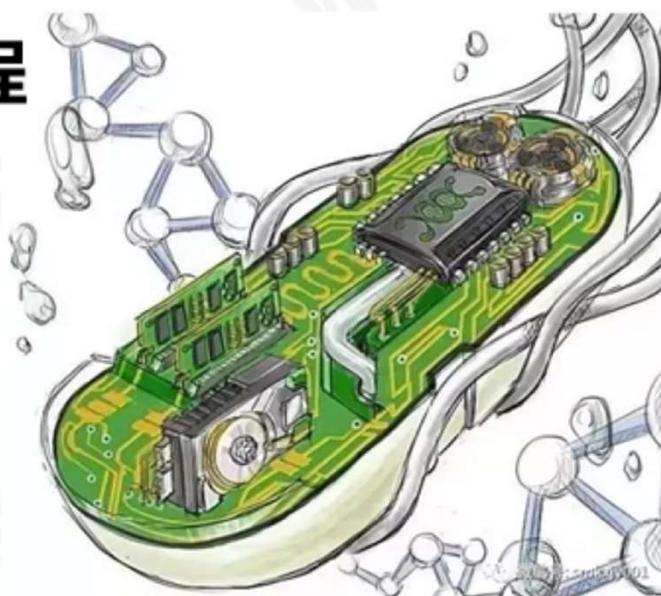


# 微生物工程

一个来盘  
微生物的工程课



微生物工程 第一讲

## 微生物工程的过去，现在和未来



王 崇 龙  
134-5166-9579





## 本次课内容

- 1 什么是生物工程
- 2 生物工程的过去
- 3 生物工程的现在
- 4 生物工程的未来



# 1 什么是生物工程?

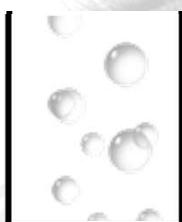
## Microbial engineering

# 微生物工程 是渗透有**工程学的微生物学**



微生物工程 (microbial Engineering) 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**或者**直接应用于工业化生产**的技术体系, 是将**传统发酵**与现代DNA重组, 细胞工程, 分子生物学调控改造等**新生物工程技术**结合并发展起来的**现代发酵技术**。

## 发酵工程?



fervere



出来冒个泡! 提高一下知名度!

微生物在无氧条件下的代谢过程



利用微生物在有氧或者无氧条件下的生命活动来制备微生物菌体或者代谢产物的过程统称为发酵



**传统发酵工程：** 利用微生物的生长和代谢活动，来生长和代谢活动来大量生产人们所需要产品的过程理论与工程体系

**现代发酵工程：** 将各种生物技术，过程优化与放大技术等新兴技术与传统发酵工程相融合，提高传统发酵技术水平，拓展传统发酵应用领域和产品范围的一种现代生物技术体系

**微生物细胞加工技术过程优化与放大**

## 传统发酵



酿造及食品业，抗生素，氨基酸，核苷酸，有机酸，饲料添加剂，生物农药，生物肥料等



## 现代发酵



基因工程药物，替代石油工业的大宗量生物基化学品，及传统发酵工业的升级



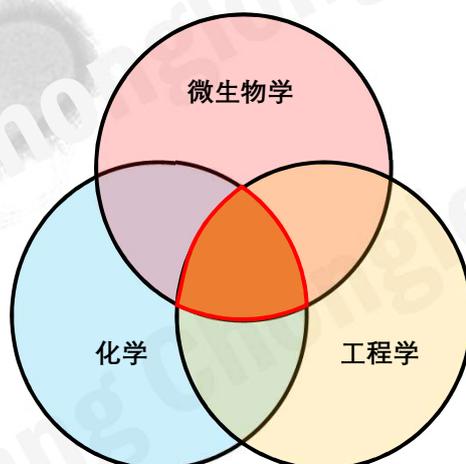
微生物工程 = 广义上的发酵工程

## 微生物工程的特点



- (1) 原料来源广，价格低廉，绿色制造
- (2) 微生物种类繁多，遗传背景相对简单，遗传操作容易，可以筛选或改造微生物提高产率
- (3) 微生物反应条件多温和，产物转换率高，能耗低，生产过程安全
- (4) 微生物代谢途径多样，反应专一性强，可以合成多种产品
- (5) 微生物繁殖速度快，生产周期短，产能高
- (6) 微生物发酵是一个纯培养过程，需要防止杂菌污染

## 微生物工程的工程体系





## 工程学的理念

理论上要正确 (valid theory)

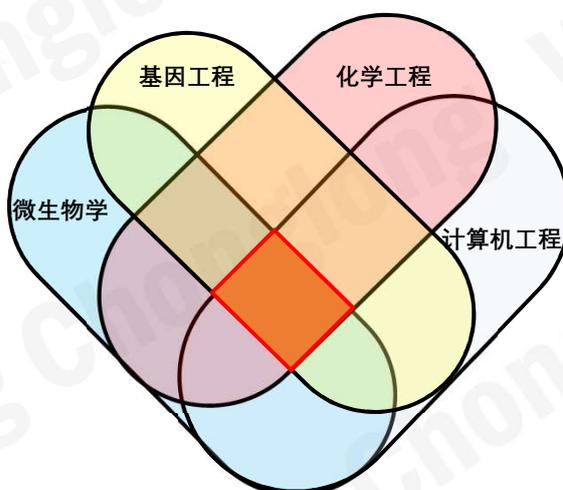
技术上要可行 (practicable technology)

操作上要安全 (safe operation)

经济上要有收益 (significant revenue)



## 微生物工程的工程体系





### 化学工程的角度:

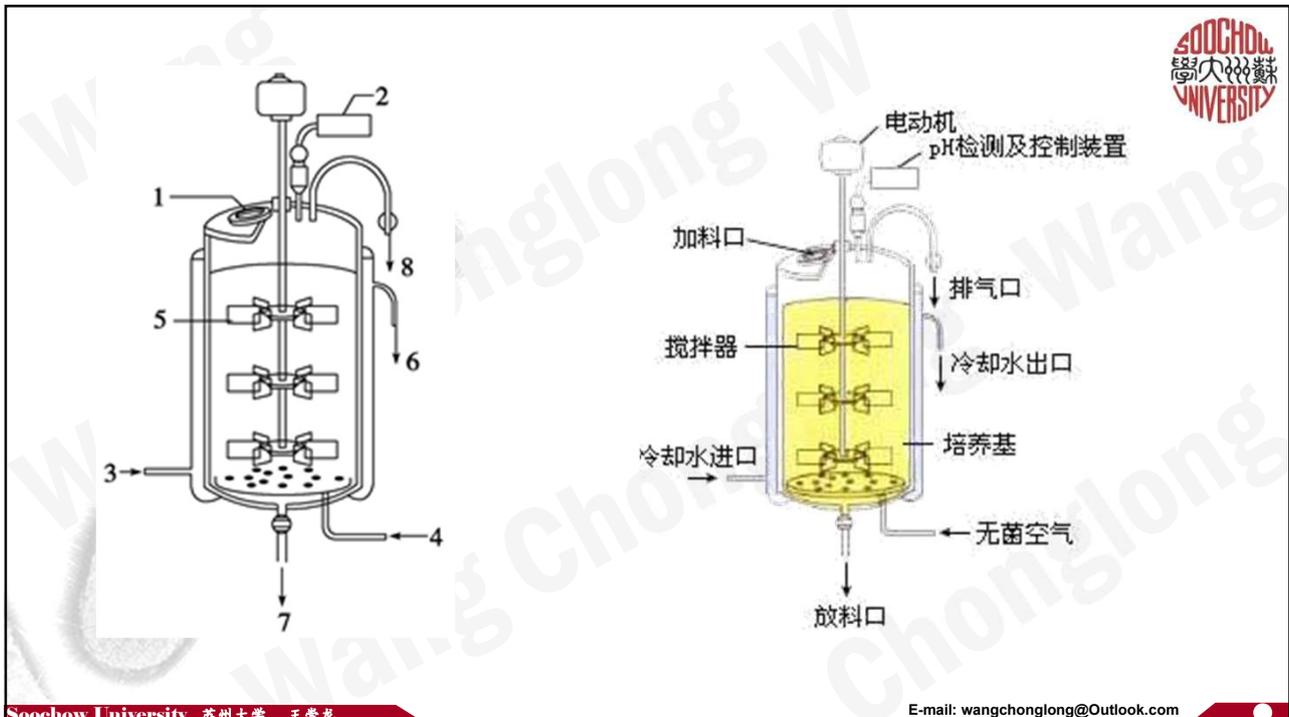
利用生物催化剂进行生物技术产品的生产过程

### 基因工程的角度:

改造生物催化剂性能提高生物技术产品的生产过程

### 计算机工程的角度:

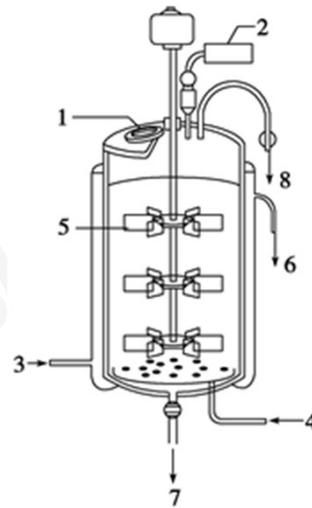
优化配置各组成部件提高生物技术产品的生产过程



## 上游工程 (UPSTREAM PROCESSES)



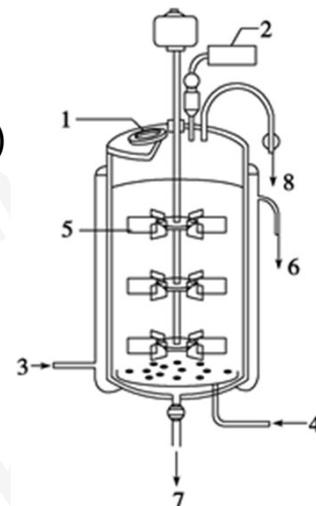
- inoculum development (菌种)
- medium formulation(菌种)
- sterilization (灭菌)
- inoculation(菌种)



## 下游工程 (DOWNSTREAM PROCESSES)



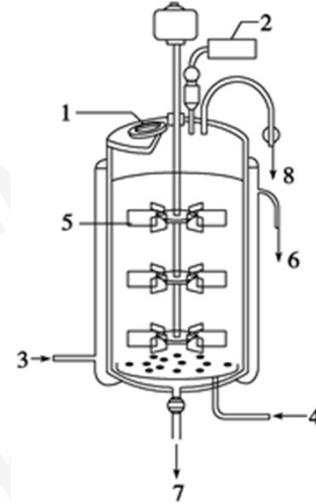
- product extraction and assays(产物分离)
- waste treatment(废物处理)
- byproduct recovery (副产物回收)



# 中游工程 (FERMENTATION PROCESSES)



- bioreactor condition (反应器条件选择)
- bioreactor controlling (反应器反应控制)



# 微生物工程的组成

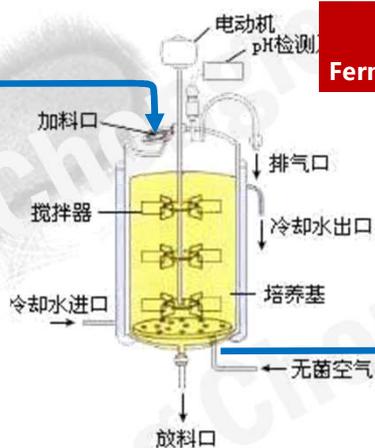


**上游工程**  
Upstream Process

- 原料的预处理
- 培养基的制备
- 生物催化剂的制备

**发酵工程**  
Fermentation Process

- 生物反应器和反应条件的选择
- 生物反应器和反应条件的控制



**下游工程**  
Downstream Process

产品的分离和纯化



## 微生物工程的 **内容**

种子扩大培养和发酵生产所需 培养基的配制

培养基，发酵罐及附属设备的灭菌

扩大培养出有活性，适量的纯种

控制最适发酵条件，使得微生物生长并形成大量的产物

产物提取和精制，获得合格产品

回收或处理三废（废水，废气，废渣）。



## 工程学的 **思想**

**衡算的概念：** 物料衡定， 能量衡定

**速率的概念：** 基质营养物消耗的速率， 细胞生长的速率，  
产物生成的速率

**最优化的概念**

**上游生物技术工程化的概念：** 合成生物学

**细胞代谢和培养工艺一体化的概念**

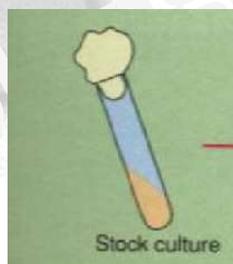
The greatest performance is that all orchestra guys play together in the best way.



## 微生物工程的过程



菌种筛选和复苏



纯种培养



摇瓶试验



发酵罐实验

## 实验室规模



**中试  
规模**



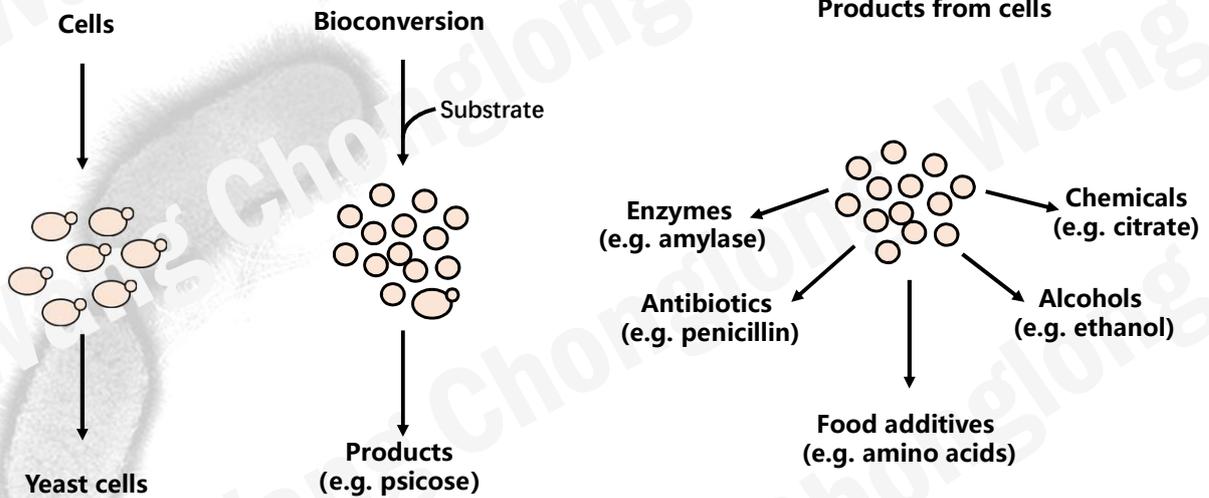
**工厂  
规模**

## 微生物工程的 **技术问题**



- 1) 发酵原料和发酵管附属器件进行**灭菌的技术**，**干燥无菌空气的空气过滤技术**
- 2) 发酵培养过程中根据细胞生长要求控制加料的**计算控制技术**
- 3) 种子培养和生产培养的不同**工艺技术**
- 4) 依据小试培养数据建立动力学模型，依次扩大建立大规模生产动力模型，**解决大规模生产过程工艺放大问题**

## 微生物工程的产品



## 发酵产品的类型





**初级代谢产物** —— 在对数生长期产生，细胞生长繁殖所必需的物质，如氨基酸、核苷酸、蛋白质、核酸、脂类和碳水化合物

**次级代谢产物** —— 在稳定期产生，由初级代谢的中间体或者产物合成，如抗生素、激素等

## 微生物产业 欣欣向荣



微生物细胞为产品的产业

生物转化或修饰化合物的产业

微生物酶为产品的产业

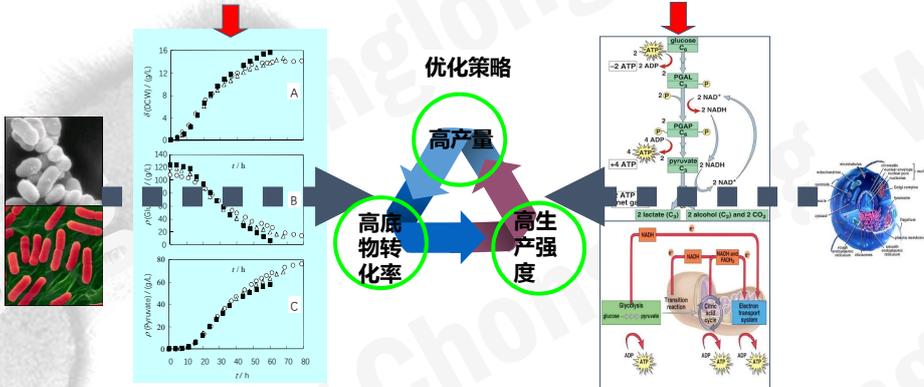
微生物代谢产物为产品的产业

微生物废水处理和及其它

# 围绕关键技术问题

基于细胞表观特性进行优化

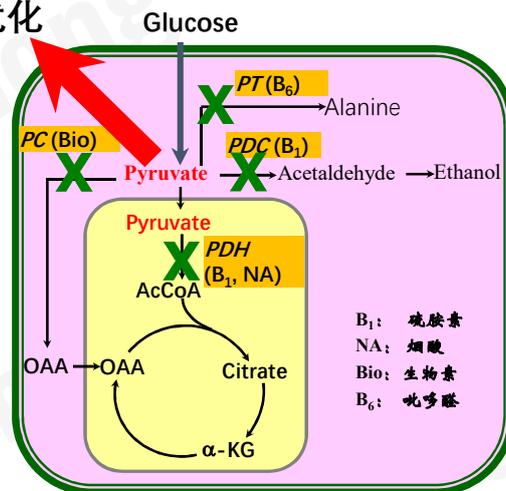
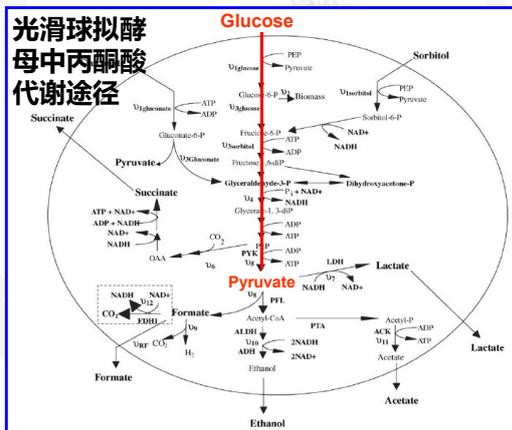
基于细胞内部分析进行优化



在理论和技术上有突破，在工业生产中能广泛应用  
 显著提高发酵过程的经济性和科学性

# 丙酮酸发酵 如何实现丙酮酸高产发酵?

菌株选育和培养条件优化



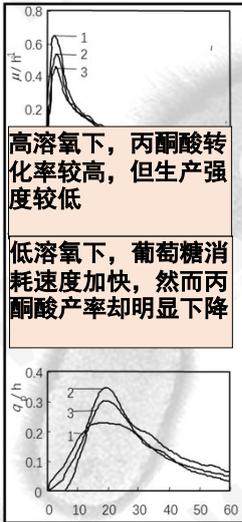
选育自身不能合成微生物素的酵母

控制培养基中微生物素的浓度

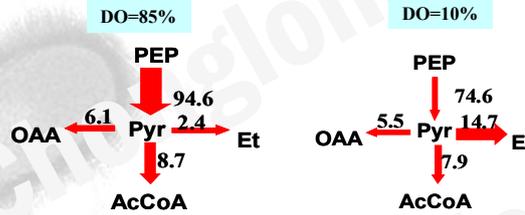
# 如何提高丙酮酸发酵的转化效率和生产强度？



## 动力学分析

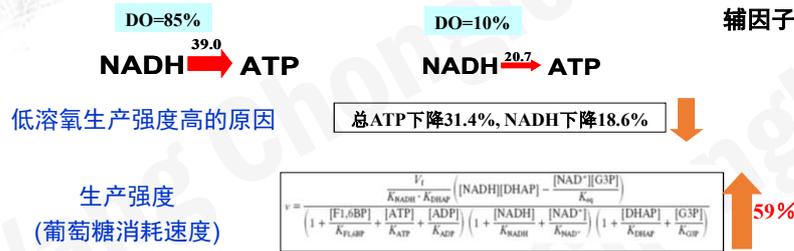


## 代谢网络分析



高溶氧下转化率高的原因  
PEP到Pyr的流量增加了20%，丙酮酸进一步代谢的流量下降了63.3%

## 辅因子分析



采用单一高或低供氧模式，不能同时达到高转化率和高生产强度！

## 分阶段溶氧控制 如何分阶段？



### 碳平衡分析

$k_2 a/h^{-1}$	0~16h			16~32h			32~48h			after 48h		
	450	300	200	450	300	200	450	300	200	450	300	200
Glucose <sup>1</sup>	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Cell growth <sup>2</sup>	47	30	27	17	13	16	13	13	11	3	10	11
Pyruvate	44	41	32	80	60	55	83	70	57	82	78	41
Ethanol	2	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Residual carbon	7	27	39	3	27	29	5	17	32	14	12	48

前16 h较高溶氧有利于碳流合成细胞；  
16 h后耗氧速率恒定，碳流转向合成丙酮酸

## 结果

高产量(89.4 g/L)  
高产率(0.636 g/g)  
高生产强度(1.95 g/(L·h))

确定分阶段供氧模式: 发酵0-16 h控制 $k_2 a$ 为450 h<sup>-1</sup>, 16 h后将 $k_2 a$ 降低至200 h<sup>-1</sup>

## 微生物工程师的 **理想国**



**更高产，更高效，更高速**

To be Higher **titer**, higher **yield**, higher **rate**

**TRY**

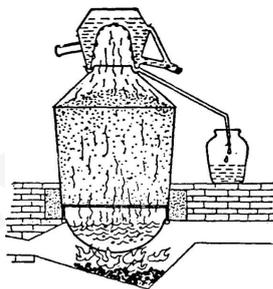
## 2 微生物工程的过去?

**Ancient fermentation**





# 1) 微生物工程的自然发酵时期 (~1900)



## 将进酒 唐李白

君不见，黄河之水天上来，奔流到海不复回。  
君不见，高堂明镜悲白发，朝如青丝暮成雪。  
人生得意须尽欢，莫使金樽空对月。  
天生我材必有用，千金散尽还复来。  
烹羊宰牛且为乐，会须一饮三百杯。  
岑夫子，丹丘生，将进酒，君莫停。  
与君歌一曲，请君为我侧耳听。  
钟鼓馔玉不足贵，但使愿无违。  
陈王昔时宴平乐，斗酒十千恣欢谑。  
主人何为言少钱，径须沽取千黄金。  
五花马，千金裘，呼儿将出换美酒，与尔同销万古愁。



遊後零我月飲影相花  
相各亂歌將影成親間  
期分醒月影徒三舉一  
邈散時徘徊樂我月邀酒  
雲水同徧我須身既明獨  
漢結交我舞及暫不月酌  
無歡舞影春伴解對無





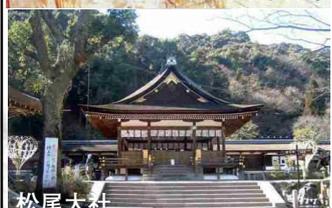
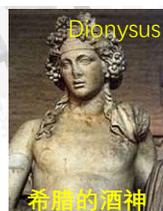
“若作酒醴，尔惟**曲蘖**”

——《尚书》

## 人们利用微生物发酵，但并不知道微生物与发酵的关系



以科学原理分析，酒曲实际上是从发霉的谷物演变来的。酒曲的生产技术在北魏时代的《齐民要术》；中第一次得到全面总结，在宋代已达到极高的水平：  
酒曲品种齐全，工艺技术完善。





代表产物:

米酒, 啤酒, 红酒, 醋, 奶酪, 酱, 面包

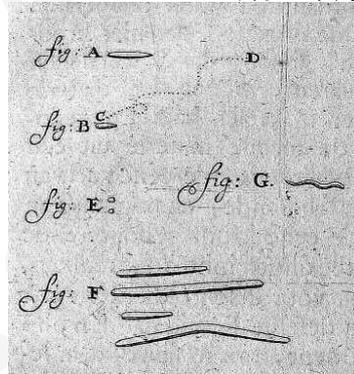
食品中的微生物

## 2) 微生物工程的 **纯培养时期** (1900-1940)



**列文虎克**打开了观察微观世界之门 好奇的看门人

要成功一项事业, 必须花掉毕生的时间



animalcules



安东·列文虎克 (1632-1723)  
Antony van Leeuwenhoek

## 细菌学的鼻祖

罗伯特 科赫 (1843-1910)  
Robert Koch

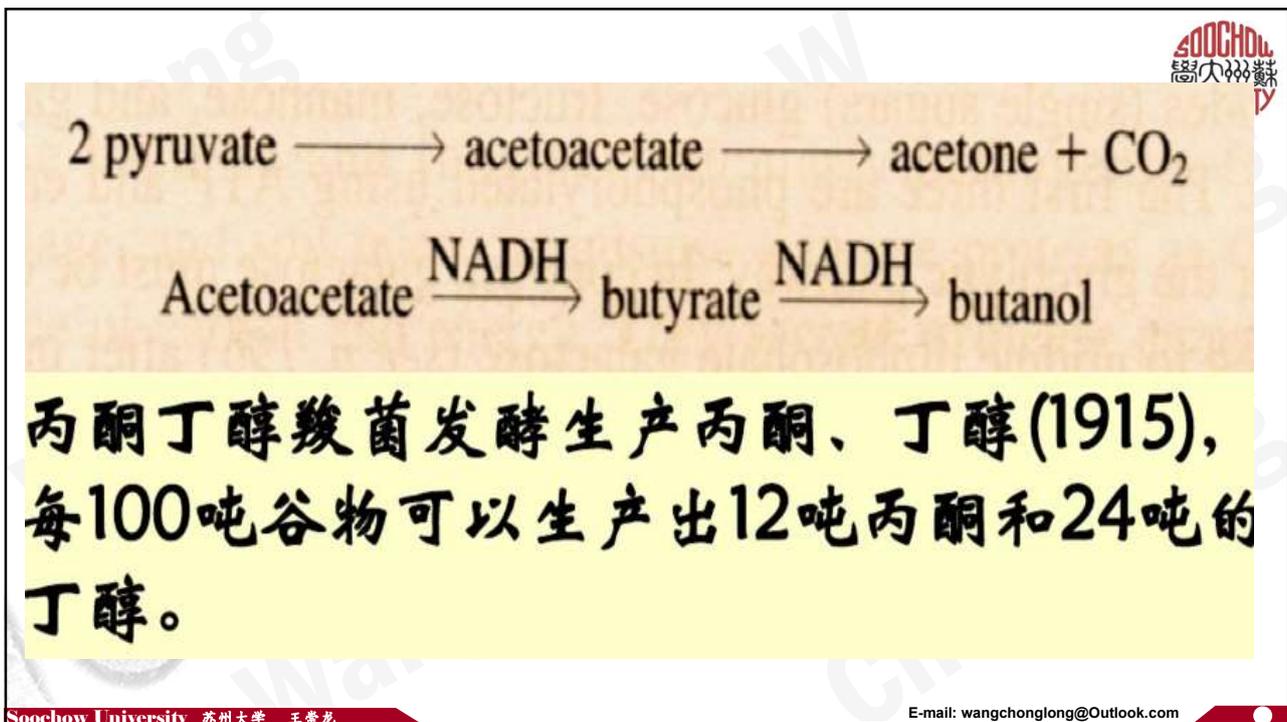
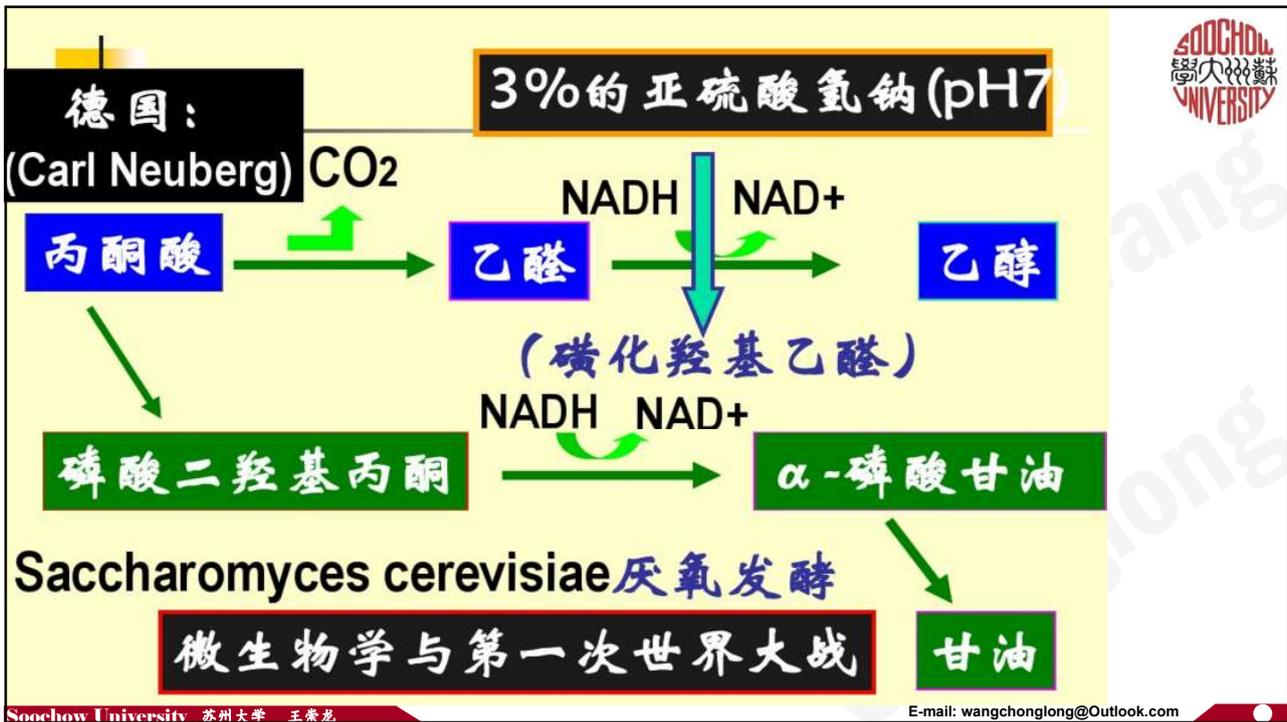


### 科赫法则 (Koch's postulates)

- 1 在每一病例中都出现相同的微生物，且在健康者体内不存在；
- 2 要从宿主分离出这样的微生物并在培养基中得到**纯培养 (pure culture)**；
- 3 用这种微生物的纯培养接种健康而敏感的宿主，同样的疾病会重复发生；
- 4 从试验发病的宿主中能再度分离培养出这种微生物

微生物**纯培养技术**的建立是微生物工业  
发展过程的**第一个转折点**

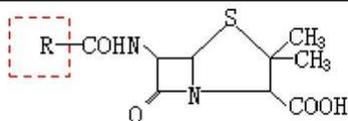




## 2) 微生物工程的 **通气搅拌时期** (1940-1970)



20世纪中叶，随着青霉素的发现，抗生素开始逐渐兴起，由于青霉素大量生产的需要，建立通气搅拌技术。该技术的建立是许多产品都可以用好气性发酵进行大规模生产



弗莱明



希特林



弗洛里



钱恩



1942年6月，库存青霉素已经能够治疗10个病人了。到1943年秋，已经能够提供给军队使用了，但成本还是很高，20美元一个剂量，因此只能给有生命危险的伤员使用。1943年，军方占用了青霉素产量的85%，为2310亿单位，到1944年，产量达到16330亿单位，在诺曼底登陆时，盟军有3000亿单位、10万剂量青霉素的储备，1945年青霉素产量达到79520亿单位，1946年每剂成本只有55美分。



1944年1月，**樊庆笙**乘坐美国的运输船历经艰辛于当年7月到达印度，又经驼峰航线飞到了昆明。樊庆笙回国时，随身带着三支盘尼西林菌种，这在当时比黄金还贵重（据说该菌种当时受到少数国家的严格封锁，真正的金不换），他要用它造福祖国人民。后在汤飞凡的协助下，1944年年底，第一批中国造 5万单位 / 瓶的盘尼西林面世。



## 通气搅拌技术是微生物工业发展过程中的第二个转折点。

通气搅拌解决了液体深层培养的供氧问题

无菌空气、培养基灭菌、无污染接种，大型发酵罐的密封和抗污染设计解决了好氧发酵中杂菌污染问题



1965年，由上海酵母厂首先采用深层发酵法由薯干直接发酵生产柠檬酸

现在我国的柠檬酸生产量和出口量居世界第一位

全球柠檬酸的总生产能力接近 1,200,000 吨/年，中国占 50%，世界总需求量为 1050 ~ 1100 千吨/年，呈供大于求的状况，过剩的生产能力主要在中国。消费以欧美为最大的市场，两市场合计消费量占全球总消费量的70%。



柠檬酸发酵设备



由于生物化学和微生物遗传学的发展，从1955年始，木下祝郎 成功的用谷氨酸棒杆菌 (*Corynebacterium glutamicum*) 发酵生产谷氨酸，鸟氨酸，赖氨酸 异亮氨酸等

从DNA分子水平上控制（无定向诱变）微生物代谢途径，进行最合理代谢，该技术的发展完成了发酵技术的第三次转折



代表产物：

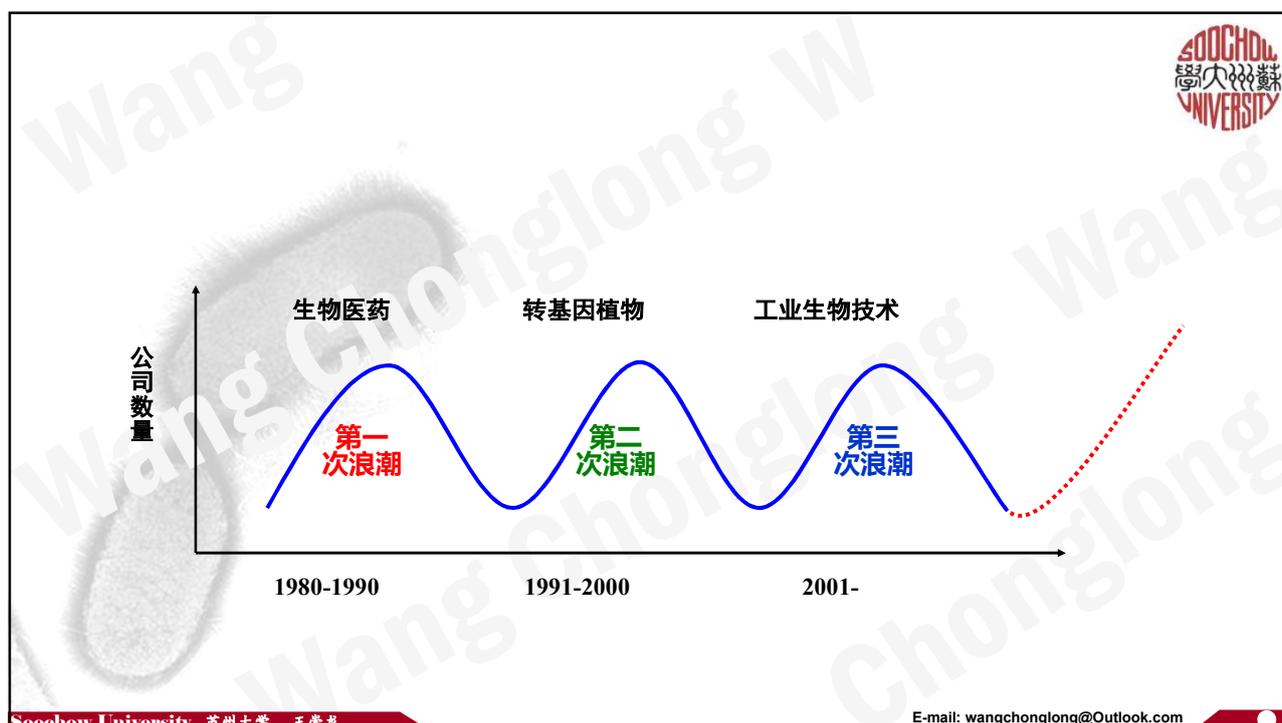
抗生素，氨基酸，核苷酸，有机酸，新型酶制剂

推动抗生素工业乃至整个发酵工业快速发展，建立代谢控制发酵的技术体系，奠定了现代发酵工业的理论和实践基础



### 3 微生物工程的现在

#### Genetic engineering



## 蓝晶微生物完成B轮近2亿元融资

2021-02-26 17:54

2月26日，蓝晶微生物（Bluepha）宣布完成近2亿元的B轮融资，这笔融资创下国内合成生物学领域初创企业单笔融资金额的新纪录。

蓝晶微生物联合创始人兼CEO张浩千表示，本轮融资将用于公司自主研发管线——生物材料PHA年产万吨级工厂的建设、数字原生（digital born）研发平台的搭建和后续产品管线的研发推进。

蓝晶微生物成立于2016年，是一家基于合成生物技术从事分子和材料创新的初创公司，致力于设计、开发、制造和销售新型生物基分子和材料，包括在所有自然环境中均可自发完全降解的生物材料PHA、可有效缓解焦虑的功能饮料成分和补偿人体常见代谢缺陷的新型功能益生菌等。

2020年3月，蓝晶微生物完成数千万元的A+轮融资，此次B轮融资由光速中国和高瓴创投领投，七匹狼创投和三一创新投资跟投，现有股东峰瑞资本、前海母基金、中关村发展启航基金和中关村发展前沿基金继续追加投资。泰合资本担任本轮融资独家财务顾问。

光速中国助理合伙人高健凯表示，合成生物学作为一项具有颠覆性意义的新兴技术将为可持续发展带来更多的可能性。在商业应用领域，合成生物学市场预计到2025年将以近30%的复合年增长率在高速增长。蓝晶的核心技术在可降解塑料领域解决了多年来成本高、产量低、性能不稳定的难题，使得这一环保技术能取得突破性发展，无论对于商业应用还是绿色发展，都有着重大意义。

合成生物学是一门前沿交叉学科，近年在医药、化工、农业和消费品等诸多领域呈现出广阔的应用场景。麦肯锡国际研究院（MGI）2020年5月发表的报告显示，当前全球经济中60%的物质产品可以通过生物技术制造。报告预测，合成生物学技术革命将在未来10年至20年，每年为全球带来2万亿至4万亿美元的直接经济效益。

## 发酵工业的现在

中国是发酵工业**大国**



### ◆生产规模大

- ❖ 醋、酱油、啤酒等产量世界第一
- ❖ 抗生素，如青霉素等产量世界第一
- ❖ 维生素C、氨基酸(味精)、有机酸(如柠檬酸) 等产量世界第一

### ◆产品种类多

5000多家, 相关产业年产值超过2万亿元, 占国民经济的20%

## 发酵工业的现在

中国是发酵工业**强国**



### ◆工艺技术落后

生产水平低25%-45%、能耗高40%、水耗高55%

产 品	国内水平	国际水平
谷氨酸	产酸12-13%，转化率45-55%	15-18%，60-65%
柠檬酸	产酸14-16%	25%
头孢菌素	30000-35000 u/ml	40000 u/ml以上
维生素C	糖酸转化率 94%	糖酸转化率97%

### ◆环境污染严重

每年废水达80亿m<sup>3</sup>(工业排放总量10%)，COD排放500万吨(20%)

产 品	每吨排放废水
硫氰酸红霉素	500吨，COD10万mg/L
味精	COD6-7万mg/L废母液近20吨，总排400吨
柠檬酸	COD1-4万 mg/L中和废水10吨，总排300吨

### ◆创新品种较少 部分产品长期依赖进口

80



# 4 微生物工程的未来

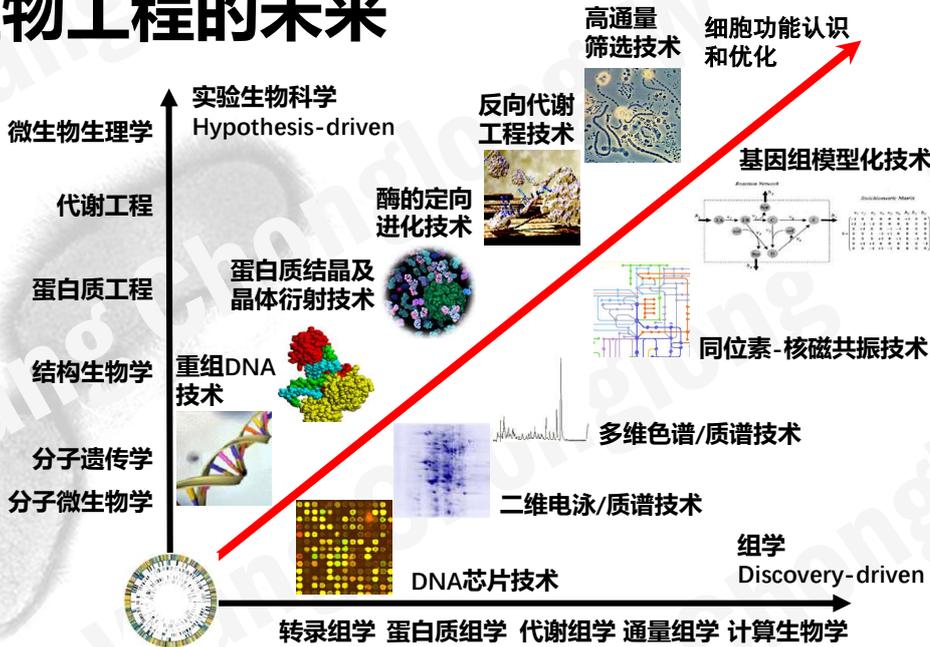
## Synthetic biology

Soochow University 苏州大学 王荣龙 E-mail: wangchonglong@Outlook.com

# 微生物工程的未来

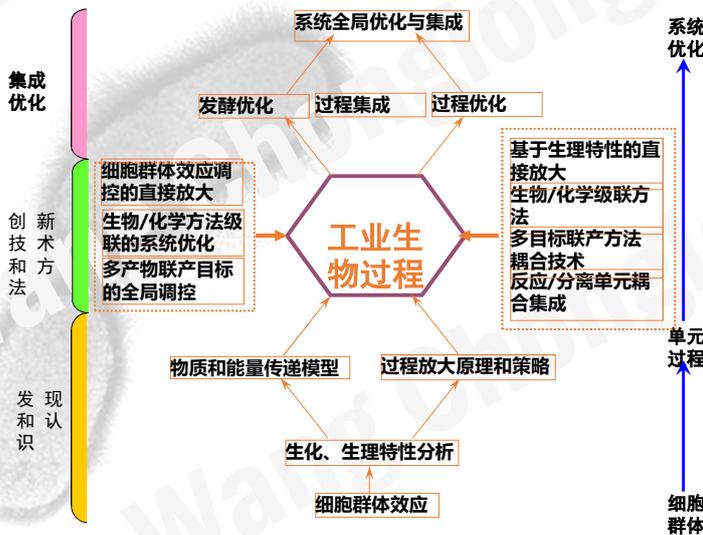


生物学知识和技术



# 微生物工程的未来

## 工程学方法和规律



# 中国微生物工程的未来

## 从发酵工业大国转为发酵工业强国



### ◆ 产品选择

国内已形成较大规模，对国民经济产生重大影响的  
已形成出口能力，能参与国际竞争的  
受知识产权限制，长期依赖进口，急需技术突破的

### ◆ 技术方向

原料拓展  
菌株改造  
工艺优化  
综合利用

### ◆ 整体目标

提升发酵工业整体技术水平  
提高产品经济技术指标  
增强国际竞争力  
创造重大的社会和经济效益。

# 一个发酵产品的生产技术的过程



# 微生物工程的研究内容



## 3 单元操作 → 发酵工程过程工程技术

细胞群体效应及过程放大原理

1 大规模细胞群体行为及过程放大原理

2 生化反应过程放大原理与方法

多相复杂体系物质和能量传递与生物转化规律

3 多相生化特性分析及生物过程模型化

4 生物/化学方法耦联设计与调控

生物过程单元耦合与过程优化原理

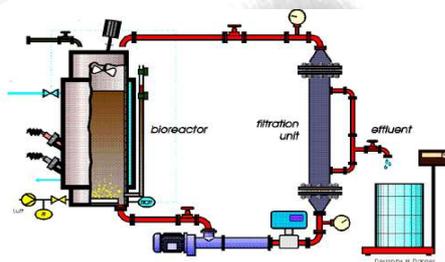
5 工业生物过程单元耦合与集成

6 工业生物过程的系统控制与优化

# 微生物工程的研究内容



## 4 发酵产品分离提取工艺 → 发酵产品高效提取技术与装备



- 生物反应与产物分离的耦合技术
- 新型分离介质和新型分离方法



- 1、提高产品收率
- 2、降低生产成本



# 微生物工程的研究内容



## 5 废物处理→绿色制造工艺的开发

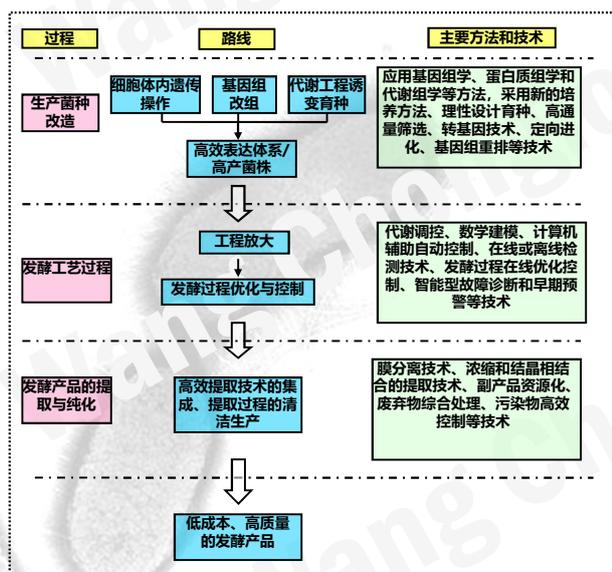
利用微生物细胞或酶的生物催化功能，进行大规模的物质加工与转化的先进生产方式

针对高污染、高能耗的化学工业过程，以生物加工取代化学加工

采用酶技术等方法，改造造纸、皮革、纺织、医药、食品等行业

节约能耗、降低水资源消耗、降低污染物排放、实现环境友好过程

## 总体技术路线



## 发展的关键技术



- 1 基于组学技术的高通量菌种改造和筛选平台
- 2 基于组学和生物信息学的代谢途径分析与优化
- 3 基于实时代谢流分析、代谢途径模型和智控工程的集约型发酵过程控制与优化技术
- 4 基于发酵液及产品特性的高收率、低成本、高质量和环境友好的集成型提取精制技术
- 5 基于源头防治与过程监控的资源节约与废弃物资源化清洁生产技术