

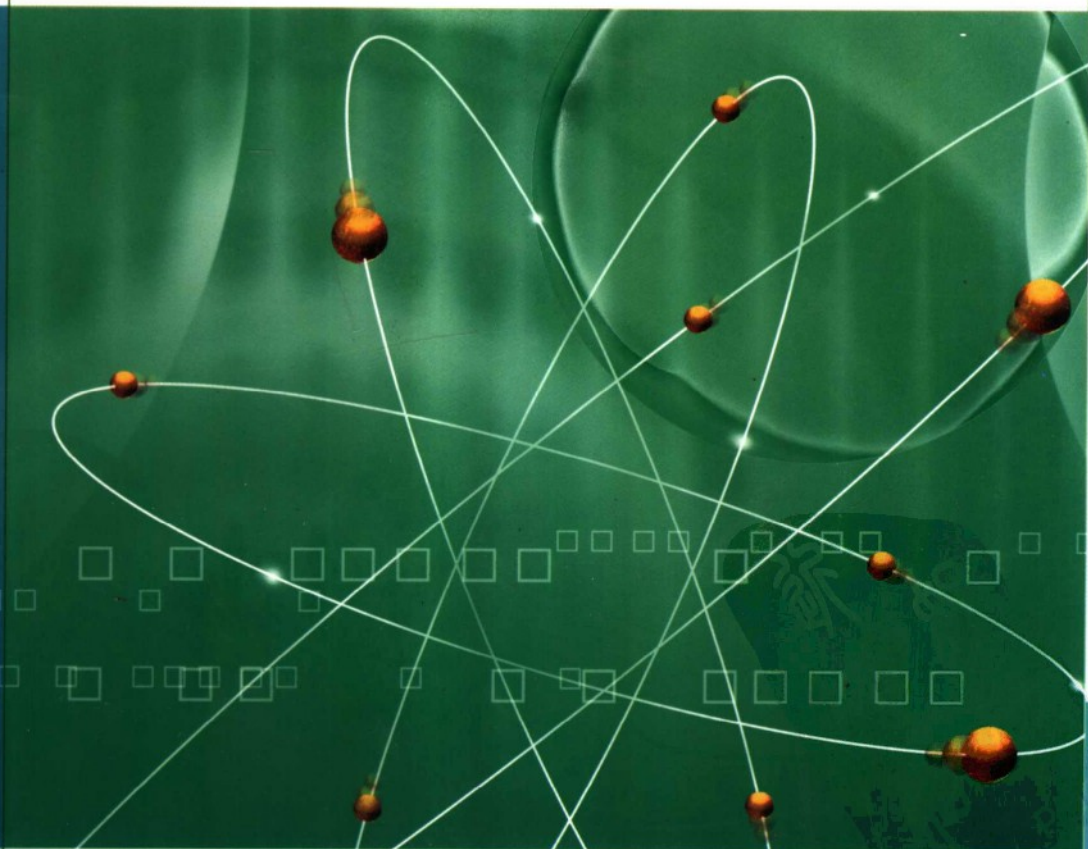


高等职业教育人才培养创新教材出版工程

高职高专生物技术类教材系列

生物工程概论

■ 主编 廖湘萍



科学出版社
www.sciencep.com



高职高专生物技术类教材系列

- 化工原理
- 生物化学
- 微生物学
- **生物工程概论**
- 生物工程设备
- 酒精生产技术
- 白酒生产技术
- 果酒生产技术
- 啤酒生产技术
- 酶制剂生产技术

(Q-1435.0101)

ISBN 7-03-013640-3



9 787030 136404 >

高职高专编辑部
咨询电话: (010)64010638

ISBN 7-03-013640-3

定价: 23.00 元

● 高等职业教育人才培养创新教材出版工程

高职高专生物技术类教材系列

生物工程概论

主 编 廖湘萍

主 审 陆寿鹏

科学出版社

北 京



内 容 简 介

本书全面介绍了生物工程的概念、原理、发展方向及应用领域。全书共分13章,内容包括:生物学基础、基因工程、发酵工程、酶工程、细胞工程、蛋白质工程,以及生物技术 in 农业、工业、医药、能源、材料及环境保护等方面的应用及发展前沿动态。

本书可作为高职高专学院生物专业的入门课程和非生物工程专业学生素质教育的教材。同时可供相关专业的科技人员参考。

图书在版编目(CIP)数据

生物工程概论/廖湘萍主编. —北京:科学出版社,2004

高等职业教育人才培养创新教材出版工程·高职高专生物技术类教材系列
ISBN 7-03-013640-3

I. 生… II. 廖… III. 生物工程-高等学校:技术学校-教材 IV. Q81

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2004)第 065733 号

责任编辑:沈力匀 / 责任校对:李奕莹
责任印制:安春生 / 封面设计:王凌波

北京东黄城根北街16号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

科学出版社印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2004年8月第 一 版 开本:B5(720×1000)

2004年8月第一次印刷 印张:16 1/4

印数:1—3 500 字数:303 000

定价:23.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换〈环伟〉)



《高职高专生物技术类教材系列》编委会

主 编 陆寿鹏

副主编 温守东 张安宁 翟 敏 逯家富
孙俊良 廖湘萍 江建军

编 委 徐清华 赵金海 蔡功禄 赵 辉
李宏高 杨天英 翁鸿珍 廖世荣
武 运 何 惠 胡文浪 万 萍
陆正清



《高等职业教育人才培养创新教材》

出版工程说明

一、特色与创新

随着高等教育改革的进一步深化,我国高等职业教育事业迅速发展,办学规模不断扩大,办学思路日益明确,办学形式日趋多样化,取得了显著的办学效益和社会效益。

毋庸置疑,目前已经出版的一批高等职业教育教材在主导教学方向、稳定教学秩序、提高教学质量方面起到了很好的作用。但是,有关专家也诚恳地指出,目前高等职业教育教材出版中还存在一些问题,主要是:教材建设仍然是以学校的选择为依据、以方便教师授课为标准、以理论知识为主体、以单一纸质材料为教学内容的承载方式,没有从根本上体现以应用性职业岗位需求为中心,以素质教育、创新教育为基础,以学生能力培养为本位的教育观念。

经过细致的调研,科学出版社和中国高等职业技术教育研究会共同启动了“高等职业教育人才培养创新教材出版工程”。在教材出版过程中,力求突出以下特色:

(1) 理念创新:秉承“教学改革与学科创新引路,科技进步与教材创新同步”的理念,根据新时代对高等职业教育人才的需求,策划出版一系列体现教学改革最新理念,内容领先、思路创新、突出实训、成系配套的高职高专教材。

(2) 方法创新:摒弃“借用教材、压缩内容”的滞后方法,专门开发符合高职特点的“对口教材”。在对职业岗位(群)所需的专业知识和专项能力进行科学分析的基础上,引进国外先进的课程开发方法,以确保符合职业教育的特色。

(3) 特色创新:加大实训教材的开发力度,填补空白,突出热点,积极开发紧缺专业、热门专业的教材。对于部分教材,提供“课件”、“教学资源支持库”等立体化的教学支持,方便教师教学与学生学习。对于部分专业,组织编写“双证教材”,注意将教材内容与职业资格、技能证书进行衔接。

(4) 内容创新:在教材的编写过程中,力求反映知识更新和科技发展的最新动态。将新知识、新技术、新内容、新工艺、新案例及时反映到教材中来,更能体现高

职教育专业设置紧密联系生产、建设、服务、管理一线的实际要求。

二、精品与奉献

“高等职业教育人才培养创新教材出版工程”的启动,得到了教育部高等教育司高职高专处领导的认可,吸引了一批职业教育和高等教育领域的权威专家积极参与,共同打造精品教材。其实施的过程可以总结为:教育部门支持、权威专家指导、一流学校参与、学术研究推动。

国内的高等职业院校特别是北京联合大学、天津职业大学以及中国高等职业技术教育研究会的其他副会长、常务理事、理事单位等积极参加本教材出版工程,提供了先进的教学经验,在此基础上出版一大批特色教材。

在教材的编写过程中,得到了许多行业部委、行业协会的支持,对教材的推广起到促进作用。

先进的理念、科学的方法、有力的支持,必然导致精品的诞生。“高等职业教育人才培养创新教材出版工程”主要包括高职高专层次的基础课、公共课教材;各类紧缺专业、热门专业教材;实训教材、引进教材等特色教材;还包含部分应用型本科层次的教材。根据我们的规划,下列教材即将与读者见面:

(一) 高职高专基础课、公共课教材

- (1) 基础课教材系列
- (2) 公共选修课教材系列

(二) 高职高专专业课教材

(1) 紧缺专业教材

- 软件类专业系列教材
- 数控技术类专业教材
- 汽车类专业教材
-

(2) 热门专业教材

- 电子信息类专业教材
- 交通运输类专业教材
- 财经类专业教材
- 旅游类专业教材
- 生物技术类专业教材



- 食品类专业教材
- 精细化工类专业教材
- 广告类专业教材
- 艺术设计类专业教材
-

(三) 高职高专特色教材

- 高职高专院校实训教材
- 国外职业教育优秀教材
-

(四) 应用型本科教材系列

.....

欢迎广大教师、学生在使用中提出宝贵意见,以便我们改进教材出版工作、提高质量。

中国高等职业技术教育研究会

科学出版社



前 言

本教材的编写是按照《国务院关于中国教育改革和发展纲要的实施意见》规定的职业培养目标,以全面素质教育为基础,以能力培养为本位,为培养实用型生物技术类专业方面的人才服务。本书作为生物工程专业入门的教材,目的是使学生在专业学习以前,了解生物技术的基本知识、原理和发展方向,整体了解生物工程的框架体系,以激发学生学习专业课的热情。

在教材编写中,我们力求突出实用性、简约性,在阐述基本概念和基本原理时,既用较少的篇幅阐明有关内容,又能涵盖教学大纲规定的所有知识。教材内容注意与实际相联系,在编写中每一领域都有应用举例,突出高职教育的特点。教材编写中突出“新”字,如介绍人类基因组计划、新兴的生物能源、生物材料等当前前沿的科学技术。鉴于基因工程在生物工程应用中的特殊性,将基因工程与生物工程作为单独内容进行讨论。

本书内容丰富,覆盖生物工程各个应用领域,每一章节都列出小结和一定数量的复习思考题,可供学生课外复习和自学使用。另外教学中可根据各学校教学方向、教学时数和实际需要,进行取舍。

第1章绪论,介绍生物工程的产生、发展和前景;第2章生物学基础,概述了生物细胞、糖、蛋白质、酶、核酸的有关基本知识;第3~7章主要介绍发酵工程、酶工程、细胞工程、基因工程、蛋白质工程的发展、原理和应用实例;第8~13章讲述生物技术在农业、医药、工业、环境保护、能源、材料等方面的应用。

本书由湖北轻工职业技术学院廖湘萍主编。廖湘萍编写第1章、第2章2.1节、第3章3.3、3.4节、第4、10、11章;江苏食品职业技术学院张安宁编写第2章2.2节、第3章3.1、3.2、3.5节;北京农业职业技术学院丁国亮编写第5、6、8、13章;广东职业技术学院阳元斌编写第7、9、12章。

本书由四川工商管理职业技术学院陆寿鹏副教授任主审,并得到了科学出版社沈力匀编辑的大力支持。在此表示衷心地感谢。

由于编者水平有限,不足之处在所难免,欢迎读者批评指正,我们将万分感谢。

编 者

目 录

第 1 章 绪论	1
1.1 生物工程的概述	1
1.2 生物工程发展进程及特征	3
1.3 生物工程的范围和未来	7
第 2 章 生物学基础	11
2.1 细胞是生物的基本单位	11
2.2 细胞内的化合物的结构、性质及其作用	16
第 3 章 发酵工程	26
3.1 发酵工程概况	26
3.2 微生物工业菌种与培养基	29
3.3 发酵操作方法和工艺控制	39
3.4 发酵产物的后处理	47
3.5 发酵工程的应用	49
第 4 章 酶工程	63
4.1 酶工程概况	63
4.2 酶的生产	66
4.3 酶的分离纯化	71
4.4 酶分子的修饰	73
4.5 酶与细胞固定化	77
4.6 酶反应器	82
4.7 酶的应用	84
第 5 章 细胞工程	91
5.1 细胞工程概念及内容	91
5.2 植物细胞工程	93
5.3 动物细胞工程	103
5.4 微生物细胞工程	106
第 6 章 基因工程	109
6.1 基因工程的基本知识	109
6.2 基因工程的流程	111
6.3 基因工程原理	112

6.4	基因工程与食品工业	119
6.5	基因工程技术的应用和展望	122
第7章	蛋白质工程	132
7.1	蛋白质结构基础	132
7.2	蛋白质工程原理和方法	140
7.3	蛋白质工程的应用和发展	147
第8章	农业生物技术	151
8.1	生物技术与种植业	151
8.2	生物技术与养殖业	156
第9章	生物制药技术	165
9.1	生物药物	165
9.2	微生物发酵制药	172
9.3	基因工程药物	175
9.4	生物医学材料	185
第10章	工业生物技术	188
10.1	生物技术与食品生产	188
10.2	生物技术与精细化工	193
10.3	生物技术与纺织皮革工业	199
第11章	生物技术与环境	203
11.1	概述	203
11.2	废水生物处理技术	205
11.3	污染场地的生物修复	212
11.4	生物降解塑料的生产与应用	214
第12章	生物技术与能源	220
12.1	微生物技术与石油的开采	220
12.2	乙醇的生产	223
12.3	生物沼气	228
12.4	清洁能源(氢气)	232
第13章	生物技术与电子信息科学	236
13.1	神经系统的电生理基础	236
13.2	激素和免疫信号的传递	237
13.3	生物传感器	238
13.4	生物芯片	242
参考文献		246

绪 论

生物工程是一门迅速发展的边缘学科，它吸收并综合了近代生物学、生物化学、分子生物学、遗传学和化学工程等领域的最新成就。操纵生物的基因、细胞组织和系统，以造福人类为目标，为人类展现了一幅过去所梦想不到的美妙前景。

生物工程是 20 世纪后期国际上突飞猛进的技术领域之一，现已广泛应用于医学、人类保健、农牧业、轻工业、环保及精细化工等各个领域，已产生了巨大的经济效益，并且日益影响和改变着人们的生产和生活方式。因此受到世界各国的普遍关注，它将是 21 世纪高技术革命的核心内容及其 21 世纪的支柱产业。

1.1 生物工程的概述

1.1.1 生物工程的产生及定义

生物工程（或生物技术）这个词是由一位匈牙利工程师于 1917 年提出的。当时他提出的生物技术这个词的含义是指用甜菜作为饲料进行大规模养猪，即利用生物将原材料转变为产品。而人类有意识地利用酵母进行大规模发酵生产是在 19 世纪，当时进行大规模生产的发酵产品有酒精、面包酵母、柠檬酸和蛋白质酶等初级代谢产品。1928 年发现了青霉素，同时以获取细菌的次级代谢产物——抗生素为主要特征的抗生素工业成为当时生物技术的支柱产业。20 世纪 50 年代氨基酸发酵工业又成为生物工程的一个新成员，到了 20 世纪 60 年代在生物工程产业中又增加了酶制剂工业这一新成员。在 20、21 世纪之交，人类基因组测序、酵母基因组测序、水稻基因组测序先后基本或全部完成，这使生物技术发生了巨大的革命，逐步形成了以基因工程为核心的现代生物技术。

鉴于生物工程的迅速发展，1982 年国际合作及发展组织对生物工程技术重新定义，即生物工程技术是应用自然科学及工程学的原理，依靠微生物、动物、植物体作为反应器，将物料进行加工以提供产品来为社会服务的技术。生物工程逐步成为微生物学、生物化学、化学工程等多学科密切相关的综合性边缘学科。

随着基因工程的崛起，生物工程的定义也不断地得到发展和充实，因此它又被描述为：人们以现代生命科学为基础，结合先进的工程技术手段和其他基础学科的科学原理，按照预先的设计改造生物体或加工生物原料，为人类生产出所需

产品或达到某种目的,即现代生物工程技术。

1.1.2 生物工程的种类及相互关系

生物工程包括所有具备产业化条件的生物技术。按照生物工程操作对象,主要包括基因工程、蛋白质工程、酶工程、细胞工程、发酵工程等五个方面。应用的生产部门有农业、环境、食品、医药等多个方面。

(1) 基因工程 基因工程也叫基因操作、遗传工程或重组体 DNA 技术,是 20 世纪 70 年代以后兴起的一门新技术。它是一项将生物的某个基因通过基因载体运送到另一种生物的活性细胞中,并使之无性繁殖(称之为克隆)和行使正常功能(称之为表达),从而创造生物新品种或新物种的遗传学技术。这种创造新生物并给予新生物以特殊功能的过程就称为基因工程。

目前基因工程主要在细菌方面取得了较大的成功。如利用微生物生产动物蛋白质、人体生长激素、干扰素等。在食品工业上,细菌和真菌的改良菌株已影响到传统的面包烘烤和干酪的制备,并对发酵食品的风味和组分进行控制;在农业上,基因工程已用于品种改良,如:培育出玉米新品种(高直链淀粉含量、低胶凝温度以及无脂肪的甜玉米)和番茄新品种(高固体含量强风味)等。

(2) 细胞工程 细胞工程是指以组织、细胞和细胞器为对象进行操作,在体外条件下进行培养、繁殖,或人为地使细胞某些生物学特性按人们的意愿发生改变,最终获得人们所需的组织、细胞或个体。通过细胞和组织工程,人们可以不经过基因操作,直接对生物进行改造。它包括动、植物细胞的体外培养技术、细胞融合(也称细胞杂交技术)、细胞器移植技术等。

目前利用细胞融合技术已培育出番茄、马铃薯、烟草和短牵牛等杂种植株;利用植物细胞培养可以获得许多特殊的产物,如生物碱类、色素、激素、抗肿瘤药物等;动物培养可以用来大规模地生产贵重药品,如干扰素、人体激素、疫苗、单克隆抗体等。

(3) 发酵工程 发酵工程是利用生物的生命活动产生的酶,对无机或有机原料进行酶加工(生物化学反应过程)获得产品的工业。其主体是利用微生物进行反应的工业。它处于生物工程的中心地位,绝大多数的生物工程目标都是通过发酵工程来实现的。

根据其发展进程应包括传统发酵工业,如某些食品和酒类等生产,近代的发酵工业,如酒精、乳酸、丙酮-丁醇等,及目前新兴的如抗生素、有机酸、氨基酸、酶制剂、核苷酸、生理活性物质、单细胞蛋白等发酵生产。

(4) 酶工程 酶的生产和应用的技术过程称为酶工程,它是利用酶、细胞器或细胞所具有的特异催化功能以及对酶进行的修饰改造,并借助生物反应器生产人类所需产品的一项技术。它主要包括:酶的发酵生产、酶的分离纯化、酶的应

用等方面。酶工程的主要任务是：通过预先设计、经过人工操作控制而获得大量所需的酶，并通过各种方法使酶发挥其最大的催化功能。

(5) 蛋白质工程 蛋白质工程是20世纪80年代初诞生的一个新兴生物技术领域。它的主要内容和基本目的是以蛋白质分子的结构规律及其与生物功能的关系为基础，通过所控制的基因修饰和基因合成，对现有蛋白质加以定向改造、设计、构建，并最终生产出性能比自然界存在的蛋白质更加优良、更加符合社会需要的新型蛋白质。

上述5个技术是构成当今生物工程的主要分学科。这5个方面的技术并不是各自独立的，它们彼此之间是互相联系、互相渗透的。其中基因工程是核心技术，它能带动其他技术的发展。发酵工程是生物工程的主要终端，绝大多数生物技术的目标都是通过发酵工程来实现。如通过基因工程对细菌或细胞改造后获得的“工程菌”或细胞，可再通过发酵工程或细胞工程生产出有用的物质。可以说，基因工程和细胞工程是生物工程的基础，蛋白质工程、重组DNA技术和酶固定化技术是生物工程的最富有特色和潜力的生物技术，而发酵工程与细胞和组织培养技术是目前较为成熟、广泛应用的生物技术。它们的相互关系如图1-1所示。

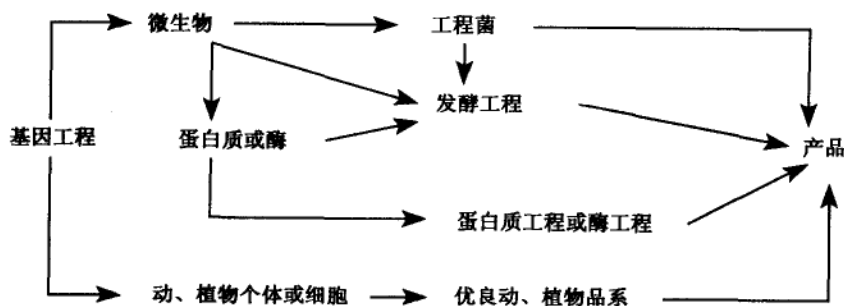


图 1-1 生物工程各学科之间的关系

1.2 生物工程发展进程及特征

生物工程不是一门新学科，在地球诞生生命时就有发酵现象的存在。但是作为工业产品却只有近百年的历史。按照其发展过程可分为三个阶段。

1.2.1 远古时代——第一代生物工程产品

广义上说，原始人从一种靠狩猎为生，逐水草而聚居的部落游牧生活，走向定居靠务农而生存的时候，他们就学会饲养和驯化他们所喜爱的动物。由牧人成为农人时，就发现野生植物种子也能栽种，并学会挑选优良的植物种籽。这种农

业革命使原始人的粮食富裕了,于是他们想到要贮存粮食,间或也想到要转化一些收获物,结果就出现了现今称之为的发酵技术。公元前 6 000 年,苏米尔人即古代巴比伦人就已掌握了酿造啤酒的技术;公元前 4 000 年,埃及人已掌握了发酵面包的技术。

我国人民在殷商时期就已经掌握制酱的技术;周朝时期,就有制醋的技术。在这些制造产品的操作中,总是离不开微生物菌种的利用,这就是传统概念中的生物工程,属于自然发酵。因为在那个时期内,人类社会还不清楚微生物与发酵的关系,一切全凭经验,还没有上升到科学的水平。

第一代生物工程产品有:啤酒、苹果酒、发酵面包,产品的附加值低或中等。

1.2.2 巴斯德时代——第二代生物工程产品

生物工程的产品是利用微生物产生的。1680 年荷兰微生物学家安东·列文虎克(Anthry Van Leewenhock, 1632~1723 年)发明显微镜(放大 275 倍),他利用这种放大镜在水中发现了微小生物——红血球、霉菌、酵母菌及细菌,为微生物的存在提供了有力的证据。19 世纪中叶,法国科学家路易·巴斯德(Louis Pasteur, 1812~1895 年)以著名的 Pasteur 实验证明了发酵原理,他指出发酵现象是微小生命体进行的化学反应。其后他先后对乳酸发酵、酒精发酵、葡萄酒酿造等发酵现象进行了研究,明确了这些发酵是由不同的微生物所引起的,并指出:“酒精发酵是由于酵母的作用,葡萄酒的酸败是由于酵母以外的另一种微生物(醋酸菌)的第二次发酵作用所引起的。”

1865 年巴斯德用实验证实,微生物能利用胺和糖生物合成出蛋白质类的物质。今天的单细胞蛋白工业就是当初巴斯德预见到的工业化生产。为使发酵能正常进行,巴斯德用蒜汁灭菌消毒,在 1877 年他就曾指出过把炭疽菌跟普遍的细菌放在一起培养时,由于受到培养物产生出来的某些物质的影响,会使炭疽菌的致病力丧失,由此他认为,它可以应用到治疗疾病的方面,不久就出现了“抗生作用(antibiosis)”这个词。由此把传统概念中的生物工程提高到科学高度,巴斯德也因此被人们誉之为“发酵之父”。

其后不久,布雷菲尔德(Brefeld)创建了霉菌纯粹培养法(1872 年),德国利斯特·柯赫(Rober Koch, 1843~1910 年)完成了细菌纯粹培养技术,建立了一套分离、培养、接种、染色等微生物技术,一直沿用至今,并获得 1905 年诺贝尔奖。另外,丹麦的汉逊(Hansen)建立了啤酒酵母的培养方法(1879 年),从而确立了单种微生物的分离和纯粹培养技术,使发酵技术从天然发酵转变为纯粹培养发酵,实现了第一个技术进步。从而人类开始了人为控制微生物的发酵过程,使发酵的生产技术得到了巨大的改良,提高了产品的稳定性。

1897年,法国布赫纳(Buchner, 1860~1917年)以制药为目的,将酵母和砂混合磨碎,为了防腐他添加了糖,在放置一段时间后,发现此细胞萃取液同样能产生酒精发酵现象,这就证明了任何生物都有引起发酵的物质(酶),都会导致生物化学反应的出现。

第一次世界大战时,需要大量制造炸药的原料硝化甘油,这就导致了甘油发酵进入了工业化。英国因制造无烟火药的硝化纤维而需要大量的优质丙酮,促使Weizman发明了丙酮-丁醇发酵,并实现了工业化生产。第二次世界大战中日本为补充燃料不足,由藤弁三郎发明了用砂糖发酵制取正丁醇,再通过化学反应生成异辛烷的方法,并发展成工业化生产。

1928年英国弗莱明(A. Fleming)发现青霉素,其后在1940年,英国的弗洛里(Hawserd Floreg)及钱恩(E. B. Chain)分离出纯度较高的青霉素。1941年美、英两国合作对青霉素进行了更深一步的研究和开发,从而推进了青霉素的工业化生产,开拓了以青霉素为先锋抗生素的发酵工业。

第二代生物工程产品有:抗生素、单细胞蛋白质、酶、乙醇、丁醇、维生素、生物杀虫剂,产品的附加值高或者中等。

1.2.3 现代生物工程的崛起

1. 现代生物工程的起源

20世纪70年代初,由于微电子学兴起,计算机的应用,工业产品的工艺流程自动化程度的提高,使工、农业生产获得了空前的发展。随着生产的飞速发展,能源消耗也以惊人的速度增长。据推算,传统能源消耗量每20年增加1倍,而核能铀的消耗甚至比石油消耗的速度还要快。

工、农业生产高速发展带来的另一个后果是,环境受到了严重污染。许多污染物是呈指数相增长的。例如矿物燃料燃烧时释放出来的 CO_2 ;全球达到2000亿t,每年按0.2%比率增长。此外还有 SO_2 、CO、烃类大量的有害气体被排入大气中。

水的情况也一样,全地球70%的表面积覆盖了14亿 km^3 的水体,海水占96.5%。全世界可利用的淡水储量只占水资源的0.003%,有100万 km^3 的水受到了不同程度的污染,水中还含有某些剧毒物质和化学污染物。

此外,人口膨胀,耕地面积、耕作层日益减少、土地沙化、森林草原面积缩小,这些都超越了自然界生态所能容许的限度,从而使生物圈良性循环变成了恶性循环。

人们终于认识到,过去依靠物理学、化学的基本原理建立起来的工业繁荣,其后果必然是资源、能源的减少。由于环境受到污染,适宜于人类生存的空间将逐渐缩小,于是人们希望能探索出一条更为合理的生产工艺,能在24h内把消耗

的能源又在同一时间内产生出来,并且达到使用的原料是取之不尽、用之不竭的可再生的廉价生物量;同时还要做到带来的污染少或无污染。这样就发展到第三代生物工程——现代生物工程。

2. 现代生物工程发展的过程

1953 年美国沃森、英国克里建立遗传的物质基础——核酸结构,阐明了 DNA 的半保留复制模式,揭开了生命秘密的探索。从而开辟了分子生物学研究的新纪元,生物的研究由细胞水平进入到分子水平,由定性进入到定量,其后 10 年内,科学家破译了生命遗传密码。1960 年完成了生物通用遗传密码“辞典”。1971 年,美国保罗·伯格(Berg)用一种限制性内切酶打开了环状 DNA 分子,第一次把两种不同的 DNA 联结在一起,实现了 DNA 体外重组技术,标志着生物技术的核心技术——基因工程技术的开始。它向人们提供了一种全新技术手段,使人们按照意愿在试管内切割 DNA,分离基因并经重组后导入细菌,由细菌生产大量的有用的蛋白质,或作为药物,或作为疫苗,它也可以直接导入人体内进行基因治疗。这样迅速完成了从传统生物技术向现代生物技术的飞跃转变。从原来的传统产业一跃而成为 21 世纪的发展方向具有远大发展前景的新兴学科和产业(图 1-2)。

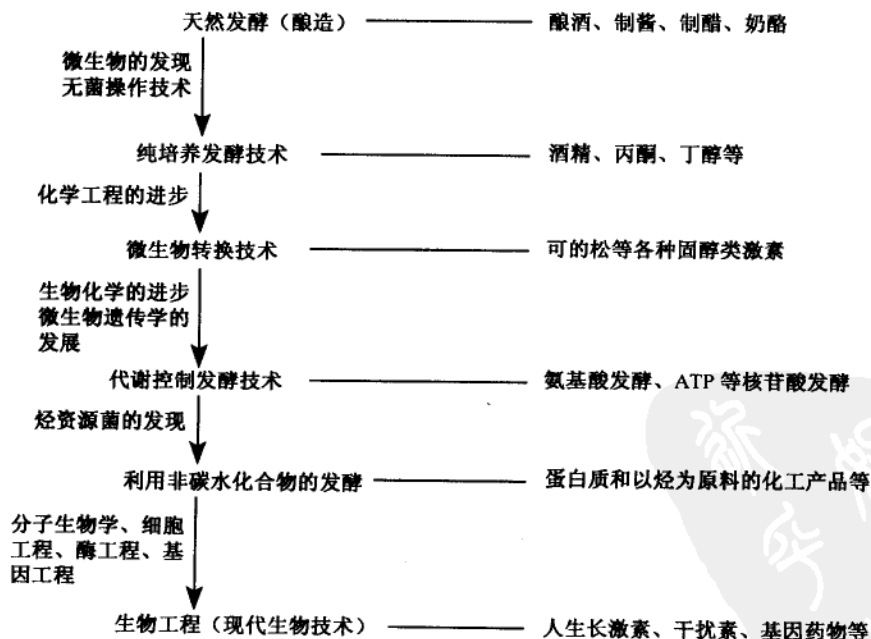


图 1-2 生物工程进展过程

由此可见,现代生物工程是一个复杂的技术群,基因工程、染色体工程、细胞工程、组织工程和器官培养、数量遗传工程等,这些都属于现代生物工程的范畴。而为工程服务的一些工艺体系,如发酵工程、酶工程、生物反应器工程同样被纳入了现代生物工程的系统。

当今,现代生物工程技术同信息技术、新材料技术、新能源技术、海洋技术一起构成了新技术革命的主力,这将会对人类社会生活带来一场深刻的工业革命,它会使医药、食品、发酵、化学、能源、采矿等工业部门的生产效率提高百倍、千倍乃至万倍。现代生物工程产品有:基因工程药物、基因治疗、转基因植物、克隆动物、诊断试剂、DNA 芯片、生物传感器等涉及工、农、医、信息和基础生物的各个方面,具体如表 1-1 所示。

表 1-1 生物工程分期产品

时 期	名 称	采 用 技 术	附 加 值
第一代产品	啤酒、苹果酒、发酵面包、醋	自然发酵	低、中
第二代产品	抗生素、单细胞蛋白质、酶、乙醇、丙酮、维生素、氨基酸	初步的物理、化学遗传分析、细胞杂交、物理化学、诱变育种	中、高
第三代产品	涉及工、农、医、信息和基础生物学的各个方面如:基因药品、DNA 芯片、生物导弹	基因工程、细胞工程	高、很高

3. 传统生物工程与现代生物工程的区别

现代生物工程技术是在传统生物工程的基础发展起来的。它与传统的生物工程或近代的生物工程有着发展中的联系,但又有质的区别。古代传统生物工程和近代生物工程只是利用现有的生物类型或生物机能为人类服务,现代的生物工程技术则是按照人们的意愿和需要创造全新的生物类型和生物机能,或者改造现有的生物类型和生物机能(包括改造人类自身),从而造福于人类。它是人类在建立实用生物技术中从必然王国走向自由王国,从等待大自然的恩赐转向索取的质的飞跃。

1.3 生物工程的范围和未来

1.3.1 生物工程概况及其领域

当今全球生物工程技术产业正在蓬勃发展,各国政府也都把推广生物技术、发展生物工程技术产业作为提高本国工业在世界经济中竞争力的重要手段。目前美国和欧洲分别拥有生物技术公司 1 千多家,2002 年 6 月欧共体部长批准了 4 年投资 160 亿美元的生物技术研究计划。美国将生物与医药产业作为新的经济增长点,确定每年投入的预算高达 380 亿美元。有人预测到 2025 年美国生物工程技术市场的贸易额将达到 25 200 亿美元。欧洲国家在 5 年内将达到 3 360 亿美元,

日本到 2010 年将达到 2 080 亿美元。生物工程技术产业将逐步成为世界经济体系的支柱产业之一。目前最具有代表性的应用领域是生物医药和生物农业。

1. 生物医药

生物医药产业是一项高投入、高风险、高利润的产业。它利润率高达到 17.6%，是信息产业的 2 倍。2000 年全世界的销售额达到 1 490 亿美元，比上一年增加了 11.2%。1997 年全球生物技术药品市场约为 150 亿美元，而 2003 年约为 600 亿美元，占同期世界药品市场总销售额的 10% 以上。因此它是生物工程技术应用最具代表的领域，其产品有：各种激素、淋巴素、免疫球蛋白、疫苗、抗生素以及抗癌的药物。

2. 生物农业

生物工程技术在农业中也大放异彩。全球转基因作物的市场销售额已由 1995 年的 7 500 万美元增长到 1998 年的 16.4 亿美元。据国际农业生物技术应用服务机构的一份报告介绍：1999~2000 年度全世界转基因谷物播种面积达到 4 420 万 hm^2 ，比上年度增加了 11%，1998 年全球动物生物技术产品总销售额估计为 6.2 亿美元，预计到 2010 年总销售额达到 110 亿美元，其中约 75 亿美元是转基因动物产品。现在人们正在努力研究固氮基因粮食作物的转移，不仅粮食可以大幅度增多，成本大幅度降低，而且，传统的化肥工业将被改造，其产品有：杂交水稻、杂交玉米、抗病毒的新品种作物、生物杀虫剂 (Bt)。

3. 化学工业

在化学工业方面生物工程充分发挥生物反应器的作用。从而节省能源、简化设备，进行各种类的石油化学产品的大量生产，其产品有：塑料、尼龙、玻璃、脂肪酸、杀虫剂、除草剂等。

4. 食品工业

食品生产是世界上最大的工业之一。在工业化国家中，食品消费至少占家庭预算的 20%~30%。为了解决人口爆炸带来的食品短缺，生物工程技术正在发挥积极作用。它包含的内容也很广，如提高食品的质量、营养、安全性，以及食品保藏等；它有赖于现代生物知识和技术与食品加工、检测、保藏、生物工程原理的有机结合，其产品有：氨基酸、有机酸、核酸类物质的生产。

5. 环境保护

生物工程在环境保护中创造了奇迹，它表现在处理海上浮油、工业废水、城

市垃圾；高分子化合物的分解；各种有毒物质的降解；污染事故的现场补救等。它与传统的污染防治技术和手段相比较，其主要的优越性表现在它是一个纯生态的过程，从根本上体现了可持续发展的战略思想。

6. 能源工业

能源是人类赖以生存的物质基础之一，是地球演化及万物进化的动力，它与社会经济的发展和人类的进步及生存息息相关。能源分为不可再生能源和可再生能源。可再生能源因为它是植物对太阳能的捕捉，是取之不尽、用之不竭的，因而它是生物工程主要研究对象之一。如利用纤维素等植物原料发酵生产酒精、甲烷和氢气；创造具有高效光合作用并能生产能源的植物。目前生物工程技术与能源的研究及开发已日益倍增，预计在不远的将来，能源主要将来自于生物工程。

可以说生物工程是当代科学技术的宠儿，它广泛用于解决当今世界面临的许多重大课题，这些课题与人类生存休戚相关。正如世界微生物学国际联盟咨询委员海登教授所说：“生物工程将成为导致工业调整和结构改革的动力。”

1.3.2 生物工程发展趋势

生物工程技术在世纪之交已经以众多的成就为我们展示了一卷新的宏图，从医药革命到绿色革命；从新能源到永续的生态环境；生物技术的无限生机在于地球上的生命历经漫长进化保留下来的各种基因、蛋白质和各种生命过程都必有可能逐渐地为人类所用。未来的发展取决于技术平台的宽度和高度，从目前已有的生物技术来看主要有3个平台，即DNA重组、细胞培养和DNA芯片。已经取得的成果和已经形成的产业诸如基因治疗，基因工程药物，转基因动、植物，克隆动物，诊断试剂等。在未来的日子里，生物工程技术的新进展将会给农业、医疗与保健带来根本性的变化，并对信息、材料、能源、环境与生态等领域带来革命性的影响。科学家们预计，未来最主要的创新约有一半与生物工程技术相关，它们包括：基因组学和基因资源的开发；生物信息学；转基因动、植物；治疗性克隆和组织工程；生物能源和环保生物技术；生物芯片等众多迅猛发展的技术领域，同时还会形成以下几个新的平台：

第一是基因组平台：目前已有数十种微生物和四种模式生物（酵母、线虫、果蝇和拟南芥）的基因组全序列已进入数据库，人类基因全序列草图也已完成，这意味着有数十万的基因及其编码的蛋白质可供基因工程和蛋白质工程的操作，从而大大扩展生物工程技术的产业范围。

第二平台是生物芯片：它是分子生物学与化学和物理领域的多种高新技术的交叉和融合。以DNA芯片延伸含各种生物分子的硅片与纳米技术相结合，使离子操作的芯片发展成为可在活体内执行某种功能的组件。

第三平台是干细胞生物学：它是克隆动物和克隆组织器官的基础。这个平台的完善将为医学上器官移植、农业上优良家畜的繁殖带来革命性的进展。

第四个平台是生物信息学：发展前景就是在计算机上模拟细胞内和机体内的生化代谢过程；甚至模拟进化的历程，这将使生物学真正进入理论生物学的新时期。

第五个平台是神经科学：人类的高级神经活动、感觉、认知和思维终将在分子水平和细胞水平上被解析，在不久的将来就会在这个平台上出现新的生物技术，一方面为人类的自身和精神疾患带来福音，另一方面也会由此产生高度智能化的计算机和机器人。

以上是可以预计的五个平台，随着科学技术的发展还会有新的平台出现，生物技术的发展前景是难以估量的。到 21 世纪中期，当生物经济进入成熟阶段的时候，生物工程技术的应用将渗透到我们生活中许多角落。不过有一点现在应该引起高度重视，生物工程技术在造福于人类的同时，也会危害人类和地球上的其他生物，对此我们必须予以控制。

本章小结

生物工程是当今世界发展迅猛的高新技术，现已广泛应用于医药、农业、轻工业和环保等各个领域，已产生了巨大的经济效益。通过学习本章节知识，我们可初步掌握生物工程含义及特性，它所包含的内容及互相联系、互相渗透的关系。了解生物工程这一传统工业一跃成为代表 21 世纪发展方向具有远大发展前景的新兴学科和产业的发展进程，传统生物工程与现代生物工程的区别，以及今后生物工程发展的几个热点问题。

复习思考题

1. 生物工程的定义，它包含哪些学科？
2. 生物工程的特性，与其他学科有什么关系？
3. 简述生物工程发展的进程，各阶段的生物工程产品的特点。
4. 传统生物工程或近代生物工程与现代生物技术有什么区别？
5. 生物工程技术的应用包括哪些领域？它对人类产生什么影响？

PDF

生物学基础

生物学的概念来源于希腊文字“Bios Logos”，意为“生命学说”。

生物学分为动物学和植物学，而分子生物学则研究由分子组成的生命物质。最小的生物功能单位是细胞，各种生物的细胞结构大体相近，细胞生物学、蛋白质、核酸等生物大分子结构知识是生物工程的理论基础。细胞和生物大分子是生物工程在细胞和分子水平上的两大对象。

2.1 细胞是生物的基本单位

2.1.1 生命现象与生命特征

世界是由物质构成的，自然界中的物质可分为无机物和有机物。人们很早就知道花草树木、鸟兽虫鱼等生物都是有生命的物体，而日月星辰、金石土木是没有生命的。那么生物与无生命物质相比较有什么特征呢？我们将生命特征归结为以下几个特点：

1. 生物都具有新陈代谢的作用

生物不是孤立地存在，而是与外界环境发生密切联系的。它们在生命活动过程中，一方面不断地从外界环境中吸收营养物质；另一方面又不断地排出废物。这种生物体与外界环境的物质交换和能量交换，以及生物体内物质和能量的转化，从而达到自我更新的过程，称为新陈代谢，或称为代谢。生物体的各种生命活动，如生长、发育、繁殖、遗传、变异乃至运动、思维等都是通过新陈代谢来实现的。因此，没有新陈代谢就没有生命。

2. 生物具有生长和繁殖的现象

任何生物体（细胞或个体）在它的生命过程中，都表现出质量和体积的增加，这就是生长。当细胞摄取的组成自身的物质超过排出的废物时，细胞体积会由小变大。

任何生物（细胞或个体）的数量的增加可称为繁殖。当一个细胞生长到一定程度，会发生分裂，结果一个细胞变成二个细胞，这就是细胞的分裂。单细胞生

物体细胞分裂,细胞数量增加为繁殖现象,但多细胞生物体的细胞增多并不能称之为繁殖,而是生长。因为多细胞生物的生长不仅包含着细胞体积的增大,还包含着细胞数量的增多,另一方面任何生物体的生命都是有限的。尽管个体不断死亡,但种族却可以生生不息,通过繁殖后代延续万代,这是生物体特有的繁殖现象,即生物的延续性是通过繁殖后代来实现的。生物体的繁殖方式可分为两大类:无性繁殖和有性繁殖。

无性繁殖是指不需要经过两个亲体细胞的结合,由母体直接产生后代的生殖方式。如通过分裂(低级单细胞生物:细菌);通过孢子形成(指那些可以繁衍成新的植物单细胞:霉菌、蕨类植物、地衣);通过卵化胚体(长藓茎、块茎、洋葱)。有性繁殖是通过两性细胞的结合产生合子,由合子发育形成新个体的生殖方式。有性繁殖是生物界最普遍的一种繁殖方式。

3. 生物具有遗传和变异的特性

在自然界中各种生物都存在着遗传和变异现象。遗传性和变异性是一切生物最本质的属性,遗传性是指亲代生物传递给子代的与自身性状相同的遗传信息,这种遗传性是相对稳定的。所谓种瓜得瓜,物生其类。但是后代不会与亲代完全一致,后代各个之间也不会完全一致,它们必有或多或少的差异。这种遗传物质在水平上发生了改变而引起某些相应性状发生改变的特性称为变异性。这种变异性是可以遗传的。

遗传性和变异性是生物的基本特征之一,它们是一对既互相对立,又同时并存的矛盾统一体。没有变异,生物界就失去进化的材料,遗传只能是简单的重复;没有遗传,变异不能积累,变异就失去意义,生物也就不能进化。因此说,遗传是相对的,变异是绝对的,遗传中有变异,变异是有遗传的,从而使生物不断进化。

4. 生物都能对刺激产生反应

生物可以接受外来刺激并对其做出应答的反应。例如外界的光、热、引力、机械接触以及化学物的变化等都是常见的刺激,为了对这些刺激做出反应,生物体必须具有探测刺激的手段。例如:动物和人的鼻、眼、耳都是有效的探测器。生物体对刺激产生应答的反应是高度协调的,这是因为生物体中存在着周密、细致而灵敏的调节系统。

2.1.2 植物和动物的区别

动物和植物都是有生命的物质,然而它们在自然界中存在着很多差别。

动物是以有机物为生,属于碳化物异养型生物。动物的身体结构体上有一个较

大的内腔，以吸收进食的食物。它们可以自由改变自己所处的位置，主动寻求适合自己生存的条件，最高级的动物——人具有高级思维，创造了语言并学会了劳动。

植物是通过光合作用以无机物为生，它们是属碳化物自养型生物，最终固定生存在土壤或以海洋和湖泊为生存环境。外表面较大是植物的结构特点。

微生物无处不有。有独立存在能力的微生物漂泊不定，既以无机物又以有机物为营养物；不能独立生存的微生物借居于其他生物体内，它们利用甚至牺牲宿主以求得自己的生存，微生物介于自养和异养生物之间（表 2-1）。

表 2-1 植物和动物的区别

植 物	动 物
细胞壁由牢固的纤维素组成	细胞裸露
以无机物为营养	以有机物为营养
借助光能和叶绿素、 H_2O 、 CO_2 形成碳水化合物（藻类例外）	没有光合作用，没有叶绿素
吸收气体或者溶解养分	进食固体食物，肠道消化吸收
不活动	活动（也有例外）
排出氧气和水等代谢物质	排泄水或 CO_2 以及不消化食物
无限制生长	有限制生长
组织差别小，没有感觉器官移植	组织差别大，有感觉器官

2.1.3 细胞——生命的基本单位

一般来说，生物体都是由细胞构成的，细胞是生物体的结构和功能的基本单位。动物体由多细胞组成，多数植物为多细胞，极少数为单细胞，微生物则大多数是单细胞。

单细胞生物仅由一个细胞组成，单个细胞就是一个独立生活的生命个体，所有生命活动都在这个细胞内完成。如微生物细菌、酵母菌和原生动物都是单细胞生物。

多细胞生物则是由许多结构不同的细胞，相互依赖、彼此分工、共同协调合作才能完成全部生命活动的生物。我们常见的高等动、植物个体都是多细胞生物，都必须是由各种各样的细胞组成的多细胞生物。组成它们的细胞数十分可观，如一个新生儿体重仅有 3.5kg 左右，共有 10^{12} 个细胞，而一个成年人体重约为 65kg，约有 10^{16} 个细胞。

1. 细胞的基本结构

基本结构是指任何生物都具有的构造结构，它们是细胞膜、细胞质和细胞核。

1) 细胞膜

它是包围在细胞质表面的一层生物膜，又称为细胞质膜。厚度一般为 5~8nm，细胞膜主要是由蛋白质分子（约占 50%）和脂类分子（约占 50%）构成。它的主要任务是选择性地控制细胞内外营养物质和代谢产物的运送，外界的营养物、气体和

水,通过细胞膜传输到细胞内部,并将代谢产物排泄出细胞体外。同时它具有调节细胞内外渗透压的作用。膜上还含有能量代谢的酶系,是细胞的产能场所。

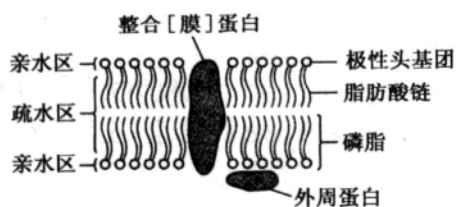


图 2-1 细胞膜结构模式图

通过电子显微镜的观察,可以清晰见到两暗一明的三层结构,这是磷脂双分子层,其中埋藏着与物质运输、能量代谢和信号接收有关的膜内在蛋白质。脂类化合物是非极性、疏水性(亲脂肪)脂肪物质。磷脂化合物则是和脂肪相近的物质,它也包含极性群,所以磷脂化合物一方面有疏水性,另一方面有亲水性,通过静电

吸引,类脂(化合物)分子会排列成一个复影,其间疏水的那一端彼此相对排列,而亲水的一端则朝外整合蛋白是完全地与膜连接而且贯穿全膜的蛋白,所以在此区域中的这些蛋白有疏水性氨基酸埋藏在脂内。外周蛋白是由于磷脂带正电荷性,只是通过电荷作用与膜松散连接的一类(图 2-1)。

细胞膜内部充满着运动,磷脂双层构成的细胞膜骨架并不是刚性的结构,而是有流动性;膜内外两层的蛋白质分子则像一群岛屿一样,飘浮在脂质的“海洋”中(图 2-2),蛋白质可以扩散到类脂层,反过来类脂化合物也可以扩散到蛋白质内。但两侧的蛋白质不能交换。通过这种扩散方式才能进行合理的物质传输。

2) 细胞质

在细胞膜以内、细胞核以外的原生质称为细胞质。它是细胞内环境最基础的物质,也是酶的所在地。细胞质是新陈代谢的内环境,细胞内各种生物化学反应均在其中进行。

3) 细胞核

在动、植物细胞中心常有一个或多个细胞核,哺乳动物除成熟的细胞无细胞核外,其他细胞均有细胞核。真核细胞核主要有 3 个部分组成,它们是:核膜、核仁、染色质。它是遗传贮存、复制和表达的主要场所。

(1) 核膜 核膜把核内物质与细胞质分隔开。核膜上有许多孔称为核孔,核孔是某些大分子的运输孔道。它能使核糖核酸大分子(RNA)通过,但核仁和染色质却不能通过。

(2) 核仁 它由核糖核酸(RNA)和蛋白质组成。其主要功能是进行核糖体 RNA 的合成。产生的 RNA 可经核孔进入细胞质,参与蛋白质的合成。

(3) 染色质 它是由脱氧核糖核酸(DNA)和蛋白质组成,当细胞处于分裂期间时,染色质组合成为细长的丝,并交织成网状,这些丝状生物就是染色

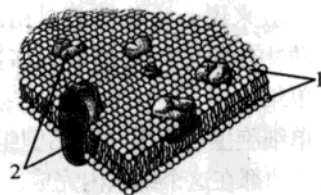


图 2-2 细胞膜流动镶嵌模型

1. 磷脂(双分子层); 2. 蛋白质分子

质。当细胞处于分裂期时，细胞核内长丝状的染色质高度螺旋化，缩短变粗，就形成了光学显微镜下的清晰可见的棒状小体，这时称其为染色体。细胞核中的染色体上保存并且携带着细胞遗传信息。

2. 特殊结构

在真核细胞中，除了上述基本结构外，还含有特殊的结构。如细胞壁、细胞器和内含物等。

1) 细胞壁

细胞壁是由一种肽聚糖组成的一层无色透明，而且有弹性的薄层，它位于细胞的最外层，其作用是保护细胞使其免受渗透压等外力的损伤，维持细胞的形态，溶于水的物质可以通过细胞壁，细胞壁黏滞而且有膨胀性。一般来说，植物体比较坚硬，动物体比较柔软，这是因为植物细胞有细胞壁，而动物细胞没有细胞壁的缘故。

2) 线粒体

线粒体普遍存在于真核生物细胞中，是细胞进行生物氧化的细胞器。它由双层膜包被，内层膜折叠成盘状或管状，称为嵴。ATP 的产生部位就在附着于嵴上的颗粒中。

3) 内质网

内质网普遍存在于真核细胞中。内质网是由管状和盘状膜组成的复合体，与核膜相连。内质网可以是滑面型，或被核糖体附着而变糙面型。内质网对于细胞的生命活动有着重要的作用，其主要功能是合成和输送蛋白质和脂类（图 2-3）。



图 2-3 内质网

4) 核糖体

核糖体大都附着于内质网上，有些则游离在细胞质的基质中。它是由蛋白质、核糖核酸和酶共同构成的粒状小体。核糖体是细胞内合成蛋白质的场所，因此有人把它比喻为蛋白质合成的“装配机器”。

5) 高尔基体

高尔基体是一系列扁平的、有膜包被并具孔的囊泡。从内质网分泌出来的小泡与高尔基体融合，其内含物在此进一步进行生化加工。加工后的物质以小泡的形式从高尔基体中分泌出来，然后与其他细胞器或质融合。

6) 质体

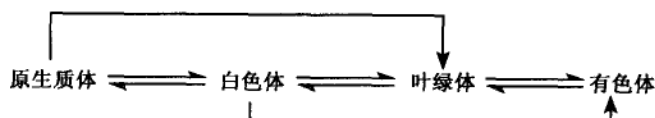
植物区别于动物的又一个最主要的特征是它们的细胞内出现质体。由于质体中含有不同的色素和具有不同的功能，把细胞中的质体分为以下三种类型：白色体、叶绿体和有色体。

(1) 白色体 白色体为无色(又称无色体),它的前体是“原生质体”。在植物细胞中,白色体可以大量积聚淀粉。有些白色体还可以积聚蛋白质或脂肪类物质。在光照下白色体常常转变为叶绿体,从而具有光合作用。

(2) 叶绿体 是由双层膜包被的细胞器,因含有能够进行光合作用的叶绿素而得名。叶绿体是植物细胞吸收二氧化碳和水生成糖类的主要场所。

(3) 有色体 有色体又称杂色体。因其含有叶黄素、胡萝卜素等色素,呈现黄色或橘红色。有色体在植物细胞内也可以积聚淀粉、脂类等物质,它广泛存在于植物的果实、根、茎等部位的细胞中。它可以由叶绿体转化而来。

各种类型的质体之间,在发育上有着密切的联系,它们可按下面路线互相转化:



7) 溶酶体与过氧化物酶体

溶酶体和过氧化物酶体是高尔基体分泌的、有膜包被的囊泡。溶酶体有和酸性水解酶参入胞内的消化作用。过氧化物酶体含有氨基酸和脂肪酸降解酶以及过氧化氢酶,后者对降解过程中产生的过氧化氢有解毒作用。

2.2 细胞内的化合物的结构、性质及其作用

构成细胞的化合物,包括无机物和有机物。无机物是指普遍存在于非生物体中的化合物。细胞中所含的无机物包括水和无机盐。有机物则主要是指蛋白质、核酸、糖类和脂类等大分子。它们在生物体干物质中占绝大部分,这些有机物在自然界中仅仅存在于生物体内,它们是生物体特有的标志物,所以人们将生物体又称为有机体或机体。构成细胞的这些化合物在细胞中的存在形式和所具有的功能也都不一样。

2.2.1 糖

糖类是指多羟基醛或多羟基酮一类有机化合物,包括单糖、二糖、和多糖三大类。构成糖类分子的三种元素是碳(C)、氢(H)、氧(O),其中氢原子和氧原子之比是2:1。大多数糖类都是植物通过光合作用合成的,动物自身是不能合成的,必须直接或间接以植物为食物来获取这类化合物。

糖类是生物体的重要组成成分。在所有生物细胞中均有糖类物质的存在,植物体由于光合作用合成糖类,细胞含糖量普遍较高,如植物的细胞壁几乎全部由糖类组成。糖类又是微生物的主要碳源,是工业发酵的重要原料。工业发酵的各种产物大都是通过糖代谢生成。同时糖类也是人类和动物生命活动的主要能源。

人体所需能量主要来自食物中的糖类，特别是淀粉的供给。淀粉经过酶的催化作用最后水解成葡萄糖，进入细胞参加生物氧化，释放的能量可以满足各种生命活动的能量需求。

2.2.2 蛋白质

蛋白质是一类复杂的高分子含氮化合物，相对分子质量一般在 $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^6$ ，有的可达数百万或数千万，是极为重要的活性物质。

自然界中的一切微生物都含有蛋白质。就微生物而言，其蛋白质含量尤为丰富，若按菌体的干重计：酵母含蛋白质 50%~70%；霉菌含蛋白质 14%~50%；细菌含蛋白质 50%~80%；噬菌体除含少量核酸外，几乎都是蛋白质。

蛋白质在生物体内的生理功能多种多样：酶作为有特殊催化功能的蛋白质，几乎催化着机体内的一切变化；核蛋白与生物的遗传变异紧密相关； α -角蛋白和 α -纤维状蛋白分别作为维持机体的弹性及非弹性结构；肌肉收缩是肌动蛋白和肌球蛋白的束状物彼此间发生滑动的结果，有些微生物的鞭毛活动也属于类似于肌球蛋白的活动；某些激素蛋白或多肽作为新陈代谢调节的一个因子；机体内产生的抗体为免疫球蛋白；使机体致病的病毒也仅由蛋白质和核酸组成；具有载氧功能的血红蛋白是氧气和二氧化碳的运载工具；生物氧化中电子的得失也靠色素蛋白来完成；细胞膜是蛋白质-脂类的复合物，具有半透膜的特点，且对所传送的分子及方向具有选择性，能更好地吸收营养和释放代谢产物；蛋白质也是蛋白质自我更新所需氨基酸的来源，这主要由机体内所贮存的蛋白质来供应。总之，蛋白质体现了生命活动中的多种生物学功能。

1. 蛋白质的化学组成

化学元素分析表明，蛋白质分子质量虽大小不一，但化学元素的组成大致是相似的。它们除含氮(N)外，还含碳(C)、氢(H)、氧(O)，同时还含少量的硫(S)、磷(P)，有的还含有铁(Fe)、铜(Cu)、锰(Mn)、锌(Zn)等金属元素，个别还含碘(I)。

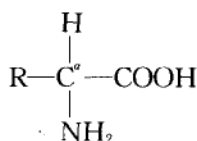
蛋白质含氮有一定比例，一般蛋白质含氮(N)在 15%~17.6%，其平均值为 16%。这是蛋白质的一个重要特点。

蛋白质受酸、碱或酶的催化作用，可将其大分子逐次水解为分子质量较小的肽、肽，最终生成 α -氨基酸。由此可见， α -氨基酸为蛋白质分子组成的基本单位。

2. 氨基酸的结构、分类及主要性质

1) 天然氨基酸的结构特点

蛋白质经完全分解后，生成 α -氨基酸。 α -氨基酸的通式为



上式中除 R 为 H 的甘氨酸外，其他氨基酸所含的 α -碳原子均为不对称碳原子，因此，氨基酸（甘氨酸除外）均具有光学活性，能使偏振光平面向左或向右旋转。

氨基酸从构型上可分为两种异构体，一种是 *L*-型，另一种是 *D*-型。天然蛋白质中所发现的氨基酸都属 *L*-型，因此，*L*-氨基酸称为天然氨基酸。*D*-型与 *L*-型氨基酸在化学组成上虽然没有区别，但在生理功用上却不相同。各种微生物一般只能利用 *L*-氨基酸。

发酵法生产的氨基酸皆为 *L*-型，化学合成法生产的氨基酸往往为 *L*-型与 *D*-型的混合物。

2) 氨基酸的分类

按氨基酸的分子结构的不同（通式中基团 R 的不同）可分为链状氨基酸（即脂肪族氨基酸）、碳环氨基酸（即芳香族氨基酸）和杂环氨基酸三大类。也可按其分子中氨基（ $-\text{NH}_2$ ）及羧基（ $-\text{COOH}$ ）的数目，或其在溶液中的酸碱性分为中性氨基酸、酸性氨基酸和碱性氨基酸。

比较普遍存在于多数蛋白质中的氨基酸有 20 种，见表 2-2。

中性氨基酸分子中氨基与羧基的数目相等，一般对石蕊呈中性反应。

酸性氨基酸分子中有 2 个羧基 1 个氨基，对石蕊呈酸性反应。

碱性氨基酸分子中有 2 个氨基 1 个羧基，对石蕊呈碱性反应。

3) 氨基酸的主要性质

(1) 物理性质 α -氨基酸均为无色的结晶，各有其一定的晶形。熔点比较高，为 $200\sim 300^\circ\text{C}$ ，往往加热至熔点时，分解生成胺，并放出 CO_2 气体。

α -氨基酸因具有极性基团，一般可溶于水，但个别氨基酸如胱氨酸、酪氨酸等难溶于水。 α -氨基酸一般不溶于乙醚，微溶于乙醇，但均易溶于稀酸、稀碱。

除甘氨酸外，所有天然氨基酸都具有旋光性。

(2) 化学性质

① 两性解离及等电点。根据光谱分析，氨基酸在结晶状态时是由离子键构成的化合物，是由羧基阴离子（ $-\text{COO}^-$ ）和氨基阳离子（ $-\text{NH}_4^+$ ）构成的内盐。在氨基酸的水溶液中，有两性离子，也有阴离子和阳离子。因此，氨基酸属两性化合物，具有酸性和碱性的双重性质，是一种两性电解质，能与酸或碱化合并生成盐。

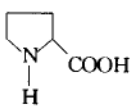
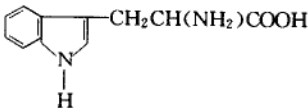
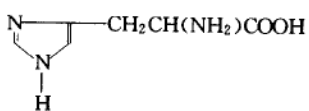
一般情况下，氨基酸中羧基的解离程度大于氨基，因此氨基酸中的羧基与氨

基的数目相等时,其水溶液偏于酸性。

如果把氨基酸水溶液的酸碱性加以适当调节,促使其酸性电离与碱性电离恰好相等,使氨基酸在溶液中呈两性离子存在,这时氨基酸分子内正电荷与负电荷相等,净电荷为零。此时的 pH 称为氨基酸的等电点,以 pI 表示。氨基酸在等电点时,分子间易聚集成大分子而沉淀析出,其溶解度最小。

各种氨基酸的化学结构不同,其等电点也是不相同的,见表 2-2。

表 2-2 氨基酸的分类

氨基酸名称	分子式	等电点 pI	熔点/°C
中 性 氨 基 酸			
甘氨酸 (Gly)	$\text{CH}_2(\text{NH}_2)\text{COOH}$	6.06	240
丙氨酸 (Ala)	$\text{CH}_3\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$	6.00	297
丝氨酸 (Ser)	$\text{CH}_2(\text{OH})\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$	5.68	223
半胱氨酸 (Cys)	$\text{CH}_2(\text{SH})\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$	5.05	260
苏氨酸 (Thr)	$\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$	6.16	253
蛋氨酸 (Met)	$\text{CH}_2(\text{SCH}_3)\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$	5.74	283
缬氨酸 (Val)	$\text{CH}_3\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$	5.96	298
亮氨酸 (Leu)	$\text{CH}_3\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$	5.98	295
异亮氨酸 (Ileu)	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$	6.02	280
苯丙氨酸 (PHe)	$\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$	5.48	283
酪氨酸 (Tyr)	$\text{HO}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$	5.66	316
脯氨酸 (Pro)		6.30	220
色氨酸 (Try)		5.89	289
谷氨酰胺 (Gln)	$\text{CH}_2(\text{CONH}_2)\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$	—	184
天冬酰胺 (Asn)	$\text{CH}_2(\text{CONH}_2)\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$	—	226
酸 性 氨 基 酸			
谷氨酸 (Glu)	$\text{CH}_2(\text{COOH})\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$	3.22	248
天冬氨酸 (Asp)	$\text{CH}_2(\text{COOH})\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$	2.77	270
碱 性 氨 基 酸			
精氨酸 (Arg)	$\text{H}_2\text{NC}(\text{NH}_2)-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$		
赖氨酸 (Lys)	$\text{CH}_2(\text{NH}_2)(\text{CH}_2)_4\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$		
组氨酸 (His)			

氨基酸的两性电离及等电点的概念,在氨基酸的分离和提取技术上已得到广泛的应用。

② 与金属离子反应。氨基酸可与一些金属离子反应生成络合物。如谷氨酸与 Zn^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Ba^{2+} 等离子作用可生成难溶于水的络合物。利用这一性质,可用于分离提取某种氨基酸。

③ 黑色素的形成。氨基酸能与单糖及糖的分解产物(如羟甲基糠醛、糠醛等)在高温条件下缩合生成一类呈黑色的复杂化合物,这类物质统称为黑色素。黑色素有芳香味道,对协调酿造产品的风味有一定作用。许多食品在制造、干燥及贮存过程中变黑,也是由于黑色素形成的缘故。

④ 与亚硝酸、甲醛、茚三酮反应。 α -氨基酸,除亚氨基酸(脯氨酸、羟脯氨酸)外,均可与亚硝酸作用生成 α -羟基酸并放出氮气;氨基酸的氨基能与甲醛反应生成羟甲基氨基衍生物;氨基酸与茚三酮的水合物一起加热起氧化脱氢反应,放出的氨与1分子茚三酮及1分子茚三酮还原产物反应生成蓝色化合物,所生成的酮酸则被加热分解放出 CO_2 。这三种反应的原理都已用于氨基酸含量的测定中。

3. 蛋白质的结构、主要化学性质和分类

1) 蛋白质的结构

蛋白质的性质及种种生理活性,决定于蛋白质的特殊结构。蛋白质的结构可分为基本化学结构(一级结构)和空间结构(二级、三级和四级结构)。详见第7章。

2) 蛋白质的主要性质

(1) 蛋白质的两性解离及等电点 与氨基酸类似,蛋白质也是一种两性电解质,同样能按化学规律与定量的酸和碱化合成盐。

在酸性环境中,蛋白质分子离解的结果是蛋白质阳离子多于阴离子,整个蛋白质分子带上正电荷。在碱性环境中,是蛋白质阴离子多于阳离子,整个蛋白质分子带上负电荷。调节溶液的 pH,蛋白质分子上的电荷将发生变化。总能控制某个 pH,使蛋白质分子上的正负电荷相等,净电荷为零,整个蛋白质分子呈两性离子存在。此点的 pH 称为蛋白质的等电点(以 pI 表示)。等电点时,蛋白质溶液的溶解度、黏度、渗透压、膨胀性及导电能力均降为最低值。

(2) 蛋白质的变性作用 天然蛋白质分子都有紧密而特殊的空间结构,决定其具有特殊的生理功能与活性。如果蛋白质受外界各种因素的影响,使其二级、三级结构遭到破坏,则天然蛋白质的理化性质就会改变,并失去原来的生理功能与活性。这些外界因素中的物理因素主要有加热、紫外线、超声波、强烈的搅拌振荡及各种放射线等;化学因素主要有重金属盐、浓酸浓碱及醇、酚、醛、酮、脎等化学试剂。

蛋白质变性后,其溶解度降低,黏度增大;在生理上,原有的催化功能(酶)、载送氧的功能(血红蛋白)、免疫功能(抗体蛋白)、调节代谢功能(激素蛋白)、或致病功能(病毒蛋白)都会丧失。蛋白质变性作用在理论和实践上均具有重要的意义。

另外蛋白质还有盐析作用、呈色反应等性质,已在蛋白质提取、分析等方面应用。

3) 蛋白质的分类

蛋白质按组成和性质分类,通常分为单纯蛋白质和结合蛋白质两大类。

2.2.3 酶

酶是生物体内产生的一类具有催化作用的物质,能加快化学反应速度,并使之发生一定顺序转换。由于酶是生物体产生,所以也称生物催化剂。任何细胞都能产生各种各样的酶,生物体中的化学反应,几乎都是在酶的催化下进行的,因此可以认为,没有酶便没有生命。

1. 酶的基本结构

研究表明,酶的化学本质是蛋白质,其分子结构也与蛋白质一样,具有一级、二级、三级或四级结构。按组成相应地分为单成分酶和双成分酶。单成分酶一般仅由蛋白质分子组成;双成分酶的组成除蛋白质部分(称酶蛋白)外,还有部分非蛋白部分(称辅酶或辅基),这两部分缺一不可,缺了,酶就丧失催化活性。双成分酶也称全酶。

酶的活性部位也叫酶的活性中心,是指酶蛋白分子中,直接与底物结合,形成酶—底物复合物的,随时发生化学反应的特殊部位。酶的活性部位只有在酶蛋白保持一定的空间构象时,才能存在并发挥其催化功能。

人们还发现,离体的酶同样起着高效的催化作用,这对酶的生产 and 应用有着重要的意义,也推进了近代酶剂工业的兴起和酶制剂在工农业、医药等方面的广泛应用。

2. 酶的催化特征

酶是一种生物催化剂,具有一般催化剂的作用。但由于酶的化学本质是蛋白质,故有其特点。

1) 酶的催化反应条件

酶能够在常温和 pH 近乎中性的温和条件下发挥其催化功能。这与一般的催化剂反应时需要的剧烈条件是不相同的。

2) 酶的催化效率

酶的催化效率要比一般催化剂的催化效率高得多。如 1g 结晶的细菌 α -淀粉酶, 在 65℃ 条件下, 15min 便可使 2t 淀粉水解为糊精, 而酸法或碱法水解淀粉无论如何也达不到这种速度。

3) 酶的专一性

一种酶仅能作用于某一种物质或一类结构相似的物质并催化某种类型的反应, 这种特性称为酶的专一性, 又叫酶的特异性或选择性。酶的专一性是相对而言的, 按其严格程度的不同, 可以分为:

(1) 相对专一性 一种酶能够催化一类具有相同化学键或基团的物质进行某种类型的反应, 这种专一性称为相对专一性。

如脂肪酶可以催化含酯键 ($\text{—}\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C—O—}$) 的一类物质水解等。

(2) 绝对专一性 一种酶只能催化一种化合物进行一种反应, 这种专一性称为绝对专一性。

如脲酶只能催化尿素进行水解而生成二氧化碳和氨, 既不能催化尿素以外的任何物质发生水解, 也不可以使尿素发生水解以外的其他反应。

(3) 立体异构专一性 当底物有不对称的碳原子时, 酶只能作用于异构体中一种, 而对另一种则全无作用, 这种专一性称为立体异构专一性。

如酵母中的糖酶类只作用于 D-型的糖而不能作用于 L-型的糖; L-氨基酸氧化酶只作用于 L-氨基酸, 而不作用于 D-氨基酸等。

酶的专一性在科研和生产中都得到广泛的应用。利用这一特性, 可以从原料得到单一的产物, 防止副产物的生成, 提高产品的质量和产量。还可以利用酶的专一性进行酶的鉴定、酶的分类、酶的活力测定以及对某些物质进行定性定量分析等。

当然, 酶的催化功能在特定条件下, 如使用酶的底物类似物, 或用化学药剂等, 可以引起酶催化功能的转换。

3. 酶的应用

酶的种类很多, 国内外用于生产实践的有 100 多种。

2.2.4 核酸

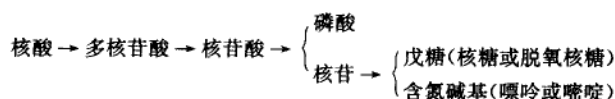
核酸与蛋白质一样, 是生物体内极为重要的基本物质。天然的核酸常与蛋白质结合, 称为核蛋白。核酸存在于一切生物体中, 一般细菌中含有 10%~20% (干重计, 下同), 酵母含 6%~8%, 霉菌含 1%, 噬菌体含 40%~50%。核酸根据其化学特点, 分为两大类: 一类是脱氧核糖核酸 (DNA), 主要存在于细胞

核内，微量存在于细胞质；另一类是核糖核酸（RNA），主要存在于细胞质内，微量存在于细胞核。

通过对核酸的研究，人们认识到，核酸是遗传信息的载体，是遗传物质。生物体的遗传特征主要由 DNA 决定，它通过 RNA 主宰蛋白质的合成，决定蛋白质的种类和性质。核酸则是通过细胞，一代一代地复制着、延绵着生物体的遗传特征。

1. 核酸的化学组成

核酸是高分子化合物。核酸的水解过程可表示如下：



两类核酸（DNA、RNA）在化学组成上有差异，主要差异在于戊糖的不同，核糖核酸含核糖，脱氧核糖核酸含脱氧核糖。另外在嘧啶碱基的组成上亦有差异，如表 2-3 所示。

表 2-3 两类核酸的化学组成差异

水解产物 核酸类别	碱 基		戊糖	磷酸
	嘌呤碱	嘧啶碱		
核糖核酸 (RNA)	腺嘌呤 (A)	胞嘧啶 (C)	D-核糖	H_3PO_4
	鸟嘌呤 (G)	尿嘧啶 (U)		
脱氧核糖核酸 (DNA)	腺嘌呤 (A)	胞嘧啶 (C)	D-2-脱氧核糖	H_3PO_4
	鸟嘌呤 (G)	胸腺嘧啶 (T)		

2. 核酸分子结构的概念

由核酸的化学组成知，核酸是高分子化合物，它的基本组成是核苷酸。对每类核酸来说，它的核苷酸种类基本是四种，由于在核酸中，它们的数量很大，都是按一定的顺序相连而成，因此核酸的种类很多，并都有一定的化学结构（一级结构）与立体结构。

1) 核酸分子中核苷酸的连接方式（一级结构）

核酸由核苷酸所组成，它们的连接方式是磷酸基团与其相邻的核苷酸中戊糖的羟基（—OH）缩合，即核苷酸之间是通过叫做 3', 5'-磷酸二酯键相连接而形成多核苷酸链。

2) DNA 的双螺旋结构（DNA 的立体结构）

对 DNA 是由许多核苷酸以 3', 5'-磷酸二酯键相连接而成为多核苷酸长链所构成，这在 20 世纪 40 年代已经了解。但对多核苷酸长链如何形成立体结构并担负起携带大量贮存的遗传信息的生物学功能，则是到 1953 年由华特生（Wat-

son) 和克立克 (Crick) 提出的 DNA 双螺旋模型才获得解答。

DNA 双螺旋模型理论认为: DNA 分子是由两条多脱氧核糖核苷酸长链组成, 这两条链是右旋的, 以相反方向围绕同一轴盘旋, 形成右旋的双螺旋结构。两条链由碱基对之间的氢键相连, 以维持双螺旋的立体结构。四种碱基相互形成氢键是有一定规律的, 都是由腺嘌呤(A)和胸腺嘧啶(T)以氢键相连形成 A=T 对; 由鸟嘌呤(G)和胞嘧啶(C)形成 G=C 对。

由于 DNA 的分子可以很大, 含有的核苷酸单位也就很多, 四种碱基在分子中的排列次序千变万化, 在这种碱基排列中就蕴藏着遗传密码。因此, 各种生物的 DNA 分子中的碱基排列的顺序总是有差异的。为了保证生物体的遗传特征精确地从一代(亲代)传到下一代(子代), 生物体是通过 DNA 自我复制来实现的。

DNA 分子的双螺旋结构理论不仅为分子遗传学奠定了基础, 而且也为进化论进一步提供了可靠的科学依据。

3) RNA 的立体结构

除少数病毒的 RNA 外, RNA 是以单链分子存在的。根据研究, 一般认为 RNA 分子的多核苷酸链也能形成与 DNA 相类似的螺旋区。螺旋区是由单链自身回折, 以腺嘌呤(A)和尿嘧啶(U)相连的 A=U 对、鸟嘌呤(G)和胞嘧啶(C)相连的 G=C 对形成的。

3. 核酸的主要理化性质

1) 一般物理性质

核酸的相对分子质量很大, DNA 的相对分子质量一般为 $10^6 \sim 10^9$ 。RNA 的相对分子质量大小变动很大, 在 $10^4 \sim 10^6$ 。

核酸的化学组成中含有 C、H、O、N 和 P 五种元素。核苷酸中除肌苷酸、鸟苷酸具有鲜味外, 大多呈酸味。

DNA、RNA、核苷酸一般都溶于水而不溶于乙醇、氯仿等有机溶剂。核酸的钠盐水溶液具有很高的黏度。

2) 核酸的变性作用

核酸与蛋白质一样能因理化因素引起变性现象。所谓变性是指多核苷酸之间维持立体结构的氢键(碱基对之间的氢键)的断裂, 故变性后核酸的相对分子质量不变, 但螺旋结构变为无定形的伸展或卷曲状态。

DNA 核酸的变性可由四种方法引起: ①将 DNA 溶解在纯水或非常稀的电解质溶液; ②用强酸或强碱溶液处理; ③加热; ④加入破坏氢键的试剂如脲、盐酸胍、水杨酸等。变性后核酸的生物学活性丧失, 黏度下降。

另外, 核酸还有离解性质、紫外线吸收性质和显色反应等性质。

本章小结

本章节介绍了生物学的一些基本知识，重点介绍了生物的基本单位——细胞的结构、生长和功能，生物与非生物的根本区别，生物大分子糖、蛋白质、酶和核酸的基本组成单位、结构、特性。通过本章节的学习，主要了解细胞的结构和功能、生物的特性、氨基酸与蛋白质的结构特点、两性离解能力、蛋白质胶体性、蛋白质变性，酶的催化特点及核酸的结构和基础知识。

复习思考题

1. 名词解释：原生质、染色质、细胞核、核酸、酶、酸性搭配、碱性氨基酸。
2. 简述细胞核的构造及其作用。
3. 构成细胞的生物大分子化合物主要有哪些？它们分别由哪些小分子构成？
4. 为什么说细胞是生物体结构和功能的基本单位？
5. 蛋白质在生物体内生理功能主要有哪些？
6. 天然氨基酸的结构特点是什么？氨基酸按其结构特点的不同可分为哪三类？
7. 什么是蛋白质的一级结构和空间结构？
8. 酶的化学本质是什么？酶的催化特点是什么？
9. 核酸的遗传特性是什么？简述核酸的分子结构的基本概念。



第 3 章

发 酵 工 程

发酵工程是研究微生物工业生产中各单元操作的工艺和设备的一门学科。其主要内容包括菌种的选育、发酵条件的优化与控制、反应器的设计及产物的分离、提取与精制等。

3.1 发酵工程概况

3.1.1 发酵工程的定义

微生物工业是利用微生物的生长和代谢活动生产各种有用物质的现代工业，由于它以培养微生物（发酵）为主，所以也称发酵工业。发酵工程是研究微生物工业生产中各单元操作的工艺和设备的一门学科。

发酵工程是利用微生物的特定性状和功能，通过现代化工程技术生产有用物质或直接应用于工业化生产的技术体系；是将传统发酵与现代的 DNA 重组、细胞融合、分子修饰和改造等新技术结合并发展起来的发酵技术。也可以说是渗透有工程学的微生物学，是发酵技术工程化的发展。

什么是发酵？工程上的定义为：利用微生物在有氧或无氧条件下的生命活动来制备微生物菌体或其代谢产物的过程。

发酵工程基本上可分为发酵和提取两大部分。发酵部分是微生物反应过程，提取部分也称后处理或下游加工过程。完整的微生物工程应包括从投入原料到获得最终产品的整个过程。发酵工程就是要研究和解决这整个过程中的工艺和设备问题，将实验室成果和中试成果扩大到工业化生产中去。

实践证明，发酵工程不仅是开发微生物资源的一项关键技术，同时也是生物技术产业化的重要环节。目前已开发的“工程产品”如：人干扰素、乙肝疫苗、心活素（tPA）、红细胞生成素（EPO）、血凝因子、青霉素酰化酶等产品，都是通过发酵工程来完成的，并且已产生巨大的效益。

3.1.2 发酵工程反应过程的特点

发酵工程反应过程是指由生长繁殖的微生物所引起的生物反应过程。这些过程既有利用微生物获得某种产品的过程，又有利用微生物消除某些物质（废水、

废物的处理)的过程,这些过程的产物可以是过程的中间或终点时的代谢产物,也可以是有机的降解物或微生物自身的细胞。

发酵工程与化学工程联系非常密切,化学工程中的许多单元操作在微生物工程中得到广泛应用。但由于微生物工业是培养和处理活的有机体,所以除了与化学工程有共性外,还有它的特殊性。如空气的除菌系统、培养基灭菌系统等都是微生物工程特有的。

与化学工程相比,发酵工程反应过程具有以下特点:

(1) 作为生物化学反应,通常是在温和的条件(如常温、常压、弱酸、弱碱等)下进行。

(2) 原料来源广泛,通常以糖、淀粉等碳水化合物为主。

(3) 反应以生命体的自动调节方式进行,若干个反应过程能够像单一反应一样,在单一反应器内很容易地进行。

(4) 发酵产品多数为小分子产品,但也能很容易地生产出复杂的高分子化合物。如酶、核苷酸的生产等。

(5) 由于生命体特有的反应机制,能高度选择性地对复杂化合物在特定部位的氧化、还原官能团导入等反应。

(6) 生产发酵产物的微生物菌体本身也是发酵产物,富含维生素、蛋白质、酶等有用物质。除特殊情况外,发酵液一般对生物体无害。

(7) 要特别注意防止发酵生产操作中的杂菌污染,一旦发生杂菌污染,一般都会遭受损失。

(8) 通过微生物菌种的改良,能够利用原有设备较大幅度地提高生产水平。

发酵过程中也有一些问题应引起注意,如:

(1) 底物不可能完全转化为目标产物,副产物的产生不可避免,因而造成提取和精制的困难。

(2) 微生物反应是活细胞的反应,产物除受环境因素影响外,还受细胞内因素的影响,并且容易发生变异,影响反应物的生成率,实际控制也相当困难。

(3) 生产前准备工作量大,花费高。相对化学的反应而言,反应器效率较低。

(4) 发酵中,因底物浓度不能过高,从而导致要使用较大体积的反应器。

(5) 发酵废水常具有较高的 COD 和 BOD,需要进行处理方可排放。

3.1.3 发酵工程的内容和发展

发酵工程的内容主要包括生产菌种的选育、发酵条件的优化与控制、反应器的设计及产物的分离、提取与精制等过程。

发酵工程就其发酵方式而言可分为厌氧发酵和通风发酵两大类。厌氧发酵包

括酒类发酵、丙酮丁醇发酵、乳酸发酵、甲烷发酵等；通风发酵有酵母培养、抗生素发酵、有机酸发酵、酶制剂生产和氨基酸发酵等。

发酵工程涉及的生产部门有：食品工业（如调味品、食品添加剂、发酵食品等）、酶制剂、农产品加工、酒精和饮料酒工业、氨基酸工业、有机酸工业、医药工业（核苷酸、抗生素、激素等）、单细胞蛋白的生产、废物废水的处理、生物气体的产生等。

目前已知的具有生产价值的发酵产物类型有：微生物菌体本身；由菌体或酶系实现生物转化所得到的产物；菌体生长所必需的基本代谢产物；菌体生长不必需的次生代谢产物等。

发酵工程的生产可归纳为三大类：

- (1) 细胞的生产 如酵母、细菌、霉菌和真菌（包括食用菌）的生产等。
- (2) 酶类的生产 如各个酶种、酶制剂和各种曲类（大曲、小曲、麸曲、麦曲）等的生产。
- (3) 代谢产品 如工业溶剂（酒精、丙酮、丁醇等）、有机酸（乙酸、乳酸、柠檬酸等）、氨基酸（谷氨酸、赖氨酸、丙氨酸等）、维生素（B族维生素、维生素C等）、抗生素（青霉素、链霉素等）、多糖类（葡聚糖、细菌多糖、真菌多糖等）、核苷及核苷酸（ATP、AMP、肌苷、5'-肌苷酸等），近来，一些激素、胰岛素、干扰素、抗体、疫苗等也可用发酵法生产。

随着科学技术的发展，发酵工程涉及的范围将越来越宽广。近年来，由大量生产实践和科学实验总结出来的发酵机制、发酵动力学、连续发酵的理论研究，促进了微生物工业中许多实际问题的解决。但由于工业飞跃发展，目前的经验还不足或还没有总结归纳为理论，因而生产中出现的某些实际问题尚无完善的理论指导，例如，霉菌、放线菌的发酵就没有完善的理论指导，因而还没有比较满意的设计和放大方法。又如连续发酵的理论虽然研究的很多，但实际生产中的许多问题未能很好解决，因而除酒精、啤酒、丙酮、丁醇等生产和活性污泥法处理废水采用连续发酵外，大生产上应用极少。理论问题之所以难以解决，不外乎二种原因：

(1) 微生物的复杂和多样性 微生物的生长要求、生理特点、代谢途径各不相同，因此，适合于某种微生物的发酵罐的形式，不一定适用于另一种微生物；同一种形式的发酵罐适用于某些菌种，但各种菌对通风量、搅拌转速、培养条件等要求又各不相同。因此，发酵生产条件的变化比化工生产复杂。要在消耗最小的情况下维持最高生产率，目前只有通过大量试验才能获得最佳条件。

(2) 试验条件的局限性 目前因大型生产设备条件的限制，不能用各种不同的条件进行试验，所以某些理论和设计方法的提出，大多是通过实验室小试后得到的。小型试验虽然在一定程度上反映出大设备的一些情况，但它不可能包括全部生产条件。

计算机在发酵工程中的应用,也由于生物对象的复杂性,还没有足够的直接测量传感器和完善的数学模型,有待进一步研究。所以发酵全过程的最优化动态控制基本上还处于检验与半检验阶段。

总之,发酵工程领域内很多理论和实际问题远未解决,有待今后进一步研究和探讨。在目前阶段,要很好解决生产问题,必须多做试验。实验室小型试验、中间试验、大型生产,这个过程是目前新产品投产的必经之路。

3.2 微生物工业菌种与培养基

自然界中存在着各种各样的微生物,它们是个体微小,构造简单,必须借助显微镜才能看清它们的外形的一群微小生物。微生物具有不同的形态结构和生理特征,可以分成不同的类群。其中,细菌、放线菌、酵母和霉菌等已广泛应用于发酵工业,有的直接利用其菌体细胞,有的则利用其代谢产物或转化机能。了解微生物的种类、形态、及生理特征的目的在于认识微生物的特性,掌握其生命活动规律,使其在工业生产中充分发挥作用。

微生物具有种类多、繁殖快、分布广、易培养、代谢能力强和容易变异等特点,并且在生产中不易受时间、季节、地区的限制。

微生物包括原生动物、单细胞藻类、真菌、立克次氏体和病毒等。原生动物、单细胞藻类、真菌等的细胞含有像高等植物一样的具体细胞核,细胞核有核仁、核膜和染色体,这类微生物称真核生物。细菌和立克次氏体蓝绿藻类等的细胞含有不具体的细胞核,细胞核没有核膜、核仁,遗传(DNA)不组成典型的染色体,这类微生物称原核生物。病毒没有具体细胞结构,为非细胞微生物。工业上应用的全部微生物都称为工业微生物,生产中,还会和杂菌污染打交道,如噬菌体等。有些微生物既是工业生产菌,但在一定条件下又可能是杂菌。工业生产中常见的微生物和经常遇到的杂菌主要是细菌、放线菌、酵母、霉菌和一部分病毒。由于发酵工程本身的发展以及遗传工程正进入发展阶段,病毒、藻类等其他微生物也正逐步地成为工业生产菌。

3.2.1 发酵工业对菌种的要求

微生物广泛分布于土壤、水和空气等自然界中,尤以土壤中最多。在工业基础生产中,我们不仅会遇到有益的微生物,还有有害的微生物。有的微生物从自然界分离出来就能利用,有的需要对分离到的野生菌株进行人工诱变,得到突变体才能被利用。为了保证大规模生产的正常性和安全性,选择菌种应遵循以下原则:

(1) 能在廉价原料制成的培养基上迅速生长,并生成所需的代谢产物,产量高。

(2) 可以在易于控制的培养条件下(糖浓度、温度、pH、溶解氧、渗透压等)迅速生长和发酵,且所需酶活力高。

(3) 生长速度和反应速度较快,发酵周期短。

(4) 根据代谢控制要求,选择单产高的营养缺陷型突变菌株、调节突变菌株或野生菌株。

(5) 选育抗噬菌体能力强的菌株,使其不易感染噬菌体。

(6) 菌种性能稳定,不易变异退化,以保证发酵生产和产品质量的稳定性。

(7) 菌种不是病原菌,不产生任何有害的生物活性物质和毒素(包括抗生素、激素、毒素),以保证安全。

3.2.2 工业常用的微生物菌种

1. 细菌

细菌是自然界中分布最广、数量最多的一类微生物,属单细胞原核生物,具有典型的核分裂或二分分裂繁殖。一般体形微小,通常在1000倍的光学显微镜或电子显微镜下才能看到。

1) 形态和大小

细菌的基本形态有球状、杆状、螺旋状3种。

细菌的大小随种类的不同变化很大,有的小到用光学显微镜观察时,仅能达到可见的程度,有的大到几乎用肉眼就可以看见,多数细菌的大小在这两者之间。不论它们大小如何,除用显微镜外,都不能清楚地看到它们。

细菌细胞的质量为 $1 \times 10^{-10} \sim 1 \times 10^{-9}$ mg,即每克细菌含(1~10)万亿个细胞。细菌体积虽小,但其表面积很大,有利于细胞吸收营养物质和加强新陈代谢。

2) 细菌的细胞结构

细菌的一般结构为细胞壁、细胞膜、细胞质和核质体。由于细菌属原核生物,细胞内没有一个结构完善的核,所以只有一个核质体,它的主要成分是脱氧核糖核酸(DNA),功能是传递遗传特性。

细菌还有一些特殊结构:鞭毛、荚膜和芽孢等。

3) 细菌的繁殖方式

细菌以裂殖方式进行繁殖,即一个细胞分裂为二个子细胞。分裂时首先菌体伸长,核质体分裂,菌体中部的细胞膜以横切方向形成隔膜,使细胞质分为两部分,细胞向内生长,把横隔膜分为两层,形成子细胞的细胞壁,然后,子细胞分离形成两个菌体。

作为细菌的一个特殊结构,芽孢在其生活史和繁殖方式上有特殊性。某些细菌在其生活史的一定阶段,于营养细胞内形成一个内生孢子,称为芽孢。对于芽

孢形成的环境条件,还不十分清楚。以往认为,不良条件会促成细菌形成芽孢,然而实践证明,并无一定规律。芽孢含水量较营养细胞少,代谢活动极低,具有致密而不易渗透的芽孢壁,对化学药品、干燥和高温等具有高度的抵抗力。一般的湿热灭菌,规定在 121℃ 下灭菌 15min,以杀死在自然界中抗热性最强嗜热脂肪芽孢杆菌的芽孢为灭菌标准。细菌的芽孢在适宜的条件下开始吸收水分、盐类等营养物质,然后孢壁破裂,而萌发产生新菌体。

4) 发酵工业上常用的细菌

发酵工业生产中常用的细菌有枯草芽孢杆菌、乳酸杆菌、醋酸杆菌、大肠杆菌、棒状杆菌、丙酮-丁醇梭状芽孢杆菌和短杆菌等。

2. 放线菌

放线菌以菌落呈放射状而得名,该菌在自然界中分布很广,而土壤是这类微生物的主要习居场所,一般在中性或偏碱性的土壤和有机质丰富的土壤中较多。放线菌的最大的经济价值在于它们能产生各种抗生素。据不完全统计,到目前为止,由放线菌产生的抗菌素约 1 700 种,其中在临床和农业生产上有使用价值的约数十种,如链霉素、土霉素、金霉素、卡那霉素、争光霉素、春雷霉素、灭瘟素等。放线菌还可产生各种酶和维生素等。

1) 放线菌的形态和构造

放线菌的菌体由菌丝体构成。菌丝体有两型:一型为基内菌丝体或称营养菌丝体,长在培养基内和紧贴在培养基表面,并纠缠在一起而形成密集的菌落;另一型为气生菌丝体,即基内菌丝体发育到一定阶段后,向空间长出的菌丝体。气生菌丝体发育到一定阶段,在它上面形成孢子丝,然后形成孢子。

放线菌虽然有良好的菌丝体,但无横膈,为单细胞、菌丝和孢子内不具有完整的核,没有核膜、核仁、线粒体等。因此,放线菌属于原核微生物。

2) 放线菌的繁殖

放线菌以无性方式繁殖,菌丝断裂的片断即可繁殖成新的菌体。

3) 放线菌在微生物中的分类地位

放线菌与细菌有很多相似的地方:都属原核生物,细胞壁的构成基本相同,均易受噬菌体感染,对抗菌素的敏感性相同等。放线菌与细菌的区别主要在于放线菌是有真正分支的菌丝体,而细菌则没有菌丝体。放线菌是介于细菌和丝状真菌之间的一类微生物,但在微生物分类位置上应在细菌之中,而不属于真菌。

4) 发酵工业中常用的放线菌

发酵工业中常用的放线菌主要用于生产抗生素。如龟裂链霉菌产土霉素;金霉素链霉菌产四环素;灰色链霉菌产链霉素;红霉素链霉菌产红霉素;小单胞菌属是产生抗生素种类较多的一个属,据不完全统计,产抗生素有 30 多种。

3. 酵母

酵母是一群单细胞微生物，属真菌类。为人类实践中应用较早的一类微生物。

早在4000多年以前的殷商时代，我国劳动人民就会酿酒。以后人们利用酵母烤制面包，进行酒精发酵，甘油发酵等。近年来，已应用于石油的发酵脱蜡，发酵生产有机酸等新型工业中。由于酵母细胞含有丰富的蛋白质、维生素和各种酶，所以又是医药、化工和食品工业的重要原料。酵母在发酵工业中的地位是很重要的。

在自然界中，酵母主要分布在含糖质较高的偏酸性环境中，例如果实、蔬菜、花蜜、五谷以及果园的土壤中。酵母的生长温度范围在4~30℃，最适温度为25~30℃。

1) 酵母的形态大小

酵母是单细胞的，通常以出芽方式进行无性繁殖。酵母的形态多样，依种类不同而有差异。普通有球形、椭圆形、卵圆形、柠檬形、腊肠形以及菌丝状等。这些形态因培养时间、营养状况以及其他条件而有变化。

酵母细胞的大小，根据不同的种类差别很大，一般在(1~5) μm × (5~30) μm 。发酵工业上通常培养的酵母细胞平均直径为4~6 μm 。

2) 酵母的细胞结构

酵母具有典型的细胞结构，有细胞壁、细胞膜、细胞质、细胞核、液泡、线粒体以及各种贮藏物。

酵母为真核生物，细胞中有明显的细胞核，核有核膜、核仁和染色体。

3) 酵母的繁殖方式

酵母的繁殖方式分为无性繁殖和有性繁殖，以无性繁殖为主。

无性繁殖分为芽殖和裂殖两种方式。

有性繁殖产生子囊和子囊孢子。其过程是两个邻近的细胞，各伸出一根管状原生质突起，然后通过接触并融合而成一个通道，两个核在此通过内结合，形成二倍体细胞，并随即进行减数分裂，形成四个子核或八个子核，每一个子核和其附近的原生质形成子囊孢子。形成子囊孢子的细胞称为子囊。石膏块为常用的生成子囊孢子的培养基。在生产上，可利用子囊孢子进行杂交育种，人工定向培育所需特性的菌种，以提高产品的产量、质量或使其适应新的工艺要求。

4) 工业上常用的酵母

(1) 啤酒酵母 啤酒酵母除了可酿造啤酒、酒精及其他饮料酒外，还可发酵制面包。

(2) 卡尔斯伯酵母 该酵母是啤酒酿造业中典型的下面酵母，也可用作食用、药用和饲料酵母等。

(3) 啤酒酵母椭圆变种 此菌是由葡萄果皮中分离而来,一般适用于葡萄酒的酿造。

(4) 德巴利氏酵母属 此属酵母中有的种,如克氏德巴利氏酵母产柠檬酸量较高,并能利用煤油作为碳源;有的种能氧化正癸烷、十六烷及石油。

(5) 汉逊氏酵母属 此属酵母能多产乙酸乙酯,并可自葡萄糖产生磷酸甘露聚糖,应用于纺织及食品工业。此属酵母大部分的种属能利用酒精为碳源,因此是酒精发酵工业的有害菌。

(6) 毕赤氏酵母属 该菌属中有的种能产生麦角固醇、苹果酸、磷酸、甘露聚糖。毕赤氏酵母也是饮料酒类的污染菌。

(7) 假丝酵母属 该菌属中有很多种有酒精发酵能力,有的种能利用农副产品或碳氢化合物生产蛋白质,以供食用或饲料用等。

(8) 红酵母属 该菌属的菌种均不发酵,无酒精发酵能力,但有较好产脂肪的菌种,可由菌体提取大量脂肪。

4. 霉菌

霉菌亦称丝状真菌,是真菌的一部分。凡生长在营养基质上形成绒毛状、蜘蛛网状或絮状菌丝体的真菌,统称为霉菌。霉菌在自然界中分布极为广泛,存在于土壤、空气、水和生物体内等处,与人们日常生活关系密切。霉菌除应用于传统的酿酒、制酱和制作其他发酵食品外,在发酵工业、农业、纺织、食品和皮革方面也起极重要的作用。如生产酒精、柠檬酸、青霉素、灰黄霉素、淀粉酶、蛋白酶、果胶酶、纤维素和甾体激素转化、发酵饲料、赤霉素等。但霉菌也有不利的一面,如能引起各种工业原料、产品、仪器设备以及粮食、水果、蔬菜等农副产品发霉变质,引起人和动植物的病害。

1) 霉菌的形态和构造

霉菌的营养体由菌丝构成,菌丝可以无止境的伸长和产生分枝,分枝的菌丝相互交织在一起,形成菌丝体。

霉菌的菌丝有两类:一类菌丝中无横膈,整个菌丝体就是一个单细胞,含有多个细胞核。另一类菌丝有横膈每一段就是一个细胞,整个菌丝体由多个细胞构成。

菌丝细胞由细胞壁、细胞核、细胞膜、细胞质和其他内含物组成。菌丝的一般的宽度为 $3\sim 10\mu\text{m}$ 。

2) 霉菌的繁殖和生活史

霉菌主要依靠各种孢子进行繁殖。形成孢子的方式分为有性和无性两种。

无性孢子是霉菌进行繁殖的重要方式,其特点是分散、量大。工业生产中多用无性孢子进行繁殖,扩大培养;霉菌的有性孢子是经过不同的细胞配合而产

生的。

霉菌的生活史包括有性阶段和无性阶段：菌丝体（营养体）在适宜条件下产生无性孢子，无性孢子萌发形成新的菌丝体，如此多次反复，这是无性阶段。霉菌生长发育的后期，进入有性阶段，即从菌丝体上形成配子囊，经过质配、核配而形成双位体的细胞核，最后经过减数分裂，形成单倍体的孢子，孢子萌发形成新的菌丝体。

3) 工业上常用的霉菌

工业上常用的霉菌，有藻状菌纲的根霉、毛霉、犁头霉；子囊菌纲的红曲霉；半知菌类的曲霉、青霉等。

霉菌的用途很广。酿酒工业上多用根霉等来作淀粉质原料酿酒的糖化菌。有些霉菌能产生有机酸、芳香物质、蛋白酶、抗生素、色素等。

5. 噬菌体

在发酵生产中，噬菌体的危害是一个值得足够重视的、具有普遍性的问题。凡用细菌和放线菌为生产菌的发酵生产（如丙酮丁醇、谷氨酸、微生物农药和发酵饲料等）均存在着噬菌体危害的问题。

噬菌体是病毒的一种，其特点是：

(1) 形体微小，体积比细菌小得多，必须在电子显微镜下才能够看见。

(2) 没有细胞结构，为非细胞类型，是一种独特的分子生物，主要由核酸和蛋白质构成。

(3) 对寄主细胞有严格的专一性，缺乏独立代谢的酶体系，不能脱离寄主而自行生长繁殖，必须寄生在其他活体细胞中生长。而且对寄主细胞有着严格的专一性，只能在特异性寄主细胞中增殖。

噬菌体在自然界中分布极广，凡是有寄主细胞存在的地方，一般都能找到相应的噬菌体。在发生严重危害期间，甚至从空气中也能分离出噬菌体。

6. 形态、结构和化学成分

大多数噬菌体有头、尾之分，也有尾部欠缺不全和成线形的噬菌体。

噬菌体的化学成分，绝大多数是核酸和蛋白质，占粒子质量 90% 以上，其中核酸占 40%~50%。

7. 生长和繁殖

噬菌体在寄主细胞中的生长繁殖过程可分为：

(1) 吸附 当噬菌体和敏感细菌混合时，噬菌体的尾部吸附侵入。

(2) 侵入 尾端插入寄主细胞，将头部的脱氧核糖核酸射入细胞内，而蛋白

质外壳留在细胞外部。

(3) 增殖 噬菌体的脱氧核糖核酸进入寄主细胞后,借助于寄主细胞的代谢机构,由本身的核酸物质操纵,以寄主细胞内的营养物质为原料,大量复制子代噬菌体的脱氧核糖核酸和蛋白质。

(4) 成熟 此阶段是将脱氧核糖核酸和蛋白质在寄主细胞内聚合成完整的子代噬菌体。该阶段也称潜伏期。

(5) 释放 寄主细胞裂解,从而释放出大量子代噬菌体。

8. 噬菌体的防治

噬菌体的防治措施一般有:

(1) 杜绝噬菌体赖以生存增殖的环境条件。如严格控制活菌体的排放,对倒罐的废液应灭菌处理后再排放。定期使用漂白粉、石灰等处理地面和墙壁等。

(2) 选育和使用抗噬菌体菌株。

(3) 菌种轮换使用。根据生产的需要,可选择几株亲原不同的生产菌株按期轮换使用。该法的依据为噬菌体对寄主细胞具有严格的专一性。

3.2.3 培养基的制备

培养基是提供微生物生长繁殖和生物合成各种代谢产物所需要的,按一定比例配制的多种营养物质的混合物。它的组成对于微生物生长繁殖、酶的活性及产量都有直接的影响。

1. 培养基的营养成分及来源

微生物为了生长、繁殖需要从外界不断地吸收营养物质,加以利用,从中获得能量并合成新的细胞物质,同时排出废物。我们研究微生物的营养,主要是了解营养特性和培养条件,以便进一步控制和利用它们,更好地为工业生产服务。微生物的营养活动,是依靠向外界分泌大量的酶,将周围环境中大分子的蛋白质、糖类、脂肪等营养物质分解成小分子化合物,再借助细胞膜的渗透作用吸收这些小分子营养来实现的。因此微生物所需要的基本营养物质主要是碳源、氮源、水、无机盐、生长因素和能源。它们在微生物生命活动中的主要功能是:

(1) 供给微生物合成细胞生物和代谢产物的物质基础。

(2) 供给微生物生命活动和合成反应的能量。

(3) 调节微生物的新陈代谢。

碳源主要用来供给微生物生命活动所需的能量和构成菌体细胞以及代谢产物的物质基础。常用做碳源的物质主要是糖类、脂肪及某些有机酸。氮源是构成微生物细胞中蛋白质和核酸的主要元素。通常所用的氮源可分为有机氮源和无机氮

源两类。水在微生物细胞中的含量高达 80% 左右，是重要的组成成分。菌种所需的营养物质必须溶解于水中，才能通过细胞膜被吸收或排出；细胞中的各种生物化学反应要在水中进行；同时水也参入各种生物化学反应；水的存在有利于生物大分子结构的稳定。微生物体内的水以游离水和结合水两种形式存在。无机盐是微生物生命活动所不可缺少的物质。它的主要作用是：参入细胞结构物质的组成；作为酶活性中心的组成部分或维持酶的活性；调节渗透压、pH、氧化还原电位、控制原生质的胶态和细胞透性；还可以作为自养菌的能源物质。生长因子是提供微生物细胞所需要的化学物质（蛋白质、核酸和脂质）、辅助因子（辅酶和辅基）的组分和参与代谢的物质。一般来说，生长因子有维生素、氨基酸、嘌呤和嘧啶及其衍生物、脂肪酸和一些特殊的辅酶等。能源是指为微生物的生命活动提供最初能量来源的营养物或辐射能。不同的微生物的能量来源与它们的营养类型有关，可以是光能，可以是无机物氧化释放的化学能，也可以是有机物氧化所释放的化学能。微生物的营养来源如下所示：

- | | | | | | |
|-----------------------------|---|----------------------------|------------------|---|-----|
| (1) 能源 | { | 光 | 光能自养菌 | } | 自养菌 |
| | | 氢、硫、氨 | | | |
| | | 亚硝酸盐、亚铁盐 | 化能自养菌 | | |
| | | 碳水化合物等有机物 | | | |
| | | | 石油天然气和石油化工产品，如醋酸 | | 异养菌 |
| (2) 碳源 | { | 碳酸气 | | | |
| | | 淀粉水解糖、糖蜜、纤维素水解液 | | | |
| | | 石油、正构石蜡、天然气 | | | |
| | | 醋酸、甲醇、乙醇等石油化工产品 | | | |
| (3) 氮源 | { | 豆饼、玉米浆、蚕蛹粉、饼粉、鱼粉等有机氮 | | | |
| | | 尿素、硫酸铵、氨水、硝酸盐等无机氮 | | | |
| | | 胰酪胨蛋白、牛肉膏、蛋白胨和酵母膏等实验室用的含氮物 | | | |
| (4) 无机盐 | { | 磷酸盐、钾盐、镁盐、钙盐等其他矿盐 | | | |
| | | 铁、锰、钴等微量元素 | | | |
| | | 其他 | | | |
| (5) 生长因子：硫胺素、生物素、肌醇、对氨基苯甲酸。 | | | | | |

2. 培养基的类型

培养基的种类很多，可根据不同的依据来进行划分：

1) 根据培养基的营养来源划分

天然培养基：采用天然的动植物原料配制而成，其化学成分不明确。用于异养型微生物的常规培养。

合成培养基：用化学成分十分明确的物质配制而成。适合定量工作的研究。

综合培养基：在合成培养基中加入某些天然成分的物质配制而成，是实验室中常用的培养基。

2) 根据培养基原物质状态划分

(1) 液体培养基 在常温下呈液体状态的培养基。常用于摇瓶培养，观察微生物的生理生化 and 生长型式；也可以用于大规模生产，使微生物均匀弥散于液体中。

(2) 固体培养基 在液体中加入凝固剂或直接采用固体材料（如马铃薯等）与水 and 盐混合制成，还可以用能提供固体表面的滤膜制成。一般用于纯种分离、鉴定、计数、观察菌落形态、选种、育种、保藏菌种等方面。

3) 根据培养基用途划分

(1) 基础培养基 (MM)：可满足一般微生物的野生型菌株最低营养要求而制成的培养基。

(2) 鉴别培养基：在基础培养基中加入某种物质（如指示剂）后就可以分出不同微生物类型的培养基。

(3) 增殖培养基（加富培养基）：在基础培养基中加入额外的营养物质，可促进某一类菌生长而抑制其他菌生长的培养基。它主要用于培养某种或某类对营养要求苛刻的异养微生物。

(4) 选择培养基：在基础培养基中加入某种具有杀菌作用的物质（如染色剂、抗生素等）后就可使某类微生物生长而其他微生物不能生长，使用这类培养基可以把某种或某类微生物从混杂的微生物群体中分离出来。

(5) 活体培养基：是指用某些活的动植物体或离体的生活细胞来作为培养基，一般用于寄生菌的培养。

4) 根据生产目的来划分

(1) 种子培养基：是为了保证在生产中获得大量优质孢子和营养细胞的培养基。目的是为下步发酵提供数量较多、强壮而整齐的种子细胞。一般要求营养丰富，含氮量高。用于种子培养。

(2) 发酵培养基：是生产中供菌种生长繁殖并积累代谢产物的培养基，一般要求数量大，配料粗，价格低廉，有利于产物的分离提取并便于管理。用于发酵生产方面。

3. 发酵培养基的选择

选择和配制发酵培养基时应考虑以下基本原则：

(1) 必须提供合成微生物细胞和发酵产物的基本成分。

(2) 有利于减少培养基原料的单耗，即提高单位营养物质所合成产物的数量

或最大产率。

(3) 有利于提高培养基和产物的浓度, 以提高单位体积发酵罐的生产能力。

(4) 有利于提高产物的合成速度, 缩短发酵周期。

(5) 尽量减少副产物的形成, 便于产物的分离纯化。

(6) 原料价格低廉, 质量稳定, 取材容易。

(7) 所用原料尽可能减少对发酵过程中通气搅拌的影响, 通过提高氧的利用率, 降低成本能耗。

(8) 有利于产品的分离纯化, 并尽可能减少产生“三废”物质。

当然, 任何一种培养基都不可能面面俱到地满足上述各项要求, 应根据具体情况, 抓主要环节, 使其既能满足微生物的生长要求, 又能获得优质高产的产品。同时也符合增产节约, 因地制宜的原则。

4. 菌种的扩大培养

1) 种子扩大培养的目的

现代的发酵工业生产规模越来越大, 每个发酵罐的容积约几十立方米, 甚至几百立方米。要使小小的微生物在几十小时内, 完成如此巨大的发酵转化任务, 就必须具备数量巨大的微生物细胞。菌种扩大培养的目的就是在为其提供适宜的特定的微生物生长的物理和化学环境中, 大量繁殖, 为生产提供相当数量的代谢旺盛的种子。因为, 它与发酵时间的长短和接种量的大小有关, 接种量大, 发酵时间就短。所以将数量较多的成熟菌体加入发酵罐中, 有利于缩短发酵周期, 提高发酵罐利用率, 并且也有利于减少杂菌污染的机会。因此种子扩大培养的任务, 不但要得到纯而壮的培养物, 而且要获得活力旺盛的、接种数量足够的培养物。

2) 工业微生物菌种培养的类型

由于培养目的的不同, 微生物的特性不同, 在微生物培养中应采用不同的培养方法。

根据菌对氧气的需求不同, 有好氧培养和厌氧培养(静置培养法); 根据培养基质的不同; 有固体培养和液体培养; 根据培养是否连续, 有分批培养和连续培养。现将主要培养方法及特点简述如下:

(1) 种子扩大培养阶段

① 液体培养法: 包括液体试管、三角瓶摇床振荡或回旋培养。摇瓶通气量大小与摇瓶机型、转数、振幅(或偏心距)、三角瓶容量、装料量有关。

② 表面培养法: 包括茄子瓶、克氏瓶或瓷盘培养。

③ 固体培养法: 包括三角瓶、蘑菇瓶、克氏瓶、培养皿等麸皮培养。

(2) 大规模生产阶段 工业生产中, 由于培养基数量大, 微生物细胞数量要求多, 因此培养方法与种子阶段有所不同。生产上常用的培养方法有: 浅盘固体

培养、深层固体培养、浅盘液体培养、深层液体通气培养等方法。现将主要方法介绍如下：

① 固体培养：在生产实践中，好氧真菌的固体培养方法都是将接种后固体基质薄薄地摊铺在容器的表面，这样，既可使菌体获得充足的氧气，又可将生长过程中产生的热量及时释放，这就是传统的曲法培养的原理。

固体培养使用的基本培养基原料是小麦麸皮等。将麸皮和水混合，必要时添加一些辅助营养物和缓冲剂，灭菌后待冷却到合适温度后便可接种。进行固体培养的设备有较浅的曲盘、较深的大池、能旋转的转鼓和通风曲槽等。使用前要先用去垢剂洗涤，再用次氯酸钠、甲醛等消毒剂消毒，然后进行蒸汽灭菌。接种时用的种子可通过逐级扩大培养获得。

固体培养的设备简单，生产成本低，产量较高，但耗费劳动力较多，占地面积大，pH、溶解氧、温度等不易控制，易污染、生产规模难以扩大等特点。

② 液体培养：液体培养生产效率高，适于机械化自动化，因而是目前微生物发酵工业的主要生产方式。有静置培养和通气培养两种类型：静置培养适用于厌氧菌发酵，如酒精、丙酮-丁醇、乳酸等发酵；通气培养适用于好氧菌发酵，如抗生素、氨基酸、核苷酸等发酵。

a. 浅盘培养：容器中盛装浅层液体静止培养，没有通气搅拌设备，全靠液体表面与空气接触进行氧气交换，这是最原始的液体培养方式。劳动强度大，生产效率低，易污染。

b. 液体深层培养：液体深层培养是在发酵罐内进行的。发酵罐内装有搅拌器，空气从罐底部通入，送入的空气在罐内的搅拌器的搅拌下分散成微小气泡以促进氧的溶解，这种培养方法称为深层培养法。

现代发酵工业的主角是好氧培养，一般从实验室规模到工厂生产要经过放大，大型发酵罐的发酵一般也须分几级进行，使发酵的种子逐级扩大，以提高发酵罐的利用率并节约能源等。罐的级数一般根据菌体繁殖速度以及发酵罐的体积而确定，如谷氨酸发酵多采用二级培养，生长较慢的青霉素和链霉素生产菌种一般需要三级培养。液体深层培养是在青霉素等抗生素发酵中发展起来的技术，由于生产效率高，易于控制，产品质量稳定，因而在发酵工业中被广泛应用。但是，深层发酵耗费的动力较大，设备较为复杂，需要很大的投资。

3.3 发酵操作方法和工艺控制

3.3.1 发酵操作方法

当从实验室中通过一系列的操作得到了优良的菌株后，我们的任务并不就到

此为止,要为菌株设计、安排一个适合它们的理想生活环境。而最终目的是用最小的成本生产尽可能多的产品和为我们提供最大的劳务。为此必须考虑如下几个指标:

- (1) 底物转化为产品的比率,按比率就能够确定原料对产品成本的影响。
- (2) 产率,即发酵罐在单位时间内,单位体积内制造的成品和半成品的数量。
- (3) 发酵产物的浓度,据此就能够确定一个提取和精制费用。
- (4) 残留底物量,据此确定实际的转化率和防治杂菌的费用。

在考虑这些指标过程中,由于不断改进和挖掘微生物的新生产工艺,使发酵工业发展到现在这样高度完善的程度。目前比较成熟的工艺有:分批发酵、连续发酵和补料分批发酵三种类型。

1. 分批发酵

分批发酵又称间歇发酵法。即在一个密闭系统内一次性加入营养物和菌种进行培养,直到结束放出,中间除了空气进入和尾气排出,与外部没有物料交换。传统的生物产品发酵多用此过程。它除了控制温度和 pH 及通气以外,不进行任何其他控制,操作简单。培养过程中培养基成分减少,微生物得到生长繁殖,这是一种非恒态的培养法。分批发酵的具体操作如图 3-1 所示。

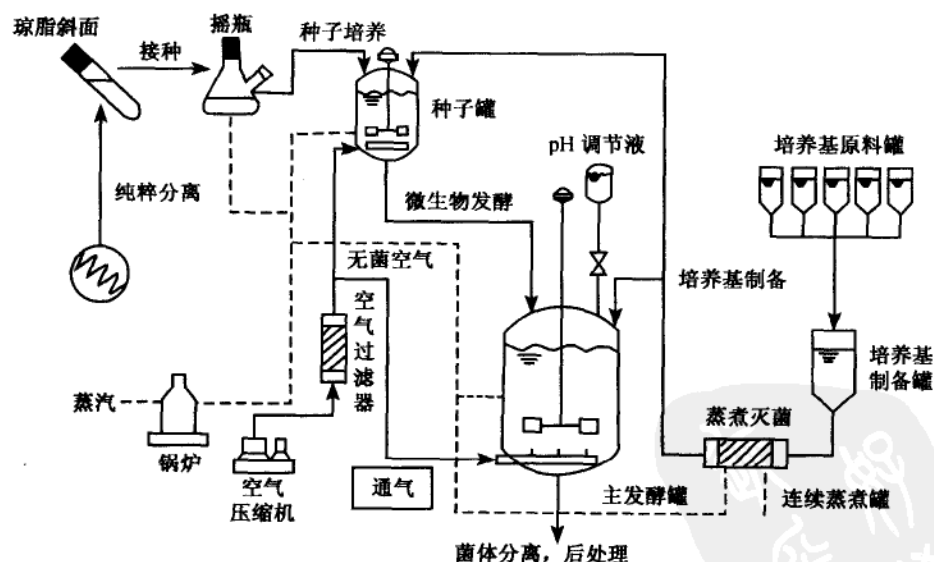


图 3-1 微生物发酵工艺流程图

首先将空罐杀菌,进行空消操作,之后投入培养基再通蒸汽进行实消灭菌,然后接种进行培养。在培养过程中,必须连续监测和控制温度、pH、溶解氧,

定期从发酵罐内取出样品进行测定,以便掌握营养成分的消耗,菌体的数量和产物的积累,了解培养物的纯度,以确定发酵的终止时间。

在分批培养条件下,随着细胞浓度和代谢物浓度的不断变化,微生物的生长过程可分为四个不同的阶段,即迟滞期、对数期、稳定期和衰亡期。图 3-2 以细胞数目的对数值或生长速度为纵坐标,培养时间为横坐标所得的生长曲线。从曲线中我们可以观察到生长繁殖过程的 4 个阶段。

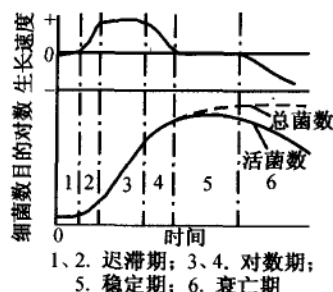


图 3-2 单细胞微生物的生长曲线

(1) 迟滞期 当细胞由一个培养基转到另一个培养基时,由于环境变化,细胞中的各种酶系要有一个适应过程,菌体并不立即繁殖,此时菌种细胞代谢机能活跃,体积不断增大,但对外界环境较为敏感,细胞数目几乎不增加,甚至还稍有减少。这是细胞表现出来的一个适应期。这个时间的长短与接种物的生理状态及浓度有关,如果接种物处于对数期很可能不存在迟滞期或迟滞期很短,就开始生长;接种物的浓度大,也有利于缩短适应期。

(2) 对数期 细胞经过迟滞期后适应了新的环境,生理状态较为活跃,细胞开始迅速繁殖,单位时间内细胞的数目或质量的增加维持恒定,呈几何级数增加。此阶段营养物比较充足,有害代谢物很少,有利于细胞的生长。

(3) 稳定期(平衡期) 细胞经过大量繁殖后,必需营养物质逐渐耗尽,某些有害代谢产物出现积累,一些其他条件如 pH、氧化还原电势的改变都使菌体生长受到限制,死亡率和繁殖率达到平衡,活菌数保持相对稳定,进入稳定期。处于稳定期的菌体形态大小典型,生理生化反应相对稳定,细胞开始积累贮存物质。如抗生素和某些酶也在对数期与稳定期转换阶段产生。

(4) 衰亡期 细胞经过大量增殖再经平衡期后,由于培养基中营养物质耗尽,代谢产物大量积累,这时能够增殖的细胞越来越少甚至降到零,而死亡率逐渐增加,这一阶段称为衰亡期。大多数的分批发酵在达到死亡期前就结束了。

目前分批发酵多用在酒精、氨基酸、抗生素生产中。此方法不易染菌,但很难采用控制基质浓度等方法来增加发酵生产能力。

2. 连续发酵法

在分批发酵中,随着微生物的活跃生长,营养物不断消耗,有害的代谢产物不断积累,对数生长期不可能长期维持。从理论上讲,若将营养物浓度和培养条件维持在对数生长期不变,则对数生长可以无限延长。连续发酵就是根据这种设想以保证细胞高速增长或产物高速形成。

所谓连续发酵,是指在向发酵罐中连续供给新鲜培养基的同时,将含有微生物和产物的培养液以相同的速度连续放出。从而使发酵罐内的液量维持恒定,微生物在稳定状态下生长。稳定状态可以有效地延长分批培养中的对数期。在恒定的状态下,微生物所处的环境条件如营养浓度、产物浓度、pH、微生物细胞的浓度以及生长速率等可以始终维持不变,甚至可以根据需要来调节生长速度。

连续发酵的最大特点是:微生物细胞的生长速度、代谢活性处于恒定状态,达到稳定高速培养微生物或产生大量代谢产物的目的。连续发酵目前用于废水处理、葡萄糖酸发酵、酒精发酵等工业中。与分批发酵相比,表现出如下特点:

优点:(1) 提高设备利用率 连续发酵减少了洗刷、杀菌等非生产性时间。

(2) 提高了原料利用率 连续发酵对杂菌污染的控制严格,避免了原料的损耗。

(3) 便于实现自动控制。

缺点:(1) 由于是开放系统,容易杂菌污染。

(2) 对设备、仪器要求高。

3. 补料分批发酵法

补料分批发酵又称半连续发酵,是分批发酵和连续发酵之间的一种过渡培养方法。补料分批发酵是指在分批培养过程中,间歇地或连续地补加新鲜培养基,但所需产物不到一定时刻不放出的培养方法。此方法通过向培养系统中补充物料,可以使培养液中的营养物浓度较长时间保持在一定范围内,既保证微生物的生长需要,又不造成不利影响,从而达到提高产率的目的。它兼有分批和连续发酵两者的优点,而且克服了两者的缺点。同分批发酵相比,它具有可以解除底物的抑制,产物反馈抑制和葡萄糖分解阻遏的优点。与连续发酵相比较,它具有不需要严格的无菌条件,不会产生菌种老化和变异问题以及适用范围广的特点。

补料分批发酵的类型很多。根据流加方式不同,可分为两种类型:单一补料和反复补料分批发酵。单一补料指在开始时投入一定量的基础培养基,到发酵过程的适当时期,开始连续补加碳源、氮源和其他所需基质,一直加到达到发酵罐操作容积为止;最后将培养液一次全部放出。此方法的缺点:受到发酵罐体积的限制,发酵周期只能控制在较短的范围内。反复补料分批发酵是在单一补料分批发酵的基础上发展起来的,其过程是在发酵过程中每隔一定时间按一定比例放出一部分发酵液,使发酵液体积始终不超过发酵罐的最大操作体积。从而在理论上可以延长发酵周期,直至发酵产率明显下降,才最终将发酵液全部放出。

目前,运用补料分批发酵技术进行生产和研究的范围十分广泛,它用于面包酵母、氨基酸、抗生素、单细胞蛋白质等发酵工业。

3.3.2 影响发酵的主要因素

发酵过程是一个复杂的生化过程，它受到诸多的因素影响，为了获得良好的发酵产物，必须对其影响因素进行分析，制定出合理的工艺条件。影响发酵过程的参数可分为两类，一类为直接参数如温度、压力、搅拌功率、转速、泡沫度、发酵液黏度、浊度、pH、离子浓度、溶解氧浓度、基质浓度等，它们是可以采用特定的传感器检测出来的参数；另一类为间接参数，它们至今尚难于用传感器来检测，如细胞生长速率、产物合成速率等。这些参数中对发酵过程影响较大的是温度、pH、溶解氧浓度等。

1. 温度

发酵成绩的好坏与合理的控制发酵温度有着极大的关系。因为温度对微生物的影响是多方面的，不仅表现为菌体表面的作用，而且因热平衡关系，热传递至菌体内，对菌体内部所有的结构物质都有作用。通常在生物学范围内每升高 10°C ，生长速度加快1倍。所以温度直接影响酶的反应，因而影响着生物体的生命活动，改变菌体代谢产物的合成方向，影响微生物的代谢调控机制。除这些直接影响外，温度还对发酵液的理化性质产生影响，如发酵液的黏度、基质和氧在发酵液中的溶解度和传递速率，某些基质的分解和吸收速率等，进而影响发酵的动力学特性和产物的生物合成。

合理的发酵温度是根据微生物的特性、培养基成分、培养阶段及培养条件等因素而决定的，而不是在各种情况下都一成不变的。发酵温度的确定应根据发酵的不同阶段，确定其最适温度。在发酵的前期应选择菌体的生长温度，这样有利于菌体的繁殖，在产物分泌阶段，应选择最适生产温度，有利于代谢产物的积累。生产实际过程中，一般不需要加热，因为发酵中释放了大量的发酵热，通常是要进行冷却操作，在发酵罐内一般装有夹套排管或蛇管等冷却设备，通过冷却水进行热交换来调节温度，达到控制温度的目的。

2. pH

pH对微生物的生命活动有显著影响。它会影响菌体细胞膜的带电性、膜的稳定性及膜对物质的吸收能力，使菌体表面蛋白变性或水解，破坏酶的活性，从而影响细胞的代谢作用。如酵母菌在pH4.5~5.0时，产物为乙醇，而在pH7.6时产物为甘油；黑曲霉在pH2~3时，产物为柠檬酸，而在pH近中性时产物为草酸。

各种微生物都有其可以生长和适宜生长的pH范围（表3-1）。因此，在生产中应注意调节合适的pH。

表 3-1 各类微生物生长的最适 pH 及范围

微生物种类	最低 pH	最适 pH	最高 pH
细菌和放线菌	5.0	7.0~8.0	10.0
酵母菌	2.5	3.8~6.0	8.0
霉菌	1.5	3.0~6.0	10.0

微生物在生命活动中由于新陈代谢作用, 会改变环境中的 pH, 进而影响自身的生长繁殖及代谢产物的积累。因而, 在发酵工业中, 控制发酵的 pH 是控制生产的指标之一, 常用配制基质时加缓冲性物质, 生产过程中适时加入无机酸、碱或生理活性物质的方法。如谷氨酸发酵中, 进入产酸阶段 pH 就会降低, 每当 pH 降到 6.0~7.0 时就流加尿素, 尿素分解放出氨, 使 pH 升高, 氨被利用后 pH 又下降, 如此反复, 既调节了发酵液中的 pH, 又供给了必要的氮源。

3. 通风和搅拌

好氧和兼性需氧微生物, 在发酵过程中必须提供大量的氧以满足菌体生长繁殖和产酶的需要。发酵液中溶氧在生产中具有举足轻重的作用。在 101.3kPa, 25℃ 的温度下, 空气中的氧在培养液中的饱和浓度约为 0.2ml/L, 如果外界不能及时供氧, 这些溶氧浓度只能维持菌体 15~20s 的正常呼吸, 因而发酵液中的溶氧浓度是发酵过程中一个需要调节控制的重要参数。所以溶氧及其控制对发酵生产是非常重要的。

各种微生物在发酵过程中, 都有其可以生长和最适生长的氧浓度。可以生长氧浓度称为临界氧浓度, 指不影响菌体呼吸所允许的最低浓度。最适氧浓度指溶解氧浓度对生长或合成最适的浓度范围。在生产中只有供氧大于临界氧并维持在最适氧水平上, 才能确保发酵的正常进行。保证供氧方面, 主要通过通风和搅拌来进行控制, 通风可以供给大量的氧, 而搅拌则能使通气的效果更好, 从而达到菌体对氧浓度的要求。

发酵液的需氧量受菌体浓度、基质的种类和浓度以及培养条件等因素的影响, 其中以菌种浓度的影响最大。发酵液的需氧率随菌体浓度增大而增大, 但氧的传递率随菌浓的对数关系而减少。因此可以通过控制菌体的生长速率比临界值略高点, 达到最适菌体浓度, 这样既能保证产物的比生产速率维持最大值, 又不会使需氧大于供氧。此外可以通过控制基质的浓度、调节温度 (降低培养温度可提高溶氧浓度)、中间补水、添加表面活性剂等工艺措施来改善溶氧水平。

4. 染菌的控制

染菌是生产的大敌, 一旦发现染菌, 应该及时进行处理, 以免造成更大的损失。染菌的原因归纳起来主要有:

- (1) 设备、管道、阀门漏损。

- (2) 设备及管道灭菌不彻底存在死角。
- (3) 菌种不纯或培养基灭菌不彻底。
- (4) 空气净化不彻底。
- (5) 无菌操作不严格或生产操作出错。

在生产中,如果发现染菌必须及时找出染菌的原因,采取相应措施,杜绝染菌事故发生。

3.3.3 发酵设备

进行微生物深层培养的设备称为发酵罐。它是微生物在液体发酵过程中进行生长繁殖和形成产品时必需的外部环境装置,这些装置跟传统的工业发酵装置相比,主要区别在于具备了严格的灭菌和良好的通气环境。随着发酵产物的种类、使用菌种的类型、采用原料的来源及工艺操作的方式等方面不断扩大和改进,相继设计出了各类型的发酵罐。

根据微生物的特性发酵罐分为好氧发酵罐和厌氧发酵罐两类。对于好氧发酵罐根据其通气的方式又有机机械搅拌式发酵罐和通气搅拌式发酵罐。

1. 厌氧发酵罐

厌氧发酵罐用于厌氧菌的培养,其形式有:半密闭式、密闭式。设备和工艺比较简单,主要特色是排除发酵罐中的氧。设备结构:罐身呈圆柱形,罐身直径与高之比为1:1.1,盖及底为圆锥形或碟形;罐内装冷却蛇管,蛇管可分为上下两组安装,并加以固定。也有采用在罐顶用淋水管或淋水围板使水沿罐壁流下,以达到冷却发酵液的目的。对于体积较大的发酵罐,这两种形式可同时采用。发酵罐底部设置吹泡器,以便进行搅拌醪液,使发酵均匀,罐顶设有 CO_2 排出管和加热蒸汽管,醪液输入管。管路设置尽量简化,做到一管多用,减少管道死角,防止杂菌污染。大的发酵罐的顶端及侧面还应设有人孔,以便于清洗。此设备主要用于酒精、乳酸和啤酒等厌氧发酵工艺生产中(图3-3)。

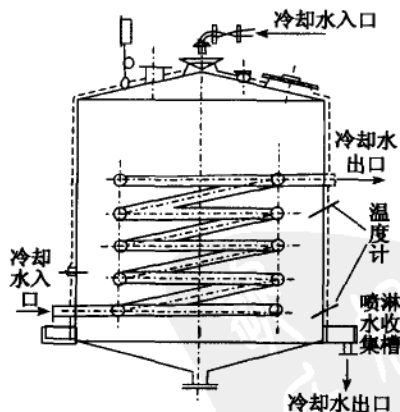


图 3-3 酒精发酵罐

2. 好氧发酵罐

好氧发酵罐有多种类型,根据通风的方式有机机械搅拌式发酵罐(又称通用式

发酵罐)和通风搅拌式发酵罐。

(1) 通用式好氧发酵罐 通用式好氧发酵罐是指既具有机械搅拌又有压缩空气分布装置的发酵罐。现在大部分通风发酵采用通用式好氧发酵罐,该设备的主要特点是:溶氧速率高,气液混合效果好,结构严密,有利于防止杂菌污染。但其结构较复杂,动力消耗大。通用式好氧发酵罐的结构如图 3-4。

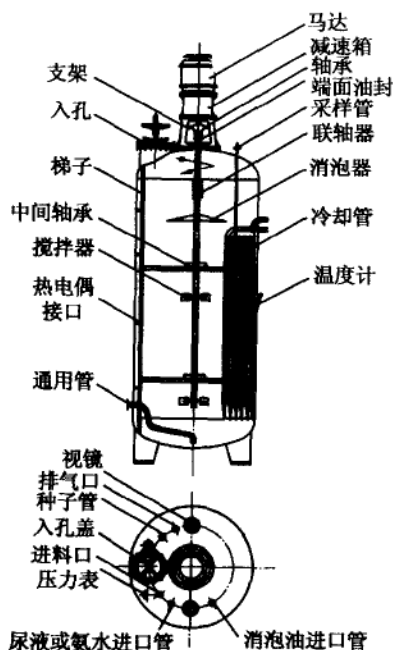


图 3-4 通用式发酵罐的结构

通用式发酵罐的罐体为带有碟形或椭圆形封头、封底的圆柱形容容器,一般用碳钢或不锈钢焊接而成。罐体的几何尺寸与溶氧系数有很密切的关系,如 H/D (罐高/罐径) 由 1 增至 2 时,溶氧系数可增加 40% 左右, H/D 由 2 增加至 3 倍时,溶氧系数又增加 20%,即 H/D 越小,氧的利用率越差;若过大也不行,反而起到不好的作用。因此 H/D 一般为 1.5~4 倍为宜。为了便于清洗和检修,发酵罐设有手孔或人孔,甚至爬梯,罐顶还装有窥镜和灯孔,以便观察罐内的情况。

发酵罐的通风搅拌装置为通风管,一般采用单孔管或环形多孔管。单孔管的管口正对罐底中心位置,其距离在 200mm 左右,环形多孔管的圈径为搅拌器的 0.8 倍,孔径为 5~8mm,搅拌用涡轮式搅拌器,常用弯叶涡轮和箭叶涡轮两种,对于大型发酵罐,可在同一搅拌轴上配置多个搅拌器。通用式发酵罐的密封装置是采用端面轴封,其作用是使罐外空气不会进入罐内造成染菌。这是通用罐的另一特点。其密封的严密性较之普通填料涵式优越,密封性好,但结构稍微复杂。发酵罐的传热装置有夹套和蛇管两种,采用何种视罐容大小而定,一般罐容小的采用夹套冷却,罐容在 5m^3 以上应采用罐内蛇管冷却。罐内立式蛇管也可起到挡板的折流作用,延长气液接触时间,强化液体垂直流向。此外为控制发酵操作条件,在罐体上还装有压力计、温度计、风量计或其他自动检测、自动控制仪器等。

(2) 通风搅拌式发酵罐

针对通用式好氧发酵罐结构复杂、能耗大的缺点,产生了通风搅拌式发酵罐。此设备通风的目的,不仅是供给微生物所需要的氧,同时还利用通入发酵罐的空气代替搅拌器使发酵液均匀混合,常用的有循环式通风发酵罐和高位塔式发酵罐。

① 循环式通风发酵罐 它无需凭借机械搅拌就能达到很好溶解氧的目的,

它在罐外装设上升管,上升管两端通过与罐底及罐上部相连接构成一个循环系统。培养液进入培养罐,当罐内液体接近循环管进口时,由于上升管底部的单孔或空气喷嘴通入高速的无菌空气,空气被分割细碎,使气液充分混合,使上升管内培养液乳化,以利氧溶解于培养液中,乳化的醪液相对密度较罐内培养液小,另外喷嘴的高速气流产生负压现象,这对罐内醪液产生抽吸作用,于是培养液便产生强烈的对流动力,在罐内与上升管形成反复的循环,引起了和机械搅拌相同的作用。循环式通风发酵罐也有将空气上升管安装在培养罐内的,称为内循环式发酵罐,循环管有采用单根的也有多根的。

② 高位塔式发酵罐 是一种类似于塔式的反应器,其径高比为1:7左右,罐内装有若干块筛板,压缩空气由罐底导入,经过筛板逐渐上升,气泡上升过程中带动发酵液同时上升,上升后的发酵液又通过筛板上带有液封作用的降液管下降而形成循环,从而达到搅拌的作用。

3.4 发酵产物的后处理

发酵产物的分离、提取和精制是指从发酵液或酶反应液中分离、纯化产品的过程,或称为下游技术。是生物技术转化为生产力时不可缺少的重要环节。

3.4.1 发酵产物的分离和纯化的目的及其基本要求

生物反应过程是一个复杂的生化变化过程,得到的最终代谢产物的浓度较低,发酵液中其他杂质含量较多,对于低浓度的发酵产品不能作为其他工业生产的原料或直接为人们所利用,其工业价值较低。因此必须把发酵液中低浓度的生物产品加以浓缩和分离,使其具有较高的工业价值。

发酵产品分离纯化的基本要求:

- (1) 采用的分离纯化方法必须有利于生物产品的分离,操作简单,费用低。
- (2) 要求能够达到所要求的纯度,提取率高,废液中发酵产品的含量低。
- (3) 提取方法不影响产品的质量。
- (4) 在提取过程中所采用的试剂对设备的腐蚀性小。
- (5) 生产中所产生的废物能够处理,对环境污染小。

3.4.2 发酵液下游处理的流程和方法

由于发酵产物存在形式不同,用途各异,对产品的质量(纯度)要求不一,因而分离与纯化的步骤和方法可以有不同的组合。但大多数产品的后处理过程可以分为4个阶段,即发酵液的预处理和固液分离;提取(初步纯化);精制(高度纯化);成品加工,如图3-5。

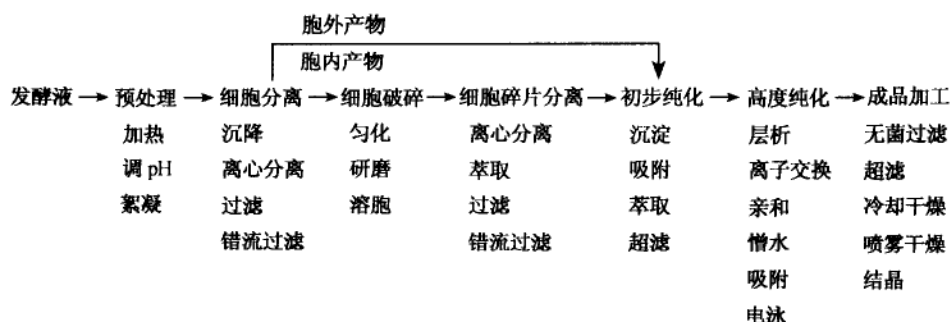


图 3-5 发酵产品分离过程的工艺流程

1) 发酵液的预处理与固液分离

从发酵中提取生物产品的第一步就是预处理和固-液分离，其目的不仅在于分离细胞、菌体和其他悬浮颗粒，还希望除去部分可溶性杂质和改变滤液的性质，以利于后继各步操作。对于胞外产物，应尽可能使生物产品转移到液相中，常用调节 pH 至酸性或碱性的方法达到。对于胞内产物，则应首先收集菌体或细胞，经细胞破碎后，生物产品被释放到液相中，再将细胞碎片分离，通常以含生物产品的液体为出发点，进行后继提取和精制的各步操作。

预处理采用的方法主要有：调 pH、加热、过滤、离心分离等。为了加速两相分离，可采用不凝聚和絮凝等技术，为了减少过滤介质的阻力，可采用错流膜过滤技术。细胞破碎采用机械、生物和化学等方法，如研磨、溶胞、匀化等技术。

2) 纯化方法

经固液分离或细胞破碎后，生物产品存在于液相中，此时液体体积很大，因此必须采用一系列的方法使产品的浓度增加，并排除其他物质的含量，以达到产品的质量要求标准。此过程包括提取和精制两个部分。

(1) 提取 这一步没有特定的方法，主要除去与目标产物性质有很大差异的物质。一般是发生显著的浓缩和产物质量的增加。常用的方法有：吸附法、离心分离、萃取、沉淀、超滤法等。

(2) 精制 经提取过程初步纯化后，滤液体积大大缩小，但纯度提高不多，需要进一步精制。此过程用于除去有类似化学功能和物理性质的不纯物。初步纯化中的某些操作，如沉淀、超滤等也可应用于精制中。典型的方法有层析、电泳等。这类过程技术对产物有高度的选择性。

3) 成品加工

经提取和精制后，一般根据产品应用要求，最后还需要浓缩、无菌过滤和干燥、加稳定剂等加工步骤。采用何种方法由产物的最终用途决定，结晶和干燥是大多数产品常用的方法。随着下游技术的发展，膜技术将会越来越多的被应用在

下游加工的各个阶段中,如浓缩可采用升膜或降膜式的薄膜蒸发,对热敏性物质可用离心薄膜蒸发,对于大分子溶液的浓缩可用超滤膜,而小分子溶液的浓缩可用反渗透膜等。干燥也有很多方式,使用时应根据物料的性质、物料状况及当地具体条件而定。常用的干燥方法有:真空干燥、红外线干燥、沸腾干燥、气流干燥、喷雾干燥和冷冻干燥等方法。

以上各阶段都有若干单元操作可以选用,应根据具体情况而定。

3.5 发酵工程的应用

3.5.1 氨基酸的生产工艺

氨基酸是构成蛋白质的基本单位,是人体及动物的重要营养物质,它广泛应用于食品、饲料、医药、化学、农业等领域。目前用发酵法生产的氨基酸种类有22种,其中18种系采用直接发酵法,4种为酶转化法。谷氨酸是目前氨基酸生产中产量最大、最典型、最成熟的一种。现以谷氨酸的发酵为例介绍氨基酸的发酵生产。

1. 谷氨酸——味精的生产工艺流程

谷氨酸是味精生产的前体物质,味精是谷氨酸单钠盐,带有1分子的结晶水,学名叫 α -氨基戊二酸一钠,分子式为 $C_5H_6O_4NNa \cdot H_2O$ 。味精是谷氨酸生产菌以葡萄糖为碳源,经EMPH途径和TCA循环生成谷氨酸,再与碱中和而制成。其过程包括五个部分:①淀粉水解糖的抽取;②谷氨酸生产菌种子的扩大培养;③谷氨酸发酵;④谷氨酸的提取分离;⑤由谷氨酸制味精。工艺流程如图3-6所示。

2. 谷氨酸发酵工艺控制

1) 淀粉水解糖的制取

能够用来发酵生产谷氨酸的原料很多,淀粉质原料、含糖原料、石油副产物都可以经过微生物的发酵作用合成谷氨酸。但几乎所有的氨基酸生产菌都不能直接利用(或仅微弱利用)淀粉和糊精。因此,在发酵生产谷氨酸之前,必须将淀粉质原料水解为葡萄糖,才能供发酵使用。

淀粉水解为葡萄糖的过程称为淀粉糖化。制得的水解液叫淀粉糖。淀粉水解糖的制备方法有酸解法、酶酸法、酸酶法和双酶法4种。

(1) 酸水解法 又称酸糖化法。它是以酸(无机酸或有机酸)为催化剂,在高温、高压下将淀粉转化为葡萄糖的方法。该方法具有生产方便,水解时间短,

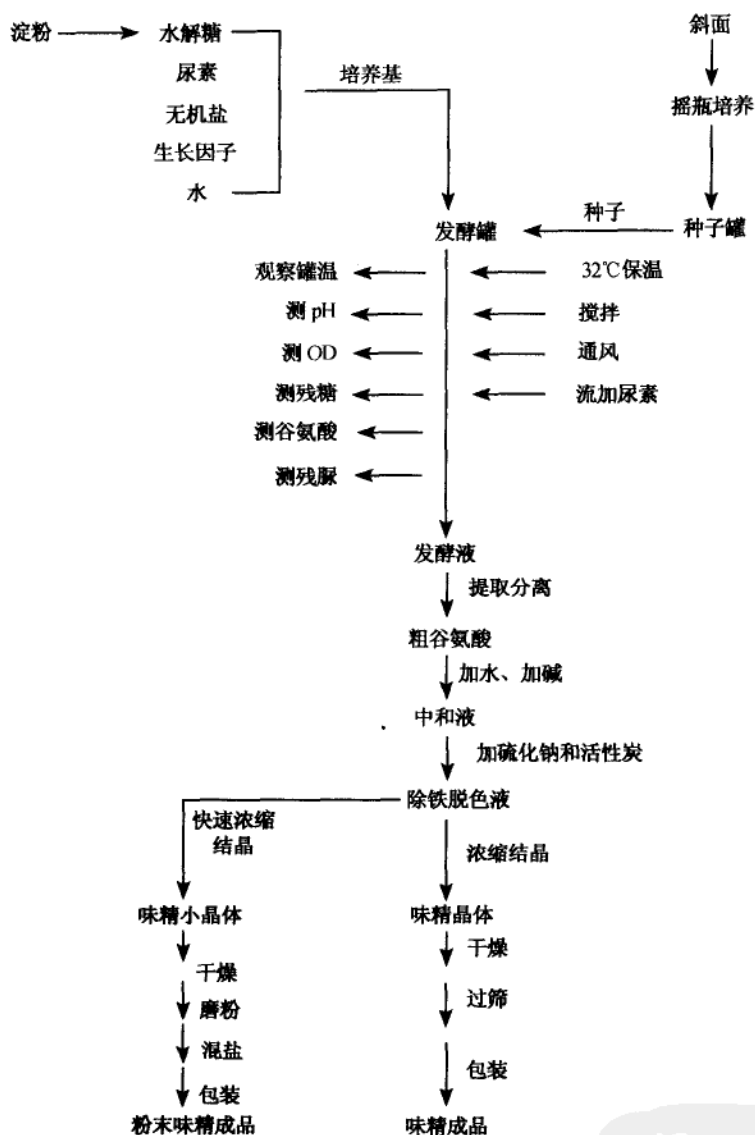


图 3-6 味精生产工艺流程

设备要求简单，生产效率高，设备生产能力大等优点。因此目前该法还有厂家采用。但由于水解作用是在高温、高压及一定酸浓度条件下进行的，因此要求有耐腐蚀、耐高温、高压的设备，而且水解过程生成的副产物多，影响糖液浓度，使淀粉转化率降低。还有，酸水解对淀粉质原料要求较高，淀粉颗粒不宜过大，大小要均匀。颗粒大，易造成水解不彻底。淀粉浓度也不宜过高，浓度高，淀粉转化率低。

(2) 酶水解法 酶水解法是利用专一性很强的淀粉酶及糖化酶将淀粉水解为葡萄糖的工艺。酶水解法制葡萄糖可分为两步：第一步是利用 α -淀粉酶将淀粉液化为糊精及低聚糖，使淀粉的可溶性增加，这个过程称为液化。第二步是利用糖化酶将糊精及低聚糖进一步水解，转变为葡萄糖，这个过程称为糖化。淀粉的液化和糖化是在酶作用下进行的，故称酶水解法又称双酶法。

酶水解法的优点：①由于淀粉水解是在酶作用下进行的，所以反应条件较温和，如BF7658细菌淀粉酶反应温度为85~90℃，pH6.0~7.0，糖化酶温度：50~60℃，pH3.5~5.0。因此，不要求设备耐高温、高压、耐酸碱；②酶的作用专一性强，淀粉水解副产物少，故水解糖液纯度高，淀粉转化率高；③可在较高淀粉乳浓度下水解，而且可采用粗原料；④由于微生物酶制剂中菌体细胞自溶，使糖液的营养物质较丰富，这可使发酵培养基的组成简化；⑤用酶水解法制得的糖液颜色浅，较纯净，无苦味，质量高，有利于糖液的充分利用。缺点是生长周期长，要求设备多，而且酶本身是蛋白质，易引起糖液过滤困难。

(3) 酸-酶结合水解法 酸-酶结合水解法是集合了酸水解和酶水解的优点，而采用的生产工艺。该工艺分为酸-酶法和酶-酸法两种。

① 酸-酶法：是先将淀粉用酸水解成糊精或低聚糖，再用糖化酶将其水解为葡萄糖的工艺，有些淀粉如玉米、小麦等谷物淀粉，淀粉颗粒坚实，如果用 α -淀粉酶液化，在短时间内，往往会液化反应不彻底。因此首先用酸将淀粉水解至葡萄糖值10~15（DE指葡萄糖占干物质的百分比），然后将水解液降温中和，再加入糖化酶进行糖化。采用此法具有酸液化速度快，用酸量少，产品颜色浅，糖液质量高的优点。另外由于糖化过程由酶来完成，因而可采用较高的淀粉乳浓度，提高生产效率。缺点是糖化时间较长，需20~30h。

② 酶-酸法：是将淀粉乳先用 α -淀粉酶液化到一定程度，再用酸水解成葡萄糖的工艺。该工艺适用于大米或粗淀粉原料，可省去大米或粗淀粉原料的精制过程。避免淀粉在加工过程中的大量流失，原料利用率一般可提高10%左右。

2) 谷氨酸发酵控制

谷氨酸的生物合成途径包括葡萄糖酵解途径（EMPH途径）、磷酸己糖途径（HMPH途径）、三羧酸循环（TCA循环）、乙醛酸循环等。其具体过程为：葡萄糖经EMPH和HMPH途径生成丙酮酸，然后进入TCA循环和乙醛酸循环，最后在醛缩酶的催化下，草酰乙酸和乙酰辅酶A合成柠檬酸，进一步生成异柠檬酸和 α -酮戊二酸。在氨充足的前提下， α -酮戊二酸由还原氨基化作用生成谷氨酸，菌体内合成的谷氨酸透过细胞膜，在发酵液中大量积累谷氨酸。整个生物合成代谢途径至少有16步酶促反应。发酵的具体过程为：谷氨酸生产菌经活化，经一级种子、二级种子的扩大培养，接入发酵罐中，在温度32~38℃，pH7.0左右条件下，好氧发酵30h左右，制得谷氨酸。

发酵是谷氨酸生产过程的关键阶段,其中许多工艺条件直接影响谷氨酸的得率。如配料、发酵温度、pH、通风等因素。

(1) 生物素对谷氨酸发酵的影响 生物素作为催化脂肪酸生物合成最初反应关键乙酰 CoA 羧化酶的辅酶,加入了脂肪酸的生物合成,进而影响磷脂的合成。只有在生物素限量的条件下,脂肪酸合成才不完全,导致细胞发生变形,谷氨酸能够从胞内渗出,积累于发酵罐中。相反在生物素充足条件下,发酵过程菌体大量繁殖,不产或少产谷氨酸,代谢产物中乳酸和琥珀酸明显增多。生物素属于 B 族维生素,也称维生素 H 或辅酶 R,广泛存在于动植物中,麸皮、玉米浆、牛肉膏、蛋白胨和酵母膏中含量相当丰富。

(2) 种龄和种量的控制 种龄是指种子培养时间,种量是指接入发酵罐内种液量占发酵罐内发酵培养基量的百分比。谷氨酸生产菌的培养时间,一般是菌种经活化后,要经二级培养,一级种子的种龄控制在 11~12h,二级种子种龄控制在 7~8h。接种量一般为 1%。接种量要适当,过多会使菌体生长速度过快,菌体娇嫩,不强壮,提前衰老自溶,后期产酸不高;如果过少,则菌体增大缓慢,会导致发酵时间延长,容易染菌。

(3) 温度对发酵的影响 谷氨酸生产菌生长繁殖的最适温度为 32℃ 左右,产酸的最适温度在 34~36℃。如果温度过高,则菌体生长迟滞,形状不整齐,且过早衰老,以至出现发酵中期就停止发酵,不耗糖;OD 不增,pH 下降或上升等现象。但在发酵后期,短时间温度过高影响不大。在发酵过程主要是进行降温操作,因为在发酵过程中,菌体生长繁殖合成作用和谷氨酸的生物合成作用会放出大量的生物热,而使发酵温度急剧上升。因此在生产中,控制温度是发酵操作指标之一。为此在生产中采用二段温度控制法:在发酵的 0~12h 控制在 32~34℃,而在 16h 以后则维持 34~36℃。也有采用三段温度控制:在发酵 0~12h,控制在 32~33℃,12~24h 为 33~34℃,24h 以后则控制在 34~36℃。

(4) 溶解氧对发酵的影响 溶解氧与谷氨酸发酵有密切关系。其需要量与种龄、种量、培养基成分、发酵阶段及发酵罐的大小有关。当其他因素固定下来后,通风量便成为可控制的技术条件。在长菌期,如果通风量过大,菌体细胞代谢活动过剧,易引起衰老;在产酸期,通风量不足,不能进入三羧酸循环,导致乳酸积累以致酸败,因此只有在适量通风条件下,才有可能大量积累谷氨酸。一般控制为:长菌阶段低风量,产酸阶段高风量,发酵成熟期又转为低风量。

(5) pH 对发酵时间的影响 不同的微生物有不同的最适 pH。谷氨酸生产菌的最适 pH 一般是中性或微碱性,而且生长 pH 和发酵 pH 又稍有不同。发酵前期 pH 控制过低,会造成菌体生长旺盛,营养成分消耗大,转入正常发酵时,长菌而不产酸。如果过高,有利于抑制杂菌生长,但对菌体生长不利,糖化代谢缓慢,发酵时间延长。在谷氨酸发酵过程中,pH 是变动的,为了保证发酵顺利

进行, 必须根据发酵液 pH 变化的规律, 通过流加尿素来及时调整发酵液的 pH 和补充氮源, 使发酵得以正常进行, 这是保证谷氨酸高产的重要措施。

(6) 中间补料对发酵的影响 所谓补料就是补加适量的生物素、营养盐和糖液。如果生物素或营养盐不足, 会引起细胞生长缓慢, 菌体衰弱, 使得菌体在生长旺盛期, OD 值仍达不到要求。所以补料是提高谷氨酸产量的一个关键措施。

(7) 防止噬菌体和杂菌污染 谷氨酸生产菌一般都是生物素缺陷型, 而在发酵培养基中又大多是控制生物素亚适量, 所以谷氨酸生产菌对噬菌体和杂菌的抵抗能力弱。特别是噬菌体对谷氨酸发酵危害非常大。如果发酵过程造成污染, 轻则出现产酸率降低, 难提取; 重则倒罐, 造成很大经济损失。所以在谷氨酸生产中, 杂菌和噬菌体的防治工作是非常重要的。造成噬菌体污染途径有三个方面: 一是环境中存在噬菌体; 二是环境中存在活菌体; 三是噬菌体与活菌体有相互接触的机会。而活菌体排放造成环境污染是主导原因, 空气是噬菌体污染的主要途径。所以要从空气过滤、培养基灭菌、设备及环境等环节严格把关。

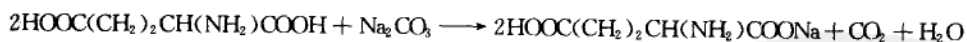
3) 谷氨酸的提取

谷氨酸发酵结束后, 发酵液的温度在 $34\sim 36^{\circ}\text{C}$, pH 一般在 $6.0\sim 7.0$ 接近中性, 正常的谷氨酸发酵液比较稀薄, 不太黏稠, 外观呈浅黄色, 表面浮有少许泡沫。其主要成分含有谷氨酸外, 还存在着菌体, 培养基残留物、色素、胶体物质及其他发酵副产物, 因此要对它进行分离除去杂质。谷氨酸的分离提取的原理通常是利用它的两性电解质性质、谷氨酸的溶解度、分子大小、吸附剂的作用以及谷氨酸的成盐作用等。常用的方法有: 等电点法、离子交换法、锌盐法等。

4) 谷氨酸制味精

从发酵液中提取出来的谷氨酸, 是味精生产过程的半成品, 还需要经过中和、脱色、真空煮晶、分离、干燥等操作才能制成味鲜透明、晶莹洁白的成品味精。

(1) 中和 谷氨酸与碱作用生成谷氨酸钠的过程称为谷氨酸的中和。反应式如下:



中和反应时, 应将 pH 控制在第二等电点 pH6.96, 如果碱放得过多, pH 过高会造成谷氨酸二钠生成量过多, 谷氨酸二钠没有鲜味, 从而影响精制的利率和成品味精的质量。中和整个过程应控制温度不要超过 75°C , 中和后转入脱色工序。

(2) 中和液的除铁和除锌 中和液的铁质主要是由原辅材料及设备带入的, 其中以盐酸、液碱和纯碱带入量最多。味精含铁锌过多, 一方面不符合食品规定标准, 另一方面味精中铁离子过多, 味精就呈红色或黄色, 影响产品的色泽。因此在生产过程中, 必须将铁和锌除去。通常都采用硫化钠法, 使铁和锌生成沉淀从而被过滤除去。

(3) 谷氨酸中和液的脱色 一般谷氨酸中和液都具有深浅不同的黄褐色色

素,其来源有三个方面:①原料本身的色素;②设备受到腐蚀产生的金属离子;③生产中化学变化产生的色素。为了不影响产品质量,必须在结晶前将其脱色,常用脱色方法有活性炭脱色法和离子交换树脂法两种。

(4)中和液的浓缩和结晶 谷氨酸钠在水中的溶解度很大,要想从溶液中析出结晶,必须除去大量的水分,使溶液达到过饱和状态。中和液不宜在高温下进行浓缩,否则谷氨酸钠易脱水环化生成没有鲜味的焦谷氨酸钠。因此生产上常采用减压浓缩的方法来进行中和液的浓缩和结晶。浓缩时一般真空度控制在80kPa以上,温度为65~70℃,pH为6.0~7.0。操作中边搅拌边浓缩,当浓缩达到30~32°Bé后,投入晶体,进行结晶。为了使味精的结晶颗粒整齐,一般采用投晶种结晶法。在结晶锅里完成结晶后,经离心机分离、振动床干燥、筛分即成成品味精。

实例

(1) 工艺条件

菌株:黄色短杆菌 FM84~415

斜面培养基组成(%):牛肉膏 10 蛋白胨 1.0 NaCl 0.5 琼脂 2.0 pH7.0~7.2。

一级种子培养基组成(%):葡萄糖 2.5 玉米浆 2.2 KH_2PO_4 0.1 pH7.0~7.2。

二级种子培养基组成(%):葡萄糖 2.5 玉米浆 2.8 KH_2PO_4 0.2 尿素 0.35 pH 6.7。

发酵培养基组成(%):水解糖 18~20 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.06~0.065 KH_2PO_4 0.1~0.2 尿素按糖浓度定,复合生物素(糖蜜、麸水解液和玉米浆)适量 MnSO_4 1.8mg/L pH 7.0。

接种量:1%

发酵温度:三级管理

通风量:五级管理

(2) 操作注意事项

① 生物素用量:黄色短杆菌 FM84~415 对生物素敏感,因此掌握好复合生物素用量是发酵取得成功的关键。

② 通风量控制:发酵罐体积为24t,按发酵时间不同,通入不同的风量:0~6h, 100~120m³/h; 6~12h, 120~180m³/h; 12~24h, 200m³/h左右; 24~32h, 180~160m³/h; 32h至放罐, 160~120m³/h。

③ 尿素用量:一次高糖发酵时,尿素用量一般在某种程度上4.5%左右,碳氮比大致为100:26,尿素使用可采用低初脉,发酵过程中多次少量流加的方

法。当发酵 pH 低于 7.0 时即流加尿素，每次加量不多于 0.6%。

④ 温度控制：在不同发酵时间，控制不同的发酵温度：0~12h，35℃，12~28h，36~37℃，28h 至放罐，37~38℃。

⑤ OD 值的控制：OD 的净增值控制在 0.7 左右，在发酵 16~20h 时，细菌进入平衡期。

3.5.2 有机酸发酵生产

有机酸是羧酸 ($R-COOH$)、磺酸 ($R-SO_2OH$)、亚磺酸 ($R-SOOH$)、硫代羧酸 ($R-COSH$) 等的总称。严格地说，凡是能给予氢离子的有机物都可以称为有机酸，但通常仅指羧酸，它也有饱和一元、二元、三元、多元和不饱和及环状羧酸，种类繁多。就目前市场占有率而言，以柠檬酸为主，它占酸味剂市场的 70% 左右。现简单介绍柠檬酸发酵生产过程。

1. 柠檬酸概况

柠檬酸又名橐酸，学名 2-羟基丙烷三羧酸或 3-羟基-3-羧基戊二酸，是生物体主要代谢产物之一。主要存在于柠檬、柑橘、菠萝、梅等果实中，尤其以未成熟者含量较多。植物叶子中也含有柠檬酸，在动物中，柠檬酸存在骨髓、肌肉、血液、乳汁、唾液、汗和尿中。它是食品、医药、化工等领域应用最广泛的有机酸之一。其中尤以食品工业用量最多，世界卫生组织 (WHO) 对柠檬酸在食品中的添加量未做任何限制。

2. 柠檬酸发酵用微生物

很多微生物都能产生柠檬酸，如毛霉、橘青霉、棒曲霉、泡盛曲霉、黑曲霉及假丝酵母等，但并非所有的菌株都可用于工业生产，目前采用糖质原料生产柠檬酸的菌株均为黑曲霉，有黑曲霉 N-558、川柠 19-1、G2B8、5016、3008，近年来又有 T149、Co817 等菌种。这些菌种都具有产酸力高，发酵速度快和培养条件粗放等特点。以烷烃为原料发酵生产柠檬酸的优良菌种有解脂假丝酵母，解脂复膜胞酵母等各种假丝酵母，它们的优越性是利用烷烃发酵产柠檬酸能力远强于黑曲霉，对烷烃转化率可达 56%。

3. 柠檬酸发酵工艺

柠檬酸发酵无论采用何种微生物都必须是典型的好氧发酵，工业上采用的方法有 3 种：固体发酵法、浅盘发酵法和深层发酵法。

1) 固体发酵法 (又称曲法)

是我国 1976 年在上海嘉定投产的用薯渣固体发酵法生产柠檬酸，其工艺如下：

薯渣→晾干、粉碎→配料→蒸料→冷却→补水→蒸料灭菌
→接种→装盘→进曲房→发酵→出曲→浸泡→提取

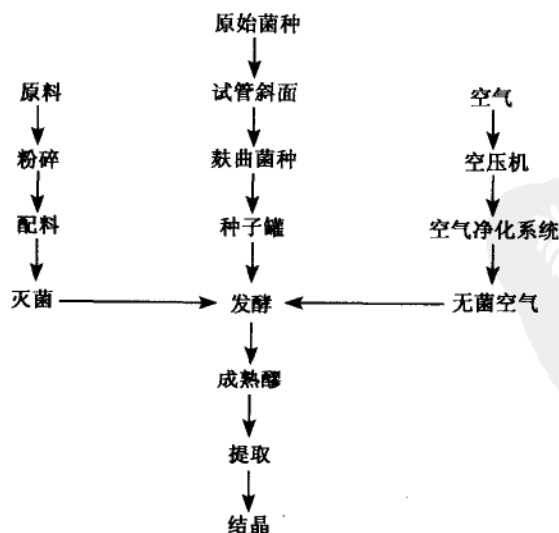
该工艺采用的菌种为曲霉 G2B8 及其他诱变菌株。种曲培养基由麸皮、碳酸钙和硫酸铵组成，发酵培养基由薯渣与米糠组成。种曲与蒸料的含水量不能太高，以使料的结构疏松，灭菌时易穿透，培养时易透气为宜。一般蒸料的含水量不超过 65%。冷却后补水量 70%~77%，装盘厚度 5cm 左右，培养温度 25~30℃，培养时间 96h，产酸率约 70%，该工艺简单，受益快，可变废为宝。

2) 浅盘发酵法 (又称表面发酵法)

浅盘发酵是将培养基盛于浅盘中接种，再进行发酵。主要用于糖蜜原料，其工艺过程是：将糖蜜稀释至含糖 15%~20%，添加适量营养盐并加酸调节 pH 到 6.0~6.5，再加热 18~45min，最后加入抗菌剂六氟基高铁酸钾于热溶液中。在 40℃ 时，进行接种，每立方米需要 100~150mg 的孢子。接种后通风，35℃ 维持 3d 当柠檬酸生成时，放出热量，需要进行降温处理，使温度维持在 26~28℃，最大风量 15~18m³/(m²·h)，风温 25℃ 以下，湿度 75% 以上，发酵时间 6~8d。发酵液中含柠檬酸 200~250g/L，每 100g 葡萄糖生成柠檬酸 75g。该方法具有设备简单，投资少，投产快；操作技术简单，能耗低；原料粗放，产酸浓度高等优点。但也有占地面积大，劳动强度高，发酵时间长，菌体生成量影响产酸等缺点。

3) 液态深层发酵法

深层发酵是在发酵罐内进行接种、培养和发酵。培养过程需要通入无菌空气。该工艺为柠檬酸工业中的主导地位，其流程如下：



工艺条件:

菌种: 斜面试管: 培养基: 麦芽汁 7°Be 培养温度 34℃ 时间 7d

三角瓶培养基: 麸皮 容量 5 000~10 000ml 培养温度 33~34℃
时间 1d

种子罐: 培养温度 34℃ 时间 24~30h

发酵罐: 发酵温度 (34±1)℃ 时间 4d

原 料: 薯干粉

发酵罐的体积一般为 50~1 000m³, 产量为 10.9%~13.8%, 转化率可达 91%~104%。

4) 柠檬酸的提取

成熟的柠檬酸发酵醪中, 除含有主产物柠檬酸之外, 还含有纤维、菌体、有机杂酸如草酸、葡萄糖酸及糖、蛋白质、胶体物质、色素、无机盐及其他代谢产物等杂质, 它们来自发酵原料, 或在发酵过程中产生, 它们溶于或悬浮于发酵醪中。通过各种理化方法, 清除这些杂质, 得到符合各种质量标准的柠檬酸产品的全过程, 称为柠檬酸的提取。从柠檬酸发酵液中提取柠檬酸一般包括 3 个步骤: ①去除菌丝体和其他固形物得到滤液; ②用各种物理和化学方法处理滤液得到初步纯化的柠檬酸溶液; ③初步纯化的柠檬酸溶液经精制后浓缩得到柠檬酸结晶。柠檬酸提取的方法有钙盐离子交换法、溶剂萃取法、连续离子交换法及色谱离子交换法等。我国一般采用钙盐离子交换法。工艺流程如图 3-7, 发酵液经 80~90℃热处理后, 滤去菌体等残渣, 加 CaCO₃ 和石灰乳中和, 使柠檬酸以钙盐形式沉淀下来, 然后加入 H₂SO₄, 使柠檬酸游离, 形成硫酸钙(石膏渣)被滤除。所得粗柠檬酸经脱色和离子交换净化, 除去色素和胶体杂质及无机杂质离子。净化后的柠檬酸溶液浓缩后, 结晶出来, 离心分离晶体经干燥筛分和检验后即为成品。

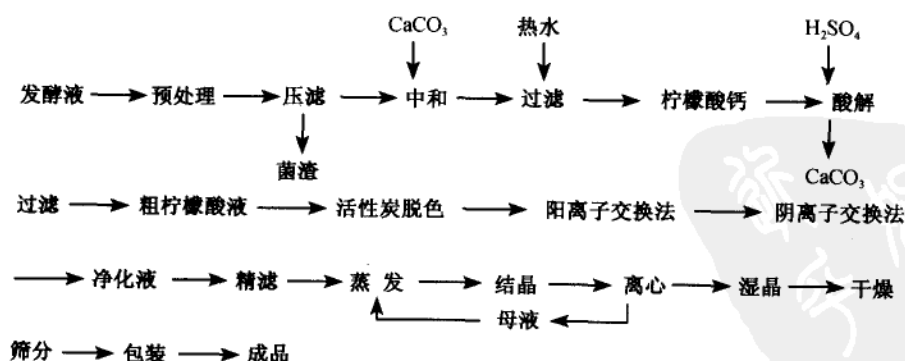


图 3-7 柠檬酸提取工艺流程

3.5.3 饮料酒的生产

酒类生产在发酵工程中是利用微生物获得最早的产品之一。凡是酒精含量超过0.5%的饮料和饮品均称为酒。目前市场上饮用的酒精饮料可分为酿造酒、蒸馏酒和配制酒。酿造酒指使用酒母进行酒精发酵后得到发酵液，可直接饮用或经过过滤后饮用。其代表有葡萄酒、黄酒、啤酒。蒸馏酒是在酿造酒的基础上发展起来的，指凡是用水果、乳类、糖类、谷类等原料，经过酵母菌发酵后，蒸馏得到无色、透明的液体，再经陈酿和调制成为透明的、含酒精浓度大于70%（体积百分比）的酒精性饮料。其代表有威士忌、伏特加、白酒等。配制酒是以发酵酒、蒸馏酒和食用酒精为酒基与各种可食用物质一起进行再加工制成的有独特风味的饮料酒。

我国的白酒是世界六大蒸馏酒之一，产品种类繁多，质量独具风格，深受广大消费者喜爱和国际市场的好评。这里主要介绍白酒的生产过程。

1. 酒的种类与方法

白酒又叫烧酒，是指用含淀粉或糖分的原料，经糖化发酵酿制而成的一种蒸馏酒，它无色或微黄；澄清透明，具有独特的芳香和风味，含酒精比较高。我国白酒种类很多，按主要原料分类有：粮食酒、薯类酒和代用原料酒；按生产工艺可分为：固态法、半固态法和液态法发酵白酒；按采用糖化和发酵剂分类有：大曲酒、小曲酒和麸曲白酒；按香型分类有：浓香型、酱香型、清香型、米香型和其他香型白酒；按酒度高低分类有：高度白酒、中度白酒和低度白酒；白酒的生产方法有固态、半固态和液态发酵法。固态发酵法以它独特的风格和生产工艺，在我国占有比较重要的地位，因此主要介绍固态白酒的生产工艺。

2. 固态法白酒生产工艺（大曲酒）

大曲酒是采用大曲作为糖化、发酵剂，以含淀粉物质为原料经固态发酵和蒸馏而成的一种饮料酒。

1) 大曲的生产

大曲生产是我国传统的制曲工艺，也是我国名优白酒生产常使用的一种糖化和发酵剂。它以小麦、大麦和豌豆为原料，经粉碎生料加水。压制成块状，在室内保温培养，让自然界各种微生物在上面富集生长，以产生白酒生产所需的糖化酶和酒化酶，并产生一定的香味物质，经过风干、贮存，即成大曲。大曲中含有霉菌、酵母菌和细菌等多种微生物。其品种，根据培养过程中控制的品温的不同分为高温曲和中温曲。高温曲主要用于酱香型白酒的生产，其酱香浓郁，直接影响到白酒的香味。工艺过程如图3-8所示。中温曲又分为偏高温曲和次中温大

曲两种类型。偏高温指品温在 $55\sim 60^{\circ}\text{C}$ 的大曲，用于浓香型酒的生产，生产工艺如图 3-9 所示。次中温大曲分为清茬、后火、红心 3 种。制曲步骤相同，但控制的品温不同，在酿酒时可按比例混合使用。流程如图 3-10 所示。

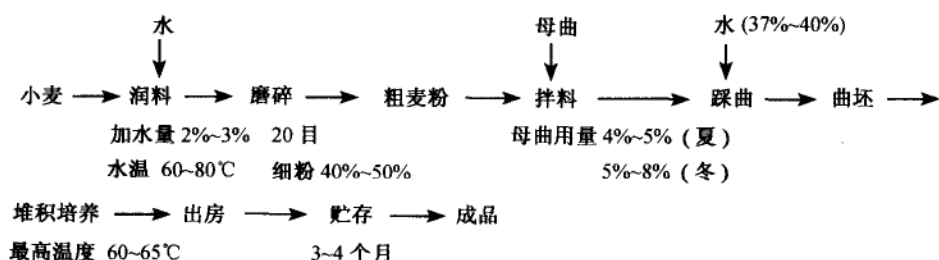


图 3-8 高温大曲生产工艺流程图

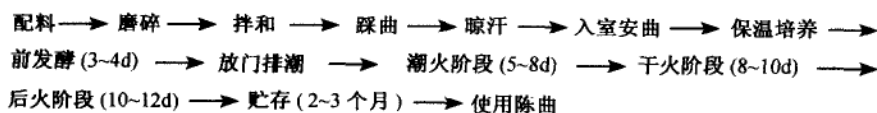


图 3-9 偏高温大曲生产工艺流程图

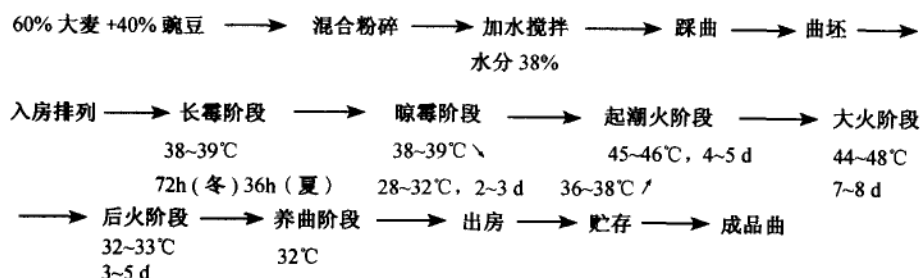


图 3-10 次中温大曲生产工艺流程图

2) 大曲酒的生产工艺 大曲酒发酵特点是：①采用固态配醅发酵，物料含水较低，常控制在 $55\%\sim 65\%$ ，整个物料呈固体状态。②发酵结束后，含酒精分为 $5\%\sim 6\%$ （体积分数）。③在较低温度下的边糖化边发酵工艺，俗称双边发酵，大曲既是糖化剂，又是发酵剂，窖内酒醅同时进行着糖化和发酵作用。④属多种微生物的混合发酵，参与大曲白酒生产的微生物种类繁多，它们主要来自于大曲和窖泥，以及环境、设备和工具场地，整个发酵过程是在粗放条件下进行的。⑤固态甑桶蒸馏分离提取成品酒。

大曲酒生产的操作通常为清渣法、续渣法和两者兼用（清渣加续渣法）3 种方法。其香型不同，采用的生产方法就不同。

(1) 浓香型大曲酒 浓香型大曲酒以续渣法为生产工艺，其工艺特征是：以高粱为原料，偏高温曲为糖化发酵剂，混蒸混烧，老五甑操作，泥窖发酵，周期1~2个月，酒的香气主要来源于窖泥和糟，以己酸乙酯为主体香气。在浓香型大曲酒生产的操作中，发酵好的粮醅称为母糟，母糟配粮后称为粮糟，粮糟发酵后蒸得的酒称为粮糟酒，母糟不配粮蒸酒称为红糟，蒸得的酒称为红糟酒，红糟蒸酒后不打量水，只加曲作为面糟用。工艺流程如图3-11所示。

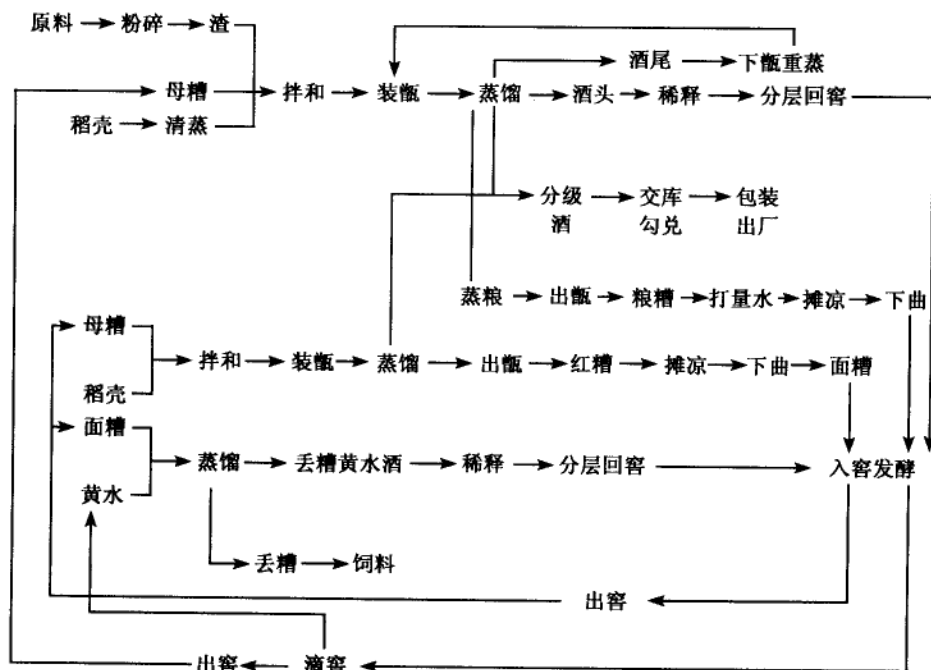


图 3-11 浓香型大曲酒工艺流程图

(2) 清香型大曲酒 清香型大曲酒是以山西杏花村汾酒为典型代表，其工艺操作是：整个生产过程中突出一个“清”，原料清蒸、辅料清蒸、清蒸流酒、清渣发酵。采用次中温大曲为糖化发酵剂，清蒸二次清，地缸、固态、分离发酵法。制得的酒具有“清香芬芳、醇厚绵软、甘润爽口、酒味纯净”的特点，以乙酸乙酯为主体香气。工艺流程如图3-12。

(3) 酱香型大曲酒的生产工艺 酱香型大曲白酒是以茅台酒为典型代表的，其酒质微黄透明，酱香突出，以低而不淡，香而不艳，回味悠长，敞杯不饮，香气持久不散，空杯留香长而著称。它与法国科涅克白兰地、英国苏格兰威士忌并列世界三大名酒。

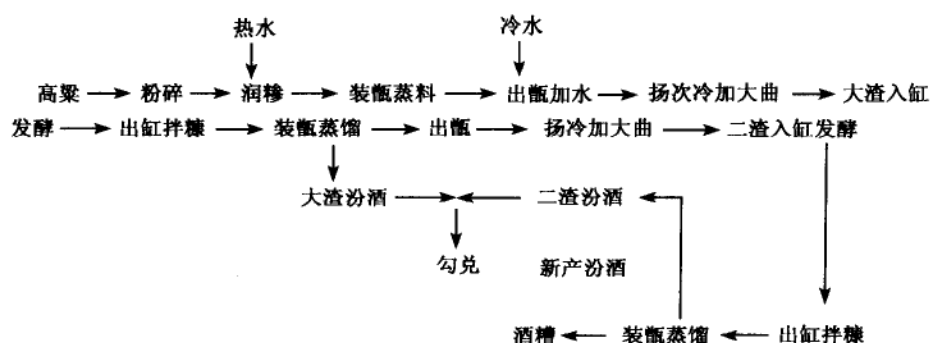


图 3-12 清香型大曲酒工艺流程图

酱香型白酒在工艺操作方面与浓香型白酒、清香型白酒的最大区别在于：酿酒用高温曲，糙沙、堆积、回沙、多轮次发酵。用曲量大，周期长。工艺流程如图 3-13。此流程的特点是：高温制曲，高温堆积，两次投料，8 次发酵，7 次流酒，一年一个生产周期，回流发酵，高温流酒，分质贮存，精心勾兑。

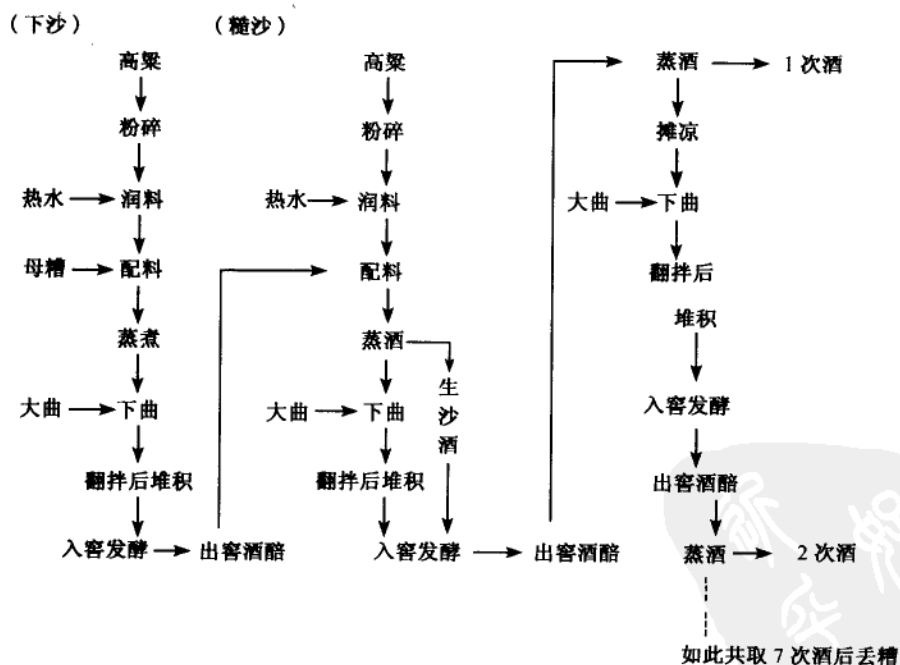


图 3-13 酱香型大曲白酒工艺流程图

本章小结

发酵工程是生物工程应用最广泛的一个学科，它是利用微生物的生长和微生物机能及代谢活动生产各种有用物质的现代工业。本章节主要介绍发酵工程的基本内容和基本原理，通过本章节的学习了解发酵工业上微生物的种类及特性，发酵培养基的组成、发酵方法和工艺条件的操作、发酵设备的结构和类型及发酵下游技术的处理过程和方法。同时了解发酵工程的应用实例及前景。

复习思考题

1. 发酵工程的定义及包括的内容？
2. 发酵工程产物有哪几种类型？
3. 发酵工业对菌种有什么要求？
4. 微生物发酵常用的微生物有哪些？各有何特性？
5. 发酵方法有哪几种？各有什么优缺点？
6. 影响发酵的因素有哪些？如何控制？
7. 发酵下游处理分为哪几个步骤？相应的分离方法有哪些？
8. 简述谷氨酸的生产过程。生物素对谷氨酸生成合成途径有何影响？
9. 简述柠檬酸的生产过程。



第 4 章

酶 工 程

酶工程是研究酶的生产和应用的一门技术性学科，它的主要内容包括：酶的发酵生产、酶的分离纯化、酶分子修饰、酶和细胞固定化等。

4.1 酶工程概况

4.1.1 酶的概念及特性

1. 酶的定义

酶是一种由活细胞产生的生物催化剂。它存在于活细胞中，控制各种代谢过程，将营养物质转化成能量和细胞构成材料。在生物体外，只要条件适宜某些酶亦可催化各种生化反应。酶和其他的蛋白质一样，基本组成单位是氨基酸，无论是动物、植物及高等生物体内，还是细菌、真菌、藻类等低等生物细胞中，在其生长发育、呼吸、吸收、排泄和繁殖等新陈代谢过程中所进行的一切生物化学变化几乎都是在酶的催化下发生的，可以说，没有酶，就没有生命。

2. 酶的特性

酶具有催化剂的共性，只要有少量酶存在即可大大加快反应的速度。它能使反应迅速达到平衡，但不改变反应的平衡点。有时它也加入反应，但在反应前后本身无变化。同时酶与非酶的催化剂相比，又具有特性。

(1) 催化效率更高 酶的催化的反应速率是相应的无催化反应速度的 $10^8 \sim 10^{20}$ 倍，并且至少高出非酶催化反应速率几个数量级。

(2) 反应专一性强 酶对反应的底物和产物都必须有极强的专一性，也就是说，酶催化反应几乎没有副产物。

(3) 反应条件温和 酶催化反应都发生在相对温和的条件下。例如：温度低于 100°C ，正常的大气压，中性的 pH 环境。相反一般化学催化往往需要高温高压和极端的 pH 条件。

4.1.2 酶工程的发展概况

早在几千年前，人类已开始利用微生物酶来制造食品和饮料，但是那时人类

并不知道酶是怎样的物质，是不自觉地利用了酶的催化作用。然而真正地认识酶的存在和作用，是从 19 世纪开始的。1857 年巴斯德提出了发酵是由微生物引起的概念并认为发酵的各个阶段都有特定的酶加入，这些酶只有在活细胞酵母体中才有功能。这一时期人类通过对胃肠的消化作用，麦芽对淀粉的糖化作用和酵母的酒精发酵等的研究建立了酶的概念。1878 年库尼（Kühne）首先把这物质称之为酶（enzyme）。随着酶科学技术的发展，到 1897 年，德国学者巴赫纳（Buchner）兄弟用细砂研磨酵母细胞，然后压取汁液，并证明此不含细胞的酵母提取液也能使糖发酵，说明了酶不仅在细胞内，而且从细胞分离出来后仍可继续发生作用。因此认为巴斯德的生命酶，是可以与生命体脱离的。

1894 年日本的高峰让吉利用米曲霉固体培养法生产第一个商品酶制剂——高峰淀粉酶作消化药物；从此人类开始了有目的地进行酶的生产 and 应用，即酶工程的第一阶段。1907 年德国人罗姆（Rohm）制得胰酶，用于皮革的软化；1911 年德国人威尔斯丁（Wallerstein）利用木瓜蛋白酶防止啤酒混浊；1917 年法国人博伊登（Boidin）首创以枯草杆菌生产淀粉酶产品在纺织工业上用作退浆剂。此后酶的生产和应用逐步发展，然而酶的大规模生产是在第二次世界大战后，随着抗生素的发展而建立起来，1949 年日本开始用液体深层培养法生产细菌 α -淀粉酶。从此微生物酶的生产进入大规模工业化阶段。1960 年法国的雅各（Jacob）和莫诺德（Monod）提出操纵子学说，阐明了酶生物合成的调节机制，使酶的生物合成可以按照人们的意愿加以调节控制。随着酶生产的发展，酶的应用越来越广，然而应用过程，人们注意到酶存在一些缺点，如稳定性差、使用效率低、不能在有机溶剂中反应等。为此，为了更好地发挥酶的催化功能，并使其能在生化反应器中反复连续使用，人们发展了酶的固定化技术。从而进入了酶工程的第二阶段，即固定化酶阶段。酶固定化后有一定的机械强度，装入酶反应器中可使生产连续化、自动化，同时也提高了对酸、碱、热的稳定性能，对提高生产效率，节约能源，降低成本等均起到前所未有的作用。目前在单一酶固定化技术的基础上，又发展了多酶体系的固定化及固定化细胞增殖技术，由于细胞壁扩散障碍，又发展起来了固定化原生质体技术；而固定化酶的研究推动了新型生物反应器、生物传感器和生物芯片等现代生物电子器件的发展。从而开创了第三代酶工程。目前第三代酶工程产品已用于生产各种氨基酸、有机酸、核苷酸、抗生素。它有高效能、低消耗、无公害、长寿命、安全、自动化等特点。目前已在各先进国家中使用。

随着基因工程的崛起，酶工程的发展进入一个非常重要的时期，即第四阶段酶工程。它是将新的生物技术全部应用到酶工程上来。使酶工程不断向广度和深度发展。显示广阔而诱人的前景。例如，用细胞融合术、DNA 重组术改良产酶的菌种，使之能源源不断地生产出适合人类需要的酶来。

4.1.3 酶工程的应用前景

酶的应用已有几千年的历史。然而真正认识而有目的的利用酶,至今不过100年的历史。特别是随着对酶的研究的深入和酶的生产技术的进步,酶在工业生产中的应用越来越广泛,几乎在各个行业都有酶的应用。例如:在食品、医药、制革、纺织印染、日用化工、造纸、三废治理和部分化学工业方面的应用。

由于酶具有专一性强,催化效率高及反应条件温和的特点,因此酶在工业上应用,可以增加产量,提高质量、降低原材料和能源的消耗,改善劳动条件,甚至可以生产出用其他方法难以得到的产品,促进新产品、新技术、新工艺的兴起和发展。如医药方面,酶可以快速、简便、准确地诊断出疾病,并可作为药物使用。在分析检验方面,酶能快速简便、灵敏准确地检测出结果,而且能使原来难以检验的物质及其变化情况变得简单快捷。特别是在基因工程、细胞工程和蛋白质工程等新技术领域,酶是必不可少的工具。然而在酶的应用过程中,要根据应用目的选择适当的酶和酶的纯度。有时可以采用粗酶,有时则要求用纯化的酶,有的酶可在不同的领域广泛使用,有的应用却需要几种酶联合作用。

现在,随着酶工程的发展,不断出现新酶种和新用途。在传统领域中,如洗涤剂工业,除原先使用的碱性蛋白酶外,已经研制开发出对漂白剂有很强耐性的蛋白酶,对底物有很强亲和力的脂肪酶、碱性 α -淀粉酶和纤维素酶等,各种酶的配合应用,可以制成各种不同的洗涤剂,能够满足洗涤纺织品、餐具和卫生洁具等的需要。在临床诊断方面应用广泛的过氧化物酶,也可以制作洗涤剂,该酶只作用于游离的色素,而不作用于已经染在纺织品上的色素,因此在洗涤时既能防止衣物不被其他色素污染,又不会使衣服褪色。在纺织工业中,除利用纤维素酶处理纺织品提高其柔软性和染色性外,又开发了将原果胶酶用于棉纤维的加工,既能改善纤维的手感和提高染色性,又不影响纤维的强度。近来蛋白酶广泛用于水解动植物蛋白,制造营养性天然调味品。在化妆品工业,酶的应用也越来越受到重视,如染发剂中常用过氧化氢,易伤毛发,现在研究用尿酸酶作为过氧化氢的供体,可以稳定的供应过氧化氢,又不会损伤毛发。在饲料工业方面,现在已普遍使用纤维素酶、半纤维素酶、果胶酶、淀粉酶和蛋白酶,从而提高饲料的可消化性,提高畜禽的产肉率,畜类的产乳率及禽类的产蛋率等。

目前,国外的酶生产公司不断应用基因工程、蛋白质工程等新技术,大力发展新酶种、新用途。如Novo公司已经开发出不依赖钙离子的高温 α -淀粉酶,用于非水有机系统中反应的酶,能够应用半年以上的固定化酶等。日本目前已能生产出10多种酶和10多种功能性低聚糖,并用于生产保健食品、药品和化妆品等。近十几年,先后又开拓了青霉素酰胺酶、氨基酰化酶、异淀粉酶、蜜二糖酶、天冬酰胺酶等。目前已经发现的酶约有3000多种,但得以应用的酶仅只有

60 多种,而已工业化生产的酶只不过十多种。因此酶的应用大有潜力可挖,加上固定化酶技术和酶分子修饰的发展,可使酶的各种特性变得更加符合人们的愿望,使酶的广泛应用更显示出其优越性。

4.2 酶的生产

酶的生产是指经过预先设计,通过人工操作控制而获得所需的酶的过程。酶的生产方法有提取法、发酵法及化学合成法 3 种。

4.2.1 提取法

提取法是最早采用的酶生产方法,并仍沿用至今。它是采用各种提取、分离技术从动物、植物或微生物细胞或组织中将酶提取分离出来。例如,从子牛胃黏膜中提取胃蛋白酶、凝乳酶等。该方法简单方便,但必须首先获得含酶组织或细胞,受气候、地理环境的影响,动植物来源及数量有一定的局限性。或在培养微生物细胞后,再从细胞中提取,而使工艺流程变得繁杂,而且产品含杂质较多,分离纯化较困难。所以 20 世纪 50 年代后,随着发酵法的发展,许多酶都采用发酵法。

4.2.2 化学合成法

化学合成法是 20 世纪 60 年代中期出现的新技术。1965 年,我国人工合成胰岛素的成功,开辟了蛋白质化学合成的新纪元。此后世界各国进行大量的研究和开发,在 1969 年美国首次用化学合成法得到含有 124 个氨基酸的核糖核酸。现在已可用肽合成仪进行酶的化学合成。然而酶的化学合成法对单位底物的各种氨基酸的纯度要求很高,合成的成本高昂,而且只能合成已经搞清楚其化学结构的酶。因此它的使用受到限制,至今仍停留在实验室阶段。

4.2.3 酶的发酵生产

利用微生物生产酶是 20 世纪 50 年代以来酶生产的主要方法。它是利用细胞,主要是微生物细胞的生命活动而获得人们所需的酶。它的发展是随着酶的应用范围的日益扩大,单纯依靠动植物来源已远远不能满足工业需要的形式下,而迅速发展起来一种方法。通过微生物生产酶从技术上来说,它已存在一定的历史基础,不仅在微生物中酶原蕴藏丰富,而且微生物在人工控制条件下,能够以动植物生产所无法比拟的速度进行大量繁殖,只要用比较简单的设备即可大批生产。所以目前大部分的酶生产都是采用微生物培养生产,因此将重点介绍发酵法。

酶的种类虽然繁多,产酶微生物的菌种又各异,但是发酵生产的工艺流程大

体相似的,一般分为固态发酵法和液体深层发酵法。生产过程首先必须选择合适的产酶菌种,然后采用适当的培养基和培养方式进行发酵,使微生物生长繁殖并合成大量所需的酶,最后将酶分离纯化制成一定的酶制剂。

1. 酶发酵生产常用的微生物

1) 酶生产工业对菌种的要求

发酵法生产酶的关键是菌种。优良菌种不仅能提高酶的产量、发酵原料的利用效率,而且能提高酶的品质,缩短生产周期,改进发酵和提炼工艺条件等。

一般来说,一个优良的产酶菌种必须具备如下几个条件:

(1) 酶的产量高 优良的产酶菌种首先要具有高产的特性,才有较好的开发应用价值。高产菌种可以通过筛选、诱变或采用基因工程、细胞工程等技术而获得。

(2) 容易培养和管理 要求产酶的菌种繁殖速度快,容易生长,并且适应性较强,易于控制,便于管理。

(3) 产酶稳定 在通常生长条件下,能够稳定地用于生产,菌株不易退化,不易受噬菌体侵袭。一旦菌种退化要经过复壮处理,使其恢复产酶性能。

(4) 产生的酶容易纯化 发酵完成后需要经分离纯化过程,才能得到所需的酶。这就要求产酶细胞本身及其他杂质易于和酶分离。

(5) 不是致病菌及产生有毒物质或可产生其他生理活性物质的微生物。要求所采用的微生物不会影响生产人员和环境,安全可靠。微生物具有种类多、繁殖快,容易培养,代谢能力强等特点,有不少性能优良的产酶菌株已在酶的发酵生产中得到广泛应用。

2) 酶生产中微生物的种类 酶的生产菌株主要来自自然界,目前已在微生物中发现了3000多种酶。工业用于酶生产的微生物主要是细菌、霉菌、酵母菌及放线菌中的某些菌株。

(1) 枯草芽孢杆菌 枯草芽孢杆菌是应用最广泛的产酶生物之一。可用于 α -淀粉酶、蛋白酶、 β -葡聚糖酶、碱性磷酸酶等。例如:BF7658,是国内用于生产 α -淀粉酶的主要菌株;ASI 398可用于生产中性蛋白酶和碱性磷酸酶。枯草杆菌生产的 α -淀粉酶和蛋白酶都是胞外酶,而碱性磷酸酶存在于细胞内间质之中。

(2) 大肠杆菌 大肠杆菌可生产多种多样的酶,一般都属于胞内酶,需经过细胞破碎才能分离得到。例如:谷氨酸脱羧酶:用于测定谷氨酸含量生产 γ -氨基丁酸;天冬氨酸:催化延胡索酸生成L-天冬氨酸;苄青霉素酰化酶:生产新的半合成青霉素或头孢霉素; β -半乳糖苷酶:用于分解乳糖;限制性核酸内切酶、DNA聚合酶、DNA连接酶、核酸外切酶:在基因工程方面应用。

(3) 黑曲霉 黑曲霉在自然界分布极广,是曲霉属黑曲霉群霉菌。它可用于

生产多种酶,有胞外也有胞内酶。如糖化酶、 α -淀粉酶、酸性蛋白酶、果胶酶、葡萄糖氧化酶、过氧化酶、过氧化氢酶、核糖核酸酶、脂肪酶、纤维素酶、橙皮苷酶、柚苷酶等。

(4) 米曲霉 米曲霉是曲霉属黄曲霉群霉菌。用它主要生产糖化酶和蛋白酶。在我国传统的酒曲和酱油曲中得到广泛应用。此外米曲霉还用于生产氨基酰化酶、磷酸二酯酶、核酸酶、果胶酶等。

(5) 青霉 青霉属半知菌纲。分布很广,种类很多,主要用于生产葡萄糖氧化酶,苯氧甲基青霉素酰化酶、果胶酶、纤维素酶和 Cx 酶等。

(6) 链霉菌 链霉菌是一种放线菌。是生产葡萄糖异构酶的主要菌株,也可用于生产青霉素酰化酶、纤维素酶、碱性蛋白酶、中性蛋白酶、几丁质酶等。

(7) 木霉 木霉属于半知菌纲。它是生产纤维素酶的重要菌株。木霉产生的纤维素酶中包含有 C₁ 酶、Cx 酶和纤维二糖酶等。此外还含有较强的 17 α -羟化酶,常用于甾体转化。

(8) 根霉 根霉属于半知菌纲根霉属,主要用于生产糖化酶、 α -淀粉酶、转化酶、酸性蛋白酶、核糖核酸酶、脂肪酶、果胶酶、纤维素酶、半纤维素酶等。根霉含有较强的 α -羟化酶,是用于甾体转化的重要菌株。

(9) 啤酒酵母 啤酒酵母是在工业应用广泛的菌种,它主要用于酿造啤酒、酒精、饮料和面包制造。在酶的生产方面用于转化酶、丙酮酸脱羧酶、醇脱氢酶等的生产。

(10) 假丝酵母 假丝酵母是单细胞蛋白的主要生产菌。在酶工程方面可用于生产脂肪酶、尿酸酶、尿囊素酶、醇脱氢酶。

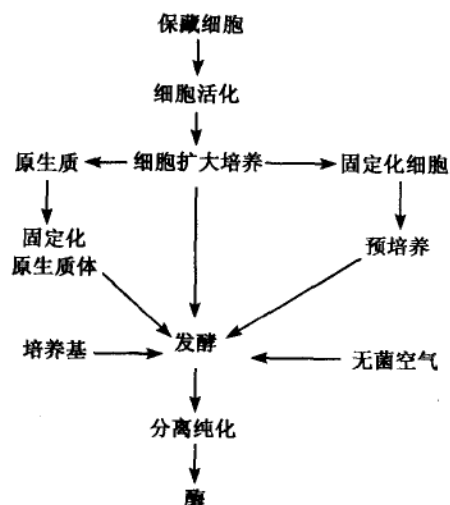


图 4-1 酶发酵生产工艺流程

2. 微生物酶的发酵生产

微生物酶的发酵生产是指在人工控制的条件下,有目的地利用微生物培养来生产所需的酶。包括培养基、发酵方式的选择及发酵工艺条件的控制管理等方面的内容(图 4-1)。

1) 细胞活化与扩大培养

为了保证产酶细胞的优良性能稳定性,一般在生产之前,都对菌种采用了妥善的保藏,即保藏菌种。在使用之前必须接于新鲜的斜面培养基上,在一定的条件下进行培养,以恢复细胞的生命活动能力,这就叫细胞活化。为了保证发酵时有足够数

量的优质细胞，活化了的细胞一般要经过一级至数级的扩大培养，而获得大量健壮、活力旺盛、产酶能力强的菌体细胞，以保证发酵正常生产。种子培养应采用氮源丰富，碳源可相对少些的培养基，并在适宜的温度、pH、溶解氧的供给条件下进行培养。一般培养至对数生长期，即可接入下一级扩大培养或接入发酵。

2) 培养基的配制

由于酶是蛋白质，酶的形成也是蛋白质的合成过程，因此在设计和配制培养基时，既要特别注意各种组分的种类和含量，有利于蛋白质的合成，从而调节适宜的 pH，也要注意有些微生物生长繁殖的营养与产酶的营养要求不同。要根据不同的阶段配制不同组分的培养基。但不管培养基的千差万别，一般包括碳源、氮源、无机盐和生长因素等几方面。

(1) 碳源 碳源指能够向细胞提供碳水化合物类的营养物。因为碳水化合物是构成细胞成分的主要元素，也是各种酶的主要组成成分。通常碳源同时也提供能源，是多种诱导酶的诱导物。不同的微生物要求碳源是不同的，这是由菌种自身的酶系决定的。在选择时应尽量选用对所需的酶有诱导作用的碳源，而不使用和少使用有分解代谢阻遏作用的碳源。目前在酶发酵生产中最常用的碳源是淀粉及其水解物，如糊精、麦芽糖、葡萄糖。

(2) 氮源 氮是组成细胞蛋白质和核酸的重要元素之一，也是酶分子的主要组成元素。氮源分为有机氮和无机氮，使用时应根据不同的细胞要求进行选择和配制。一般来说，微生物细胞中，异养型微生物用有机氮，自养型微生物用无机氮。此外，在使用量上要结合碳源的含量进行配比，即所谓碳氮比 (C/N)。不同的菌种或酶对培养基中的碳氮比要求不同，一般蛋白酶生产采用碳氮比较低的配比，淀粉酶要求的配比比蛋白酶略高。

(3) 无机盐 微生物在生产繁殖和代谢过程中都需要无机盐，无机盐提供多种金属和非金属离子，它们都是微生物生产所不可缺少，但需要量较少的营养物质。其对培养基的 pH、氧化还原电位和渗透压起调节作用。各种无机元素的功能各不相同：有些是细胞的主要组分，如磷、硫等；有些是酶的组分，如磷、硫、锌、钙等；有些是酶的激活剂或抵制剂，如钾、钙、镁、铁、铜、锰、钼、钴、氯、溴、碘等；有些则是对 pH、渗透压、氧化还原电位起调节作用，如钠、钾、钙、氯、磷等。因此，根据细胞对无机盐的要求量的大小可将无机盐分为主元素和微量元素两大类。主元素有：磷、硫、钾、镁、钙等；微量元素有铁、锰、铜、钴等元素，这些元素的需要量极微，一般天然原料中常已存在，不需另外加入。

(4) 生长因素 细胞生长中需要微量的维生素一类物质才能正常地生长繁殖，这类物质称为生长因素。包括某种氨基酸、维生素、嘌呤碱和嘧啶碱等。这些物质大都是许多辅酶或辅基的组分，对酶的生产很重要，在酶的发酵生产中，

通常在培养基中加进玉米浆、酵母膏等,以提供各种必需的生长因素,有时也加进纯化的生长因素,以供细胞生长繁殖的需要。

(5) 产酶促进剂 能显著增加酶的产量的某种少量物质称为产酶促进剂,这类物质多数属于酶的诱导物或表面活性剂,有些物质不仅是酶作用的底物或底物结构类似物而且是诱导物的前体物质。可供作产酶促进剂的物质有:吐温 80 (Tween80)、洗涤剂 LS (脂肪酰胺磺酸钠)、聚乙烯醇、糖脂、乙二胺四乙酸 (EDTA) 等。

(6) 阻遏物 多数工业用酶如淀粉酶、纤维素酶、蛋白酶等属于诱导酶,其生产过程受到代谢末端产物阻遏和分解代谢阻遏的调节。如葡萄糖等易利用的碳源,一旦在培养液中存在时,它会抑制代谢产物,抑制酶的合成。为了避免分解代谢阻遏,提高酶的产量,可采用难于利用的多糖类或聚多糖作为碳源,或用分次添加碳源(或限量添加)的办法,控制菌种的增殖速度。使培养液中碳源保持在不致引起分解代谢阻遏的浓度。

3. 酶发酵工艺条件的控制

在酶的生产过程中,发酵的工艺条件对产酶影响十分重要。为了提高产量,对发酵过程中参数控制是十分必要的,除培养基成分外,还包括温度、pH、通气搅拌、消泡沫、溶解氧等参数。可以通过调节和控制使微生物对酶的生物合成达到最佳状态。

1) pH 对酶生产的影响及其控制

发酵过程中的 pH 很重要,它对微生物生长繁殖和代谢产物的积累都有很大影响。不同的细胞生长繁殖的最适 pH 有所不同。大多数细菌的最适 pH 为 6.5~7.5,霉菌和酵母的最适 pH 为 3~6。酶生产的最适 pH 通常和酶反应的最适 pH 接近。因此生成碱性蛋白质酶的芽孢杆菌宜在碱性环境下培养,生产酸性蛋白酶应在酸性条件下培养。另外有些细胞可以同时产生多种酶,通过控制 pH 可以改变各种酶之间的产量比例。由于酶的生产受培养基 pH 的影响,培养基的 pH 和碳氮比密切相关,因此在酶生产过程中通过控制培养基的碳氮比来控制 pH,从而控制酶产量和各种酶之间的产量的比例。

酶生产的 pH 控制,一般根据酶生产所要求的 pH 确定培养基的碳氮比和初始 pH,在一定通气搅拌条件配合下,使培养过程的 pH 变化适合酶生产的要求。也可以通过使用缓冲溶液,或流加适宜的酸、碱溶液,以调节控制培养基中 pH 的变化。

2) 酶生产的温度控制

温度是影响微生物生长和代谢活动的主要因素。严格保持细胞生长繁殖和生命合成所需要的最适温度,对稳定发酵过程、缩短发酵周期、提高发酵单位和产

量具有很大的现实意义。一般情况,产酶温度低于生长温度。例如:酱油曲霉蛋白合成酶合成的最适温度为 20°C ,而其生长的最适温度为 40°C 。为此,温度的控制应根据不同的阶段进行调整,以利于细胞生长繁殖和酶的产生。温度控制的方法一般采用热水升温、冷水降温。故在发酵罐中,均需有足够的传热面积的热交换装置如排管、蛇管、夹套、喷淋管等。

3) 发酵过程中溶解氧与控制

产酶菌种一般为好氧微生物,发酵过程中必须提供大量的氧以满足细胞的生长繁殖和产酶的需要。如果氧供应不足,将影响微生物的生长发育和酶的产生。为提高氧气的溶解度,应对培养液加以通气和搅拌,但是通气和搅拌应适当,以能满足微生物对氧的需求为妥。一般通气量少对霉菌孢子萌发和菌丝生长有利,对酶生产不利。通气量大,则促进产酶而对菌丝生长不利。另外过度通气对有些酶如青霉素酰化酶的生产有明显的抑制作用,而且在剧烈搅拌和通气下容易引起酶蛋白发生变性失活。

4) 发酵过程的中间补料的控制

发酵产物常是微生物培养中期的代谢产物,培养前期是微生物的菌体增殖时期,一般不含或少含发酵产物,绝大部分发酵产物都在发酵中后期,特别是发酵产物的旺盛分泌期产生。要提高产量就必须设法延长中期,采用有效的措施就是进行中间补料工艺,即在发酵过程中补充某些营养物料,满足微生物的代谢活动和合成发酵产品的需要。通过实践证明该工艺对发酵单位的提高有重要作用,它促使微生物在培养中期的代谢活动受到控制,延长发酵产物的分泌期,推迟细胞的自溶期,维持较高的发酵产物的增长幅度,并增加发酵液的总体积,从而使单罐产量大幅度上升。中间补料内容大致有四个方面:①补充微生物碳源,如葡萄糖、玉米粉、废糖蜜等;②补充氮源,如玉米浆、尿素等有机氮和无机氮;③补充一些无机盐、微量元素或前体类物质;④补充全料和水。

4.3 酶的分离纯化

如果要使酶具有工业生产价值,就必须将酶从发酵液中或菌体中分离,并提取出来,制成一定纯度的产品,称为酶的提取。它是酶生产的下游技术。

4.3.1 酶提取的基本方法

(1) 破碎细胞 微生物酶有胞内酶和胞外酶两种。如果是胞内酶就必须将细胞从发酵液中分解出来,并进行破碎,使酶溶解到溶液中,细胞破碎的方法很多,归纳起来可分为:机械破碎法、物理破碎法、化学破碎法和酶学破碎法。如果是胞外酶,一般是通过过滤离心等方法除去发酵液中的悬浮固形物,再减压浓

缩到适当浓度。

(2) 溶剂抽提 大多数酶蛋白都可用稀酸、稀碱或稀盐溶液浸泡抽提,选用何种溶剂和抽提条件视酶的溶解性和稳定性而定,抽提时应注意溶剂种类、溶剂量、溶剂 pH 等的选择。

(3) 离心分离 离心分离是目前酶分离提纯中最常用的方法,主要用于发酵液中的菌体残渣、固形物杂质和悬浮固体物质或抽提过程中生成的沉淀物。在离心分离时,要根据欲分离物质以及杂质的大小、密度和特性的不同,选择适当的离心机、离心方法和离心条件。工业上常用板框压滤机来完成酶的粗分离。

(4) 酶液浓缩 发酵液或酶提液(特别是采用高效率的分离技术)中,酶浓度一般都比较低,必须经过浓缩才能进一步纯化(为了减少下游工程中试剂或溶剂的损耗),以便于保存、运输和应用。浓缩的方法很多。膜分离、沉淀、层析、吸附等都能起到浓缩作用。目前常用的有蒸发浓缩和超滤浓缩的方法,其效果比较好。

(5) 干燥 酶溶液或含水量高的酶制剂,即使置于低温下,也是极不稳定的,只能做短期的保存。为了便于酶制剂长时间的运输和贮藏,防止酶变性、变质,往往需要对酶进行干燥,制成含水量较低的制品。干燥的方法有:真空干燥、冷冻干燥、喷雾干燥、气流干燥和吸附干燥(图 4-2)。

4.3.2 酶提取过程的注意事项

在酶的提取过程中,为了提高提取率,并防止酶变性失活,必须注意如下几点:

(1) 温度 除少数耐热和低温敏感酶外,一般酶在 0°C 附近是较稳定的。所以为了防止酶的变性失活,提取时温度不宜高,尤其是在有机溶剂中或无机溶液中更应注意保持低温操作,一般温度控制在 $0\sim 10^{\circ}\text{C}$ 。然而有些酶可耐较高的温度如胃蛋白酶,即可在较高的温度下提取。原则是在不影响酶的稳定性的条件下,适当提高温度,这样可以提高酶的扩散速率,增加溶解度,有利于酶的提取和进一步的分离纯化。

(2) pH 大多数酶在中性附近($\text{pH}6\sim 8$)稳定。溶液的 pH 大于 9 或小于 5 时,往往会引起酶失活,要防止因调整溶液 pH 时添加酸、碱引起的局部过酸过碱。为了增加酶的溶解度,提取溶液的 pH 应该远离酶的等电点。

(3) 酶浓度 酶在低浓度下易失活,因此在操作中应注意酶浓度不宜太低。制备成固体或干粉更有利于保存。

(4) 搅拌 剧烈的搅拌和酶溶液表面形成的薄膜容易引起酶变性,因此要控制好搅拌速度,防止剧烈的搅拌引起的酶的变性。

(5) 添加保护剂 在酶提取过程,为了提高酶的稳定性,防止酶变性失活,可以加入适量的酶或其辅酶作用底物以及某些抗氧化剂等保护剂。

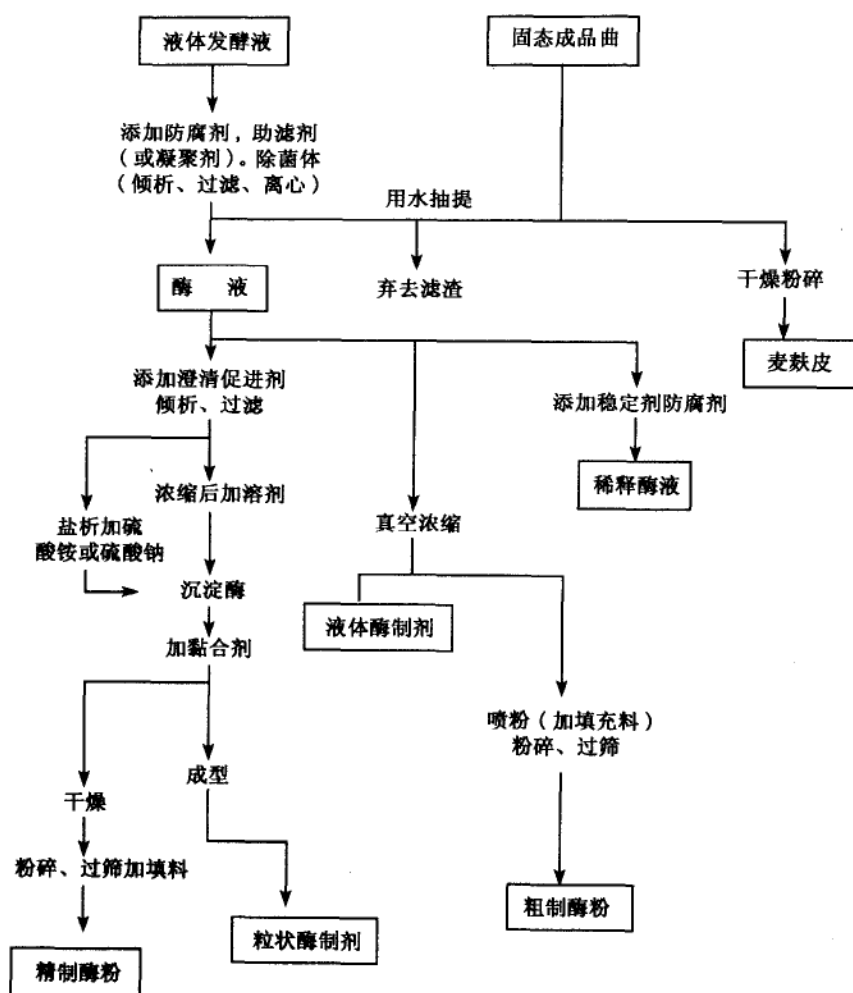


图 4-2 酶制剂提取工艺流程图

4.4 酶分子的修饰

4.4.1 酶分子修饰的目的

虽然酶已在工业、农业、医药和环保等方面得到了越来越多的应用，但总体而言，大规模应用酶和酶工艺的尚不多。原因之一是酶自身在应用上存在一些缺点。酶作为生物催化剂，具有催化效率高，专一性强和作用条件温和等显著的特点，但是另一方面，酶一旦离开生物细胞，离开其特定的作用环境条件，常变得不太稳定，不适合大量生产的需要；溶液中酸碱性偏离酶的活性范围，酶就难于发挥作用；另外绝大多数的酶对人体而言是外源蛋白质，具有抗原性，直接注入

会引起人体的过敏反应。鉴于以上的原因,人们通过各种方法使酶分子结构发生某些改变,从而改变酶的某些特性和功能,创造出天然酶不具备的某些优良性状,使其更能适应各方面的需要。具体目的有:①提高酶活力;②改进酶的稳定性;③允许酶在一个变化环境中起作用;④改变最适 pH 或温度,改变酶的特异性,使它能催化不同的底物的转化;⑤改变催化反应类型;⑥提高催化过程的反应效率。

4.4.2 酶分子修饰的方法

酶分子修饰技术不断发展,修饰方法多种多样,主要分为两大类,一类是通过分子修饰的方法来改变已分离出来的天然酶的结构。具体方法有:金属离子置换修饰、大分子结合修饰、肽链有限水解修饰等。另一类是通过生物工程方法改造酶分子的编码基因从而达到改造酶的目的。这种方法将在蛋白质工程中介绍。

1. 金属离子置换方法

通过改变酶分子中所含的金属离子,使酶的特性和功能发生改变的方法称为金属离子置换修饰。

有些酶中含有金属离子,这些金属离子往往是酶的活性中心组成部分,对酶的催化功能起着很重要的作用。如果从酶分子除去所含的金属离子,酶就会失去活性,若加入不同的金属离子,则使酶呈现不同的特性,有的使酶活性增加,有的使酶活性降低,甚至失活。如 α -淀粉酶的 Ca^{2+} 是它的活性离子,同时 α -淀粉酶也含有镁离子或锌离子,即为杂离子型。若把镁离子或锌离子换成钙离子,则可提高酶活力 3 倍以上,并增加酶的稳定性。因此在 α -淀粉酶生产保存中,常常添加一定量的钙离子,以提高和稳定 α -淀粉酶的活力。所以在进行金属置换时要注意选择适宜的金属作修饰剂,从而达到提高酶的活性,增加酶的稳定性。

离子置换修饰的过程:首先要加入一定量的金属螯合物(如乙二胺四乙酸简称 EDTA)到酶液中,使酶分子中的金属离子与 EDTA 形成螯合物,此时酶为无活性状态,然后通过分离手段将金属离子——EDTA 螯合物分离出来,然后将不同的金属离子加入酶液中,酶蛋白与金属离子结合从而达到置换的目的。操作中要注意选择适宜的金属离子作修饰剂,因为不同的离子经置换后将会出现不同的特性,有些修饰可以提高酶活性,有些修饰使酶活性降低,甚至无活性,有些修饰可提高酶的稳定性,所以,在修饰时要根据修饰的目的及酶的特性进行修饰操作。

2. 大分子结合修饰

利用水溶性大分子与酶结合,使酶的空间结构发生某些精细的改变,从而改

变酶的特性与功能的方法称为大分子结合修饰法,或为大分子结合法。该法是目前应用最广的酶分子修饰方法。经过大分子结合修饰可使酶的特性发生如下一些显著的变化:

1) 通过修饰可提高酶活力

酶的活性受诸多因素的影响,其本质是由特定的空间结构,特别是由其活性中心的特定构象所决定的。水溶性大分子与酶分子形成共价酶,使酶的空间结构发生某些改变,从而使酶活力中心更有利于和底物结合,并形成准确的催化部位,使酶活力得以提高。

2) 通过修饰增加酶的稳定性

酶在放置或使用一段时间后,由于受到各种因素的影响,原来完整的空间结构会逐渐受到破坏,致使酶活力逐步下降,最后完全丧失其催化功能。可见酶的性质是不稳定的,而且不同的酶其活性下降的速度是不同的,表现出不同的稳定性。对于酶的稳定性用半衰期来表示,酶的半衰期是指酶的活力降低到原来活力一半时所经过的时间。为了使酶的稳定性增加,延长半衰期,可采用大分子与酶结合,形成复合物,使酶的空间结构稳定。起到保护酶的天然构象作用,从而增加酶的稳定性。可以与酶结合的大分子种类很多,归纳起来分为2类,一类是不溶于水的大分子与酶结合制成固定化酶后,酶的稳定性大大提高。第二类是可溶于水的大分子与酶结合进行修饰。使酶的空间构象免受其他因素的影响,从而增加酶的稳定性,延长其半衰期。如超氧化物歧化酶(SOD)天然的半衰期只有6~30min,用水溶性大分子结合法修饰后,半衰期可延长70~300多倍(表4-1)。此外,通过大分子修饰后,酶的耐热性、抗酸碱性及抗氧化的能力都有所提高。

表 4-1 天然 SOD 与修饰后的 SOD 在人血浆中的半衰期

酶	半衰期
天然 SOD	6 min
右旋糖苷-SOD	7 h
聚乙二醇-SOD	35 h

3) 通过修饰可降低或消除抗原性

酶大多数是从动物、植物或微生物中获得的蛋白质,对于人体来说是一种外源蛋白。当外源蛋白自非经口进入人或动物体内后,往往就成为一种抗原,即引起体内产生抗体的物质,这时体内血清中就可能与此外源蛋白特异结合的物质,这些物质称为抗体。如果再次使用这种酶时,体内的抗体就会与作为抗原的酶结合为特异物质,而使酶失去其催化功能。为降低或消除这种现象,利用水溶性大分子对酶进行修饰,改变抗体或抗原的特定结构,使它们之间不再特异地结合,从而就有可能降低甚至消除抗原性。如精氨酸酶经聚乙二醇(PHEC)结合

修饰后,其抗原性显著降低。用聚乙二醇对色氨酸进行修饰,可完全消除其抗原性。常用的水溶大分子修饰剂有:右旋糖苷、聚乙二醇、肝素、蔗糖聚合物、聚氨基酸等。在使用这些大分子修饰以后,首先要进行活化,然后在一定条件下与酶分子以共价键结合,对酶分子进行修饰。

3. 肽链有限水解修饰

有些酶原来不显酶活性或酶分子活力不高,利用某些具有高度专一的蛋白酶,对它进行有限的水解修饰,除去一部分肽段或若干个氨基酸残基,就有利于活性中心与底物结合并形成准确的催化部位,从而显示出酶的催化活性或提高酶活力。这种利用肽链的有限水解,使酶的空间结构发生某些精细的改变,从而改变酶的特性和功能的方法,称为肽链有限水解修饰。例如:胰蛋白酶原不显酶活性,用蛋白酶进行修饰,除去其6个肽,此时就显示出胰蛋白酶的催化活性。此外通过有限水解修饰的方法不但具有提高酶活性的作用,而且还有在保持其酶活力的前提下,使酶的抗原性显著降低,甚至消失的作用。例如:木瓜蛋白酶用亮氨酸胺酶进行有限水解,除去2/3肽链后,该酶的活力保持不变,而抗原性却大大降低。在采用此方法时要注意使用专一性很强的蛋白酶或肽酶为修饰剂。同时也可采用其他方法使肽链部分水解达到修饰的目的。

4. 其他修饰方法

酶蛋白分子中存在一些氨基酸残基如:氨基、羟基、巯基、咪唑基、吡啶基、甲硫基等,这些基团为酶蛋白侧链基团,组成各种副键,对蛋白质空间结构及稳定性有影响,可以通过对这些侧链基团进行修饰,来达到改变酶的特性和功能的目的。这是对酶蛋白侧链基团的修饰方法。还有可以对酶蛋白中各种氨基酸进行修饰,将肽链上的某一个氨基酸进行置换,从而改变酶的某些特性和功能。这种方法称为氨基酸的置换修饰。这种方法与20世纪80年代发展起来的蛋白质工程相互联系,为氨基酸置换修饰提供了行之有效的可靠手段。

4.4.3 酶分子修饰的注意事项

酶分子修饰时是通过利用修饰剂与酶分子的化学、生化反应,从而达到改造酶分子的结构与功能。因此酶进行修饰时应注意如下几点:

- (1) 修饰剂的选择 要根据修饰的目的,选择适宜的修饰剂。
- (2) 酶性质的了解 应熟悉酶活性部位的情况、酶反应最适条件和稳定条件以及酶分子侧链基团的化学性质和反应活性等。
- (3) 反应条件的选择 在进行修饰时应必须仔细控制反应体系中酶与修饰剂的分子比例、反应温度、反应时间、盐浓度、pH等条件,使反应尽可能在酶稳

定的条件下进行反应,以得到酶与修饰剂高结合率及高酶活回率。

大多数酶经过修饰后,其性质会发生一些变化,如酶的热稳定、抗原性、半衰期、抗各类失活因子能力及最适 pH 等酶学性质。但并不是说酶修饰后以上这些性质都会得到改善,而应根据具体的目的选用特定的修饰方法,来改变酶的特性。

4.5 酶与细胞固定化

由细胞合成的酶是游离态的。它易变性、失活,随着反应时间的延长,反应速度下降,而且在催化结束后,难以回收。为了建立一个系统可以使酶得到回收或以某种方式重复使用,于是人们模仿人体酶的作用方式,将酶固定在一惰性的固体支撑物上实现这个目的。这就是固定化技术,它研究始于 20 世纪 50 年代,先后制成了羧肽酶、淀粉酶、胃蛋白酶、核糖核酸酶等固定化酶,并在 20 世纪 60 年代后期实现固定化酶的工业生产的应用。此后,固定化技术迅速发展,先后出现了固定化细胞技术、固定化原生质体技术,近年来,人们又提出了联合固定化技术,它是酶和细胞固定化技术发展的综合产物。这些技术可以代替游离细胞进行酶的发酵生产,具有提高产酶率,缩短发酵周期等优点,在酶的发酵生产中有广阔的发展前景。

4.5.1 酶和菌体固定化

将酶与水不溶性的载体结合,制备固定化酶的过程称为酶的固定化。固定在载体上并在一定的空间内进行催化反应的酶称为固定化酶。

1. 制备固定化酶的依据

酶是蛋白质,它的催化活力和它的空间结构紧密有关,这些空间结构一旦改变,它就失去了催化活力,由于酶具有这一特性,所以制备固定化酶须遵守下列原则:

- (1) 固定化酶必须能保持酶原有的专一性、高效催化力和在常温常压下能起催化反应等特点。
- (2) 固定化酶应能回收、贮藏、利于反复使用。
- (3) 固定化酶应用于连续化、自动化的操作,且载体应具有一定的机械强度。
- (4) 固定化酶应能最大程度与底物接近,从而提高产物的产量,制备固定化酶时所选载体应尽可能地不阻碍酶和底物的接近,即有最小的空间位阻。
- (5) 固定化酶应能保持甚至超过原有酶液的活性。
- (6) 固定化酶应有最大的稳定性。

(7) 固定化酶应易与产物分离, 即能通过简单的过滤或离心就可回收和重复使用。

2. 酶和菌体固定化的制备方法

固定化酶的制备方法很多, 主要有吸附法、包埋法、结合法、交联法和热处理法等。如图 4-3。

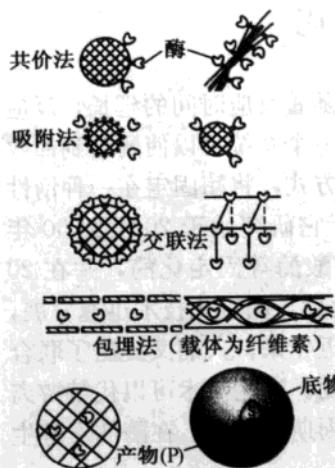


图 4-3 固定酶模式图

(1) 吸附法 吸附法制备固定化酶是利用固体吸附剂将酶分子或菌体吸附在其表面上而使酶固定化的方法。该法操作简单、条件温和, 不会引起酶变性失活, 载体廉价易得, 而且可以反复使用。但由于靠物理吸附作用, 结合较弱, 酶与载体结合不牢固而易脱落, 故生产上用得不多。常用的吸附剂有活性炭、氧化铝、硅藻土、多孔陶瓷、多孔玻璃、硅胶和羟基磷灰石。

(2) 结合法 这是一种让酶通过化学反应以共价键或离子键与载体结合在一起的固定化方法。根据酶与载体结合的化学键不同, 结合法可分为离子键结合法和共价键结合法两种。离子键结合法是通过离子键与载体结合的固定化方法, 所用的载体是某些不溶于水的离子交换剂。常用的有

DEAE-纤维素、TEAE-纤维素、DEAE-葡聚糖凝胶等。共价键结合法是通过共价键将酶与载体结合的固定化方法。所用的载体主要有: 琼脂糖凝胶、纤维素、葡聚糖凝胶、甲壳质、氨基酸共聚物、甲基丙烯酸共聚物等。

(3) 交联法 在这种方法中, 酶依靠双功能团试剂造成分子间交联而成为网状结构。常用的双功能团试剂有戊二醛、顺丁烯二酸酐等。酶蛋白分子中的氨基、酚基、咪唑基及巯基均可参加交联反应。交联法制备的固定化酶或固定化菌体结合牢固, 可以长时间使用, 但反应条件比较激烈, 固定化酶的回收率比较低, 一般不单独使用。

(4) 包埋法 包埋法是将酶包埋在凝胶网格中或半透膜微型胶囊中的一种方法。利用此法制得的固定化酶、酶蛋白几乎不起变化, 可适用多种不溶酶的制备, 酶的回收率较高。缺点是酶被包埋在内部, 对大分子底物难以发生催化作用。因此它仅用于小分子底物和产物的酶。

(5) 热处理法 用加热方法将酶直接固定在菌体内此法仅适用于耐热性的酶。加热的温度和时间要控制好以防酶失活。

常用的几种方法优缺点见表 4-2。

表 4-2 固定化酶的制法和特点

方法 项目特点	物理吸附法	载体偶联法		交联法	包埋法	
		共价键法	离子键法		格子法	多微型胶囊法
制备难易性	简单	繁杂	简单	繁杂	繁杂	繁杂
酶活性	低	低	高	低	低	低
结合力	弱	强	弱	强	强	强
再生	可能	不可能	可能	不可能	不可能	不可能

3. 固定化酶的性质

将酶或含酶菌体固定化后制得固定化酶或固定化菌体,即从游离态转变为结合态,酶分子处于一个游离态完全不同的微环境中,微环境的特殊性质会影响酶原有的性质。因此在应用固定化酶过程中,应该了解酶性质的变化,并对操作条件加以适当的调整。现将固定化酶的一些主要性质介绍如下:

(1) 酶稳定性提高 大多数酶经固定化后,其稳定性都有所提高,对于实际应用是十分有利的。主要表现在:①对热的稳定性提高,可以耐受较高的温度;②贮藏稳定性好,可以在一定条件下保存较长的时间;③对蛋白酶水解作用稳定性增加,不易被蛋白酶水解;④对变性剂的耐受性提高,在各种有机试剂、盐酸胍、尿素等蛋白质变性剂的作用下,仍可保留较高的酶活力等。

(2) 最适温度 固定化酶作用的最适温度一般都比天然酶高一些。这是非常有利的结果,如色氨酸经共价结合法固定后,最适温度比游离酶高 5~15℃。

(3) 最适 pH 的变化 酶经固定后,其作用的最适 pH 大多有所变化。影响固定化酶最适 pH 的因素主要有:一个是载体的带电性质,另一个是酶催化反应产物的性质。一般地说,当酶靠近正电荷固定在支撑物上时,常见最适 pH 向低值漂移(即向酸性一侧移动),当用带负电荷的载体制备的固定化酶,其最适 pH 向偏碱方向偏移;而用不带电荷的载体制备的固定化酶,其最适 pH 一般不改变(有时也会有所改变),这种现象不是由于载体的带电性质所引起的,而被认为是由于反应混合物中体系相和环境相中质子分布的变化引起的。嵌在载体当中的固定化酶,当其作用于底物而产生酸性物质时,固定化酶的最适 pH 比游离酶的最适 pH 高一些;产物为碱性时,固定化酶的最适 pH 要比游离酶的最适 pH 低一些;产物为中性时,最适 pH 一般不改变。这是由于固定化载体为扩散障碍使反应向外扩散受到一定的限制所造成的。

(4) 底物特异性 固定化酶的底物特异性与游离酶比较可能有些不同,其变化与底物相对分子质量的大小有一定关系。一般来说,作用于小分子底物的酶类经固定化后,其底物特异性没有明显变化。但是对于那些可作用大分子底物,又可作用小分子底物的酶而言,固定化酶的底物特异性往往会发生变化。引起变化

的原因是由于载体的空间位阻作用引起的。酶固定在载体上以后,使大分子底物难以接近酶分子,而使催化速度大大降低,而相对分子质量小的底物受空间位阻作用小,故与游离酶的作用没有显著不同。

4.5.2 固定化细胞

通过各种方法将细胞与水不溶性的载体结合,制备固定化细胞的过程称为细胞固定化。固定在载体上并在一定的空间范围内进行生命活动的细胞称为固定化细胞。固定化细胞能进行正常的生长、繁殖和新陈代谢,所以又称固定化活细胞或固定化增殖细胞。该方法免去了破碎细胞提取酶等步骤,直接利用细胞内的酶,因而固定后酶活基本没有损失。此外,由于保留了胞内原有的多酶系统,对于多步催化转换的反应,优势更加明显,而且无需辅酶的再生。

固定化细胞的制备方法大体上与固定化酶的制备方法相同,常用的为吸附法和包埋法两大类。

(1) 吸附法 很多细胞都具有吸附到固体物质表面,或其他细胞表面的能力。依靠这种吸附能力使细胞吸附在载体的表面而使细胞固定在载体上的方法称为吸附法。在吸附法制备中常用的吸附剂有:硅藻土、多孔玻璃、陶瓷、塑料、中空纤维和金属丝网等。这些载体都是多孔性物质。如酵母菌带有负电荷,在pH 3~5的条件下,能够吸附在多孔陶瓷或多孔塑料等载体的表面,制成固定化细胞,用于酒精和啤酒的发酵生产。用吸附法制备固定化细胞所需条件温和,操作简便,对细胞生长、繁殖和新陈代谢没有明显影响。但吸附力较弱,细胞吸附不牢,易脱落。它是制备固定化动物细胞的主要方法。

(2) 包埋法 将细胞包埋多孔载体内部而制定固定化细胞的方法称为包埋法。包埋法可分为凝胶包埋法、纤维包埋法和微胶囊法。其中凝胶包埋法是应用最广泛的细胞固定化方法。它是以各种多孔凝胶为载体,将细胞包埋在凝胶的微孔内而使细胞固定的方法。此法的优点是能较好地保持细胞内的多酶反应系统的活力。可以像游离细胞那样进行发酵生产。凝胶包埋法使用的载体主要有琼脂、海藻酸钙凝胶、角叉菜胶、明胶、聚丙烯酰胺凝胶和光交联树脂等。以聚丙烯酰胺凝胶包埋法为例其制备过程为:先配制一定浓度的丙烯酰胺和甲叉双丙烯酰胺的溶液与一定浓度的细胞悬浮液混合均匀,然后加入一定量的过硫酸钙和四甲基乙二胺(TEMED),混合后让其静置聚合,获得所需形状的固定化细胞胶粒。这种方法广泛地用于生产L-苹果酸、L-色氨酸、L-赖氨酸、 α -淀粉酶、甾体激素等各种代谢产物。

4.5.3 原生质固定化

由于固定化细胞具有可以取代游离细胞进行发酵,生产各种有用物质等众多

优点,因此发展非常迅速,然而人们在使用中发现其存在一些缺点。如固定化细胞只能用于生产胞外酶和其他能够分泌到细胞外的产物,而且由于载体的影响,使营养物质和产物的扩散受到一定的限制,特别是在好氧发酵中,溶解氧的传递和输送成为关键性的限制因素,为了解决这样的问题,人们从不同的角度进行研究,发现细胞壁是对物质扩散的障碍原因之一,因此就产生了原生质体固定化的技术。对微生物细胞和植物细胞进行处理,除去细胞壁就可获得原生质体,原生质体很不稳定,容易破裂,若将它包埋起来制成固定化原生质体,由于有载体的保护作用,原生质体的稳定性大大提高。而且排除细胞壁的阻碍作用,从而克服了固定化细胞的缺点,有利于反应进行。

固定化原生质的制备分为原生质体的制备和原生质体固定化两个阶段。

1. 原生质体的制备

原生质体是被细胞壁包围起来的,要进行原生质体固定化,必须将微生物细胞和植物细胞的细胞壁破坏分离出原生质体。由于各类细胞的细胞壁的组成、结构和性质不同,因此制备原生质体的方法有所不同。一般制备时都是采用对数生长期的细胞,其过程是:首先将对数生长期细胞收集起来,放在含有渗透压稳定剂的高渗缓冲液中,然后加入适量的细胞壁水解酶,在一定的条件下,进行作用,使细胞壁破坏,然后对混合液进行分离,除去细胞壁碎片、未作用的细胞以及细胞壁水解酶,得到原生质体。抽取原生质体时应注意几点:①破坏细胞壁时不能影响到细胞膜的完整性及细胞内部的结构,因此只能使用对细胞壁有作用的专一性酶。②选用分解酶时,应根据不同来源的细胞而选用不同的酶。如酵母的细胞壁由 β -葡聚糖构成,故应采用 β -1,6-葡聚糖酶,植物细胞壁由纤维素、半纤维素和果胶质组成故应采用纤维素酶和果胶酶进行水解。③制备原生质体的细胞应选择对数生长期的细胞,因为此阶段的细胞处于生长旺盛期,细胞健壮,这样可以获得较高的原生质体形成率。④在制备中为防止制备得到的原生质体破裂,应加入适当的渗透压稳定剂如无机盐、糖类、糖醇等化合物。

2. 原生质体固定化

将通过上述步骤制备好的原生质体,重新悬浮在含有渗透压稳定剂的缓冲液中配成一定浓度的原生质体悬浮液,然后采用一定的方法将它制成固定化原生质体。固定原生质体的方法一般是采用凝胶包埋法。常用的有:琼脂凝胶、海藻酸钙凝胶、角叉菜酸和光交联树脂等方法。例如:海藻酸钙凝胶固定化法的操作过程:用含有渗透压稳定剂的缓冲溶液配制一定浓度的(3%~6%)海藻酸钠溶液,与等体积的一定浓度的原生质体悬浮液混合均匀,将此混悬浮液用滴管或注

射器滴到一定浓度的氯化钙溶液中,浸泡 1~2h,制成直径为 1~4mm 的球状固定化原生质体。

3. 固定化原生质体的特性及应用

原生质体经固定化制成固定化原生质体后,仍然保持了原生质体的新陈代谢的特性,可以照常产生各种代谢产物,而且除去了细胞壁的扩散屏障,更有利于生产而获得大量的发酵产物。在使用中固定化原生质体具有如下特点:

(1) 可显著提高产率 由于除去了细胞壁扩散屏障,有利于胞内物质不断分泌到胞外,有利于氧气和营养物质的传递和吸收,这样加快反应速度。

(2) 有利于连续生产、延长保存时间 由于有载体的保护作用,因此具有较好的操作稳定性和较长的保存时间,可以连续反复使用较长时间,利于连续化生产。

(3) 提高产品质量 固定化原生质体易于和发酵产物分开,有利于产物的分离和纯化,从而提高产品质量。

固定化原生质体目前主要用在各种氨基酸、酶和生物碱等物质的生产及甾体转化等产品的生产中。

4.6 酶 反 应 器

4.6.1 酶反应器的特点

以酶作为催化剂进行反应所需的设备称为酶反应器。其作用是以尽可能低的成本,按一定的速度由规定的反应物制备特定的产物。酶反应器的特点是:在低温、低压的条件下发挥作用,反应时耗能和产能也比较少。它不同于发酵反应器,因为它不表现自催化方式,即细胞的连续再生。但是酶反应器和其他反应器一样,都是根据产率和专一性来进行评价的。

4.6.2 酶反应器的基本类型和特征

酶反应器有两种类型:一类是直接应用游离酶进行反应即均相酶反应器。另一类是应用固定酶进行的非均相酶反应器。均相酶反应能在分批式反应器或超滤膜反应器中进行,而非均相酶反应则可在多种反应器进行。酶反应器的种类很多如图 4-4,应用时大致可根据催化剂的形状来选用。如粒状催化剂可采用搅拌罐、固定化床和鼓泡塔式反应器。而细小颗粒的催化剂则宜选用流化床,对于膜状催化剂,则可考虑采用螺旋式、转盘式、平板式、空心管式膜反应器。各反应器形式及其特征如表 4-3。

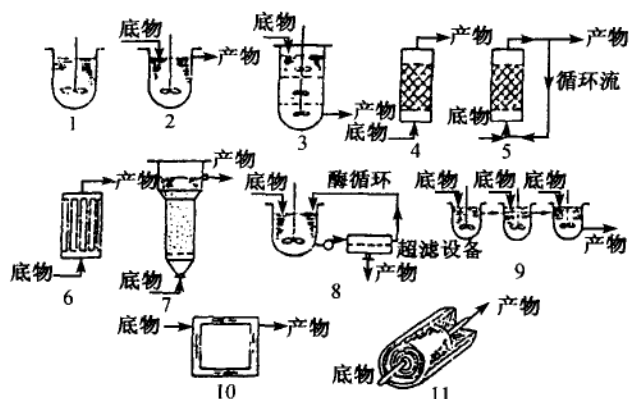


图 4-4 酶反应器的类型

1. 间歇式搅拌罐；2. 连续式搅拌罐；3. 多级连续搅拌罐；4. 填充床；5. 带循环的固定床；
6. 列管式固定床；7. 流化床；8. 搅拌罐-超滤器联合装置；9. 多釜串联半连续操作；
10. 环流反应器；11. 螺旋卷式生物膜反应器

表 4-3 各反应器形式及其特征

均相酶反应器	形式名称	适用的操作方式	特 征
固 定 化 酶	搅拌罐	分批、半连续	反应器内的溶液用搅拌器机械混合
	超滤膜反应器	分批、半连续 连续	采用如透析膜、超滤膜、中空纤维等，只允许低分子化合物而酶不能通过的膜反应器，适用于大分子底物
	搅拌罐	分批、半连续、 连续	用搅拌器搅拌，固定化酶或固定化微生物粒子悬浮在溶液中，粒子保留在槽内
	固定床或填充床	连续	最广泛使用的固定化酶及固定化反应器，把固定化酶或固定化微生物粒子（粒径 $100\mu\text{m}$ 至若干毫米）填充在塔内底物溶液一般是由下向上通入
	膜反应器	连续	膜状或者片状的固定化酶或固定化微生物反应器，其组件形式有螺旋板反应器、旋转圆盘型、平板型等
	流化床	分批、连续	靠溶液的流动促进固定化酶或固定化微生物粒子在床内激烈搅动、混合
	鼓泡塔	分批、连续 半连续	悬浮在鼓泡塔中，粒子保留塔内，适用于有气体（特别 O_2 ）参加的反应

总之在选用酶反应器形式时，必须综合考虑各种因素。具体有：

- (1) 催化剂的形状和大小；
- (2) 催化剂的机械强度和相对密度；
- (3) 反应操作的要求（如 pH 是否可控制）
- (4) 对付杂菌污染的措施；
- (5) 反应动力学方程的类型；

- (6) 底物(溶液)的性质;
- (7) 催化剂的再生、更换的难易;
- (8) 反应器内液体的塔存量与催化剂表面积之比;
- (9) 传质特性;
- (10) 反应器制造成本和运动成本。

4.7 酶的应用

随着酶工业生产的发展,酶已在工业、农业、医药、环保等领域中广泛应用,成为人类生活中不可缺少的一部分,人们的衣、食、住、行及其他方面的新技术几乎都离不开酶。下面仅从几个方面对酶的应用进行简要说明。

4.7.1 酶在酿造、食品工业中的应用技术

目前国内外最广泛使用酶的领域是在食品、酿酒等部门。其主要的應用如表4-4所示。

表 4-4 酶在轻工、食品中的应用

酶 名	来 源	主 要 用 途
α -淀粉酶	枯草杆菌、米曲霉、黑曲霉	发酵原料淀粉液化,制造葡萄糖、饴糖、果葡糖浆,纺织退浆
β -淀粉酶	麦芽、巨大芽孢杆菌	制造麦芽、啤酒酿造
异淀粉酶	气杆菌、假单胞杆菌	制造直链淀粉、麦芽糖
糖化酶	黑曲霉、根霉、红曲霉	制造葡萄糖、发酵原料淀粉糖化
蛋白酶	胰脏、木瓜、枯草杆菌	水解蛋白、啤酒澄清、皮革加工
果胶酶	霉菌	果汁、果酒的澄清
柑苷酶	黑曲霉、青霉	水果加工、去除橘汁苦味
纤维素酶	木霉、青霉	食品、发酵、饲料加工
核苷磷酸化酶	酵母菌	生产 ATP
色氨酸合成酶	细菌	生产色氨酸

1. 外加酶制剂啤酒生产

啤酒以其特有的“麦芽的香味、细腻的泡沫、酒花的苦涩、透明的酒质”为人们所喜爱。为了进一步提高质量、降低成本,采用补充外加酶,来弥补麦芽中的酶。

从而达到此目的。具体生产过程如下:

1) 工艺流程(图 4-5)

在该工艺中,酶制剂的使用贯穿在生产的全过程之中,并且操作简便、效益

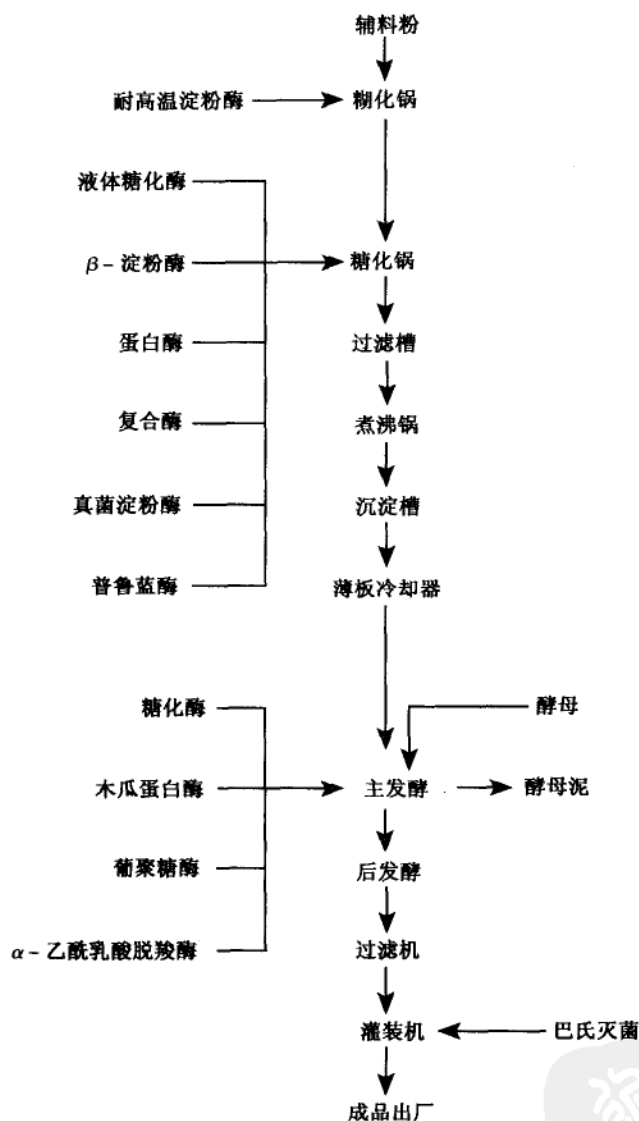


图 4-5 外加酶制剂啤酒生产工艺流程图

高。耐高温 α -淀粉酶应用在糊化时，可达到无麦芽糊化，使辅料比增加，酒质清淡爽口。采用液体糖化酶或 β -淀粉酶协同麦芽糖化，可以弥补麦芽质量差，提高发酵度。为了增加 α -氨基酸氮，可以在发酵前加蛋白酶。为了加快过滤速度，可以加 β -葡聚糖酶。防止啤酒混浊可以在发酵中添加蛋白酶。表 4-5 列出了啤酒酿造中使用的主要酶制剂。

表 4-5 啤酒酿造中使用的主要酶制剂

种 类	产 生 菌	功 用
α -淀粉酶 耐高温 α -淀粉酶	枯草芽孢菌 解淀粉芽孢杆菌 地衣芽孢杆菌	用于辅料液化
糖化酶	黑曲霉 米曲霉	生产干啤酒、增加可发酵性糖
蛋白酶	黑曲霉 枯草芽孢菌 栖土曲霉	增加 α -氨基酸, 防止啤酒混浊, 改善麦芽质量, 加快过滤速度
普鲁蓝酶	嗜酸芽孢杆菌 产气气杆菌	切割淀粉支链, 增加出糖
β -葡聚糖酶	枯草芽孢杆菌 地衣芽孢杆菌	改善过滤速度
α -乙酰乳酸脱羧酶	枯草芽孢杆菌	减少双乙酰含量
纤维素酶	绿色木霉	增加出糖
β -淀粉酶	植物提取	增加可发酵性糖

2) 注意事项

在使用外加酶生产啤酒时应正确选择酶制剂, 合理使用酶制剂, 使酶制剂发挥最大的功效, 因此应注意如下几点:

- (1) 必须针对性地选择合适酶制剂, 以弥补麦芽质量最差状况。
- (2) 应使用高质量酶制剂, 防止染菌。因啤酒为酿造酒添加的酶必须符合食品卫生标准, 并且在使用过程中严格控制用量, 注意灭菌操作。
- (3) 操作工艺应根据酶制剂的特性进行调整, 应在最适的工艺条件下 (pH、温度、用量) 进行生产, 使酶发挥最大效能。

(4) 正确使用酶制剂, 严格控制酶用量。酶用量不当, 效果不佳, 如在糊化时加高温淀粉酶, 用量少, 会产生煮沸溢料, 用量太多, 造成浪费。因此用量必须适当, 操作方法必须正确。总之在使用各种酶的过程中, 必须保证一定条件下的作用时间, 确保酶分子与作用物的接触和反应时间, 从而达到添加酶的作用效果。作用时间与酶量多少相关, 加酶量多, 相对来说作用时间可以缩短, 加酶量少, 则作用时间延长。

2. 果葡糖浆的生产

果葡糖浆是由葡萄糖异构酶催化葡萄糖异构化生成部分果糖而得到的葡萄糖与果糖的混合糖浆。从营养角度上讲接近于蔗糖, 被广泛地应用在可乐一类饮料中。目前国内外大都采用固定化葡萄糖异构酶进行连续化生产。

1) 工艺流程 (见图 4-6)

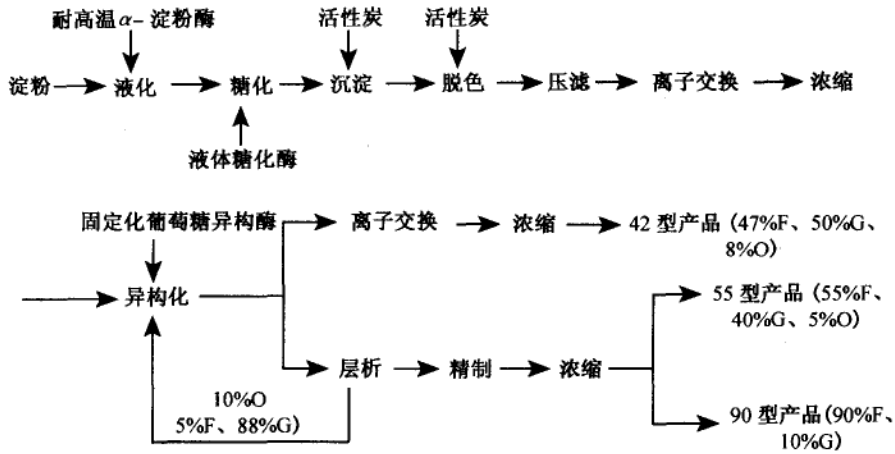


图 4-6 果葡糖浆生产工艺流程图

2) 生产工艺过程

(1) 葡萄糖的制备 生产果葡糖浆原料是纯度高的葡萄糖溶液，以“双酶法”所制得的葡萄糖溶液为最好。“双酶法”生产葡萄糖的过程为：淀粉原料经粉碎加水制得浓度为 $17 \sim 18^\circ \text{Bé}$ 的粉浆，经 α -淀粉酶液化，再经糖化酶糖化得到浓度为 30% 左右糖化液。通过脱色、离子交换、等方法分离纯化，并经浓缩得 $40\% \sim 45\%$ 的葡萄糖液。葡萄糖浆的质量标准：透光率 $> 90\%$ ，葡萄糖值 $> 90\%$ ，色泽为淡黄色。

(2) 葡萄糖异构化 葡萄糖异构化所用的葡萄糖异构酶在工业上常采用链霉菌属菌株生产，该酶为胞内酶，常直接将菌体制成固定化，成为具有一定强度的颗粒状的酶，在柱内充填。生产中一般采用 4 个柱串联，分成两组连续串流进行催化。葡萄糖异构化时，先将精制葡萄糖调节 pH 为 $6.5 \sim 7.0$ ，加 0.01 mol 的硫化镁，让葡萄糖液在 60°C 的恒温下，从上而下连续通过柱子获得转化糖液。葡萄糖从柱内通过的速度和时间是影响流出糖液内果糖含量的决定因素。流速太快，会使果糖含量降低，太慢会影响产量。为了最有效地利用葡萄糖异构酶，延长葡萄糖异构酶的使用周期，一般将流出糖液内的果糖含量按干物质计控制在 42% 。葡萄糖液通过异构转化成果糖、葡萄糖混合糖浆后，即可进行脱色、离子交换，并经真空浓缩，将糖浆缩到 70% 以上，即为果葡糖浆。

3) 葡萄糖异构酶的更换

糖液源源不断地流到柱子中进行催化，受到反应液中各种因素，包括温度、pH 等的影响而使酶的活力不断钝化，催化效果越来越小；另外固定化葡萄糖异构酶在糖过程中也会因受压冲击等因素发生破碎，强度下降等物理性损伤，造成柱子体积及中间间隔变小。受这两方面的影响，葡萄糖液在柱内的通过速度会越来越

低,当酶活只有 25%以下时,即到原酶的第二个半衰期,就应停止使用,换新酶。

4.7.2 酶在医药方面的应用

酶有医药领域的用途很广,主要体现在:①用酶进行疾病的诊断;②用酶治疗各种疾病;③用酶制造各种药物。随着酶分子修饰和酶固定化等酶技术的发展,将会不断扩大酶在医药方面的应用。主要医药用酶如表 4-6。

表 4-6 主要医药用酶

酶 名	来 源	用 途
淀粉酶	胰脏、麦芽、微生物	治疗消化不良,食欲不振
蛋白酶	胰脏、植物、微生物、胃	治疗消化不良,食欲不振,消炎,消肿,促进创伤愈合,降低血压,制造水解蛋白质
溶菌酶	蛋清、细菌	治疗手术性出血,消炎,镇痛,增加放射线疗效
链激酶	链球菌	治疗心肌梗塞,结膜下出血
L-天冬酰胺酶	大肠杆菌	治疗血病
11- β -羟化酶	霉菌	制造氢化可的松
L-酪氨酸转氨酶	细菌	制造多巴(L-二羟苯丙氨酸)
尿酸酶	牛肾	测尿酸含量,治疗痛风
L-精氨酸酶	微生物	抗癌

由于酶具有高度的灵敏性与专一性的催化特点,在医学疾病诊断上成为了一种简单、快捷、灵敏的诊断方法,特别是应用固定化制造的各种酶试纸是家庭“诊断盒”重要工具,发展前景十分可观。用酶诊断疾病包括两个方面,一是根据体内原有酶活力的变化来诊断某些疾病;二是利用酶来测定体内某些物质的含量从而诊断某些疾病。

(1) 根据体内酶活力的变化诊断疾病 用酶测定体内酶活力的变化情况诊断疾病的原理是:一般健康人体内含有的某些酶的量是恒定在某一范围的,若出现某些疾病,则体液内的某种或某些酶活力将会发生相应的变化,根据酶在体液内所处部位及作用和酶的变化情况从而诊断出某些疾病(表 4-7)。

表 4-7 酶在疾病诊断方面的应用

酶	疾病与酶活力变化
淀粉酶	胰脏疾病、肾脏疾病时,活力升高,肝病时,活力下降
胆碱酯酶	肝病时,活力下降
酸性磷酸酶	前列腺病、肝炎、红血球病变时,活力升高
碱性磷酸酶	佝偻病、软骨化病、甲状旁腺机能亢进时,活力升高
谷丙转氨酶	肝炎等肝病、心肌梗塞等时,活力升高
胃蛋白酶	胃癌时,活力升高,十二指肠溃疡时,活力下降
醛缩酶	癌症、肝病、心肌梗塞时,活力升高
碳酸酐酶	坏血病、贫血等时,活力升高
乳酸脱氢酶	癌症、肝病、心肌梗塞时,活力升高

如转氨酶：血清中谷转氨酶（GPHT）和谷草转氨酶（GOT）的活力测定，是肝脏疾病和心肌梗塞等疾病的诊断指标之一，如急性传染性肝炎、肝硬化和阻塞性黄疸肝炎的患者，其血清中 GOT 和 GPHT 的活力升高，尤其是急性传染性肝炎患者 GOT 和 GPHT 的活力急剧升高。当测定其血清的 GOT、GPH 很高时，再结合其他指标即可作出诊断。

另外， β -葡萄糖醛缩酶、胃蛋白酶、乳酸脱氢酶等的活力测定，有助于对某些癌症做出诊断。

（2）用酶测定体液中某些物质的量诊断疾病 利用酶专一性强、催化效率高的特点，来测定体液中某些物质的含量，从而达到诊断某些疾病的目的。如：糖尿病的诊断，糖尿病患者的血液或尿液是葡萄糖的含量高，利用葡萄糖氧化酶和过氧化氢酶的联合作用，检测患者的血液和尿液的葡萄糖含量，从而作为糖尿病临床诊断的依据。目前已将这两种酶制成固定化酶试纸或酶电极，这样十分方便地用于临床检测；用固定化尿酸酶测定血液中尿酸的含量来诊断痛风病。目前酶标免疫测定在疾病诊断方面的应用越来越多。酶标免疫测定是先把酶与某种抗体或抗原结合，制成酶标记的抗体或抗原。然后将酶标抗体（或酶标抗原）与待测定的抗原（抗体）结合，再借助于酶的催化特性进行定量测定，测出酶-抗体-抗原结合物中的酶的含量，就可计算出欲测定的抗体或抗原的含量。然后根据抗体或抗原的量就可做出某些疾病的诊断。常用的标记酶有碱性磷酸酶和过氧化物酶等。利用酶标免疫测定可诊断的疾病有：疟疾、麻疹、乙型肝炎等疾病，随着细胞工程的发展，现已生产出各种单克隆抗体，为酶标免疫测定带来极大的方便和广阔的应用前景。

4.7.3 酶在疾病治疗方面的应用

酶可以作为医物治疗各种各样的疾病，而且具有疗效显著，副作用小的特点。

（1）蛋白酶 蛋白酶是催化肽键水解的一类酶，它在临床上使用最早、用途最广的一种药用酶之一。主要作用为：①消化剂：利用蛋白酶水解蛋白质为氨基酸和多肽，达到消化作用，用于治疗消化不良和食欲不振的患者，使用时可与淀粉酶、脂肪酶等制成复合制剂，以增加疗效。②作为消炎剂：利用蛋白酶分解一些蛋白质和多肽，使炎症部位的坏死组织溶解，增加组织的通透性，抑制浮肿，促进病灶附近组织液的排出并抑制肉芽的形成，从而达到消炎作用。使用时可以口服、局部外敷或肌肉注射等。

（2）超氧化歧化酶（SOD）超氧歧化酶催化作用是：催化超氧负离子（ O_2^- ）进行氧化还原反应，使机体免遭 O_2^- 的损害。它具有抗辐射作用，对红斑狼疮、皮炎、结肠炎等疾病有显著疗效。并且不管用任何给药方法，无任何明显的副

作用,也不会产生抗原性。是一种多功能低毒性的药用酶。

(3) 溶菌酶 溶菌酶作用于细菌的细胞壁,可使病原菌、腐败性细菌等溶解死灭,对抗生素有耐药性的细菌同样起溶菌作用,具有抗菌、消炎、镇痛的作用,而对人体副作用小的一种药用酶。它与抗生素联合使用,可显著提高抗生素的疗效,是一种应用很广的药用酶。

本章小结

酶工程是酶的开发生产和应用的一门高技术学科,本章节主要介绍的内容有:

- (1) 酶的基本概念:酶的定义、特性及发展前景。
- (2) 酶的发酵法生产的基本内容和基本原理,重点介绍了酶生产常用的微生物、生产的方法及酶分离纯化方法。
- (3) 酶分子的修饰目的、修饰的方法。重点了解通过修饰后的酶所改变的特性。
- (4) 酶的固定化技术:固定化的方法和特点、固定化酶的特性。
- (5) 酶的应用:酶工程在食品、轻工、医药等领域的应用实例。

复习思考题

1. 名词解释:酶、底物、固定化酶、固定化细胞、酶的修饰、抑制剂。
2. 什么是酶工程?有哪些应用前景?
3. 酶发酵生产对微生物有何要求?常用于酶生产的菌种有何特性?
4. 影响酶发酵的工艺条件有哪些?如何控制?
5. 酶的分离提取方法有哪些?提取过程应注意的事项?
6. 酶固定化方法有哪些?各有什么优缺点?
7. 简述果葡糖浆的生产过程?
8. 说明啤酒外加酶的作用?
9. 酶在医学上有哪些作用?举例说明。
10. 酶在食品工业有哪些作用?举例说明。
11. 酶产品可分为哪几个阶段?各有什么特点?



第 5 章

细胞工程

5.1 细胞工程概念及内容

5.1.1 细胞工程的概念

细胞是生物体的基本结构单位和功能单位。随着细胞生物学和分子生物学的发展,20 世纪 70 年代末至 80 年代初出现了细胞工程这一新型学科。

细胞工程是指在细胞整体水平或细胞器水平上研究开发、利用各类细胞的工程,即人们根据科学设计,改变细胞的遗传基础,通过无菌操作、细胞融合、核质移植、染色体或基因移植以及组织培养和细胞培养等方法,改变细胞内的遗传物质以快速繁殖和培养出人们所需要的新物种的技术。

以细胞工程关键技术之一的细胞融合为例,细胞工程的优势在于避免了分离、提纯、剪切、拼接等基因操作,只需将细胞遗传物质直接转移到受体细胞中就能够形成杂交细胞,因而能够提高基因转移效率。此外,细胞工程不仅可以在植物与植物之间、动物与动物之间、微生物与微生物之间进行杂交,甚至可以在动物与植物、与微生物之间进行杂交,形成前所未有的杂交物种。

迄今为止,人们已经从基因水平、细胞器水平以及细胞水平开展了多层次的大量工作,在细胞培养、细胞融合、细胞代谢物的生产和生物克隆等诸多领域取得了一系列令人瞩目的成果。

5.1.2 细胞工程的研究内容

细胞工程涉及的领域相当广泛,根据研究对象不同,可以将细胞工程分为微生物细胞工程、植物细胞工程和动物细胞工程三大类。从研究水平来划分,细胞工程可分为细胞水平、组织水平、细胞器水平和基因水平等几个不同的研究层次。

具体而言,细胞工程的一些主要研究领域包括以下几种。

1. 动、植物细胞与组织培养

该技术最显著的价值在于优良植物的快速繁育与代谢产物的大量制备方面。动植物细胞与组织培养可分为三个层次上的培养:细胞培养、组织培养和器官培养。

植物细胞的大规模培养要早于动物细胞。植物细胞和原生质体培养技术可以

用于育种,也可用于各类植物的快速繁殖,并在培养无毒苗、长期贮存种子、细胞与原生质体融合和生产次生代谢产物等方面发挥作用。

动物细胞培养技术可用于制取许多有应用价值的细胞产品,如多种单克隆抗体、疫苗、生长因子等。其中单克隆抗体的生物反应器大规模生产,已经在医药领域产生了极大的社会和经济效益。此外在组织与器官培养方面也已展现出了美好前景,其中以胚胎干细胞的培养与人工诱导分化最具价值。

2. 细胞融合

细胞融合是采用自然或人工的方法使两个或几个不同细胞(或原生质体)融合为一个细胞,用于产生新的物种或品系及产生单克隆抗体。其中单克隆抗体技术能利用克隆化的杂交瘤细胞分泌高度纯一的单克隆抗体,具有很高的实用价值,已经在诊断和治疗病症方面做出了很大的贡献。

细胞融合最大的贡献是在动植物、微生物新品种的培育方面。以植物为例,该技术应用于植物细胞中可以改良植物遗传性、培养新的植物品种。原生质体融合可克服有性杂交的不亲和性而使叶绿体、线粒体等细胞基因组合在一起。动物细胞融合方面,从杂交瘤细胞产生单克隆抗体至今,已有大批肿瘤的单克隆抗体被制备出来,将为治疗癌症开辟一条新的途径。

3. 染色体工程

染色体工程是按人们的需要来添加、削减或替换生物的染色体的一种技术。主要分为动物染色体工程和植物染色体工程两种。动物染色体工程主要采用对细胞进行微操作的方法来达到转移基因的目的。植物细胞工程目前主要是利用传统的杂交回交等方法来达到改变染色体的目的。

4. 胚胎工程

这项技术主要是对哺乳动物的胚胎进行某种人为的工程技术操作获得人们所需要的成体动物。胚胎工程采用的新技术包括胚胎分割技术、胚胎融合技术、卵核移植技术、体外受精技术、胚胎培养、胚胎移植以及性别鉴定技术、胚胎冷冻技术等。

胚胎工程最成功的应用领域体现在畜牧业,主要是采用胚胎移植技术进行优良品种的快速繁殖与胚胎保存,已经产生了极大的经济效益。除畜牧业以外,对于人类,试管婴儿培育技术也为人类做出了贡献。

5. 细胞遗传工程

细胞遗传工程主要包括克隆和转基因技术。前者主要是指无性繁殖,如动物

克隆是指由一个动物经无性繁殖而产生的遗传性状完全相同的后代个体。现已在畜牧业、稀有动物遗传资源保护与繁衍、医学等方面展现出了诱人前景。后者是指将外源基因整合到生物体内,得到稳定表达,并使该基因能稳定地遗传给后代的技术。它是改变物种遗传性状的最有效途径,现已在微生物、动植物领域得到迅速发展。

该技术可以说代表了现代细胞工程,甚至是整个生物工程的前沿领域。几乎所有细胞工程的最新科研成果都与此有关,所产生的社会争议也是其他细胞工程技术无法比拟的,有可能对生物伦理学、生物哲学等新型学科的发展产生巨大的影响。

5.2 植物细胞工程

5.2.1 植物组织培养

植物组织培养是指在无菌条件下,将离体的植物器官(如根尖、茎尖、叶、花、果实、种子等)、组织(如花药组织、胚乳、皮层等)、细胞(体细胞、生殖细胞等)、胚胎(如成熟或未成熟的胚)、原生质体等培养在人工配制的培养基上,并人为控制外因(营养成分、光、温、湿),诱导产生愈伤组织、潜伏芽,甚至进而从中分化、发育出整体植株的技术。

植物组织培养的历史可以追溯到20世纪初。1902年德国植物学家哈伯兰德(Haberlandt)提出了细胞全能性的概念,即一个个体的所有细胞,无论是体细胞还是性细胞,所含的DNA或基因是一样的。细胞全能性是组织培养的基础。1958年施图尔德(Stemart)等由培养的胡萝卜细胞诱导形成体细胞胚胎,进而再生成完整植株,从而证明了哈伯兰德(Haberlandt)提出的细胞全能性的概念。从此以后,通过组织培养方法培育完整植株的探索便在世界范围内蓬勃开展起来。现在已有上千种植物能够借助组织培养的手段进行快速繁殖,多种具有重要经济价值的粮食作物、蔬菜、花卉、果树、药用植物等实现了大规模的工业化、商品化生产。

进行植物组织培养,一般要经历以下5个阶段。

1. 预备阶段

(1) 选择合适的外植体是本阶段的首要问题。外植体,即能被诱发产生无性增殖系的器官或组织切段,如一个芽,一节茎等。

选择外植体,要综合考虑以下几个因素:①大小要适宜,不宜太小。外植体的组织块要达到2万个细胞(即5~10mg)以上才容易成活;②同一植物不同部

位的外植体,其细胞的分化能力、分化条件及分化类型有相当大的差别。因此要根据培养目标选择不同部位的植物切段;③植物胚与幼龄组织器官比老化组织、器官更容易去分化,产生大量的愈伤组织。愈伤组织原意指植物因受创伤而在伤口附近产生的薄壁组织,现已泛指经细胞与组织培养产生的可传代的未分化细胞团;④不同物种相同部位的外植体,其细胞分化能力可能大不一样。

总之,外植体的选择,一般以幼嫩的组织或器官为宜。此外,外植体的去分化及再分化的最适条件都需经过摸索,他人成功的经验只可借鉴,不可完全照搬。

(2) 除去病原菌及杂菌。选择外观健康的外植体,尽可能除净外植体表面的各种微生物是成功进行植物组织培养的前提。消毒剂的选择和处理时间的长短与外植体对所用试剂的敏感性密切相关(表 5-1)。通常幼嫩材料处理时间比成熟材料可短些。

表 5-1 常用消毒剂除菌效果比较

消毒剂	使用浓度	处理时间/min	除菌效果	去除难易
氯化汞	0.1%~1%	2~10	最好	较难
次氯酸钠	2%	5~30	很好	容易
次氯酸钙	9%~10%	5~30	很好	容易
溴水	1%~2%	2~10	很好	容易
过氧化氢	10%~12%	5~15	好	最易
硝酸银	1%	5~30	好	较难
抗生素	20~50mg/L	30~60	较好	一般

对外植体除菌的一般程序如下:

外植体→自来水多次漂洗→消毒剂处理→无菌水反复冲洗→无菌滤纸吸干

(3) 配制适宜的培养基。由于物种的不同、外植体的差异,组织培养的培养基也是多种多样,但它们通常都包括以下三大类组成成分:①含量丰富的基本成分,如蔗糖或葡萄糖高达每升 30g,以及氮、磷、钾、镁等。②微量无机物,如铁、锰、硼酸等。③微量有机物,如激动素、吲哚乙酸、肌醇等。

各培养基中,激动素和吲哚乙酸的变动幅度很大,这主要因培养目的而异。一般较高的生长素(吲哚乙酸)对细胞分裂素(激动素)比值有利于诱导外植体产生愈伤组织,反之则促进胚芽和胚根的分化。

2. 诱导去分化阶段

外植体是指植物组织培养中用来进行离体无菌培养的离体材料,可以是器官、组织、细胞和原生质体等。组织培养的第一步就是让这些器官或组织切段去分化,使各细胞重新处于旺盛有丝分裂的分生状态,因此培养基中一般应添加较高浓度的生长素类激素。可以采用固体培养基(添加琼脂 0.6%~1.0%),这种

方法简便易行,可多层培养,占地面积小。外植体表面除菌后,切成小片(段)插入或贴放于培养基上即可。但外植体的营养吸收不匀,气体及有害物质排换不畅,愈伤组织易出现极化现象是本方法的主要缺点。如把外植体浸没于液态培养基中,则营养吸收及物质交换便捷,但需提供振荡器等设备,投资较大,且一旦染菌则难以挽回。

本阶段为植物细胞依赖培养基中的有机物等进行的异养生长,原则上无须光照。

3. 继代增殖阶段

继代培养是指愈伤组织在培养基上生长一段时间后,营养物枯竭,水分散失,并已经积累了一些代谢产物,此时需要将这些组织转移到新的培养基上,这种转移称为继代培养。同时,通过移植,愈伤组织的细胞数大大扩增,有利于下一阶段收获更多的胚状体或小苗。

4. 生根成芽阶段

愈伤组织只有经过重新分化才能形成胚状体,继而长成小植株。所谓胚状体指的是在组织培养中分化产生的具有芽端和根端,类似合子胚的构造。通常要将愈伤组织移置于含适量细胞分裂素和生长素的分化培养基中,才能诱导胚状体的生成。光照是本阶段的必备外因。

5. 移栽成活阶段

生长于人工照明玻璃瓶中的小苗,要适时移栽室外以利生长。此时的小苗还十分幼嫩,移植应在能保证适度的光、温、湿条件下进行。在人工气候室中锻炼一段时间能大大提高幼苗的成活率。一般先将培养容器打开,于室内自然光照下放3d,然后取出小苗,用自来水把根系上的培养基冲洗干净,再栽入已准备好的基质中。移栽前要适当遮荫,加强水分管理,保持较高的空气湿度,但基质不宜过湿,以防烂苗。

5.2.2 植物细胞培养

植物细胞培养是指在离体条件下,将愈伤组织或其他易分散的组织置于液体培养基中,进行振荡培养,得到分散成游离的悬浮细胞,通过继代培养使细胞增殖,从而获得大量的细胞群体的一种技术。小规模悬浮培养可在培养瓶中进行,大规模的需要利用生物反应器生产。

植物中含有数量极为可观的次生代谢物质,如哈尔碱、人参皂角苷等。这些物质对人体治病强身具有特殊的功效。然而植物生长缓慢,自然灾害频繁,即使是大规模人工栽培仍然不能从根本上满足人类对这类经济植物日益增长的需求。

早在 20 世纪 50 年代,人们就发现离体培养的高等植物细胞具有合成并积累次生代谢产物的潜力。目前利用植物细胞培养技术生产植物产品已成为工业化生产植物产品的一条有效途径。这些产品既可用作药物生产的原料,也可作为工业、农业、食品添加剂等的原料。但目前存在的主要问题是代谢产品的含量低,由此造成成本和产品价格高。但是随着培养技术的发展,植物细胞培养必将成为大规模生产植物代谢产品的有效途径。

至今,人类通过植物细胞培养获得的生物碱、维生素、色素、抗生素以及抗肿瘤药物等不下 50 多个大类,其中已有 30 多种次生物质的含量在人工培养时已达到或超过亲本植物的水平。在已研究过的 200 多种植物细胞培养物中,已发现可产生 300 余种对人类有用的成分,其中不乏临床上广为应用的重要药物。利用现代细胞培养技术,工厂化生产生物天然次生代谢产品的前景十分广阔。

植物细胞培养的方法,根据培养对象,植物细胞培养主要有单细胞培养、单倍体培养、原生质体培养等。按照培养系统可分为悬浮培养、液体培养、固体培养、固定化培养等。

单倍体培养主要是指花药培养,即将花药在人工培养基上进行培养,从小孢子(雄性生殖细胞)直接发育成胚状体,然后长成单倍体植株;或通过组织诱导分化出芽和根,最终长成植株。

原生质体培养是将植物的体细胞经过纤维素酶等处理后去掉细胞壁,获得的原生质体在无菌培养基上生长、分裂,最终长成植株。通常这种方法将不同植物的原生质体融合后可获得体细胞杂交的植株。

植物细胞培养与微生物发酵类似,可采用固体和液体培养基培养。

固体培养是在微生物培养基础上发展起来的植物细胞培养的方法。一般都使用添加一定比例的琼脂培养基。固定化培养是固体培养的一种,但不是使用固体培养基,而是与固定化酶或固定化微生物细胞培养类似的一种植物细胞培养技术,是在微生物和酶的固定化培养基础上发展起来的。目前应用最广泛的、能很好保持细胞活性的固定化方法是将细胞包埋于海藻酸盐卡拉胶中。

液体培养也是在微生物培养基础上发展起来的,可分为静止与振荡培养两种。静止培养适合某些原生质体的培养,范围较窄。振荡培养需要摇床或转床等设备。细胞悬浮培养属于液体培养的一种,是植物细胞大规模培养的主要方式,可以通过机械或气体搅拌实现细胞的悬浮,类似于微生物的发酵工程技术。

目前,植物细胞大规模培养多采用悬浮培养方式,这主要是由于悬浮培养具有以下优点,而且可以借鉴发酵工程的成熟技术,容易放大,实现规模化。

- (1) 可以增加培养细胞与培养液的接触面,促进营养的吸收。
- (2) 可带走培养物产生的有害代谢产物,避免其高浓度积聚对细胞的伤害。
- (3) 保证良好的混合状态,从而获得良好的气体传递效果。

5.2.3 植物细胞融合

人类对自然的认识总是不断地经历由表及里、由浅入深的发展过程。面对五彩缤纷的大千世界，人们往往不满足于自然的种种恩赐，历史上曾有不少有识之士提出过，在不同物种间进行杂交，以期获得具有双方优良性状的杂种生物的美好设想。然而常规的杂交育种由于物种间难以逾越的天然屏障而举步维艰。科学家们受细胞全能性理论及组织培养成功的启示，逐渐将眼光转向细胞融合，试图用这种崭新的手段冲破自然的禁锢。

1937年 Michel 率先实施植物细胞融合的试验。如何去除坚韧的细胞壁成了生物学工作者必须解决的首要难题。起初，科学家采用机械法切除细胞壁。他们先把植物外植体（或愈伤组织、悬浮培养细胞）进行糖或盐的高渗处理，引起脱水，细胞质收缩，最后导致质壁分离；随后用组织捣碎机等高速运转的刀具随机切割细胞，最终可能从中获得少量脱壁细胞供细胞融合用。不过经上述机械法制取的脱壁细胞往往活力低、数量少，难以进行有效的实验操作。1960年该领域终于出现了重大突破。由英国诺丁汉大学 Cocking 教授领导的小组率先利用真菌纤维素酶，成功地制备出了大量具有高度活性可再生的番茄幼根细胞原生质体，开辟了原生质体融合研究的新阶段。

植物细胞原生质体是指那些已去除全部细胞壁的细胞。这时细胞外仅由细胞膜包裹，呈圆形，要在高渗液中才能维持细胞的相对稳定。此外在酶解过程中残存少量细胞壁的原生质体叫原生质球或球状体。它们都是进行原生质体融合的好材料。

原生质体融合的一个有效方法是 1973 年 Keller 提出的高钙高 pH 法。第二年加拿大籍华人高国楠首创聚乙二醇法（PEG）诱导原生质体融合；1977 年他又把聚乙二醇法与高钙高 pH 法结合，显著提高了原生质体的融合率。次年，Melchers 用此法获得了番茄与马铃薯细胞融合的杂种。1979 年 Senda 发明了以电激法提高原生质体融合率的新方法。由于这一系列方法的提出和建立，促使原生质体融合实验蓬勃发展起来。

1. 原生质体的制备

1) 取材与除菌

原则上植物任何部位的外植体都可成为制备原生质体的材料。但人们往往对活跃生长的器官和组织更感兴趣，因为由此制得的原生质体一般活力较强，再生与分生比例较高。常用的外植体包括：种子根、子叶、下胚轴、胚细胞、花粉母细胞、悬浮培养细胞和嫩叶。

对外植体的除菌要因材而异。悬浮培养细胞一般无须除菌。对较脏的外植体

往往要先用肥皂水清洗再以清水洗 2~3 次, 然后浸入 70% 酒精消毒后, 再放进 3% 次氯酸钠处理。最后用无菌水漂洗数次, 并用无菌滤纸吸干。

2) 酶解

由于植物细胞的细胞壁含纤维素、半纤维素、木质素以及果胶质等成分, 因此使用的纤维素酶实际上大多含有纤维素酶、纤维素二糖酶以及果胶酶等多种成分。现以叶片为例说明如何制备植物原生质体。①配制酶解反应液: 反应液应是一种 pH 在 5.5~5.8 的缓冲液, 内含纤维素酶 0.3%~3.0% 以及渗透压稳定剂、细胞膜保护剂和表面活性剂等。②酶解: 将除菌后的叶片撕去下表皮后, 切成小块放入酶解反应液中, 保持 25~30℃ 的温度 2~4h 并不时轻摇, 待反应液转绿则酶解完成。反应液转绿是酶解成功的一项重要指标, 说明已有不少原生质体游离在反应液中。经镜检确认后应及时终止反应, 避免脆弱的原生质体受到更多的损害。

3) 分离

在反应液中除了大量的原生质体外, 尚有一些残留的组织块和破碎的细胞。为了取得高纯度的原生质体就必须进行原生质体的分离。可选取 200~400 目的不锈钢网或尼龙布进行过滤除渣, 也可采用低速离心法或相对密度漂浮法直接获取原生质体。

4) 洗涤

刚分离得到的原生质体往往还含有酶及其他不利于原生质体培养、再生的试剂, 应以新的渗透压稳定剂或原生质体培养液离心洗涤 2~4 次。

5) 鉴定

只有经过鉴定确认已获得原生质体后才能进行下一阶段的细胞融合工作。由于已去除全部或大部分细胞壁, 此时植物细胞呈圆形。如果把它放入低渗溶液中, 则很容易胀破。也可用荧光增白剂染色后置于紫外显微镜下观察, 残留的细胞壁呈现明显荧光。通过以上观测, 基本上可判别是否是原生质体及其百分率。

2. 原生质体的融合

1) 化学法诱导融合

化学法诱导融合无须贵重仪器, 试剂易于得到, 因此一直是细胞融合的主要方法。尤其是聚乙二醇 (PEG) 结合高钙高 pH 诱导融合法已成为化学法诱导细胞融合的主流。以下简介此方法 (在无菌条件下进行):

按比例混合双亲原生质体→滴加 PEG 溶液, 摇匀, 静置→滴加高钙高 pH 溶液, 摇匀, 静置→滴加原生质体培养液洗涤数次→离心获得原生质体细胞团→筛选、再生杂合细胞。

通常, 在 PEG 处理阶段, 原生质体间只发生凝集现象。加入高钙高 pH 溶

液稀释后,紧挨着的原生质体间才出现大量的细胞融合。其融合率可达到10%~50%。这是一种非选择性的融合,既可发生于同种细胞之间,也可能在异种细胞中出现。有些融合是两个原生质体的融合,但也经常可见两个以上的原生质体聚合成团,不过此类融合往往不大可能成功。应当指出,高浓度的PEG结合高钙高pH溶液对原生质体是有一定毒性的,因此进行诱导融合的时间要适中。处理时间过短,融合频率降低;处理时间过长,则将因原生质体活力明显下降而导致融合失败。

2) 物理法诱导融合

将双亲本原生质体以适当的溶液悬浮混合后,插入微电极,接通一定的交变电流。原生质体极化后顺着电场排列成紧密接触的珍珠串状。此时瞬间施以适当强度的电脉冲,则使原生质体膜被击穿而发生融合。电激融合不使用有毒害作用的试剂,作用条件比较温和,而且基本上是同步发生融合。只要条件摸索适当,亦可获得较高的融合率。

上述操作实际上是供体与受体原生质体对等融合的方法。由于双方各具几万对基因,要筛选得到符合需要且能稳定传代的杂合细胞是相当困难的。最近,有人提出以X射线, γ 射线、纺锤体毒素或染色体浓缩剂等对供体原生质体进行前处理。轻剂量处理可造成染色体不同程度的丢失、失活、断裂和操作,融合后实现仅有少数染色体甚至是DNA片段的转移;致死量处理后融合则可能产生没有供体方染色体的细胞质杂种。利用这种所谓的不对称融合方法,大大提高了融合体的生存率和可利用率。

经过上述融合处理后再生的细胞株将可能出现以下几种类型:①亲本双方的细胞和细胞质能融洽地合为一体,发育成为完全的杂合植株。这种例子不多。②融合细胞由一方细胞核与另一方细胞质构成,可能发育为核质异源的植株。亲缘关系越远的物种,某个亲本的染色体被丢失的现象就越严重。③融合细胞由双方细胞质及一方核或再附加少量其他方染色体或DNA片段构成。④原生质体融合后两个细胞核尚未融合时就过早地被新出现的细胞壁分开。以后它们各自分生长成嵌合植株。

3. 杂合体的鉴别与筛选

双亲本原生质体经融合处理后产生的杂合细胞,一般要以含有渗透压稳定剂的原生质体培养基培养(液体或固体),再生出细胞壁后转移到合适的培养基中。待长出愈伤组织后按常规方法诱导其长芽、生根、成苗。在此过程中可对是否是杂合细胞或植株进行鉴别与筛选。

1) 杂合细胞的显微镜鉴别

根据以下特征可以在显微镜下直接识别杂合细胞:若一方细胞大,另一方细

胞小, 则大、小细胞融合的就是杂合细胞; 若一方细胞基本无色, 另一方为绿色, 则白绿色结合的细胞是杂合细胞; 如果双方原生质体在特殊显微镜下或双方经不同染料着色后可见不同的特征, 则可作为识别杂合的标志; 发现上述杂合细胞后可借助显微操作仪在显微镜下直接取出, 移置再生培养基培养。

2) 互补法筛选杂合细胞

显微鉴别法虽然比较可信, 但实验者有时会受到仪器的限制, 工作进度慢且未知其能否存活与生长。遗传互补法则可弥补以上不足。

遗传互补法的前提是获得各种遗传突变细胞株系。如不同基因型的白化突变株 $aB \times Ab$, 可互补为绿色细胞株 $AaBb$, 这叫做白化互补。甲细胞株缺外源激素 A 不能生长, 乙细胞株需要提供外源激素 B 才能生长, 则甲株与乙株融合, 杂合细胞在不含激素 A、B 的选择培养基上可能生长。这种选择类型称生长互补。假如某个细胞株具某种抗性 (如抗青霉素), 则它们的杂合株将可在含上述两种抗生素的培养基上再生与分裂。这种筛选方式即所谓的抗性互补筛选。此外, 根据碘代乙酰胺能够抑制细胞代谢的特点, 用它处理受体原生质体, 只有融合后的供体细胞质才能使细胞活性得到恢复, 这就是代谢互补筛选等。

3) 采用细胞与分子生物学的方法鉴别杂合体

经细胞融合后长出的愈伤组织或植株, 可进行染色体核型分析、染色体显带分析、同工酶分析以及更为精细的核酸分子杂交、限制性内切酶片段长度多态性和随机扩增多态性 DNA 分析, 以确定其是否结合了双亲本的遗传素质。

4) 根据融合处理后再生长出的植株的形态特征进行鉴别

自从 Cooking 取得制备植物原生质体的重大突破以来, 科学家在植物细胞融合, 甚至植物细胞与动物细胞融合等方面进行了不懈的努力, 已在种内、种间、属间乃至科间细胞融合后得到了近 200 例再生株。最突出的成就是番茄与马铃薯的属间细胞融合。已经获得的番茄-马铃薯杂交株, 基本像马铃薯那样的蔓生, 能开花, 并长出 2~11cm 的果实。成熟时果实黄色, 具番茄气味, 但高度不育。综上所述, 虽然细胞融合研究至今尚面临种种难题和挑战, 但该领域在理论及实践两方面的重大意义, 仍然吸引了不少科学家为之忘我奋斗, 更为激动人心的研究成果一定会不断地涌现出来。

5.2.4 人工种子

人工种子就是外面包裹一层有机薄膜的植物胚状体。外层胶囊状的固定化膜保护胚状体中的水分并能防止外部力量冲击, 中间含有培养物所需的营养成分和某些植物激素, 最内则是被包裹的胚状体或芽。通过这样的组合, 人为地制造出和天然种子相类似的结构。

1. 人工种子的构成及特点

人工种子由以下 3 部分构成：

(1) 人工种皮 这是包裹在人工种子最外层的胶质化合物薄膜。这层薄膜既能允许内外气体交换畅通，又能防止人工胚乳中水分及各类营养物质的渗漏。此外还应具备一定的机械抗压力。

(2) 人工胚乳 这是人工配制的保证胚状体生长发育需要的营养物质，一般以生成胚状体的培养基为主要成分，再根据人们的需要外加一定量的植物激素、抗生素、农药以及除草剂等物质，尽可能提供胚状体正常萌发生长所需的条件。

(3) 胚状体 胚状体是由组织培养产生的具有胚芽、胚根双极性、类似天然种子胚的结构，具有萌发长成植株的能力。

人工种子作为 21 世纪极具发展潜力和经济价值的高科技成果，具有以下突出的优点：①可以不受环境因素制约，一年四季进行工厂化生产；②由于胚状体是经人工无性繁育产生，有利于保存该种系的优良性状；③与试管苗相比，人工种子成本更低，更适合于机械化田间播种；④可根据需要在人工胚乳中添加适量的营养物、激素、农药、抗生素、除草剂等，以利胚状体的健康生长。

虽然人工种子的研制历经十几年已经取得了长足的进展，但是仍有一些关键技术尚未攻克。例如，人工种皮的性能尚不尽人意，还未找到一种符合多数物种需要的人工胚乳，胚状体如何让它处于健康的休眠状态，人工种子如何做到既延长其保存时间又不明显降低萌发率等。

2. 人工种子的制备

(1) 胚状体的制备及其同步生长 如前所述，通过外植体的固体培养基培养、液体培养基的悬浮细胞培养以及花药、花粉的诱导培养都可获得数量可观的胚状体。但这些胚状体往往处于胚胎发育的不同时期，不符合大量制备人工种子的需要。因此诱导胚状体的同步化生长成了制备人工种子的核心问题。采取以下措施可促进胚状体的同步生长：

低温法：在细胞的早期对培养物进行适当低温处理若干小时。由于低温阻碍了微管蛋白的合成，纺锤体形成受阻，滞留于有丝分裂中期的细胞增多。此时再让培养物回复到正常温度，细胞则同步分裂。

抑制剂法：同理，细胞培养初期加入 DNA 合成抑制剂，如 5-氨基尿嘧啶等，使细胞生长基本上都停顿于 G1 期。除去抑制剂后，细胞进入同步分裂阶段。

分离法：在细胞悬浮培养的适当时期，用一定孔径的尼龙网或钢丝网或密度梯度离心法，收取处于胚胎发育某个阶段的胚性细胞团，然后转移到无生长素的培养基上，使多数胚状体同步正常发育。

通气法：有人发现，在细胞悬乳培养液中每天通入氮气或乙烯 1~2 次，每次几秒或更长时间，可显著提高有丝分裂同步率。

渗透压法：随着植物胚状体发育从小到大，其渗透压值呈现规律性的从高到低的变化。可配制一定渗透压值的培养基而使胚状体的发育停留在指定的阶段，从而达到同步发育的目的。

控制细胞及胚状体的同步化生长是一个尚未完全解决的问题。除了上述提出的外因干预以外，物种及不同的外植体细胞的第三性，对实现同步生长也有很大影响。只有经过实验摸索才可能成功。

此外，刚收获的胚状体含水分很高，不够成熟，亦难以贮存。一般应经自然干燥 4~7d，使胚状体转为不透明状为宜。

(2) 人工胚乳的制备 人工胚乳的营养需求因种而异，但与细胞、组织培养的培养基大体相仿，通常还配加一定量的天然大分子碳水化合物（淀粉、糖类）以减少营养物泄漏。常用人工胚乳有：MS（或 SH、White）培养基+马铃薯淀粉水解物 1.5%；0.5×SH 培养基+麦芽糖 1.5% 等。尚可根据需要在上述培养基添加适量激素、抗生素、农药、除草剂等。

(3) 配制包埋剂及包埋 褐藻酸钠是目前最好的人工种子包埋剂，它无毒、使用方便，具有一定的持水、透气性能，价格较低。经 CaCl_2 离子交换后，机械性能较好，其次是琼脂、白明胶等。通常以人工胚乳溶液调配成 4% 的褐藻酸钠，再按一定比例加入胚状体，混匀后，逐滴滴到 2.0%~2.5% CaCl_2 溶液中。再经过 10~15min 的离子交换络合作用，即形成一个圆形的具一定刚性的人工种子。而后以无菌水漂洗 20min，捞起晾干。

以上所述滴液法获得的人工种子，其直径随滴管口径的大小而定；每颗种子内含胚状体数目主要取决于包埋剂中胚状体的密度；人工种皮的厚度则随人工种子在 CaCl_2 溶液中离子交换时间的长短而定，一般掌握在 10~15min。种皮太厚，不利于胚状体萌发；种皮太薄，则在贮存、运输以及播种过程中都会遇到麻烦。

3. 人工种子的贮存与萌发

人工种子的贮存与萌发是迄今尚未攻克的难关。一般要将人工种子保存在低温（4~7℃）、干燥（<67% 相对湿度）条件下。有人将胡萝卜人工种子保存在上述条件下，2 个月后的发芽率仍接近 100%。但这种贮存方式的费用是昂贵的。在自然条件下人工种子的贮存时间较短，萌发率较低。

综上所述，尽管人工种子的研制尚处于实验室研究阶段，但它那令人神往的产业化前景正吸引着各国政府投入巨额资金，各国科学家付出辛勤汗水。成功研制人工种子的美好时刻相信不久一定会到来。

5.3 动物细胞工程

5.3.1 什么是动物细胞工程

动物细胞工程是细胞工程的一个重要分支,它主要从细胞生物学和分子生物学的层次,根据人类的需要,一方面深入探索和改造生物遗传种性,另一方面应用工程技术的手段,大量培养细胞或动物本身,以期收获细胞或其代谢产物以及可供利用的动物。可见,动物细胞工程不仅具有重要的理论意义,而且它的应用前景也十分广阔。

5.3.2 动物细胞工程所涉及的主要技术领域

1. 细胞与组织培养

动物细胞与组织培养是从动物体内取出细胞或组织,模拟体内的生理环境,在无菌、适温和丰富的营养条件下,使离体细胞或组织生存、生长并维持结构和功能的一门技术。两者的区别是:细胞培养指的是细胞在体外条件下的生长,在细胞培养的过程中,细胞不再形成组织。组织培养指的是组织在体外条件下的保存或生长,此时可能有组织分化并保持组织的结构或功能。细胞或组织培养是细胞学研究的技术之一,是动物细胞工程的基础。

2. 动物细胞融合

动物细胞融合是研究细胞间遗传信息转移、基因在染色体上的定位以及创造新细胞株的有效途径。

3. 淋巴细胞杂交瘤产生单克隆抗体技术

淋巴细胞杂交瘤产生单克隆抗体技术自1975年问世以来,取得了飞速的发展,几乎可以用这项技术获得任何针对某个抗原决定簇的高纯度抗体。因此单克隆抗体的应用范围已经扩大到了生物医学的众多领域,如免疫学、细菌学、遗传学、肿瘤学等,但21世纪初主要利用其高特异和高纯度的突出优点大量应用于临床诊断方面。

4. 细胞拆合

从不同的细胞中分离出细胞器及其组分,在体外将它们重新组装成具有生物活性的细胞或细胞器的过程称为细胞拆合。细胞拆合的研究大多以动物细胞为材料,其中尤以核移植和染色体转移的工作令人瞩目。

5.3.3 动物细胞工程发展概况

早在 1885 年, Roux 就开创性地把鸡胚髓板在保温的生理盐水中保存了若干天。这是体外存活器官的首次记载, 不过, Harrion 才是公认的动物组织培养的鼻祖。1907 年, 他培养的蛙胚神经细胞不仅存活数周之久, 而且还长出了轴突。在 20 世纪 40 年代 Carrel 和 Earle 分别建立了鸡胚心肌细胞和小鼠结缔组织 L 细胞系, 令人信服地证明了动物细胞体外培养无限繁殖力。21 世纪初, 科学家们建立的各种连续的或有限的细胞系(株)已超过 5 000 种。1958 年冈田善雄发现, 已灭活的仙台病毒可以诱使艾氏腹水瘤细胞融合, 从此开创了动物细胞融合的崭新领域。20 世纪 60 年代, 童弟周教授及其合作者独辟蹊径, 在鱼类和两栖类动物中进行了大量核移植实验, 在探讨核质关系方面做出了重大贡献。1975 年, Kohler 和 Milstein 巧妙地创立了淋巴细胞杂交瘤技术, 获得了珍贵的单克隆抗体, 免疫学取得了重大突破。1997 年, 英国 Wilmut 领导的小组用体细胞核克隆出了“多莉”绵羊, 把动物细胞工程推上辉煌的顶峰。

5.3.4 动物细胞工程的操作方法

1. 细胞组织培养

(1) 细胞培养法 培养动物细胞一般可按以下步骤进行: 无菌取出目的细胞所在组织, 以培养液漂洗干净→以锋利无菌刀具割去多余部分, 切成小组织块→将小组织块置解离液分散细胞(解离液含蛋白酶类, 无钙、镁离子)→低速离心洗涤细胞后, 将目的细胞吸移培养瓶培养。

(2) 组织培养法 组织培养法与细胞培养法类似, 主要区别在于省略了蛋白酶对组织的离析作用。其基本方法如下: 无菌操作取出目的组织, 以培养液漂洗→以锋利无菌刀具割去多余部分, 将该组织分切成 $1\sim 2\text{mm}^3$ 小块, 移入培养瓶→加入合适的培养基浸润组织。小心地将培养瓶平翻 180° , 搁置 $15\sim 30\text{min}$, 以利组织块的贴壁生长→翻回培养瓶, 平卧静置于 37°C 培养。

2. 动物细胞融合

细胞融合是研究细胞间遗传信息转移、基因在染色体上的定位以及创造新细胞株的有效途径。动物细胞融合的途径有以下三条:

(1) 病毒诱导融合 1958 年冈田善雄发现已灭活的仙台病毒可诱发艾氏腹水瘤细胞相互融合形成多核体细胞。以后, 科学家证实, 其他的副黏液病毒、天花病毒和疱疹病毒也能诱导细胞融合。

由于病毒的致病性与寄生性, 制备比较困难; 此外本方法诱导产生的细胞融

合率还比较低,重复性不够高,所以近年来已不多用。

(2) 化学诱导融合 1974 年高国楠用聚乙二醇 (PEG) 成功诱导植物细胞融合后,次年, Pontecorvo 即用该法成功融合动物细胞。此后, PEG 诱导融合一直成为动植物细胞融合的主要手段。动物细胞的 PEG 融合方法可参照前述植物细胞融合的 PEG 悬浮混合法进行。

(3) 电激诱导融合 方法参见植物原生质体电激融合。

3. 淋巴细胞杂交瘤产生单克隆抗体技术

众所周知,当某些外源生物(细菌等)或生物大分子(蛋白质),即抗原进入动物或人体后,会刺激后者形成相应的抗体,引起免疫应答,从而将前者分解或清除。随着免疫学的深入发展,科学家们已经知道,每种抗原的性质是由其表面的蛋白类物质(决定簇)决定的。遗憾的是,抗原表面往往有很多种决定簇,可以引发机体产生相当多种特异性抗体,这种情况给临床医学的诊断与治疗带来了诸多不便。

哺乳动物和人体内主要有两类淋巴细胞: T 细胞和 B 细胞。前者能分泌淋巴因子(如干扰素),发挥细胞免疫的功能;后者能分泌抗体,具有体认免疫的作用。由于外环境纷繁复杂,千差万别的抗原诱使 B 淋巴细胞群产生的抗体高达数百万种。不过每个 B 淋巴细胞都仅专一地产生、分泌一种针对某种抗原决定簇的特异性抗体。显然,要想获得大量专一性抗体,就得从某个特定 B 淋巴细胞培养繁殖出大量的细胞群体,即克隆。如此克隆出的细胞其遗传性质高度一致,由它们分泌出的抗体即叫做单克隆抗体。令人遗憾的是, B 淋巴细胞在体外不能无限分裂繁殖。为了攻克上述难关,充分利用单克隆抗体纯度高、专一性强的优点, 1975 年柯勒和米尔斯坦利用肿瘤细胞无限增殖分生的特征,将 B 细胞与之融合,终于获得了既能产生单一抗体又能在体外无限生长的杂合细胞,在生物医学领域做出了重大贡献,由此荣获 1984 年诺贝尔生理学或医学奖。

4. 细胞拆合

从不同的细胞中分离出细胞及其组分,在体外将它们重新组装成具生物活性的细胞或细胞器的过程称为细胞拆合。细胞拆合的研究大多以动物细胞为材料,其中尤以核移植和染色体转移的工作令人瞩目。

(1) 核移植 20 世纪 60 年代科学家开展了鱼类核移植工作。他们取出鲤鱼胚胎囊胚期细胞的细胞核,放入鲫鱼的去核受精卵中,结果有部分异核卵发育成鱼。经检查,这些鱼为杂种鱼。

(2) 染色体转移 为了改变真核细胞的遗传性状和控制高等生物的生命活动,除了需在细胞整体水平和胞质水平上转移整个核的基因组外,还有必要在染

染色体水平上建立一种新的技术体系。通过这种技术将同特定基因表达有关的染色体或染色体片段转入受体细胞,使该基因能得以表达,并能在细胞分裂中一代又一代地传递下去。这种技术称之为染色体转移(或染色体转导)。

染色体转移技术不仅可以将各种可供选择的基因导入受体细胞,而且还可以用于确定基因在染色体上的连锁关系。自从1973年染色体转移技术首创以来,随着体细胞遗传学的发展,染色体转移技术正日益发展成为一项重要的既具有理论价值,又具有广阔应用前景的细胞工程技术。

5.4 微生物细胞工程

微生物是一个相当笼统的概念,既包括细菌、放线菌这样微小的原核生物,又涵盖菇类、霉菌等真核生物。由于微生物细胞结构简单,生长迅速,实验操作方便,有些微生物的遗传背景已经研究得相当深入,因此微生物已在国民经济的不少领域,如抗生素与发酵工业、防污染与环境保护、节约资源与能源再生、灭虫害与农林发展、种菇菌造福大众等方面发挥了非常重要作用。

5.4.1 原核细胞的原生质融合

细菌是最典型的原核生物,它们都是单细胞生物。细菌细胞外有一层成分不同、结构相异的坚韧细胞壁形成抵抗不良环境因素的天然屏障。根据细胞壁的差异一般将细菌分成革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌两大类。前者肽聚糖约占细胞壁成分的90%,而后的细胞壁上除了部分肽聚糖外还有大量的脂多糖等有机大分子。由此决定了它们对溶菌酶的敏感性有很大差异。

溶菌酶广泛存在于天然植物、微生物细胞及其分泌物中。它能特异地切开肽聚糖中N-乙酰葡萄糖胺之间的 β -1,4-糖苷键,从而使革兰氏阳性菌的细胞壁溶解。但由于革兰氏阴性细菌细胞壁组成成分的差异,处理革兰氏阴性菌时,除了溶菌酶外,一般还要添加适量的EDTA(乙二胺四乙酸),才能除去它们的细胞壁,制得原生质体或原生质球。

革兰氏阳性菌细胞融合的主要过程如下:

分别培养带遗传标志的双亲本菌株至对数生长期,此时细胞壁最易被降解;

分别离心收集菌体,以高渗培养基制成菌悬液,以防止下阶段原生质体破裂;

混合双亲本,加入适量溶菌酶,作用20~30min;

离心后得原生质体,用少量高渗培养基制成菌悬液;

加入10倍体积的聚乙二醇(40%)促使原生质体凝集、融合;

数分钟后,加入适量高渗培养基稀释;

涂接于选择培养基上进行筛选。长出的菌落很可能已结合双方的遗传因子,要经数代筛选及鉴定才能确认已获得杂合菌株。

对革兰氏阴性细菌而言,在加入溶菌酶数分钟后,应添加 0.1mol/L 的 ED-TANa_2 共同作用 $15\sim 20\text{min}$,则可使 90% 以上的革兰氏阴性菌转变为可供细胞融合用的球状体。

尽管细菌间细胞融合的检出率仅在 $10^5\sim 10^2$,但由于菌数总量十分巨大,检出数仍是相当可观的。

5.4.2 真菌的原生质体融合

真菌主要有单细胞的酵母类和多细胞菌丝真菌类。同样的降解它们的细胞壁、制备原生质体是细胞融合的关键。

真菌的细胞壁成分比较复杂,主要由几丁质及各类葡聚糖构成纤维网状结构,其中夹杂着少量的甘露糖、蛋白质和脂类。因此可在含有渗透压稳定剂的反应介质中加入消解酶进行酶解。也可用取自蜗牛消化道的蜗牛酶进行处理。原生质体的得获率都在 90% 以上。此外还有纤维素酶、几丁质酶、新酶等。

真菌原生质体融合的要点与前述细胞融合类似,一般都以 PEG 为融合剂,在特异的选择培养基上筛选融合。但由于真菌一般都是单倍体,融合后,只有那些形成真正单倍重组体的融合子才能稳定传代。具有杂合双倍体和异核体的融合子遗传特性不稳定,尚需经多代考证才能最后断定是否为真正的杂合细胞。至今国内外已成功地进行过数十例真菌的种内、种间、属间的原生质体融合,大多是大型的食用真菌,如蘑菇、香菇、木耳、凤尾菇、平菇等,取得了相当可观的经济效益。

细胞工程是和 20 世纪同时诞生的世纪工程。一个世纪过去了,人类在植物、动物、微生物各领域细胞工程都取得了辉煌的成就。科学家不仅能培养各类细胞和组织,还能从单个细胞克隆出最高等的植物——被子植物和最高等的动物——哺乳动物;我们不仅在努力揭去自然界神秘的重重面纱,而且已不满足于大自然亿万年的恩赐,正在用智慧的大脑和勤奋的双手改造生物种性,创造更加美好的未来。

本章小结

本章从植物细胞工程、动物细胞工程和微生物细胞工程三个领域介绍了细胞工程的基础理论和基本实验技术。细胞和组织培养是细胞工程最基本的、也是最重要的内容。细胞融合是细胞工程最基本的核心操作技术。要从植物的细胞组织培养中产生胚状体乃至植株,调节好各阶段生长素和细胞分裂素的比例最为关

键。用动物体细胞的细胞核克隆出一只完全正常的哺乳动物的技术已经接近成熟。细胞融合能重新组合双亲本的优良遗传信息，已经成了改良生物特性、创造新的符合人类需要的动植物新细胞、新株系的重要手段。

复习思考题

1. 什么是细胞工程？其主要优势是什么？
2. 细胞工程的研究领域包括哪些方面？
3. 如何从一片嫩叶经组织培养培育出众多的完整植株？
4. 植物细胞融合的步骤及方法？
5. 人工种子包括哪几部分？如何制备人工种子？
6. 简述动物细胞工程所涉及的主要领域。
7. 采用什么方法可以分别去除革兰氏阴性细菌和革兰氏阳性细菌的细胞壁？



第 6 章

基因工程

6.1 基因工程的基本知识

6.1.1 基因工程的概念

在漫长的生物进化过程中, 基因重组从来没有停止过。在自然力量作用下, 通过基因突变、基因转移和基因重组等途径, 推动生物界不断的进化, 使物种趋向完善, 出现了今天具有不同特性的繁多物种, 有的能忍耐高温, 有的不怕严寒, 有的能适应干旱的沙漠, 有的可在高盐度的海滩上或海水中生存繁殖, 有的能固定大气中的氮素……这些都为自然界提供了丰富的生物资源。但是地球上没有一种生物是完美无缺的, 这就促使科技工作者对生物加以研究改造。

按照人们的愿望, 进行严密的设计, 通过体外 DNA 重组、转基因、基因组改造、细胞核移植等技术, 有目的地改造生物种性, 使现有物种在较短的时间内趋于完善, 创造出新的生物类型, 这就是基因工程的基本工作。

6.1.2 基因工程的发展简史

基因工程的发展过程, 也是人类探究自然界生物和人类自身遗传奥秘的过程。

1968 年, 沃纳·阿尔伯博士、丹尼尔·内森斯博士和汉密尔·史密斯博士第一次从大肠杆菌中提取出了限制性内切酶。限制性内切酶能够在 DNA 上寻找特定的“切点”, 认准后将 DNA 分子的双链交错地切断, 并可以完整地切下个别基因。至 21 世纪初, 人们已经分离提取了上千种限制性内切酶, 其中许多限制性内切酶的特定识别切点已被弄清。有了形形色色的限制性内切酶, 人们就可以随心所欲地进行 DNA 分子长链的切割了。由于限制性内切酶的发现, 阿尔伯、史密斯和内森斯共享 1978 年诺贝尔生理和医学奖。

1967 年, 科学们在 5 个实验室里几乎同时发现并提取出一种酶, 这种酶可以将两个 DNA 片段连接起来, 修复好 DNA 链的断裂口。1974 年以后, 科学界正式肯定了这一发现, 并把这种酶叫做 DNA 连接酶。只要在用同一种限制性内切酶剪切的两种 DNA 碎片中加上 DNA 连接酶, 就会把两种 DNA 片段重新连接起来。

1973 年, 美国斯坦福大学教授科恩从大肠杆菌里取出两种不同的质粒, 它

们各自具有一个能够抵抗抗菌素药的基因。将这两个基因分别“裁剪”下来，再把这两个基因“拼接”在同一个质粒中。新的质粒叫“杂合质粒”。当这种杂合质粒进入大肠杆菌体内后，这些大肠杆菌就能抵抗两种药物，而且这种大肠杆菌的后代都具有双重抗药性。这表示“杂合质粒”在大肠杆菌的细胞分裂时也能自我复制。它标志着基因工程的首次胜利。

1974年，科恩又把金黄色葡萄球菌的质粒（上面具有抗青霉素的基因）和大肠杆菌的质粒“拼接”成杂合质粒，送入大肠杆菌体内，使这种大肠杆菌获得了对青霉素的抗药性。这说明金黄色葡萄球菌质粒上的抗青霉素基因，由杂合质粒带到大肠杆菌体内，更重要的是表明外来基因在大肠杆菌体内同样也发生作用。这在专业上称为表达。此后，科恩又将非洲爪蟾的DNA与大肠杆菌的质粒“拼接”，获得成功，拼接后的杂合质粒进入大肠杆菌，产生了非洲爪蟾的核糖体核糖核酸（rRNA）。两栖动物的基因能在细菌里发挥作用，也能在细菌里不断复制的事实说明，基因工程完全可以不受生物种类的限制，而按照人类的意愿去拼接基因，创造新的生物。

科恩随后以DNA重组技术发明人的身份向美国专利局申报了世界上第一个基因工程的技术专利。科恩的实验首次打破了不同物种在亿万年中形成的天然屏障，他的成功标志着任何不同种类生物学基因都能通过基因工程技术重组到一起，人类可以根据自己的意愿定向地改造生物的遗传特性，甚至创造新的生命类型。科恩获得专利技术的消息引起全球轰动，在短短几年中，世界上许多国家的上百个实验室开展了基因工程的研究。

随着科恩及其同事利用重组DNA技术从哺乳动物基因组中切割了一个基因，植入大肠杆菌获得成功后，投资家鲍勃·斯旺森说服博耶成立遗传技术公司——世界上第一家利用重组DNA技术制造蛋白质用于治疗人体疾病的公司，它于20世纪70年代在美国诞生，生物工程从此步入产业化。

1983年，世界上第一例转基因植物在美国成功培植。1996年转基因作物首次商业性种植，到2002年全世界共有16个国家种植转基因作物，转基因作物种植面积已达到5870万 hm^2 。全世界已经有近50个国家开展了转基因植物田间实验，涉及60多种植物。21世纪初期在美国，转基因食品高达4000多种，已成为人们日常生活的普通商品。

1990年10月1日美国国会批准正式启动人类基因组计划，为期15年，总投资30亿美元。人类基因组计划与曼哈顿原子弹计划和阿波罗登月计划一起被称为20世纪三大科学工程。2003年4月美国联邦国家人类基因组研究项目负责人弗朗西斯·柯林斯博士在纽约隆重宣布，人类基因组序列图绘制成功，人类基因组计划的所有目标全部提前实现。经过13年的努力，人类在揭示生命奥秘、认识自我的漫漫长路上迈出了重要的一步。

6.1.3 基因工程的巨大意义

基因工程技术的出现,彻底改变了传统生物科学技术的被动状态,使得我们可以克服物种之间的遗传屏障,按照人们的愿望,产生出人类需要的基因产物,或者定向培养或创造出自然界所没有的新的生命形态,以满足人们的要求。基因工程可以打破不同物种间在亿万年中形成的天然屏障,无论是植物、动物、微生物之间,甚至在人与动物、植物之间,任何不同种类生物的基因都有可能通过基因工程技术而组合到一起。人类由此进入了激动人心的基因工程时代。

6.2 基因工程的流程

6.2.1 基因工程的基本流程及步骤

基因工程是一项非常复杂的技术操作,它的环节之繁多、操作之细致是其他工程所无法比拟的。但是如果抛开细节问题,基因工程操作流程还是比较明了的。它的基本步骤可以大致归纳如下几点(图6-1)。

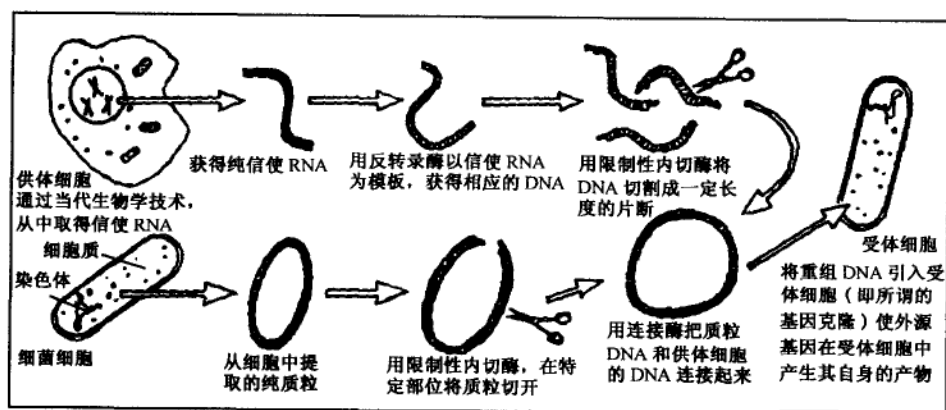


图 6-1 基因工程操作流程

(1) 获取目的基因: 利用各种不同的限制性内切酶切割下人们所需要的基因, 也就是某些 DNA 片段。那里面含有一种或几种遗传信息的全套遗传密码。获取目的基因是基因工程操作的关键。

(2) 获取基因载体: 用人工方法, 取得目的基因的适宜载体, 即质粒或病毒。载体一般带有必要的标志基因, 以便进行检测。

(3) 重组 DNA: 即用人工方法, 让目的基因与载体相结合, 首先要用限制性内切酶和其他一些酶类, 切割或修饰载体 DNA 和目的基因, 然后用 DNA 连

接酶将两者连接起来,使目的基因插入载体内,形成重组 DNA 分子。这些工作都在生物体外进行,所以基因工程操作又叫体外 DNA 重组。从这里就可以看出工具酶的重要性,没有它们,重组工作就寸步难行。

(4) 把重组 DNA 导入受体细胞进行扩增:即用人工方法,让携带着目的基因的运载体进入新的生物细胞里,让其增殖,由此形成重组 DNA 的无性生殖系(即克隆)。

(5) 筛选与培育:即基因表达产物的鉴定、收集和加工等一系列复杂过程的综合。前几步工作是播种,这一步工作则是收获。

6.2.2 基因克隆

基因是细胞内 DNA 分子上具有遗传效应的特定核苷酸序列的总称,是具有遗传效应的 DNA 分子片段。基因控制蛋白质合成,是不同物种以及同一物种的不同个体表现出不同的性状的根本原因。基因通过 DNA 复制及细胞分裂把遗传信息传递给下一代,并通过控制蛋白质的合成使遗传信息得到表达。

基因克隆技术包括一系列技术,大约建立于 20 世纪 70 年代初期。美国斯坦福大学的伯格(P. Berg)等人于 1972 年把一种猿猴病毒的 DNA 与 λ 噬菌体 DNA 用同一种限制性内切酶切割后,再用 DNA 连接酶把这两种 DNA 分子连接起来,于是产生了一种新的重组 DNA 分子,从此产生了基因克隆技术。1973 年,科恩(S. Cohen)等人把一段外源 DNA 片段与质粒 DNA 连接起来,构成了一个重组质粒,并将该重组质粒转入大肠杆菌,第一次完整地建立起了基因克隆体系。

一般来说,基因克隆技术包括把来自不同生物基因同有自主复制能力的载体 DNA 在体外人工连接,构建成新的重组 DNA,然后送入受体生物中去表达,从而产生遗传物质和状态的转移和重新组合。因此基因克隆技术又称为分子克隆、基因的无性繁殖、基因操作、重组 DNA 技术以及基因工程等。

单就“克隆”一词而言,可以指克隆技术,但通常指单一分子或细胞的大量的完全相同的后代。对基因来说,某个基因的大量完全相同的后代即为该基因的克隆。在转基因植物技术中,对分离出来的有用基因,进行大量克隆,然后利用这些基因克隆,进入下一步的操作。

6.3 基因工程原理

6.3.1 目的基因的分离

基因工程的主要目的是通过优良性状相关基因的重组,获得具有高度应用价

值的新物种。为此必须从现有生物群体中,根据需要分离出可用于克隆的此类基因。这样的基因通常称之为目的基因。目的基因是人们需要的基因,一般也是接受目的基因的细胞或个体原本没有的基因。

目的基因是在 DNA 分子上的片段,这就需要对 DNA 分子进行切割以获得人们所需的基因片段。目前人们对 DNA 分子进行切割的工具是限制性内切酶。限制性内切酶是一类以环状或线形双链 DNA 为底物,能识别 DNA 中特定核苷酸序列,并在合适反应条件下使每条链的一个磷酸二酯键断开,产生 3'-OH 和 5'-P 基团 DNA 片段的内脱氧核苷酸酶。如果两个不同的 DNA 分子可被同一种限制性内切酶切割,两个 DNA 生成的片段可彼此通过相同的黏性末端上的核苷酸碱基互补相连在一起,再经 DNA 连接酶作用将两条链上的接口处的相邻核苷酸连接起来,产生 3', 5'-磷酸二酯键,形成重组 DNA 分子。

6.3.2 选择载体

1. 载体的条件

目的基因分离完成之后,这些外源基因必须先同某种传递者结合之后才能进入细菌和动植物受体细胞,这种能承载外源 DNA 片段(目的基因)带入受体细胞的传递者称之为载体。载体是通过自身的 DNA 和目的基因的 DNA 重组形成一个新的 DNA(重组体)而携带目的基因的。

作为载体一般要具备以下条件:①具有能使外源 DNA 片段组入的克隆位点;②能携带外源 DNA 进入受体细胞并具有可在受体细胞中正常存在的能力,如随着受体细胞分裂而扩增和正常的表达;③载体还要在携带目的基因时有供筛选的标志,使人们能将携带有目的基因的载体和没有携带目的基因的载体区分开。

2. 载体的种类

构建应用的载体有质粒载体、病毒载体,以及由它们互相组合或者与其他基因组 DNA 组合而成的载体。

1) 质粒载体

质粒载体是最早发展起来的一类载体,以质粒 DNA 为基础构建而成,是微生物和植物转基因研究的主要载体。

质粒是一种寓于宿主细胞中染色体以外的裸露 DNA 分子,广泛存在于细菌之中,在某些蓝藻、绿藻和真菌细胞中也存在质粒。一个质粒就是一个 DNA 分子,多数以超螺旋环状共价双链分子形式存在。

大肠杆菌的质粒是 DNA 重组使用最早和最多的质粒。例如 pBR322 是人工

构建的质粒, 4 363 个碱基对, 有可供作筛选标志的抗四环素和抗青霉素基因, 在不携带目的基因时, 含有这种质粒的大肠杆菌不能被青霉素或四环素杀死, 当其中一种抵制抗生素如四环素的基因被所携带的目的基因插入分开后, 原有的抗四环素能力消失, 在含有四环素的培养基上不能生长。由此可将携带有目的基因的大肠杆菌挑选出来。自然界大肠杆菌质粒可自由地在大肠杆菌细胞之间进出, 只要所携带的目的基因长度适合, 这一能力不受影响, 所以很容易将目的基因带入受体细胞。操作时只需将携带有目的基因的质粒和受体细胞混合在一起放置一段时间即可。

2) 病毒载体

病毒自由出入宿主细胞的能力几乎人人皆知。将遗传物质是 DNA 的病毒用做载体取得了成功。有一类专门杀灭细菌的病毒, 又叫噬菌体。 λ 噬菌体是大肠杆菌中的一种噬菌体, 双链线状 DNA, 48 502 个碱基对, 两端有黏性末端, 在受体细胞中能自动成为环状。噬菌体和质粒不同之处在于, 噬菌体不仅有 DNA, 外部还有蛋白质壳, 但噬菌体进入受体细胞(宿主)的仅仅是 DNA 部分。噬菌体的 DNA 进入宿主细胞后可插入到宿主的 DNA 中, 然后和宿主的 DNA 一起进行表达, 由于噬菌体 DNA 的插入, 改变了宿主 DNA 的序列组织结构, 使得宿主的 DNA 转变成成为噬菌体繁殖期的 DNA。最终结果是噬菌体得到繁殖, 而宿主细胞消失。如果将噬菌体 DNA 的一部分用目的基因取代, 同时不影响噬菌体 DNA 随着宿主 DNA 一起增殖的能力, 宿主细胞也不被破坏, 这样的噬菌体可被用做 DNA 重组载体。为了克服噬菌体无筛选标志的缺陷, 常将质粒的筛选标志基因移植到噬菌体中。

将质粒和病毒载体做比较, 在宿主中目的基因所处的状态不同。质粒载体中的目的基因和质粒一起独立存在, 这相当于在宿主细胞中增加了一条 DNA, 而病毒载体中的目的基因是和病毒基因一起插入在宿主的 DNA 中, 宿主细胞的 DNA 分子数没有增加。

6.3.3 目的基因和载体连接形成重组体

目的基因导入受体细胞之前, 一般需先把含目的基因的 DNA 片段组入合适的克隆载体。为选用合适的载体, 必须注意以下几点: ①为了使组入的目的基因能够在受体细胞中有效表达, 应选用具有较强表达能力的核苷酸序列片段的载体, 除非目的基因本身已具备在受体细胞内较强的表达能力。②选用的载体应便于同含有目的基因的 DNA 片段进行连接。③根据确定的受体系统, 选用相应的载体, 因为用做受体细胞的不同生物类型有各自适用的载体。

目的基因和载体的连接是 DNA 重组技术的关键, 这一过程是在 DNA 连接酶的催化下进行的。能催化两个 DNA 片段末端之间—P 基团和—OH 基团形成

磷酸二酯键,使两末端连接的酶称为 DNA 连接酶。通过 DNA 连接酶,使分离出的含有目的基因的 DNA 片段与载体 DNA 通过磷酸二酯键连接在一起形成重组 DNA 分子。DNA 连接酶在 DNA 重组中发挥着重要作用。

6.3.4 将重组体引入受体细胞

目的基因能否有效地导入受体细胞,取决于是否选用合适的受体细胞、合适的载体和合适的基因转移方法。

1. 受体细胞

所谓受体细胞,从实验技术上讲是能摄取外源 DNA 并使其稳定表达的细胞;从实验目的上讲是有应用价值和理论研究价值的细胞。原核生物细胞、植物细胞和动物细胞可以作为受体细胞,但不是所有细胞都可以作为受体细胞。原核生物细胞是一类很好的受体细胞,容易摄取外界的 DNA,增殖快,基因组简单,便于培养和基因操作,普遍被用作互补 DNA 文库和基因组文库的受体菌,或者用来建立生产目的基因产物的工程菌,或者作为克隆载体的宿主。用做基因克隆受体的原核生物主要是大肠杆菌,蓝藻和脓杆菌等也被广泛应用。真核生物细胞作为基因克隆受体近来已受到很大的重视,如酵母和某些动植物的细胞。由于酵母的某些性状类似原核生物,所以较早就被用作基因克隆受体。虽然动物细胞也已被用做受体细胞,但由于体细胞不易再分化成个体,所以采用生殖细胞、受精卵细胞或胚细胞作为基因转移的受体细胞,由此培养成转基因动物。不过最近通过体细胞培养也生成了多种克隆动物,由此可见动物体细胞同样可以用做基因克隆的受体细胞。植物细胞作为基因克隆的受体细胞,有其优于动物细胞的特点,一个活的离体细胞在合适的培养条件下比较容易再分化成植株,意味着一个获得外源基因的体细胞可以培养成能传代的植株,成为转基因植物。由于这个原因,近年来植物基因工程发展非常迅速。

2. 重组 DNA 进入受体细胞

重组后的 DNA 进入受体细胞后才可能得到表达。重组 DNA 能否顺利进入受体细胞并得到表达,取决于以下因素:①使用的受体细胞。如向动物卵细胞显微注射,成功率在 50%左右。②导入的方法。③导入的重组 DNA 在受体细胞中是否受到排斥。④导入的重组 DNA 在受体细胞中表达的条件是否具备。

下面就重组 DNA 分子导入不同受体细胞的方法做简单介绍。

1) 重组 DNA 分子导入原核生物细胞

大肠杆菌是用得最广泛的基因克隆受体,可以通过转化、转导和三亲本杂交等途径,把重组 DNA 分子导入受体细胞。

(1) 转化途径 携带基因的外源 DNA 分子通过与膜结合进入受体细胞,并在其中稳定维持和表达的过程称为转化。DNA 转化大肠杆菌的技术路线包括制备感受态细胞和转化处理。

感受态细胞指处于能摄取外界 DNA 分子的生理状态的细胞。为制备感受态细胞,在最适培养条件下培养受体菌至对数生长期后期,离心收获菌体,将其悬浮在含 CaCl_2 (50~100mmol/L) 的无菌缓冲液中,置冰浴中 15min 后,离心沉淀,再次悬浮在含 CaCl_2 的缓冲液中,4℃下放置 12~14h,便成为可用于转化的感受态细胞。

向新制备的感受态受体细胞悬浮液中加入重组 DNA 溶液,使 CaCl_2 终浓度为 50mmol/L,置于冰水浴中 1h 左右,转移至 42℃水浴中放置 2min,促进受体细胞吸收 DNA,马上振荡培养 30~60min,就可以接种在选择培养基上筛选克隆子。

(2) 转导途径 通过噬菌体(病毒)颗粒感染,把 DNA 导入被感染的受体细胞的过程称为转导。含目的基因的 DNA 与噬菌体载体的重组 DNA 分子导入受体细胞,一般先需进行体外包装。为此,根据 λ 噬菌体体内包装的原理,获得了分别缺 D 蛋白和 E 蛋白 λ 噬菌体突变株的两种溶源菌。这两种溶源菌单独培养,因各缺一种包装必备的蛋白质,所以体内即使有 λ DNA 也不能进行包装,因此细胞内积累了大量除一种以外的其他供包装用的蛋白质。如果在试管内混合两种溶源菌合成的蛋白质, D 蛋白和 E 蛋白互相补充,就可以包装 λ DNA 或重组的 λ DNA。

(3) 重组 DNA 分子通过三亲本杂交转化大肠杆菌 当重组 DNA 分子不能直接转化受体菌时,可采用三亲本杂交转化法。将转化的受体菌、含重组 DNA 分子的供体菌和含广泛宿主辅助质粒的辅助菌三者进行共培养,在辅助质粒的作用下,重组 DNA 分子被转移到受体菌细胞内,按照重组 DNA 分子携带的选择标记筛选克隆子。

外源 DNA 通过上述 3 种方法导入大肠杆菌的技术已趋于成熟。其中有的方法加以适当修改可以用于蓝藻、固氮菌和脓杆菌等其他原核生物的基因转移。

2) 重组 DNA 分子导入真核生物细胞

由于真核生物的细胞结构较为复杂,适用于原核生物基因转移的方法不能有效地用于真核生物。因此,近年来经过探索,发展了多种适用于植物和动物转基因的方法。

(1) 重组 DNA 分子导入植物细胞

① 用致癌脓杆菌介导的 Ti 质粒载体转化法 含有 Ti 质粒的致癌脓杆菌与一些植物的细胞接触后, Ti 质粒的一部分(T-DNA)可以导入植物细胞,整合到植物基因组 DNA,随其复制而复制。根据这一特性可构建一系列 Ti 质粒载体,与含目的基因的 DNA 片段重组,导入致癌脓杆菌,再采用叶盘转化法、原

生质体共培养转化法和悬浮细胞共培养转化法，通过致癌脓杆菌介导法进入植物细胞。

叶盘转化法：将实验植物材料的叶片进行表面灭菌，用无菌的打孔器从叶片上取下圆形小片，接种含 Ti 质粒载体重组 DNA 的致癌脓杆菌。由圆形小片长出的愈伤组织通过筛选培养和再分化培养就可以获得转基因植株。与此类似的方法是将致癌脓杆菌接种在植物新产生的伤口，同样可获得转基因植株。

原生质体共培养转化法：取含 Ti 质粒载体重组 DNA 的致癌脓杆菌，同刚再生细胞壁的植物原生质体进行短暂的共培养，使重组 DNA 导入细胞，经筛选和再分化培养获得转基因植株。

悬浮细胞共培养转化法：此方法类似原生质体共培养转化法，不同的是首先建立植物悬浮细胞系。

用致癌脓杆菌介导法已获得了一些转基因植物，但是一般局限于双子叶植物。

② **重组 DNA 的直接转移法** 为克服致癌脓杆菌介导法的受体局限性，近来发展了电穿孔法、微弹轰击法、激光微束穿孔法、多聚物介导法和花粉管通道法等，把重组 DNA 分子直接导入植物细胞。采用的载体不限于 Ti 质粒载体。

电穿孔法：细胞膜的基本组成是磷脂，在适当的外加脉冲电场作用下，细胞膜被击穿，但还不至于使细胞受到伤害。所以当移去外加电场后，被击穿的膜孔可自行复原。根据这一性质，植物原生质体同外源 DNA 分子混合，置于电位仪的样品室中，按预定的参数进行直流电脉冲处理，再通过常规的再分化培养和筛选，可获得转基因植株。为避免制备原生质体和原生质体再生植株的困难，用此技术直接处理具有完整细胞壁的植物细胞、愈伤组织和花粉粒，均取得一定的效果。

微弹轰击法：金属微粒在外力作用下达到一定速度后，可以进入植物细胞，但又不导致细胞受到伤害，仍能维持正常的生命活动。利用这一特性，先将含目的基因的外源 DNA 同钨、金等金属微粒混匀，使 DNA 吸附在金属微粒表面，随后用基因炮轰击，使 DNA 随高速金属微粒进入植物细胞。此方法可直接处理植物某器官或某组织，是当今普遍使用的植物转基因方法。

激光微束穿孔法：利用直径很小、能量很高的激光微束可引起细胞膜可逆性穿孔的原理，在荧光显微镜下用激光处理细胞，处于细胞周围的重组 DNA 随之进入细胞。此方法最适用于活细胞中线粒体和叶绿体等细胞器的基因转移。

多聚物介导法：聚乙二醇 (PEG)、多聚赖氨酸和多聚鸟氨酸等是协助 DNA 转移的常用多聚物，尤以 PEG 应用最广。这些多聚物同二价阳离子 (Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Mn^{2+}) 和 DNA 混合，可在原生质体表面形成颗粒沉淀，使 DNA 进入细胞内。

花粉管通道法：将重组 DNA 涂于授粉的柱头上，使 DNA 沿花粉管通道或传递组织通过珠心进入胚囊，转化尚不具有正常细胞壁的卵、合子和早期的胚胎细胞，在活体内产生转基因种子。

(2) 重组 DNA 分子导入哺乳动物细胞 哺乳动物的细胞不易从周围捕获外源 DNA，明显地影响了哺乳动物转基因的发展。近年来通过研究发展了一些能有效地将外源 DNA 分子导入哺乳动物细胞的方法，主要有以下几种。

病毒颗粒转导法 由于病毒的种类繁多，用病毒 DNA 或 RNA 构建的载体性质各异，所以转导的过程各有不同，主要有三种类型：其一，带有目的基因的病毒颗粒直接感染受体细胞，目的基因随同病毒 DNA 分子整合到受体细胞染色体 DNA 上；其二，带有目的基因的病毒基因组是缺陷型的，需同另一辅助病毒一起感染受体细胞；其三，虽然带有目的基因的病毒基因组是缺陷型的，但是被感染的受体细胞的基因组中已整合了病毒缺失的基因，所以没有必要用辅助病毒混合感染。

磷酸钙转染法 哺乳动物细胞能捕获黏附在细胞表面的 DNA-磷酸钙沉淀物，使 DNA 转入细胞。先将待转染的重组 DNA 同 CaCl_2 混合制成 CaCl_2 -DNA 溶液，随后逐滴缓慢加入 Hepar-磷酸钙溶液中，形成 DNA-磷酸钙沉淀，黏附在培养的细胞表面上，达到转染目的。

DEAE-葡萄糖转染法 DEAE-dextran (二乙胺乙基葡萄糖) 是一种高分子量的多聚阳离子试剂，能促进哺乳动物细胞捕获外源 DNA 分子，基本操作过程主要有两种方式：其一，先使病毒的 DNA 直接同 DEAE-葡聚糖混合，形成 DNA-DEAE-葡聚糖复合物，再处理受体细胞；其二，受体细胞先用 DEAE-葡聚糖溶液预处理，随后再同 DNA 接触，也可达到转染目的。

显微注射转基因技术 鉴于哺乳动物细胞便于注射的特性，常应用显微注射法把外源 DNA 分子直接注入细胞。获得稳定转化子的数量取决于注射的 DNA 分子。

6.3.5 筛选出含有重组体的克隆子

受体细胞经转化、转染或转导处理后，真正获得目的基因并能有效表达的克隆子一般来说只是一小部分，而绝大部分仍是原来的受体细胞，或者是不含目的基因的克隆子。为了从处理后的大量受体细胞中分离出真正的克隆子，需要对受体细胞进行筛选和鉴定。目前对受体细胞进行筛选和鉴定的方法，主要有以下几种：

(1) 利用载体携带的选择标记基因筛选克隆子 不同载体通常分别携带不同的抗性基因。当含任何一种抗生素抗性基因的载体与目的基因的重组 DNA 处理不具有这种抗性基因的受体细胞，并在含相应抗生素的培养基上培养时，只有获

得重组体的受体细胞才能继续生长, 这样可筛选出含重组体的克隆子。

(2) 利用报告基因筛选克隆子 对于那些不宜用克隆载体选择标记筛选克隆子的受体细胞, 往往在含目的基因的 DNA 片段与载体连接之前, 先在目的基因上游或下游连接一个报告基因。这样的重组 DNA 导入受体细胞后, 可根据报告基因的表达产物筛选克隆子。

(3) 免疫学方法 以目的基因在受体细胞中表达的产物为抗原, 以该基因产物的免疫血清作抗体, 通过抗原和抗体之间的免疫反应将含有目的基因的细胞筛选出来。

(4) 电泳法 将受体细胞中插入目的基因 DNA 和没有插入目的基因 DNA 的受体细胞进行电泳, 由于前者的相对分子量比后者大, 所以可以将重组体筛选出来。

6.4 基因工程与食品工业

6.4.1 转基因食品概念

从狭义上说, 通过基因工程手段将一种或几种外源性基因转移至某种特定生物体(动物、植物和微生物等)中, 并使其有效地表达出相应的产物(多肽或蛋白质), 这样的生物体直接作为食品或以其为原料加工生产的食品就叫做转基因食品。这里所指“外源性基因”, 通常为受体生物体中原本没有的。因此转移了外源基因的生物体会因产生原来不存在的多肽或蛋白质而出现新的生物学和生理学特性, 专业上称为新的表现型。一种生物体新的表现型的产生除可采用转基因技术外, 还可采用对生物体本身基因修饰的办法。一个基因修饰后会改变“模样”, 其表达产物与不修饰时不同, 在效果上等同于转基因, 这是广义上的转基因食品。

例如, 人们可以用鲜鱼的基因帮助番茄、草莓等普通植物来抵御寒冷; 把某些细菌的基因接入玉米、大豆的植株中, 就可以更好地保护它们不受害虫侵袭。而以这些转基因生物为原料加工生产的食品就是转基因食品。转基因技术能够提高农作物的抗病虫害和抗杂草能力, 减少农药和除草剂的使用, 使农作物的生产成本大大降低。还可以培育出营养成分更高, 有晚熟、保鲜功能的转基因农产品。

6.4.2 转基因食品的类型

转基因牛羊、转基因鱼虾、转基因粮食、转基因蔬菜和转基因水果在国内外均已培育成功并已投入食品市场。据资料表明, 2002 年全球共有 16 个国家种植转基因作物, 种植面积达 5 870 万 hm^2 。

世界上第一种转基因食品是 1993 年投放美国市场的番茄。随后的几年中,

动物来源的、植物来源的和微生物来源的转基因食品发展非常迅速,各种类型转基因食品应运而生。到目前为止,大致可以分成以下几种类型:

(1) 增产型 农作物增产与其生长分化、肥料、抗逆、抗虫害等因素密切相关,故可转移或修饰相关的基因达到增产效果。

(2) 控熟型 通过转移或修饰与控制成熟期有关的基因,可以使转基因生物成熟期延迟或提前,以适应市场需求。最典型的例子是延迟成熟速度,不易腐烂,好贮存。

(3) 高营养型 许多粮食作物缺少人体必需的氨基酸,为了改变这种状况,可以从改造种子贮藏蛋白质基因入手,使其表达的蛋白质具有合理的氨基酸组成。现已培育成功的有转基因玉米、土豆和菜豆等。

(4) 保健型 通过转移病原体抗原基因或毒素基因至粮食作物或果树中,人们吃了这些粮食和水果,相当于在补充营养的同时服用了疫苗,从而起到了预防疾病的作用。有的转基因食物可防止动脉粥样硬化和骨质疏松。一些防病因子也可由转基因牛羊奶得到。

(5) 新品种型 通过不同品种间的基因重组可形成新品种,由其获得的转基因食品可能在品质、口味和色香方面具有新的特点。

(6) 加工型 由转基因产物作原料加工制成,花样最为繁多。

6.4.3 转基因食品的优点

基因技术的突破使科学家们得以用传统育种专家难以想像的方式改良农作物,其优点是显而易见的。第一,可降低生产成本。一个品种的基因加入另一种基因,会使该品种的特性发生变化,具备原品种所不具备的因子,从而增强了抗病、抗杂草或抗虫害能力,由此可减少农药和除草剂的用量,降低种植成本。第二,可提高作物单位面积产量。一种作物的基因改良后,更容易适应环境,能更有效抵御各种灾害的侵袭,并使产量更高。第三,转基因技术可以使开发农作物的时间大为缩短。利用传统的育种方法,需要7~8年时间才能培育一个新的品种,而基因工程技术培育出一种全新的农作物品种,时间可缩短一半。

6.4.4 转基因食品的安全

从20世纪80年代世界上第一例转基因植物的诞生,到目前全世界大约有5000万 hm^2 的转基因作物,且利用转基因动物生物反应器大量生产医用蛋白,人类将最新的生物技术应用与医药、食品、农业领域以摆脱自然对传统作业的限制。转基因食品以其独特的品质和特性,深受人们的关注。

随着基因工程的发展和进步,转基因作物的增多和转基因食品的大量上市,一些负面影响也开始显现。

1998年8月,英国阿伯丁的罗威特研究所教授普兹泰发现老鼠食用转基因土豆之后免疫系统受到破坏,普兹泰进一步推论,很多消费者也像被用于试验的老鼠一样食用没有经过严格鉴定的转基因食品。该消息的发布,使世界各国的转基因热潮蒙上了一层阴影。人们开始疑惑:转基因技术是改造自然还是破坏自然?是造福人类还是给人类带来灾难性的毁灭?不过,后来英国皇家学会专门组织了评审,指出这项实验有6条缺陷。

1999年5月,英国的权威科学杂志《自然》刊登了美国康奈尔大学副教授约翰·罗西的一篇论文,引起世人的震惊。论文说把抗虫害转基因玉米——BT基因玉米的花粉撒在苦苣菜叶上,然后让君主斑蝶的幼虫啃食这些菜叶。4d之后,有44%的幼虫死亡,活着的幼虫身体较小,而且无精打采。而另一组啃食撒有普通玉米花粉的菜叶,则未出现死亡高或发育不良的现象。论文据此推断,BT转基因玉米花粉含有毒素。

BT转基因玉米是为玉米抗病虫害能力而培育的,其培育方法是向玉米种子中植入一种可以有效杀伤危害玉米害虫的基因。一些科学家认为,植入BT基因使玉米能够产生杀伤害虫的物质,从而具有抗虫害能力,但也因此而具有了毒性。这对生态环境造成不利的影响。

那么,人们怀疑,转基因农作物和以此为原料制造的转基因食品对人体是否也有危害,比如,具有抗虫害、自动除杂草的转基因作物其作用机理与传统农药有无不同,会不会将有毒性的物质“传送”给消费者的有机体系?此外,某种转基因食品可以抵御细菌入侵,那么是否会使我们体内外的细菌产生变异而对所有的抗生素产生免疫力?这些问题尚无法做出明确的解释。并且,英国的研究人员近来在实验室中证实:小白鼠在食用转基因土豆10d后,白鼠的肾、脾和消化道都出现了损伤。这就更加深了人们的恐惧心理。

利用转基因技术人为地打破自然界世代沿袭的性状平衡,究竟会带来什么样的后果?基于以上疑虑,基因工程生物安全性的评价成为人们日益关注的焦点。

转基因植物的安全性评价:一方面是环境安全性,另一方面是食品安全性。

环境安全性评价的核心问题是转基因植物释放到田间后,是否会将被转基因移到野生植物中,是否会破坏自然生态环境,打破原有生物种的动态平衡。包括:①转基因植物演变成农田杂草的可能性。②基因漂流到近缘野生种的可能性。③对生物类群的影响。

关于食品的安全性,经和组织(OECD)1993年提出了食品安全性评价的实质等同性原则。如果转基因植物生产的产品与传统产品具有实质等同性,则可以认为是安全的。反之,则应进行严格的安全性评价。在进行实质等同性评价时,一般要考虑以下主要方面:①有毒物质:必须确保转入的外源基因或基因产物对人畜无害。②过敏源:在自然条件下存在着许多过敏源,在基因工程中如果将控

制过敏源形成的基因转入目标植物,则会对过敏源造成不利的影响。利用转基因动物生产出来的药物安全性问题不大,可根据其结构与天然蛋白结构是否一致来判断安全性。

目前,世界主要发达国家和部分发展中国家都制定了各自对转基因生物的管理法规,负责对其安全进行评价和监控。

6.4.5 转基因食品的检测

转基因检测是一项技术性很强的工作,在检测方面,国内仍无统一的标准。

目前我国共有 21 家经农业部核准的权威转基因检测机构。根据我国 2002 年 3 月开始实施的《农业转基因生物标识管理办法》规定,有 17 种产品属转基因生物标识管理范畴,分别是大豆种子、大豆、大豆粉、大豆油、豆粕、玉米种子、玉米、玉米油、玉米粉、油菜种籽、油菜籽、油菜籽油、油菜籽粕、棉花种子、番茄种籽、鲜番茄、番茄酱。

现时,要测试食品中是否含有经过基因改造的成分,或是某农作物是否经过基因改造,主要有两个方法:一是找出是否有外来的基因或 DNA;二是找出是否有外来的蛋白质。其中第一种方法是最常用的方法,它是基于 PCR 技术基础之上,此方法能精确找出样本内是否有外来基因,即使外来基因只占样本的极少量。

6.5 基因工程技术的应用和展望

6.5.1 基因芯片技术及应用

1. 基因芯片的概念

基因芯片,又称 DNA 芯片,是指将许多特定的寡聚核苷酸片段或基因片段作为探针,有规律地排列固定于支持物上,样品 DNA/RNA 通过 PCR 扩增、体外转录等技术掺入荧光标记分子,然后按碱基配对原理进行杂交,再通过荧光检测系统等对芯片进行扫描,并配以计算机系统对每一探针上的荧光信号做出比较和检测,实现对生物样品快速、并行、高效地检测或医学诊断。由于常用硅芯片作为固相支持物,且在制备过程中运用了计算机芯片的制备技术,所以称之为基因芯片技术。

基因芯片技术是随着“人类基因组计划”的进展而发展起来的,是 20 世纪 90 年代中期以来影响最深远的重大科技进展之一。基因芯片技术是融电子学、生物学、物理学、化学、计算机科学为一体的高度交叉的新技术,具有分析速度快、所需样品量少、污染少等特点,既有重大基础研究价值,又有明显的产业化前景。基因芯片技术为“后基因组计划”时期基因功能的研究提供了强有力的工

具,它将会在 DNA 测序、基因表达和基因组图研究、基因诊断、新基因的发现、药物筛选、给药个性化等方面取得重大突破,该技术被评为 1998 年度世界十大科技进展之一。

2. 基因芯片的应用

(1) 测序 基因芯片利用固定探针与样品进行分子杂交产生的杂交图谱而排列出待测样品的序列,这种测定方法快速而且准确率高,具有十分诱人的前景。

(2) 基因表达水平的检测 用基因芯片进行的表达水平检测,它可自动、快速地检测出成千上万个基因的表达情况。

(3) 基因诊断 从正常人的基因组中分离出 DNA 与 DNA 芯片杂交就可以得出标准图谱。从病人的基因组中分离出 DNA 与 DNA 芯片杂交就可以得出病变图谱。通过比较、分析这两种图谱,就可以得出病变的 DNA 信息。这种基因芯片诊断技术以其快速、高效、敏感、经济、平行化、自动化等特点,将成为一项现代化诊断新技术。基因诊断是基因芯片中最具有商业化价值的应用。

(4) 药物筛选 如何分离和鉴定药的有效成分是中药产业和传统的西药开发遇到的重大障碍,基因芯片技术是解决这一障碍的有效手段,它能够大规模地筛选,而且通用性强,能够从基因水平解释药物的作用机理,即可以利用基因芯片分析用药前后机体的不同组织、器官基因表达的差异。基因芯片技术使得药物筛选、新药测试的速度大大提高,成本大大降低,这一技术具有很大的潜在应用价值。

(5) 给药个性化 临床上,同样剂量的药物对病人甲有效可能对病人乙不起作用,而对病人丙则可能有副作用。在药物疗效与副作用方面,病人的反应差异很大。这主要是由于病人遗传学上存在差异,如药物应答基因,导致对药物产生不同的反应。如果利用基因芯片技术对患者先进行诊断,再开处方,就可对病人实施个体化治疗。另一方面,在治疗中,很多同种疾病的具体病因是因人而异的,用药也应因人而异。

(6) 预防医学 在婴儿出生前,可用基因芯片进行有效的产前检查和诊断,防止患有先天性疾病的婴儿出生。而在婴儿出生后,即可采用基因芯片技术来分析其基因图谱,不仅可预测出他日后可以长多高,还可预测其患某些疾病的潜在可能性有多大,以便采取预防措施。

此外,基因芯片在新基因发现、药物基因组图、中药物种鉴定、DNA 计算机研究等方面都有巨大应用价值。

3. 基因芯片技术发展前景

尽管基因芯片技术发展时间不长,但由于芯片技术与传统的杂交技术相比具有检测系统微型化的特点,对样品的需要量非常少,效率高,能高通量检测

DNA 序列, 更好地解释基因之间表达的相互关系及检测基因表达变化的灵敏度高优点, 基因芯片技术的应用前景无疑是非常广阔的。

6.5.2 人类基因组研究

1973 年重组 DNA 技术的问世宣告了现代生物技术的诞生, 它的诞生又推动了生命科学基础研究的进程, 使生命科学从单纯的基础研究与合理开发利用生物资源跃上了改造和创造生命的新阶段, 跃上了单纯基础理论与合理开发利用生物资源相结合的新台阶。“人类基因组计划”的实施就是生物技术在人类基因的基础理论与合理利用、开发人类基因资源的一个极好的例子。

1. 人类基因组计划产生的背景

现代自然科学的发展使人类成为地球上的主宰, 也使人类的健康踏上了新的台阶。如人类根治了天花, 战胜了霍乱等疾病, 控制了麻风病、结核病等不治之症, 人类的平均寿命也由此有了很大的提高。可是与现代自然科学在太空、信息、武器、交通等领域的辉煌成就相比, 人类对自身的认识和保护却不尽如人意。有数据表明, 全球有 20%~50% 的人每天备受各种慢性疾病的折磨。我国 11% 的人患有高血压症; 4.2% 的人有不同程度的残疾; 2.5% 的人智力低下; 肿瘤、心血管疾病等主要死因已成为驱除不掉的幽灵; 艾滋病、疯牛病、禽流感等新的传染病使人们对未知灾难又有了新的恐惧。有鉴于此, 世界各国的生物学家有必要联合起来, 共同研究人类基因组, 提示人类基因的奥秘, 认识人类的遗传信息, 并进而了解人类各种疾病与基因的相互关系, 从而达到从根本上预防人类疾病的发生以及有效治疗人类疾病的目的。

最早提出“人类基因组计划”这一设想的是美国生物学家、诺贝尔奖得主杜尔贝科。他在 1986 年 3 月 7 日出版的《科学》杂志上发表了一篇题为“肿瘤研究的一个转折点: 人类基因组的全序列分析”的短文, 提出包括癌症在内的人类疾病的发生都与基因直接或间接有关, 呼吁科学家们联合起来, 从整体上研究人类的基因组, 分析人类基因组的序列。杜尔贝科的这一倡议引起了生物界和医学界的热烈讨论, 历经 2 年之久。其高潮是美国科学院国家研究委员会任命的一个委员会和美国国会技术评估办公室任命的一个委员会综合分析了各方面的意见, 分别于 1988 年 2 月和 4 月发表研究报告, 支持“人类基因组计划”的研究设想, 并建议美国政府给予资助。美国国会于 1990 年批准了这一项目, 并决定由美国国立卫生研究院和能源部从 1990 年 10 月 1 日起组织实施。计划耗资 30 亿美元, 历时 15 年完成整个研究计划。该项研究计划无论就研究规模、所费财力和社会影响, 都可与曼哈顿原子弹计划、阿波罗登月计划相提并论, 而且已成为一项国际合作项目。包括欧洲、日本、前苏联、印度、中国在内的几十个国家都相继启

动了这一计划。

2. 人类基因组计划的任务

人类基因组指的是人类生殖细胞所包含的全部染色体。

人类基因组计划的最终任务是要破译人体遗传物质 DNA 分子所携带的全部遗传信息。

人类基因组计划是国际生物学界的一项“太空计划”，是对人类智慧的一项挑战。它的终极目标应该阐明人类全部基因的位置、功能、结构、表达调控方式以及与致病有关的变异。所以人类基因组计划的研究成果对生命科学基础研究的影响更将是长期而深远的。

3. 人类基因组计划对医学发展的影响

人类基因组计划是当代生命科学一项伟大的科学工程，它奠定了 21 世纪生命科学发展和现代医药生物技术产业化的基础。

人类是生物界中最高等的生物，人类基因组是生物进化最高级、最复杂的信息库，所以人类基因组计划的实施无疑将大大加速医学科学基础研究的发展。通过对人类基因组的研究将进一步阐明人类基因在时空上的特异性表达及其调控机理，从而推动发育生物学和神经生物学的发展，并揭示细胞分化、胚胎发育、人类思维、人类记忆等复杂的高级生命活动的分子基础。

不同种族、不同民族之间的核苷酸序列必然存在着多态性。人类基因组计划项目的实施，必将向人们提供有关不同种族、不同民族的起源和演进的强有力的分子证据。所以人类基因组计划的实施，将带动种族学和民族学的研究，在分子水平上提示人类各族和民族的起源的演进过程。

人类基因组计划除了在医学科学的基础研究上将做出重大贡献外，在人类的疾病治疗和预防方面也将做出特殊的贡献。从全球的范围看，随着科学的发展，虽然还不能说传染性疾病已得到了完全的控制，但毫无疑问，传染病的危害已大大降低。而与此同时，相应地，遗传病及与遗传有关的疾病，如癌症、心血管疾病、自身免疫性疾病、生物钟、各种老年病将在疾病谱中的比重逐渐加大。人类基因组计划的开展，将使科学家们获得有关这些疾病发病的分子机理，从而根据其发病机理设计相应疾病的治疗手段及预防方针。所以人类基因组计划的开展，将使人们在疾病诊断、基因治疗、遗传保健、优生优育等方面建立全新的人类医学。人类的寿命也将得到进一步的大幅度提高。

4. 人类基因组计划的进展

1990 年 10 月，被誉为生命科学“阿波罗登月计划”的国际人类基因组计划

启动。

1998年5月,一批科学家在美国罗克威尔组建塞莱拉遗传公司,目标是投入3亿美元,到2001年绘制出完整的人体基因图谱,与国际人类基因组计划展开竞争。

1999年9月,中国获准加入人类基因组计划,负责测定人类基因组全部序列的1%,也就是3号染色体上的3000万个碱基对。

经过多国科学家的共同努力,1999年11月23日,美国国家科学院的官员和参加人类基因组计划的科学家们庆祝人类基因组计划公众DNA测序工作完成第10亿个碱基对的测定。

1999年12月1日,国际人类基因组计划联合研究小组宣布,他们完整地译出人体第22对染色体的遗传密码,这是人类首次成功地完成人体染色体基因完整序列的测定。研究显示,第22对染色体与免疫系统、先天性心脏病、精神分裂、智力迟钝和白血病以及多种癌症相关。完成对第22对染色体的测定将对这些疾病的早期诊断和治疗起到帮助作用。这一成果是宏大的人类基因组计划的一个里程碑。

2000年3月14日,美国总统克林顿和英国首相布莱尔发表联合声明,呼吁将人类基因组研究成果公开,以便世界各国的科学家都能自由地使用这些成果。他们是针对一些私营生物技术公司为了商业利益而与国际人类基因组计划展开竞争,并试图将自己的研究成果申请专利而发出此声明的。

2000年4月,我国科学家按照国际人类基因组计划的部署,完成了1%人类基因组的工作框架图。

经美国、英国、日本、法国、德国和中国共16个测序中心或协作组的共同努力,完成工作草图的目标已经实现。到2000年4月15日止得到的完成序列达586Mb,占人类基因组18.2%。工作草图序列达2327.6Mb,覆盖了人类基因组的72.4%,两者相加已达到90%的预定目标。

2000年5月,由德国和日本等国科学家组成的国际科研小组宣布,他们已经基本完成了人体第21对染色体的测序工作。

2000年6月,各国科学家公布了人类基因组工作草图,人类基因图谱正式面世,其数目大约在3.5万个左右,比过去估计的数目少得多。

5. 我国的人类基因组计划

1993年,国家自然科学基金委员会设立“中华民族基因中若干位点基因结构的研究”标志着我国人类基因组计划正式启动。1998年开始,国家在3年内加大了对人类基因组项目的投资力度,其投资总额近3亿元。1999年7月,我国在国际人类基因组注册,承担了其中1%的测序任务,也就是3号染色体上的

3 000 万个碱基对,使中国成为继美、英、日、德、法之后第六个国际人类基因组计划参与国,也是参与这一计划的唯一发展中国家。2000 年 4 月末,我国科学家按照国际人类基因组计划的部署,完成了 1%人类基因组的工作框架图。

我国人类基因组研究没有走国外全基因组或整条染色体做图、测序的路线,而是根据我国的经济实力和基因资源优势的特点,除完成 3 号染色体 3 000 万个碱基对即 1%的测序任务外,主要在两个方面开展工作——基因组多样性和疾病基因的识别,并围绕这两个方面引进基因研究新技术。

经过科学家们的努力,我国人类基因组计划研究取得了显著的成绩。在基因组多样性研究,即多民族基因组保存和研究方面,我国已完成了南、北方两个汉族群和西南、东北地区傣族、藏族、壮族等 12 个少数民族共 733 个永生细胞株的建立;应用多种遗传标志对我国多民族基因组的多样性进行了比较,验证了我国南北人群之间的差异和进化上的联系。在基因研究新技术引进和建立方面,形成了包括做图、测序、定位、基因识别、基因组扫描、生物信息学等比较完整的基因组研究技术体系。在疾病基因研究方面,首次发现神经性耳聋的致病基因,并克隆到定位于 11 号染色体的多发性外生性骨疣的致病基因;获得了与心血管系统、神经系统、造血系统发育、分化和基因表达调控相关的约 100 个全长新基因;定位了鼻咽癌在染色体上的杂合丢失区域;对原发性高血压、精神病等多基因病患者及其家系或同胞对进行全基因组扫描,发现了一些与其发病相关的位点,还发现了与原发性高血压相关的新基因;克隆了若干白血病致病基因,获得了一批与食管癌有关的 DNA 片段;发现了若干和肝癌有关的全长新基因;克隆了数百条来自造血、内分泌、神经、心血管、生殖系统或与发育、分化以及与信号传导有关的新基因的全长 cDNA。

6.5.3 基因工程的应用

1. 转基因动物

20 世纪 80 年代初,美国的哥登用显微注射法向动物胚胎转移外来基因,生产出带有外源性脑苷激酶基因的小白鼠——转基因鼠。此后,转基因兔、转基因羊和转基因猪等不断问世。

用转基因动物生产人用药品是基因工程制药业中新崛起的行业。英国科学家自推出明星“多莉”后,又成功地向一头绵羊导入人体基因,从而使该羊产出的奶中含有一种贵重的蛋白药品——抗胰蛋白酶,可用于治疗因该酶缺乏所引起的肝脏衰竭或肺气肿。

从转基因动物的乳汁中获得药物,不但产量高,易提纯,还具有稳定的生物活性。产乳量高的动物相当于一座大型药物工厂,人们只需饲养活的转基因牛、

羊,便可获取所需的贵重药品。科学家已成功地培育出能在乳汁中生产特殊蛋白质的转基因猪。

中国科学家 1997 年用新的转基因路线获得了 5 头转基因山羊,其中一头母羊于当年 9 月进入泌乳期,乳汁中含有人的凝血因子,为血液病患者带来了福音。

未来,科学家还可用转基因动物生产“人造器官”,供器官移植。英国已开展了将人的基因转入猪体的试验,目的是希望这种转基因猪成为“人造器官”的代理加工厂。

2. 转基因植物

基因工程技术对农业发展具有举足轻重的作用。众所周知,农作物育种有两个难题长期未能解决,一是培育一个新品种需要很长时间(用有性杂交法通常需 4~8 年);二是无法逾越物种之间的屏障。转基因植物能够打破物种间的屏障,使不同作物品种实现杂交,并可在短期内培育出具有优良性状的新品种。

1983 年,世界上首次培育转基因植物成功,目前已有 100 多种转基因植物,包括水稻、小麦、大豆、油菜、棉花、番茄、黄瓜等。

在农业方面,通过转基因植物育种所改良的作物性状主要包括:①抗病。通过导入与作物抗病相关的基因,使作物能抵御或延缓病害的侵袭。例如,中国科学家把抗病毒基因转到了水稻细胞里,由此而培育出的植株,可以抵抗水稻上常见的白叶枯病等危害,并能稳定遗传。②抗虫。将一些毒蛋白基因导入作物中,以杀死作物上的害虫。例如,比利时科学家将一种能控制毒蛋白产生的基因转移到植物细胞中,这些获得毒蛋白基因的植物细胞所长成的植株,能产生毒蛋白而毒杀害虫。③抗除草剂。将不耐除草剂的作物通过改变基因结构,使之成为耐除草剂的作物。例如,美国科学家将一种抗除草剂基因转入大豆植株的细胞里,获得的转基因植株能抗除草剂,遗传性状稳定。

此外,还可以通过基因工程改善作物品质提高作物蛋白质和氨基酸的含量;改变油料作物的油脂成分;延长水果成熟后的贮藏时间;提高作物抗旱、耐盐能力等。

世界上沙漠、干旱、高温、低温和盐碱地区占据很大面积,在这类地区作物生长很困难。科学家发现在这些恶劣环境下尚可生长的植物中存在抗逆基因,如抗旱基因、抗盐碱基因、抗冻基因和耐高温基因等,并对其中某些基因进行了克隆、分析和抗逆试验。将来,随着对抗逆基因作物研究的深入,处于高寒和干旱盐碱地区的人们照样可长年种植粮食、蔬菜和水果。

今天,品种丰富的转基因粮食、水果、蔬菜、禽畜和水产等已摆上了人们的餐桌。科学家预测,转基因食品将是未来 50 年内满足人们粮食需求的关键。

3. 基因诊断与基因治疗

人类疾病都直接或间接与基因相关。“基因病”包括3种：一是某一特定基因的结构或表达异常引起特定疾病，称为单基因病；二是某一疾病与多个基因的结构或表达异常相关，称为多基因病；三是病原微生物侵入机体引起的疾病，叫获得性基因病。在基因水平上对疾病进行诊断和治疗，可达到标本兼治、灵敏度高、简便快速的效果。

用基因工程技术制备的基因探针，可对各种致病基因和疾病相关基因进行检测，确定其是否患病或患病的概率，也可对胎儿进行产前基因诊断，以确定是否终止妊娠，这对于提高人口质量大有好处。基因探针还可以进行基因跟踪，在鉴定带菌者和预告流行病发生方面发挥作用，为疾病预防提供科学依据。目前，基因诊断作为第四代临床诊断技术已被广泛应用于遗传病、肿瘤、心脑血管病、病毒细菌寄生虫病和职业病等的诊断中。

许多活性多肽和蛋白质具有治疗和预防疾病的作用，它们都是由相应的基因所产生的，但在组织细胞内产量极微，采用常规方法很难获得足够量以供临床应用。基因工程则突破了这一局限性，可大量生产这类多肽和蛋白质，迄今已成功地生产出胰岛素（治疗糖尿病和精神分裂症）、干扰素（抗病毒剂，对血癌和某些瘤有疗效）、生长激素（治疗侏儒症）、生长激素释放抑制因子（治疗肢端肥大症和急性胰腺炎）等百余种产品，其中许多已成为临床治疗的有力武器，并创造了显著的经济效益。

目标基因与基因载体通过基因工程可以形成具有特定功能的重组体，以补偿失去功能的基因的作用或增加某种功能对异常细胞进行矫正或消灭，这便是基因治疗。理论上，基因治疗是标本兼治而且无任何毒副作用的疗法，目前国际上有100多个基因治疗方案正处于临床试验阶段。

在基因诊断和基因治疗中，揭示疾病发生机理的最关键前提条件是要找到特定疾病的相关基因，正在实施的“人类基因组计划”给最终找到各种疾病相关基因带来了曙光。

4. 基因疫苗

疫苗是预防和治疗流行性疾病和其他严重疾病的“杀手锏”。

基因工程可以根据病原体的抗原分子群，将它们的基因重组在一起导入大肠杆菌（工程菌），使该菌成为制造混合抗原的工厂。基因工程还可将有关抗原的DNA导入活微生物，这种微生物在受免疫应激后的宿主体内生长，可产生弱毒活疫苗，具有抗原刺激剂量大、持续时间长等优点。

正在研制的基因疫苗有数十种之多，在抗细菌方面有针对麻风杆菌、百日咳

杆菌、脑膜炎双球菌等的疫苗；在抗病毒方面有针对乙型肝炎、甲型肝炎、带状疱疹等的疫苗；在抗寄生虫方面有针对疟原虫、血吸虫等的疫苗；在抗真菌方面有针对曲霉菌、念珠菌等的疫苗。

对肿瘤疫苗的研制一直是肿瘤防治中的关注热点。一般认为，肿瘤细胞由于抗原性太弱而逃避了机体免疫系统对它们的追杀，而用基因工程将某些具有抗原性的蛋白质基因导入肿瘤细胞，可大大增加其抗原性，从而被免疫系统所识别与杀灭。

5. 基因环境监测与净化

环境保护是人类面临的重大课题。用基因工程制备的基因探针可以充当环境监测的“尖兵”。基因探针可监测饮用水中病毒和细菌的含量，灵敏度和精确度极高。基因工程也可用于环境污染的清除，如将假单胞杆菌的几种不同质粒重组成一个超级质粒，导入一种细菌，使该菌成为超级菌，这种超级菌能在原油中迅速繁殖，并在浮游过程中快速降解烃类物质，除去污染水面和地面的石油。

基因工程专家们的一项大胆设想是把固氮肥基因转移到非豆科植物中去。这是一项既可提高作物产量，又可减少能量消耗，并且肥沃土壤、减少成本和净化环境的举世瞩目的大课题，当前世界上许多科学家正致力于攻克此项难关。

6. 基因工程的工业应用

基因工程在工业上也展示了美好的应用前景。通过 DNA 操纵可以得到不同类型的基因工程菌，其中有些工程菌可把低品位矿石或废矿石、废矿渣中的金属富集起来，有的还可对富集的金属进行化学转化。采用这种技术，人们已从贫矿和废矿石中提取了铀、铜、金属硫化物和镍等。

基因工程专家们正在研究和制备这样一种工程菌：它既可成倍地提高由葡萄糖转化为乙醇的效率，又可将纤维素转化为葡萄糖，为高效、高产的乙醇生产提供一条切实可行的途径。

本章小结

基因工程以核酸为基本材料，操作流程主要包括获取目的基因，获取基因载体，重组 DNA，把重组 DNA 导入受体细胞进行扩增，筛选与培育。分离目的基因常采用 PCR 技术从基因组 DNA 中扩增含目的基因的 DNA 片段。克隆载体有质粒载体和病毒（噬菌体）载体以及它们彼此重组或与其他基因组 DNA 片段重组的载体，供不同实验要求选择使用。在 DNA 连接酶的作用下，含目的基因的 DNA 片段与克隆载体连接成为重组 DNA 分子。在连接之前，一般先分别用限制性内切酶切割。重组 DNA 分子导入原核生物细胞可采用转化法、转导法和

三亲本杂交法等；导入植物细胞常采用 Ti 质粒载体转化法、电穿孔法、微弹轰击法等；导入动物细胞常用的方法有病毒颗粒介导的病毒载体转导法、DNA-磷酸钙沉淀物转染法和显微注射法等。筛选克隆子常采用克隆载体携带的选择标记基因、供体 DNA 携带的报告基因、免疫法以及电泳等方法。

基因食品的安全性以及在道德与伦理上的影响引起了很大争论，而从本质上来说，现代遗传工程与传统的育种方式并无不同，生物技术产生的食品并不比传统食品的安全性低。

人类基因组的研究为遗传疾病的基因治疗开拓了一个美好的前景，但同时也带来了一系列道德、法律及伦理问题。

复习思考题

1. 简述限制性内切酶和 DNA 连接酶的作用机制。
2. 如何采用 PCR 技术从生物材料中分离出目的基因？
3. 什么样的细胞可用作受体细胞？
4. 简述外源基因转入受体细胞的各种途径。
5. 筛选克隆子有哪些方法？
6. 转基因食品具有哪些类型？如何评价转基因食品的安全性？
7. 为什么说基因芯片具有诱人的前景？
8. 人类基因组计划有何实际意义？
9. 阐述基因工程在农业生产中的应用。



蛋白质工程

蛋白质工程是 20 世纪 80 年代在基因工程基础上发展起来的第二代基因工程，这一名词最早是 1981 年由美国 Genex 公司的 Ulmer 提出。

蛋白质工程是利用 X 射线结晶学和电子计算机图像显示计算，确定天然蛋白质的立体空间三维构象和活性部位，分析设计需要改变或替换的氨基酸残基，然后采用定位突变基因等方法，直接修饰或人工合成基因，有目的地按照设计来改变蛋白质分子中的任何一个氨基酸残基，以达到改造天然蛋白质或酶，提高其应用价值的目的。蛋白质工程是基因工程的深化和发展，也是生物技术中最富有发展前景的高新技术领域之一。随着分子生物学、晶体学及计算机技术的迅猛发展，蛋白质工程在 20 世纪后期取得了长足的进步，成为研究蛋白质结构和功能的重要手段，同时广泛应用于制药及其他工业生产中。

7.1 蛋白质结构基础

蛋白质工程的目标是：按预期的结构和功能，通过基因修饰或基因合成，对现有蛋白质加以定向改造、设计、构建，并最终生产出性能比天然蛋白质更加优良、更加符合人类社会需要的新型蛋白质。无论是改造现有蛋白质还是从头设计全新蛋白质，都必须以蛋白质分子的结构规律及其与生物功能的关系为基础，以天然蛋白质分子的三维结构为基本蓝图。

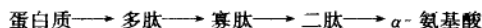
大量蛋白质结构的测定揭示不同蛋白质分子结构之间存在的共同特征，包括基本的结构组建，多层次的结构组织方式，在结构域水平上的结构类型等。下面将概要介绍这些具有共性的蛋白质结构知识，作为蛋白质工程的共同基础。

7.1.1 蛋白质的基本化学结构

蛋白质的基本化学结构（蛋白质一级结构）主要是指氨基酸在蛋白质分子中的排列顺序。尽管蛋白质具有极其复杂的总体结构，但在化学上它们都是由 20 种氨基酸按特定的顺序通过肽键连接形成的具有有限长度的多肽链。不同蛋白质间最基本的差别就是其组成多肽链的氨基酸序列和长度不同。

从蛋白质的水解产物就可得知其分子组成。蛋白质受酸、碱或酶的催化作用，其大分子逐次水解为相对分子质量较小的多肽、寡肽、二肽，最终生成 α -

氨基酸。详情见第2章。

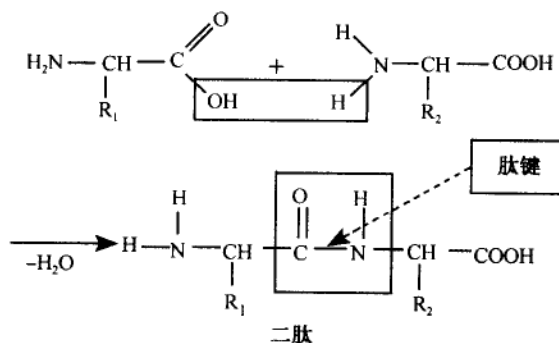


蛋白质分子一级结构又叫初级结构、基本化学结构或共价结构。是指多肽键中氨基酸的顺序或氨基酸沿线性多肽键的排列。

一级结构是高级结构的化学基础，也是认识蛋白质分子生物功能、结构与生物进化的关系、结构变异与分子疾病的关系等许多复杂问题的重要基础。研究一级结构需要阐明的内容包括：①蛋白质分子的多肽链数目。②每条肽链的末端残基种类。③每条肽链的氨基酸顺序。④链内或链间二硫键的配置等。

早在1891年有人根据蛋白质及其不完全的水解产物的双缩脲反应，提出氨基酸组成蛋白质分子是通过肽键（ $-\text{CO}-\text{NH}-$ ）连接方式的假说。1907年费什尔（E. Fischer）用人工合成法将18个氨基酸分子借肽键连接方式形成了复杂的多肽，从而创立了多肽学说。

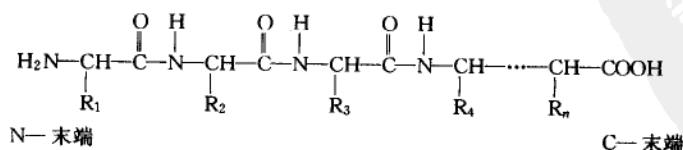
肽键（ $-\text{CO}-\text{NH}-$ ）是由一个氨基酸的羧基（ $-\text{COOH}$ ），与另一个氨基酸的 α -氨基（ $-\text{NH}_2$ ）脱水缩合而形成的键。



肽键（ $-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{N}-$ ）又称为酰胺键。

从上式中可知，两个氨基酸缩合而成二肽两端，仍然分别有1个自由氨基（ $-\text{NH}_2$ ）和1个自由羧基（ $-\text{COOH}$ ），它们仍可以同第3个、第4个或更多的氨基酸缩合起来，形成一种链状结构，称为多肽链。

多肽链中的 R_1 、 R_2 、 R_3 、 $\dots$ 、 R_n 称为侧链。肽键两端仍遗留有自由氨基和羧基。在一条多肽链中含有自由氨基的一端称为N-末端（或氨基端），而含有自由羧基的一端称为C-末端（或羧基端）。书写时，一般是将N-末端写在左边，C-末端写在右边。



有些蛋白质分子的一级结构是一条多肽链；有些蛋白质分子的一级结构是由两条以上的多肽链组成。两个不同蛋白质的一级结构如果具有显著相似性，则称它们彼此同源。由于同源蛋白的编码 DNA 序列也有显著的相似性，因此一般认为它们在进化上是相关的，是从一个共同的始祖基因进化而来。

氨基酸在蛋白质中的连接方式，主要以肽键连接而成多肽链。多数多肽链是直链结构，还有少数环状结构。除肽键连接之外，一级结构中还可配置有二硫键。二硫键是 2 个半胱氨酸分子的巯基脱氢氧化形成的硫桥—S—S—，它对稳定蛋白质分子的空间构象起着重要的作用。二硫键的配置属于一级结构的重要研究内容。由一条肽链促成的蛋白质分子，只有链内半胱氨酸间形成的二硫键（使肽键具有环状结构）。由两条以上肽链组成的蛋白质分子，除链内二硫键之外，链与链间也可以形成二硫键连接。

例如，胰岛素含有两条多肽链（A 链和 B 链），通过两个二硫键相连接。图 7-1 中展示了牛胰岛素的氨基酸组成及其排列顺序。A 链由 21 个氨基酸组成，以甘氨酸为 N—末端氨基酸，而以天冬酰胺为 C—末端。此链中的二硫键包含 3 个半胱氨酸、丝氨酸及缬氨酸的环状结构；B 链由 30 个氨基酸组成，以苯丙氨酸为 N—末端，而以丙氨酸为 C—末端。

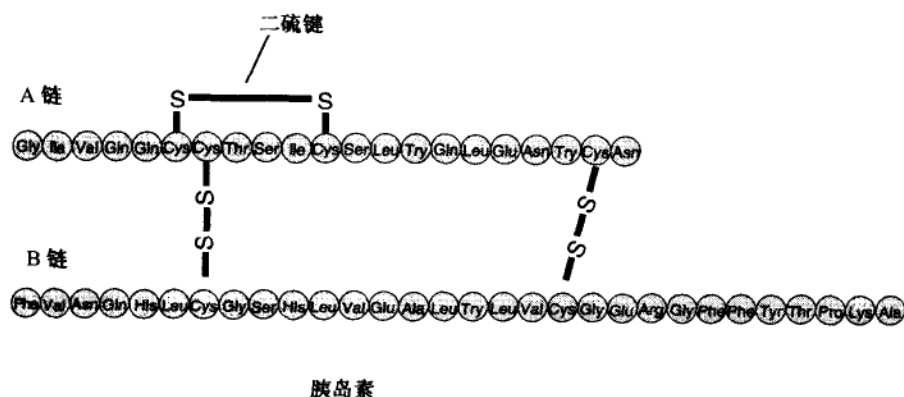


图 7-1 胰岛素分子一级结构

不同来源的蛋白质其一级结构是有差异的，说明蛋白质一级结构与生物的种类特异性有关。不同来源的胰岛素在 A 链环状结构的氨基酸配置方面与牛胰岛素不同。例如，马胰岛素含苏氨酸、甘氨酸和异亮氨酸，而猪胰岛素含苏氨酸、丝氨酸和异亮氨酸。

近 20 多年来，随着生化分离技术的飞速发展，蛋白质一级结构被确定的越来越多，至 21 世纪初为止，已经被确定的蛋白质一级结构就有 100 多种，为进一步分析确定蛋白质的空间结构打下了基础。

7.1.2 蛋白质的空间结构

蛋白质的空间结构（即蛋白质的二级、三级和四级结构），对蛋白质的生理活性很重要。当其空间构象有所损害，蛋白质的构象随即改变或失去其原有的生理活性。

蛋白质空间结构的确定，主要利用 X 射线衍射法，形成衍射图像，再经过数学推导和计算，得出晶体中原子的分布和分子的空间构象。蛋白质多肽链的卷曲、折叠形成的紧密结构，是由于蛋白质多肽链间各种化学键交互作用的结果。故在具体介绍蛋白质空间构象之前，必须首先了解其有关的各种化学键的性质及其作用。

1. 维持蛋白质分子空间构象的化学键（图 7-2）

蛋白质的空间结构一般是通过非定向的静电引力、范德华引力和氢键等形成的。一般这些键的键能比较小，故不太稳定，容易受各种理化因素影响而破坏。有关的化学键主要有以下几种：

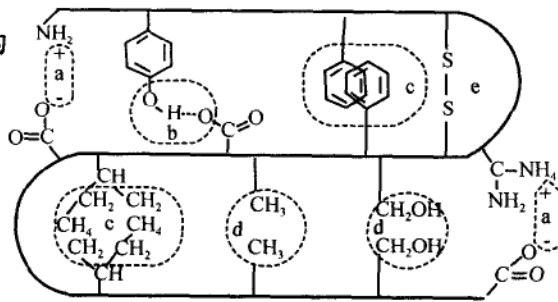


图 7-2 维持蛋白质三级结构的各种作用力

a. 盐键；b. 氢键；c. 疏水相互作用；
d. 范德华力；e. 二硫键

1) 氢键 $\left(\begin{array}{c} \diagup \\ \text{C=O} \cdots \text{H}-\text{N} \\ \diagdown \end{array} \right)$

氢键主要由肽链上的羰基 $\left(\begin{array}{c} \diagup \\ \text{C=O} \\ \diagdown \end{array} \right)$ 和亚氨基 $\left[\begin{array}{c} \text{H} \\ | \\ -\text{N}- \end{array} \right]$ 之间通过氢原子

被 2 个负电性较大的原子所吸引而形成的一种键。由于肽链上有许多羰基和亚氨基。因此，蛋白质分子中氢键较多。氢键具有离子的特性，只有电负性较大的原子间才能形成，它需要极化的一 OH、—NH—、—NH₂ 等基团作为供氢体。而电负性较大的原子，如 O、N、Cl、F 等作为受体。

氢键为蛋白质空间结构中最重要副价键。它普遍存在于蛋白质分子中。无论在肽键与肽键间或是一条多肽链卷曲后相邻的基团之间，都可以形成氢键。氢键的键长约 0.27nm，键能约 23.4kJ。故容易受外力影响而破坏。这一点与蛋白质生理活性有紧密关系。

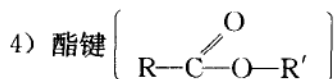
2) 二硫键 (—S—S—)

蛋白质分子中的二硫键，是 2 个半胱氨酸分子通过脱氢氧化而结合形成的一

种化学键。此键在蛋白质一级结构中是连接不同肽链或同一肽链不同部分的键。它结合得比较牢固，在蛋白质空间结构中则起着稳定肽链空间构型的作用。二硫键一旦遭受破坏，蛋白质的生理活性随即丧失。这种键的数目越多，其蛋白质就越稳定，对抗外界能力就越强。例如，毛、发、鳞、甲壳之所以比较坚固，其原因之一为其蛋白质中含有较多的二硫键。

3) 盐键 ($-\text{NH}_3^+ - \text{OOC}-$)

蛋白质分子中自由的氨基及羧基，在适当的条件下，可以分别以正负离子形式存在，因而形成盐键。盐键的结合力也较为牢固，也为稳定蛋白质空间结构的一个因素，但其在蛋白质分子中一般数量不多，而且容易受酸、碱的作用而破坏。



酯键是由羟基氨基酸分子中的羟基 ($-\text{OH}$) 与二羧酸 β -或 γ -羧基脱水缩合而成的键。酯键在蛋白质分子中不多，水解时可受破坏。

5) 疏水键

蛋白质分子中一些疏水性较强的侧链基团能避开水而相互黏附聚集而成。天然蛋白质分子中一般疏水性较强的基团大部分集中在中心区域，只有少数暴露在溶液中。疏水键对蛋白质的稳定也起着一定的作用。疏水键与盐键对在溶液中加盐或有机溶剂的反应恰恰相反。非极性溶剂能破坏疏水键，但由于它降低了溶液的解电常数，因而加强了盐键。盐的作用则使疏水键强度增大，这是因为它降低了非极性基团在水中的溶解度。

6) 范德华引力

范德华引力是分子键借静电引力而形成的。在蛋白质分子中的非极性基团的偶极间的相互作用，以及极性基团之间的偶极与诱导偶极的相互作用。（例如， $-\text{CH}_3$ 与 $-\text{CH}_3$ 之间的引力）。此键比一般静电键及共价键长 $0.3 \sim 0.4\text{nm}$ ，且远比这两种键的键能小。

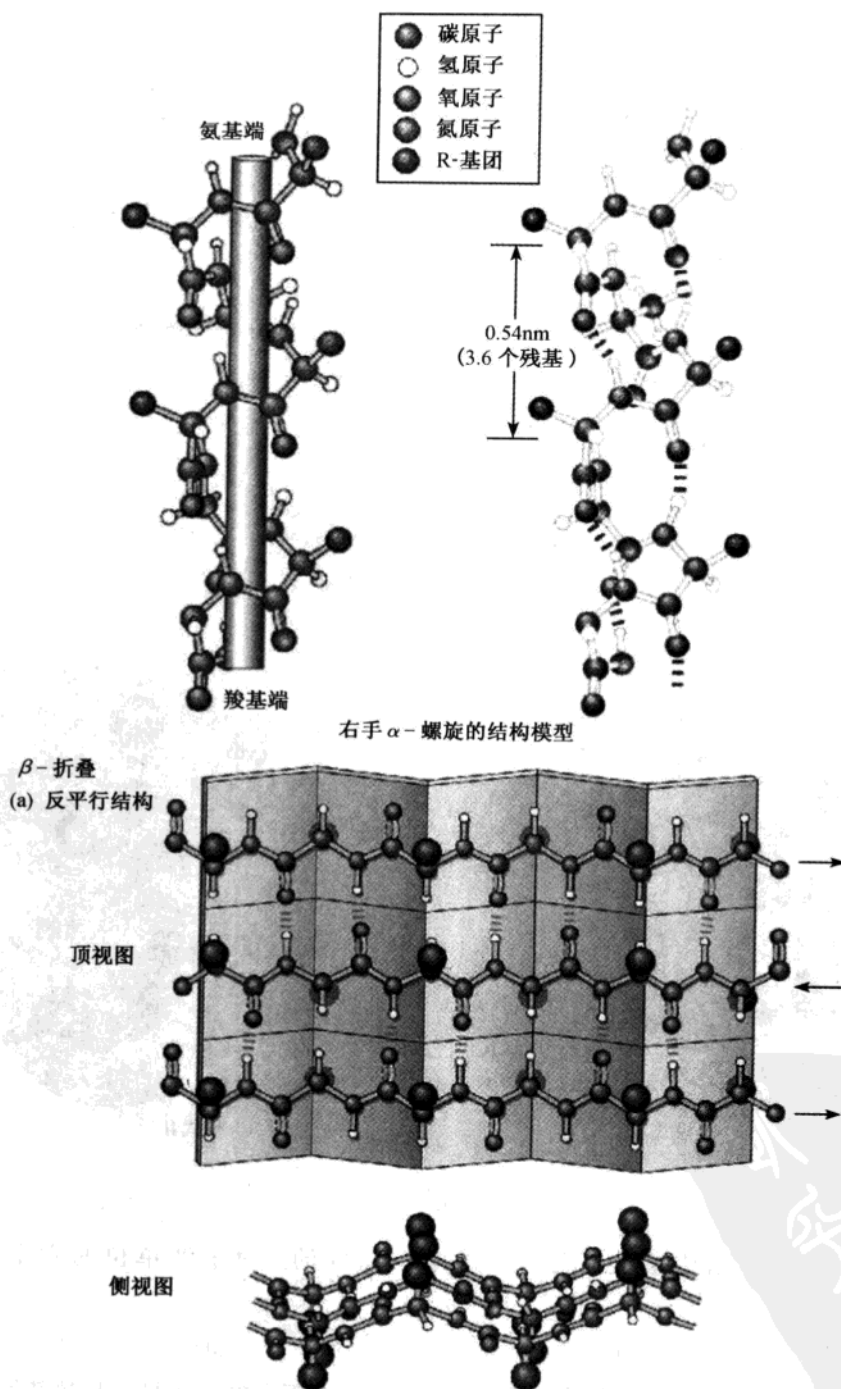
7) 金属键

许多蛋白质的三、四级结构需要金属键参与维持其构型。这类金属所起的作用，也属于一种化学键的作用。当金属被除去时，四级结构也随即破坏，蛋白质则解离为亚基，或者三级结构局部破坏，其生理活性则减弱或丧失。

2. 蛋白质的二级结构

蛋白质的二级结构是指蛋白质分子的肽键的螺旋卷曲或折叠所成的空间结构。二级结构仅仅是主链构象，不讨论侧链基团的空间排布。

据目前所知，天然蛋白质分子存在的主链构象只有少数几种基本类型（图 7-3），即 α -螺旋、 β -折叠、 β -转角和无规则卷曲。这些主链基本构象都是以酰



(b) 平行结构

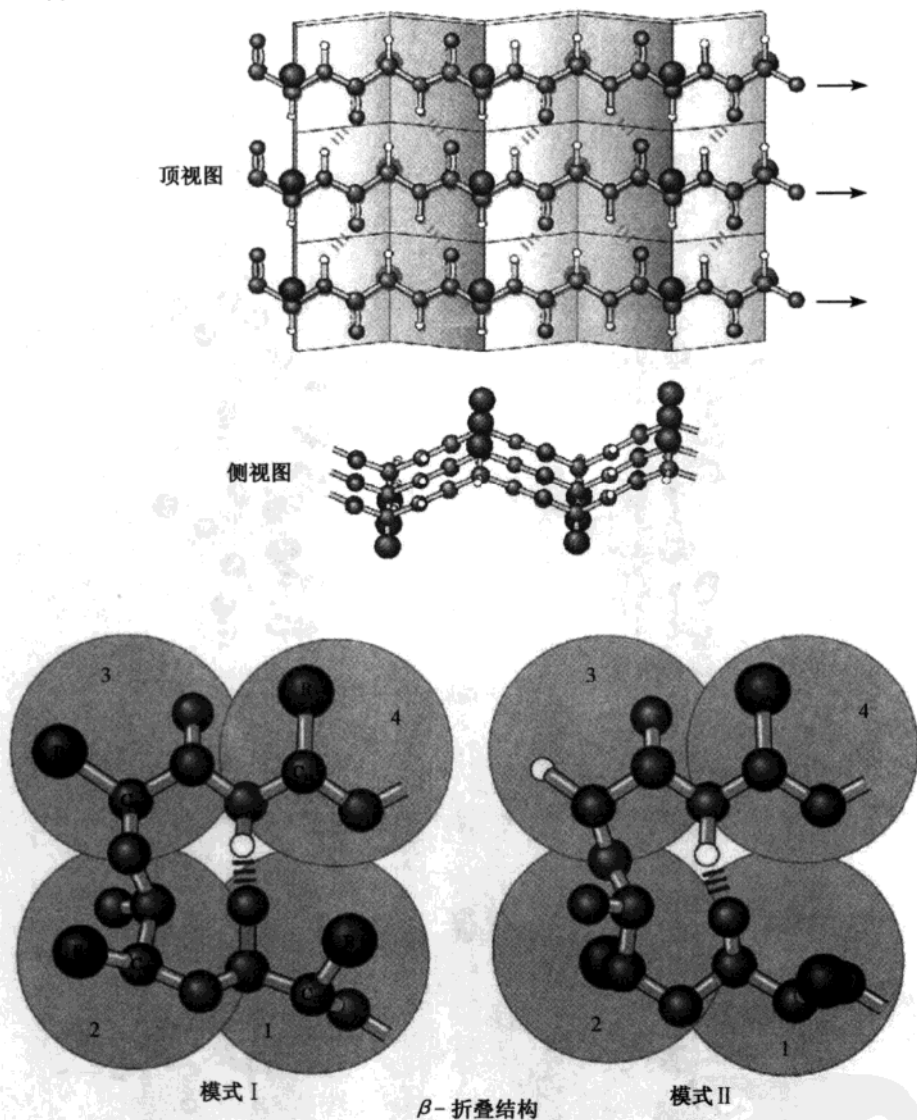


图 7-3 (续)

胺平面为基本结构单位，有规则的盘曲而成的。每个肽单位的六个原子

($\text{Ca}-\overset{\text{O}}{\underset{\text{||}}{\text{C}}}-\overset{\text{H}}{\underset{|}{\text{N}}}-\text{Ca}$) 都被酰胺键固定在同一个平面，也叫肽平面 (图 7-4)。酰胺平面是刚性平面，6 个原子的相对位置都是固定不变的，而且，其羰基氧原子

与亚氨基氢原子总是呈反式排列。在主链的成链共价键中，肽键占 1/3，且不能自由转动，这对肽链形成三维构象显然有很大约束作用，只能靠 α -碳原子两边的单键转动，使酰胺平面的相对位置发生变化，形成有限的几种主链构象。

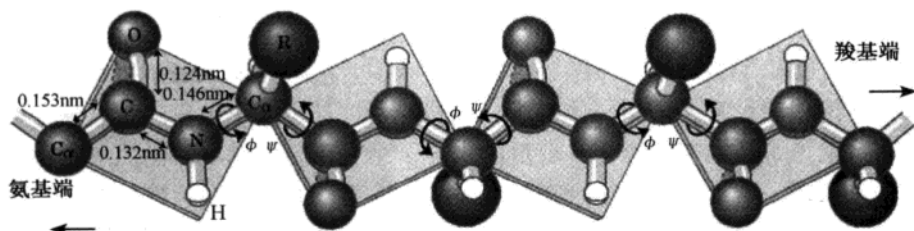


图 7-4 多肽主链的酰胺平面主链

3. 蛋白质的三级结构

蛋白质的三级结构是在二级结构的基础上进一步弯曲盘绕成更复杂的构型。这种结构主要由盐键、氢键和疏水键来维持的。经过这样的盘绕和弯曲后，蛋白质多肽链虽然很长，由于二、三级结构的存在，蛋白质形成更紧密的空间构型。例如，由 153 个氨基酸组成长肽链的肌红蛋白（图 7-5），经过折叠弯曲，便形成一个球状蛋白。凡具有一条肽链的蛋白质只有三级结构，而无四级结构。

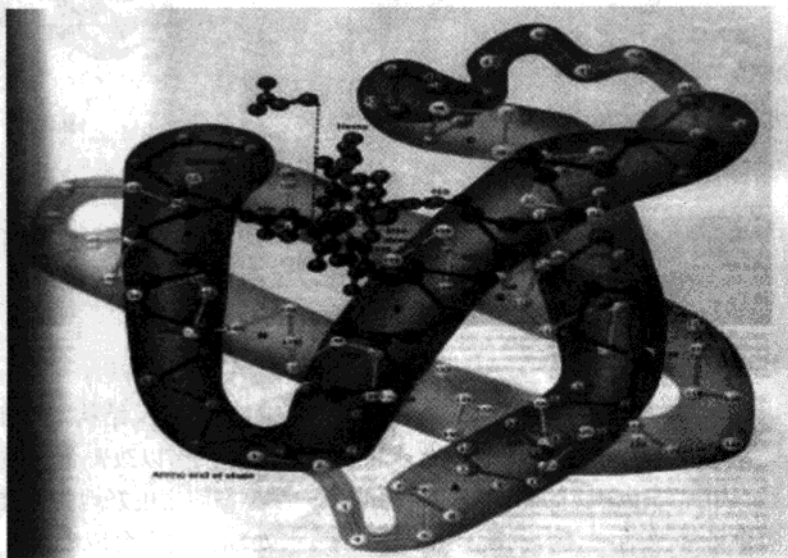


图 7-5 肌红蛋白分子的三级结构

4. 蛋白质的四级结构

蛋白质的四级结构是由几个或数十个以上的亚基形成的。而每一个亚基又是由一个或数个肽链在一级、二级和三级结构的基础上形成的蛋白质小单位。亚基之间借助于氢键、盐键、疏水键和范德华引力等稳定其结构。

此外,在稳定蛋白质三维结构的诸多因素中,溶剂中的水分子也具有重要的作用。任何功能意义上的蛋白质的稳定和功能发挥都依赖于介质环境,最重要的共同因素就是水。现在知道,一定量的水分子结合在蛋白质表面的二级结构片段具有重要作用。少量水分子结合在蛋白质分子内部,有时是在活性位置,不仅有助于局部结构的稳定,有的还直接参与功能作用。大量水组成局部有序的介质环境对蛋白质的折叠和三维形成也有重要作用。因此,水也应视为构成蛋白质结构和功能整体的有机组成部分,是蛋白质结构组织中的重要因素。

蛋白质结构就像一座精美的建筑,层次丰富,构造多彩。蛋白质一级、二级、三级以及四级结构的关系如图 7-6。

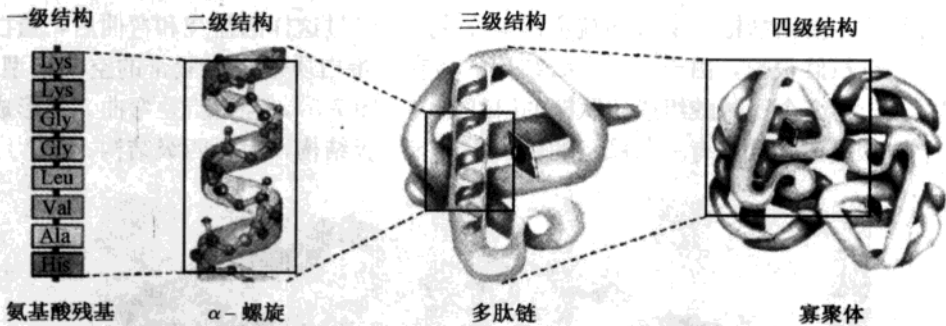


图 7-6 蛋白质一级、二级、三级以及四级结构的关系

7.2 蛋白质工程原理和方法

7.2.1 蛋白质分子设计

所谓蛋白质工程是指人们在深入了解蛋白质空间结构以及结构与功能关系,并且在掌握基因操作技术的基础上,设计和改造蛋白质,借以改善蛋白质的物理和化学性质,如提高蛋白质的热稳定性、酶的专一性等,使之更好地为人类所用。

蛋白质设计涉及药物、食品工业中的酶、污水处理、化学合成疫苗、生物传感器等,设计大的蛋白质不仅限于 20 种天然氨基酸,也可以包括非天然氨基酸。从有机化学、无机化学、生物化学以及分子生物学得到的建筑模块的结合及通过

序列的改变,将产生蛋白质的结构与功能的多样性。

蛋白质的分子设计就是为有目的的蛋白质工程改造提供设计方案。虽然经过漫长岁月的进化,自然界已经筛选出了数量众多种类各异的蛋白质,但天然蛋白质只是在自然条件下才能起到最佳功能,在人造条件下往往就不行。例如在工业生产中常见的高温高压条件下,大多数蛋白质都会失活。因此就需要对蛋白质进行改造,使其能够在特定条件下起到特定的功能。蛋白质的分子设计又可以按改造部位的多寡分为三类。第一类为“小改”,可通过定位突变或化学修饰来实现;第二类为“中改”,对来源于不同蛋白的结构域进行拼接组装;第三类为“大改”,也就是完全从头设计全新的蛋白质。

蛋白质设计目前存在的问题是设计的蛋白质与天然蛋白质比较,缺乏结构的独特性及明显的功能优越性。所有设计的蛋白质有正确的形貌、显著的二级结构及合理的热力学稳定性,但一般说来它们的三级结构的确定性较差。

1. 小改——少数残基的替换

小改是指对已知结构的蛋白质进行少数几个残基的替换,这是蛋白质工程中最广泛使用的方法。这种方法通过定点突变技术或盒式替换技术有目的改变几个氨基酸残基,借以研究和改善蛋白质的性质和功能。比如蛋白质的稳定性是蛋白质正常发挥生物活性的重要前提,因此改善蛋白质的稳定性成为蛋白质设计和改造的重要目标之一。

在改造中如何恰当地选择突变残基是一个关键问题,这不仅需要分析残基的性质,同时还需要借助于已有的三维结构或分子模型。例如通过蛋白质工程途径引入二硫键,期望提高蛋白质的稳定性,面临的一个问题就是怎样选择合适的突变位点。蛋白质中的二硫键具有一定的结构特征,随机选择突变位点引入二硫键会给整体分子带来不利的张力,不但不会提高蛋白质的稳定性,反而会降低蛋白质的稳定性。为了解决这个问题,人们尝试了几何方法、分子力学方法、分子动力学方法等多种方法,并已经编制了一些实用程序,可以在实验之前筛选可能的以及较好的突变位点。相类似地,对于其他类型的突变也可以进行预测。已有许多方法和程序可以在已知天然蛋白质结构的基础上预测突变体的结构和性质。

定点突变的工作是蛋白质工程研究的主体。至21世纪初,已经对枯草杆菌蛋白酶、T4溶菌酶、二氢叶酸还原酶、胰蛋白酶以及核糖核酸酶等许多种类的蛋白质进行过改造实验。

蛋白质分子设计的过程简单说来就是首先建立所研究对象的结构模型,在此基础上进行结构——功能关系研究,然后提出设计方案;通过实验验证后进一步修正设计。往往需要几次循环才能达到目的。蛋白质分子设计的流程框图,如图7-7。

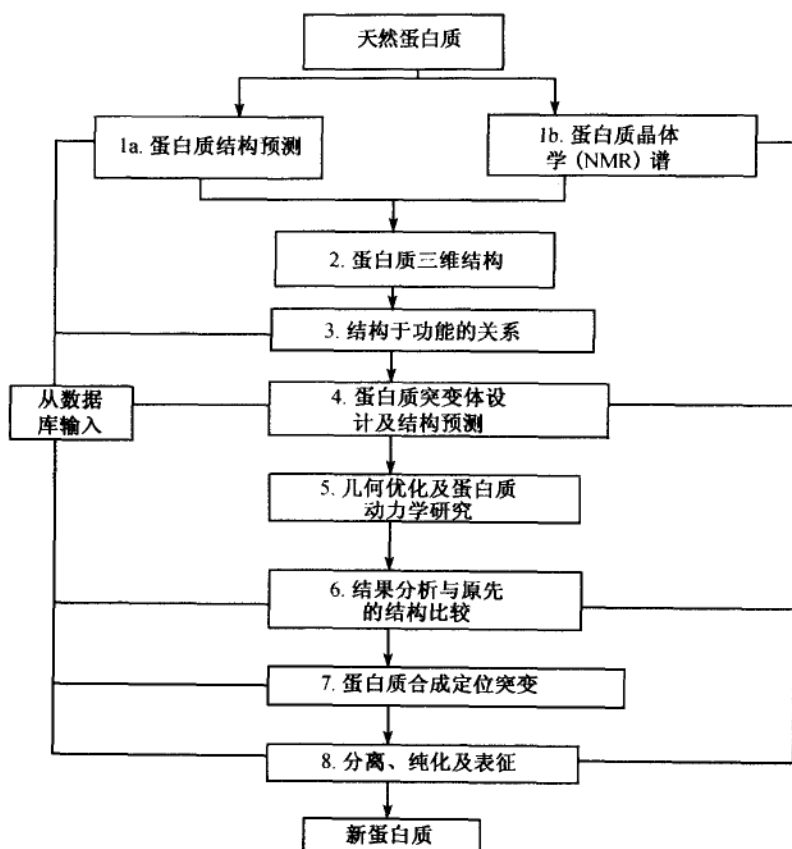


图 7-7 蛋白质分子设计流程框图

蛋白质突变体的设计涉及如下三个步骤。

(1) 从天然蛋白质的三维结构出发（实验测定或预测），利用计算机模拟技术确定突变位点及替换氨基酸。这是非常关键的步骤，一般应注意如下问题：①应确定对蛋白质折叠敏感的区域，这些区域包括带有特殊扭角的氨基酸（例如 *cis*-脯氨酸）、盐桥、密堆积区等。②应确定对功能非常重要的位置，这些可以从结构与功能的关系、生物化学或蛋白质工程实验及结构上的考虑。③应考虑剩余位置对所希望改变的影响。④当进行互换或插入/删除残基时应考虑它们对结构特征的影响，如疏水堆积、侧链取向、氢键盐桥等。同时也应考虑它们对蛋白质功能的影响。互换或插入/删除区域一般都在外环。有如下一些假设：氨基酸侧链的改变不会影响该主链折叠的改变，插入/删除某些部分不会影响表面区域，侧链交换遵守蛋白质结构保守原则。

(2) 利用能量优化及蛋白质动力学方法预测修饰后的蛋白质结构。

(3) 预测的结构与原先的蛋白质结构比较, 利用蛋白质结构-功能或结构-稳定性相关知识及理论计算预测新蛋白质可能具有的性质。

在上述设计工作完成后, 要进行合成或突变实验并经分离、纯化及表征后得到所要求的新蛋白质。

2. 蛋白质设计原理

(1) 内核假设。在蛋白质内部侧链相互作用决定蛋白质特殊折叠。一个非常简单和有用的关于蛋白质折叠的假设是, 假定蛋白质独特的折叠形式主要由蛋白质内核中残基的相互作用所决定。所谓内核是指蛋白质在进化中保守的内部区域。在大多数情况, 内核由氢键连接的二级结构单元组成。

(2) 所有蛋白质内部都是密堆积(很少有空穴大到可以结合一个水分子或惰性气体), 并且没有折叠。这个限制是由两个因素造成的。第一个因素是分子从内部排出的, 是总疏水效应的一部分; 第二个因素是由原子间的伦敦色散所带来的, 是由于短吸引力的优化。

(3) 所有内部的氢键都是最大满足的(主链及侧链)。蛋白质的氢键形成涉及一个交换反应, 溶剂键被蛋白质键所取代。随着溶剂键的断裂所带来的能量损失是由折叠状态的重组以及可能释放一个结合的水分子而引起的熵的增益来弥补。

(4) 疏水及亲水基团需要合理地分布在溶剂可及表面及不可及表面。这种分布代表了疏水效应的主要驱动力。这种分布的正确设计不是简单地使暴露残基亲水、使埋藏残基疏水。至少有两种原因使图像复杂化。首先, 侧链不总是完全地亲水, 例如赖氨酸有一个带电的胺基, 但是连接到主链上的碳原子是疏水的。因此在建模过程中要在原子水平上区分侧链为疏水及亲水部分。第二, 正确的分布是要安排少许疏水基团在表面, 少许亲水基团在内部。

(5) 在金属蛋白质中, 配位残基的替换要满足金属配位几何。这要求围绕金属中心放置合适目的蛋白质侧链或溶剂分子, 并符合正确的键长、键角以及整体的几何。

(6) 对于金属蛋白, 围绕金属中心的第二壳层中的相互作用是重要的。大部分配基含有多于一个与金属作用或形成氢键的基团。如果一个功能基团与金属结合, 另几个功能基团可以自由地采取其他相互作用方式。例如, 组氨酸中的咪唑可以与 N_1 或者 N_3 成键, 另外可以形成氢键。总结金属蛋白的结构表明, 这些第二基团总是参与围绕金属中心的氢键网络。氢键的第二壳层通常涉及与蛋白质主链的相互作用, 有时也参与侧链或水分子的相互作用。

这些相互作用起到两个作用: 第一符合蛋白质折叠的热力学要求; 第二这些氢键固定在空间的配位位置。

(7) 最优的氨基酸侧链几何排列。蛋白质中侧链构象是空间两个立体因素所决定。首先侧链构象是由旋转每条链的立体势垒所决定,其择优构象可以通过实验统计测量,也可以由第一原理计算得到。第二个因素是由氨基酸在结构中的位置所决定的。蛋白质内部的密堆积表明在折叠状态侧链构象只能采取一种合适的构象,即一种能量最低的构象。

(8) 结构及功能的专一性。形成独特的结构,独特的分子间相互作用是生物相互作用及反应的标志。实践表明这是蛋白质设计最困难的问题。要构筑一个蛋白质模型必须满足所有合适的几何要求,同时满足蛋白质折叠的几何限制。因为蛋白质是一个复杂的体系,体系有可能采取一个能量与所希望状态相近的另外一个构象。因此在设计程序中必须引入一个特征,它稳定所希望的状态,而不稳定不希望的状态,这也是最困难的计算机模拟技术之一。目前蛋白质设计还是实验性科学,它的成功需要几个“设计循环”,即设计、构筑、再设计等。情况越复杂,循环次数就会越多。虽然困难,但是仍然是有成果的。它可以在实践中发现新的因素,产生新的概念并修正老的概念。

3. 蛋白质设计中的结构——功能关系研究

蛋白质的序列、三维结构,热力学及功能性质之间的关系是 21 世纪初广泛关注的热点。它对于蛋白质工程及蛋白质设计都是非常重要的。这方面的研究有助于基于序列和三维结构信息,预测蛋白质的功能以及序列的改变如何影响蛋白质的功能。这将增加设计具有预定结构与功能的蛋白质的能力。对蛋白质结构与功能的认识过程始于蛋白质中重要功能残基及蛋白质等其他分子相互作用的确立。通过定位突变替换单独的氨基酸残基是分析功能残基的有力工具。选择突变残基,最重要的信息来自结构特征。因此如果蛋白质的立体结构是未知的,则突变功能残基的研究带有不确定性,不能很好地区别蛋白质构象扭曲变化的影响与原有功能残基突变的影响。可以根据序列同源性或原先的生物化学实验证据选择突变残基,也可以通过随机或合理筛选技术鉴定重要的功能区域,以便进一步重点分析蛋白质功能残基。

定位突变可以在蛋白质中引入特殊的替代氨基酸,并显示蛋白质功能的损失及变化。因此,它是鉴定蛋白质功能残基的重要手段。对于蛋白质中某些已经通过结构及生物化学实验证明其功能重要性的残基,通过定位突变可以探测它们的作用机理。这些研究为认识蛋白质——蛋白质相互作用及酶催化的本质提供理论基础,也为蛋白质工程及蛋白质设计提供依据。蛋白质结构与功能关系研究也可用于药物开发。

根据上述目的,可以进行三类突变:插入一个或多个氨基酸残基;删除一个或多个氨基酸残基;替换或取代一个或多个氨基酸残基。最大量的定位突变是在

体外利用重组 DNA 技术或 PCR 方法。

1) 根据结构信息确定残基的突变

对于三维结构已经经过 X 射线测定或 NMR 谱测定的蛋白质,可以根据氨基酸来推测专一性残基的功能作用。如果蛋白质与它们的抑制剂、辅酶及受体的三维结构是已知的话,这个方法就更有价值。可以根据蛋白质上的氨基酸与配件上的受体基团间的距离与取向决定它们之间形成的氢键、离子对或疏水相互作用。这样的残基通过定位突变取代后,能够证实某一残基对键合过程的参与以及每一个相互作用对复合物结构的贡献。这样的研究是认识专一性及酶催化的基础。

蛋白质三级结构知识对突变策略的设计很有帮助。例如,结构可用于鉴定最暴露于蛋白质表面的残基。最暴露于蛋白质表面的残基是突变残基的最好残基,因为这些残基对于分子间相互作用是合适的。另外表面残基对序列变化有更大的容忍性,因此这些残基的替换不易引起结构变化。结构知识可用于估计专一性突变对结构改变的可能性。合适的氨基酸替代可以构建结构模型并可以估计立体阻碍或电荷排斥。

2) 其他实验方法鉴定功能残基

随机突变、删除分析以及连接段扫描突变等实验方法可用于鉴定功能残基。随机突变技术分析蛋白质功能的优点是用一种简单方法就可产生突变体。然而,因为对于突变没有控制,因此必须进行大数目的突变产生大量的可解释的数据。往往非保守残基或小的氨基酸会被大的氨基酸所替代,这两种突变都会引起蛋白质构象的变化及引起功能的损失。在这些研究中,在每一个位置上的氨基酸由不同的几个氨基酸替换,可以比较蛋白质保守及非保守替换对功能的影响。

一个通过随机突变分析基因序列的例子是 HIV-1 蛋白酶。蛋白酶的 99 个残基的编码区的每个残基用不同的氨基酸替换,得到 33 个突变体,平均每个残基有 3.3 个代替物。

另一个重要方法是删除分析及连接片段扫描突变。这些突变涉及在整个基因位置删除或插入小数目的核苷酸。这些突变可以很容易通过重组 DNA 技术构建。利用能识别序列内的多重位点的限制酶可以部分降解基因,并分离得到在单一位点被切断的线性片段。为了进行分散插入小的合成 DNA 片段,常常编码一个有限制位点的片段,可以把它配位到断开位置。为了建立分散删除,在重新配位形成之前用外核酸酶降解 DNA,目标是快速扫描编码序列的长度以及鉴定重要功能区域,然后可以进行单一氨基酸替换的更仔细分析。这两种技术已经非常成功地用于确定在基因调控区域的 DNA 序列单元。这些方法也可用于蛋白质的分析。

3) 利用蛋白质同源性鉴定功能残基

随着克隆基因数据库的增加,根据与其他蛋白质的序列对来确定蛋白质的功

能域已成为可能。每个残基所起作用的信息能够来自不同种同源蛋白序列比较或一类具有相应活性的蛋白质序列比较。同源蛋白质的保守的残基是保持那类蛋白质共同的功能或者是维持共同结构的关键因素。相反,在一类蛋白质内变化的残基看来对结构和功能是不重要的,但涉及在分子识别中起作用的专一性。这两个假设已经用于指导位点突变分析蛋白质。

通过突变研究蛋白质的功能有一定的不确定性。这种不确定性是由于难以区别突变效应和结构微小变化效应造成的。最好的方法是使突变过程减小对结构的影响,预先尽可能多地了解蛋白质的结构,进化保守以及生物化学信息。最好的突变策略依赖于所涉及的蛋白质、生物体系以及已掌握的信息。这些信息主要包括 X 射线或 NMR 结构信息,特别是蛋白质分配体或底物形成的复合物的结构信息,在原子水平上的结构与活性关系及分子间相互作用信息。

如果同源蛋白质的结构是已知的和可以进行序列对准的,突变策略可以使用不同二级结构单元的转换,如“loop—交换”,以减少结构破坏的危险性。

一组同源蛋白质同感兴趣的蛋白质的序列比较以鉴定高度保守的残基。它们是突变及功能进化的很好的候选残基,因为它们与这类蛋白质的共同的功能与保持结构有关。相反,非保守残基涉及每个蛋白质的独特功能。例如底物或结合专一性。因此非保守残基是分析的靶,特别是对于专一性研究。有用的策略涉及同源蛋白质间序列单元的转换,交换整个结构域、loops 或单个残基。这个方法的优点是转换的序列与蛋白质的整体构象是协调的,这些突变对结构破坏少。

4. 中改——分子剪裁

分子剪裁是指在对天然蛋白质的改造中替换 1 个肽段或一个结构域。Winter 等将分子剪裁技术成功用于抗体分子的改造。他们将小鼠单克隆抗体分子重链的互补决定域用基因操作方法插到人的抗体分子的相应部位上,使得小鼠单抗分子所具有的抗原结合专一性转移到人的抗体分子上。这项实验有重要的医学价值。

蛋白质结构及功能对残基的替换有一定的容忍度,即结构与功能关系有一定的稳定度。

5. 大改——从头设计

从头设计蛋白质是在人们认识蛋白质、掌握其结构规律、了解结构功能关系的基础上进行的。同时它也是人们更加深入全面理解蛋白质的一个过程,它的目的是人工创造出自然界中不存在的蛋白质分子,使之具有人们所需要的特殊结构和功能,为人类所利用。

进入 21 世纪人类已经迈进蛋白质设计的时代,并且正在以越来越快的步伐前进。蛋白质分子设计有助于进一步揭示蛋白质的结构原理以及结构与功能的关

系,同时也有助于指导药物合成以及工业产品的设计。因此它既是基础研究的手段,同时也为实业界展示了诱人的应用前景。

7.2.2 蛋白质工程的研究方法

基因工程通过分离目的基因重组 DNA 分子,使目的基因更换宿主得以异体表达,从而创造生物新类型,但这只能合成自然界固有的蛋白质。蛋白质工程则是运用基因工程的 DNA 重组技术,将克隆后的基因编码序列加以改造,或者人工合成新的基因,再将上述基因通过载体引入适宜的宿主系统内加以表达,从而产生数量几乎不受限制、有特定性能的“突变型”蛋白质分子,甚至全新的蛋白质分子。

蛋白质工程所要实现的目标就是根据人类的需要改造天然蛋白质或设计创造自然界没有的新蛋白质。实现蛋白质工程目标有三个环节的工作要做。第一,需要用结晶学技术培养获得蛋白质晶体,而且尽可能得到微晶,利用 X 射线技术通过晶体衍射仪收集衍射数据,经等密度图转换,对晶体进行测量、分析,确定蛋白质的三维结构。除此之外还可以通过分光光度计、核磁共振、圆二色性、电镜等技术获得某些结构信息。第二,需要借助电子计算机对蛋白质进行选择饰变,可通过模拟三维图像进行能量计算和动力学研究,从氨基酸化学结构预见空间结构,也可通过建立数据库、专家系统和人工智能等途径确定蛋白质结构和功能的关系,找到所要修饰的位点。第三,通过改变编码蛋白质的基因的核苷酸实现蛋白质结构的改变,这首先需对基因序列有所了解,然后通过定点突变技术进行碱基替换,这就需要一整套的基因操作技术。总之通过这三个环节的工作才能对所饰变的蛋白质的结构和功能有一基本认识。由于目标不同起点可能不同,如对已有的蛋白质改造需要从结构测定入手;而创造新的蛋白质,可通过已有的蛋白质结构功能信息资料进行分子设计,通过基因表达后再对表达产物的结构和功能进行检测、分析。要获得一个理想的蛋白质工程产品往往需进行多轮的饰变、分析、检测与修改的过程才能实现。

7.3 蛋白质工程的应用和发展

20 世纪 80 年代初美国 Genex 公司 K. Ulmer 第一次提出蛋白质工程概念,并建立了专门研究实体,制定了相应研究开发计划。其后,以美国为首的几家生物技术公司同时应用蛋白质工程技术得到几种蛋白质结构,标志着蛋白质工程正式诞生。蛋白质工程创立初始即显示了它的巨大应用前景,如英国医学研究协会剑桥分子生物学研究所 G. Winter 等实现了嗜热脂肪芽孢杆菌氨酰 tRNA 合成酶活性改变;美国旧金山 Genentech 公司 L. J. Pery 等使 T4 溶菌酶热稳定性得到

改变,对于用 T4 噬菌体清除乳酪制造中梭状芽孢杆菌污染可发挥重要作用; S. Rosenberg 等对 α -抗胰蛋白酶的改造,可防止其被氧化,并被应用于防止肺气肿;美国 Genetech 和 Genrncor 公司改变了枯草杆菌蛋白酶稳定性和抗氧化性,这些都可应用在洗涤、蚕丝加工业、制革工业中。因此蛋白质工程得到许多国家政府和公司的极大关注,纷纷投入巨大的资金和力量进行研究和开发,近 10 年来已有一些工业用酶和家用产品进入市场,一些项目得到专利保护,商业竞争趋势异常激烈。在开发产品的同时,蛋白质工程基础研究也在不断加强,研究对象由单一蛋白质扩充到糖蛋白、糖、蛋白核酸复合物以及核酸酶等生物分子和复合物。研究内容从蛋白质修饰延伸到分子设计、构象设计、药物设计等。研究技术手段日新月异,基因资源的积累和计算机应用软件的大量涌现,促成了生物信息研究 (Bioinformatic) 技术的形成,为加强蛋白质工程的高效、理性和创造性奠定了基础,这必将大大加快研究和开发进程。进入 20 世纪 90 年代以后,对天然蛋白质进行改造的技术越来越成熟,设计合成新的蛋白质的途径已取得突破性进展,为蛋白质工程树立了新的里程碑。

蛋白质工程在生命科学研究和医药、工业、农业等各行各业中具有广阔的应用前景,其突出表现有以下几个方面。

7.3.1 医用蛋白质工程

利用生物细胞因子进行人类疾病治疗的独到作用已越来越被人们重视,基因工程技术诞生后首先就被用于人类生长激素释放抑制因子、胰岛素等医用蛋白质产品的开发,这大大降低了治疗的成本。一方面利用大肠杆菌进行真核生物蛋白质表达会遇到生物活性低等问题,解决这些问题的出路一是研究开发新的表达系统,如酵母、哺乳动物细胞等。另一方面就需要借助蛋白质工程,如利用分子设计和定点突变技术获得胰岛素突变体等取得了相当多的成果,此外,干扰素、尿激酶等蛋白质工程也取得了长足的发展。此外,利用蛋白质工程技术进行分子设计,通过肽模拟物构象筛选药物等方面研究更加丰富了蛋白质工程的内容。

7.3.2 工业用酶的蛋白质工程

以酶的固定化技术为核心的酶工程是 20 世纪继生物发酵工程后又一次创造出巨大工业应用价值的现代生物工程技术。通过酶的结构或局部构象调整、改造,可大大提高酶的耐高温、抗氧化能力,增加酶的稳定性和适用 pH 范围,从而获得性质更稳定、作用效率更高的酶,并应用于食品、化工、制革、洗涤等工业生产中,如食品工业中用于制备高果糖浆的葡萄糖异构酶,用于干酪生产的凝乳酶,用于洗涤工业的枯草杆菌蛋白酶等蛋白质工程产品。

7.3.3 病毒疫苗的蛋白质工程

疫苗在病毒等病原引起的人及畜禽传染性疾病的预防中起着不可替代的作用,从制备疫苗的途径来说已有几代产品,目前如乙肝等基因工程疫苗已开始得到应用。通过抗原移植、构建各种颗粒体、活载体及多价疫苗的研究已经成为生物技术领域的研究热点,但也遇到一些问题,如移植抗原三级结构没有完全恢复天然状态,因而使得抗原性不够理想。蛋白质工程技术将在今后的疫苗改造中发挥重要的作用,不但可使抗原性得到最大的提高,还可使重组疫苗抗病作用更加广泛。近年来越来越多的病毒精细结构的阐明正在为开展蛋白质工程奠定基础。

7.3.4 抗体的蛋白质工程

抗体不仅在哺乳动物机体中担负着重要的体液免疫功能,还在医学、生物学免疫诊断中被广泛地应用。20世纪证明了抗体是一类免疫球蛋白,并相继阐明了抗体的产生及其多样性的细胞和分子机制,使免疫学研究成为生命科学前沿领域。同时抗体的制备技术也经历着一次又一次革命,由血清抗体到杂交瘤单克隆抗体,再到基因工程抗体库技术,可谓日新月异。单克隆抗体给人类疾病的药物导向治疗带来了曙光,但应用上遇到鼠抗体对人具有免疫原作用的问题,蛋白质工程已成功解决这个问题。通过结构分析表明,抗体可变区内具有6个互补决定区(CDR)与抗原结合作用,其他区域作为支架(FR)维持构象,通过CDR移植已构建了30多种改型的人源化鼠抗,并通过序列分析比较和计算机模拟进行分子设计,对FR区特定碱基进行替换,保证了改型后抗体亲和力不下降,这种抗体有人称之为第二代基因工程抗体,亦即蛋白质工程抗体。可以相信,蛋白质工程在未来改造抗体中还将发挥更大作用,目前有人研究通过抗体的多样性从抗体库中筛选具有酶活性的分子,从而得到抗体酶。

分子生物学基础研究及其他以上提到的只是蛋白质工程应用上的几个具有代表性的领域,实际上它的作用远非如此。随着蛋白质工程研究对象的扩大和技术的成熟,其应用领域也将不断拓宽,除用于直接生产蛋白质产品外,也将通过操作生物体内蛋白质而获得特定的生物性状。有人根据植物叶绿体中1,5-二磷酸核酮糖羧化酶、加氧酶双重活性,提出通过蛋白质工程途径提高其还原能力、降低氧化能力从而提高光合效率的设想,目前进行了大量探索工作,一旦成功必将给农业生产带来巨大的效益。另外,改良农作物的蛋白质组成的蛋白质工程也是目前正在研究的重要课题。蛋白质工程不仅对产品开发具有巨大的作用,它也为基础分子生物学研究提供了非常有力的手段,因为它可以从分子内部了解构象和功能的关系,从而阐明分子作用机制。近年来国际上正在利用结构分析、定点突变等技术研究一些重要的分子生物学和细胞分子生物学问题,如蛋白质合成过程

中延伸因子的作用、蛋白体在蛋白质折叠、加工过程中的作用位点,血球凝集因子 TF/VIIa 相互作用、细胞膜信号传递中丝氨酸、苏氨酸、磷酸化酶的催化机制以及肿瘤基因 Ras 蛋白的作用等,这些方面都取得了较快的进展。

蛋白质工程作为一项新的生物技术可以说还刚起步,它的发展前景无量。今后蛋白质工程将和其他生物技术共同发展,并为阐明生命科学领域中重大问题且尽快转变成实用技术做出巨大的贡献。

本章小结

本章内容主要包括以下几个部分:

1. 蛋白质的结构基础,包括蛋白质的化学组成,蛋白质的一级、二级、三级以及四级结构。其中重点是蛋白质的基本组成(氨基酸),蛋白质的一级和二级结构。蛋白质的结构基础也是蛋白质工程的共同基础。

2. 蛋白质工程原理和方法,包括蛋白质分子设计和研究方法。蛋白质的分子设计根据其改造部位的多寡分为三类:第一类为“小改”,可通过定位突变或化学修饰来实现;第二类为“中改”,是对来源于不同蛋白的结构域进行拼接组装;第三类为“大改”,也就是完全从头设计全新的蛋白质。其中“小改”使用最广泛,为主要方法。

3. 蛋白质工程的应用和发展,了解蛋白质工程在各个领域中的应用情况及其发展趋势。

复习思考题

1. 组成蛋白质的常见氨基酸有哪些?它们的分子结构有何共同点?
2. 维持蛋白质分子空间构象的化学键包括哪些?
3. 蛋白质的一级、二级、三级以及四级结构的概念,及其各自的特点是什么?
4. 蛋白质分子设计根据其改造部位的多寡分为哪几大类?蛋白质分子设计的原理与依据是什么?
5. 举例说明蛋白质工程在医药上的应用。谈谈你对蛋白质工程发展前景的看法。



农业生物技术

8.1 生物技术与种植业

植物通过光合作用所形成的产物是人类及其他生物直接或间接的食物来源，植物所创造的产品及用途与人是密不可分的。很早以来人们就寻求提高重要作物质量和产量的方法，传统的育种过程是一个缓慢而艰辛的过程，但它取得了重大的成功。现在高质量的水稻、玉米、小麦、土豆等就是从它们早先的种演变而来的。传统的育种方式，包括生殖杂交，将继续作为提高谷物农学性状的主要方式，但一些新技术如组织培养、单倍体育种、细胞质融合和基因工程等现代生物技术方法将发挥越来越重要的作用。

8.1.1 植物雄性不育及杂种优势利用

植物雄性不育是自然界的普遍现象，在植物的 43 个科 162 个属 617 个种中发现了雄性不育现象。其中单子叶植物禾本科、双子叶植物茄科、豆科和十字花科中的雄性不育现象最引起人们的重视，这些植物具有重要的经济价值，对于自花授粉的植物利用雄性不育可以培育不育系，利用不育系生产杂交种子，为增加农作物产量和改善品质提供优良种源。

植物雄性不育从基因控制水平可分为细胞质雄性不育和核雄性不育。细胞质雄性不育性状既有核基因控制又有核外细胞质基因控制，表现为核质相互作用的遗传现象。雄性不育是研究植物的线粒体遗传、叶绿体遗传和核遗传的极好材料，可以结合性状遗传、细胞遗传、分子遗传进行研究。因此，植物细胞质雄性不育的研究，成为近年来植物遗传学研究十分活跃的研究领域。

在农业生产中以此理论为基础，建立了三系育种体系：在这个体系中包括：①不育系——其雄蕊中的花药是不育的，无法实现传粉受精作用，而其雌蕊是可育的；②保持系——其作用是给不育系授粉，杂交后代仍然保持不育性状；③恢复系——该品系含恢复基因，给不育系授粉受精后其后代是可育结实的，并且能够形成杂种优势，从而提高农作物产量与品质。三系中不育系的寻找和培育是关键。20 世纪 70 年代中期，我国首先在水稻中发现野生型雄性不育系，并实现了三系配套，大面积用于农业生产从而大大提高了粮食产量，也使我国杂交水稻的

研究和运用处于世界领先水平。随后在小麦、棉花、油菜、萝卜、马铃薯等经济作物的生产中也广泛运用。

植物核雄性不育性状是由细胞核内基因控制的,目前的研究认为是由核内一对等位基因调控。这种核雄性不育基因往往受到外界光照或温度等因素的影响。1973年我国首次发现具有光周期敏感不育的水稻品系农垦 58s,并正式命名为光敏感核不育水稻。该不育系的不育性状受到光照时间长短的控制,在夏季长日照条件下,它表现为雄性不育性,可作为制种用的母本;而在秋季,日照时间缩短,其育性又恢复正常,并可自交结实,用于保种,起到保持系的作用;再配合恢复系,这就是杂交水稻生产运用中的二系法。由于它省去三系杂交体系中的保持系,大大降低了制种成本。并且其恢复系广,易获得优势组合,可避免不育细胞的负效应和细胞质单一化的潜在威胁,因而受到农业生产及育种界的重视。

随着雄性不育研究不断深入,研究技术也不断改进,产生可遗传不育的技术方法很多,主要有:基因工程方法、远缘杂交核置换、辐射诱变、体细胞诱变、组织培养、原生质体融合和体细胞杂交等。远缘杂交核置换仍然是培育植物雄性不育的主要方法。中国水稻所利用巴斯马提品种进行胚组织培养,然后用愈伤组织进行辐射,从而选育出巴斯马提雄性不育系。匈牙利国家自然科学院 Menczel 等(1982年)以链霉素抗性基因作标记在烟草品种间进行原生质体融合,实现了细胞质雄性不育基因的转移。

利用植物基因工程的原理和方法,已创造了一批不育系,并在生产上得以运用,同时获得了可喜的成果。其中最典型的例子是在油菜和烟草上的应用。人们从细菌中分离出一种芽孢杆菌 RNA 酶基因,该基因编码的酶可降解高等植物细胞内的 RNA,从而阻止蛋白质的生物合成,破坏细胞的生理功能。

基因工程方法人工创造雄性不育植株的另一个重要方法是反义技术。在植物体生殖生长阶段,花粉的正常发育同多种因素相关,其中包括一些必不可少的蛋白质。而其基础是建立在编码这些蛋白质的基因能正常表达。例如微管蛋白,如果说其表达受到抑制,微管及细胞骨架就形成不了,就会导致细胞无法行使正常功能,从而导致败育。我们可根据编码的正常蛋白质的基因序列,设计与之相对应的能转录出反义 RNA 链的反义 DNA,转基因后所产生的反义 RNA 链根据碱基互补配对原理就会与 mRNA 链结合成双链,从而使正常的 mRNA 无法和核糖体结合,导致蛋白质翻译终止,而最终造成雄性不育。国内外已在拟南芥、玉米、油菜等植物上创造出相应的不育系。

植物雄性不育及杂种优势利用,已成为现代粮食作物和经济作物提高产量、改良品质的一条重要途径,无论在理论研究或实践应用,都日益受到各国科学界和政府的广泛重视。我国作为一个人口大国,这方面的工作显得更加重要,杂交水稻的大面积推广和杂种优势的理论研究均被列入我国国家的 863 计划和攀登计

划等重大研究计划中,并已取得令世人瞩目的巨大成绩。

8.1.2 植物抗逆性研究

自然界中的植物体与环境间有着密不可分的关系。环境提供了植物体生长、发育、繁殖所必不可少的物质基础如阳光、水分、土壤、空气等;但环境又会给予植物体很大的选择压力,如气候寒冷、土壤或水分含盐量过高、病虫害等。面对这些不利的环境条件,许多种植物消亡了。但同时也有许多品系发生遗传变异,以适应恶劣条件的影响,表现出一种抗逆性如抗寒、抗冻、抗盐、抗虫害、抗病毒、抗真菌等。在自然条件下,植物体的这种自发遗传变异以达到抗逆性的过程,是一个漫长且效率较低的过程,而逆性环境的出现,特别是病虫害的发生是频繁的,例如水稻的稻瘟病、白叶枯病、棉花的棉铃虫病等都会造成农业上大面积的减产。这就需要人们利用现代生物技术的方法来培育抗逆性植物。

传统的方法是在一定逆性环境选择压力下,采用随机筛选或通过诱变、组织培养、原生质体融合、体细胞杂交等方法定向筛选。这些方法盲目性较大,同时由于植株遗传变异频率较低导致筛选效率不高;另一方面由于植物体间的种属界限明显,在一种植物体上的优良抗逆性状出现后,很难顺利地将这种遗传性状转入到其他种的植物体中去。发展起来的植物基因工程技术,可以有效地解决这些问题。

这种方法一方面由于它是特定抗性基因定向转移,因而频率较高,比自发突变高出100~10 000倍,从而大大提高选择效率,极大地避免了盲目性;另一方面其基因来源打破了种属的界限,不仅植物来源的基因可用,动物、细菌、真菌甚至病毒来源的基因都可以使用。因而植物基因工程技术已成为一种广泛,且有效地培育植株抗逆性的手段。通过基因工程技术获得的植物称为转基因植物。下面我们通过一些已成功用于农业生产的具体例子说明转基因植物的应用。

1. 抗除草剂作物

这是一项比较成功的植物基因工程,目前至少已培养出多种抗除草剂的转基因植物,给农业带来了很大方便。使用抗除草剂的转基因植物可以促进除草剂的大面积使用,而不必担心作物本身受害。

草甘膦和膦丝菌素均是广泛使用的广谱除草剂,因其除草时是非选择性的,在杀死杂草的同时,也将杀死作物植株,因此在应用中对作物影响很大。转基因技术为解决这一问题提供了一个崭新的途径。目前已经分别从一种细菌和一种霉菌中分离出抗草甘膦的基因和抗膦丝菌素基因。在理论上,通过基因工程技术分别将这两种基因转入到作物中,这种作物将获得抗草甘膦或膦丝菌素的能力,从而在使用草甘膦或膦丝菌素除草时,则可选择性地杀死杂草,作物却由于具备抗

性而不受影响继续生长。

2. 抗昆虫作物

有害昆虫一直是农作物最难对付的天敌，对害虫进行绿色防治显得越来越重要。转基因技术已经为这种绿色防治开辟了一条新的途径。由于生物各自的保护作用，一些生物体内会产生对另一些生物有毒的物质。利用这一现象，将一些生物中对昆虫有毒的基因转入到作物中，作物也将由此产生对昆虫有毒的物质而获得抗昆虫性。

苏云金杆菌能产生一种对鳞翅目昆虫有特异毒性作用的毒蛋白，将这种蛋白质的基因转入到作物体内，将使作物获得对这类昆虫的抗性。将这种毒蛋白基因转入到了烟草中，并获得了含有毒蛋白基因的烟草转基因植株，可对鳞翅目昆虫产生一定的特异性抗性。苏云金杆菌毒蛋白基因研究已吸引了越来越多科学家们的兴趣。

豇豆胰蛋白酶抑制因子是另一种深入研究的抗昆虫蛋白。它具有广谱的昆虫抗性，能抗鳞翅目、鞘翅目害虫等，几乎对所有害虫都有效，但对人畜无害。因此它比苏云金杆菌更有应用价值。

3. 抗真菌作物

几丁质是真菌细胞壁的组分之一，可为几丁质酶分解破坏。美国科学家将细菌的几丁质酶基因导入烟草中，通过大田试验发现，这种转基因烟草具有高效的抗真菌感染能力。将几丁质酶基因导入番茄、马铃薯、莴苣和甜菜中，并正在准备进行大田试验。这一技术将对蔬菜和果实类植物抗真菌感染具有重要意义。

4. 抗病毒作物

对于抗病毒的转基因作物研究已经取得了相当多的成果。1986年美国在抗烟草花叶病毒中取得了成功。之后，抗黄瓜花叶病毒、苜蓿花叶病毒、马铃薯X病毒的转基因植株也陆续获得成功。我国科学工作者用这一方法培育的抗病毒优质香料烟品种已于20世纪80年代末期进入大田试验，抗病性、产量和品质等各项指标均为优良，超过引进品种和进口烟草。番茄的抗病毒转基因植株在田间也表现出明显的抗病性。我国在20世纪80年代后期还获得了转基因黄瓜、烟草和番茄，对病毒复制有明显抑制作用。

此外，培育抗盐、抗寒和抗旱等作物良种的研究也很重要，因为这不仅能提高植物对这些不良环境的抵御能力，而且还可以扩大它们的分布区域和种植面积，这对我国人多地少的国情尤为重要。我国地域广大，自然生态环境复杂，生物资源相当丰富，为进行这方面研究提供了有利条件。

8.1.3 生物农药及生物控制

农作物在田间生长过程中, 往往会遇到病虫害的侵扰, 从而导致大面积减产和品质下降。传统的方法是运用化学农药。化学杀虫剂的使用在很大程度上可以提高农业和森林业的产量, 然而也正是由于化学农药的广泛应用不仅造成水源污染、土地毒化、不利于耕种, 而且农药残留在食物上, 导致人畜中毒。科学家们在努力培育抗病害作物以减少农药使用量的同时, 正在寻找替代化学杀虫剂的方法, 来控制农业病虫害。一个最有效的方法就是运用自然界中的生物学方法来控制病虫害以减少因使用化学农药带来的诸多后遗症。例如: 所有的有机体都有它们特定的疾病, 同时疾病也有其天敌。在现代的观念中, 生物控制是指运用微生物等去控制害虫和疾病, 类似以昆虫的天敌控制昆虫的目的。生物控制最成功的例子是苏云金芽孢杆菌的运用, 其细菌孢子中含有的晶体毒蛋白能特异地作用于鳞翅目昆虫, 它已经被广泛运用达 30 年。

近年来一些毒素的基因被分离、测序以及重组和改造, 这些基因也被转入多种植物中, 并在植物组织中表达。这样的植物自身就具备了抗病虫害的能力。

8.1.4 植物生物技术的其他应用

1. 植物次级代谢产品

早在 1939 年, 人们已能从特定植物体中分离一些细胞, 这些离体细胞能在人造环境中生存合成人类有用的次生代谢产物, 如生物碱、黄酮类化合物等。近年来, 利用植物细胞培养技术以及各种植物细胞固定化技术, 可以像固定化微生物那样, 在预先设计的生物反应器中高效地源源不断地生产出具有商业价值的次生代谢产物。

2. 改良种子的贮存蛋白

对水稻谷蛋白、菜豆贮存蛋白、小麦贮存蛋白、巴西坚果种子蛋白和玉米醇溶蛋白基因的研究较为深入。利用这些基因进行转化会使受体植物的蛋白质含量得到提高。特别是巴西坚果种子蛋白富含甲硫氨酸, 而大多数禾谷类种子蛋白则缺乏此种氨基酸。目前美国科学家已成功地将玉米醇溶蛋白基因导入向日葵的细胞内, 在转化植株内得到部分表达。

3. 被改良的药用植物

日本科学家通过转基因技术, 将一种决定镇痛药莨菪胺生物合成的酶基因转

入到茄科的颠茄中,使莨菪胺的产量从 0.3% 提高到 1.0% 左右,并且该特性是可遗传的。

4. 植物再生技术

快速繁殖是用组织培养方法将小块植物组织在室内迅速、大规模繁殖的技术。快速繁殖技术不仅已在农作物上广泛应用,而且对于生长缓慢的名贵花卉、林木果树和濒临灭绝的珍稀植物具有特殊意义。快速繁殖技术不仅降低了成本和价格,而且突破了季节的限制,同时很好地保存了这些名贵品种的优良遗传特性。现今的植物快速繁殖已经像工厂一样用工业化方式经营和生产,用 1 棵幼苗或 1 片叶子在 1 年内生产出几十万甚至上百万株苗。

5. 提高作物收获后的贮藏能力

植物收获后往往在转运和贮藏过程中会造成损失。在美国和欧洲,每年果蔬收获后由于转运和贮藏过程造成的损失达 40%~60%。造成损失的原因有病虫害的影响,过软的水果和蔬菜容易损伤,在冷热环境中破损,以及过熟后失去原味等。而这些生理变化都是由果蔬细胞内酶系统活性调节的。这种酶系统活性能够被控制吗?转基因番茄的诞生就明确地回答了这个问题。果实生长过程中,植物体往往会合成一定量的乙烯而加速果实成熟,利用反义技术抑制乙烯合成酶的活性,降低番茄在成熟过程中乙烯的形成量,因而延迟了果实的变软,大大提高番茄贮藏期,其货架期可长达 152d。另外番茄中由于多聚半乳糖醛酸酶能降解细胞壁的成分,导致番茄在成熟过程中果实变软。这个过程与其色泽是相佐的。在通常条件下,如果番茄在枝条上生长成熟,待其色泽变化完成,其果实也会变软。因而在运输中就容易破损。通过向番茄中转入多聚半乳糖醛酸酶的反义基因就可起到延缓变软的良好效果。这种技术正被广泛运用在其他水果上。

基因工程技术也被广泛应用于控制观赏植物的叶色、花数、花形、香味等性状。这是植物产业中的一个重要领域。

8.2 生物技术与养殖业

农业动物为人类提供肉、蛋、奶以及毛皮、绢丝等产品,满足人类对动物蛋白的营养需要和其他生活需要。生产农业动物的养殖业包括畜牧、水产和其他有关副业,涉及的动物门类有贝类、昆虫、鱼类、两栖类、爬行类和哺乳类。养殖业的发展和种植业一样需要大量的优良品种,需要不断地改良农业动物的生产性状,才能达到高产、优质、高效的目标。同作物育种一样,常规的动物育种技术主要是对与生产性状有关的表型性状的选择,通过直接选留或淘汰某些直观的表

型性状来提高动物的生产性能如产奶量、产蛋量、瘦肉率、生长速度等。由于动物不同于植物的生活方式和繁殖方式,农业动物尤其是大型家畜育种比作物育种存在更多的局限性,往往需要大量的种群和漫长的过程才能使选育的性状稳定下来。虽然传统的育种工作已经取得了很大的成就,养殖业的品种和产量有了很大的增长,但是随着人口的急剧增长和环境的日渐恶化,养殖业面临着越来越大的压力。

现代生物技术的迅速发展将为养殖业的革命提供有效的技术手段。基因工程、细胞工程和胚胎工程技术的日臻成熟,给农业动物生产注入了前所未有的活力,短时间内大量繁殖优良动物品种或创造具有新性状良种已不再是遥远的梦。

8.2.1 动物转基因技术

动物转基因技术是在基因工程、细胞工程和胚胎工程的基础上发展起来的。将外源基因导入动物的基因组并获得表达,由此产生的动物称为转基因动物。转基因技术利用基因重组,打破动物的种间隔离,实现动物种间遗传物质的交换,为动物性状的改良或新性状的获得提供了新方法。作为基因工程技术之一,动物转基因同样需要目的基因、合适的载体和受体细胞。由于动物细胞有别于植物细胞,绝大多数不具备发育的全能性,不能发育成为完整的个体,只有受精卵才可能发育成个体,所以要得到转基因动物还需要细胞工程和胚胎工程技术配合。动物转基因的步骤是:鉴定和构建外源基因;外源基因导入受精卵;转基因受精卵移植到母体子宫;胚胎发育;检测新基因的遗传性和表达能力。

1. 导入外源基因的方法

(1) 显微注射法 这是使用最早、最常用的方法。这种方法用显微注射器直接把外源 DNA 注射到受精卵细胞的原核或细胞质中。如果能够成功地把 DNA 注射到原核中,可以得到较高的整合率。注射到细胞质的 DNA 因为与受体基因组结合的机会较少,整合率较低。哺乳动物常用注射原核的方法,鱼类和两栖类的卵是多黄卵,难以在显微镜下辨认原核,通常只能把 DNA 注射到细胞质。也有人采用注射卵母细胞的方法制作转基因鱼,先把外源 DNA 注射到卵母细胞,再让卵母细胞在体外成熟,然后受精。显微注射法的优点是直观,基因转移率高,外源 DNA 长度不受限制,实验周期相对而言较短,常成为导入外源基因的首选技术。不足之处是操作难度大,仪器要求高,导入的外源基因拷贝数无法控制。

(2) 病毒载体法 许多动物病毒在感染宿主以后能够大量复制,有些病毒在复制过程中能整合到宿主细胞的基因组。更重要的是动物病毒基因组的启动能被

宿主细胞识别,可以引发导入基因的表达。由于这些特性,一些病毒被选择作为目的基因的载体感染动物细胞,以期得到转化细胞。在转基因操作中,病毒载体可以直接感染着床前或着床后的胚胎,也可以先整合到宿主细胞内,再通过宿主细胞与胚胎共育感染胚胎。最常用的病毒载体是逆转录病毒。病毒载体的优点是单拷贝整合,整合率高,插入位点易分析等;缺点是安全性和公众的接受程度。

(3) 脂质体介导法 用脂质体作为人工膜包裹 DNA,以此作为载体导入 DNA。

(4) 精子介导法 成熟的精子与外源 DNA 共育,精子有能力携带外源 DNA 进入卵里,并使外源 DNA 整合到染色体。这种能力使人们看到提高动物转基因效率的希望。精子作为转移载体的机制还在探索之中,但至少为大动物转基因的研究提供了又一个新途径。

(5) 胚胎干细胞法 胚胎干细胞是从早期胚胎的内细胞团经体外培养建立起来的多潜能细胞系,被公认为转基因动物、细胞核移植、基因治疗的新材料,具有广泛的应用前景。用于动物转基因时,作为基因载体,导入早期受体细胞,整合到胚胎中参与发育,形成转基因的嵌合体动物。

2. 转基因农业动物

最早问世的转基因动物是转基因小鼠。转基因小鼠证明了生物技术可以改变动物的天然属性,从而显示了动物转基因技术的广阔应用前景。转基因技术应用于农业动物的主要目标是提高生产性能,提高抗病性等。进入 21 世纪用转基因动物作为生物反应器的研究越来越受到人们的重视,已逐步走向商品化生产。

(1) 转基因鱼 20 世纪 80 年代中期国内外开始转基因鱼的研究。鱼类因其产卵量大,体外受精,大大简化了转基因操作的步骤。我国学者朱作言首次用人的生长激素构建了转基因金鱼,已有鲫鱼、鲤鱼、泥鳅、鳙鱼、大马哈鱼、鲢鱼、鲑鱼等各种淡水鱼和海鱼被用于转基因研究。

转基因鱼的研究主要集中在提高生长速度和抗逆性,以及发育生物学和插入突变研究。已有多种哺乳类和鸟类的基因被成功地整合到鱼类的基因组中,例如转入生长激素基因鲤鱼、鲫鱼、泥鳅、鲑鱼,生长激素能提高动物的生长速度,已经有转生长激素基因鲤鱼明显提高了生长速度,显示出转基因鱼在渔业生产和水产养殖业的潜在经济价值。在提高抗性方面,抗冻蛋白基因被用来提高鱼类的抗寒能力。生长在北美的美洲拟鲟的抗冻蛋白基因导入红鲟、鲑鱼的细胞系,被测到了该基因的表达;美洲拟鲟的抗冻蛋白基因转到鲑鱼卵中,也测到了有所表达;转抗冻蛋白基因技术有可能成为南鱼北养、扩大优质鱼种养殖范围的有效途径。转基因鱼研究还引进了反义 RNA 技术,有可能开辟鱼类抗病新途径。我国

的转基因鱼研究已达到了国际先进水平,有不少研究小组使用鱼类基因构建了转基因鱼。使用鱼类自身基因元件构建转基因鱼,可以解决基因表达强度问题和推广转基因鱼的环境问题、伦理道德问题,已经引起广泛的重视。

(2) 转基因家禽 生产转基因动物的常规操作用于家禽是很困难的。这是因为鸟类的繁殖系统有别于其他动物。家禽卵的受精是在排卵时发生的,受精卵从输卵管排出需要 20h 左右,其时已经开始卵裂,产出时的卵已有 6 000 多个细胞。生产转基因鸡的方法可分为蛋产出前的操作和产出后的操作两种类型。产出前的操作方法是在受精后每一次卵裂前取出单细胞的卵,在体外进行转基因操作,然后用代用蛋壳作为培养器皿在体外培养至孵化。

进入 21 世纪还有不少实验室正在探讨以鸟类精子作为基因载体的途径。由于家禽人工授精技术已经相当成熟,精子携带基因具有很好的可行性,有待解决的问题是提高精子携带外源 DNA 的能力。蛋产出后的操作载体可有多种,被认为较有前景的是胚胎干细胞法和原生殖细胞 (PGC) 法。原生殖细胞是鸟类配子的前体,有实验证明原生殖细胞可以从一个胚胎转到另一个胚胎发育。这意味着 PGC 的转染也可以作为生产转基因家禽的候选方法。转基因技术在家禽生产上的应用,同样以提高抗病性和改良生产性状为主要目标。例如,用鼠的抗流感病毒基因导入鸡胚的成纤维细胞,细胞表现对流感病毒的抗性,提示了抗流感病毒基因导入胚胎细胞产生抗病性的可行性。对鸡基因组做图使鉴定抗性基因取得进展,通过品系之间转移抗性基因也可以作为提高抗性的途径。许多与鸡繁殖和生产有关的激素和生长因子基因已经被克隆,已有人将牛生长激素基因导入鸡的品系,获得高水平表达牛生长激素的鸡,体重大于对照组。因此通过基因操作改变鸡的生产性状是可能的。对某些不能通过常规育种手段改良的性状,通过转基因法例如导入其他物种的基因或许可以起作用。此外,用鸡蛋生产外源蛋白,例如抗体蛋白,是转基因鸡生产的一个十分诱人的领域。

(3) 转基因家畜 家畜的转基因研究得益于小鼠,进展较快。转基因猪、牛、马、羊、兔等家畜纷纷出现,并逐步走出实验室进入实用阶段。哺乳动物体外受精和胚胎移植技术为转基因家畜的成功提供了有效的技术手段。转基因家畜除了与其他转基因农业动物一样瞄准抗病性和生产性能以外,还因其与人的生物学相似性,在器官移植、药物生产和特殊疾病模型等方面显示出特殊的价值。

转生长激素基因的猪,饲料转化率、增重率提高,脂肪减少。转抗流感病毒基因的猪抗流感病毒能力增强。通过转基因方法解决器官移植中的超敏排斥反应的设想在转基因猪的研究中得到令人鼓舞的结果,这个实验将人的补体(一类参与免疫排斥的蛋白质)抑制因子基因导入猪的胚胎,得到在内皮细胞、血管平滑肌、鳞状上皮等不同组织的不同程度的表达,说明在供体组织中表达受体的补体抑制系统,克服补体介导的排斥反应是可行的,这个研究为异种器官移植展示了

美好的前景。转基因的家畜作为生物反应器生产新一代的药物已有许多例子，特别是乳腺作为生物反应器，产物已经进入市场。

8.2.2 胚胎工程——家畜繁殖的新技术

胚胎工程技术使哺乳动物的繁殖得以打破时间和空间的限制，为家畜良种的繁育和推广提供了快速有效的途径。哺乳动物独特的胎生模式使其胚胎发育得到母体的直接保护，大大提高了胚胎的成活率，这是动物进化史上的大进步。哺乳动物的成熟期长，产子数少，孕期不排卵，繁殖有季节性，这些特性又成了制约家畜良种大量繁殖的因素。胚胎工程是对哺乳动物的排卵、受精、胚胎早期发育等繁殖过程进行人工操作的现代生物技术。基因工程技术为胚胎工程提供了新天地，胚胎工程是以提高良种的繁殖率和扩大推广途径为目标，进一步发展成为定向改变动物性状的动物转基因技术的关键。胚胎工程技术主要包括冷冻保存技术、胚胎移植、体外生产胚胎、胚胎克隆、性别鉴定和转基因技术。

1. 冷冻保存技术

精液保存技术已经成为畜禽繁殖的常用技术。精液冷冻技术和人工受精技术相配合，打破了地域对优质种公畜的配种限制，实现了大范围良种繁育推广。在冷冻精子技术的基础上发展起来的胚胎冷冻技术进一步解决了胚胎移植中母畜性周期的时间限制，同时也解决了远距离的运输问题。例如，1 000 只牛胚胎连同冷冻容器总重量不超过 50kg，在飞机上只要相当于一个座位的地方就能容纳。从而使世界范围内的良种推广大大简化。胚胎冷冻保存技术有利于转基因动物的种质保存，养活饲养和维持动物所需的巨额费用，避免世代延续可能产生的变异和意外事故产生的破坏。到 21 世纪初已有鼠、兔、牛、羊等 10 多种动物胚胎冷冻成功，其中有的种类的冷冻技术已经程序化，并出现了商品化的试剂盒。但仍有一些动物冷冻后成活率相当低，而往往就是这些动物适合于某些转基因研究（例如猪），这是冷冻技术的新课题。

胚胎冷冻保存技术包括胚胎的冷冻和解冻。抗冻剂种类和浓度、加入抗冻剂的速度、解冻的速度、稀释的速度和温度都关系到冷冻胚胎的成败。抗冻剂的毒性、胚胎渗透压的变化及冰晶形成是保存胚胎必须考虑的因素。

2. 胚胎移植

早期的胚胎移植是指把优良种畜的早期胚胎从供体母畜体内取出来，移到受体母畜的输卵管或子宫，“借腹怀胎”繁殖后代的技术。它弥补了精子冷冻、人工受精的不足，把来自良种母畜的胚胎植入别的代孕母畜，解决了良种母畜怀孕期间影响排卵的问题，提高了良种的繁殖率。母畜的排卵数直接影响可供移植的

胚胎数量,因此胚胎移植商业化的第一步是取得大量的受精卵。使用促性腺激素可以诱发母畜的超数排卵,得到比正常排卵数多的卵子,以此获得更多的早胚。但是超数排卵的受精率低,胚胎退化率高,致使可移胚数下降,造成胚胎移植成本过高。21世纪初对卵巢调节机理和精卵相互作用机理的研究,正在寻找控制排卵率和解决超排体内受精问题的渠道。胚胎移植技术已经成熟地应用奶牛和肉牛,鲜胚的移植成功率已经达到70%,每年都有大量的胚胎移植牛犊出生。猪和羊也进行了胚胎移植研究,但必须手术取卵,影响母畜的繁殖寿命,还难于推广。

人工重组DNA技术促进了胚胎移植的进展。人工重组的生物工程产品促性腺激素将会大大提高胚胎移植的经济效益。有资料表明,用重组的牛黄体刺激素bFSH对牛进行超排,最佳方案每头牛平均获卵12.4个,可移11.00个,占89%;用脑垂体提取的FSH超排,最佳方案平均获卵12.16个,可移胚6.72个,占55%。此外,卵母细胞体外成熟和体外受精技术也可降低胚胎成本,有助于胚胎的商品化。

3. 体外生产胚胎

体外生产胚胎至少有3方面的意义:第一,提供大量胚胎进行商业性胚胎移植。在欧洲和日本,奶牛犊比肉牛犊便宜,体外生产肉牛胚胎移植给奶牛在经济上是合算的,生双犊就更赚钱。第二,为克隆胚胎提供核受体并进行胚胎前的体外早期培养以降低成本。第三,为某些研究提供大量知道准确发育时期的胚胎。体外生产胚胎的工艺过程包括卵母细胞体外成熟,体外受精和胚胎培养。

(1) 卵母细胞体外成熟 在家畜,尽管体内成熟的卵母细胞体外受精后胚胎发育良好,但未成熟的卵母细胞体外受精则不能完成胚胎发育。如果让这些细胞在体外成熟,体外受精胚发育率将大大改善。目前,牛体内成熟卵母细胞体外受精的囊胚发育率在45%左右,体外成熟的卵母细胞体外受精的囊胚率受不同培养条件影响,在20%~63%。自超排牛卵巢获取的未成熟卵母细胞发育率明显高于未超排牛的。要提高体外成熟卵母细胞的质量和数量,主要应解决以下问题:了解控制卵母细胞成熟的机理,卵母细胞的选择和合适培养体系的选择。体外培养胎儿卵巢被认为是将来的发展方向,因为胎儿卵巢在体外培养可以像活体睾丸产生精子一样不断产生卵母细胞。

(2) 体外受精 精子必须先获能才能完成体外受精的过程。已应用多种方法进行精子体外获能。一般说来,凡能促使钙离子进入精子顶体,使精子内部pH升高的刺激均可诱发获能。牛、绵羊、猪和山羊的受精率都高达70%~80%。

(3) 胚胎培养 各种家畜体内成熟卵母细胞体外受精的胚胎,在1~2细胞期移植到本种个体输卵管内发育到囊胚期的比例都很高。牛胚胎在兔和羊的输卵

管内发育也很好。但是,体外成熟卵母细胞体外受精体外发育到囊胚期的比例还很低,而且囊胚的发育能力也不如体内胚胎。为此,人们开始研究影响胚胎体外发育的各种因子。这项工作还在探索之中。

体外生产胚胎技术已经开始走上商业化,用于生产可移植胚和细胞核移植,大大降低了成本。也有将体外生产牛胚用于胚胎分割和冷冻,均能产犊。

4. 胚胎克隆

胚胎克隆提供遗传上完全相同的个体,无论对科研还是对畜牧生产均有意义。遗传上完全相同使实验中的遗传变异降为零。对纯系胚胎进行表型选择和后裔测定,使我们有可能改变所选择的性状,如产乳或产肉量。胚胎克隆与体外生产胚胎结合能生产高质量的胚胎供商业移植。生产胚胎克隆的方法有胚胎分割和核移植。

(1) 胚胎分割 把二细胞至囊胚阶段胚胎一分为二都可以形成两个胚胎。牛的胚胎分割已经广泛应用,半胚移植的妊娠率接近整胚,使产犊数几乎加倍。在猪、绵羊,经胚胎分割也已经产出同卵双胞胎。经胚胎分割产生的个体数一般为2个,最多4个。

(2) 细胞核移植 在胚胎工程中,细胞核移植是指将胚胎细胞核经显微手术和细胞融合的方法移植到去核卵母细胞中,重组胚胎发育至产仔的过程。小鼠、绵羊、牛、兔和山羊都有核移植的后代:体内胚胎和体外胚胎细胞核移植均已成功,牛冷冻胚胎细胞核移植也已成功,但是成功率都很低。未来的研究方向是提高移植的成功率,以及开展已分化细胞的核移植研究。

5. 性别鉴定

在移植前对胚胎进行性别鉴定对于产乳业有重要意义,因为只有雌性动物产乳。性别鉴定技术要求准确、快速、对胚胎无损害。曾经有许多方法用于胚胎性别鉴定,新技术是DNA探针法和PCR扩增法。二者都是利用雄性染色体的DNA序列进行识别,具有准确快速的优点。

8.2.3 生物反应器

自从DNA重组技术问世以来,人类建立了许多表达系统来生产昂贵的药用蛋白。尽管DNA重组技术在微生物中表达外源蛋白技术已经成熟,但是该系统不能进行真核蛋白的加工,而这对于某些蛋白质的生物活性却极为重要。另一方面,大肠杆菌、酵母和哺乳动物细胞基因工程表达系统成本高,分离纯化复杂。利用转基因动物生产的药用蛋白具有生物活性,且纯化简单、投资少、成本低,对环境没有污染。转基因动物就像天然原料加工厂,只要投入饲料,就可以得到

人类所需要的药用蛋白, 畜牧业由此开辟出一个全新的天地。

1. 乳腺生物反应器

哺乳动物乳汁中蛋白质含量为 30~35g/L, 一头奶牛每天可以产奶蛋白 1 000g, 一只奶山羊可产奶蛋白 200g。最好的转基因羊所分泌的药用蛋白已达到正常奶蛋白的 100%。由于转基因牛或羊吃的是草, 挤出的乳是珍贵的药用蛋白, 生产成本低, 可以获得巨额的经济效益。

许多药用蛋白已经通过乳腺生物反应器生产出来。首例是荷兰人研制的转人乳铁蛋白基因的牛, 乳铁蛋白能促进婴儿对铁的吸收, 提高婴儿的免疫力抵抗消化道疾病感染。21 世纪初又培育出促红细胞生成素的转基因牛, 红细胞生成素能促进红细胞生成, 对肿瘤化疗等红细胞减少症有积极疗效, 是商业价值最大的细胞因子之一。

乳腺生物反应器成功的关键是转基因动物乳腺特异性表达外源蛋白质基因。组织特异性表达载体是否有效, 包括外源基因在乳腺特异性表达, 表达的蛋白质具生物活性和表达的水平起决定性作用。乳腺生物反应器研制周期受到动物生长繁殖周期的限制, 哺乳动物孕后泌乳, 因此, 必须先经过性成熟、发情、受孕几个阶段, 然后才能检测乳汁的药用蛋白, 需要较长的时间。进一步进行乳腺特异性表达的调控研究, 建立表达载体的有效性和合理性的快速检测系统, 有助于加快乳腺生物反应器走向商品化。

2. 其他生物反应器

除了乳汁之外, 转基因动物的其他蛋白质产品同样也可以生产药物蛋白。转基因动物的血液生产人的血红蛋白可以解决血液来源问题, 同时避免了血液途径的疾病感染。已经有转基因猪表达出人的血红蛋白, 虽然采血没有挤奶方便, 但血液的巨大市场以及猪的迅速繁殖能力, 仍然使其显示了诱人的前景。利用鸡蛋生产重组蛋白的研究正在开展。鸡蛋的蛋白质组成及其生物合成机制均已十分清楚, 为生产重组蛋白提供了方便。卵黄蛋白和白蛋白基因都可以进行修饰来指导外源蛋白质基因的表达, 但吸收卵黄的蛋白质需要相互识别的特殊序列, 白蛋白可能更容易修饰。其中两个主要的白蛋白基因, 卵白蛋白基因和溶菌酶基因的表达与调控研究正在进行。卵黄和白蛋白可以积累大量的免疫球蛋白, 转基因鸡的蛋用来生产重组的免疫球蛋白, 有许多用途。鸡的成熟期短, 饲养管理简单, 一只鸡年产蛋 250 枚, 成本低廉。这些都成为输卵管作为生物反应器的优势。

本章小结

现代生物技术的原理和方法已广泛应用于农业生产，正从根本上改变传统农业的技术手段和运作方法，并已产生了巨大的经济效益。本章从植物生物技术和动物生物技术的角度加以具体阐述现代生物技术在植物方面的应用，其中包括：植物雄性不育和杂种优势利用；植物抗逆性（抗虫、抗除草剂、抗菌、抗病毒等）；生物农药及生物控制方法防治病虫害；植物次生代谢物如生物碱、黄酮类化合物等；植物品质改良以及基因工程方法提高作物储藏能力等。在动物方面的应用则主要有：应用转基因技术培育转基因动物；利用胚胎工程快速繁殖动物；利用生物反应器来生产贵重药物等。

复习思考题

1. 现代植物生物技术与传统农业技术相比有何突出优点？试举例说明。
2. 现代生物技术在种植业中有哪些应用？
3. 动物转基因导入外源基因的方法有哪些？
4. 动物胚胎工程的主要技术是什么？
5. 生物反应器有哪些？分别有什么特点？
6. 什么是动物生物反应器？应用前景如何？



第 9 章

生物制药技术

21 世纪初,在生物技术应用领域中,最具有代表性的是生物医药,它的利润可达 17.6%,是信息产业的 2 倍。其巨大的经济效益主要来源于创新。其中包括:开发新的药品资源,改善医疗手段,从而提高整个医疗水平。生物制药的主要内容有:生物药物、微生物发酵制药、基因工程制药和生物医学材料。

9.1 生物药物

9.1.1 生物药物的来源

1. 生物药物的定义

生物药物是指运用生物学、医学、生物化学等的研究成果,从生物体、生物组织、细胞、体液等,综合利用物理学、化学、生物化学、生物技术和药学等学科的原理和方法制造的一类用于预防、治疗和诊断的制品。

2. 生物药物的原料来源

生物药物原料以天然的生物材料为主,包括人体、动物、植物、微生物和各种海洋生物等。随着生物技术的发展,有目的人工制得的生物原料成为当前生物制药原料的重要来源,如用免疫法制得的动物原料,用基因工程技术制得的微生物或其他细胞原料等。

9.1.2 生物药物的特性

1. 药理学特性

(1) 治疗的针对性强 治疗的生理、生化机制合理,疗效可靠。如细胞色素 c 为呼吸链的一个重要成员,用它治疗因组织缺氧所引起的一系列疾病,效果显著。

(2) 药理活性高 生物药物是从大量原料中精制出来的高活性物质,因此具有高效的药理活性。如注射纯的 ATP 可以直接供给机体能量,效果确切、显著。

(3) 毒副作用小, 营养价值高 生物药物主要有蛋白质、核酸、糖类、脂类等。这些物质的组成单元为氨基酸、核苷酸、单糖、脂肪酸等, 对人体不仅无害而且还是重要的营养物质。

(4) 生理副作用常有发生 生物药物是从生物原料制得的。生物进化的结果使不同生物, 甚至相同生物的不同个体之间的活性物质的结构都有很大差异, 其中尤以相对分子质量较大的蛋白质更为突出。这种差异在使用生物药物时表现出副作用, 如免疫反应、过敏反应等。

2. 在生产、制备中的特殊性

(1) 原料中的有效物质含量低 杂质种类多且含量高, 因此提取、纯化工艺复杂。如胰腺中胰岛素含量仅为 0.002%, 还含有多种酶、蛋白质等杂质, 提纯工艺就很复杂。

(2) 稳定性差 生物药物的分子结构中一般具有特定的活性部位, 生物大分子药物是以其严格的空构象来维持其生物活性功能的, 一旦遭到破坏, 就失去其药理作用。引起活性破坏的因素有: 生物性的破坏, 如被自身酶水解等, 理化因素的破坏, 如温度、压力、pH、重金属等。

(3) 易腐败 由于生物药物原料及产品均为营养价值高的物质, 因此极易染菌、腐败, 从而造成有效物质被破坏, 失去活性, 并且产生热原或致敏物质等。因此生产过程中对于低温、无菌操作要求严格。

(4) 注射用药有特殊要求 生物药物由于易被胃肠道中的酶所分解, 所以给药途径主要是注射用药, 因此对药品制剂的均一性、安全性、稳定性、有效性等都有严格的要求。同时对其理化性质、检验方法、剂型、剂量、处方、贮存方式等亦有明确的要求。

3. 检验上的特殊性

由于生物药物具有特殊的生理功能, 因此生物药物不仅要有理化检验指标, 更要有生物活性检验指标, 这也是生物药物生产的关键。

9.1.3 生物药物的分类

生物药物的分类方法有以下三种: 按药物的化学本质和化学特性分类; 按原料来源分类; 按生理功能和临床用途分类。

1. 按药物的化学本质和化学特性分类

生物药物的有效成分多数是比较清楚的, 该分类方法有利于比较一类药物的结构与功能的关系、分离制备方法的特点和检测方法的统一等。因此一般教科书

均按此来分类。即有:

(1) 氨基酸及其衍生物药物 这类药物包括天然的氨基酸和氨基酸混合物, 以及氨基酸衍生物, 如 *N*-乙酰半胱氨酸、*L*-二羟基苯丙氨酸等。

(2) 多肽和蛋白质类药物 多肽和蛋白质的化学本质是相同的, 性质又相似, 但相对分子质量不同, 在生物学上性质差异则较大, 如分子大小不同的物质免疫原性就不一样。蛋白质类药物, 有血清蛋白质、丙种球蛋白、胰岛素等; 多肽类药物有催产素、降钙素、胰高血糖素等。

(3) 酶与辅酶类药物 酶类药物可按其功能分为: 消化酶类、消炎酶类、心脑血管疾病治疗酶类、抗肿瘤酶类、氧化还原酶类等。辅酶种类繁多, 结构各异, 一部分辅酶亦属于核酸类药物。

(4) 核酸及其降解物和衍生物类药物 这类药物包括核酸 (DNA, RNA)、多聚核苷酸、单核苷酸、核苷、碱基等。人工化学修饰的核苷酸、核苷, 如 5-氟尿嘧啶、6-巯基嘌呤等, 亦属于此类药物。

(5) 糖类药物 糖类药物以黏多糖为主。多糖类药物的特点是具有多糖结构, 由糖苷键将单糖连接而成。但由于单糖结构糖苷键的位置不同, 因而多糖种类繁多, 药理功能各异。这类药物存在于各种生物中。

(6) 脂类药物 这类药物具有相似的性质, 能溶于有机溶剂而不溶于水, 而在化学结构上差异又较大。这类药物, 主要有脂肪酸类、磷脂类、胆酸类、固醇类、卟啉类等。

(7) 细胞生长因子类 细胞因子是人类或动物的各类细胞分泌的具有多种生物活性的因子。细胞生长因子类药物是 21 世纪初发展最迅速的生物药物之一, 也是生物技术在该领域中应用最多的产品, 如基因工程白细胞介素 (IL)、红细胞生成素 (EPO) 等。它们的功能是在体内对人类或动物细胞的生长与分化起重要调节作用。20 世纪末到 21 世纪初人们广泛研究的细胞因子有干扰素、白细胞介素、肿瘤坏死因子、集落刺激因子等四大系列十几种细胞因子等。

(8) 生物制品类 从微生物、原虫、动物或人体材料直接制备或用现代生物技术和化学方法制成作为预防、治疗、诊断特定传染病或其他疾病的制剂, 统称为生物制品。

2. 按原料来源分类

按原料来源分类, 有利于对不同原料进行综合利用、开发研究。对于生物技术制药来说, 不同原料来源的生物药物对生物技术的要求有所不同。例如人类来源的生物药物对基因工程、蛋白质工程要求较高; 植物来源的生物药物对植物基因工程、植物细胞培养、植物组织培养要求较高。

(1) 人体组织来源的生物药物 人类提供的原料制成的生物药物品种较多,

疗效也好，又无副作用。现在投入生产的主要品种有：人血液制品类、人胎盘制品类、人尿制品类。

(2) 动物组织来源的生物药物 该类药物包括动物脏器制药的全部内容。由其他小动物制得的药物，如蛇毒、蜂毒等。所用原料的来源丰富，价格低廉，可以批量生产。但由于提供脏器的动物种族差异较大，所以产品需要进行严格的药理毒理实验。

(3) 植物组织来源的生物药物 植物药物是中草药的主要成分。它的有效成分为具有生物活性的天然有机化合物，如酶、蛋白质、核酸等。

(4) 微生物来源的生物药物 微生物用于制药以抗生素生成最为典型；氨基酸、维生素、酶的生产也大量使用微生物发酵技术。微生物发酵技术亦是生物制药技术的主要内容。

(5) 海洋生物来源的药物 海洋生物种类繁多，是丰富的药物资源宝库。对新药开发具有很大潜力，已引起重视，但现有成型品种不多。

3. 按生理功能和临床用途分类

生物药物广泛用做医疗用品，在治疗医学、预防医学、保健医学等领域都发挥着重要作用。

按用途分类，大致可分为四大类：

(1) 治疗药物 生物药物对许多常见病、多发病有着很好的疗效。尤其对于疑难杂症，如肿瘤、艾滋病、心脑血管疾病、免疫性疾病、内分泌障碍等，生物药物的治疗效果是其他药物不可比拟的。因此，治疗疾病是生物药物的主要功能。

(2) 预防药物 预防为主是我国医疗卫生工作的一项重要方针。许多疾病，尤其是传染性疾病，如天花、麻疹、百日咳等，预防比治疗更为重要。常见的预防药物有菌苗、疫苗、类毒素等。生物药物在预防疾病方面将显示出越来越重要的地位。

(3) 诊断药物 大部分临床诊断试剂都来自生物药物，这也是生物药物的重要用途之一。生物药物诊断的特点是：速度快、灵敏度高、特异性强。现已成功使用的有：免疫诊断试剂、单克隆抗体诊断试剂、酶诊断试剂、放射性诊断药物和基因诊断药物等。一些生物活性物质亦是检测疾病的指标，如谷草转氨酶等。

(4) 其他生物医药用品 生物药物在其他方面应用也很广泛，如生化试剂、保健品、化妆品、食品、医用材料等。

9.1.4 生物药物的制备

生物药物的提取与分离方法因为原材料、药物的种类和性质不同而有很大差异。由于这些方法在其他教材中已有详细论述，这里只做综合性概述。

1. 生物药物原料的选择、预处理与保存方法

(1) 原料选择 生物药物生产原料的选择原则主要是：有效成分含量高，原料新鲜；原料来源丰富，易得，原料产地较近；原料中杂质含量少；原料成本低等。但是，同时具备多种有利因素的原料不多，生产研究者可酌情选择。

原料的选择还要注意如下事项：植物原料要注意植物生长的季节性，选择最佳采集时间；微生物原料要注意微生物生长的对数期长短；动物原料有的要注意动物的年龄与性别。

(2) 原料的预处理与保存 动物原料采集后要立即处理，去除结缔组织、脂肪组织等，并迅速冷冻贮存。植物原料确定后，要择时采集并就地去除不用的部分，将有用部分保鲜处理，收集微生物原料时，要及时将菌细胞与培养液分开，进行保鲜处理。

原料的保存方法主要有：①冷冻法。该方法适用于所有的生物原料。常用-40℃速冻。②有机溶剂脱水法。常用的有机溶剂是丙酮。该法适用于原料少而价值高、有机溶剂对活性物质没有破坏作用的原料，如脑垂体等。③防腐剂保鲜。常用的防腐剂是乙醇、苯酚等。该法适用于液体原料，如发酵液、提取液等。

2. 生物药物的提取

(1) 生物组织与细胞的破碎 生物药物大部分存在于生物组织或细胞中，要提高提取率，对生物组织与细胞的破碎过程是非常重要的。常用的破碎方法一是磨切法，该法属于机械破碎方法，使用的设备有组织捣碎机、胶体磨、匀浆器、匀质机、球磨机、乳钵等。二是压力法，这类方法有加压与减压二种，常用的法兰西压釜使用效果良好。三是反复冻融法，该法设备简便，活性保持好，但耗时较长。四是超声波振荡破碎法，该方法破碎效果好，但由于局部发热，对活性有损失。五是自溶法或酶解法，用得较少。

(2) 提取 生物组织与细胞破碎后要立即进行提取。提取时，首先要根据活性物质的性质，选择提取试剂。提取试剂主要有：水、缓冲溶液、盐溶液、乙醇、其他有机溶剂。其次要考虑提取溶剂的用量及提取次数、提取时间。三是注意提取的温度、pH、变性剂等因素。这样才可以保证活性物质提取充分而且不变性。

3. 蛋白质类药物的分离纯化方法

这里所说的蛋白质类药物包括蛋白质、多肽和酶类等药物。它们的分离纯化方法有：

(1) 沉淀法 蛋白质、酶的初步纯化往往用沉淀法。该法的原理是使蛋白质胶体颗粒破坏,从而沉淀蛋白质。常用的有盐析法、有机溶剂沉淀法、等电点沉淀法、与靶物质结合沉淀法(如抗体-抗原)等。

(2) 按分子大小分离的方法 这类方法有超滤法和透析法(即膜分离方法)、凝胶层析法、超速离心法等。其中膜分离方法可用于生物大分子的浓缩、分级和脱盐。

(3) 按分子所带电荷进行分离的方法 氨基酸、多肽、蛋白质、酶均为两性电解质。它们具有等电点,在离开等电点 pI 时便会带正或负电荷。例如某蛋白质等电点 pI 为 7.0,当溶液 pI 为 4.0 时,分子则带有正电荷。由于具有该性质,利用带电性质进行分离是极其有效的方法。利用电学性质进行分离的方法有离子交换柱层析法、电泳法、等电聚焦法等。

(4) 亲和层析法 大部分生物活性物质都有其作用的靶物质,如酶与底物(或抑制剂)、抗原与抗体、激素受体等,它们之间有特异的亲和作用,利用该性质设计的特异层析分离技术称为亲和层析。亲和层析分离专一性强,操作简便,是当前应用很广泛的分离方法之一。

另外,最近出现的新方法还有疏水层析等。

4. 核酸类药物的分离纯化方法

核酸类药物生产方法主要有提取法和发酵法。提取法生产 DNA 和 RNA 的主要技术是,先提取核酸和蛋白质复合物,再解离核酸与蛋白质,然后分离 DNA 与 RNA。发酵法主要用于生产单核苷酸。

5. 糖类药物的分离纯化方法

由于各种糖类药物的性质和原料来源不同,没有统一的规范提取和纯化工艺。这里只介绍多糖和黏多糖的一般分离纯化方法。

(1) 提取方法 非降解法适用于从含一种黏多糖的动物组织中提取黏多糖,提取采用的溶剂是水或盐溶液。

降解法适用于从组织中提取结合比较牢固的黏多糖。如从软骨中分离提取硫酸软骨素,就是用碱处理进行降解。又如用酶处理法可提取与蛋白质结合的多糖。

(2) 分离方法 常见的分离方法是乙醇沉淀法和离子交换层析法。

乙醇沉淀法是从提取液中沉淀多糖的最简易方法,也适用于分级分离。用季铵化合物也可沉淀黏多糖。黏多糖的聚阴离子能与某些阳离子表面活性剂结合成不溶于水的盐,如十六烷基三甲基铵等。

离子交换层析法中黏多糖的聚阴离子能够很好地被阴离子交换剂吸附和分

离,如Dowex I-X2离子交换树脂、DEAE-离子交换纤维等,洗脱时可用NaCl溶液进行梯度洗脱。

6. 脂类药物的分离纯化方法

(1) 提取方法 脂类自然状态下是以结合形式存在的。非极性脂是与其他脂质分子或蛋白质分子的疏水区相结合的。提取脂质药物就是要选择适当的溶剂来破坏这种结合键,将脂质溶解出来。常见的溶剂有组合溶剂,醇是其中的主要成分,此外还有氯仿、甲醇、水等。

(2) 纯化方法

沉淀法:由于不同脂质在丙酮中溶解度不同,故常用它进行沉淀。

吸附层析法:常用吸附剂有硅胶、氧化铝等。它是通过极性和离子力等把各种化合物结合到固体吸附剂上。洗脱一般是采用极性逐渐增大的洗脱液来进行,非极性的先流出,极性的后流出。

离子交换法:脂质分子的存在有非解离、两性离子和酸式解离三种状态。根据它们在一定pH条件下的解离情况,选择适当的离子交换剂可将它们提纯。

7. 氨基酸类药物的分离纯化方法

(1) 氨基酸的生产方法

蛋白质水解法:水解法有酸水解、碱水解和酶水解三种。用盐酸水解为常用方法,其优点是水解迅速、完全,产物全部是L-型氨基酸,缺点是色氨酸全部被破坏,丝氨酸等部分被破坏。碱水解法易产生消旋作用。酶水解法水解不够完全。

发酵法:发酵法主要是选育特异产生某种氨基酸的菌株,经过发酵后,从培养液中提取氨基酸。

化学合成与酶促合成法:化学合成法一般得到的是DL-型氨基酸,尚需要对异构体拆分;酶促合成法也是酶工程在医药工业上应用的一个内容,优点是技术工艺简单,转化率高,副产物少和易提纯等。

(2) 氨基酸的分离方法 常用的氨基酸分离提纯方法有沉淀法、吸附法和离子交换法。

沉淀法:根据形成沉淀的原理不同分为两种:一种是依据不同氨基酸在水中或其他溶剂中的溶解度差异进行沉淀分离。另一种是用特殊试剂沉淀某种氨基酸,如用邻二甲苯-4-磺酸与亮氨酸形成不溶性盐沉淀,再用氨水分解,使亮氨酸游离出来。

吸附法:这是利用吸附剂根据氨基酸吸附力的差异进行氨基酸分离的方法。苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸的分离就是利用活性炭对其吸附的原理。

离子交换法：氨基酸是两性电解质，在一定 pH 条件下，不同氨基酸带电性质及解离状态是不相同的，因此在离子交换剂上吸附的强度不同。常用的离子交换剂为强酸型阳离子交换树脂，洗脱主要用 pH 梯度洗脱。

9.2 微生物发酵制药

9.2.1 微生物发酵制药概况

21 世纪初，全世界的医药产品生产已有一半是由生物合成，抗生素、维生素、核酸这三大类药物几乎都是通过微生物发酵而生产的。近年来，微生物药物的产量不断增加，品种也在不断扩大，人干扰素、胰岛素、生长激素、乙肝疫苗等大批新型药物已经由基因工程菌发酵生产。随着代谢工程和蛋白质工程的研究进展以及在抗生素、蛋白质及其他生物活性物质发酵工业中的应用，微生物制药工业的水平将进一步提高，成本也将进一步下降。

1. 次级代谢产物发酵的特点

微生物药物是微生物的次级代谢产物，在发酵工艺上较一般工业产品要复杂得多。其发酵具有以下特点：

(1) 所用的微生物以纯种状态在具有通气搅拌的发酵罐中进行发酵。罐中的培养基和设备都必须在接种微生物前进行灭菌，整个发酵过程必须保持无杂菌污染。

(2) 发酵过程中初级代谢和次级代谢两种不同的代谢途径交织在一起，有生长期和生产期两个截然不同的生理代谢阶段。次级代谢产物的形成与微生物的生长不同步，当微生物生长速度减低或停止生长后，次级代谢产物才开始合成。

(3) 发酵产物积累和基质消耗之间没有明显的化学计量关系。理论产量与实际产量往往相差甚远。

(4) 发酵产物极其复杂。通常一种微生物可以发酵产生几个甚至几十个结构类似的副产物，需要经过一系列物理和化学方法对目的产物进行提取分离和精制。

(5) 微量的金属离子 (Fe^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Mn^{2+} 、 Ni^{2+} 等) 和磷酸盐等无机离子对次级代谢产物的形成具有显著影响。

(6) 发酵过程更加难以控制。即使同一菌种，在同一厂家，也会因生产设备、原料来源等差别，使菌种的生产能力大不相同。

2. 微生物发酵的操作方式

微生物发酵过程一般有 3 种操作方式，即分批发酵（间歇发酵）、补料分批

发酵(半连续发酵)和连续发酵。发酵所采用的操作方式不同,微生物的代谢变化规律也不同。发酵的操作方式与发酵工程相似,可参见第3章。

3. 微生物药物发酵生产的一般流程

微生物药物产生菌在进入发酵罐之前,必须经过种子扩大培养。将冷冻管或沙土管的孢子接种到斜面上,待斜面孢子或菌丝成熟后接入摇瓶中培养,长好的种子接入一级种子罐中;另外,斜面孢子也可以扩大到茄子瓶中,茄子瓶孢子长好后可制备成孢子悬液接入一级种子罐中。菌丝在一级种子罐中长好后接入二级种子罐中继续培养待长好后接入到发酵罐中发酵生产所需要的药品,通常发酵要进行1~10d,收集发酵液。发酵液经预处理及提取分离,得到成品,经检验合格后包装出厂。

9.2.2 抗生素的发酵工艺

抗生素是微生物药物中,品种最多,使用量最大的一种药物,现以青霉素的发酵工艺为例进行详细介绍。

青霉素的产生菌主要是产黄青霉 51-20 和点青霉,全世界用于青霉素生产的高产菌株几乎都是以产黄青霉为出发菌株,经不同的改良途径得到的。据报道,21 世纪初青霉素的发酵单位高达 60 000 U/ml。

1. 生产孢子的制备

生产上所用的产黄青霉孢子是将沙土孢子用甘油、葡萄糖和蛋白胨组成的培养基进行斜面培养;然后转移到大米或小米固体培养基上,与 25℃ 培养 7d,孢子成型后进行真空干燥、低温贮藏备用。

2. 发酵的影响因素及控制

青霉素大规模生产是采用三级发酵,其目的主要是使青霉菌菌体数量逐步扩大和适应发酵,其次是使发酵罐连续使用,缩短发酵周期。一级发酵通常在小罐进行,主要使孢子萌芽形成菌丝;二级发酵主要是大量繁殖青霉菌丝体;三级发酵除了继续大量繁殖菌丝体外主要是生产青霉素。由于每级发酵的目的不同,因此需要对培养基的组成、培养温度、pH、通气量、一级培养时间等条件进行控制,以利于青霉素的合成。

1) 碳源、氮源的影响和控制

(1) 碳源 青霉菌能利用多种碳源,如乳糖、蔗糖、葡萄糖、阿拉伯糖、甘露糖、淀粉以及天然油脂等。葡萄糖是容易利用的碳源,有利于菌体的生长;乳糖是青霉素生物合成最好的碳源。青霉素发酵培养基中采用葡萄糖和乳糖两种碳源

就能适合青霉菌发酵过程中的生理变化,在发酵初期利用氧化速率快的葡萄糖使青霉菌大量、迅速、强壮地繁殖菌丝体;当葡萄糖耗尽时青霉菌进入发酵后期,此时利用氧化缓慢的乳糖,使发酵液 pH 稳定,避免速效碳源的分解产物阻遏作用,有利于青霉菌大量、持久地分泌青霉素。单独使用葡萄糖,常常因为发酵前期葡萄糖浓度过高,其分解产物对青霉素合成酶产生阻遏(或抑制)或对菌体生长产生抑制作用,而后期葡萄糖浓度降低,限制了菌丝生长和产物合成。为了避免这一现象,青霉素发酵中采用连续流加的方法加入葡萄糖来代替乳糖,既节约了成本,又有利于青霉素的合成。

(2) 氮源 玉米浆是青霉素发酵最好的氮源,因为玉米浆含有多种氨基酸,如精氨酸、谷氨酸、苯丙氨酸以及青霉素生物合成的前体苯乙酸及其衍生物。由于玉米浆的质量难以控制,也可选用便于贮藏和质量稳定的花生饼或棉籽饼来代替。

2) 前体影响及控制

苯乙酸及其衍生物乙酰胺、苯乙胺、苯乙酰、苯乙酰甘氨酸等均可以作为青霉素 G 侧链的前体物直接结合到青霉素分子中,也可以作为养料和能源被利用。这些前体的利用途径取决于培养条件和菌株特性。但苯乙酸、苯乙酰胺等对菌体生长和生物合成均有毒性,其毒性的大小与培养基的 pH 有关。苯乙酰胺在碱性(pH8)条件下抑制菌体生长;苯乙酸在酸性(pH5.5)下毒性较大;中性 pH 下苯乙酰胺的毒性大于苯乙酸。前体用量大于 0.1% 时,除了苯氧乙酸外,其他前体都对青霉素合成产生抑制。通常情况下,发酵液中苯乙酸前体浓度控制在 0.1%、苯乙酰胺控制在 0.05%~0.08% 为宜。

有些前体物质还能被菌体氧化,氧化程度受很多因素影响:菌龄增大,氧化能量增强;在复合培养基中对前体的氧化能力比在合成培养基中强;pH 上升,氧化能力增强;通气条件差时,氧化能力降低。为了尽量减少苯乙酸的氧化,采用间歇或连续流加低浓度前体物质的方法,保持前体的供应速度仅略大于生物合成的需要,可以起到提高产量的作用。

3) pH 的影响及控制

青霉素发酵的最适 pH 一般认为是 6.2~6.8,由于青霉素在碱性条件下不稳定,容易加速其水解,因此,应尽量避免 pH 超过 7.0。在青霉素发酵过程中,通过采用下列手段控制发酵过程的 pH:

(1) 当 pH 高于最适 pH 时,可以通过补加糖和生理酸性物质(如硫酸铵等无机氮源),降低 pH。

(2) 当 pH 低于最适 pH 时,可以通过补加 CaCO_3 、氨水或尿素,也可提高通气量,促进有机酸氧化来提高 pH。

(3) 可利用自动加入酸或碱的方法,使发酵液 pH 维持在 6.8~7.2,以提高青霉素产量。

用补糖来控制 pH 要比用酸或碱调节好。补糖可以采用恒速补糖的方法控制 pH; 也可以根据 pH 来补糖, 即 pH 上升快时就多补, 维持 pH 在 6.6~6.9。

4) 温度的影响及控制

青霉菌生长的适宜温度为 30℃, 而分泌青霉素的适宜温度是 20℃左右, 通常采用分段变温控制法, 使温度适合不同阶段的需要。如采用从 26℃逐渐降至 22℃的发酵温度, 可延缓菌丝衰老, 增加培养液的溶解氧浓度, 延长发酵周期, 有利于发酵后期青霉素单位的生长, 减少发酵液中青霉素的降解破坏, 提高产量。

5) 补料控制

青霉素发酵过程中, 除中间补糖以控制糖浓度及 pH 外, 补加氮源也可提高发酵单位。在发酵过程中分次补加硫酸铵、氨或尿素等氮源, 可以延长发酵周期、调节 pH、提高青霉素产量。补氮的标准是控制发酵液中的氨基氮含量在 0.01%~0.05%。在基础料中加入 0.05% 尿素, 并在补糖时再两次补加尿素, 可以扭转发酵液浓度转稀、pH 降低和青霉素单位增长缓慢的情况, 有利于提高产量。

在发酵过程中与料液一起补入表面活性剂, 如新洁尔灭 50mg/L 或聚氧乙烯、山梨糖醇酐、单油酸酯、单月桂酸酯和三油酸酯等非离子化表面活性剂液能增加青霉素的产量。在青霉素发酵过程中加入少量可溶性高分子化合物, 如 4.0mg/L 聚乙烯醇、聚丙烯酸钠、聚二乙胺或聚乙烯吡咯烷酮 (PVP), 能使青霉素产率增加 38%。这些物质能够提高产量原因是: 当发酵罐使用较大的搅拌功率和较快的搅拌速度时, 这些高分子化合物能使搅拌叶邻近的液体速度梯度降低, 避免打断菌丝, 而且在促进氧在培养基中充分溶解的同时还有利于除去 CO₂; 菌丝生长时, 由于高分子化合物起分散剂的作用, 菌丝不致成团, 界面面积得以增加, 因而增加了氧传递到菌丝体内的速度。

6) 铁离子的影响及控制

三价铁离子 (Fe³⁺) 对青霉素生物合成有显著影响, 一般当发酵液中 Fe³⁺ 含量超过 30~40μg/ml, 则发酵单位增长缓慢。因此, 铁制发酵罐在使用前必须进行处理, 可在罐壁涂上环氧树脂等保护层, 使 Fe³⁺ 含量控制在 30μg/ml 以下。

9.3 基因工程药物

基因工程药物是指利用基因工程技术研制和生产的药物, 主要包括重组蛋白多肽药物、核酸药物、DNA 药物和基因工程抗体等。

现代生物技术是一项与医药产业结合非常密切的高技术, 它的发展不仅使医学基础学科发生了革命性变化, 也为医药工业发展开辟了更为广阔的前景。生物技术的核心是基因工程, 基因工程技术最成功的成就就是用于生物治疗的新型生

物药物的研制。虽然一些内源生理活性物质作为药物已有多年的历史,如治疗糖尿病的胰岛素,治疗侏儒症的生长激素等,但是许多在疾病诊断、预防和治疗中有重要价值的内源生理活性物质(如激素、细胞因子、神经多肽、调节蛋白、酶类、凝血因子等人体活性多肽)以及某些疫苗,由于材料来源困难或制造技术问题而无法研制出产品而付诸应用;即使应用传统技术从动物脏器中提取出来,也因造价太高而使患者望而却步;而且,在提取过程中难免有病毒感染,因此还可能对病人造成严重后果。而应用基因工程技术,就可以从根本上解决上述问题。自20世纪70年代基因工程诞生以来,最先应用基因工程技术且目前最为活跃的研究领域便是医药科学。基因工程技术的迅猛发展使人们已能够十分方便有效地生产许多以往难以大量获取的生物活性物质,甚至可以创造出自然界不存在的全新物质。1982年第一个基因重组产品——人胰岛素在美国的问世,吸引和激励了大批科学家利用基因工程技术研制新药品,到21世纪初累计已有近30种基因工程药物投入市场,产生了巨大的社会效益和经济效益。

基因工程技术的应用使得人们在解决癌症、病毒性疾病、心血管疾病和内分泌疾病等方面问题中取得明显效果,它为上述疾病的预防、治疗和诊断提供了新型疫苗、新型药物和新型诊断试剂,主要是医用活性蛋白和多肽类,包括:①免疫性蛋白,如各种抗原和单克隆抗体;②细胞因子,如各种干扰素、白细胞介素、集落刺激生长因子、表皮生长因子、凝血因子;③激素,如胰岛素、生长激素、心钠素;④酶类,如尿激酶、链激酶、葡激酶、组织型纤维蛋白溶酶原激活剂、超氧化物歧化酶等。可用于医药目的的蛋白质或活性多肽都是由相应的基因合成的。而基因工程技术的最大好处在于它有能力从极端复杂的机体细胞内取出所需要的基因,将其在体外进行剪切拼接、重新组合,然后转入适当的细胞进行表达,从而生产出比原来多数倍、数千倍的相应的蛋白质。所以利用基因工程技术生产药品的优点在于:①利用基因工程技术可大量生产过去难以获得的生理活性蛋白和多肽,为临床使用提供有效的保障;②可以提供足够量的生理活性物质,以便对其生理、生化和结构进行深入的研究,从而扩大这些物质的应用范围;③利用基因工程技术可以发现、挖掘更多的内源性生理活性物质;④内源生理活性物质在作为药物使用时存在的不足之处,可以通过基因工程和蛋白质工程进行改造和去除。如白细胞介素-2的第125位半胱氨酸是游离的,有可能引起—S—S—键的错配而导致活性下降,如将此半胱氨酸改为丝氨酸或丙氨酸,白细胞介素-2的活性以及热稳定性均有提高;⑤利用基因工程技术可获得新型化合物,扩大药物筛选来源。

9.3.1 基因工程药物生产的基本过程

基因工程技术就是将重组对象的目的基因插入载体,拼接后转入新的宿主细

胞, 构建成工程菌(或细胞)实现遗传物质的重新组合, 并使目的基因在工程菌内进行复制和表达的技术。基因工程技术使得很多从自然界很难或不能获得的蛋白质得以大规模合成。20世纪80年代以来, 以大肠杆菌作为宿主, 表达真核 cDNA、细菌毒素和病毒抗原基因等, 为人类获取大量有医用价值的多肽类蛋白质开辟了一条新的途径。

基因工程药物制造的主要程序是: 目的基因的克隆, 构建 DNA 重组体, 将 DNA 重组体转入宿主菌构建工程菌, 工程菌的发酵, 外援基因表达产物的分离纯化, 产品的检验等(图 9-1)。以上程序中的每个阶段都包含若干细致的步骤, 这些程序和步骤将会随研究和生产条件的不同而有所改变。

基因工程药物的生产是一项十分复杂的系统工程, 可分为上游和下游两个阶段。上游阶段是研究开发必不可少的基础, 它主要是分离目的基因、构建工程菌(细胞)。下游阶段是从工程菌(细胞)大规模培养一直到产品的分离纯化、质量控制等。上游阶段的工作主要在实验室内完成。基因工程药物的生产必须首先获得目的基因, 然后用限制性内切酶和连接酶将所需目的基因插入适当的载体质粒或噬菌体中并转入大肠杆菌或其他宿主菌(细胞), 以便大量复制目的基因。对目的基因要进行限制性内切酶和核苷酸序列分析。目的基因获得后, 最重要的就是使目的基因表达。基因的表达系统有原核生物系统和真核生物系统。选择基因表达系统主要考虑的使保证表达的蛋白质的功能, 其次要考虑的是表达量的多少和分离纯化的难易。将目的基因与表达载体重组, 转入合适的表达系统, 获得稳定高效表达的基因工程菌(细胞)。下游阶段是将实验室成果产业化、商品化, 它主要包括工程菌大规模发酵最佳参数的确立, 新型生物反应器的研制, 高效分离介质及装置的开发, 分离纯化的优化控制, 高纯度产品的制备技术, 生物传感器等一系列仪器仪表的设计和制造, 电子计算机的优化控制等。工程菌的发酵工艺不同于传统的抗生素和氨基酸发酵, 需要对影响目的基因表达的因素进行分析, 对各种影响因素进行优化, 建立适于目的基因高效表达的发酵工艺, 以便获得较高产量的目的基因表达产物。为了获得合格的目的产物, 必须建立起一系列相应的分离纯化、质量控制、产品保存等技术。

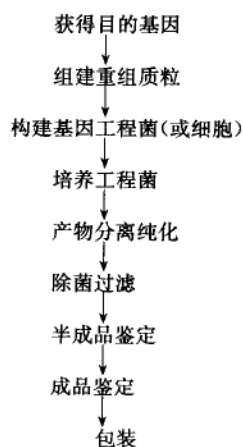
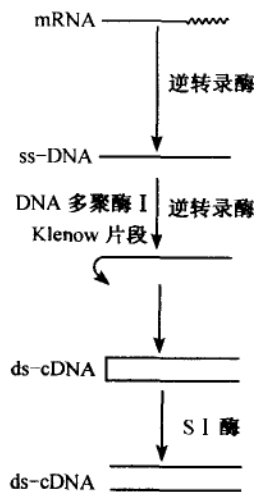


图 9-1 制备基因工程药物的一般程序

9.3.2 目的基因的获得

应用基因工程技术生产新型药物, 首先必须构建一个特定的目的基因无性繁殖系, 即产生各种新药的不同基因工程菌株。来源于真核细胞的产生基因工程

药物的目的基因，是不能进行直接分离的。真核细胞中单拷贝基因只是染色体 DNA 种的很小一部分，为 $0.001\% \sim 0.00001\%$ ，即使多拷贝基因也只有其 $1/10$ ，因此从染色体中直接分离纯化目的基因极为困难。另外，真核基因内一般都有内含子，如果以原核细胞作为表达系统即使分离出真核基因，由于原核细胞缺乏 mRNA 的转录后加工系统，真核基因转录的 mRNA 也不能加工、拼接成为成熟的 mRNA，因此不能直接克隆真核基因。克隆真核基因常用的方法有逆转录法和化学合成法两种。



1. 逆转录法

逆转录法就是先分离纯化目的基因的 mRNA，再反转录成 cDNA，然后进行 cDNA 的克隆表达。为了克隆编码某种特异蛋白质多肽的 DNA 序列，可以从产生该蛋白质的真核细胞中提取 mRNA，以其为模板，在转录酶的作用下，反转录合成该蛋白质 mRNA 的互补 DNA (cDNA 第一链)，再以 cDNA 第一链为模板，在逆转录酶或 DNA 聚合酶 I (或者 Klenow 酶大片段) 作用下，最终合成编码该多肽的双链 DNA 序列 (图 9-2)。由于 cDNA 模板 mRNA 核苷酸序列是严格互补的，因此 cDNA 序列只反映基因表达的转录及加工后产物所携带的信息，即 cDNA 序列只与基因的编码序列有关，而不含内含子。这是制取真核生物目的基因常用的方法。

图 9-2 cDNA 克隆示意图

2. 化学合成法

较小的蛋白质后多肽的编码基因可以用化学合成法制得。化学合成法有一个先决条件，就是必须知道嘧啶基因的核苷酸排列顺序，或者知道目的蛋白质的氨基酸顺序，再根据密码子推导出 DNA 的碱基序列。用化学方法合成目的基因 DNA 不同部位的两条链的寡核苷酸片段，再退火成为两端形成黏性末端的 DNA 双链片段，然后将这些双链片段按正确的次序进行退火，使其连接成较长的 DNA 片段，再用连接酶连接成完整的基因。

化学合成基因的限制主要有：一是不能合成太长的基因。化学合成 DNA 中所合成的寡核苷酸片段仅为 $50 \sim 60\text{bp}$ ，因此此方法只适用于克隆小分子肽的基因。二是化学合成基因时，遗传密码的间并会为选择密码子带来很大困难，如用氨基酸顺序推测核苷酸顺序，得到的结构可能与天然基因不完全一致，易造成中性突变。三是费用较高。

9.3.3 基因表达

基因表达是指结构基因在生物体中的转录、翻译以及所有加工过程。基因工程中基因高效表达研究是指外源基因在某种细胞中的表达活动,即剪切下一个外源基因片段,拼接到另一个基因表达体系中,使其能获得既有原生物活性又有高产的表达产物。

进行基因表达研究,人们关心的问题主要是目的基因的表达量、表达产物的稳定性、产物的生物学活性和表达产物的分离纯化。因此在进行基因表达设计时,必须综合考虑各种影响因素,建立最佳的基因表达体系。

目的基因获得后,必须在合适的宿主细胞中进行表达,才能获得目的产物。宿主细胞应满足以下要求:容易获得较高浓度的细胞;能够利用易得的廉价原料;不致病,不产生内毒素,发热量低,需氧量低,适当的发酵温度和细胞形态;容易进行代谢调控;容易进行DNA重组技术操作;产物的产量、产率高,产物容易提取纯化。

用于基因表达的宿主细胞分为两大类:第一类为原核细胞,常用的有大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、链霉菌等;第二类为真核细胞,常用的有酵母、丝状真菌、哺乳动物细胞等。

9.3.4 基因工程菌的稳定性

基因工程菌(简称工程菌)在传代过程经常出现质粒不稳定的现象,质粒不稳定分为分裂不稳定和结构不稳定。质粒的分裂不稳定是指工程菌分裂时出现一定比例的不含质粒子代菌的现象。质粒的结构不稳定是指外源基因从质粒上丢失或碱基重排、缺失所致工程菌性能的改变。

工程菌的质粒不稳定常见的是分裂不稳定,它主要与二个因素有关:一是含质粒菌产生不含质粒子代菌的频率;二是这两种菌的比生长速率差异的大小。

为了提高工程菌培养中质粒的稳定性,工程菌的培养一般采用二段培养法,第一阶段先使菌体生长至一定密度,第二阶段诱导外源基因的表达。由于第一阶段外源基因未表达,从而减小了重组菌与质粒丢失菌的比生长速率的差别,增加了质粒的稳定性。在培养基中加入选择性物质如抗生素等,来抑制质粒丢失菌的生长,也是工程菌培养中提高质粒稳定性的常用方法。采用适当的操作方式可使工程菌生长速率具有优势,并使工程菌和质粒丢失菌生长竞争趋于极端化。

9.3.5 基因工程菌的发酵

基因工程菌的培养过程主要包括:①通过摇瓶操作了解工程菌生长的基础条件,如温度、pH、培养基各种组分以及碳氮比,分析表达产物的合成、积累对

受体细胞的影响；②通过培养罐操作确定培养参数和控制的方案以及顺序。由于细胞生长和异源基因表达之间较大的差异，各培养参数在全过程中必须分段控制。

基因工程菌培养常用的方式有：补料分批培养、连续培养、透析培养、固定化培养。

利用基因重组技术构建的基因工程菌的发酵工艺不同于传统的微生物发酵工艺，就其选用的生物材料而言，基因工程菌是外源基因重组载体的微生物，而传统的微生物不含外源基因；从发酵工艺考虑，基因工程菌发酵生产的降低是使外源基因高效表达，尽可能减少宿主细胞本身蛋白质的污染，以获得大量的外源基因产物，而传统微生物发酵生产的目的是获得微生物自身基因表达所产生的初级或次级代谢产物。外源基因的高效表达，不仅涉及宿主、载体和克隆基因之间的

相互关系，而且与其所处的环境息息相关。在不同的发酵条件下，工程菌的代谢途径也许不一样，因而对下游的纯化工艺会造成不同的影响。因此，在高表达高密度的前提下，还要尽量建立有利于纯化的发酵工艺，以提高产品的纯度及改善其性质。

9.3.6 基因工程药物的分离纯化

分离纯化是基因工程药物生产中极其重要的一环，这是由于工程菌经过大规模培养后，产生的有效成分含量很低，杂质含量却很高；另外由于基因工程药物是从转化细胞生产的，而不是正常普通细胞生产的，所以对产品的纯度要求也高于传统产品。所以要得到合乎医用要求的基因工程药物，分离纯化要比传统产品困难得多。

基因工程药物的分离纯化一般不应超过 4~5 个步骤，包括细胞破碎、固-液分离、浓缩与初步纯化、高度纯化直至得到纯品加工。其一般流程如图 9-3 所示。

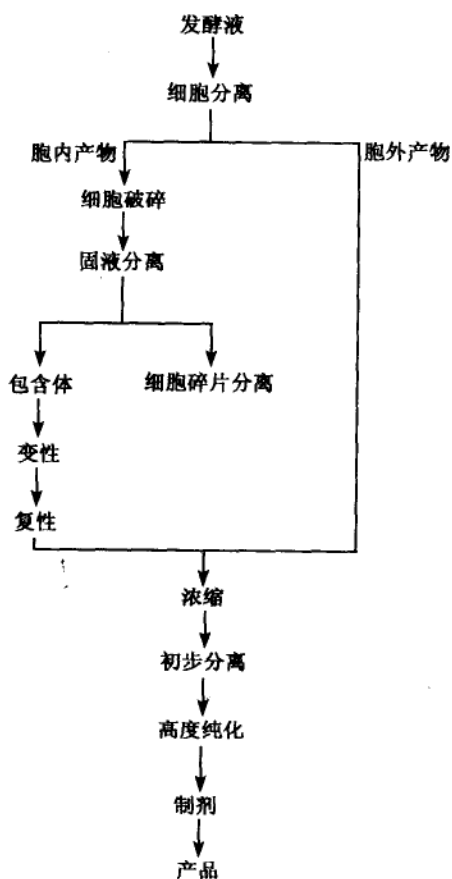


图 9-3 基因工程药物分离纯化的一般流程

9.3.7 基因工程药物的质量控制

基因工程药物与传统的一般药品的生产有着许多不同之处,首先它是利用活的细胞作为表达系统,所获得蛋白质产品往往相对分子量较大,并且有复杂的结构;许多基因工程药物还与极微量的人体一些生理功能精密调节所必需的蛋白质产生显著效应。宿主细胞中表达的外源基因,在转录或翻译、精制、工艺放大过程中,都可能发生变化,故从原料到产品以及制备全过程的每一步都必须严格控制条件和鉴定质量,确保产品符合质量标准、安全有效。基因工程药物的质量控制主要包括:①原材料的质量控制;②培养过程的质量控制;③纯化工艺过程的质量控制;④产品的质量控制;⑤产品的保存。

9.3.8 基因工程药物制造实例

干扰素(IFN)是人体细胞分泌的一种活性蛋白质,具有广泛的抗病毒、抗肿瘤和免疫调节活性,是人体防御系统的组成部分。根据其分子结构和抗原性的差异分为 α 、 β 、 γ 、 ω 等4个类型。早期的干扰素是用病毒诱导人体白血球或白细胞产生的,其产量低、价格昂贵、不能满足需要。现在可以利用基因工程技术并在大肠杆菌中发酵、表达来进行生产。

1. 基因工程菌的组建

在干扰素重组DNA成功以前,人们对于干扰素的结构一无所知,因此不可能人工合成基因。在人染色体上的干扰素基因拷贝数极少(大约只有1.5%),加工上又有技术困难,所以不能直接分离干扰素基因,而是通过分离干扰素mRNA,再以干扰素mRNA为模板,通过反转录酶等使其形成干扰素cDNA。干扰素cDNA的获得是将产生干扰素的白细胞的mRNA分级分离,然后将不同部分的mRNA注入蟾蜍的卵母细胞,并测定合成干扰素抗病毒活性。结构发现12smRNA的活性最高,因此用这部分mRNA合成cDNA。将cDNA克隆到含有四环素和氨苄青霉素抗性基因的质粒pBR322中,转化大肠杆菌K12,得到几千个重组子克隆,每个克隆都用粗提的干扰素的mRNA去进行杂交,把得到的杂交阳性克隆中的重组质粒DNA放到一个无细胞蛋白合成系统中进行翻译,对每一个翻译体系的产物进行抗病毒的干扰素活性检测。经过多轮筛选获得了产生干扰素的cDNA。最后将干扰素cDNA克隆入大肠杆菌表达载体中,转化大肠杆菌进行高效表达(图9-4)。

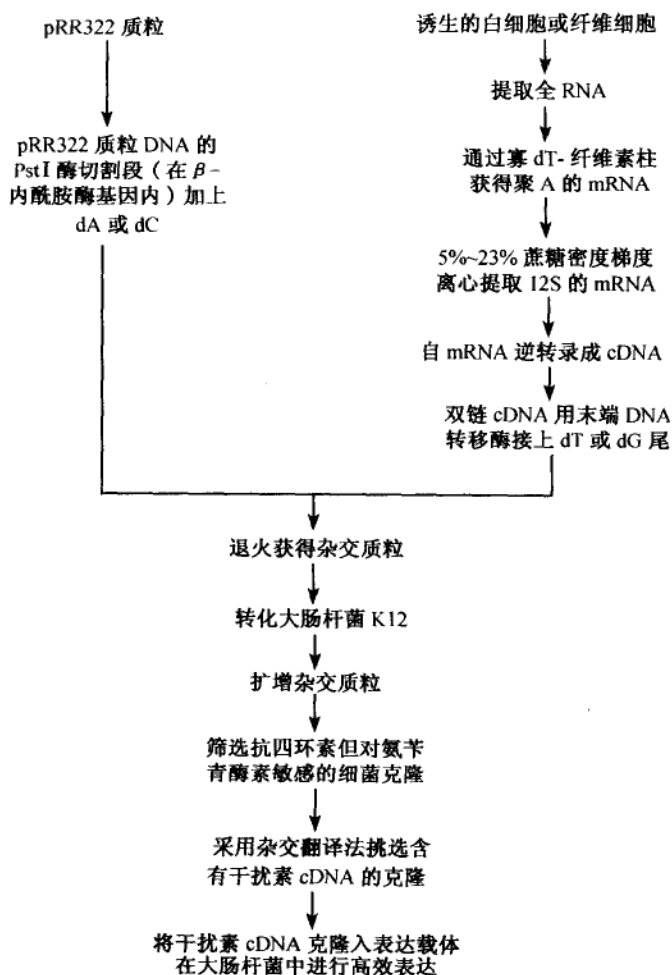
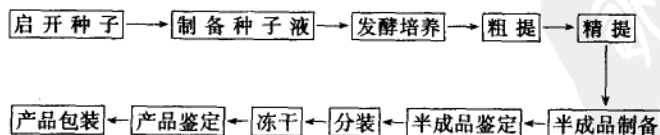


图 9-4 组建干扰素工程菌流程图

2. 基因工程干扰素的制备

制备基因工程干扰素 α 的工艺流程如下图：



下面以基因工程人干扰素 $\alpha 2b$ 为例说明干扰素的生产过程。

1) 发酵

人干扰素 $\alpha 2b$ 基因工程菌为 SW-IFN α —2b/E. coli DH5 α ，质粒用 P_L 启动

子,含氨苄青霉素抗性基因。种子培养基含1%蛋白胨、0.5%酵母提取物、0.5%NaCl。分别接种人干扰素 α 2b基因工程菌到4个装有250ml种子培养基的1000ml三角瓶中,30℃摇床培养10h,作为发酵罐种子使用。用15L发酵罐进行发酵,发酵培养基的装量为10L,发酵培养基由1%蛋白胨、0.5%酵母提取物、0.01% NH_4Cl 、0.05% NaCl 、0.6% Na_2HPO_4 、0.001% CaCl_2 、0.3% KH_2PO_4 、0.01% MgSO_4 、0.4%葡萄糖、50mg/ml氨苄青霉素、少量防泡剂组成,pH6.8。搅拌转速500r/min,通气量为1:1VVM,溶氧为50%。30℃发酵8h,然后在42℃诱导2~3h即可完成发酵。同时每隔不同时间取2ml发酵液,10000r/min离心除去上清液,称量菌体湿重。

2) 产物的提取与纯化

发酵完毕冷却后进行4000r/min离心30min,除去上清液,得湿菌体1000g左右。取100g湿菌体重新悬浮于500ml、20mmol/L磷酸缓冲液(pH7.0)中,于冰浴条件下进行超声破碎。然后4000r/min离心30min。取沉淀部分,用100ml含8mol/L尿素、20mmol/L磷酸缓冲液(pH7.0)0.5mmol/L二巯基苏糖醇的溶液,室温搅拌抽提2h,然后15000r/min离心30min。取上清液,用220mmol/L磷酸缓冲液(pH7.0)稀释至浓度为0.5mol/L,加二巯基苏糖醇至0.1mmol/L,4℃搅拌15h,15000r/min离心30min除去不溶物。

上清液经截流量为相对分子质量10000的中空纤维超滤器浓缩,将浓缩的人干扰素 α 2b溶液经过Sephadex G50分离,层析柱2cm×100cm,先用20mmol/L磷酸缓冲液(pH7.0)平衡,上柱后用同一缓冲液洗脱分离,收集人干扰素 α 2b部分,经SDS-PAGE检查。

将Sephadex G50柱分离的人干扰素 α 2b组分,再经DE-52柱(2cm×50cm)纯化人干扰素 α 2b组分,上柱后用含0.05、0.1、0.15mmol/LNaCl和20mmol/L磷酸缓冲液(pH7.0)分别洗涤,收集含人干扰素 α 2b的洗脱液。全过程蛋白质回收率为20%~50%,产品不含杂蛋白,DNA及热源质含量合格。

3. 质量控制标准和要求

1) 半成品鉴定

半成品鉴定,主要包括下列项目:效价测定、蛋白质含量测定、活性测定、比活性测定、纯度测定、相对分子质量测定、核酸含量测定、鼠IgG含量测定、等电点测定、无菌实验、热源质试验等。

(1) 干扰素效价测定 用细胞病变抑制法,以Wish细胞、VSV病毒为疾病检测系统。测定中必须用国家或国际参考品标准的国际单位。

(2) 蛋白质含量测定 用福林-酚法,以中国药品生物制品鉴定所提供的标准蛋白质作标准。

(3) 比活性 干扰素效价的国际单位与蛋白质含量的毫克数之比即为比活性。

(4) 纯度测定 电泳纯度用非还原型 SDS-PAGE 法, 银染显色应为单一区带, 经扫描仪测定纯度应在 95% 以上。在非还原电泳上允许有少量聚合体存在, 但不得超过 10%。用高效液相色谱反相柱或 GPC 柱测纯度, 应呈一个吸收峰, 或主峰占总面积 95% 以上。

(5) 相对分子质量测定 用还原型 SDS-PAGE 法, 加样量不低于 $5\mu\text{g}$, 同时用已知相对分子质量的蛋白标准系列做对照, 以迁移率为横坐标, 相对分子质量的对数为纵坐标做图, 计算相对分子质量, 再与干扰素理论值比较, 其误差不得高于 10%。

(6) 残余外源相 DNA 含量测定 用放射性核素或生物素探针法测定, 每剂量针残余外源性 DNA 应低于 100pg。

(7) 残余血清 IgG 含量测定 在应用抗体亲和层析法作为纯化方法时必须进行此项鉴定。如用鼠杂交瘤单克隆抗体时应测定鼠 IgG 的含量, 可用酶标或其他敏感方法测定, 每剂量 ($20\mu\text{g}$) 的鼠 IgG 的含量应在 100ng 以下。

(8) 残余抗生素活性测定 凡在菌种传代中曾经使用过抗生素者, 均应测定相应抗生素活性, 半成品中不应有残余抗生素活性存在。

(9) 紫外光谱扫描 检查半成品的光谱吸收值, 用全自动扫描紫外分光光度计观察紫外光范围内光谱图, 最大吸收值应为 $280\text{nm} \pm 2\text{nm}$ 。

(10) 肽图测定 用 CNBr 裂解法, 测定结果应符合该干扰素的结构, 且批与批之间肽图应一致。

(11) 等电点测定 用等电点聚焦电泳法测定, 批与批之间等电点应完全相同。

(12) 除菌半成品应做干扰素效价测定、无菌试验、热源质试验。

2) 成品鉴定

产品鉴定, 主要包括下列项目: 外观检查、活性测定、水分测定、无菌试验、安全毒性试验、热源质试验等。

(1) 物理性状 冻干制品外观应为白色或微黄色疏松体, 加入注射水后, 不得含有肉眼可见的不溶物。

(2) 鉴别试验 应用 ELISA 或中和试验鉴定。

(3) 水分测定 用卡氏法, 水分含量应低于 3%。

(4) 无菌试验 同半成品鉴定。

(5) 热源质试验 同半成品鉴定。

(6) 干扰素效价测定 同半成品鉴定, 效价不低于标示量。

(7) 安全试验 取体重 350~400g 豚鼠 3 只, 每只腹侧皮下注射剂量为人每千克体重临床使用量最大量的 3 倍, 观察 7d, 若豚鼠局部无红肿、坏死、总体重不下降, 即说明产品合格。

取体重 18~20g 小鼠 5 只, 每只尾静脉注射剂量按人每千克体重临床使用最大的 3 倍, 观察 7d, 若动物全部存活, 则说明产品合格。

9.4 生物医学材料

材料科学与物理学、化学、生物学及临床科学越来越紧密的结合产生了一个新兴的产业——生物医学材料产业。生物医学材料已经成为生物医学工程的四大支柱产业之一, 它为医学、药理学及生物学等学科的发展提供了丰富的物质基础, 作为材料学的一个重要分支, 它对于促进人类文明的发展必将做出更大的贡献。

9.4.1 生物医学材料的定义

生物医学材料指的是一类具有特殊性能、特种功能, 用于人工器官、外科修复、理疗康复、诊断、治疗疾患, 并且对人体组织不会产生不良影响的材料。现在各种合成和天然高分子材料、金属和合金材料、陶瓷和碳素材料以及各种复合材料, 制成的产品已经被广泛地应用于临床和科研。

9.4.2 生物医学材料的基本要求

一般而言, 医学临床对生物医学材料有以下基本的要求: ①材料无毒性, 不致癌、不致畸、不引起人体细胞的突变和组织细胞的反应; ②与人体组织相容性好, 不引起中毒、溶血凝血、发热和过敏等现象; ③化学性质稳定, 抗体液、血液及酶的作用; ④具有与天然组织相适应的物理机械特性; ⑤针对不同的使用目的具有特定的功能。

9.4.3 生物医学材料的种类

根据生物医学材料的物质属性来分大致可以分为以下几种:

(1) 生物医学金属材料 医用金属材料是作为生物医学材料的金属或合金, 具有很高的机械强度和抗疲劳特性, 是临床应用最广泛的承力植入材料, 主要有钴合金 (Co/Cr/Ni)、钛及钛合金 (Ti/6Al/4V) 和不锈钢的人工关节和人工骨。镍钛形状记忆合金具有形状记忆的智能特性, 能够用于矫形外科、心血管外科。

(2) 生物医学高分子材料 生物医学高分子材料有天然的和合成的两种, 发展得最快的是合成高分子医用材料。通过分子设计, 可以获得很多具有良好物理机械性和生物相容性的生物材料。其中软性材料常用来做人体软组织如血管、食道和指关节等的代用品; 合成的硬材料可以用来做人工硬脑膜、笼架球形的人工心脏瓣膜的球形阀等; 液态的合成材料如室温硫化硅橡胶可以用来做注入式组织修补材料。

(3) 生物医学无机非金属材料或生物陶瓷 生物陶瓷这类医用材料化学性质稳定,具有良好的生物相容性。生物陶瓷主要包括两类:①惰性生物陶瓷(如氧化铝、医用炭素材料等),这类材料具有较高的强度,耐磨性能良好,分子键力较强;②生物活性陶瓷(如羟基磷灰石和生物活性玻璃等),这类材料具有能在生理环境中逐步降解和吸收、或与生物机体形成稳定的化学键结合的特性,因而具有极为广阔的发展前景。

(4) 生物医学复合材料 生物医学复合材料是由两种或两种以上不同材料复合而成的生物医学材料,主要用于修复或替换人体组织、器官或增进其功能以及人工器官的制造。其中钴合金和聚乙烯组织的假体常用做关节材料;碳-钛合成材料是临床应用良好的人工骨头;高分子材料与生物高分子(如酶、抗原、抗体和激素等)结合可以作为生物传感器。值得指出的是,与人骨中无机质成分相同、结构相似的羟基磷灰石具有良好的生物相容性和生物活性,能与骨组织形成牢固的化学键合,但是其低强度、低韧性的特点使其只能用于非承载部位的骨替换,而纯钛具有与骨相近的密度,还具有良好的抗蚀性、生物相容性及适中的机械性能,因此综合两者特点,既具有良好生物活性又具有较强机械性能的生物复合材料(Ti/HA)具有广阔的应用前景。

(5) 生物医学衍生材料 生物衍生材料是经过特殊处理的天然生物组织形成的生物医学材料,经过处理的生物衍生材料是无生物活力的材料,但是由于具有类似天然组织的构型和功能,在维持人体组织动态的修复和替换过程中具有重要作用,主要用做皮肤掩膜、血液透析膜、人工心脏瓣膜等。

到21世纪初,被详细研究过的生物材料已有1000多种,医学临床上广泛使用的也有几十种,涉及到材料学的各个领域。目前生物医学材料研究的重点是在保证安全性的前提下寻找组织相容性更好、耐腐蚀、持久性更好的多用途生物医学材料。

9.4.4 我国生物医学材料产业的前景展望

随着材料工业的发展和人工器官的广泛应用,生物医学材料这门新兴交叉学科已经成为新技术革命的一个重要组成部分。经济发达国家已形成了新型的生物材料工业体系,目前比较有代表性的生物材料产品包括:①用于人工器官及代用品制造的膨体聚四氟乙烯、低温各向同性碳、表面修饰与交联的血红蛋白、炭化硅酯和超高分子量聚乙烯等;②用于人工关节及骨替代的高分子量高密度聚乙烯、氧化锆陶瓷、甲基丙烯酸甲酯与苯乙烯共聚物等;③用于人工膜替换的甲基丙烯酸酯类共聚水凝胶、硅橡胶聚甲基丙烯酸酯等;④用于应用黏合剂的亚甲基丙二酸酯、GRF胶,蛋白胶等。

我国生物材料的应用和开发研究起步较晚,但是随着政府的重视和投入的不

断增加,取得一批较高水平的研究和科研成果,如生物活性骨、关节系统替换材料、人工心脏瓣膜等心血管替换材料以及眼科手术用高分子复合材料等。

生物材料产业作为新兴的产业具有极大的发展前景,到21世纪初一直保持着较高的增长速度,其中蕴藏着巨大的经济利益和社会利益。我国生物材料产业不仅受国内的条件制约,同时也面临着国外企业的激烈竞争,加入WTO后我国生物技术产业将面临更严峻的挑战。

本章小结

本章主要包括以下四点:

1. 介绍了生物药物,包括生物药物的来源、特性、分类及其主要制备方法。重点讲解了三方面的内容:一是生物药物的特性:药理学特性、生产制备中的特殊性以及检验上的特殊性;二是分类:生物药物的分类方法主要有三种,即按药物的化学本质和化学特性来分,按原料来源来分和按生理功能和临床用途来分;三是主要的制备方法,不同种类的药物,制备方法各有不同。从总体上了解生物制药。

2. 对于微生物发酵制药,从微生物的代谢产物出发,讲解了微生物发酵的操作方式以及微生物发酵的生产一般流程。以具体的实例说明微生物发酵制药的一般过程及其注意事项。

3. 基因工程药物是指利用基因工程技术研制可生产的药物,主要包括重组蛋白多肽药物、核酸药物、DNA药物和基因工程抗体等。基因工程药物制造的主要程序是:目的基因的克隆,构建DNA重组体,将DNA重组体转入宿主菌构建工程菌,工程菌的发酵,外援基因表达产物的分离纯化,产品的检验等。主要介绍了怎样获取目的基因,目的基因的表达和基因工程菌的稳定性,怎样通过基因工程菌进行发酵生产基因工程药物,以及药物的分类纯化与质量控制。

4. 生物医学材料指的是一类具有特殊性能、特种功能,用于人工器官、外科修复、理疗康复、诊断、治疗疾患,而对人体组织不会产生不良影响的材料。对生物医学材料主要介绍了生物医学材料的基本要求,生物医学材料的种类(主要包括生物医学金属材料、生物医学高分子材料、生物医学无机非金属材料或生物陶瓷、生物医学复合材料和生物医学衍生材料等五大类),同时对我国生物医学材料产业的前景做了简单的介绍。

复习思考题

1. 与普通药物相比,生物药物具有何特点?
2. 微生物发酵制药与一般的工业发酵有何异同?
3. 如何控制基因工程药物的质量?
4. 举例说明基因工程药物生产的一般工艺流程。

工业生物技术

随着工业发展要求和技术的提高,生物工程技术的应用是不断深入,并产生巨大的经济效益。这一技术除了我们在上几章介绍的医药、农业行业中所起的作用外,这一技术还在食品、化工、纺织和制革方面得到广泛而又深入的应用,既起到了对传统企业改造,又起到了拓展高新技术产业化的作用,并以年增长率近 10% 的幅度展示出诱人的发展前景。

10.1 生物技术与食品生产

食品工业是最早广泛应用生物技术的领域。据报道世界食品工业中生物技术产业(酒精、氨基酸、柠檬酸、酵母等)的总值达 2 000 亿美元以上,我国利用生物技术生产的味精、柠檬酸的产量居世界首位。

食品生物技术是食品科学与生物技术相互渗透而形成的一门交叉学科。从广义来说,食品生物技术包括所有以生产和加工食品为目的的生物技术,涉及到基因工程、细胞工程、酶工程和发酵工程等主要生物技术。从生物技术在食品工业中的应用的深度和广度来看,它不仅使古老的食物发酵工业焕发青春,而且正在开创着生物技术新产业。食品生物技术包含的内容有:醇饮料、发酵调味品、发酵乳制品等产品的生产;提高食品质量、营养、安全性和食品贮藏等方面的应用。特别是基因工程等生物新技术的兴起和发展,为传统食品生物技术的突破性进展提供了技术基础。

10.1.1 基因工程与食品工业

食品工业本质上说是农副产品加工业。除了蔬菜和水果,大部分食品原料需要通过酶的催化作用或利用微生物进行物质转化,采用基因手段培育生物的良好及优良的工程菌株,对资源优化,原料基地开拓,简化工艺,改善产品质量,降低原材料消耗,降低成本和提高经济效益均有特殊意义。

(1) 基因工程菌在食品加工业上的应用 α -淀粉酶是食品生产中应用最广的酶之一,它主要用途是发酵原料的淀粉液化,制葡萄糖、饴糖、果葡糖浆,传统的来源主要用枯草杆菌进行发酵生产而制得。现由美国、日本等国家的科学家成

功地利用 DNA 重组技术实现了 α -淀粉酶基因克隆化, 并将它产酶能力提高了 3~5 倍, 此工程菌已用于工业化生产中, 为制糖、淀粉液化提供了大量的酶源, 并降低了成本。凝乳酶是奶酪生产中用的酶。以往凝乳酶主要来源于小牛的胃及成年的牛和猪。现已将小牛凝乳酶基因引入到酵母细胞中, 构成了基因工程菌, 可生产与动物相同的凝乳酶, 并且成分单一, 使用中作业时间更容易把握。现已实现了工业化生产, 为奶酪工业提供了廉价充足的凝乳酶。

(2) 基因工程在食品工业氨基酸生产中的应用 基因工程在氨基酸应用, 主要体现在氨基酸的产量上有较大的提高。如日本科学家将高丝氨酸脱氢酶和高丝氨酸激酶的基因引入到乳糖发酵短杆菌中, 这两种酶是合成苏氨酸的关键酶, 这样使苏氨酸的产量大大提高, 由原 16g/L 提高到 33g/L。

(3) 基因工程菌在食品色素的应用 食品色素是食品加工中的一种添加剂, 为了保证食品的安全性, 一般生产中应尽量使用天然色素。靛蓝是一种从植物蓼蓝叶提取的天然食品色素, 也是纺织工业中大规模应用的染料。生产需要量很大, 为了满足市场需要近年采用基因工程菌技术, 将萘双氧酶基因引入大肠杆菌构建成基因工程菌再以吲哚为原料合成靛蓝。与化学合成法比较, 基因工程菌技术具有工艺流程简单, 设备投资少, 产品收率高, 成本低及环境污染小等优点。因此基因工程菌将为食品色素生产带来无限生机, 大大提高食品的安全性。

10.1.2 酶工程与食品工业

食品加工过程中, 如何保持食物的色、香、味和结构是很重要的问题。因此加工过程中要避免剧烈的化学反应。酶由于反应温和、专一性强, 本身无色无味, 反应容易控制, 因而在食品加工中有着广泛的应用。其主要应用有: 淀粉加工生产、蛋白制品加工、果蔬加工、食品保鲜及改善食品的品质与风味精等。

1. 淀粉加工

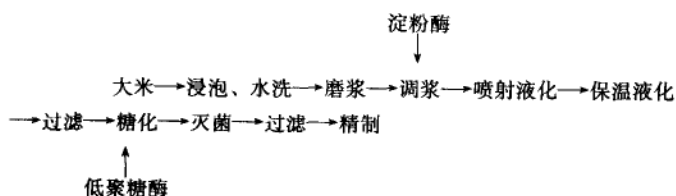
食品中有很多是由淀粉加工获得的, 如葡萄糖浆、葡萄糖、麦芽糖以及各淀粉糖浆、麦芽糊精都是由淀粉转化的。

(1) 葡萄糖生产 国内外葡萄糖生产都是采用酶法。酶法生产葡萄糖是以淀粉为原料, 首先是淀粉的液化, 采用的 α -淀粉酶为液化酶在 85~90℃ 下, pH6.0~5.0, 保温 45min 左右, 将淀粉液化成糊精, 第二步将液化淀粉冷却至 55~60℃, pH 调至 4.5~5.0, 加入糖化酶保温糖化 48h 左右, 使糊精转变为葡萄糖。此方法与化学法、酸水解相比, 具有不必精制、产品无苦味与色素生成、水解终止后不必中和、设备不需耐酸、耐压等优点, 水解率可达 98% 以上, 全糖收率可达 100%。

(2) 低聚糖生产 低聚糖是具有营养和保健双重功能的新一代食品, 由于它

具有多方面的功能特性：有的可抑制人们肠道腐败菌的生长，有的可促进人们肠道内有益细菌——双歧杆菌的繁殖，有的可降低血液中胆固醇的水平，因此发展很快。低聚糖通常是指由 2~10 个单糖组成的聚合物。11 个单糖以上组成的聚合物称为大糖类，100~2 000 个单糖组成的聚合物为多糖。低聚糖由于单糖分子结合位置和结合数量不同，生成的种类很多，一般认为已知的即达 1 000 种以上。低聚糖由同一种单糖组成的总称同低聚糖，由两种以上不同单糖组成的总称杂低聚糖。其命名是以来源来命名。如以淀粉水解物的方法通常以麦芽糖基为词头：麦芽低聚糖、麦芽四糖等，以木聚糖为原料的称木低聚糖。

在种类繁多的低聚糖产品中，以麦芽低聚糖和异麦芽低聚糖是国内研究最多，发展最快、产量最大的一种以淀粉为原料生产的低聚糖，而且已有工业化生产。目前在国内外，生产低聚糖大多是利用微生物酶的特异作用，将淀粉分子按一定的方向，一定的长度进行水解，生成的产物大多在麦芽三糖至麦芽七糖这一范围。低聚糖的生产还可通过葡萄糖转苷酶的作用，将游离的葡萄糖转移至另一个葡萄糖或麦芽糖分子的 α -1, 6 位上，形成具有分支结构的异麦芽糖，异麦芽三糖或者潘糖等新的聚合物，这样的聚合物称为异麦芽低聚糖。麦芽低聚糖生产工艺如下：



工艺条件控制：

液化：粉浆浓度 15~17°Bé pH 6.2~6.4

高温淀粉酶 温度 95~97℃ DE 控制在 10%~12%

糖化：温度 55~58℃ 糖化时间：10~12h pH 5.2~5.5

低聚糖酶或高温酶 DE 要求在 30%~35%

麦芽低聚糖具有其他低聚糖相同的一些特性，能提高钙离子的吸收能力，防止龋齿等。特别是具有 DE 和甜度较低，吸湿性和保湿性较强等特性，适用于食品工业，尤其是一些儿童食品和需要保持水分的食品（如奶油软糖、巧克力果冻等）生产。

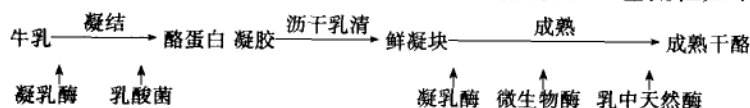
异麦芽糖的生产与麦芽低聚糖的不同在于糖化过程，由于它具有 α -1, 6 葡萄糖苷键的分支结构，因此在糖化时首先在糖化酶的作用下将液化液水解成麦芽糖和其他低聚糖，然后在葡萄糖转苷酶的转苷作用，将游离葡萄糖转移至另一个葡萄糖或麦芽糖分子的 α -1, 6 位，生成异麦芽糖或潘糖等，具有分支结构的低

聚糖类。异麦芽低聚糖是国内研究最多，发展最快且有成功的葡萄糖转苷酶实际应用。由于它对双歧杆菌等的增殖作用更强，所以应用前景十分广阔。

2. 乳品加工

酶工程在乳品工业中的应用非常广泛。例使用凝乳蛋白酶制造奶酪；用乳糖酶水解乳中的乳糖，生产低乳糖奶，此产品在 1977 年用固定化乳糖酶实现了连续生产。用过氧化氢酶除去杀菌处理后残存在牛奶或奶酪中的过氧化氢；用蛋白酶生产乳蛋白（酪蛋白）水解物等。

例如干酪的生产：干酪俗称奶酪，是乳中的酪蛋白凝固而成的一种营养价值高、容易消化吸收的食品。其成分是蛋白质和乳糖还含有少量的无机盐及丰富的维生素。全世界干酪生产所耗牛乳约占全年牛乳总产量的 1/4。干酪的生产有两种方法，一种是采用乳酸菌发酵，另一种为利用凝乳蛋白酶进行酶法生产。采用凝乳蛋白酶酶法生产干酪的基本原理是：牛乳中有三种酪蛋白，即 α 、 β 、 κ 酪蛋白。 κ -酪蛋白水解为副 κ -酪蛋白失去保护作用，在凝乳蛋白酶的作用下， κ -酪蛋白水解在酸性环境下，钙离子使酪蛋白凝固生成凝胶。工艺流程如下：



3. 食品分析

食品加工需要分析控制，从食品分析手段来看，酶法分析是最灵敏而快速，以及专一性的分析方法。随着酶法分析的发展，在食品分析中的应用也越来越广泛。

采用酶法测定食品的成分时，实际上是将食品中被测成分看作为酶催化反应的一个底物，通过测定底物转化为产物的量计算出其含量。因此酶法分析是食品成分定量分析常用的方法。如用抗坏血酸氧化酶测定维生素 C；用乳酸脱氢酶来测定乳酸；用碳酸酐酶测定 CO_2 ；用醋酸激酶测定醋酸；用 L-氨基酸脱羧酶测定氨基酸；用胆固醇氧化酶测定胆固醇等含量。另外，酶法测定也可作为食品质量的评价方法，在食品中加入一种或几种酶，根据它们作用于某些组分的结果，来评价食品的质量。例如，食品中蛋白质的消化率和可用性是许多食品的营养价值的指标，因此可以通过蛋白酶测定食品中蛋白质的消化率，作为蛋白质在体内实际消化的指标。因此蛋白酶在测定食品的营养价值方面起着重要作用。同时也可以利用蛋白酶的作用评价热加工对食品中氨基酸有效成分的影响。

对于食品中组分的分析，需要自动和快速测定，而固定化酶应用于食品分析，使食品分析工作得到了满足。例如，采用固定化葡萄糖氧化酶测定葡萄糖；

固定化精氨酸酶和谷氨酰胺酶分别测定精氨酸和谷氨酰胺等。如果将固定化酶同具有传感器功能的电极紧密地耦合在一起,可以构成酶电极在食品分析中加以利用,此技术已应用于测定氨基酸含量中,其中谷氨酸生物传感器的研究是最为广泛也是最成功的。

4. 食品保鲜

包装食品在贮藏中变质的主要原因是氧化和褐变,许多食品的变质都与氧有关,因此在食品加工过程采用去氧减少许多组分发生褐变,减少微生物的繁殖而导致的腐败是保藏食品的重要措施。酶工程在这方面发挥了很好的作用。如用葡萄糖氧化酶可去除果汁、饮料、罐头食品和干燥果蔬制品中的氧气,防止产品氧化变质,防止微生物生长,延长食品保存期。为了减少食品保鲜中因微生物作用而发生的变质,可使用鸡卵溶菌酶来保存食品,起到食品保鲜作用等。

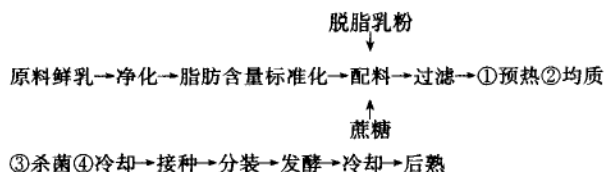
5. 用酶改善食品的品质和风味

酶不仅广泛用于食品的制造与加工中,而且在改善食品的品质和风味方面大有用场。在这方面主要是风味酶的应用,如用洋葱的风味酶处理甘蓝等蔬菜,可以使被处理的蔬菜呈现洋葱的风味;用奶油风味酶作用于含乳脂的巧克力、冰淇淋、人造奶油等食品,可使这些食品增强奶油的风味。一些食品在加工或保藏过程中,可能会使原有的风味减弱或失去,若在这些食品中添加各自特有的风味酶,则可使它们恢复甚至强化原来的天然风味。

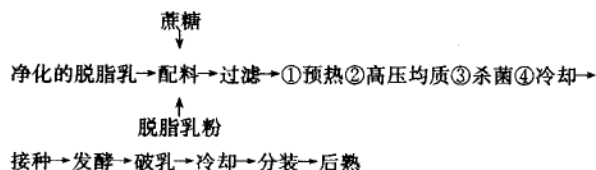
10.1.3 发酵工程与食品工业

随着科学技术的发展,发酵工业已进入一个新的阶段。现在发酵工业已将传统发酵技术与现代 DNA 重组、细胞融合等最新技术结合,使发酵工程在食品工业中的应用越来越广泛。主要体现在:牛乳发酵饮料、酒类生产、调味剂生产等方面。现以酸乳的生产为例说明发酵工程在食品工业的应用。

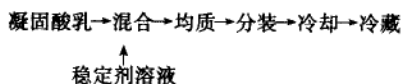
酸乳是利用保加利亚乳杆菌和嗜热链球菌共同作用,使按要求配制的乳或乳制品进行乳酸发酵而制得的酸乳饮料,它不仅口味好,而且富含营养物,极易被人体吸收利用。酸乳的种类很多,按形态区分酸乳可分为凝固型、搅拌型和饮料型 3 种,按产品中是否含活乳酸菌,可分为活菌型和杀菌型 2 个品种,在生产过程中添加果汁的酸乳被称为果汁型酸乳,使用乳酸菌和双歧杆菌作为混合发酵的称为混合酸乳。凝固型酸乳的生产是将乳酸菌在乳中生长繁殖,发酵分解乳糖产生乳酸等有机酸,导致乳的 pH 下降,使乳酪蛋白在其等电点附近发生凝集,从而制成凝固型酸乳。工艺流程如下:



搅拌型酸乳是指先在发酵罐中通过乳酸菌的作用，将经过标准化处理的牛乳发酵至乳凝，然后再用搅拌器破乳，使凝乳粒子保持在 $0.01\sim 0.04\mu\text{m}$ 大小的一种酸乳，产品呈半流动状态的粥糊状，易使用吸管吸食。工艺流程如下：



饮料型酸乳是将凝固型酸乳均质处理后，使凝乳充分分散，凝乳粒子直径在 $0.01\mu\text{m}$ 以下的酸乳，这种酸乳的特点是与牛乳相似，呈液体状。工艺流程如下：



目前已将乳酸酶实现固定化，因此利用固定化酶进行酸乳的生产，实现了连续的工业化处理牛乳，从而大大提高了产量。牛乳经过乳酸发酵的处理后具有提高牛乳的营养作用、缓解乳糖不耐症、降低胆固醇、整肠作用、抑菌作用、改善便秘作用和抗癌作用，从而使它越来越受到人们的喜爱。

10.2 生物技术与精细化工

生物技术进行生产精细化学品解决了用化学法合成存在反应步骤长，或是反应速度慢，反应条件苛刻或副产物较多，产物分离精制极其困难等缺点，因此生物技术的应用在精细化学品占据很大的比重，特别是现代生物技术基因工程获得的“工程菌”所提供的生物酶使许多精细化学品的合成、分离精制都有可能顺利实现。如美国军方研究利用生物技术生产一种蚕丝蛋白，其韧性和强度均是其他材料所无法比拟的，可作为降落伞生产原料；日本研究用微生物生产新的磁性材料；以及药物合成中甾体激素的羟化和脱氢、青霉素类药物中的 6-氨基表霉烷酸、化工产品丙烯酰胺的生产都显示了生物技术在精细化学品生产中的优越性。

10.2.1 发酵工程在精细化工中的应用

(1) 发酵生产酒精 酒精被广泛应用于国民经济的许多部门,是重要的溶剂和化工原料。酒精生产有化学合成法和发酵法两种方法,化学合成法是采用石油化工原料如乙烯进行合成,其产品中夹杂异构化高级醇类物质,对人的神经中枢有麻痹作用,用途受到限制。发酵法是采用再生资源为原料经微生物作用而生产的产品,从长远的观点看具有重要的战略意义。我国酒精生产发展很快,已成为世界上的酒精生产大国。而且酒精发酵技术也已进入国际先进行列。

酒精的发酵生产按照原料不同可分为淀粉质原料、糖蜜原料和纤维质原料三大类。其发酵机制是:酵母活细胞中含有丰富的蔗糖水解酶和酒化酶,蔗糖在蔗糖水解酶的作用下,水解为单糖,单糖又在酒化酶的作用下,经 EMP 途径最终生成酒精和 CO_2 。

进入 21 世纪我国酒精行业面临的重大课题是原料、成本和污染 3 个问题。解决发酵酒精原料的根本出路在于利用纤维原料代替粮食;酒精生产与饲料生产结合,饲料粮先酿酒,酒糟再生产蛋白质饲料;节能措施应放在原料粉碎、蒸煮、蒸馏等工序的技术革新和改造上。利用遗传工程技术选育能直接发酵生成淀粉、纤维素、半纤维素的菌株以及耐高温酵母、抗杂菌酒精发酵菌等都能从根本上改变目前酒精生产面貌。

(2) 单细胞蛋白的生产 单细胞蛋白(简称 SCP)主要是指酵母、细菌、真菌等微生物蛋白质资源,通过工业法增殖培养并从中提取出的蛋白质。由于人民生活水平的提高,人们对动物蛋白质的需求量大为增加,而生产动物蛋白需消耗大量植物蛋白,如要获得牛蛋白 1kg,需消耗植物蛋白 3~4kg,有些甚至需要植物蛋白 7~10kg,很不经济。因此人们在不懈地寻求蛋白质资源以解决由于经济发达、人口急剧增长造成的蛋白质供给不足的矛盾。目前人们已公认 SCP 是最具有应用前景的蛋白质新资源之一,对于解决世界蛋白质资源不足问题方面将会发挥重要作用。与传统动、植物蛋白质生产比较,发酵技术生产 SCP 不受季节影响和耕地的制约,并具有生产效率高等特点。具体的优点见表 10-1。

表 10-1 用微生物生产 SCP 的优点

优 点	缺 点
1. SCP 生产周期短	核酸含量较高,人体代谢产生尿酸,易引起风湿症,
2. 占地少,不依赖气候	一些细胞壁组分不能消化
3. 蛋白质含量高,蛋白质营养价值高	
4. 微生物的培养基来源广泛低廉	
5. 容易进行遗传操作更容易实施转基因技术	

SCP 生产的菌种主要有酵母菌、霉菌、细菌、藻类真菌等微生物, 这些微生物菌体的蛋白质含量很高, 以干重计, 大部分可达 42%~75% (表 10-2) 其中所含人体八种必需氨基酸, 因此也具有较高生物效价。酵母菌是最早用于 SCP 生产也是现在应用最广的生产 SCP 的菌种。它具有可利用原料广, 能在酸性条件下生长, 菌体大, 易分离回收等优点。同时除含有丰富的优质蛋白质外, 还含有较丰富的维生素 C 和 B 族维生素及 Ca、Fe、Zn 等必需微量元素。但其具有生长速度慢、蛋白质含量低的缺点。细菌具有生长速度快、蛋白质含量高等优点, 但菌体小, 分离回收比较困难。随着分离技术的改进, 这个缺点已能克服, 因此具有较好的发展前途。藻类是以阳光为能源, 以 CO_2 为碳源且蛋白质含量高的微生物源, 它能在开放的池塘中很好地生长, 因此人们对利用藻类生产 SCP 的兴趣日增, 现在许多国家都在积极进行球藻和螺旋藻的 SCP 开发。如美国、日本、墨西哥等国将螺旋藻制成高级营养品和减肥品等健康食品, 在国际上很受欢迎。

表 10-2 微生物基本化学成分

单位: 质量分数%

微生物种类	蛋白质	碳水化合物	核 酸	脂 质	灰 分
霉菌	31~50	7~40	9.2	2~8	9~14
酵母菌	47~56	26~63	6~15	2~6	5~9.5
细菌	72~83	12~28	8~16	1.5~3	3~7.0
螺旋藻	50~70	—	4~9	30	—

SCP 生产的原料主要有两类: 一类为再生资源, 如淀粉质原料、废糖蜜、造纸、食品加工厂的废弃物、农林工业的有机废弃物, 这些物质大部分是各工厂排放的废液, 给环境带来很大的污染, 因此利用这些废料来生产 SCP 是一举两得的事情, 既减少污染, 又可得到吃的蛋白质。另一类为矿物产品 (如正烷烃) 和石油化工产品 (如石蜡烃、柴油、甲烷、甲醇、乙醇类), 这类原料是 20 世纪 60 年代末期和 70 年代初期连续开发出的 SCP 工艺, 这些技术有些适用于大规模工业化生产。如工业规模生产 SCP 的方法主要有以甲醇为原料的 ICI 法, 以乙醇为原料的 Amoco 法, 利用亚硫酸纸浆废水连续生产丝状真菌蛋白的 Pekilo 法, 以淀粉废液为原料的 Symba 法以及以农业废料如玉米秆为原料的 Waterloo 法, 其中大多数为培养酵母生产 SCP 产物。

SCP 生产的方法本质上就是以工业方式培养微生物, 其过程为预处理、发酵培养及菌种回收等步骤, 其生产流程见图 10-1。

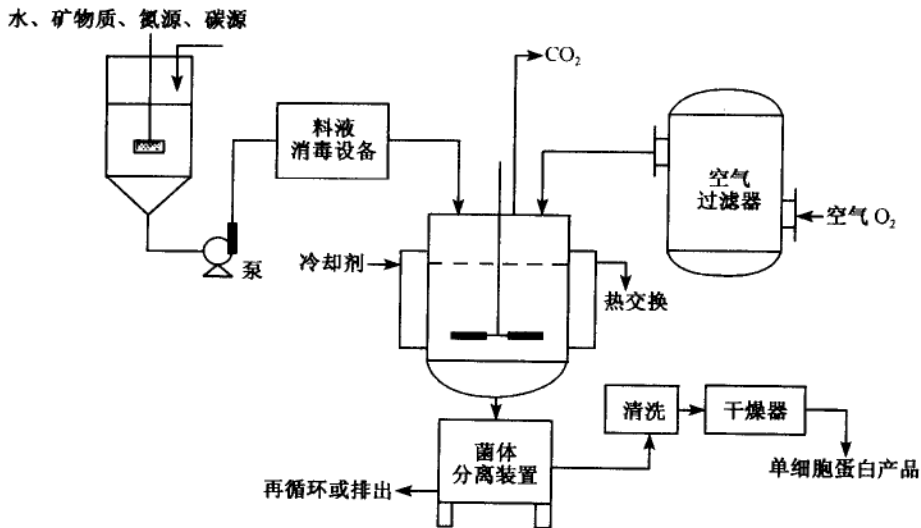
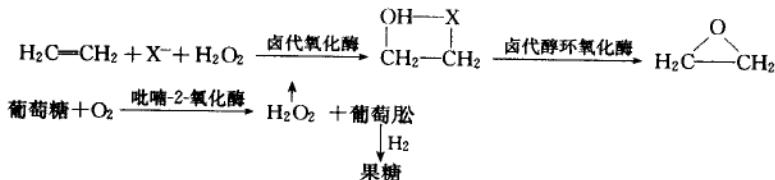


图 10-1 单细胞蛋白生产流程简图

10.2.2 酶工程在精细化工中的应用

利用酶的特性，在精细化学品合成中具有重要意义。

(1) 有机化工产品中的应用 环氧乙烷、环氧丙烷等氧化链烯烃是重要的塑料生产原料，迄今是由化学法经高温高压反应生产的。Cetus 公司开发的酶法新工艺可能使塑料工业发生划时代的变化，因而引起工业界的高度重视。该法由两个反应体系构成：



有三种酶参加反应，其特性如下：

吡喃-2-氧化酶：担子菌产生，能以葡萄糖为能源，催化葡萄糖生成过氧化氢与葡萄糖，过氧化氢作为烯烃的氧化剂，葡萄糖则氢化后变为果糖。

卤代氧化酶：烟色卡尔黑霉产生，在卤素和过氧化氢存在下催化烯烃生成卤代醇。

卤代醇环氧化酶：黄杆菌产生，将卤代醇转化为环氧化物，该反应中的卤素可用食盐代替，大大降低成本。此反应乙烯换成丙烯则获得产物是环氧丙烷。

另一个重要的化工原料丙烯酰胺也可以用酶法生产，1989 年日本以假单胞杆菌 *pseudochloraphio* 细胞为催化剂，在 15℃、pH 为 7.0，反应时间为 7~8h，完成丙烯腈转化为丙烯酰胺的反应，回收率可达 99% 并实现了工业化生产。

(2) 有机酸合成中的应用 有机酸是重要的精细化工产品或原料。利用细胞或酶可生产多种有机酸产品, 酶法合成有机酸是结合有机化学合成与生化合成的长处而构成的生产工艺。

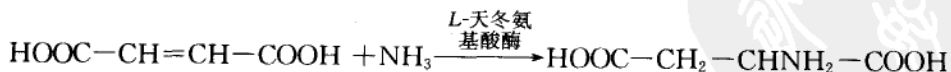
长链二元酸是香料、树脂、合成纤维的原料, 不易用化学法生产, 但应用专一性微生物催化可方便生产。现日本已建成年产 200t 的生产装置。

生产二元酸是根据酵母菌对末端甲基高度亲合力的作用, 长链二元酸的积累, 要求突变株的 ω -氧化活力要高, 而 β -氧化系统活力要低, 否则一元酸被逐步切短。生产过程如图 10-2 所示。

苹果酸是一种优良的食品酸味剂, 在化工、印染、医药生产上有着广泛的用途, 它可代替橡胶用做防锈剂。自然界如各种果蔬中广泛存在的苹果酸为 *L*-苹果酸, 用化学合成的则为 *D* 型和 *L* 型的混合物, 不能用做食品添加剂。若用延胡索酸在延胡索酸酶的作用下进行水合, 或直接用糠质为原料利用霉菌进行发酵可制得 *L*-苹果酸。日本四边制药厂用聚丙烯酰胺包埋的气短杆菌转化富马酸产生 *L*-苹果酸, 其后又用角叉菜胶包埋的黄色杆菌生产, 其酶活力增加 9 倍并已批量应用于医药生产中。

(3) 氨基酸合成的应用 酶在氨基酸生产中的用途有两个: 一个是利用酶的高度专一性进行 *D*-、*L*-氨基酸的拆分; 另一个用途是利用酶法合成光学活性氨基酸。用酶法可合成多种氨基酸, 甚至一些天然不存在的氨基酸, 如可用酶法生产一些 *D*-氨基酸, *L*-天冬氨酸、*L*-赖氨酸、*L*-丙氨酸等均可用酶法合成, 并已大规模生产。现举例如下:

L-天冬氨酸是唯一用酶法生产的一种氨基酸, 可以用天冬氨酸酶将延胡索酸(反丁烯二酸)氨基化生成 *L*-天冬氨酸, 工业上也可用大肠杆菌细胞内酶天冬氨酸酶进行反应合成天冬氨酸。用聚丙烯酰胺凝胶包埋大肠杆菌细胞制成固定化细胞, 用于连续生产 *L*-天冬氨酸, 且反应几乎是定量反应, 回收率已达到 100%。其反应式如下:



化学合成法生产的氨基酸都是消旋体, 其中只有 *L* 型具有生理活性, 用 *L*-氨基酸酰化酶可将 *DL*-酰基氨基酸光学拆分生成 *L*-氨基酸。其过程为: 用 *L*-氨基酸酰化酶对化学合成的 *N*-酰基-*DL*-氨基酸进行不对称水解, *L*-酰基氨基酸被水解生成 *L*-氨基酸, 余下的 *N*-酰基-*D*-氨基酸经化学消旋再生成 *DL*-酰基氨基酸, 再用 *L*-氨基酸酰化酶进行不对称水解, 这样反复多次, 直至几乎全部变成 *L*-氨基酸。目前工业上已用固定化 *L*-氨基酸酰化酶连续生产 *L*-苯丙氨酸和 *L*-色氨酸。

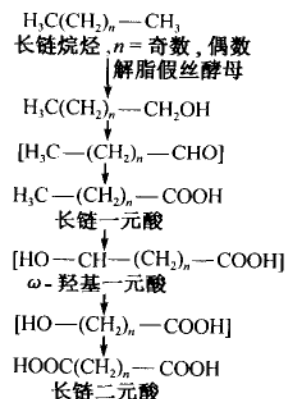


图 10-2 二元酸发酵过程

酸等氨基酸,如将米曲酶酰化酶固定在 DFAE-葡聚糖凝胶 G25,可用于 5 种氨基酸的拆分,一个 1 000L 酶柱日产量可达 10~32t。

10.2.3 细胞工程与精细化工

植物组织和细胞培养技术是细胞工程中发展十分迅速、有广阔应用前景的领域。利用植物中代谢产物或次级代谢产物来提取的精细化工产品有:有机酸、生物碱、酚类、色素、香料、杀虫剂、蛋白质、糖类、酶、类固醇类、植物生长调节剂、激素等十几种类别。这些物质是药物、燃料、食品添加剂、香料和杀虫剂的重要原料。由于它们来自于植物的天然产物,大多数用化学方法难以合成。当今,由于人口增加、地球环境破坏、森林被毁,许多天然产物来源日益萎缩,致使来自天然植物的精细化学品供求矛盾加剧,因此寻找新的资源日益迫切。为解决这种矛盾,我们可将植物组织和细胞进行大规模培养,从培养的植物细胞中找到与其亲代植物所通用的同样化合物,从而生产出人类所需的植物产品。而且组织培养与栽培植物相比有许多优点:①在控制条件下生产;②可采用连续方法;③不受气候影响,稳定供应。这样就可以解决资源不足的问题。

目前国内外已有数百种植物通过植物细胞组织培养的方法获得了完整的植株,科研人员已对 200 余种植物进行了植物组织培养研究,已分离出次级代谢产物达到 500 种以上。如用做色素的花色苷、姜黄;用做农药的除虫菊酯、鱼藤酮等;还有用做药物的人参、西洋参等。日本 Mitsui 石油化工工业公司用组织培养法生产的紫草素,具有无毒、无副作用、抗菌和抗炎作用,可作为口红原料之一用于化妆品,深受欢迎。其产量占全年需求量的 2/5。我国在植物细胞培养研究方面已有相当水平的发展,在利用植物细胞的大量培养,生产天然色素、天然香料、次级代谢产生的功能型食品 and 食品添加剂等方面均取得了一定的成就。

植物组织培养过程可分为两个步骤:一是愈伤组织培养;二是细胞悬浮液培养(图 10-3)。植物组织培养基的成分包括碳源、氮源、无机盐、纤维素和植物激素。植物激素包括生长素和细胞分裂素。

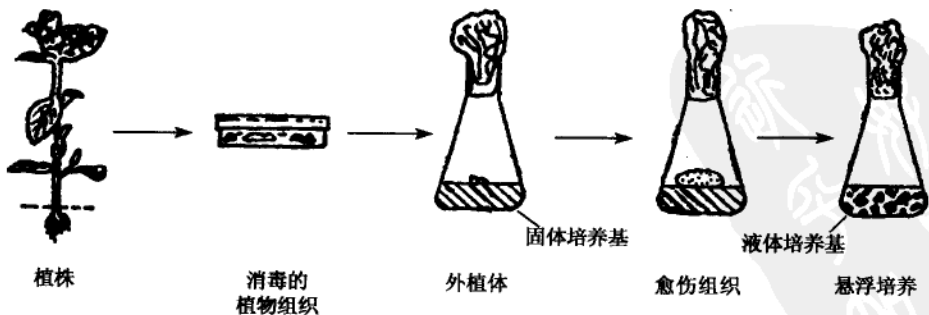


图 10-3 建立悬浮培养的过程

10.3 生物技术与纺织皮革工业

10.3.1 生物技术在纺织工业中的应用

(1) 酶制剂在退浆工序中的应用 织物在织造过程中,纤维需要上浆,增加牢度。织坯进行染色、漂白印花时需要将浆料去掉,印花后也需要把印花的浆料去掉。退浆的好坏,直接影响成品的质量,如手感、白度、光洁度、给色量、白芯及强度等。目前大多采用淀粉上浆,而退浆的方法很多,可以用烧碱、硫酸、双氧水等,但这些化工产品不仅有损织物,操作麻烦,而且污染环境。利用酶制剂——淀粉酶在一定的条件下,可将淀粉浆迅速变为糊精,液化后的可溶性糊精随水洗而洗净,达到退浆的目的。与化学法相比具有如下特点:①织物不受损伤,退浆后织物手感柔软、丰满、光洁度强、染色鲜艳;②高效高速,适合高温退浆,时间短,退浆率可达90%~95%;③退浆和固色可以同浴处理,缩短工艺流程,提高劳动效率;④用于炼白,能提高毛细管效应,并能改善劳动生产条件,节约燃料,降低成本,能用于连续化大生产。酶法退浆可用于棉布、丝绸、涤纶、黏胶纤维、混纺织物、色织府绸和化纤混纺等织物。

退浆所用的淀粉酶有两种:一种为耐高温 α -淀粉酶;另一种是中温淀粉酶,选用时应根据各工厂设备条件及织物的性能来决定采用何种酶。退浆工艺方法有三种:①堆叠退浆法:织物浸湿后铺开或成束浸在50~70℃并配有100~250ml/100L中温淀粉酶的退浆剂水浴中,织物应被水完全淹没,退浆水要循环40~60min,温度应控制在50~70℃,排去退浆水后用热水冲洗。②染布机退浆法(热浴法):水浴先加热到沸腾,然后清洗一次织物,水温降到65℃时,按量加入退浆剂(中温淀粉酶退浆剂)及其他原料,织物缓慢转动2~4次,温度65~75℃下作用10~20min,再加热到80~85℃,保持1~2min,放出退浆水,并用热水冲洗1~2次。③连续退浆法:水加热至70℃,按量加入250ml/100L中温淀粉酶退浆剂,将织物在热水浴中浸透并吸附退浆剂,加热水浴1~2min,然后进行清洗和煮洗,如果选用耐高温 α -淀粉酶,热水浴的温度要提高到95℃左右,并且要连续液化,再清洗至干净。

实例:热浴法退浆工艺流程

烧毛→平洗槽轧流动热水(75~80℃)→平洗槽轧流动热水(55~60℃)→
平洗槽轧酶→绳状进堆布池,堆置30min→绳洗机热浴→绳洗机热水洗

轧酶处方和条件:

	轧槽配液	补充配液
2 000 倍中温淀粉酶	500g	1 500 g
食盐	1 000 g	3 000 g
轧酶温度	(80±2)℃	
轧酶 pH	6.5~7.0	
布重对酶液吸液量	25%	
轧酶浓度	2U/(ml·h) 左右	
补充配液浓度	6 g/(ml·h) 左右	
热浴温度	95~98℃	
热浴时间	11~13s	
热洗温度	65~70℃	

退浆要点：①为了使织物纱线充分膨化，提高酶液渗透效力，轧酶液前要用充分流动热水水洗；②用酶浓度要按实际情况变化。因为不同品种的织坯有不同的上浆率，即使用同一品种上浆情况也会有所不同；③轧酶配液的 pH 应控制在 6~7；④操作中要注意车速、轧滚压力、浸轧次数、膨化程度、织坯等因素的控制。如需加助剂应采用对酶无抑制作用的渗透剂；⑤轧酶液槽前轧滚的轧液效率，一定要大于后轧液，尽量使轧酶后布上带有较多的酶液，从而控制轧槽酶液面的高度，达到稳定酶液的浓度；⑥织物轧酶后堆置，其目的是使酶液渗透到织物里面。堆置时间随季节、织物而有所不同，人造棉因是再生纤维渗透性好，堆置 5min 左右，棉布因抗水性强，堆置需 30min 左右；⑦热浴温度要严格控制，应保持均匀。

(2) 纤维素酶、蛋白酶在精炼中的应用 纯棉织物羊毛织物和丝绸的纤维表面存在一些杂质如：果胶、蜡状物质、木质素、鳞、胶质蛋白等物，这些物质的存在影响组织物的质量，利用纤维素酶、蛋白酶可以分解这些物质，从而使织物的吸湿性、柔软性、光泽提高，从而提高织物的质量。如用中性蛋白酶对羊毛表面结构中的一部分蛋白质溶解，鳞片层受到一定的破坏，达到减量的目的。经剥鳞处理后，可使羊毛变细，给予羊毛纤维优良的防缩性，并使其柔软，具有光泽。真丝、绸类产品只有经过精炼脱胶才产生鲜艳的光泽，柔软的手感，发挥出天然丝特有的特点。用蛋白酶脱胶与化学脱胶相结合处理，能使脱胶迅速、均匀，并使丝绸富有弹性，白度较好，手感柔软。

(3) 纤维素酶在棉织物中的应用 纤维素酶在纺织工业中的应用，是一项新的高科技工艺，它的发展是随着人民生活水平的提高、崇尚回归自然的需要，将生物技术应用与纺织领域的一项新的重大改革。由于经纤维素酶处理的纤维织物及其混纺织物，其性能有了极大的改善，手感柔软、光洁，穿着舒适、自然。所以此工艺发展非常迅速，在短短的时期内广泛采用。

用纤维素酶处理织物主要在两个方面：一个是纤维素酶对混纺织物（包括机、针织物）的光洁、柔软处理；另一个是牛仔服的酶洗处理。纤维织物经纤维素酶的处理，能发生风格的变化，而且表面效果也比较特殊。具体体现在：质量减轻、穿着轻快，而且会产生永久性柔软手感、悬垂性增加。表面还可产生绒面触感，同时产生漂亮的光泽。经酶处理后，由于除去了死棉与棉结，使布面更光洁，斜纹织物纹路更清晰，凹凸感更明显。牛仔服经过多种酶的复合作用，产生了减量、剥色、柔软和陈旧感的效果。为了达到上述的效果在用纤维素酶水洗时应注意以下几点：①选择最佳的加酶量、浴比（水与衣物比例），使产品达到预期的效果；②控制好处理液的 pH，一般为 4.5~5.5；③控制好处理液的温度，应在纤维素酶最适温度范围内，使纤维素酶发挥最佳水平，从而达到理想的酶洗效果；④确定适宜的酶洗时间，一般棉织物为 30~60min；⑤加强搅拌使酶与织物均匀接触，避免造成产品褪色不均匀的现象。如用化学添加剂要注意使用量，因为有些化学添加剂对酶有抑制作用。

总之，纤维素酶在纺织工业中的应用，提高了产品的档次，大幅度地增加了产品的附加值。另外纤维素酶的处理液还可以回收使用，反复多次使用时，只要测一下残余的酶活力，再适当追加一些酶，以补充至所要求的酶浓度。因此，这一技术的应用前景十分可观。

10.3.2 生物技术在皮革生产中的应用

（1）蛋白酶在皮革生产脱毛工序的应用 用来制造皮革的原料皮，从组织方面来说，是利用真皮层部分，从化学组成来说，是用其胶原部分，除此以外，其他组织如真皮、毛、皮下组织等以及化学组成中的白蛋白、球蛋白、黏蛋白等，在生产过程中都应该除去。用于除去这些物质的方法很多，一般有碱法脱毛、二甲胺脱毛、氧化脱毛以及酶法脱毛。由于传统脱毛会产生硫化物等有毒物质污染环境，为了解决这些问题从 20 世纪 70 年代开始研究利用蛋白酶的水解作用达到脱毛目的，从而消除硫化物对环境的污染，用于脱毛的蛋白酶主要来自于微生物蛋白酶制剂，常用的有 1398 中性蛋白酶、3942 中性蛋白酶、166 中性蛋白酶等品种。酶法脱毛的种类很多，国内较常用的有液酶脱毛和无液酶脱毛两大类。有液酶脱毛（湿法）是使生皮经碱膨胀处理，为蛋白质渗入皮内部创造有利条件，再用少量的酶在短时间内处理就可以达到脱毛的目的。无液酶脱毛是将回软或脱脂后的猪皮，加入适量的酶制剂并使其均匀地渗入皮内，由于未加入水，酶的浓度高，所以能在短时间内使毛松动并脱去。影响脱毛效果的因素有：酶制剂的性能、酶浓度的高低、作用温度的控制以及 pH 的影响。酶法脱毛与传统脱毛比较具有以下优点：①皮革质量好（正品率高、皮质柔软光滑）；②脱毛时间短；③环境污染小；④劳动强度低。

(2) 酶制剂在毛皮的软化中应用 旧的软化方法是采用米硝法, 此法劳动强度大、生产周期长, 皮板灰臭、不可水洗。用醛铬鞣的成品皮板僵硬, 皮板裂面现象较多。用蛋白酶来分解纤维间蛋白质, 使皮纤维松散, 再经化学鞣制后, 成品轻、软、薄、暖、毛头灵活、无灰无臭, 不怕水洗, 提高出皮率 5%~10%, 增加皮板抗张强度 30%, 提高收缩温度, 减轻质量 5%~10%, 缩短周期 50%, 显著降低了生产成本。如用脂肪酶对多脂改良绵羊毛脱脂, 可使产品丰满柔软、弹性好、皮板牢、染色均匀、色泽鲜艳、便于控制厚薄度。皮革软化时采用的酶软化剂一般多用动物蛋白酶有碱性蛋白酶 (540、289)、中性蛋白酶 (1398、3942)、酸性蛋白酶 (3350)。酶制剂使用时要注意调整到要求的 pH 及适宜的温度范围, 一般不超过 37℃, 温度控制的原则是宁可降低温度并延长时间来保持皮质, 也不采用有害于皮质的较高温度。使用何种酶制剂或使用量进行软化时, 须要先对生皮进行酶试验, 决定采用何种酶, 并找出其他相宜的加工条件, 以免出现软化不足和软化过度的缺陷。

本章小结

随着工业的发展要求和技术的提高, 工业生物工程所处的地位越来越重要, 其作用是传统技术无法比拟的。本章主要从食品工业、精细化工、纺织皮革工业介绍了生物技术在工业生产的应用情况。重点介绍了果葡糖浆的生产、干酪的生产、酸奶发酵的生产、酶法生产啤酒的工艺、单细胞蛋白的生产、酶制剂在纺织皮革上的应用, 以及生物技术在食品分析、食品保鲜的应用。

复习思考题

1. 什么是单细胞蛋白? 简述它的几种来源。
2. 食品生物技术中主要涉及哪些生物技术? 举例说明。
3. 简述生物技术在纺织工业中的主要应用。
4. 皮革生产中生物技术的应用有哪些? 举例说明。
5. 举例说明细胞工程在精细化工的应用。
6. 举例说明发酵工业在精细化工的应用。
7. 食品检测中生物技术的应用有哪些? 举例说明。



第 11 章

生物技术与环境

随着人类工业生产活动的高速发展和人口急剧增长,人类赖以生存的环境受到越来越严重的污染。工业“三废”、生活垃圾和污水的大量排放,现代农业生产过程中大量施用化肥和化学农药,超过了环境通过稀释、水解、氧化、光分解和微生物降解等作用的自然净化能力,从而导致环境遭受严重污染。环境的污染不仅破坏了自然资源,而且还危及人类健康。这一状况仅靠传统的污染防治技术和手段,已远远不能满足人类对生存环境质量的要求。生物工程与环境工程的渗透与结合,为治理环境开辟了一条新的途径,在净化环境中创造了奇迹。

11.1 概 述

11.1.1 生物技术解决环境污染的特点

环境生物技术简称 EBT,是高新技术应用于环境污染防治的一门新兴边缘学科。它起源于 20 世纪 80 年代末期的欧美经济发达的国家和地区,以高科技技术为主体,并包括对传统生物技术的强化与创新。它是开发、利用和调节生物系统,进行环境(土地、水、空气)污染的补救和环境友好产品的生产过程(包括绿色加工技术和可持续发展技术)。也可以说,是直接或间接利用完整的生物体或生物体的某些组成部分或某些机能,建立降低或消除污染物产生的生产工艺,或者能够高效净化环境以及同时生产有用物质的工程技术。

生物技术在解决环境问题过程中具有速度快、消耗低、成本低、反应条件温和以及无污染等显著优点,充分体现了它是一个纯生态过程,从根本上体现了持续发展的战略思想。随着生物技术研究的进展和对环境问题深入的认识,人们已经意识到现代生物技术的发展为从根本上解决环境问题带来了无限的希望。因此,它具有广阔的市场前景,受到各国政府、科技工作者和企业家的重视,发展极其迅速,已成为一种经济效益和环境效益俱佳、解决复杂环境污染问题的最有效手段。生物技术应用于环境保护中主要是利用微生物,部分是利用植物作为环境污染控制的生物,在水污染控制、大气污染治理、有毒有害物质的降解、环境监测、环境友好材料的合成、污染环境的修复等环境保护中的各个方面,发挥着极为重要的作用。其特点为:

(1) 生物技术处理污染物时, 最终产物都是无毒无害、稳定的物质, 如 CO_2 、 H_2O 、 N_2 、 CH_4 等, 利用生物技术处理污染物通常能一步到位, 避免了污染物的多次转移, 因此它是一种消除污染安全而彻底的方法。

(2) 环境微生物可以利用大部分的有机污染物作为底物进行反应, 产生沼气、酒精、生物蛋白质等有用的物质, 因此它是处理有机废物的首选技术。

(3) 生物反应过程是以酶促反应为基础, 具有活性的酶蛋白作为催化剂, 因此反应通常在常温、常压下进行, 与化学法相比反应条件大大简化, 因此具有投资少、费用低、效果好、过程稳定、操作简便, 并且可以和其他技术结合使用等特点。另外, 酶对底物有高度的特异性, 因此具有生物转化率高, 副产物少等特点。

(4) 用生物过程代替化学过程可以降低生产活动的污染水平, 有利于实现工艺过程生态化或无废生产, 真正实现清洁生产的目标。

(5) 生物处理技术可以利用天然水体或土壤作为污染物的处理场所, 从而大大节约处理过程的费用, 而且生物技术的产品或副产物基本上都是能够较快生物降解的。

(6) 用环境友好材料取代化学药物、化石能源、人工合成物等物质。有利于把人类活动产生的环境污染降到最低程度, 使经济发展进入可持续发展的轨道。

11.1.2 环境生物技术的内容

环境生物技术包括的内容很广, 根据技术难度和理论深度, 可分为三个部分, 或高中低三个层次。其一是现代环境生物技术, 是指以基因工程为主导的近代污染防治生物技术。例如, 用基因工程构建高效降解杀虫剂、除草剂、多环芳烃类化合物等污染物的基因工程菌, 创造抗污染型转基因植物等。这是一个高层次的、知识密集的生物技术, 寻求的是快速、高效地防治污染的新途径, 为治理环境污染开辟了广阔的前景, 使解决出现的环境难题成为可能。其二是中层次生物技术, 是指以废物的生物处理为主要内容, 包括污水处理的活性污泥法、生物膜法及其在新的理论和技术支撑下开发出来的一系列废物强化处理工艺。这是目前广泛使用的治理污染的生物技术, 具有悠久的历史, 应用性强、性能稳定, 现在依然在不断的改进, 已是当今环境生物处理的主力军, 对现时的环境质量的控制起到了极其重要的作用。其三是低层次生物技术, 主要内容包括氧化塘、人工湿地和农业生态工程及厌氧发酵等技术。其特点是以较少的资金投入, 最大限度地发挥自然界的生物环境系统的自净化及自平衡功能, 它同中层次的生物技术一样仍处在不断发展和改进之中, 应用也极为广泛。这三个层次没有重要不重要之分, 只有难易之别。在处理环境污染物时是相互联系、相辅相成的。例如, 降解有毒性污染物时, 可采用基因工程构建的高效菌; 对于厌氧发酵处理可以改进反应器以提高产品的质量; 还有些污染物可以通过低层次方法进行预处理。因此在

处理具体环境问题时,这三个层次的技术可以科学地规划、合理地配合使用,这样才会使其发挥出最大的效率。

从国内外的研究与应用现状来看,环境生物技术最有应用前景的领域是高效的废物生物处理技术、污染事故的现场补救和现场修复技术以及可降解材料的生物合成技术。我国的环境生物技术处于刚刚起步阶段,主要应用在以下几个方面:

- (1) 高效降解污染物的基因工程菌和抗污染型转基因植物的研究。
- (2) 无害化或无污染生物生产工艺技术研究。
- (3) 生物反应器和固定化技术高效处理废水的工业应用研究。
- (4) 废物资源化工工程研究。
- (5) 引入 DNA 扩增和其他生物技术的环境监测方法研究。

11.2 废水生物处理技术

11.2.1 废水水质指标与排放标准

废水包括生活污水和工业废水两大类。生活污水是人们在日常生活中产生的废水,包括厨房洗涤、沐浴、衣物洗涤等的废水。工业废水是在工业生产过程所排出的废水,其成分主要取决于生产过程中应用的原料、化学品、生产方法。根据所含的污染物的程度可分为生产废水和生产污水。生产废水是指不经处理即可排放的工业废水,也称较净废水。而生产污水是指污染较严重,需要经处理方可排放的工业废水。

1. 水质指标

水质是指水和其中所含的杂质共同表现出来的物理学、化学和生物学综合性。各项水质指标是表示水中杂质的种类、成分和数量,是判断水质的具体衡量标准。污水的污染程度的主要指标有:色泽、气味、固形物、有机物和有毒物质等。

(1) 有机物 有机物进入水体有两方面的污染:一方面是在微生物作用下进行氧化反应,使水中溶解氧量逐渐减少,当没有新的溶解氧补充时,就会腐化发出臭味,影响环境卫生;另一方面它是许多微生物的食料,可促进微生物(包括病原细菌)的生长繁殖。因此,有机物的浓度是废水的一个重要指标。

由于废水中有机物种类繁多,我们不可能通过测定废水中某一种成分的含量来了解废水的浓度。但是废水的有机污染物与氧进行氧化反应时,耗氧量是与有机物的浓度成正比的,所以通常采用生物需氧量和化学需氧量来表示有机物的含量。如果水中的有机物含有毒性,则需要分别测定这些有毒物质的数量。

生物需氧量(BOD):表示在有氧的情况下,由于微生物的活动,可降解有

机物稳定化所需的氧量。常是指在 20℃ 下, 1L 废水中的有机污染物在好氧条件下进行氧化分解时所消耗的溶解量。实际测定常采用 BOD_5 , 即水样在 20℃ 条件下, 培养 5d 的生物需氧量。

化学需氧量 (COD): 是指用强氧化剂使被测废水中有机物进行化学氧化时所消耗的氧量, 由于它能在短时间内测得, 因此指导生产较为方便。

(2) 总有机碳 (TOC) 是 21 世纪初开发的用以间接表示水中有机物含量的一个综合性指标。在 TOC 测定仪中, 当样品在 950℃ 中燃烧时, 样品中有机碳和无机碳都变成 CO_2 , 即总碳 (TC); 当样品在 150℃ 中燃烧时, 只有无机碳转化成 CO_2 , 即为无机碳 (TIC); 总有机碳 $TOC = TC - TIC$ 。

(3) 有毒和有用物质 某些废水排放出的一些污染物, 对人体和生物是有毒性作用的, 但这些物质又是有用的工业原料, 可回收利用。因此, 有毒和有用物质的含量是污水处理与利用工作中的重要指标。

(4) 固体物质 水中固体物质按其溶解性可分为溶解性固体物质和悬浮固体物质。各种水中的固体物质的含量和性质差异很大, 在废水处理中考虑采用何种方法极为重要。

总固体物质 (TS): 指单位体积的水样, 在 103~105℃ 蒸发干后, 残留物质的重量。

悬浮液固体物质 (SS) 和溶解性固体物质 (DS): 废水经过滤器后, 即可将 TS 分成两部分, 被过滤器截留的固体称为悬浮固体物质 SS, 通过过滤器进入滤液的固体称为溶解性固体物质 DS。

挥发性固体物质 (VS) 和非挥发性固体物质 (FS): 将水样中的固体物置于 55℃ 灼烧 1h, 固体中的有机物都被气化挥发, 此即为挥发性固体物质 VS; 残留的固体即为非挥发性固体物质 FS。悬浮固体和挥发性悬浮固体是表示废水强度的重要指标, 是废水处理工程设计的重要参数之一。

(5) pH pH 是废水重要污染指标之一。

(6) 微生物 某些废水中含有大量的微生物, 其中可能有对人体健康有害的病原微生物, 它是判断地面水和饮用水的重要指标之一。

以上是废水检测分析中一些主要项目, 在实际过程中应根据具体情况来决定选择哪些测定指标。

2. 国家允许的废水排放标准

为了人体的健康和人类的生存, 对污水的排放标准世界各国都根据本国情况制定了具体的要求。我国对工业废水排放的具体要求规定为: pH 为 6~9, 色度 (稀释倍数) 为 50, 悬浮物为 70mg/L, 生物需氧量 (BOD) 为 30mg/L, 化学需氧量 (COD_{Cr}) 为 100mg/L。其他指标详见中华人民共和国标准 GB 8978—1988。

11.2.2 废水的生物处理法

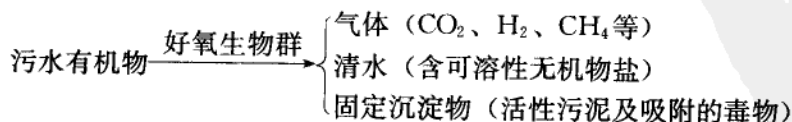
废水生物处理法是通过各类微生物的作用,使废水中溶解性和胶体有机污染物气化解降解转化为简单物质,并将有害物质转化为无毒物质,使废水得以净化的过程。废水的生物处理方法很多,可综合归纳如下:

生物 处 理 方 法	好氧处理	活性污泥法：高速活性污泥法、延时曝气法
		生物膜法：生物滤池法、生物转盘法
		稳定化池法：高速氧化塘法、通气性氧化塘法
	厌氧处理	厌氧消化池：传统消化池、高速消化池
		厌氧接触法：充填载体的厌氧接触法、投磁粉的厌氧法
		厌氧生物滤池：流化床、生物转变
	用特定生物处理法：光合性细菌、酵母、小球藻	
	营养盐类的处理：生物学脱氧、脱磷	
	应用自然净化：池沼、水路、土壤	
	利用固定化微生物或固体化酶的处理	
利用人工构建的工程菌的处理		

1. 活性污泥法

活性污泥法是污水处理最有效和最常用的生化处理法。它是利用微生物在生长繁殖过程中形成表面较大的菌胶团来大量絮凝和吸附废水中悬浮的胶体或溶解的污染物,并将这些物质同化为菌体本身的组成,或将这些物质完全氧化的过程。这种活性菌胶团或絮状泥粒的微生物群体称为活性污泥。

(1) 活性污泥法的作用原理 活性污泥法是将废水置于充分曝气供氧的条件下,与由无机物(絮凝沉淀物)和具有大量微生物(包括原生动物)的污泥相接触的过程。微生物以废水中的有机物为底物,将有机污染物无机化为 CO_2 和 H_2O 及其简单物质。此外由于活性污泥以絮体形式存在,具有较强的生物吸附作用,可以吸附废水中的悬浮物质,胶体物质、色素物质和有毒物质,因此废水经活性污泥法处理后,有机物质大为降低,悬浮物、有色物质及有毒物质也可在不同程度上去除。



活性污泥一般通过连续或间歇培养获得,并在污水处理过程中,能被不断地返回接种使用。活性污泥处理法处理废水的关键是与吸附、氧化有关的活性污泥的沉降性的优劣有关。当氧化比吸附迟缓时,则污泥轻,沉降性变劣;相反,氧

化速度过快,污泥破碎,沉降性与吸附能力也下降,这样便不能得到澄清的处理的水,因此活性污泥法处理废水首先要求活性污泥有良好的沉降性。

(2) 活性污泥中的微生物 活性污泥中的微生物几乎包括了微生物的各个类群,其中属于原核生物的有细菌(如蓝细菌)、放线菌,属于真核生物的有原生动物、多细胞的微型动物、酵母、丝状真菌以及单细胞藻类等。此外还有病毒和立克次氏体。在多数情况下,活性污泥主要是由能形成表面积较大的菌胶团的细菌和原生动物构成。

除通过微生物的氧化分解,细胞合成处理废水外,还可借助微生物群体形成的菌胶团来处理。这种菌胶团把废水包裹在内,还可以进行生物化学吸附作用。细菌若呈细胞状态,则不会简单地沉降,而通过形成菌胶团后,就易于沉降,也会与吸附物一起沉降,所以就能在较短时间内处理废水。

(3) 活性污泥处理流程 活性污泥法实质上是从废水的自净化作用原理发展起来的。不同的是,系统中分解有机成分的微生物群体是人为定向培养而成。水体中天然的溶氧根本满足不了微生物代谢的需要,因此必须设置一个鼓风曝气或机械曝气系统。这个系统被称为曝气池,曝气池中具有分解有机物能力的生物群体即为活性污泥。

活性污泥处理流程如图 11-1 所示。由曝气池、二次沉淀池曝气系统以及污泥回流系统组成,污水先通过初沉淀池,去除污水中粗大颗粒及杂质,进入曝气池并不断向曝气池供气。在曝气池中停留一段时间后,污水中的有机物或毒物被活性污泥吸附,氧化分解后流入二次沉淀池,靠自然沉降,把上清液(出水)和沉淀污泥分开,排放上清液,沉淀污泥的 20%~30% 流回曝气池中(称回流污泥) 剩余污泥由沉淀池排出经脱水、干燥后可用做肥料燃烧处理。

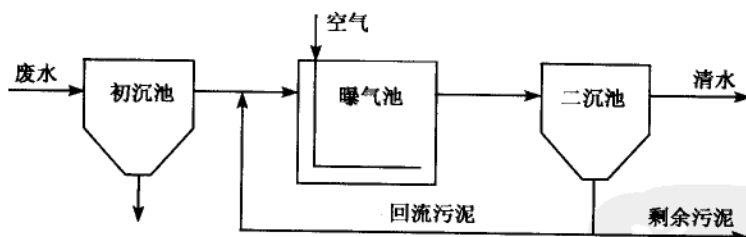


图 11-1 活性污泥法工艺流程图

活性污泥处理系统有效运行的基本条件是：①废水中含有足够的可作为微生物活动所必需的营养物质和易降解的有机物；②混合液含有足够的溶解氧；③活性污泥在池内呈悬浮状，能够充分地废水相接触；④混合液中要保持一定浓度的活性污泥，具有连续回流和及时排除剩余污泥的系统；⑤没有对微生物有毒害作用的物质。

活性污泥处理污水效率高,效果好,处理周期短,在适当条件下,BOD去除率可达80%~90%,有时高达95%以上,处理后的水,水质良好,因此此方法使用广泛。国外日处理百万吨以上的大型污水处理都是采用此方法,几乎所有城市的污水处理都采用这种方法。

2. 厌氧处理

好氧处理的进水浓度不能太高,否则由于微生物生长过于旺盛,引起氧供应不足,影响净化效率,因此,目前对高浓度污水常用厌氧发酵处理。除高浓度污水外,进一步处理活性污泥法中产生的活性污泥也常用厌氧处理技术。

(1) 厌氧生物处理过程 又称厌氧消化,是在厌氧条件下通过污泥中的多种微生物的协同作用,将有机物分解为 CH_4 和 CO_2 的过程。这种过程广泛地存在于自然界中,我国农村广泛应用的沼气就是甲烷发酵法实际应用的例子。

厌氧生物处理法的作用机制分为三个阶段,如图11-2。

其过程是:

第一阶段:称为水解、发酵阶段。复杂有机物在微生物作用下进行水解和发酵。例如,多糖先水解为单糖,再通过酵解途径进一步发酵成乙醇和脂肪酸、丙酸、丁酸和乳酸等,蛋白质则在蛋白酶作用下水解为氨基酸再经脱氨基作用产生脂肪酸和氨。

第二阶段:称为产氢、产乙酸阶段,是由一类专门细菌称为产氢、产乙酸菌,将丙酸、丁酸等脂肪酸和乙醇转化为乙酸、 H_2 、 CO_2 。

第三阶段:称为产甲烷阶段,由产甲烷菌在完全无氧的条件下,将乙酸、 H_2 、 CO_2 产生 CH_4 。这一过程由于有机酸的消耗而使pH回升,因此这一阶段也称碱性发酵。如葡萄糖的厌氧分解:

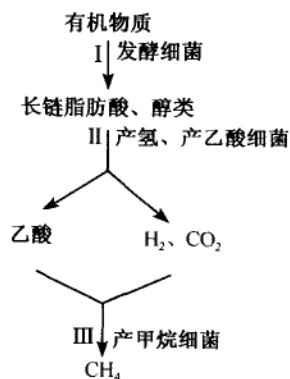
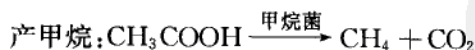
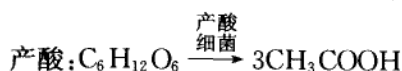


图 11-2 厌氧生物处理



与好氧生物处理相比较,厌氧生物处理的主要特征如下:①能量需求大大降低,还可产生能量。因为厌氧消化法不需要氧气,相反却能产生含有50%~70%的甲烷的沼气,可作为能源;②污泥产量极低。原因是厌氧微生物的增殖速率比好氧微生物低很多;③对温度、pH等环境因素更为敏感。厌氧细菌可分为高温菌(适温55℃左右)和中温菌(适温35℃左右),如果温度降到10℃以下,厌氧微生物的活动能力将非常低下。而好氧微生物对温度适应能力较强,在5℃以上的温度条件均能较好地发挥作用,产甲烷菌的最适pH范围也比好氧菌小;

- ④厌氧微生物可对好氧微生物所不能降解的一些有机物进行降解（或部分降解）；
⑤处理后废水有机物浓度高于好氧处理；⑥处理过程的反应较复杂。

(2) 厌氧处理主要微生物类群 污水厌氧处理的微生物类群，无论从种类和数量上都不如好氧处理的微生物类群多。在厌氧处理中微生物类群主要是细菌，分为两大类，即兼性厌氧菌和专性厌氧菌。在厌氧处理中发酵一开始可能有好氧细菌存在，当氧气用完后很快会死亡。随后兼性好氧菌又活跃起来，由于这些兼性好氧菌的活动，造成挥发酸的积累，同时处理装置中的氧化还原电位降低，专性厌氧菌开始活跃，它们利用兼性好氧菌的分解产物乙酸、甲酸、乙醇、甲醇等合成甲烷和 CO_2 。

(3) 厌氧处理的工艺流程 厌氧处理的一般流程如图 11-3，污水在废水贮池中沉淀大量悬浮物并连续进入甲烷发酵池，甲烷发酵池是密闭的钢筋混凝土结构，此装置最好有 $1/3 \sim 1/2$ 部分埋在地下，这样可以起到保温作用（高温型产甲烷菌的最适温度为 $53 \sim 54^\circ\text{C}$ ，中温型为 $36 \sim 38^\circ\text{C}$ ）。处理过程中生成的甲烷气体收集于贮气罐中，它可用做甲烷发酵池加温或家用能源，过剩污泥脱水、干燥后可作为饲料、肥料。

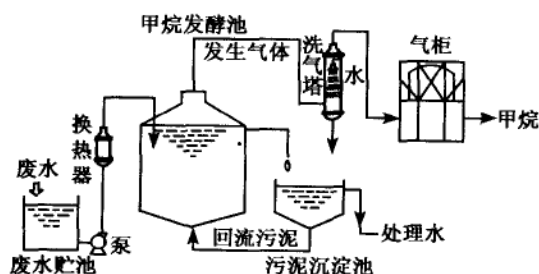


图 11-3 厌氧生化法废水处理流程

厌氧处理法的优点是：①可处理高浓度生活污水，BOD 去除率可达 $80\% \sim 90\%$ ；②处理过程中产生的可燃性气体（甲烷含量为 $69\% \sim 70\%$ ）可作为能源被利用；③产生的剩余污泥量少；④由于该过程厌氧，不存在受氧传递速率制约的问题，因而控制上更加方便。本方法的缺点是反应速度慢，需较大的反应容积。

3. 氮、磷去除技术

氮、磷是造成水体富营养化的主要营养元素，去除氮、磷是污水处理的重要目标。

(1) 生物脱氮 参与生物脱氮过程的细菌主要有三个类群：氨化细菌，进行有机氮化合物的脱氨基作用生成 NH_3 ；亚硝化和硝化细菌，将 NH_3 转化为 NO_2^- 和 NO_3^- ；反硝化细菌将 NO_2^- 、 NO_3^- 转化为 N_2 和 N_2O 。硝化过程的程度往往是生物脱氮的关键，是生物脱氮必需的步骤。

生物脱氮的代表工艺流程是厌氧-好氧, 简称 A/O 系统。A/O 系统是采取内部污水和污泥循环, 能够脱氮除磷同时具有去除 BOD 作用的污水处理新方法 (图 11-4), 污水流经系统的厌氧池、好氧池和沉淀池, 并将好氧池的混合液和沉淀池的污泥同时回流至厌氧池。废水中的含氮化合物可在厌氧池、好氧池中发生氧化作用, 在好氧池中进行反硝化作用, 氧化物被转化成为 N_2 和 N_2O , 从而挥发到空气中, 达到脱氮的目的, 这种方法具有流程简单, 不用外加碳源和后曝气池特点, 基建费和运行费均较低。

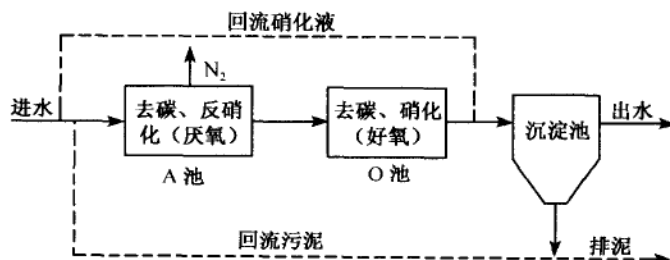


图 11-4 A/O 法工艺流程示意图

(2) 生物脱磷 长期以来除磷大多采用化学方法, 不但费用昂贵, 而且化学处理沉降后的污泥量很大, 难以处理, 根据微生物代谢磷的生理生化特点。可利用微生物处理法除磷。

脱磷细菌主要有不动杆菌属、气生单胞菌属、假单胞菌属的细菌。生物脱磷的代表性工艺流程是厌氧-好氧, 简称 An/O 系统。污泥中的细菌在厌氧条件下吸收低分子的有机物, 同时将细胞质中聚合磷酸盐异染粒的磷释放出来, 取得必要的能量, 此时磷主要存在于上清液中。在随后的好氧条件下, 所吸收的有机物被氧化并提供能量, 同时从废水中吸收超过其生长所需的磷, 并以聚磷酸盐的形式贮存起来, 即水中磷富集于活性污泥中, 通过聚磷, 剩余活性污泥和含磷上清液排降使磷脱离处理系统, 达到生物除磷的目的 (图 11-5)。生物法除磷工艺流程简单、操作方便、不需投药、运行费和建设费少。缺点为除磷效率低, 去除率为 75% 左右, 当污水中磷含量过高时, 难以达到排放要求。

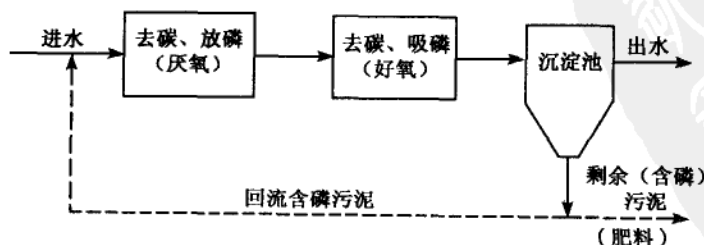


图 11-5 An/O 法工艺流程示意图

11.3 污染场地的生物修复

生物修复,也称生物补救,被认为是现代环境生物工程的核心内容。是20世纪80年代以来出现和发展的清除和治理环境污染的生物工程技术。进入21世纪,人们对固体废物堆积场地、污水处理厂、油库以及海洋运输油轮的泄漏现场日益关注。据预测有70%~80%的填埋场对土壤产生污染,有些地区有害化学物质已经开始污染地下水,基于这一现状,科学家们开始努力寻找解决途径,通过使用,微生物学、分子生态学、化学和环境工程学的现代手段来寻找途径来降低环境的污染。而依据微生物的生物降解活性,增强自然界中固有的但速度缓慢的生物降解过程,通过某种反应器使得化合物与微生物接触并促使其迅速转化的技术发展很快,逐渐形成了污染场地的生物修复新领域,且出现了许多新的技术。但就利用微生物分解化合物这一过程而言,生物修复不是新概念也不是新技术。应用生物分解过程处理工业废水或生活污水已有几十年的历史。但许多化合物不易被降解的原因可能主要是缺少降解性微生物群落,而不是反应体系运行不当。通过运用生物修复技术,可以把土壤、地下水和海洋中的有毒有害废物降解为 CO_2 和 H_2O 或转变成无害物质。

生物修复的目的是将有机污染物的浓度降低到低于检测限度或低于环保部门规定的浓度,这项技术正被用于消除土壤、地下水、污泥、工业废水及气体中的污染物,这些污染物包括石化产品、多环芳烃、卤代烷烃、卤代芳烃等,金属虽不能被生物降解,但生物修复可以通过微生物将其转移或降低其毒性。

生物修复比较被大家共同接受的基本概念为:生物特别是微生物催化降解有机污染物,从而修复被污染环境或消除环境中的污染物的一个受控或自发进行的过程。这一技术作为一项潜在的高效、低成本的清除技术正日益受到各国的重视。

11.3.1 生物修复的工程方法

(1) 生物修复的分类 生物修复的方法有很多,大致可分为两类,一类为原位生物修复,即不须将土壤挖走或将地下水抽至地面上处理,其优点为费用较低但较难严格控制。另一类为异位生物修复,即需要将污染物质通过某种途径从污染现场运走,这种方法可能会增加运输费用,但便于对修复过程进行控制。

(2) 生物修复的优点 与化学、物理方法相比,生物修复具有以下优点:①费用低,仅为传统物理修复的30%~50%;②对环境影响很小,不会产生二次污染;③能尽可能降低污染的浓度;④修复时间短;⑤就原位生物修复而言就地处理,操作简便;⑥人类直接暴露在污染物下的机会减少。

(3) 修复的前提条件 在生物修复的实际应用前必须认真考虑以下几项条件：①必须要有代谢活性的微生物存在；②这些微生物在降解化合物时必须能达到最大的速率，并且能够将化合物浓度降低到符合环保标准；③这些微生物在修复过程中所生成的物质必须是无毒无害；④污染场地必须不含对降解菌种有抑制作用的物质；⑤需要降解的化合物能够被微生物所利用；⑥污染场地或生物反应器的条件必须有利于微生物生长或保持活性；⑦技术费用应尽可能低。以上各项前提条件都十分重要，达不到其中任何一项都会使生物降解无法进行，从而达不到生物修复的目的。

(4) 生物修复的基本措施 为了达到污染场地生物修复的目的，在处理过程中必须采取一些相应措施：①污染区域中需要大量的微生物并形成生长优势才能促进生物降解，因此，在处理时要接种微生物；②在反应过程需要适当添加营养物，土壤（或地下水、海水）中微生物的活性常受许多因素的限制，其中之一就是营养盐（N、P），为了彻底降解污染物并达到更快的净化速度，添加营养比接种微生物显得更为重要；③提供电子受体，生物氧化还原反应中有许多最终电子受体：溶解氧（DO）、被分解有机物的中间产物和无机酸根（如 NO_3^- 、 SO_3^{2-} ）它们的种类和浓度对生物降解的速度和程度有极大的影响。④提供共代谢以诱导共代谢酶的产生。共代谢（共氧化）是指生产底物和非生长底物共酶，生长底物是能够被微生物作唯一碳源和能源的物质。共酶是指一些污染物（非生长底物）不能用做微生物唯一碳源和能源，而只能在生长底物（如 CH_4 ）被利用时通过微生物产生的酶被转化为不完全氧化的产物，而这些不完全氧化产物能被其他微生物利用并彻底降解。因此，提供共代谢底物（如 CH_4 ）促使微生物产生酶将有利于难降解污染物的去除；⑤添加表面活性剂，研究表明特定的表面活性剂，特别是一些非离子的乙醇乙酸酯，在低浓度时也能刺激土壤中吸附的烃类的生物降解，即使是在从土壤解析的少量化合物中加入表面活性剂也具有促进降解的作用。

11.3.2 地下水污染的生物修复

地下水的污染主要来源于地下贮油泄漏、农牧的氮肥及家畜粪便的地下渗透。由于泄漏的汽油中常含有苯、甲苯、乙苯和二甲基等有毒的烃类化合物，并能够以持续不断的方式释放到水中造成水的污染，农用的氮肥粪便在渗透过程形成硝酸盐而使地下水污染。为了解决这一问题，可采用现场生物修复的方法来处理。生物修复处理地下水主要是依赖土著微生物群落来降解石油烃类和硝酸盐类污染分子，为达到生物修复的目的，在此过程中需要做好如下技术要点：①为使生物修复取得成功，首先要收集区域水文地质等资料，为修复提供可靠的数据；②在处理的地下蓄水层中，要添加适量营养盐，如 N、P；③为达到快速生物降

解,要保持水中有足够的溶解氧的存在来维持好氧微生物活性;④可采用其他方法的辅助作用来提高生物补救的实际应用意义。

11.3.3 土壤污染的生物修复

土壤中除遭受重金属的污染外,更多的是来自有毒有机废物的污染,这些污染物包括农药、石油及其产品、垃圾渗透水、固体废弃物及其溶解液体等。处理这些问题,专家们普遍认为微生物工程在这方面具有不可估量的应用价值。土壤的微生物具有很宽的代谢活性,因此消除污染物的一个简单方法就是将污染物或含有这些污染物的物质加入到土壤中去,依靠土壤中的土著微生物群落降解,从而实现无害化。在这种处理过程中,应考虑如下几个条件:①考虑碳源和营养盐存在量的问题,一般而言,污染物中碳源已比较充足,但 N、P 或其他无机营养盐可能比较缺乏,因此必须添加;②采用相应的措施增加土壤中的含氧量,如翻动土壤等方法;③必须添加一定量的水分,保持适宜的湿度以利于微生物迅速转化。④要选择一个相对适宜的温度范围。

11.4 生物降解塑料的生产与应用

11.4.1 可降解塑料概述

自化学合成塑料工业发展以来,无论是工业、农业、建筑业,还是人们的日常生活无不与塑料密切相关。但是随着人们环保意识的增强,以及在使用过程中暴露出其在自然环境中很难分解,亦不会被腐蚀,燃烧处理又会产生有害气体,而且还具有污染范围广、污染物增长量快、回收利用难、生态环境危害大等缺点。于是科学家们将目光投向了可降解塑料的研究与开发之中。可降解塑料是塑料家族中带降解功能的一类新材料,它在使用前或使用过程中,与同类普通塑料具有相当或相近的应用性和卫生性能,而在完成其使用功能后,能在自然环境条件下,较快地降解成为易于被环境消化为碎片或碎末,并随着时间的推移进一步降解成为 CO_2 和 H_2O 最终回归自然。可降解塑料始于 20 世纪 70 年代末,目前它的主要生产国有美国、日本、德国、意大利、加拿大、中国等。我国研究开发的可降解塑料品种有光降解、光/生物降解、光/氧/生物降解(环境降解)、光/碳酸钙降解、完全生物降解等品种的环境友好材料。其中光/生物降解、可环境降解塑料地膜是“九五”重点科技攻关项目。国外也出现了多种生物可降解塑料,具体如图 11-6。与传统的化学合成高分子材料相比,采用生物特别是微生物合成的高聚物具有:①工艺操作方法简单;②合成几乎没有环境污染;③合成的高分子材料具有生物可降解性和生物相容性,且是完全彻底的;④可进行高分子材

料的调控等特点。

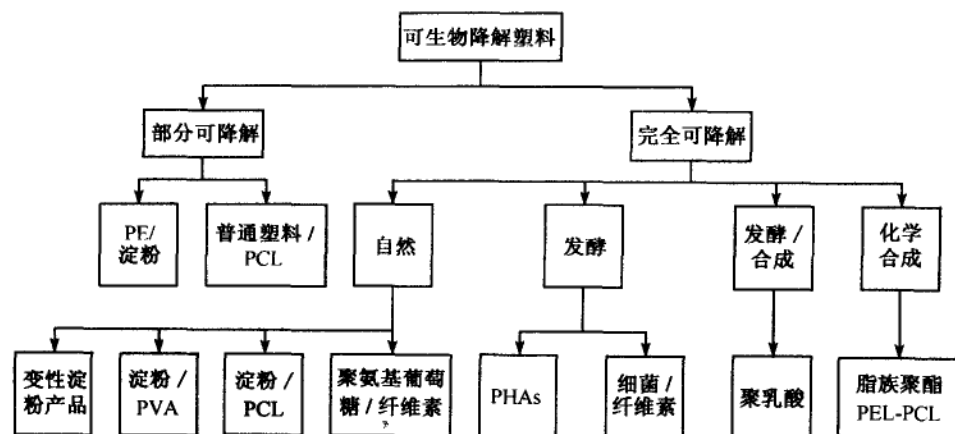


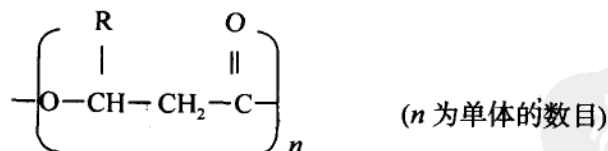
图 11-6 各种生物可降解塑料

11.4.2 聚 β -羟基烷酸的生物合成和应用

1. PHAs 的结构、物理化学性质和应用

在众多的生物可降解材料中,采用微生物发酵法生产的聚 β -羟基烷酸(简称 PHAs),是应用环境生物学方面的一个研究热点。其中聚 β -羟基丁酸(简称 PHB)及 3-羟基丁酸(3-HB)与 3-羟基戊酸(3-HV)的共聚物(简称 PHBV)是 PHAs 家族中研究和应用最广泛的两种多聚体。

PHAs 是微生物在一定条件下胞内积累作为碳源和能源的贮存物。由于它具有溶解性和高分子质量,在胞内的积累不会引起渗透压的增加,因而是一类理想的胞内贮存物,比糖原、多聚磷酸或脂肪更加普遍地存在于微生物中。其通式为:



式中 R 多为不同链长正烷基,也可以是支链的、不饱和的或带取代基的烷基。这些多聚物化学性质与单体的组成有很大关系。它们具有同高分子化合物基本相同特性如质轻、弹性、可塑性、耐磨性、抗射线等,同时还具有生物可降解性和生物相容性。这是许多化学合成塑料所不具备的,因此这类热塑性聚酯能纺丝、压膜或注塑,在工业上可作各类包装材料等,在医药方面由于其生物相容性可作外科缝线、骨骼代用品或骨板,术后无须取出。除作为塑料外还用于化学合成光

学活性物质和手性前体，特别是合成药物和昆虫信息素（表 11-1）。

表 11-1 PHAs 的应用

医药上的应用	工业上的应用
外科缝线、肘钉等	长效除莠剂、抗真菌剂、杀虫剂或肥料等的生物降解载体
伤口敷料	容器、瓶、袋、薄膜等包装材料
血管替代品	妇女卫生用品、尿布等可任意处理的前体原料
骨骼替代品和骨板（由于压电效应能促进骨骼生长）	
长效药物的生物降解载体	

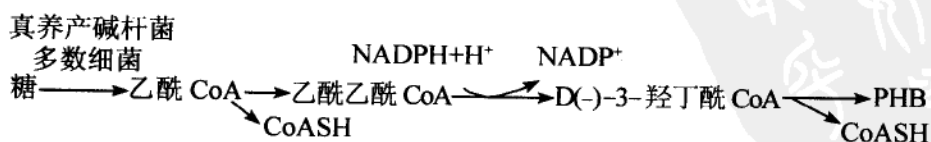
PHAs 类物质在工业化应用中存在两个缺点：一个是 PHB 的熔化稳定性较差，其分解温度为 200℃，而其熔点温度 175℃；另一个是在环境条件下贮存数日后，PHB 易发脆。

2. PHAs 的生物合成

(1) 合成 PHAs 的主要微生物 能产生 PHAs 的微生物分布极广，包括光能自养菌、化能自养菌及异养菌近 300 种微生物。研究较多的用于合成 PHAs 的微生物有：产碱杆菌属、假单胞菌属、甲基营养菌、固氮菌属和红螺菌属等，它们能分别利用不同的碳源产生不同的 PHA。如真养产碱杆菌野生株 H16 利用果糖积累 PHB；食油假单胞菌从中链烃、醇及酸合成具有与基质链长有关的 HA 单位的 PHAs。

(2) PHAs 的代谢途径与调控 研究表明，PHAs 的产生是微生物在碳源过量而其他某种营养成分，如氮、磷、镁或氧不足时，在胞内大量积累，以作为碳源和能源的贮存物或作为胞内还原性物质的一种贮备。当限制性营养物再次被提供时，PHAs 能被胞内酶降解后作为碳源和能源利用。另外，PHAs 除在饥饿条件下作为微生物碳源和能源外，还为微生物在其他环境压力条件（如渗透压、脱水或紫外线照射）下的生存起着重要的作用，一般来说，在恶劣环境下含有 PHAs 的细胞比不含 PHAs 的细胞具有更高的存活性。不同的微生物合成 PHAs 的途径不同，基质不同其合成途径也有差异。

例：真养产碱杆菌及多数细菌以糖合成 PHB：



3. PHAs 的生产

(1) PHAs 的发酵 在 PHAs 的生产中，通常采用的发酵方式有分批发酵

法和流加发酵法。采用的生产菌为自养产碱杆菌。由于自养产碱杆菌只有在某些营养成分氮、磷或氧缺乏而碳源过量的不平衡生长条件下,才能大量积累 PHAs,因而在 PHAs 的发酵生产中一般可将发酵过程分成两个阶段来进行控制,第一阶段为菌体细胞的形成阶段,在此阶段微生物利用基质形成大量菌体,而多聚体 PHAsR 积累很少;第二阶段多聚体形成阶段,当培养基中某种营养耗尽时,细胞进入 PHAs 形成阶段,在此阶段 PHAs 大量形成,而菌种细胞基本上不繁殖。用分批生产由于培养基中营养物质初始浓度的限制,当菌体生长进行到一定浓度时,培养基中的一种或几种营养物质的浓度可能成为菌体细胞进一步繁殖的限制因子,而简单地增加该种营养物质的初始浓度不可能导致菌体生长量的相应增加,因此采用分批发酵法不可能获得很高的细胞干重以及高的产物浓度和生产强度。而采用流加发酵法进行 PHAs 的生产时,就可以在某些必需的营养成分为生长限制因素之前,对其进行定量流加,延长细胞的对数生长期,从而可获得较高的菌体浓度。

(2) PHAs 的提取技术 PHAs 是以颗粒状态存在于细胞中,因此要对细胞进行分离提取才能获得产品。PHAs 的提取技术主要涉及两个问题,一是方法的合理性,主要表现在提取率、产物的纯度、环境污染程度等,二是过程的经济性。表现在提取所用材料费用、能量消耗以及设备投资等。目前对 PHAs 的提取方法的研究主要从以降低提取成本为主要目标。国内外提取 PHAs 的方法主要有:①有机溶剂法,其基本原理是利用有机溶剂能改变细胞壁和膜的通透性,使 PHB 溶解到溶剂中,而非 PHB 的细胞物质不能溶解,从而将 PHB 与其他物质分离开来。常用的有机溶剂有:氯仿、二氯乙烷、1,1,2-三氯乙烷、乙酸酐、碳酸乙烯酯及碳酸丙烯酯等,该方法提取的 PHB 时,溶液变得很黏,要去掉细胞的残余物就很困难,提取率不能达到很高;使用大量的有机溶剂必然造成巨大的原料消耗;使用有毒、易挥发溶剂,易造成环境严重的污染。因此此方法一般在实验室采用。②次氯酸钠法,该法是因为次氯酸钠能够破胞且对细胞中非 PHB 的细胞物质的消化很有效,因此用该方法破胞所得产品的纯度很高,提取速度快,避免了有机溶剂提取过程中烦琐的前、后处理工作。该法最大的优点是不使用大量的有机溶剂,但由于次氯酸钠对 PHB 分子有严重的降解作用,因而获得的 PHB 相对分子质量小,解决这个问题的有效的方法是利用氯仿对破胞产生的 PHB 起保护作用的性质,采取次氯酸钠/氯仿提取 PHB 的方法,这样所获得的产品比单独使用氯仿的提取率高,比单独使用次氯酸钠得到相对分子质量大。③酶法,是通过多种酶的作用将大量的非 PHB 的细胞物质溶解而 PHB 的纯度不高,操作比较复杂,应用上受到很大的限制。④其他方法,近年来随着提取技术的发展,产生了一些有利于 PHAs 的提取方法,如表面活性剂/次氯酸钠法、氨水等方法。总之目前迫切需要解决的问题是在保证 PHB 质量的同时尽快

降低 PHB 的提取成本。

4. PHAs 的工业化和研究进展

(1) 影响 PHAs 工业化的因素 目前 PHAs 的工业化规模生产进展不是很快,主要原因是在质量上和价格上存在一些问题。虽然经过许多研究者的不断努力与探索,PHB 的价格已下降至 5.58 美元/kg 左右,但聚丙烯的价格为 1 美元/kg,相比之下,高出许多,因此缺乏相应的市场竞争能力。因而要进一步降低 PHAs 的生产成本,还必须进一步完善工艺,在菌种、发酵方式、提取方法等方面进行不懈的努力,才可能尽快地实现 PHAs 的大规模工业化生产。具体的影响因素如表 11-2。

表 11-2 影响 PHB 成本和质量的主要因素

因子	降低成本因素	提高质量因素
菌种	利用廉价基质	聚合相对分子质量大 相对分子质量分布窄 共聚物中的 HV 组分高 多种聚合物合成
	胞内聚合物含量高	
	生长速度快	
	易于培养	
	改造菌种特性以便于提取	
工艺	高生产强度、高转化率和高胞内含量	在提取过程中使聚合物的相对分子质量 降低小、纯度高
	提高反应器中传氧性能、降低能耗	
	有利于产物提取的工艺条件优化	
提取	非有机溶剂提取	
	操作得率高,提取剂可回用	
	操作简单,提取步骤少	
	易于工业化	
	环境污染小	
性能改进	投资少	进行侧链修饰,增大相对分子质量采用 淬火工艺解决脆性大和易老化的问题
	与其他可降解材料共混	

(2) 国内外研究 PHAs 的水平 可降解塑料无论从地球环境保护的角度,或从开发再生资源的角度,还是从合成功能性高分子和医用生物高分子的高科技产品的角度来看都具有重要意义,其前景十分看好。因此,它已成为目前研究开发的热点,纵观国内外文献的报道,其研究的内容主要集中在如下几个方面:①微生物菌种的改良,包括采用分子生物学手段,有目的提高菌种对多种原料的利用能力和转化率,改变细胞特性利于提取;②发酵生产技术的研究,如采用流加发酵控制技术、高密度细胞培养技术的研究;③新型反应器的研制,如研究出一些传氧效率高、低能耗的新型反应器和改进已有的反应器;④开发出新的提取

工艺, 这个方面的工作主要从降低成本或采用非有机溶剂角度进行研究, 开发出一些新的提取方法。

(3) 研究的进展 21 世纪初, 世界各国政府和企业对 PHAs 的研究和开发工作十分重视, 以寻求生产 PHAs 新方法和开发新的应用领域, 增加市场的商业竞争能力。从所报道的资料来看, PHAs 的研究进展主要包括以下几个方面: ①改性: 通过把 PHAs 和其他共聚物共混, 可以改善其物理和化学性质, 从而改善 PHB (或 PHBV) 的加工和使用性能; ②共聚: 以 HB 单体为主要成分, 使它含有一些少量中长链 HA 单位的共聚 PHAs, 这样可使其熔点及玻璃化温度下降不多的同时, 其韧度和弹性有很大的提高; ③官能化: 如果在 PHAs 的纯碳链结构中引入不饱和键或一些官能团, 这样不仅可以获得某些新性质, 而且还可能提高 PHAs 化学性质, 以改进 PHAs 的性能并扩大其应用范围; ④对 PHAs 结构设计, 通过改变培养条件如采用不同碳源的种类或比例、氧的浓度等, 可以获得不同单体单元结构和组成的 PHAs; ⑤开发 PHAs 产生的新原料, 主要是采用如有机废水和食品废物这样的廉价底物; ⑥构建自溶性 PHAs 产生菌种, 以解决简化胞内产物 PHAs 的提取过程, 从而降低提取成本。

本章小结

本章围绕生物技术在环境工程应用方面, 阐明了环境生物技术的特性、作用原理、研究的内容及热点、进展, 主要内容如下:

(1) 生物技术在废水处理上的应用, 活性污泥法和厌氧处理法的基本原理, 与处理有关的微生物及处理的工艺流程。

(2) 污染场地生物修复的作用、方法和技术要点, 地下水污染及土壤污染的生物修复。

(3) 以 PHAs 产品的生产为例, 介绍了可降解塑料的一些基本知识, 代谢途径和发酵方法, 同时也介绍了国内外可降解塑料的研究方向和最新动态, 从而说明环境友好材料的开发将是生物技术在环境工程中最具有前景的一个领域。

复习思考题

1. 可降解塑料的定义, 有何特点?
2. PHAs 为何种物质? 说明它的化学名称及物理、化学性质, 并写出其结构。
3. 简述 PHAs 的生物合成过程及在工业上的应用。
4. 生物技术在废水处理中的作用有哪些? 请举例说明。
5. 污染场地的生物修复的意思是什么? 地下水污染修复的技术要点有哪些?
6. 说明环境生物技术的含义, 谈谈你对生物技术在环境保护的认识。

生物技术与能源

能源是人类赖以生存的物质基础之一，是地球演化及万物进化的动力，它与社会经济的发展和人类的进步及生存息息相关。能源分为不可再生能源和可再生能源。可再生能源因为它是植物对太阳能的捕捉，是取之不尽、用之不竭的，因而它是生物工程主要研究对象之一。本章主要介绍用生物技术制造乙醇、沼气、氢气的技术及在石油开采方面的应用。

12.1 微生物技术与石油的开采

微生物采油是 20 世纪 50 年代以来发展起来的一项新的提高油田采收率的技术。大量的试验表明，有很多种细菌能把石油当成营养而吃下去，并合成各种各样的代谢产物。这种产物可以是甲烷、氢、二氧化碳、硫化氢等气体，也可以是甲酸、乙酸等，还可以是醇、酸、酮等有机溶剂，以及蛋白质等高分子化合物和类脂体等表面活性物质。这些气体和各种物质，有助于提高油层压力，使石油体积膨胀，黏度降低，有机溶剂可以和石油互溶，降低石油的黏度，提高流动性；还可以提高水的黏度，堵塞高渗透孔道；而表面活性物质在油层中可以把油、水两种本来不互溶的液体，互相溶解乳化，同洗涤剂一样能把黏附在岩石表面的油洗下来。细菌这种微生物有助于提高油田采收率，是油田进行三次采油的有效方法。那么，怎样用细菌采油，它的作用是什么呢？

12.1.1 应用微生物采油的试验研究工作

要把微生物注入到油层中去，作为提高油田采收率的介质，有许多实际问题需要解决。因为油层有较高的温度和压力，是一个缺氧的环境；而且，地层水的矿化度一般都比较高，不利于微生物生长。为此，必须进行大量的试验，筛选在油层环境中能生存、繁殖，并能迅速、大量产生有用的代谢产物的微生物。根据国内外专家们的研究，在地层条件下，对于大多数微生物的生存来说，确实是不利的。于是提出了向井中注入低浓度的盐水，以降低地下水的矿化度，然后向井内注入各种养分，为进入地层的微生物创造一个生存的条件。目前，很多试验都已采用这种复杂分段的注入方法，初步见到一些效果。

要让微生物驱动地下的残余原油，还必须把它注入并传输到油层的深处，与

原油接触,才能起作用。因此,怎样使微生物在地下传输,是应用这项技术的关键。

油藏是一种孔隙介质,一般砂岩的空隙直径以微米为单位计量,而微生物个体大小也是微米级的,这两者在几何尺寸上相差并不很悬殊。而且微生物进入油层后还要增殖,体积增大很多倍。

美国南加州大学对微生物在油层状态下通过孔隙介质传输的现象做了很多研究。研究人员将微生物注入各种砂岩岩心中。发现微生物被强烈地吸附在砂岩表面上,分析其原因,可能是微生物和砂岩表面带相反的电荷。他们认为要把这样的微生物传输到地层深处,首先应该研究出一种“携菌液”,它能大大减少微生物在砂岩表面的吸附,否则,将无法实现微生物采油。

不过,也有些研究人员进行了微生物通过岩心的试验,当岩心渗透率大于 100 毫达西(相当于法定计量单位 $0.0987\mu\text{m}^2$) 时,孔隙直径为 $3\mu\text{m}$ 左右,这样微生物就可以进入到岩心的大部分孔隙中去。

通过研究,科学家认为,地层中本来就有一些厌氧性微生物,它们会制造甲烷和其他气体。但地层水的高矿化度却抑制了它们大量地增殖,甲烷的生长速度很慢。研究人员发现,地层水一旦被淡化,或者在注入的淡水与地层盐水接触的区域,微生物的活动大大激化,产生甲烷的速度明显地增加。还有其他一些使地层中微生物活动激化的方法。总之,这些都可以发展成为微生物采油的一种新的技术。

12.1.2 微生物的作用

1. 堵塞高渗透水层

由于油层的非均质性,注入水往往沿着高渗透带单层突进,降低了水驱采收率。一些研究人员试验把含有某些杆菌的单体注入渗透性不同的两块平行的岩心中,发现微生物较多地进入高渗透岩心,而使此岩心渗透率以较大的百分比下降。这表明有可能用微生物作选择性堵水材料。

有的研究人员筛选出 11 种产生大量黏液(即生物聚合物)的菌种。用人造岩心在室内试验表明,它们可以有效地封堵高渗透层。但是,这种黏液微生物总是堵在岩心表面,形成滤饼,难以注进地层中去。于是研究人员首先将一种能在岩心中生存,并抑制产生黏液的微生物注入地层中,再选择一种可诱导并激化产生黏液的微生物注入,这样就可以堵住该处的水窜层位。

2. 降低原油黏度

常规石油抽取技术,只能回收大约 50% 的地下石油储藏。这些开采后的剩

余石油不是附着在岩石中就是对抽取来说太黏稠。经研究发现,某些微生物的代谢物质可以促进稠油与水乳化,从而提高石油的回收率。例如,用一种混合菌种使原油在空气存在下发酵,制成一种生物活性剂,它可以使稠油与水乳化,乳化液的黏度只有稠油的5%。而且,乳化液具有对刚或玻璃不黏附的良好性质,这使石油非常容易用泵进行输送。

有人曾把一种标号为H-13的菌种加到含有培养基的委内瑞拉蒙拿格斯稠油中,在空气下培养了7d,研究者发现,由于乳化水和代谢产物进入油相,油相体积增大了1.5倍,而黏度下降了将近10倍。

研究人员认为,目前阶段在技术上还做不到让微生物在稠油油层中传播,而使稠油在地层中乳化。但是当稠油从井中采出,进入贮罐和管线后,就可以用微生物将其乳化,这会使输送稠油容易得多。还有人设想用微生物清除油罐、管线,甚至井底的死油和淤积物。

12.1.3 微生物在油井中的应用

目前科研人员正在分离各种不同的微生物并检测出它们对石油抽取有用的各种特性。微生物产生的气体(主要是二氧化碳)能有助于油井的再增压。理想的微生物只需使用较少的一部分石油作为碳源,就能产生表面活性剂或乳化剂,从而降低石油的黏性使其能被抽取至地表。目前还没有发现这类微生物。

而正在被研究的微生物,只是在中等的温度、盐浓度以及压力的条件下幸存的微生物。由于地质矿床中存在着广泛的变化条件,就像这些微生物所表明的那样,是微生物无法生存的环境。事实上,能从深层的地下贮油仓中分离出微生物,已能发展出特化的代谢机制,从而能应付数量很有限的氧气。科学家们此外还分离出了其他一些微生物,在这些微生物的生长过程中,它们并不需要氧气。

12.1.4 未来的研究重点

新的生物技术在环境中的应用正处于初步阶段,这主要是人们缺乏关于有潜在用途微生物的遗传学和生物化学的知识,以及缺乏关于使这些生物起作用的环境的知识,而只是用了并不反映此领域真实情况的纯培养进行了最基本的研究。由于要有大规模的应用、生产。因此,用微生物提高石油回收的特定的挑战研究包括:

(1) 对已经存在于石油回收中的微生物进行更好的生物化学的生理学的了解;

(2) 开发只降解很少一部分有用的石油成分的微生物;

(3) 筛选产生表面活性剂以及增黏剂的微生物。

总之,从20世纪50年代以来,利用微生物采油已做过了许多试验,有些已

见成效。利用微生物进行采油是一项新的科学技术。它包含着丰富的科学知识,从世界各国油田开展的试验来看,利用微生物采油,前景是很好的。一是物质来源广阔,二是成本较低,所以,当前许多国家正在加强这方面的研究。

12.2 乙醇的生产

乙醇,俗称酒精,它是以玉米、小麦、薯类、糖蜜等为原料,经发酵、蒸馏而制成的产品。

在20世纪,科学家利用石油作为主要能源,以石油化学品为原料,为人类社会的发展做出了巨大的贡献。但随之也出现了二个严重的问题:一是石油为不可再生的资源,由于大量开采,消耗过快,已面临枯竭(根据权威机构估计,21世纪中期,石油资源的供应将达到顶峰,然后将迅速下降);二是用石油作为燃料及化学品原料引起了环境的严重破坏,特别是 CO_2 的温室效应。

以发酵法生产的乙醇,具有和矿物燃料相似的燃烧性能,但其生产原料为生物源,是一种可再生的能源。此外,乙醇燃烧过程所排放的一氧化碳和含硫气体均低于汽油燃烧,所产生的二氧化碳和作为原料的生物源生长所消耗的二氧化碳的数量上基本持平,这对减少大气的污染及抑制“温室效应”意义重大,燃料乙醇也因此被称为“清洁燃料”。

车用乙醇汽油是在汽油中加入一定比例的乙醇形成的一种新型混合燃料(国际上称汽油醇,商品名GASOHOL)。这项技术在国外已十分成熟。目前国外使用车用乙醇汽油的国家主要是美国和巴西,欧共体自20世纪90年代初也开始生产使用车用乙醇汽油。在这种燃料中,乙醇既是一种能源,又是一种良好的汽油增氧剂和高辛烷值调和组分,用以代替四乙基铅和甲基叔丁基醚(MTBE)或乙基叔丁基醚(ETBE)。用乙醇作增氧剂,可显著降低汽车尾气中的有害物质,起到净化空气的功效。同时,用植物资源制造的乙醇,是一种生物转化的太阳能,是一种用之不竭的可再生资源。这样,在汽油中加入一定比例的乙醇作燃料,就能收到节约石油、净化空气和转化过剩的农产品以及充分利用农林废弃物等一举多得之效,可为人类社会的可持续发展提供了一条简单有效的途径。

12.2.1 乙醇的性质

乙醇是一种无色透明,并具有特殊芳香味和强烈味的液体,纯酒精的相对密度是0.7891(20℃/4℃),常压下的沸点为78.32℃。乙醇能与水以任何比例混合,并产生热量,且总体积缩水。它极易挥发和易燃烧,在燃烧时发出淡蓝色的火焰,变成二氧化碳和水,同时放出大量热能(发热量为29 726 kJ/kg)。与石油、煤炭为代表的传统能源相比,乙醇具有燃烧值高、可再生、不产生温室气体

等优点,因此它是一种比较理想的清洁能源。

12.2.2 乙醇的工业生产方式

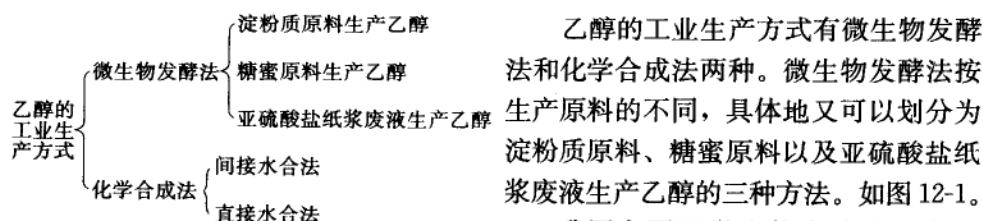


图 12-1 乙醇的工业生产方式

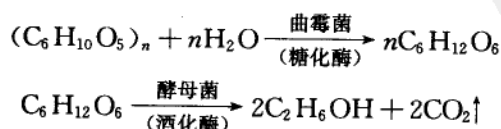
乙醇的工业生产方式有微生物发酵法和化学合成法两种。微生物发酵法按生产原料的不同,具体地又可以划分为淀粉质原料、糖蜜原料以及亚硫酸盐纸浆废液生产乙醇的三种方法。如图 12-1。我国主要以微生物发酵法生产乙醇。已有悠久的历史,在生产技术上比较成熟,但随着石油化工的迅速发展,利用石油裂解产生的乙烯或天然气化学合成生产乙醇的产量在国内、国外也都占有一定的比例。化学合成法主要采用间接水合法生产乙醇,石油裂解产生的乙烯直接合成乙醇的这项工艺已取得了很大的进展。

化学合成法与微生物发酵法生产乙醇相比较,它具有成本低,劳动生产率高和易实现生产连续化和自动化等优点,但是,化学合成法生产的乙醇中往往夹杂着异构化高级醇类,对于人的高级中枢神经有麻醉作用,不适合用于饮料、食品、医药、香料等方面,而且化学合成法的投资较大。进入 21 世纪由于受到世界石油价格上涨的影响,合成法和发酵法之间一直产生着激烈的竞争,迄今为止,即使在发达的国家,发酵法生产乙醇仍占一定的比例。本章主要介绍微生物发酵法生产酒精。

1. 淀粉质原料生产乙醇

淀粉质原料是指原料中含有一定的淀粉成分,有薯类、谷类以及野生植物三大类。我国乙醇生产中的淀粉指原料是以薯类为主,其次玉米、高粱等谷类。在我国的浙江、安徽、山东等一带的省市都是以甘薯干(山芋干)为主。

其生产原理为:利用微生物曲霉菌和酵母菌在新陈代谢过程中所产生的糖化酶和酒化酶使淀粉转化成糖,再转化生产乙醇,并放出二氧化碳。



其生产工艺流程如图 12-2 所示。

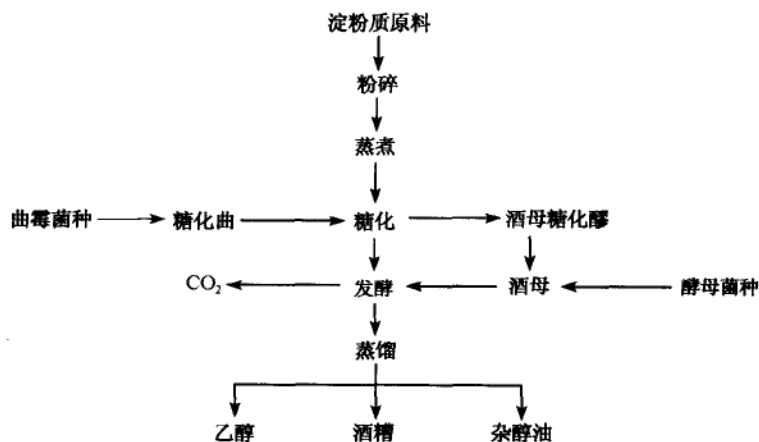
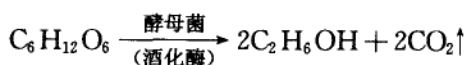
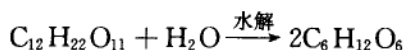


图 12-2 用淀粉生产乙醇生产工艺流程图

2. 糖蜜原料生产乙醇

糖蜜原料就是指在原料中含有一定数量的糖分，它主要是糖厂的副产品废糖蜜，分甘蔗糖蜜和甜菜糖蜜两大类，它们的产量约相当于甘蔗的3%或甜菜的4%。在我国的南方广东、广西、台湾等省市盛产甘蔗，因此，这些地区以甘蔗糖蜜为主生产乙醇。在黑龙江、吉林等省市盛产甜菜，这些地区则以甜菜糖蜜为主生产乙醇。

其生产原理如下：糖蜜中的糖分经稀释并添加部分营养盐，再经过酵母菌的作用，发酵生成乙醇。其反应式如下：



其生产工艺流程如图 12-3 所示。

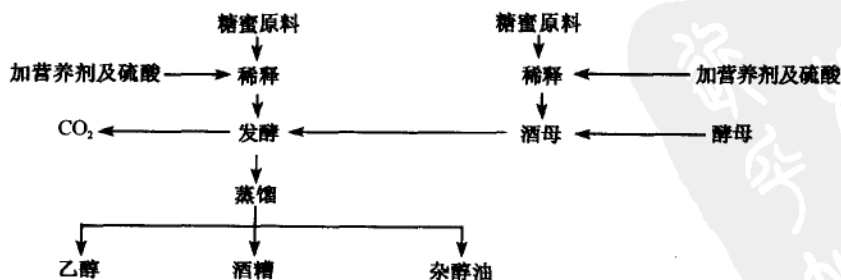


图 12-3 用糖蜜生产乙醇生产工艺流程图

3. 亚硫酸盐纸浆废液生产乙醇

亚硫酸盐纸浆废液是造纸工厂用亚硫酸处理木材制造纸浆后所不需要的排放废液。每 1L 废液中含有 100g 有机物质，其中 25g 为糖分，在这些糖分中有将近 2/3 的糖能够发酵生成乙醇。因此，从综合利用角度出发，利用废液中的糖分进行生产乙醇，不仅对废液进行了再生产，而且也减少了废液排放带来的环境污染问题，对社会有益。所以，在有些大型造纸厂中都附设乙醇车间。

其生产原理为：利用亚硫酸盐纸浆废液中含有的可发酵性糖，中和后并添加部分营养盐，在酵母的作用下，发酵生产乙醇（主要是工业乙醇）。

其生产工艺流程如图 12-4 所示。

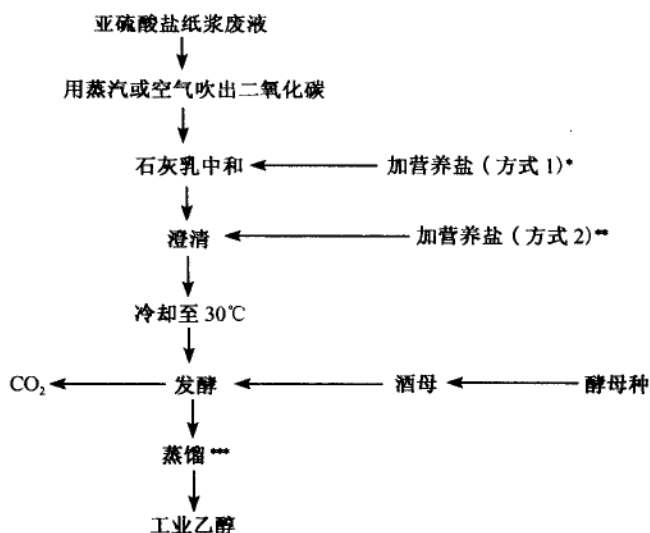


图 12-4 用亚硫酸盐纸浆废液生产乙醇

注：*（方式 1）是中和过程中加营养盐，是使所生成的沉淀在下一步澄清过程中除去。

**（方式 2）加入的营养盐为硫酸铵和过磷酸钙，在加入前，先将两种盐液混合，弃去其生成的沉淀，然后在发酵前加入。

*** 蒸馏经过醪塔、醛塔、精馏塔及甲醇塔。

12.2.3 燃料乙醇生产技术的进展

1. 原料领域的扩展

在 20 世纪末，世界上生产的燃料乙醇大部分是以甘蔗为原料发酵制造的。为了扩大乙醇生产的原料来源，降低乙醇的生产成本，国外（主要是美国）正在积极研究开发利用纤维物质生产乙醇的技术。可作为乙醇生产原料的纤维物质包

括：农业和林业生产废物与城市废物，如干磨玉米残留的纤维物质、纸浆生产和造纸的淤渣及废纸。可用做乙醇生产原料的另一更大的纤维物质来源是木本和乔木作物，如白杨、美国梧桐、刺槐、甜高粱，其中最有发展前途的是甜高粱、刺槐。

增加乙醇生产原料来源的另一途径是利用遗传工程。孟山都公司的遗传工程学家们正在利用基因技术培养淀粉含量大大高于普通品种的马铃薯和玉米，以生产更多的乙醇。

2. 发酵技术

1) 新型菌株的开发与应用

酵母乙醇发酵是国外普遍采用的酒精生产方式。国外使用的酵母大多具有以下特点：①耐高温，在 38℃ 以下有很高的活性；②耐乙醇，能够忍受 12%~13%（体积分数）的乙醇；③具有一定的糖化能力，可减少糖化酶的使用。而国内所采用的菌种的耐酒度与耐温度能力普遍较低，因此现有菌株的改良、新型耐高温、高出酒率的酵母菌株的培养、研制与工业化应用至关重要。细菌酒精发酵与酵母发酵相比，具有代谢速度快、发酵周期短、出酒率高等优点；但由于其对发酵工艺技术条件要求很高，目前尚处于实验室研究阶段，随着新型生物反应器的研制与改进，随着工艺的改进与自动化程度的不断提高，细菌酒精发酵的工业应用具有广阔的前景。

2) 生产工艺过程的合理设计与改进

在美国，生产燃料乙醇的发酵时间已缩短至 30h，发酵后的酒精度可达 14%。无水乙醇脱水早已采用能耗更低的淀粉脱水技术。

(1) 湿法工艺 目前国外采用较多的是湿法工艺生产乙醇，由于制取淀粉乳时提取了胚芽、纤维、蛋白粉，与干法工艺相比，设备生产能力可提高 20%；同时减少了环境污染，糟液中 COD 含量降低了 70% 以上，环保处理费用每吨乙醇降低 15 元以上；湿法出酒率比干法的高 1.5% 左右，由于综合利用效果好，每吨乙醇成本降低 400 元。由于原料保存的问题，湿法工艺主要适用于连续操作的生产过程。

(2) 连续发酵 连续发酵过程中培养液浓度和代谢产物含量相对稳定，从而保证了产品的质量和产量的稳定；同时又具有发酵周期短、设备利用率和产量较高等特点，节省人力物力，生产稳定，便于实现自动化生产。但由于在连续发酵试验和生产中存在微生物突变和杂菌污染问题，连续发酵还未能全部代替传统的间歇发酵。在国外，连续或半连续的生产过程应用较广；在国内，采用连续发酵过程的还较少。但其取代间歇操作是整个生化生产行业发展的必然趋势。

(3) 低温蒸煮 传统乙醇生产采用的是高温高压蒸煮，破坏植物细胞组织和

细胞壁使淀粉粒溶解并释放出来的方法；但高温蒸煮易使原料中果糖转化为焦糖，焦糖不仅不能使酵母发酵，还会阻碍糖化酶对淀粉的作用，影响酵母生长和乙醇产量，影响企业效益。另外，蒸汽及冷却水消耗量也大，蒸煮的能耗占整个生产总用量的30%~40%。因此为节能和降低成本，无蒸煮乙醇发酵技术为国内外争相研究的热点。

(4) 新型高效生产设备的设计与选用 发酵强度是常用以衡量乙醇发酵设备生产效率的指标之一，高发酵强度说明发酵系统设计科学，设备实际运行能力强。提高乙醇发酵强度有效方法之一便是实现大型化连续操作工艺。

3. 分离

用于发酵法生产乙醇的分离技术可分为传统技术、改良的传统技术和非传统技术三大类。

(1) 传统技术 传统技术是指基于精馏技术的分离过程。主要包括共沸精馏、萃取精馏和真空精馏。由于这些特殊精馏过程能耗较高，蒸汽消耗高达7 000~8 000kJ/L乙醇，此类技术用于乙醇的生产是不经济的。

(2) 改良的传统技术 所谓改良的传统技术是指采用各种热集成、回收手段和精馏技术相结合的乙醇生产技术。这些热集成、回收手段包括蒸汽的机械增压、蒸汽再利用、IHOSR 精馏 (Distillation with Intermediate Heat Pumps and Optimal Side stream Return) 等。此类技术的采用可使无水乙醇生产能耗下降30%~40%。采用该类技术的设备投资庞大，且增大耗电量，不适宜大规模生产。

(3) 非传统技术 非传统技术指一些不采用精馏过程进行乙醇回收或脱水的手段，主要包括：超临界和近临界萃取过程、吸附过程、膜分离过程和液相萃取等。在这类技术中以吸附脱水和渗透膜蒸发较为常见。采用吸附脱水方法生产乙醇已有大型装置投产，其年生产能力可达数十万吨；而渗透膜装置的生产能力较小，多在万吨以下，最大的可日产150m³无水乙醇。

12.3 生物沼气

进入21世纪，世界性能源结构正在进行战略性改变，高效利用生物、植物、纤维物质能作为能源利用的一部分，已日益受到许多国际组织、国家和研究者的关注和重视。随着工农业生产的迅速发展和人民生活的不不断提高，人畜粪便和各种有机废物废水、家庭生活污水等处理已成为当前发展生产、改善生活、保护环境 and 获取能源的日益重要的问题。

利用微生物发酵技术来处理污水和废物以生产沼气，具有好氧性处理所不能具有的高效、节能、投资省、活性污泥少等特点，是生物物质有效转换的技术之

一, 20 世纪 90 年代, 在我国得到较快的发展, 并取得丰硕的成果。

12.3.1 什么是沼气

沼气是一种可燃性气体。由于这种气体是最先在池沼中发现的, 所以大家就叫它为沼气。沼气在化学上的名称叫甲烷 (CH_4), 但沼气并不等于甲烷。甲烷在沼气中的含量约占 70%, 其余为二氧化碳和少量的氢气、氮气、硫化氢等气体。

甲烷是一种最简单的有机化合物, 是良好的气体燃料。它的化学性质极为稳定, 不溶于水, 比空气轻一半, 无色、无毒、无臭。一般沼气在燃烧前略带蒜味, 这是由于含有少量硫化氢和某些有机化合物的缘故。

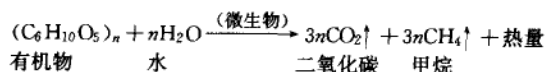
沼气与空气混合燃烧时, 呈淡蓝色火焰, 最高温度可达 1400°C , 能够产生大量的热。纯甲烷每立方米发热量约为 $3.68 \times 10^4 \text{ kJ}$ 。普通沼气池中产生的沼气, 每立方米发热量为 $5500 \sim 2.51 \times 10^4 \text{ kJ}$, 相当于 0.40kg 柴油或 2.25kg 煤炭的燃烧效能。

在自然界中, 除沼泽、池塘、湖泊、污水沟、粪坑等处可能有沼气外, 还可将各种有机物质作为原料, 用人工的方法制造出沼气来。下面介绍用人工的方法制取和应用沼气。

12.3.2 沼气的产生

沼气的产生, 简单地说, 是有机物质在隔绝空气和保持一定的温度、pH 等条件下, 经过微生物的发酵分解作用而产生的。

微生物分解有机物质的过程, 大体分为两步: 第一步, 复杂的有机物质转化为低级脂肪酸。例如丁酸、丙酸、乙酸等; 第二步, 将第一步的产物转化为甲烷和二氧化碳, 其总反应可用下式表示:



在上述过程中, 起发酵分解作用的微生物并不是一种, 参与沼气发酵的微生物统称为沼气微生物, 其中包括不产甲烷菌和产甲烷菌, 不产甲烷菌又可分为发酵性细菌和产氢产乙酸细菌 (图 12-2)。在沼气发酵过程中, 这些微生物按照各自的营养需要, 起着不同的物质转化作用。复杂的有机物被降解成甲烷, 是它们共同作用的结果。详情见第 11 章。

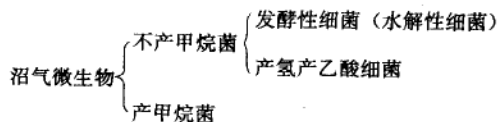


图 12-2 沼气发酵微生物的类群

12.3.3 制取沼气的条件

由于沼气是微生物发酵分解有机物质产生的,微生物的生命活动越旺盛,产生的沼气就越多;相反,微生物的生命活动受到阻碍,产气就会减少,甚至不产气。因此,人们在制取沼气时,要求产气量高,就必须给微生物的生命活动创造一个良好的环境。

1. 严格密闭的沼气发酵池

分解有机物质产生沼气的微生物,都是厌氧微生物,它们的一切生命活动(包括生长、发育、繁殖、代谢等),都不需要空气。相反,空气中的氧气对它们还有损害,因此,修建严格密闭的沼气发酵池,不仅是为了贮存沼气的需要,更重要的是保证细菌在厌氧条件下生活,使之达到正常产气的目的。

2. 充足的发酵原料

各种有机物质,如人、畜粪便、作物秸秆、树叶、杂草、阴沟污泥、垃圾、生活污水以及含有机物质的工业废料等,都可作为沼气池的发酵原料,也就是沼气细菌生长所需要的营养物质。

3. 适当的水分

沼气发酵池里,水分过少,会影响沼气微生物的活动,发酵原料不易分解,产气慢而少,水分过多,发酵原料相应减少,也影响单位体积中的沼气产量,不利于沼气池的充分利用。实践证明:池中发酵物质含水量,控制在90%左右为宜。

4. 适当的温度

沼气细菌进行生命活动,最适合的温度是30~35℃和50~55℃。这就是农村沼气池,夏天产气旺盛;冬季产气减少的原因。一般认为,池中温度在30℃左右产气最好;20℃时,产气量还比较高;当池内温度下降到8℃以下产气就很少了。因此,应设法采取保温措施,提高发酵池里的温度。

5. 适当的酸碱度

沼气微生物,适合在中性或碱性的环境中生长繁殖。池中发酵液的酸碱度(pH)以7~8为好。如果过酸,则对细菌生命活动不利,一般在发酵液中,加入0.1%的碳酸钙调节酸碱度。

12.3.4 制取和使用沼气的好处

推广和应用沼气具有以下三方面的好处：

(1) 充分利用生物物质能，有效解决农村能源的短缺。

我国广大农村以燃烧大量作物秸秆和木柴等作为农民生活用的燃料，但随着人口的增长和农业生态的破坏，农村生活用燃料日感短缺。怎样解决农村燃料的不足，主要应从提高燃料的利用率和开辟燃料的来源两个方面努力。

推广应用节柴灶，是提高燃料利用率的方法之一。农村广泛使用的旧式炉灶，直接燃烧作物秸秆，能量利用率很低（约占10%），应用节柴灶可提高热能的利用率，但节柴灶的推广和应用，只是提高一部分的热能利用率，生物物质中的热能仍未充分利用。若将秸秆进行沼气发酵，生物物质能转换率可达90%（即90%的能量转换在甲烷中），再利用合理的燃具，燃烧沼气，热能利用率可达40%~60%，比直接燃烧秸秆提高20%~30%。因此，推广应用沼气可充分利用秸秆中的能量，有效地解决农民生活燃料的短缺。

另外，推广应用沼气可增加燃料的来源。原来直接作为有机肥料的人畜粪便、褥草和秸秆中的能量没有加以利用，若将这些材料投入沼气池进行沼气发酵，将其中大部分生物物质能转化成沼气，就增加了农村燃料的来源。沼气发酵后的沼渣可作为有机肥施入土中。

(2) 增加土壤有机质，提高土壤肥力。

(3) 保持良好的生态环境，改善卫生条件。

推广应用沼气，除能解决我国广大农民生活能源的短缺和增加土壤有机质提高肥效外。更重要的是自然界的生态可以向良性循环发展。以沼气为燃料可以保护树木，改善农村绿化条件，防止水土流失；沼气发酵在无氧条件下进行，原来粪便杂草中的寄生虫卵、病原细菌、杂草种子等在厌氧条件下被杀灭或大大减少，防止或减少人畜病原菌和作物病虫害的蔓延，对改善农村卫生面貌起一定的作用。燃烧沼气，可防止或减少对大气的污染，又可大大节省农民解决燃料的劳动力，改善农村妇女家务劳动的条件。

在城市中，以往采用好氧方法处理生活污水或大量的工业有机废水。当废水中有机质含量增高时，要消耗大量能源。若采用沼气发酵或沼气发酵和好氧法处理相结合，则可大大节省能源的消耗，又同样达到废水处理的目的，还可产生沼气供作能源。因此，在城镇推广应用沼气，将成为环境保护工作者处理工业废水和粪便的有效手段之一。

综上所述，在我国推广应用沼气，能将解决能源、肥料和环境保护三者密切结合在一起。在工农业发达的国家，应用沼气发酵一般着眼于节省能源和保护环境；在第三世界国家中，则一般着眼于解决燃料问题；在我国，不仅为节能，而

且为开辟能源、解决农村燃料的不足,同时可有效地保存肥源、增加肥源和保护环境。这将在实现中国式的现代化的社会主义建设中,具有独特、重要的意义和作用。

12.4 清洁能源(氢气)

氢是宇宙中最丰富的元素,也是所有元素中最奇特的元素,是最简单和最轻的元素,它是宇宙中一种基本的物质。从总的宇宙来看,氢的分布最为广泛。

氢具有三种同位素,即:普通氢,学名称氕;重氢,学名为氘;和超重氢,学名氚。通常所说的自然氢的性质都是指普通氢,即氕而言。由于氘和氚在自然氢中含量很少,故它们对自然氢的总性质影响极微,故一般可以忽略不计。氢、重氢和超重氢都是核热反应所需的重要燃料。

能源短缺和环境污染是 21 世纪世界面临的挑战性课题,而氢气以其燃烧热值高、清洁无污染、适用范围广等诸多优点,成为 21 世纪最理想的能源。氢是公认的最洁净的燃料,也是重要的化工合成原料。人们已通过热化学分解、电解水、水煤气转化和甲烷裂解等方法来获得氢气。

12.4.1 氢气的性质

氢气是无色无味的气体,标准状态下密度 $8.93 \times 10^{-5} \text{ g/cm}^3$, 相对分子质量为 2.0158。能燃烧,并能与许多非金属和金属直接化合。在常温下不活泼,但在高温时或催化剂存在时十分活泼,用于合成氨、盐酸、硬化油、合成甲醇、有机化合物加氢等工业,也用做金属矿的还原剂等。

12.4.2 氢气的制取

在人类生存的地球上,很少有集中的自然氢气存在。因此要大量使用氢气,首先得大规模人工制氢。制氢的方法有很多,利用微生物生产氢是生物工程在能源应用的一个新领域。

(1) 产氢的微生物 1947 年 Gafrom 和 Rubin 发现珊列藻可产氢,随后人们又发现了许多光合微生物及非光合微生物也能产氢。最常见的产氢光合微生物有:螺藻属、念珠藻属、项圈藻属、小球藻属等藻类微生物,以及非藻类的放氢微生物:绿硫细菌属、红硫细菌属、红螺菌属等;常见的产氢非光合微生物也有两类,一类为厌氧菌如巴氏梭状菌、产气微球菌、克氏杆菌等;另一类为兼性厌氧菌,有大肠杆菌、嗜水气单胞菌、软化芽孢杆菌等。近几年来,科学家已经发现 30~40 种化能异养菌可以发酵糖类、醇类、有机酸等产生氢气。在光合细菌中,也发现了 13~18 种紫色细菌和紫色非硫细菌能够产生氢气。此外利用基因

手段克隆产氢基因到水生藻类中可大大提高产氢量。

(2) 产氢的生化机理 20 世纪 60 年代初期就已经证实用人工电供体, 含有氢化酶的细菌提取物, 从菠菜中分离出的叶绿素混合能产生氢气。叶绿体膜及氢化酶混合产氢机理如图 12-5。

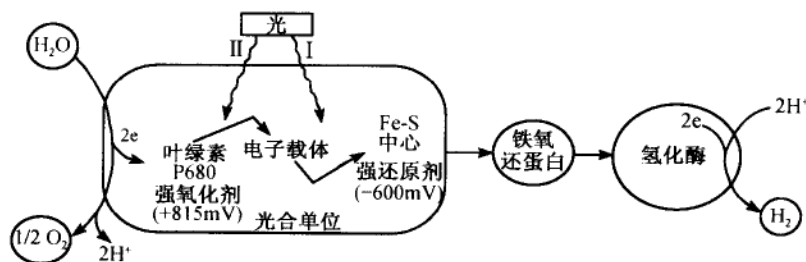


图 12-5 叶绿体膜及氢化酶等组分混合反应产氢示意图

(引自 Hall, 1982 年)

应用实例：植物如豆科植物和根瘤菌共存，根上放线菌诱发产生根瘤，根瘤不仅供应根瘤细胞需要的养分，而且产生相当量的氢气。用光照射固定化的叶绿体时可连续生成 $10\mu\text{mol}/\text{mg}$ 氢气。我国哈尔滨建筑大学开发了“发酵法生物制氢技术”，利用高浓度有机废水生物处理制取氢气。

12.4.3 氢气作为能源使用的内在依据

1. 氢及其同位素的资源丰富

氢是宇宙中最丰富的元素。它在地球上大量存在于水中。地球上，海洋表面约占 71%，所以单就海水而言，其中就存在着大量的氢。据估算，地球上水中含氢约 10^{20}kg 。水是可再生的物质，能经过水—氢—水的自然循环而生成。所以，水和氢都是取之不尽、用之不竭的物质。水中含氢的质量百分数是 11%，而氢中含重氢为质量的 0.015%，所以水也是氘的最丰富的资源。因此氘的资源在地球上也是非常丰富。

2. 氢含有极大的潜能

氢及其同位素蕴藏着极大的能量。氢和氘的资源既如此巨大，所以地球蕴藏的氢能也是十分巨大的；而已开发、利用的氢能只占其中的极小部分。

3. 氢的用途广泛

它既可用作化学燃料和核燃料，又可作为中间能源以及用来改造矿石燃料的品质。它又是许多人造合成燃料的主要燃素。

4. 制氢的方法很多，可获性大

氢能够广泛地跟很多金属和非金属相络合或化合。它的制取方法很多。它既可用电解水制取，又可用各种一次能源的热化学过程、光化过程和生化过程等来生产。

5. 氢可贮、可输

它既可以气态、液态的形式贮存和输配，又可与不饱和氢的液体、固体及金属氢化物相化合的形式进行贮存和输配。

6. 能量集中、使用方便

氢不仅可作为固定动力及生活用的能源，又可用做各种运输机械的动力能源。将来，氢的可控聚变反应成功商用之后，其使用领域将大大扩充。

7. 氢是清洁能源

氢本身无色、无味、无臭、无毒。其燃烧产物很少污染环境。所以，利用氢能既获得了能量，又不会污染生态环境。

8. 对其他能源起调节、补偿作用

氢可以对矿石燃料、核能、太阳能、水能、风能、海洋能和生物能、地热能等一次能源起能量上的调节、补偿作用；也可和电能彼此协调使用，使得社会上对各种能源的利用更加协调、更富有弹性。

从以上特点可以看出：氢是未来的一种理想的能源，是人类今后通用的燃料。氢能的发展远景是不可限量的。

限制着氢作为通用燃料使用的主要原因是制氢的成本太高。特别是在当前矿石燃料尚未用尽之前，氢作为燃料的市场价格还不足以跟石油和煤的价格竞争。其次，大规模的有效制氢技术也尚未解决。此外，氢本身的某些理化性质跟正在使用的某些矿石燃料相比也有它不利的一面。譬如，氢的相对密度和汽油相比要小得多，虽然其质量热值比汽油的大 2.8 倍，但其体积热值比汽油和甲烷的为小。当氢在深冷液化条件下使用时，由于液氢的液化温度很低 ($T < 20\text{K}$)，故需要有绝热保冷的液氢贮箱。这样就会增加贮氢、输氢和用氢上的困难与设备投资。这些由于氢的特殊理化性质带来的问题并不是不可克服的，但必须在推广应用前，或者在应用经验积累之中逐步加以解决。

本章小结

本章围绕生物技术在能源开发方面的应用,从生物技术在传统能源开采中的应用到高度清洁能源(乙醇、沼气以及氢气)的生产制备等方面进行阐述。主要介绍以下内容:

(1) 微生物技术与石油的开采,即应用微生物采油的试验研究工作的进展,微生物在采油中的作用,微生物在油井中的应用状况以及未来的研究重点。

(2) 清洁能源乙醇的性质、工艺生产方式及其生产技术的进展。乙醇的工业生产方式有微生物发酵法和化学合成法两种。微生物发酵法按生产原料的不同,具体地又可以划分为淀粉质原料、糖蜜原料以及亚硫酸盐纸浆废液3种方法。化学合成法主要采用间接水合法。

(3) 沼气的性质、生产、制取条件以及制取沼气的好处。

(4) 从性质、制取(原料、能源与方法几方面)和作为清洁能源的内在依据等方面来阐明氢是未来的一种理想的能源;是人类今后通用的燃料。

复习思考题

1. 微生物技术在石油开采中有何价值?
2. 试比较说明乙醇的各种工业生产方式的异同,哪种方法最有发展前景?
3. 采用沼气作燃料有何好处?
4. 为什么说氢气是未来最理想的能源?你有何看法?



生物技术与电子信息科学

13.1 神经系统的电生理基础

13.1.1 神经的兴奋

生物体在生命活动过程中所表现的电现象称为生物电。大量的实验证明,带电现象是生物体普遍存在的生理现象。电变化并不是细胞或器官功能活动的副产品,而是细胞实现一些最重要功能的关键或决定因素,因此了解生物电现象对了解许多生理活动的本质是极其重要的。如心电图、脑电图就可反映器官活动的电变化和机能变化。

(1) 神经细胞的静息电位 静息电位是指细胞未受刺激时存在于细胞膜内、外两侧的电位差。各种细胞的静息电位都是呈内负外正的特点,神经细胞的静息电位为 $-91\sim-71\text{mV}$,这种状态的细胞又称为极化状态。

如果胞膜内负电值减小,即膜内外电位差减小,称为去极化;如果膜内负电值加大,即膜内外电位差增大,则称为超极化。

(2) 神经细胞的动作电位 动作电位是指细胞在受到阈刺激时,受刺激处的细胞膜两侧出现的快速而可逆的电位倒转,这是在静息电位的基础上发生的。动作电位是各种细胞兴奋(活动由弱变强)时共同的、本质的表现,是兴奋产生和传导的标志。

(3) 生物电产生的机理 细胞内外离子分布不均,特别是 Na^+ 、 K^+ 分布不均都是产生生物电的基础。 Na^+ 、 K^+ 等离子在膜两侧分布的改变是通过膜上特殊蛋白质通道来转运的。在静息状态下,膜上 K^+ 通道开放让胞内 K^+ 外流并被膜内带负电的离子所吸引, K^+ 分布于膜的外侧;阴离子则分布于膜的内侧,从而形成了外正内负的静息电位。当神经纤维受到足够强度的电刺激,膜上 K^+ 通道通透性改变,对 Na^+ 的通透性突然增加,远远超过了 K^+ 的通透性, Na^+ 快速内流使膜内电位升高,从而引起了动作电位的出现。

13.1.2 神经冲动的传导

(1) 神经冲动传导的机理 神经冲动的传导是动作电位的传导,即负电波的传导。当神经纤维某一局部受到阈刺激时会发生兴奋,膜外由正电位变为负电

位,膜内由负电位变为正电位,但邻近静息部位的膜外仍是正电位,膜内是负电位,这样,细胞膜外兴奋部位和未兴奋部位之间形成电位差,便有电荷移动;胞膜内兴奋部位与未兴奋部位之间也有电位差,也有电荷移动,这就形成了局部电流,即形成了神经冲动的传导。

(2) 传导的特征及速度 神经传导的特征包括以下几点:①生理完整性,要求神经纤维在结构和生理功能上都是完整的;②绝缘性,神经纤维之间彼此独立地传导兴奋,互不干扰;③双向性,神经纤维任何一点受到产生的冲动都可向纤维的两端传导;④相对不疲劳性;⑤非递减性,神经纤维产生的动作电位的大小不因刺激的强度而变化,也不因传播的距离而减弱。

神经冲动的传导在无髓神经纤维中是依次传导,传导速度慢;在有髓神经纤维中是跳跃式传导,传导速度较快;且髓鞘越厚,传导速度越快。

13.1.3 神经讯号的传递

神经信息传递的主要形式是跨突触神经化学传递,即神经末梢释放神经递质化学信息使物质跨过神经细胞间的接触间隙,作用于效应细胞上的受体(膜上的一种特殊蛋白质),引起功能效应。由于大多神经细胞有大量分支,因而神经细胞间的信息交换则是组成复杂神经网络的基本机理。神经细胞之间的信息交换主要是通过各种化学信使物质实现的。

13.1.4 神经网络

神经网络的应用已渗透到自动控制领域的各个方面,包括系统辨识、非线性系统控制、智能控制、优化计算及控制系统的故障诊断与看错控制等。

13.2 激素和免疫信号的传递

13.2.1 激素信号的传递

生物体内,神经系统对机体的调节在很大程度上是通过激素而发挥作用的,激素是由内分泌腺活动分泌的化学物质。激素对代谢或机能的调节具有组织特异性和效应特异性,即通常一种激素只作用于一定组织细胞。

激素在体内的信息传递是随血液循环进行的,通过激素与受体间的化学反应,引起细胞内一系列生物化学变化而发挥作用的。

13.2.2 免疫信号的传递

免疫系统有关信号传递与激素信号传递方式相似,只是参与反应的还有淋巴

系统的细胞及因子等。

13.2.3 分子开关

生物体细胞膜上的受体、神经信号传递中产生的神经递质和调节物质,细胞膜内产生的活性酶等,都是生物体内特殊的分子,它们通常在分子构型或结构、组成上具有两种以上状态。不同状态时它们表现出不同活性,具有不同的生物学功能,引发的反应体系或生理机能不一样。这种分子在机体的代谢反应、机能活动中起到了“开关”作用,即可称为“分子开关”。分子开关可以是生物大分子,如受体、糖、蛋白、核酸等,也可以是有机小分子或生物大分子片段,如激素、肽段、核苷酸等。分子开关主要用于机体代谢调节、生长发育和分子生理活性的研究等方面。分子开关的应用尚处于起步阶段。

13.3 生物传感器

生物的基本特征之一,是能够对外界的各种刺激做出反应。其所以能够如此,首先是由于生物能感受外界的各类刺激信号,并将这些信号转换成体内信息处理系统所能接收并处理的信号。例如,人能通过眼、耳、鼻、舌、身等感觉器官将外界的光、声、温度及其他各种化学和物理信号转换成人体内神经系统等信息处理系统能够接收和处理的信号。现代和未来的信息社会中,信息处理系统要对自然和社会的各种变化做出反应,首先需要通过传感器将外界的各种信息接收下来并转换成信息系统中的信息处理单元(即计算机)能够接收和处理的信号。

随着工业生产、医疗卫生以及环境保护等领域的迅速发展,人们对研究对象的测试要求越来越高,需要开发能够测定各种无机或有机化合物的新型有效的传感器。生物传感器便是其中的一个重要方面。

生物传感器是利用某些生物材料的特异性生化反应(主要是酶或酶系反应),使被测物质的变化量转换成电信号的一种装置。传感器主要由信号感受器和信号转换器组成,它能够感受一定的信号并将这种信号转换成信息处理系统便于接收和处理的信号(如电信号和光信号)。例如压力传感器能感受压力信号并将压力信号转换成电信号,湿度传感器能感受湿度的大小并将湿度大小转换成电信号等。

传统的传感器中,信号感受器完全是由非生命物质组成的。而生物传感器与传统的各种物理传感器和化学传感器的最大区别,在于生物传感器的感受器中含有生物活性材料(酶、蛋白质、DNA、抗体、抗原、生物膜等)。利用固定化技术,将能够识别被测物质的生物活性材料固定化,并制成生物膜作为传感器的关键组成部分。生物传感器中的信号转换器,与传统的转换器并没有本质的区别。

例如,可以利用电化学电极、场效应管、热敏器件、压电器件、光电器件等器件作为生物传感器中的信号转换器。

13.3.1 生物传感器的优点

生物传感器的应用具有如下优点:

- (1) 高度的专一性,能够直接在组分复杂的试液(例如体液、发酵液和废水等)中有选择地分析待测物质;
- (2) 分析速度快,能够在短时间内完成测定;
- (3) 操作简便,因为能够基于电信号(电流变化或电位变化)的输出直接测量,所以适用于连续监测及过程的自动化;
- (4) 所用试样量少;
- (5) 能应用于有色样品(包括不透明试液)的测定;
- (6) 由于应用了固定化技术,昂贵的生物材料能够反复使用,节省了测试费用;
- (7) 准确度高。

13.3.2 生物传感器的原理

生物传感器是用生物活性物质作感受器,配以适当的转换器所构成的分析工具(或分析系统)。它的工作原理以图 13-1 表示:

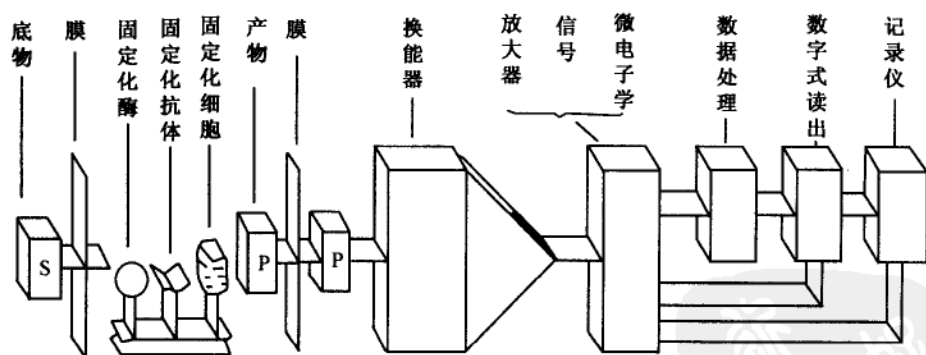


图 13-1 生物传感器简图

待测物质经扩散作用进入固定化生物感受器层,经分子识别,发生生物化学反应,产生的信息继而被相应的化学或物理转换器转化为可定量和处理的电信号,再经仪表的放大和输出,便可知道待测物的浓度。

生物感受器层又称为分子识别元件,是生物传感器的关键元件。它是由对待测物质(底物)具有高选择性分子识别能力的膜构成的,因此直接决定了传感器

的功能和质量。例如葡萄糖氧化酶能从各种糖类中识别出葡萄糖,并把它迅速氧化。那么这种葡萄糖氧化酶则可作为生物感受器膜的材料。根据所测生物物质的不同,生物感受器膜所选的材料不同,可以是酶膜、细胞膜、免疫膜、细胞器膜等,各种膜相应的内容物见表 13-1。

表 13-1 生物传感器的分子识别元件

分子识别元件	生物活性材料
酶膜	各种酶类
全细胞膜	细菌,真菌,动植物细胞
组织膜	动植物组织切片
细胞器膜	线粒体,叶绿体
免疫功能膜	抗体,抗原,酶标抗原等

在生物传感器内,生物活性材料是固定在转换器上的,为了将分子或器官固定化,已经发展了各种技术。常用的方法有六种:夹心法、包埋法、吸附法、共价结合法、交联法和微胶囊法。无论使用何种方法,都应尽可能不破坏生物材料的活性。理想的固定化方法,应能延长材料的活性。一般情况下,用常规方法嵌入的酶,其活性可维持 3~4 周或 50~200 次测定;而以化学方式结合的酶,其活性常能提高到 1000 次测定。

生物化学反应过程中产生的信息是多元化的,它可以是化学物质的消耗或产生,也可以是光和热的产生,因而对应的转换器的种类也是多样的(表 13-2)。生物传感器中研究最多的是电化学生物传感器,在这类传感器中,转换器主要有电流型和电位型两类。例如尿素传感器属电位型传感器,它的分子识别元件是含有尿素酶的膜,而转换器是电位型平面 pH 电极。酶膜是紧贴在电极表面的氨透性膜上的,当尿素在感应器内遇到尿素酶时,尿素立即被分解成氨。这种新生成的氨透过氨透膜到达 pH 电极的表面,使 pH 上升,从 pH 上升的程度可以求出尿素的浓度。

表 13-2 生物学反应信息和转换器的选择

生物学信息	转换器的选择
离子变化	电流型或电位型的离子选择电极,阻抗计
质子变化	离子选择电极,场效应晶体管
气体分压变化	气敏电极,场效应晶体管
热效应	热敏元件
光效应	光纤、光敏管,荧光计
色效应	光纤、光敏管
质量变化	压电效应
电荷密度变化	阻抗计、场效应晶体管
溶液密度变化	表面等离子共振

13.3.3 生物传感器的分类

生物传感器在 20 世纪 90 年代发展非常迅速,大致可分为 5 大类:酶传感器、微生物传感器、免疫传感器、组织传感器和场效应晶体管生物传感器。

1. 酶传感器

酶传感器是问世最早、成熟度最高的一类生物传感器。它是利用酶的催化作用,在常温常压下将糖类、醇类、有机酸、氨基酸等生物分子氧化或分解,然后通过转换器将反应过程中化学物质的变化转变为电信号记录下来,进而推算出相应的生物分子浓度。因此,酶传感器是间接型传感器,它不是直接测定待测物质,而是通过对反应有关物质的浓度测定来推算底物的浓度。国际上已研制成功的酶传感器有 20 余种,其中最为成熟的传感器是葡萄糖传感器。

2. 组织传感器

组织传感器是利用动植物组织中多酶系统的催化作用来识别分子。由于所用的酶存在于天然组织内,无须进行人工提取纯化,因而比较稳定,制备成的传感器寿命较长。例如可将猪肾组织切片覆盖在氨气敏电极上制成可测定谷氨酰胺的传感器。这是因为猪肾组织内含有丰富的谷氨酰胺酶,这种电极的稳定性可保持 1 个月以上。至今已研制出利用猪肝、兔肝、鼠脑、鼠肠、鸡肾、鱼肝、大豆、土豆、生姜等动植物组织的各类传感器。

3. 微生物传感器

微生物传感器是应用细胞固定化技术,将各种微生物固定在膜上的生物传感器。它主要可分为两大类,一类是利用微生物的呼吸作用,另一类是利用微生物内所含的酶。微生物生物体与组织一样含有许多天然的生物分子,能对酶起协同作用,因此传感器寿命也较长。此外,微生物传感器还特别适用于发酵过程中物质的测定,因为它不受发酵液中酶干扰物质的影响。到 21 世纪初已研制出可以测定葡萄糖、酒精、氨、谷氨酸、生化耗氧量等微生物传感器。

4. 免疫传感器

免疫传感器是利用抗体与抗原之间的高选择特性而研制的。已有几种免疫传感器已获得了初步的成功。绒毛促性腺激素(HCG)传感器便是其中的一种,HCG 是鉴定怀孕与否的主要化合物。其传感器的制备是将 HCG 抗体固定在二氧化钛电极的表面制成工作电极,通过它与固定尿素的参比电极之间形成一定的电位差,当电解液中加入含 HCG 的抗原时,工作电极的电位立即发生变化,从

电位变化则可求出 HCG 的浓度。

5. 场效应晶体管 (FET) 生物传感器

场效应晶体管技术是将生物技术与晶体管工艺结合的第三代生物传感器。它具有所需酶或抗体量小的优点,但由于器件的成品率很低,实际应用不多。以青霉素传感器为例来说明其工作原理:将青霉素酶固定在场效应管的栅极上,当遇到青霉素时,产生水解反应生成青霉素唑酸,这是一种比较强的酸,因此, pH 下降,并在仪表上显示出来,从而可以求出青霉素的浓度。

13.3.4 生物传感器的发展前景

生物传感器是 20 世纪末、21 世纪初发展起来的一种新的传感器技术。有人把 21 世纪称为生命科学的世纪,也有人把 21 世纪称为信息科学的世纪。生物传感器正是在生命科学和信息科学之间发展起来的一个交叉学科。尽管生物传感器的研制和开发已取得了显著的进展,但它们与嗅觉器官、味觉器官那样的生物感受系统相比还相距甚远。生物传感器在未来的主要目标是以生物感受系统水平为主攻方向,同时结合分子电学和生物电子学,以期制作各种更灵敏的新颖的生物传感器,如:

- (1) 专业化的生物传感器。
- (2) 微型生物传感器。
- (3) 集成式生物传感器。
- (4) 生物相容性的生物传感器。
- (5) 生物可理解的生物传感器。
- (6) 智能化生物传感器。

生物传感器应用较多的领域是在医疗、医药、生物工程、环境保护、食品、农业、畜牧等与生命科学关系密切的一些领域。例如,临床上用免疫传感器等生物传感器来检测体液中的各种化学成分,可为医生的诊断提供依据;生物工程产业中用生物传感器可监测生物反应器内各种物理、化学、生物的参数变化以便加以控制;环境监测中用生物传感器可监测大气和水中各种污染物质含量,食品行业中用生物传感器可检测食品中营养成分和有害成分的含量、食品的新鲜程度等。随着社会的进一步信息化,生物传感器必将获得越来越广泛的应用。

13.4 生物芯片

13.4.1 生物芯片的概念

生物芯片是 20 世纪 90 年代在生命科学领域中迅速发展起来的一项高新技

术,已成为高效、大规模获取相关生物信息的重要手段。所谓生物芯片就是缩小的生物化学分析器,通过对微加工获得的微米结构做生物化学处理,使成千上万个与生命相关的信息集中在一块厘米见方的芯片上。由于常在玻璃片或硅片等基底材料上加工,且在制备过程中模拟计算机芯片的制备技术,所以称之为生物芯片技术。

生物芯片技术是融微电子学、生物学、物理学、化学、计算机技术为一体的高度交叉的新技术。由于该技术可以将极其大量的探针同时固定于支持物上,所以一次可以对大量的生物分子进行检测分析,具有高通量、微型化和自动化的特点。能够在很短时间内分析大量的生物分子,使人们能够快速准确地获取样品中生物信息,检测效率是传统检测手段的成百上千倍。主要应用领域有基因测序、基因库做图、基因表达谱分析、新基因发现、基因突变及多态分析、疾病的基因诊断、药物筛选等。

13.4.2 生物芯片的种类

根据芯片上固定的探针不同,生物芯片分:基因芯片、蛋白质芯片、细胞芯片、组织芯片、芯片实验室等。

1. 基因芯片

基因芯片是生物芯片技术中发展最成熟和最先实现商品化的产品。基因芯片是基于核酸探针互补杂交技术原理而研制的。所谓核酸探针只是一段人工合成的碱基序列,在探针上连接上一些可检测的物质,根据碱基互补的原理,利用基因探针到基因混合物中识别特定基因。基因芯片和我们日常所说的计算机芯片非常相似,只不过高度集成的不是半导体管,而是成千上万的网格状密集排列的基因探针,通过已知碱基顺序的 DNA 片段,来结合碱基互补序列的单链 DNA,从而确定相应的序列,通过这种方式来识别异常基因或其产物等。21 世纪初,比较成熟的产品有检测基因突变的基因芯片和检测细胞基因表达水平的基因表达谱芯片。

基因芯片技术主要包括 4 个基本技术环节:芯片微阵列制备、样品制备、生物分子反应和信号的检测及分析。目前制备芯片主要采用表面化学的方法或组合化学的方法来处理固相基质如玻璃片或硅片,然后使 DNA 片段或蛋白质分子按特定顺序排列在片基上。21 世纪初已有将近 40 万种不同的 DNA 分子放在 1cm^2 的高密度基因芯片,并且正在制备包含上百万个 DNA 探针的人类基因芯片。生物样品的制备和处理是基因芯片技术的第二个重要环节。生物样品往往是非常复杂的生物分子混合物,除少数特殊样品外,一般不能直接与芯片进行反应。要将样品进行特定的生物处理,获取其中的蛋白质或 DNA、RNA 等信息分子并加以

标记,以提高检测的灵敏度。第三步是生物分子与芯片进行反应。芯片上的生物分子之间的反应是芯片检测的关键一步。通过选择合适的反应条件使生物分子间反应处于最佳状况中,减少生物分子之间的错配比率,从而获取最能反映生物本质的信号。基因芯片技术的最后一步就是芯片信号检测和分析。21世纪初最常用的芯片信号检测方法是将芯片置入芯片扫描仪中,通过采集各反应点的荣耀强弱和荣耀位置,经相关软件分析图像,即可以获得有关生物信息。

2. 蛋白质芯片

蛋白质芯片与基因芯片的原理相似。不同之处在于,一是芯片上固定的分子是蛋白质如抗原或抗体等;二是检测的原理是依据蛋白质分子、蛋白质与核酸、蛋白质与其他分子的相互作用。蛋白质芯片技术出现的较晚,仍处于发展时期,也取得了重大进展。例如制成了第一个包含一种生物全部蛋白质分子的酵母蛋白质芯片。相信不久将会有包含更高等生物甚至人类蛋白质组的蛋白质芯片研制成功,并应用于生物医学基础研究和疾病诊断。

3. 芯片实验室

芯片实验室是生物芯片技术发展的最终目标。它将样品制备、生化反应以及检测分析的整个过程集约化形成微型分析系统。现在已有由加热器、微泵、微阀、微流量控制器、微电极、电子化学和电子发光检测器等组成的芯片实验室问世,并出现了将生化反应、样品制备、检测和分析等部分集成的生物芯片。

13.4.3 生物芯片的应用

生物芯片应用前景十分广阔。如可以应用于寻找新基因、DNA 测序、疾病诊断、药物筛选、毒理基因组学、农作物优育和优选、环境检测和防治、食品卫生监督以及司法鉴定等等。使用基因芯片分析人类基因组,可找出癌症、糖尿病由遗传基因缺陷引起疾病的致病的遗传基因。生物医学研究人员可以在数秒钟内鉴定出导致癌症的突变基因。借助一小滴测试液,医生们能预测药物对病人的功效和是否有毒副作用。利用基因芯片分析遗传基因,未来可以使糖尿病的诊断率达到 50% 以上。可以想像,未来人们在体检时,由搭载基因芯片的诊断机器人对受检者取血,转瞬间体检结果便可以显示在计算机屏幕上。利用基因诊断医疗将从目前千篇一律的“大众医疗”的时代,过渡到依据个人遗传背景而异的“个体化医疗”的时代。生物芯片在疾病检测诊断方面具有独特的优势,它可以在一张芯片上同时对多个病人进行多种疾病的检测。仅用极小量的样品,在极短时间内,向医务人员提供大量的疾病诊断信息,这些信息有助于医生在短时间内找到正确的治疗措施。例如对肿瘤、糖尿病、传染性疾病等常见病和多发病的临床检

验及健康人群检查,均可以应用生物芯片技术。今后人们可以拥有个人化实验室,无论在任何地方,随时可以对自己的健康状况进行监测。在药物筛选方面,国外几乎所有的主要制药公司都不同程度地采用了生物芯片技术来寻找药物靶标,查检药物的毒性或副作用。用芯片技术进行大规模的药物筛选可以省略大量的动物试验,缩短药物筛选所用时间,从而带动创新药物的研究和开发。基因芯片在环保方面的应用表现在:可高效地探测到由微生物或有机物引起的污染,还能帮助研究人员找到并合成具有解毒和消化污染物功能和天然酶基因。这种对环境友好的基因一旦被发现,研究人员将把它们转入普通的细菌中,然后用这种转基因细菌清理被污染的河流或土壤。另外生物芯片在农业、食品监督、司法鉴定等方面都将做出重大贡献。生物芯片技术的深入研究和广泛应用,将对 21 世纪人类生活和健康产生极其深远的影响。

本章小结

生物传感器是一种以生物活性单元,如酶、抗体、核酸、细胞等作为敏感元件,配上适当的换能器所构成的,对被分析物具有高度选择的现代化分析仪器。它通过各种物理、化学换能器,捕捉目标物与敏感基元之间的反应,然后将反应的程度用离散或连续的数字电信号表达出来,从而得出被分析物的浓度。

生物芯片技术是近年发展起来的新型实用技术,已成为高效、大规模获取相关生物信息的重要手段。它能使成千上万个与生命相关的信息集中在一块厘米见方的芯片上。采用生物芯片可进行生命科学和医学中所涉及的各种生物化学反应,从而达到对基因、抗原和活体细胞等进行测试分析的目的。

复习思考题

1. 神经冲动传导的机理是什么?
2. 生物传感器的种类有哪些?各有什么用途?
3. 生物传感器的工作原理是什么?
4. 生物芯片有哪些应用?



参考文献

- 陈丹之. 氢能. 西安: 西安交通大学出版社, 1990
- 陈坚. 环境生物技术. 北京: 中国轻工业出版社, 2003
- 陈章良. 植物基因工程的研究及发展趋势. 国家 863 计划生物技术领域第一主题学术研讨会论文选编. 安徽: 中国科学技术大学出版社, 1993
- 陈章良. 植物基因工程研究. 北京: 北京大学出版社, 1992
- 大连轻工业学院. 生物化学. 北京: 轻工业出版社, 1994
- 樊耀亭, 李晨林, 侯红卫等. 天然厌氧微生物氢发酵生产生物氢气的研究. 中国环境科学, 2002, 22 (4): 370~374
- 高庆生. 生物工程进展. 北京: 科学技术文献出版社, 1986
- 郭勇. 酶工程. 北京: 中国轻工业出版社, 1999
- 何忠效等. 生物技术概论. 北京: 北京师范大学出版社, 2002
- 贾士荣. 转基因植物概述. 国家 863 计划生物技术领域第一主题学术研讨会论文选编. 安徽: 中国科学技术大学出版社, 1993
- 姜锡瑞. 酶制剂应用手册. 北京: 中国轻工业出版社, 2001
- 焦瑞身等. 生物工程概论. 北京: 化学工业出版社, 1986
- 景为. 石油开采. 北京: 石油工业出版社, 1992
- 来鲁华等. 蛋白质结构预测与分子设计. 北京: 北京大学出版社, 1993
- 李晓华. 食品应用化学. 北京: 高等教育出版社, 2002
- 李艳. 发酵工业概论. 北京: 中国轻工业出版社, 1999
- 李志勇. 细胞工程. 北京: 科学出版社, 2003
- 梁英豪. 氢气生产的方法. 中学生理科月刊, 1995, 18: 28
- 廖湘萍. 微生物学基础. 北京: 高等教育出版社, 2002
- 刘德培等. 动物转基因技术. 国家 863 计划生物技术领域第一主题学术研讨会论文选编. 安徽: 中国科学技术大学出版社, 1993
- 陆寿鹏. 酿造工艺 (上). 北京: 高等教育出版社, 2002
- 陆维忠, 郑企成. 植物细胞工程与分子育种技术研究. 北京: 中国农业科学出版社, 2003
- 伦世仪. 环境生物工程. 北京: 化学工业出版社, 2003
- 马大龙. 生物技术药物. 北京: 科学出版社, 2001
- 马晓建, 孙凤杰, 刘龙飞. 降低燃料乙醇生产成本若干问题的分析. 河南化工, 2003, 9: 4~7
- 彭志英. 食品生物技术. 北京: 中国轻工业出版社, 2003
- 钱泽澍等. 沼气发酵微生物学. 浙江: 浙江科学技术出版社, 1999
- 士娟, 付永涛. 浅谈燃料乙醇生产技术进展. 酿酒, 2002, 29 (5): 85~87
- 宋思杨, 楼士林. 生物技术概论. 北京: 科学出版社, 2003
- 万海清. 生命科学概论. 北京: 化工工业出版社, 2001

- 王大成. 蛋白质工程. 北京: 化学工业出版社, 2002
- 王福源. 现代食品发酵技术. 北京: 中国轻工业出版社, 2001
- 王联结. 生物工程概论. 北京: 中国轻工业出版社, 2003
- 王迎军, 刘康时. 生物医学材料的研究与发展. 中国陶瓷, 1998, 34 (5): 26~30
- 魏群. 生物工程技术实验指导. 北京: 高等教育出版社, 2002
- 魏述众. 生物化学. 北京: 轻工业出版社, 2002
- 吴剑波. 微生物制药. 北京: 化学工业出版社, 2002
- 吴明. 生物工程——过去·现在·未来·上海: 知识出版社, 1989
- 熊宗贵. 生物技术制药. 北京: 高等教育出版社, 2002
- 许智宏. 植物生物技术. 上海: 上海科学技术出版社, 1998
- 姚汝华. 微生物工程工艺原理. 广州: 华南理工大学出版社, 1996
- 姚永福等. 中国沼气技术. 北京: 农业出版社, 1987
- 章克昌. 酒精与蒸馏酒工艺学. 北京: 中国轻工业出版社, 1995
- 郑俊华. 生药学 (第三版). 北京: 人民卫生出版社, 2001
- 钟扬等. 简明生物信息学. 北京: 高等教育出版社, 2001
- S. H. 曼特尔, H. 史密斯. 植物生物工程学. 朱徵译. 上海: 上海科学技术出版社, 1984

蘇子龍

PDG

[General Information]

书名=生物工程概论

作者=廖湘萍主编

页数=247

SS号=11398923

出版日期=2004年08月第1版

出版社=科学出版社

尺寸=24cm

原书定价=23.00

主题词=生物工程(学科: 高等教育)生物工程

参考文献格式=廖湘萍主编, 生物工程概论, 北京市: 科学出版社, 2004.08.

内容提要=高等职业教育人才培养创新教材出版工程高职高专生物技术类教材系列 / 陆寿鹏主编: 该书共13章, 分别叙述了生物学基础、基因工程、发酵工程、酶工程、细胞工程、蛋白质工程, 以及生物技术 in 农业、医药、能源、材料及环境保护等方面的应用及发展前沿动态。