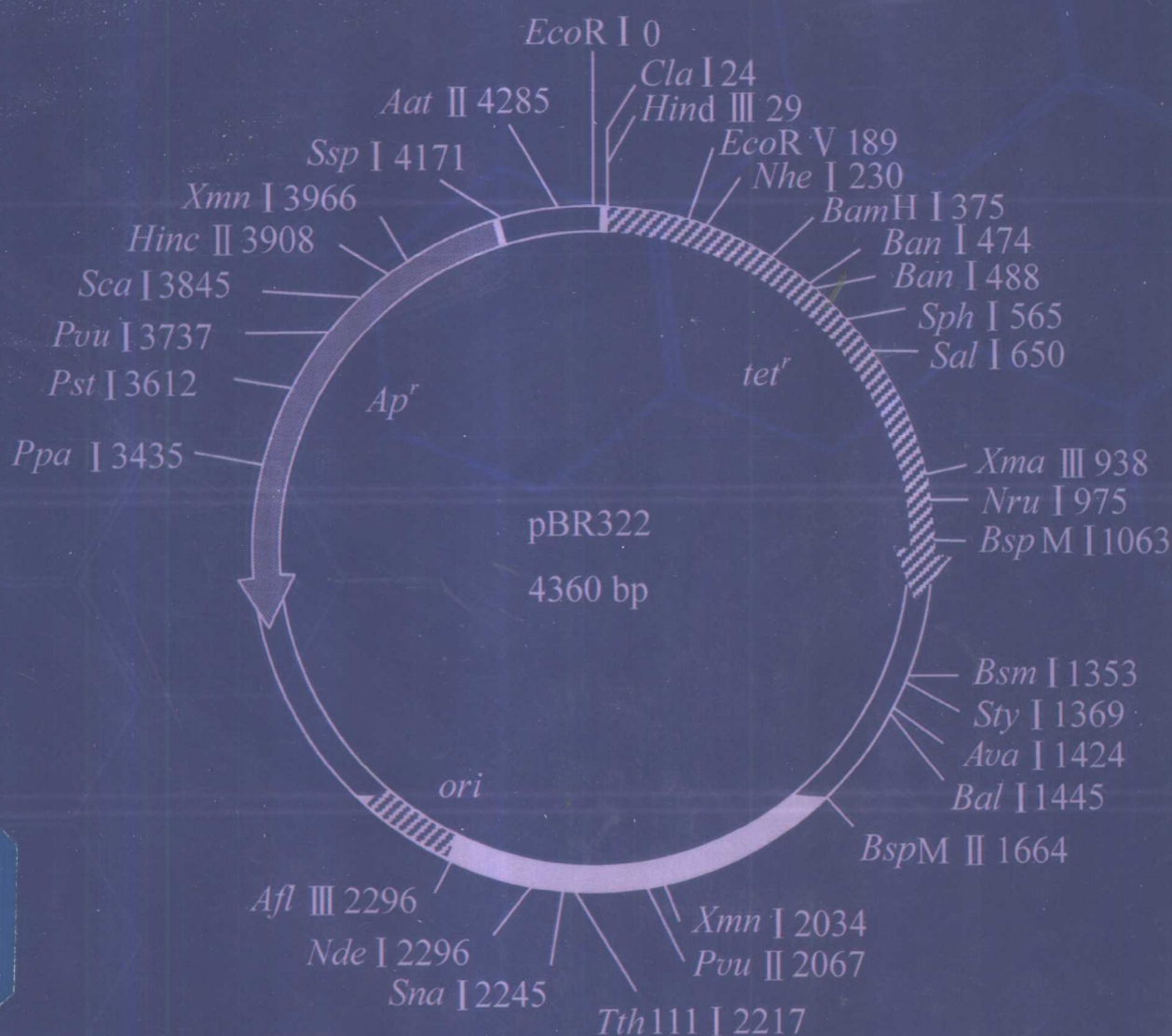


现代生物技术原理及其应用

XIANDAI SHENGWU JISHU YUANLI JIQI YINGYONG

叶 勤 主编



中国轻工业出版社

现代生物技术原理及其应用

叶 勤 主编

 中国轻工业出版社

（北京）

图书在版编目(CIP)数据

现代生物技术原理及其应用/叶勤主编. —北京:
中国轻工业出版社, 2003. 8

ISBN 7-5019-3969-1

I. 现… II. 叶… III. 生物技术 IV. Q503

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2003)第 030966 号

责任编辑: 唐是雯 白洁

责任终审: 滕炎福 封面设计: 李云飞

版式设计: 丁夕 责任校对: 李靖 责任监印: 吴京一

*

出版发行: 中国轻工业出版社(北京东长安街6号, 邮编: 100740)

网 址: <http://www.chlip.com.cn>

发行电话: 010—65121390

印 刷: 北京交通印务实业公司

经 销: 各地新华书店

版 次: 2003年8月第1版 2003年8月第1次印刷

开 本: 787×1092 1/16 印张: 26.75

字 数: 650千字 印数: 1—3000

书 号: ISBN 7-5019-3969-1/Q·017

定 价: 58.00元

·如发现图书残缺请直接与我社发行部联系调换·

30244K1X101Z13W

中国轻工业出版社读者服务部电话: 010—65241695 传真: 010—85111730

本书编写者

曹竹安 清华大学生物化工研究所

储 炬 华东理工大学生化工程系

李光友 国家海洋局第一海洋研究所国家海洋局海洋生物活性物质重点实验室

李元广 华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室

许建和 华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室

许学书 华东理工大学国家生化工程技术研究中心(上海)

叶 勤 华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室

俞俊棠 华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室

张惠展 华东理工大学应用生物学系

张元兴 华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室

钟建江 华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室

朱家文 华东理工大学化学工程研究所

前 言

虽然人类发现并逐渐认识微生物只经历了几百年,不过利用微生物并生产其代谢产物已有数千年的历史,发酵这一古老的生物技术行业对人类的生活产生了重大的影响。20 世纪 40 年代,经微生物学家、生物化学家和化学工程师的紧密合作,实现了青霉素发酵的产业化,使传统的生物技术进入了一个崭新的阶段,并诞生了一门新兴学科——生化工程,其以生物过程(bioprocess)中涉及的工程学问题作为研究内容。近 30 年来,随着遗传学、基因重组技术和细胞生物学等的发展,生物技术的内容进一步扩大,新的产品层出不穷,生物过程的研究和工业过程的建立所采用的技术更加先进,宏观的过程特性研究与微观的基因水平和细胞水平的特性研究更加紧密地结合起来,有效地提高了生物过程的效率。为了与传统的生物技术相区别,涉及上述内容的生物技术归于现代生物技术。

20 世纪末,现代生物技术获得了长足的发展,其成果对人类的生活产生了重大的影响,在 21 世纪,现代生物技术的进一步发展并作出贡献的前景已得到广泛的认同,有更多的企业和个人参加到生物技术的队伍中。面对这样的情况,我们编写了本书,希望能为有关的研究生、科技工作者和其他对现代生物技术有兴趣的人士介绍相关的知识。参与本书编写的人员都是在相关领域从事研究并获得显著成果的学者,相关章节的部分内容也反映了他们的研究心得。

本书第一章对生物技术的发展作了回顾,第二、三、四章分别介绍了微生物的代谢与调节、基因工程和代谢工程方面的知识。后面几章着重介绍有关的生物反应过程,其中第五章介绍了生物反应器的知识,六至十一章分别介绍微生物的培养技术原理、基因工程菌培养、生物催化、植物细胞培养、动物细胞培养以及海洋生化工程的知识。由于绝大多数生物技术过程都以获得细胞的代谢产物为目的,因此第十二章介绍了产物的分离与纯化。虽然我们试图在本书中反映生物技术的最新进展,但由于生物技术的发展日新月异和编者水平所限,如有重要内容遗漏和差错,欢迎读者批评指正。

本书中各物理符号的意义除特别指出外,每章统一。

叶 勤

2003 年 4 月

华东理工大学

目 录

第一章 绪论	(1)
第一节 生物技术的定义和性质	(1)
第二节 生物技术的发展及应用概况	(2)
一、经验生物技术时期(从人类出现到 19 世纪中期)	(2)
二、近代生物技术建立时期(19 世纪 50 年代至 20 世纪 40 年代)	(3)
三、近代生物技术的全盛时期(20 世纪 40 年代初到 20 世纪 70 年代末)	(5)
四、现代生物技术建立和发展时期(从 20 世纪 70 年代末开始)	(11)
第三节 生物技术的发展趋势	(17)
第四节 有关生物技术的参考书目	(22)
一、生物技术综合性参考书	(22)
二、生物技术中有关生物学基础和工艺类性质的参考书	(23)
三、与生物技术相关的工程技术方面的参考书	(26)
四、有关生物技术的工具书	(27)
第二章 微生物代谢及其调节	(28)
第一节 微生物初级代谢	(28)
一、葡萄糖代谢	(28)
二、多糖和单糖的利用	(31)
三、脂肪酸、脂烃和芳香烃的氧化	(33)
四、氮的循环和氨基酸的降解	(34)
五、硫代谢	(35)
六、核苷酸的降解和有机磷的代谢	(36)
七、聚合物的氧化	(37)
第二节 代谢调节与协调	(39)
一、遗传控制	(39)
二、酶活性的调节	(39)
三、酶合成的调节	(41)
第三节 代谢系统的分子控制机制	(45)
一、作为调节性组分的 σ 因子	(46)
二、DNA 结合蛋白: 激活剂与阻遏物	(46)
三、二元调节系统	(46)
四、RNA 水平的调节机制: 衰减器模型	(47)
第四节 微生物次级代谢	(48)
一、微生物次级代谢的特性	(48)
二、前体	(50)

三、次级代谢物的生物合成	(56)
参考文献	(59)
第三章 基因工程	(61)
第一节 概述	(61)
一、基因工程的基本概念	(61)
二、基因工程的发展历史	(63)
三、基因工程的研究意义	(64)
第二节 用于 DNA 重组的工具酶	(66)
一、限制性核酸内切酶	(67)
二、T4-DNA 连接酶	(68)
三、其他用于 DNA 重组的工具酶	(69)
第三节 分子克隆的载体系统	(71)
一、质粒载体	(71)
二、λ 噬菌体 DNA 载体	(74)
三、考斯质粒载体	(75)
四、M13 噬菌体 DNA 载体	(77)
第四节 基因重组克隆的单元操作	(78)
一、DNA 的体外重组	(78)
二、重组分子的转化与扩增	(81)
三、转化子和重组子的筛选与鉴定	(83)
第五节 目的基因的克隆	(87)
一、鸟枪法	(87)
二、cDNA 法	(88)
三、PCR 法	(89)
四、合成法	(91)
五、基因文库的构建	(92)
第六节 外源基因的高效表达	(94)
一、提高外源基因的剂量	(95)
二、强化外源基因的转录	(96)
三、强化外源基因的转译	(97)
四、促进表达产物的分泌	(98)
五、阻断表达产物的降解	(99)
六、提高重组子的稳定性	(100)
第七节 重组微生物的构建与应用	(101)
一、利用重组大肠杆菌生产人胰岛素	(101)
二、利用重组大肠杆菌生产人生长激素	(103)
三、利用重组大肠杆菌生产人干扰素	(105)
四、利用重组酵母菌生产乙肝疫苗	(106)
五、利用基因转化技术改造抗生素生产菌	(107)

第八节 高等植物基因工程	(107)
一、高等植物的载体转化系统	(107)
二、利用植物转基因技术研究基因的表达与调控	(110)
三、利用转基因植物生产重组异源蛋白	(110)
四、转基因技术在植物品种改良中的应用	(111)
第九节 高等动物基因工程	(113)
一、转基因导入动物体内的方法	(113)
二、利用动物转基因技术研究基因的表达与功能	(115)
三、转基因技术在动物遗传性状改良中的应用	(116)
四、利用转基因动物生产生物大分子	(117)
第十节 第二代基因工程	(118)
一、蛋白质工程的基本概念	(118)
二、基因的定向诱变	(118)
三、蛋白质工程的设计思想	(122)
第四章 代谢工程	(124)
第一节 概述	(124)
第二节 代谢工程应用实例	(125)
一、扩展菌种的生产特性	(125)
二、提高溶解氧的利用效率	(126)
三、改变对营养的要求	(127)
四、代谢流方向的改变	(127)
五、改变酶反应的调节	(129)
六、解除中间代谢物供应的限制	(130)
七、其他方面的应用	(130)
第三节 代谢网络的特性	(130)
一、代谢控制分析	(130)
二、代谢网络的刚性	(134)
第四节 代谢流分布的估计	(138)
一、反应动力学模型法	(138)
二、物料平衡法	(143)
三、信号流程图法	(147)
第五节 反向代谢工程	(149)
一、透明颤菌血红蛋白(VHb)	(150)
二、动物细胞的细胞周期控制	(151)
三、反向遗传学	(151)
参考文献	(151)
第五章 生物反应器	(155)
第一节 概述	(155)
一、生物反应器的衡算方程	(155)

二、生物反应器的基本类型	(155)
第二节 工业用生物反应器	(158)
一、机械搅拌式反应器	(158)
二、气升式反应器	(165)
三、其他型式的生物反应器	(169)
第三节 生物反应器的连续操作模式	(174)
一、不带循环的单罐连续操作	(174)
二、带循环的连续培养	(176)
三、流加培养	(177)
四、连续培养中的动态学	(178)
第四节 生物反应器的放大	(183)
一、相似性	(183)
二、放大准则	(184)
参考文献	(185)
第六章 微生物培养技术原理	(187)
第一节 种子的制备	(187)
一、生产种子的重要性与要求	(187)
二、影响种子质量的因素	(187)
第二节 培养(发酵)工艺	(188)
一、分批(间歇)培养(发酵)	(188)
二、补料(流加)-分批培养(发酵)	(192)
三、半连续培养(发酵)	(195)
四、连续培养(发酵)	(195)
第三节 影响培养(发酵)的各种因素及其控制	(200)
一、培养基	(201)
二、灭菌情况	(204)
三、种子质量	(204)
四、温度对发酵的影响	(205)
五、pH的影响	(208)
六、溶氧的影响	(208)
七、二氧化碳的影响	(209)
八、比生长速率的影响与控制	(209)
第四节 过程计算机监控	(211)
一、设定参数	(212)
二、状态参数	(212)
三、间接参数	(213)
四、离线发酵分析	(214)
五、在线发酵仪器的研究进展	(215)
六、计算机在发酵监控方面的应用	(215)

七、生物过程的建模	(215)
八、发酵过程估算技术	(216)
参考文献	(217)
第七章 基因重组菌培养	(220)
第一节 基因重组菌的稳定性	(220)
一、培养过程中重组菌稳定性对群体组成变化的影响	(220)
二、培养条件对稳定性的影响	(222)
第二节 影响外源基因表达的因素	(225)
一、培养基	(226)
二、比生长速率	(227)
三、培养条件	(228)
四、外源基因表达的诱导强度	(228)
五、代谢副产物的影响	(229)
第三节 发酵过程的优化和控制	(229)
一、高密度培养	(229)
二、代谢副产物生成的防止	(230)
三、发酵过程的控制	(233)
四、展望	(235)
参考文献	(236)
第八章 生物催化技术	(239)
第一节 概述	(239)
第二节 生物催化剂的筛选和制备	(241)
一、生物催化剂的筛选与改良	(241)
二、生物催化剂的发酵和下游加工	(247)
三、生物催化剂的固定化	(249)
第三节 生物催化剂的性能及其表征	(251)
一、酶催化的动力学与机理	(251)
二、生物催化剂的稳定性与稳定化	(255)
三、固定化对酶动力学和性质的影响	(257)
第四节 非常规介质中的生物催化	(257)
一、几种典型的非水介质系统	(257)
二、非水溶剂的选择原则	(261)
三、有机相酶催化的新特性	(262)
第五节 生物催化剂的应用	(263)
一、酶作为最终产品的应用	(263)
二、酶作为加工助剂的应用	(265)
三、酶在食品与饮料生产中的应用	(266)
四、酶作为工业催化剂的应用	(267)
参考文献	(270)

第九章 植物细胞培养	(273)
第一节 植物细胞培养发展历史.....	(273)
第二节 植物细胞培养特性与基本培养技术.....	(273)
一、植物细胞培养特性	(273)
二、基本培养技术	(274)
第三节 快速繁殖.....	(275)
第四节 植物细胞遗传、生理、生化和病毒方面的研究.....	(275)
第五节 有用代谢物的生产.....	(277)
一、为何要用植物细胞培养技术	(277)
二、产品研究开发现状	(278)
三、育种	(279)
四、影响因子	(280)
第六节 大量培养技术.....	(287)
一、生物反应器的选型、设计与开发	(287)
二、反应器操作条件	(288)
三、过程开发与反应器操作策略	(291)
第七节 小结和展望.....	(293)
参考文献.....	(293)
第十章 动物细胞培养	(299)
第一节 概述.....	(299)
一、动物细胞培养的发展历史	(299)
二、通过动物细胞培养得到的产品.....	(300)
第二节 细胞培养物的特性.....	(301)
一、细胞的贴壁依赖性生长	(301)
二、细胞培养物	(302)
三、细胞的生长和死亡	(303)
四、常用细胞系	(305)
第三节 培养基和添加剂.....	(306)
一、培养基的物理性质	(306)
二、细胞培养基的基本组成	(307)
三、血清	(309)
四、无血清和无蛋白培养基	(311)
第四节 细胞培养的基本方法.....	(313)
一、动物细胞培养基本工艺	(313)
二、维持培养和放大培养	(314)
三、细胞计数	(316)
四、细胞保存	(316)
第五节 细胞培养用生物反应器.....	(317)
一、动物细胞培养用生物反应器的型式	(317)

二、细胞培养生物反应器的控制系统	(321)
三、生物反应器中的细胞培养模式	(322)
第六节 动物细胞的代谢	(324)
一、葡萄糖的代谢	(325)
二、谷氨酰胺的代谢	(326)
三、其他氨基酸的代谢	(328)
四、代谢流分析	(328)
第七节 组织工程	(329)
一、体外重建人体组织的培养	(329)
二、组织工程的研究进展	(331)
第八节 杂交瘤技术	(332)
一、细胞融合用的细胞	(332)
二、细胞融合	(333)
三、杂交瘤细胞的选择性培养和克隆	(333)
参考文献	(335)
第十一章 海洋生化工程及其在海水养殖中的应用	(337)
第一节 海洋生化工程概论	(337)
一、海洋生物资源开发的重要性	(337)
二、我国海洋生物技术发展的若干分析	(339)
三、海洋生化工程这一交叉学科的产生背景	(340)
四、海洋生化工程定义和研究范畴	(340)
五、海洋生化工程特点分析	(341)
第二节 海洋生化工程在藻类生物技术开发中的应用	(343)
一、海洋生化工程在大型海藻生物技术中的应用	(343)
二、海洋生化工程在微藻生物技术中的应用	(343)
第三节 海洋生化工程在海珍品工厂化养殖中的应用	(351)
一、海珍品工厂化养殖现状及存在问题	(351)
二、海珍品循环水式工厂化养殖系统中的海洋生化工程问题分析	(352)
三、海水工厂化养殖系统中的在线检测与计算机控制	(353)
参考文献	(356)
第十二章 生物技术产品的分离和纯化	(359)
第一节 概述	(359)
第二节 细胞破碎和固液分离	(361)
一、细胞破碎技术	(361)
二、固液分离	(364)
第三节 包涵体产物的分离	(367)
一、包涵体的分离和变性溶解	(368)
二、变性蛋白的纯化和复性技术	(369)
第四节 液-液萃取	(370)

一、溶剂萃取	(370)
二、双水相萃取	(373)
三、反胶束萃取	(374)
四、超临界萃取	(375)
第五节 沉淀	(376)
一、盐析沉淀	(376)
二、等电点沉淀	(377)
三、溶析沉淀	(378)
第六节 膜分离	(378)
一、膜分离技术概述	(378)
二、超滤	(380)
三、微滤	(384)
第七节 层析	(385)
一、层析分离基本原理	(387)
二、层析过程	(390)
三、离子交换层析	(393)
四、疏水作用层析	(397)
五、亲和层析	(399)
六、固定化金属离子亲和层析	(406)
七、凝胶过滤层析	(409)
参考文献	(412)

第一章 绪 论

俞俊棠

第一节 生物技术的定义和性质

生物技术(biotechnology)一词最早是在1919年由匈牙利农业经济学家艾里基(K. Ereky)提出的,当时他对生物技术的定义为“凡是以生物机体(living organisms)为原料,不论其用何种生产方法进行产品生产的技术”。此一定义的范围太宽了,可以把常规的农业生产以及面粉、白糖、油脂、肥皂、纸张等生产技术以至食品的烹调技术都归纳在内,因此当时未为人们所重视和采用。20世纪70年代末、80年代初,由于分子生物学、DNA重组技术的出现以及某些基因工程产品如重组胰岛素、重组人生长激素等的问世,人们又提出了“生物技术”这一名词。由于在再次提出生物技术的名称时,似又有另一种倾向,即必须是采用基因工程一类具有现代生物技术内涵或以分子生物学为基础的技术才称得上为生物技术,而把原先已相当成熟的发酵技术、酶催化技术、生物转化技术、原生质体融合技术等都被排斥在外,因此也不为多数人所赞同,并发生了对生物技术定义和范围的争议。同时,有不少学者和相关组织纷纷对生物技术的定义提出了各自的见解。在众多的见解和建议中,由国际经济合作与发展组织(IECDO)在1982年提出的对生物技术的定义似能为多数人所接受。此定义为:生物技术是应用自然科学和工程学的原理,依靠生物作用剂(biological agents)的作用将物料进行加工以提供产品或用以为社会服务的技术。

IECDO提出的定义与艾里基提出的定义相比,最突出的差异是前者提出了“生物作用剂”的概念,而不是后者笼统地认为生物技术产品均来自“生物机体”的模糊概念。

看来,在IECDO提出的定义中,“生物作用剂”是指从活的或死的微生物、动物或植物的机体、组织、细胞、体液以至分泌物,以及从上述组分中提取出来的生物催化剂(biocatalysts)——酶或其他生物活性物质;提供的“产品”可以是工业、农业、医药、食品等产品;被作用的“物料”可以是有关的生物机体或其中有关的器官、细胞、体液或其经加工的组分以及少量必要的无机物质;“为社会服务”可以是医学诊断和治疗、卫生、环保等内容;应用的自然科学则可有生物学、化学、物理学等以及它们的分支学科、交叉学科,如微生物学、动物学、植物学、生物化学、分子生物学等以及医学、药学、农学等应用自然学科;应用的工程学可有化学工程、机械工程、电气工程、电子工程、自动化工程等,并派生出许多交叉分支学科如生物化学工程、生物医学工程、生物药学工程、生物信息学(bioinformatics)等。目前还出现了一个Bio-X的新名词,其中X是指任何可与生物发生关联的自然科学或工程技术。

在国内外都有人把“生物技术”称为“生物工程”,两者间究竟有何异同?不妨先把“技术”和“工程”的异同作一些考查。根据新编《辞海》(2000年版)的释义:“技术泛指生产实践经验和自然科学原理发展成的各种工艺操作方法和技能”;“工程是将自然科学的原理应用于工农业生产部门去而形成的各种学科的总称”。从上述释义中可以看出“技术”与“工程”

是由生产实践形成的自然科学的两个分支,但从习惯上看,“技术”的面似更广泛些,且更重视技术原理的探讨和应用面的扩大,如电子技术、信息技术、激光技术、航天技术、生物技术、纳米技术等,而“工程”的面似较窄些,且较重视技术的实用性和可靠性,如生物技术又可分解为基因工程、细胞工程、蛋白质工程、发酵工程、酶工程、生物化学工程、生物医学工程等。此外,技术带有较强的自然科学的探索性和首创性,在学科归属中属理科范畴,而工程则重视过程可实施性和经济上的合理性,在学科归属中属工科的范畴。因此,在我国高校中生物技术专业属理科,生物工程专业属工科。

第二节 生物技术的发展及应用概况

虽然生物技术这一名词是在 20 世纪 80 年代前后才被人们所接受,但根据生物技术的定义,人类对生物技术的实践却可追溯到远古原始人类生活期间。为此,可考虑把生物技术的发展分成四个时期,即:经验生物技术时期,近代生物技术的形成和发展时期,近代生物技术的全盛时期以及现代生物技术的建立和发展时期。

一、经验生物技术时期(从人类出现到 19 世纪中期)

远古时的原始人类过的是茹毛饮血的生活,靠捕杀兽类和采集野果、喝兽奶为生,并逐步掌握了制作“风肉”以及“果酒”、“酸奶”等技术。古埃及人民在公元前 40 世纪时已用经发酵的面团制作面包,这可从其后被打开的金字塔中的遗物得到证明;另古埃及人在公元前 20 世纪时已掌握了用裸麦制作“啤酒”的技巧。在西亚美索不达米亚留下的一块古碑(此碑现存于法国罗浮宫)上记载着公元前 20 世纪古亚述人已会用葡萄酿酒(葡萄上实际上沾有酵母)。另有公元前 25 世纪时古代巴尔干地区的人开始制作酸奶,在公元前 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。我国古代人类用黏高粱(秫)造酒是始于我国历史上第一个奴隶制朝代——夏代初期(迄今约 4000 年);用大豆制造酱也约有 4000 年的历史;约在 3000 多年前的商代后期,人们发现发了霉的豆腐可以治外伤;在 2500 年前(东周中期),我国就知晓了疯狗的危害性而将其攻而杀之;在约 1000 年前,我国已开始用轻症天花病人的痘(人痘)对健康人进行接种以防传染,这比 1798 年英国的詹纳(E. Jenner)发明的牛痘接种约早了 800 年,因此人痘接种法曾传至国外;在 3500 年前(商代),我国已开始用人畜的粪便和以桔梗、杂草沤制堆肥;约在 2000 年前(西汉后期),我国就提倡采用豆粮隔年轮种的方法来提高粮食的产量(当时并不知晓根瘤菌的存在及其固氮作用);古代人民在医药上也取得了不少成就,如我国在公元 2 世纪时的东汉,医学家华佗就用多种植物配制了一种全身麻醉药——麻沸散,明朝药学家李时珍在 1578 年所著的《本草纲目》中就记载了药用植物、动物和矿物 1892 个(主要是植物)。

对照前述生物技术的定义,上面述及的一些生活或生产实践都应归属于生物技术的范畴。当然这些实践基本上是属于只知其然而不知其所以然的实践,有关实践还没有上升到理论,更不能以理论来指导、提高实践,因此在其后相当长的时间中没有获得很大的突破。尽管是这样,上述实践还是十分可贵的,因为它为其后相关理论的建立和进一步的实践创造了条件。

二、近代生物技术建立时期(19 世纪 50 年代至 20 世纪 40 年代)

这一时期是与显微镜的诞生和微生物的发现以及微生物学的问世密切相关的。虽然最早的显微镜是荷兰人詹生(Z. Janssen)早在 1590 年制作的,其后在 1665 年英国的胡克(R. Hooke)也制作了显微镜,但都因放大倍数有限而无法观察到细菌和酵母,但胡克却观察到了霉菌,还观察到了植物切片中存在胞粒状物质,并把它称为细胞(cell),此一名称一直被沿用至今。1683 年荷兰人列文虎克(A. Van Leeuwenhoek, 1632—1723)用自磨的镜片制作的显微镜,其放大倍数可近 300 倍,从而观察并描绘了杆菌、球菌、螺旋菌等的形态,为人类进一步了解和研究微生物创造了条件,并为近代生物技术建立时期的降临作出了重大贡献。

这一时期的真正来到实际上要从 19 世纪 50 年代微生物学诞生后才算起,即自胡克从显微镜中观察到微生物到微生物学的诞生约经历了近 200 年。这里既存在经济实力和生产方式的制约因素,但更重要的是与当时人们对微生物以及发酵过程的作用和性质还缺乏足够的科学认识有关,因此发生了一场持续逾百年(18 世纪中叶至 19 世纪中后期)的关于微生物由来的争议。这场争议是因 1748 年尼达姆(J. Needham)提出了微生物的“自然发生论”后引起的,他认为“引起肉汁腐败的微生物是自然发生的,因为新鲜的肉类中是没有微生物的”。这一论点当时也获得部分学者的支持。1768 年意大利的生物学家斯帕兰扎尼(L. Spallanzani)根据实验认为只要将物品置于器皿中煮沸 30min 后,即可避免物品中出现微生物。然而“自然发生论”的支持者认为煮沸后的物品过了几天后又会重新长出微生物,同时又提出“自然发生”需要有空气的参与,因而没有认输。直到 1866 年被誉为微生物学之父的法国生物学家巴斯德(L. Pasteur)当众做了一个对照试验后,“自然发生论”支持者的观点才被彻底击败。当时巴斯德用了两套不同的实验装置分别做了试验:第一套装置是在一个内置营养液的烧瓶顶部连接着一根水平的玻璃管,并接上了一根内装无菌水的 U 形管,使其只能通过空气而不能把空气中的微生物带入烧瓶中;第二套装置除了在烧瓶顶部的水平玻璃管中没装带水的 U 形管外,其他与第一套完全相同,因此当烧瓶中的营养液在加热灭菌后的冷却过程中,外界的空气连同空气中的微生物都会进入烧瓶。试验的结果当然是可想而知的,即第一套装置没有发生“自然发生”现象,而第二套装置中的营养液在加热灭菌后又被外界空气中带入的微生物污染了。从此以后,“自然发生论”彻底破产了。接着,巴斯德又提出了一种适用于饮料、牛奶、食品的灭菌方法——巴斯德灭菌法(Pasteurization),即在 60℃ 下,使上述物品保持数分钟至 30min 后迅速进行冷却,以达到杀灭物品中的病原菌和尽量减少营养成分破坏的目的。“自然发生论”的破产以及微生物学的诞生,无疑将对其后的生物技术的发展产生重大的影响。

尽管在上述近 120 年中存在着微生物是否“自然发生”的争议,但在生物学以及生物技术方面依然出现了若干较可喜的进展。例如:1833 年帕耶(Payer)用乙醇提取了麦芽,并将其用于淀粉的水解和织物的脱浆;1835 年德国的施莱登(M. J. Schleiden)和施旺(T. Schwann)共同阐明了细胞是动植物的基本单位,因而被称为细胞学的奠基人;1857 年巴斯德明确指出:“酒精是酵母细胞生命活动的产物”;1858 年托劳贝(Traube)提出了发酵是靠酶的作用进行的概念;1863 年巴斯德又明确指出“所有的发酵都是微生物作用的结果”。

在 1866 年“自然产生论”破产以及发酵的原因被阐明后,发酵技术等微生物应用有了较大的发展,如:1880 年起,巴斯德开始对病原菌进行了较系统的研究,并用经减毒的病原菌

制成了疫苗。细菌学的奠基人,德国的科赫(R. Koch)首先采用了染色法对细菌进行了形态学的观察,1881年他与其助手帕特利(J. R. Petri)创造了一种分离纯粹微生物细胞的方法,即用接种针在铺有凝固琼脂培养基的培养皿(也称双碟或帕特利皿)上进行划线的方法以获得纯粹的细胞;此外科赫还分离到当时危害性很强、传染性较大的结核杆菌,因而获得了1905年的诺贝尔生理学或医学奖。

在19世纪中后期,酶学和酶生物技术开始萌芽,首先是1876年德国的库尼(L. Kunne)创造了“enzyme”一字(意即“在酵母中”,中文开始时译为“酵素”,后改译为“酶”);1892年德国的布希纳(E. Büchner)发现了磨碎后的酵母细胞仍能进行酒精的发酵,并认为这是酵母细胞中的一系列酶在起作用的缘故,1907年此发现曾获诺贝尔化学奖;1913年德国的米卡埃里斯(L. Michaelis)和门坦姆(M. L. Mentem)利用物理化学原理和前人工作提出了酶反应动力学的表达式;1926年美国的生物学家萨姆纳(J. Sumner)证实了从刀豆中获得的结晶脲酶是一种蛋白质,其后,他又与人合作,进一步证明胃蛋白酶和过氧化氢酶也是蛋白质,此成果在1946年获得了诺贝尔化学奖。上面这些有关酶的成果,为其后的酶生物技术的进一步发展奠定了基础。

1914~1918年间第一次世界大战爆发,德国开始建立了大规模的酵母生产线、丙酮-丁醇发酵厂以及甘油发酵工厂。

1929年英国的医生弗莱明(A. Fleming)发现了青霉素,并开始了对其进行长达10来年的不懈研究,终于在英国和美国政府的支持和其他科学家的共同努力下,用发酵法生产出对G⁺致病菌有特效的青霉素,在20世纪40年代上中期投入生产和获得良好疗效后,激起了一个研究抗生素的热潮,并为近代生物技术进入全盛期创造了条件。

此外,1937年马摩里(Mamoli)和维赛龙(Vercellone)提出的微生物转化(microbial transformation)法也为其后将出现的近代生物技术全盛时期提供了一种新的生产方式。

这一时期所生产的发酵产物都属微生物形成的初级代谢产物(primary metabolites),这是指微生物处于对数生长期(log phase或 trophophase,也称指数生长期)所形成的产物,主要是与细胞生长有关的产物,如氨基酸、核酸、蛋白质、碳水化合物以及能量代谢有关的副产物,诸如乙醇、丙酮、丁醇等。

此一时期生产的发酵产品以厌氧发酵的居多,诸如乙醇、丙酮、丁醇、乳酸和污水的厌氧处理生产甲烷等过程。此外,有的发酵过程开始时采用固体发酵方式进行生产。

这一时期主要的发酵产品为某些有机溶剂、有机酸、多元醇、酶制剂及疫苗,下面将分别进行简要的介绍,括号中标出了出现年代。

(1) 有机溶剂 乙醇(工业化生产约始于19世纪初)、丙酮-丁醇-乙醇(三者比例约为6:3:1,1905)、丙酮-丁醇-异丙醇(1905)。

(2) 有机酸 葡萄糖酸(1880)、乳酸(2-羟基丙酸,1881)、柠檬酸(citric acid,2-羟基丙烷三羧酸,1893)、乙酸(1897)、丙酸(1906)、曲酸(kojic acid,双缩水果糖,1907)、富马酸(fumaric acid,反丁烯二酸,也称延胡索酸,1911)、丙酮酸(pyruvic acid,1923)、衣康酸(itaconic acid,亚甲基丁二酸,1929)、草酸(oxalic acid,乙二酸,1931)、琥珀酸(succinic acid,丁二酸,1938)(以上早期产品开始时用固体发酵法生产)。

(3) 多元醇 甘油(丙三醇,1915)。

(4) 酶制品 淀粉酶(α-淀粉酶称为液化酶,能使淀粉液化为低分子的糊精,