有重要地位,它不仅决定发酵产品是否具有工业化生产价值,而且是发酵成败与否的关键。

第一节 工业微生物常用菌种

一、微生物发酵工业常用菌种

一般来说,微生物菌种可从国内保藏机构购买。我国目前有两处国家级微生物菌种保藏中心。

优良的微生物菌种是发酵工业的基础和关键。地球上的微生物资源非常丰富,它广泛分布于土壤、水和空气中,其中尤以土壤中为最多。

从微生物分类学的角度可把所需菌种分为以下几种:①细菌类,如短杆菌、枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、苏云金芽孢杆菌、梭状芽孢杆菌等;②酵母菌,如啤酒酵母、酒精酵母、汉逊酵母和假丝酵母等;③霉菌,如黄曲霉、红曲霉、青霉菌和赤霉菌等;④放线菌,如各种抗生素、链霉素、庆大霉素等。

二、工业微生物菌种的生产要求

作为工业微生物发酵使用的菌种,通常有以下特点。

- (1)具有稳定的遗传学特性。
- (2)微生物生长和产物的合成对于基质没有严格的要求。
- (3)生长条件易于满足。
- (4)具有较高的各种酶活力。
- (5)对于包涵体,要求在细胞破碎时不易破碎,而在目的产物的分离提取时则易破碎。

第二节 工业微生物菌种选育

工业微生物菌种一般可以通过以下途径获得:①从微生物菌种保藏机构购买;②从自然界或现有菌种中分离筛选;③对筛选的菌种进行改良从而获得新种。

一、从微生物菌种保藏机构购买

(一)中国工业微生物菌种保藏中心

中国工业微生物菌种保藏中心(China Center of Industrial Culture Collection,

CICC)是中国国家级工业微生物菌种保藏中心,也是世界菌种保藏联合会(WFCC)和中国微生物菌种保藏管理委员会成员之一,是国际标准化组织(ISO)授权关于食品与动物饲料微生物国际标准评审的组织成员,负责全国工业生产与研究应用微生物菌种的收集、保藏与提供及微生物菌种保藏技术的研究与培训等。

中心成立于1979年。目前,该中心保藏国内外各类工业微生物菌种1750余株,包括细菌380余株,酵母菌750余株,丝状真菌620余株,基本涵盖了食品与发酵行业各类生产和科研用微生物,其中许多优良菌株的生产性能具有较高水平。中心与日本、美国、英国、韩国等数十个国家及中国台湾与香港地区的菌种保藏与研究机构建立有广泛的联系与合作,每年为国内外生产企业和科研机构提供数千株生产和实验用工业微生物菌株。

(二)中国普通微生物菌种保藏管理中心

中国普通微生物菌种保藏管理中心(China General Microbiological Culture Collection Center, CGMCC)是以提供专业技术服务为主的公益性机构,1995年获得布达佩斯条约国际保藏中心的资格,是我国唯一同时提供一般菌种资源服务和专利生物材料保存的国家级保藏中心。中心设立在中国科学院微生物研究所。

中国普通微生物菌种保藏管理中心的工作主要包括:广泛分离、收集、保藏、交换和供应各类微生物菌种;保存用于专利程序的各种可培养生物材料;微生物菌种保藏技术研究;微生物分离、培养技术研究;微生物鉴定和复核技术研究;保藏菌种的资料情报收集和提供,编辑微生物菌种目录。中国普通微生物菌种保藏管理中心目前保藏各类微生物资源3200余种,近30000株,用于专利程序的生物材料2000余株。

二、从自然界或现有菌种中分离筛选

从自然界中分离微生物菌种是最初获得工业微生物菌种的主要方式,其中,从土壤中分离微生物菌种是其较为典型的分离方式之一。但是土壤中微生物的种类繁杂,要想获得目标菌需要花费大量的资金和时间。

从自然界中直接分离筛选菌种的过程一般包括采样、增殖培养、纯种分离及纯培养、生产性能测定四个基本步骤,如图2-1所示。下面以从土壤中分离筛选菌种为例,详细介绍从自然界中分离筛选菌种的主要步骤。

(一)采样

筛选菌种的采集对象以土壤为主,也可以是植物、腐败物品或某些水体等。微生物的营养需求和代谢类型与其生长环境有很大关系。土壤是微生物的汇集地,从土壤中几乎可以分离到任何所需的微生物,故土壤往往是首选的采样目标。

(二)增殖培养

增殖培养又叫富集培养。由于采集样品中各种微生物数量有很大差异,所以若估测到要分离的菌种数量不多时,就要人为增加分离的概率,以增加该菌种的数量,达到