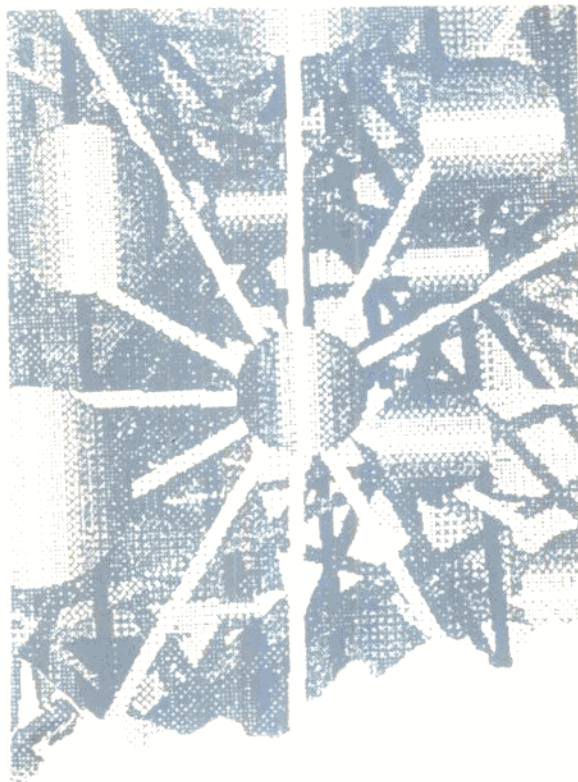


---

# 现代 XIANDAI GONGYE WEISHENGWUXUE 工业微生物学

曹友声 刘仲敏 / 主编

---



湖南科学技术出版社

# 前 言

70年代以来,随着生物技术的迅速发展,工业微生物学也得到了异常迅猛的发展,其基础理论、研究方法和实验技术日臻成熟,并不断开拓新的领域。目前,以工业微生物学作为理论基础的发酵工业已经成为生物技术的主导产业,并逐步形成了许多新兴产业部门,在国民经济中发挥着巨大的作用。

为了适应和满足我国工业微生物学教学、科研和生产的需要,我们在总结工业微生物学最新进展的基础上,结合从事工业微生物学科研和生产实践的经验,组织编写了此书。

本书由曹友声、刘仲敏主编。参加本书编写的有:曹友声(第2、3、12章),刘仲敏(第1、4、5章),李宗义(第1、2、3、12章),许平辉(第4、11、14章),员中桥(第10、16章),李宗和(第3、12章),张泽银(第8、15章),郭振勇(第4、5章),赵金海(第6、10章),李会涛(第5、10章),林兴兵(第11、14章),李廷生(第15、16章),薛慧如(第7、13章),刘红旭(第9、17章),王学增(第6、7章),程刚(第8、17章),张义国(第9、13章)。全书成稿后由曹友声、刘仲敏做了大量的修改和修订工作。修订后的书稿又经二位主编及副主编数次审订后定稿。河南省生物工程学会也为本书的编写出版做了大量组织和协调工作,在此,全体作者特表示诚挚的谢意。

由于作者水平有限,疏漏之处,敬请广大读者批评指正。

**曹友声、刘仲敏**

1997年5月于郑州

# 目 录

<b>第 1 章 筛选微生物代谢产物</b> .....	( 1 )
§ 1.1 微生物代谢 .....	( 1 )
§ 1.2 筛选产生代谢产物的微生物 .....	( 6 )
§ 1.3 微生物分离与纯化 .....	( 9 )
§ 1.4 筛选新的代谢产物 .....	( 12 )
<b>第 2 章 菌株的选育</b> .....	( 21 )
§ 2.1 诱变剂的作用机制 .....	( 21 )
§ 2.2 突变型菌株的筛选 .....	( 30 )
§ 2.3 微生物遗传重组 .....	( 36 )
§ 2.4 基因工程技术 .....	( 48 )
<b>第 3 章 用于工业发酵的基质</b> .....	( 60 )
§ 3.1 培养基 .....	( 60 )
§ 3.2 工业发酵常用的基质 .....	( 76 )
<b>第 4 章 发酵方法</b> .....	( 88 )
§ 4.1 微生物生长动力学 .....	( 88 )
§ 4.2 微生物的初级代谢产物和次级代谢产物 .....	( 100 )
§ 4.3 固体发酵 .....	( 104 )
§ 4.4 工业发酵的技术经济指标 .....	( 107 )
§ 4.5 发酵过程中热量的产生 .....	( 108 )
§ 4.6 发酵罐系统 .....	( 109 )
§ 4.7 搅拌和混合 .....	( 118 )
§ 4.8 通气及搅拌过程中的质量传递 .....	( 122 )
§ 4.9 空气除菌与培养基灭菌 .....	( 127 )
§ 4.10 发酵工艺 .....	( 131 )
§ 4.11 工业发酵中的噬菌体污染及防治 .....	( 135 )
<b>第 5 章 目标产物的分离、纯化</b> .....	( 137 )
§ 5.1 发酵液的预处理和固/液分离 .....	( 137 )
§ 5.2 细胞破碎 .....	( 142 )
§ 5.3 目标产物的提取方法 .....	( 147 )
§ 5.4 膜分离技术 .....	( 157 )
§ 5.5 层析技术 .....	( 161 )
§ 5.6 电泳技术 .....	( 181 )
§ 5.7 结晶 .....	( 183 )
<b>第 6 章 发酵法生产有机化工原料</b> .....	( 191 )
§ 6.1 酒精的发酵法生产 .....	( 191 )
§ 6.2 丙酮/丁醇的发酵法生产 .....	( 196 )

§ 6.3	甘油的发酵法生产	(201)
<b>第7章</b>	<b>有机酸</b>	(206)
§ 7.1	柠檬酸 (citric acid)	(207)
§ 7.2	葡萄糖酸 (gluconic acid)	(217)
§ 7.3	其他糖醛酸	(220)
§ 7.4	醋酸 (acetic acid)	(221)
§ 7.5	乳酸 (lactic acid)	(223)
§ 7.6	曲酸 (kojic acid)	(226)
§ 7.7	衣康酸 (itaconic acid)	(226)
§ 7.8	丙酸 (propanoic acid)	(227)
§ 7.9	丙酮酸 (pyruvic acid)	(227)
§ 7.10	草酸 (oxalic acid)	(227)
§ 7.11	苹果酸 (malic acid)	(228)
§ 7.12	富马酸 (fumaric acid)	(229)
§ 7.13	酒石酸 (dihydroxysuccinic acid)	(230)
§ 7.14	琥珀酸 (butanedioic acid)	(230)
<b>第8章</b>	<b>氨基酸</b>	(232)
§ 8.1	氨基酸的发酵机制	(233)
§ 8.2	氨基酸的产生菌及育种	(239)
§ 8.3	氨基酸发酵控制	(241)
§ 8.4	氨基酸的分离精制	(243)
§ 8.5	L-谷氨酸	(245)
§ 8.6	L-赖氨酸	(252)
<b>第9章</b>	<b>核苷类物质、核苷酸类物质及其衍生物</b>	(257)
§ 9.1	概述	(257)
§ 9.2	生物合成	(257)
§ 9.3	代谢调控机制	(259)
§ 9.4	核苷酸类物质的生产	(259)
<b>第10章</b>	<b>酶</b>	(274)
§ 10.1	绪论	(274)
§ 10.2	酶生物合成的基本理论	(278)
§ 10.3	酶发酵生产的微生物	(280)
§ 10.4	酶发酵	(282)
§ 10.5	淀粉酶	(287)
§ 10.6	葡萄糖异构酶	(291)
§ 10.7	L-天门冬酰胺酶	(292)
§ 10.8	蛋白酶	(293)
§ 10.9	凝乳酶	(294)
§ 10.10	果胶酶	(295)
§ 10.11	脂肪酶	(296)

§ 10.12	青霉素酰化酶 .....	(298)
§ 10.13	乳糖酶 .....	(299)
§ 10.14	酶的分离纯化 .....	(299)
§ 10.15	酶和细胞的固定化及酶活力稳定性的保持 .....	(304)
<b>第 11 章</b>	<b>维生素的微生物合成 .....</b>	<b>(312)</b>
§ 11.1	维生素 C .....	(312)
§ 11.2	维生素 B <sub>12</sub> .....	(317)
§ 11.3	核黄素 .....	(319)
§ 11.4	β-胡萝卜素 .....	(321)
§ 11.5	其他维生素的微生物合成 .....	(322)
<b>第 12 章</b>	<b>抗生素 .....</b>	<b>(324)</b>
§ 12.1	引言 .....	(324)
§ 12.2	β-内酰胺类抗生素 .....	(333)
§ 12.3	氨基酸和肽抗生素 .....	(347)
§ 12.4	碳水化合物抗生素 .....	(354)
§ 12.5	大环内酯类抗生素 .....	(363)
§ 12.6	四环素类和蒽环类抗生素 .....	(371)
§ 12.7	核苷抗生素 .....	(378)
§ 12.8	芳香族抗生素 .....	(380)
§ 12.9	商业生产的其他抗生素 .....	(383)
<b>第 13 章</b>	<b>麦角生物碱 .....</b>	<b>(385)</b>
§ 13.1	绪论 .....	(385)
§ 13.2	麦角真菌的生活史 .....	(386)
§ 13.3	麦角碱的结构 .....	(387)
§ 13.4	麦角生物碱的生物合成 .....	(388)
§ 13.5	麦角生物碱的生产方法 .....	(388)
§ 13.6	麦角生物碱的代谢调控 .....	(392)
§ 13.7	高产菌株的诱变选育 .....	(393)
§ 13.8	分析测定 .....	(393)
<b>第 14 章</b>	<b>微生物转化 .....</b>	<b>(395)</b>
§ 14.1	概述 .....	(395)
§ 14.2	生物转化反应类型 .....	(395)
§ 14.3	生物转化工艺 .....	(397)
§ 14.4	类固醇及固醇化合物的转化 .....	(398)
§ 14.5	抗生素的微生物转化 .....	(401)
§ 14.6	其他重要化合物的生物转化 .....	(406)
<b>第 15 章</b>	<b>单细胞蛋白 .....</b>	<b>(408)</b>
§ 15.1	单细胞蛋白的营养价值 .....	(408)
§ 15.2	单细胞蛋白的安全性 .....	(411)
§ 15.3	单细胞蛋白生产过程与监控原则 .....	(412)

§ 15.4	单细胞蛋白的生产原料与微生物	(416)
§ 15.5	单细胞蛋白生产面临的困难与前景	(421)
<b>第 16 章</b>	<b>微生物脂类</b>	<b>(423)</b>
§ 16.1	微生物脂类含量及组成	(423)
§ 16.2	用于脂类生产的微生物	(426)
§ 16.3	脂类的生物合成	(427)
§ 16.4	培养条件对脂类合成的影响	(429)
§ 16.5	脂类工业化生产的可能性	(431)
<b>第 17 章</b>	<b>污水处理</b>	<b>(433)</b>
§ 17.1	绪论	(433)
§ 17.2	厌氧微生物处理法	(435)
§ 17.3	好氧微生物处理法	(439)
§ 17.4	空气带升式反应器污水处理系统	(444)
§ 17.5	在好氧处理系统中通入纯氧的应用	(445)
§ 17.6	污水处理系统中的起子培养物	(447)
§ 17.7	光合细菌污水处理法	(447)

# 第 1 章 筛选微生物代谢产物

微生物种类繁多，生长旺盛，繁殖迅速，生理代谢类型各异，所处的环境条件不一。因此，同一物质可经不同的分解途径，产生不同的代谢产物。人们可以通过对有益微生物的培养，在短期内获得多种多样的甚至独特的代谢产物。工业微生物学家的主要任务是寻找开发获得微生物代谢产物的方法并不断筛选新的代谢产物。

## § 1.1 微生物代谢

### 一、分解代谢与合成代谢

生物体内进行的化学反应统称为新陈代谢。它是一切生命活动最基本的特征。新陈代谢包括分解代谢和合成代谢。分解代谢是指各种营养物质或细胞内复杂的有机物质通过分解酶系的催化而降解成简单的产物，并产生腺苷三磷酸（ATP）形式的能量和还原力（或称还原当量，一般用 [H] 来表示）的作用；合成代谢是指在合成酶系的催化下，由简单的小分子物质、ATP 形式的能量和 [H] 形式的还原力合成复杂的大分子物质的过程。

分解代谢与合成代谢既有明显的区别，又紧密相关，相互依存。分解代谢为合成代谢提供能量和原料；合成代谢又为分解代谢提供物质基础。它们在生物体中偶联进行，促进了生物个体的生长繁殖和种族的繁衍发展。在真核生物中，分解代谢和合成代谢一般在细胞的不同区域中分隔进行，即合成代谢一般在细胞质中进行，而分解代谢多在线粒体和微粒体中进行，这就有利于两者可同时有条不紊地运转。原核生物因其细胞结构上的间隔程度低，故反应的控制主要在简单的酶分子水平上进行。分解代谢与合成代谢的互相关系可用图 1-1 表

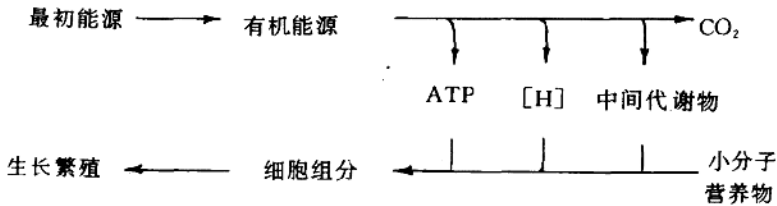


图 1-1 分解代谢与合成代谢之间的关系

示。由图可知，连结分解代谢与合成代谢的除了腺苷三磷酸（ATP）形式的能量和还原力 [H] 之外，还有中间代谢产物。这些中间代谢产物共有 12 种（表 2-1），是沟通分解代谢与合成代谢的关键代谢物。细胞合成代谢需要的各种物质靠它们来制造，分解代谢也需要它们的存在，以确保分解代谢不致中断。如果在生物体中只进行能量代谢，则有机能源的最终结局只产生 ATP、H<sub>2</sub>O 和 CO<sub>2</sub>，而没有任何中间代谢产物积累。因此，合成代谢也不能正常进行。相反，如果要进行正常的合成代谢，就要消耗大量分解代谢正常进行所必不可少的中间

代谢产物，结果也势必影响分解代谢的正常运转。

表 1-1 中间代谢产物的来源与功能

中间代谢物	来源 (分解途径)	功能 (合成产物)
1-磷酸葡萄糖	葡萄糖; 半乳糖; 多糖	核糖
6-磷酸葡萄糖	EMP	戊糖, 多糖
5-磷酸核糖	HMP	核苷酸, 脱氧核苷酸
4-磷酸赤藓糖	HMP	芳香族氨基酸
磷酸烯醇丙酮酸	EMP	磷酸转移酶系 (糖的运送) 芳香氨基酸, 葡糖异生作用 糖回补反应, 胞壁酸合成
丙酮酸	EMP 磷酸酮醇酶 (戊糖发酵)	丙氨酸, 缬氨酸, 亮氨酸, 糖回补 反应
3-磷酸甘油酸	EMP	丝氨酸, 甘氨酸, 半胱氨酸
$\alpha$ -酮戊二酸	TCA	谷氨酸, 脯氨酸, 精氨酸, 赖氨酸
琥珀酰辅酶 A	TCA	氨基酸, 叶啉
磷酸二羟丙酮	EMP	甘油 (脂肪)
乙酰辅酶 A	丙酮酸脱羧, 脂肪酸氧化, 嘧啶分解	脂肪酸, 类异戊二稀, 甾醇, 氨基 酸

为了保证合成代谢和分解代谢都能正常进行, 生物体巧妙地利用了两类独特功能的代谢途径来补充代谢所消耗的各种物质。一种是无定向代谢途径 (amphibolic pathway), 即在分解代谢和合成代谢中具有双重功能的途径。从表 2-1 中可以看出, EMP、HMP 和 TCA 循环是重要的无定向代谢途径。例如, TCA 循环不仅包含着丙酮酸和乙酰 CoA 的氧化, 而且还包含了琥珀酰辅酶 A、草酰乙酸等的产生, 它们是合成氨基酸和叶啉等化合物的重要中间代谢产物。另一种是代谢物补充序列 (anaplerotic sequence), 又称补充途径 (replenishment pathway), 是指能补充无定向代谢途径中因合成代谢而消耗的中间代谢物的反应。这样, 当重要产能途径中的关键中间代谢产物必须被大量用作生物合成的原料时, 仍可保证分解代谢的正常进行。例如, 在通常情况下, TCA 循环中约有一半的中间代谢物被用作合成氨基酸和嘧啶的原料。不同微生物在不同的碳源条件下, 有不同的补充序列。与 EMP 和 TCA 循环有关的补充序列约有 10 条, 它们都围绕着回补 EMP 途径中磷酸烯醇式丙酮酸和 TCA 循环中的草酰乙酸这两种关键性中间代谢产物。

## 二、初级代谢与次级代谢

在研究微生物代谢时, 还可根据代谢产物的生理作用不同, 将代谢分为初级代谢和次级代谢。初级代谢主要指把营养物质转化成机体的结构物质和生理活性物质, 并形成腺苷三磷酸 (ATP) 等能量物质的代谢途径, 包括提供生物合成的中间产物和能量的分解代谢、合成代谢、无定向代谢以及代谢物补充序列。这些代谢途径在生物界有着普遍性, 从单细胞生物体到多细胞生物体, 从最低等的生物到最高等的生物甚至包括人类, 其代谢途径基本相同。由初级代谢途径生成的产物称为初级代谢产物, 包括分解代谢和合成代谢过程中的各种中间代谢物质、前体物质、高分子物质以及能量代谢和代谢调控中起作用的各种物质, 如糖类、脂类、蛋白质及核酸类等。这些代谢物的转化、消长与微生物的生长繁殖息息相关, 同步进行。随着初级代谢途径的正常运转, 微生物细胞也不断生长、分裂和分化。如果初级代谢途径中某一环节出现差错, 将引起代谢紊乱, 生长发育不良, 甚至死亡。



次级代谢是指微生物在一定生理阶段出现的一种特殊的代谢途径。次级代谢在生物界不具有普遍性,仅存在于某些生物如植物和微生物中。由次级代谢途径产生的物质称为次级代谢产物。它泛指那些对产生这类物质的微生物没有明确生理功能的代谢产物。抗生素、色素、毒素、生物碱、吡啶以及糖的衍生物等都是某些微生物在一定条件下产生的次级代谢产物。次级代谢产物一般在微生物生长后期即合成期形成,并逐步积累起来。合成期的微生物生长速度已明显下降,或已停止生长。因此,微生物的生长与次级代谢产物的形成并非同步。但是,次级代谢产物的总积累与前期微生物的生长量一般呈正相关。次级代谢产物的化学结构比较复杂,往往存在着初级代谢产物中不常见的化学基团,如 $\beta$ -内酰胺环、环多肽、大环内酯、多醚和异戊二烯等。这种多类型复杂化合物反映了次级代谢产物合成途径的复杂性。其代谢途径不但因微生物类群不同而不同,就是同种微生物在不同条件下也会产生不同的次级代谢产物。例如,荨麻青霉(*Penicillium urticae*)在含 $0.5 \times 10^{-8}$ mol/L的锌离子 Czapek-Dox 培养基中,合成的主要次级代谢产物是6-甲基水杨酸;但在含有 $0.5 \times 10^{-6}$ mol/L 锌离子 Czapek-Dox 培养基中不会合成6-甲基水杨酸,而合成大量的龙胆醇、甲基醌和棒曲霉素。

与初级代谢产物相比,次级代谢产物无论在数量上还是类型上都要多得多,因此就更为复杂。目前对次级代谢产物的分类也还缺乏统一的标准。现在较为流行的分类方法有两种:一种是根据次级代谢产物的结构特征和生理作用分类,可将次级代谢产物分为抗生素、生长激素、维生素、色素、生物碱与毒素等不同类型;另一种是根据次级代谢产物碳架来源分类。目前,根据碳架来源可将次级代谢产物分为六种类型:

第一,通过乙酸-丙二酸聚合途径合成的次级代谢产物,如大环内酯类抗生素、红霉素、螺旋霉素、麦迪霉素、金霉素、土霉素、四环素、灰黄霉素、利福霉素、放线菌酮、黄曲霉毒素、胡桃醌、地衣醇等。

第二,通过莽草酸或分支酸合成途径合成的次级代谢产物,如放线菌素、吡啶霉素、氯霉素、绿脓毒素、隐杯伞素、肉桂酸、香豆酸、绿原酸等。

第三,通过甲瓦龙酸与异戊二烯聚合途径合成的次级代谢产物,如赤霉素、麦角甾醇、类胡萝卜素、天然香料等。

第四,利用氨基酸作为前体合成的次级代谢产物,如 $\beta$ -内酰胺类抗生素:青霉素、头孢菌素;多肽类抗生素:杆菌肽、多粘菌素、放线菌素、毒素等。

第五,由糖或糖的衍生物衍生而来的次级代谢产物,如氨基糖苷类抗生素:链霉素、卡那霉素、新霉素、庆大霉素、巴龙霉素等。

第六,由核苷类作为前体合成的次级代谢产物,如嘌呤霉素、核杀霉素、见支菌素等。

图1-2为各类次级代谢碳源示意图。由图可知,经莽草酸分支途径:氨基酸和乙酸支路途径而聚合成各类次级代谢产物,其中乙酸支路又可分为两个分支:其一,经乙酸缩合成聚酮醌,再进而合成抗生素中的大环内酯类、四环素类和灰黄霉素以及黄曲霉毒素等;另一分支经由甲羟戊酸(又称甲瓦龙酸 meralonic acid)进而合成重要的次级代谢产物异戊二烯类(Isoprenes),其中有真菌产生的代谢产物,如植物生长刺激素类:赤霉素和隐杯伞素等。莽草酸分支途径除产生芳香族氨基酸外,也能直接转化合成抗细菌抗生素氧霉素(Chloramphenicol);而各种氨基酸则可衍生聚合形成各种重要的多肽类抗生素、 $\beta$ -内酰胺类抗生素以及一系列氨基酸衍生物类抗生素,如D-环丝氨酸和杀腺癌菌素(Hadacidin)等。另外,从糖类转化聚合产生的核酸类、多糖类、糖苷类又可转化形成核苷类抗生素、糖苷类抗生素和糖衍生物类抗生素等。

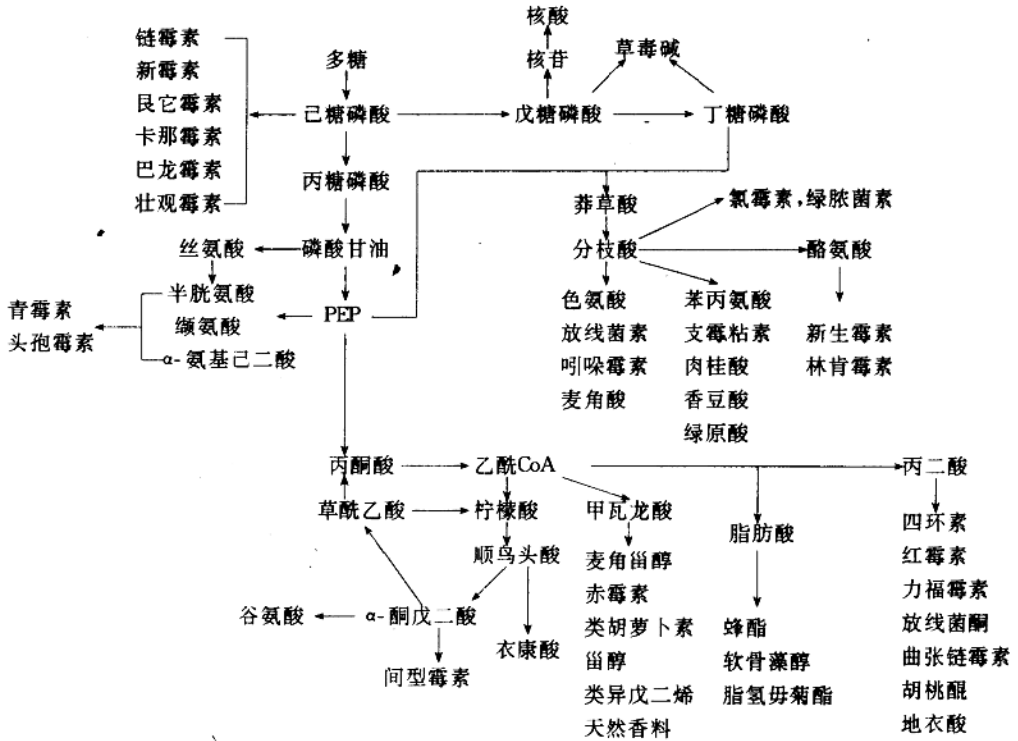


图1-2 各类次级代谢碳源示意图

有几种关于次级代谢作用的假说，其中较为完善的是 Hans zöhner 的假说。该假说认为：除了细胞本身代谢作用的五种状态，即中间代谢、调节、运输、分化和形态发生以外，次级代谢被认为是在不损害初级代谢的情况下，细胞能够继续进行的、另外开发的进行生物化学反应的“竞技场”。一般认为次级代谢是在一定条件下，通过突变而获得的一种适应生存的方式。细胞基因的改变常常导致代谢产物的改变，而这些代谢产物对于正常的细胞功能没有任何重大影响。如果由于基因的改变导致形成某些有益的代谢产物，那么这个基因的改变将固定在细胞的基因组中，也许将演变成细胞生长与繁殖不可缺少的。按这种方式形成的次级代谢产物最终将转变成初级代谢产物。在自然条件下，微生物产生次级代谢产物的能力一般都不高，它们的生成也受基本代谢调节的控制。因此，通过诱变育种和控制环境条件，可以大幅度地提高次级代谢产物的产量。这在抗生素发酵工业中是早已知道的事实。

### 三、发酵工业中的微生物代谢产物

目前，在发酵工业中应用较为广泛或具有开发前途的微生物代谢产物主要有：

#### (一) 有机溶剂与有机酸

有机溶剂与有机酸如乙醇、丁醇、丙酮、甘油、醋酸、葡萄糖酸、柠檬酸、乳酸等大多属于微生物糖代谢途径上的产物。

乙醇除用于饮料、涂料、染料外，同时又被广泛应用于化学工业领域。乙醇曾经全部由发酵法制造。但是随着石油化学合成工业的发展，美国、日本和西欧一些国家，工业酒精大部分用合成法制造。丁醇与丙酮目前也多采用合成的方法生产。甘油发酵时采用亚硫酸钠或碱作乙醛固定剂，由于发酵过程中乙醛被固定，因此不产生乙醇。1956年开始研究高渗酵母

的甘油发酵法，可以不必添加乙醛固定剂，而直接由酵母生产甘油。

醋酸和乳酸目前工业上主要采用微生物发酵法生产。自1923年后，工业上一直用生物合成法制备柠檬酸，其产量占全世界柠檬酸总产量的90%以上。

## (二) 维生素类

目前完全用微生物发酵法或微生物转化法制备中间体的有维生素B<sub>12</sub>（钴胺素）、维生素B<sub>2</sub>（核黄素）、原维生素A（ $\beta$ -胡萝卜素）和维生素C的中间体L-山梨糖等。

维生素B<sub>12</sub>现在采用巨大芽孢杆菌（*Bacillus megatherium*）和梭状芽孢杆菌（*Clostridium*）厌氧发酵生产，或从庆大霉素、链霉素、金霉素等发酵液中分离，也可由丙酮、丁醇发酵液中提取。

维生素B<sub>2</sub>采用阿氏假囊酵母（*Eremothecium ashbgli*）发酵，或由丙酮、丁醇产生菌产生。60年代中期，美国应用棉舒囊霉菌（*Ashbyagossipii*）进行深层培养。目前有报道利用棒状菌属（*Corynebaeterinum*）、假单孢菌属（*Pseudomonas*）和酵母菌进行生产。

## (三) 氨基酸

生产氨基酸的方法有三种：化学合成法、植物蛋白质和毛发等水解法及微生物发酵法。目前均由微生物发酵法生产大量光学构型单一的产品。氨基酸发酵是特定的氨基酸本身大量生成的积累。所有生物都可以合成氨基酸的形式合成自身的蛋白质，而各种氨基酸之间的量相当平衡。若某一种氨基酸被大量生成时，则称之为异常现象。氨基酸发酵是建立在微生物代谢上的突变。

## (四) 生物碱

有微生物发酵法生产或微生物转化法生产的麦角生物碱、托源生物碱和羟基青树碱等。

## (五) 抗生素

60年代兴起了应用固定化大肠杆菌细胞或固定化酰胺酶获得6-氨基青霉烷酸（6-APA）和7-氨基头孢烷酸（7-ACA）来制取自然界中没有的高效、低毒、广谱系各类半生物合成的新青霉素和新头孢霉素。这些工作有力地促进了抗生素发酵工业的发展，扩大了人们对微生物能为人类造福的眼界。使人们认识到，不仅微生物代谢产物中的抗生素物质可作为治疗的药物，而且还可以借助于微生物转化反应来合成化学方法难以合成的药物或药物中间体。到1987年，人们从自然界发现和分离的抗生素已有9000余种，并以其中的一些重要抗生素如青霉素、头孢菌素、四环素类抗生素、氨基糖苷类抗生素等为原料，进行化学结构改造。根据文献和专利资料报道，各类抗生素半合成微生物总数已近10万种。目前全世界实际生产和用于临床的抗生素约百余种，连同各种半合成衍生物及其盐类共300余种。

80年代以来，世界上先进国家都在研究重组DNA技术和细胞融合技术，以创造新的抗生素产生菌，使之提高活力和产量。美国利用细胞融合技术使青霉素发酵单位每年以8%的速度递增。中国科学院上海药物研究所研制成功青霉素G酰化酶基因工程菌，产酶水平比原工业生产菌提高10~15倍。中国医学科学院抗生素研究所利用基因工程和细胞工程，获得1-N-AHB卡那霉素A工程菌，投产后又使成本降低10倍。巴龙霉素（Paromomycin）工程菌投产后，产量比原菌株提高一倍。

目前临床上除大量应用抗细菌抗生素之外，抗肿瘤抗生素、抗真菌抗生素和抗原虫抗生素在临床应用也愈来愈多。抗真菌抗生素和抗原虫抗生素在农业上和畜牧业上的应用是广阔的，从而开辟了一条抗生素新的应用途径。

## (六) 酶制剂与酶抑制剂

目前已发现的酶有 2500 种, 在工业上制备的有 50 种, 大部分由微生物产生。有些是大规模生产的工业用酶, 如淀粉酶、蛋白酶; 有的是小规模生产的分析酶和诊断酶或直接用于医疗的酶, 如用于外科手术治疗的链球菌激酶 (streptokinase) 及链球菌脱氧核糖核酸酶 (streptidouras)。近年来, 在临床检验上开始采用酶学方法, 具有专一性强、快速灵敏、操作简便和适于自动化分析等特点。但是, 目前这些酶诊断试剂主要由动物脏器或植物组织中提取。由于资源限制和提取精制的费用高, 所以需要努力寻找微生物酶, 发展微生物发酵法制取酶制剂。

## (七) 免疫增强剂 (Immunopotentiator)

免疫增强剂有免疫增强作用, 并已确认有抗肿瘤、抗病毒作用的代谢产物很多。其中属于微生物发酵产物和菌体提取成分等来源的物质也不少。

来源于细菌的有: 由酿脓链球菌 (*Streptococcus pyogenes*) 形成的细菌制剂 OK-432 (1967); 由小棒杆菌 (*Corynebacterium parvum*) 形成的制剂; 由粪链球菌 (*Streptococcus faecalis*) 形成的 TH69 制剂; 结核杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) 细胞壁成分 BCG 以及由结核杆菌 (*M. iuber culosis*) 得到的阿拉伯甘露聚糖等。

来源于放线菌的 9-MS 是从浅多色链霉菌 (*Streptomyces pluricolor escens*) 类似的放线菌 (*Streptomyces* sp. S-885) 的发酵液分离精制的戊二酰亚胺类抗生素, 即 3-(5, 7-二甲基-2-羟基-4-氧化-6, 8-萘二烯) 戊二酰亚胺。

来源于真菌的 MYR 是近藤师家治等从仙台土壤中分离的绿僵菌 (*Metarhizium anisopliae*) 发酵液中分离精制的肽类抗生素, 其结构如下:

A. Arg-(OH) Arg-Orn-Thr-Orn-Lys-Tyr.

B. Arg-(OH) Arg-Orn-Thr-Orn-(OH) Arg-Tyr.

一般 MYR 中 A : B 为 1 : 1 混合。

大型真菌即蕈菌的抗癌作用早为人们所了解。首先报道的是 Anchel 于 1950—1952 年由 *Clitocybe illud es* 中提取的隐杯伞素 M. S (Illudin M. S)。它是一种具有抗菌、抗霉、抗癌作用的萜烯化合物。福冈等 (1968) 选取多孔菌科 (Polyporaceae) 的 10 种子实体的热水提取物, 进行了大量的抗癌试验, 发现裂蹄木层孔菌 (*Phellinus linteus*) 多糖抑制 S-180 实体瘤的效果显著。Fujil 等 (1978) 从香菇 (*Leutins edodes*) 菌丝培养液中分离并鉴定出新的抗肿瘤肽多糖 KS-2。在 1970 年前后, 对上述物质进行了研究, 发现得到了蕈菌多糖在结构上大多为葡聚糖, 如蘑菇多糖 (Leutinan) 是以 3 个  $\beta$ - (1-3) 键结合的葡萄糖联成糖链; 裂蹄菌素 (Schizophyllan) 是 3 个  $\beta$ - (1-3) 键结合的葡萄糖与另一个  $\beta$ - (1-6) 键的葡萄糖结合形成分枝结构。当然也有例外, KS-2 多糖的主要结构是以  $\alpha$  键相连的甘露糖, 并含有少量由丝氨酸、苏氨酸和缬氨酸组成的多肽。实验表明, 这些多糖或多肽是一类对细胞无毒的免疫增强剂。

从蕈菌的深层发酵液中, 还可提取许多其他有用的代谢产物, 如抗生素、稀有氨基酸、酶等物质, 在医药和食品工业中有着广阔的应用前景。

## § 1.2 筛选产生代谢产物的微生物

### 一、微生物资源

自然界中微生物资源异常丰富, 土壤、水体、空气、动植物的腐败残骸都是微生物的主

要栖居和生长繁殖场所。微生物种类之多，至今仍是一个难以估测的未知数。尽管土壤中各种微生物含量的变化很大，但每克土壤的微生物量大体上有一个十倍系列的递减规律：细菌（ $\sim 10^8$ ）>放线菌孢子（ $\sim 10^7$ ）>霉菌孢子（ $\sim 10^6$ ）>酵母菌（ $\sim 10^5$ ）>藻类（ $\sim 10^4$ ）>原生动物（ $\sim 10^3$ ）。由此可见，土壤中所含微生物数量之大，尤以细菌为多。据估计，耕作层土壤中，细菌湿重约为土壤有机物质的1%左右。通过土壤微生物的代谢活动，可以改变土壤的理化性质，进行自然界的物质转化。

在筛选抗生素和其他生理活性物质时，过去以放线菌、霉菌、细菌为主要对象，最近扩展到担子菌和其他新的微生物领域。从整体看，主要的微生物类群是有特征性的代谢产物。

### （一）放线菌

根据1978年统计，在当时已发现的5128种抗生素中，有3165种为放线菌所产生，占总数的61.70%。在放线菌中，链霉菌属（*Streptomyces*）又占首位，占放线菌产生的抗生素的87.50%。由于放线菌产生的抗生素结构多种多样，抑制对象范围广，因此一直是研究新抗生素工作者的主攻方向。此外，放线菌还是多种酶如葡萄糖异构酶、蛋白酶以及维生素（ $B_{12}$ ）的产生菌。

以前，为了从放线菌中筛选抗生素，通常从土壤中分离有良好气生菌丝的链霉菌，包括轮生链霉菌（*Streptomyces verticillium*）。最近人们对一些新的放线菌也产生了浓厚的兴趣。例如小单胞菌属（*Micromonospora*）和诺卡氏菌属（*Nocardia*）等，已取得实际效果。作为新的 $\beta$ -内酰胺类抗生素而引起人们瞩目的诺卡杀菌素（Nocardicin）和具有强抗癌活性（抗白血病）的祥环丝裂菌素（Ansamitocin），是从诺卡氏菌属放线菌的培养液中分离出。1971年，Kupchan等发现祥环丝裂菌素与美登素（Maytansines）有类似结构。美登素是从卫矛科灌木 *Maytenus serrta* 及 *M. buchnaii* 等中提取出来的。另外，产生孢囊的游动放线菌科（Actinoplanaceae）作为工业微生物在管理上有一定困难，但由于它们中的某些种的代谢产物独特，所以成为筛选对象而引起人们的重视。

### （二）细菌

微生物之间的拮抗作用最早是在细菌之间发现的，所以从细菌中提取抗生素的试验最早。革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌如枯草杆菌（*Bacillus subtilis*）、肠道杆菌（*Baeterium entericum*）、绿脓杆菌（*Bacillus pyocyanens*）、多粘杆菌（*Bacillus polymyxa*）和芽孢杆菌（*Bacillus cohn*）等都可产生抗生素。细菌产生有实用价值的抗生素大多是多肽类（polypeptides）物质，如杆菌肽（Bacitracin）、粘杆菌素（Bacillin）、多粘菌素（Polymyxin）等。细菌也会产生一些其他类别的抗生素，如由环状芽孢杆菌（*Bacillus circulans*）产生的氨基糖苷类抗生素丁酰苷菌素（Butirosin）。此外，细菌还是醋酸、乳酸，多种氨基酸和多种酶的产生菌。

### （三）酵母菌

酵母菌是一群以芽殖为主的单细胞真核微生物，在自然界分布很广，主要生长在偏酸性的含糖环境中。例如，在水果、蔬菜、蜜饯的表面和在果园土壤中最为常见；此外在油田和炼油厂附近土层中也很容易分离到能利用烃类的酵母菌。

酵母菌的种类很多。千百年来，酵母菌及其发酵产品大大改善和丰富了人类的生活，例如，乙醇及饮料酒的生产；甘油的发酵，石油及油品的脱蜡；饲用、药用或食用单细胞蛋白的生产；从酵母菌中提取核酸、麦角甾醇、辅酶A、细胞色素、核黄素、凝血质和维生素等生化药物。近年来，还将酵母菌尤其是酿酒酵母（*Saecharomyces cerevisiae*）作为遗传工程中

具有良好发展前途的受体菌。

#### (四) 霉菌

霉菌是一些丝状真菌的通称,往往在潮湿的气候条件下,大量生长繁殖,长出肉眼可见的丝状、绒毛状或蛛网状的菌丝体,在自然条件下,常引起食物、工农业产品的霉变和植物病害。在地球上,几乎到处都有真菌的踪迹。霉菌则是真菌的主要代表,它们的种类与数量惊人,在自然界分布非常广泛,也是人类在实践中最早认识并加以利用的微生物。近代工业广泛用霉菌生产酒精、有机酸、酶制剂、维生素、麦角碱、真菌多糖以及甾体激素转化和发酵饲料等,给人类创造了财富。

作为青霉素、头孢霉素为代表的抗生产菌,霉菌是极重要的一类微生物。霉菌的次级代谢产物与细菌和放线菌不同,大多为萜类化合物、甾类化合物和以莽草酸途径、甲羟戊酸途径为中间体的芳香族化合物。所以,很多研究者从霉菌中筛选这类化合物以作为放线菌的补充。由于霉菌好气性强,菌丝生长可以覆盖培养基表面,因此可以进行固体培养。在固体条件下,生成的某些代谢产物浓度很高,被认为是筛选新的生理活性物质的有效产生菌。

#### (五) 担子菌

担子菌多为大型真菌,也称蕈菌(mushroom)。随着人们对蕈菌的营养、药理作用的认识逐步深入,蕈菌在制药、食品、保健和饲料等许多行业的应用愈来愈广泛。传统的蕈菌生产方式是固体培养,通过制种和栽培,人们能够在固体培养基上培养菌丝体和子实体。蕈菌深层液体培养是在抗生素发酵技术基础上发展起来的,其发酵工艺沿用了传统的抗生素发酵工艺。从1948年至今,人们已筛选出50多种适于深层发酵的蕈菌。国内能进行深层培养的有20多种,主要有双孢蘑菇(*Agaricus bisporus*)、蘑菇(*A. compestris*)、蜜环菌(*Armillaria mellea*)、发光假蜜环菌(*Armillariella tabescens*)、美味牛肝菌(*Boletus edulis*)、铜式牛肝菌(*B. aereus*)、鸡油菌(*Cantharellus cibarius*)、毛柄金钱菌(*Collybia velutipes*)、毛头鬼伞(*Copinus comatus*)、灵芝(*Ganoderma lucidum*)、猴头菌(*Hericiun erinaceus*)、香菇(*Leuticus edodus*)、粉褶环柄菇(*Lepiotanaueina*)、高环柄菇(*Lepiota procera*)、赫色马勃(*Lycoperdon umbrinum*)、大秃马勃(*Calvatia gigantea*)、平菇(*Pleurotas ostreatus*)、美味侧耳(*Pleurotas sapiclus*)、凤尾菇(*Pleurotus sajorcaju*)、鲍鱼菇(*Pleurotas abalone*)、金针菇(*Flammulina velutipes*)、金顶菇(*Pleurotus citrinopilcatus*)、银耳(*Tremella fueiformis*)、黑木耳(*Auricularia auricula*)、草菇(*Volvaviella volvacea*)、茯苓(*Poria cocos*)。

### 二、利用微生物资源的新趋势

#### (一) 探索微生物资源的新领域

以获得新物质为目的,正把以前未曾注意到的微生物作的筛选对象。

就微生物类群来说,有假单孢菌类(Pseudomonads)的假单孢菌属(*Pseudomona*)、产碱菌属(*Alcaligenes*)、不动杆菌属(*Acinetobacter*)等;棒状菌类(Coryneform bacteria)的棒杆菌属(*Corynebacterium*)、节杆菌属(*Arthrobacter*)、粘细菌(*Myxobacteria*)、支原体属(*Mycoplasma*);担子菌纲(Basidiomycetes)以及一些稀有放线菌等。

就微生物的环境来说,在寻找新的代谢产物时,试图从极端环境或异常环境,例如高海拔、冷环境、火山、深海、盐湖、喷泉、沙漠、油田等中分离微生物,并且期望从这样的环境中分离的菌株能产生新的代谢产物。因为自然界中还存在着在高温、低温、高酸、高碱、高盐、高压或高辐射强度等极端环境下生活的嗜热菌(thermophiles)、嗜冷菌(psychrophiles)、嗜酸菌(acidophiles)、嗜碱菌(basophices或alkalophiles)、嗜盐菌(halophiles)、嗜压菌

(barophiles)或耐辐射菌等,具有不同于一般微生物的遗传特性、特殊结构和生理机能,在冶金、采矿、开采石油以及生产特殊酶制剂等领域已发挥出重要作用,或具有巨大的潜在应用价值。人们期望从极端微生物中分离出更多的微生物新菌株,筛选出更多新的代谢产物。

## (二) 利用突变株

突变是指生物体内遗传物质的分子结构突然发生可遗传的变化,突变后的菌株称突变株。微生物突变的类型很多,如形态突变型、营养缺陷型、高产突变型、抗性突变型等。在工业生产中,有时在某一特定培养基上挑选菌落形态突变株是有利的。例如,在土霉素的筛选工作中,发现龟裂链霉菌(*S. rimosus*)在不断诱变过程中,随着产量的提高,菌落形态发生四次明显的突变:第一次由龟裂型菌落过渡到梅花型菌落;第二次由梅花型菌落变成颗粒型菌落;第三次由颗粒型小菌落变为车轮型菌落;第四次由车轮型又转变成草帽型。在适当的培养基配合下,发酵单位也由3000单位提高到30000单位。在工业生产上,还常用营养缺陷型突变来阻断某代谢途径,以积累某中间代谢产物;或用营养缺陷型克服协同反馈抑制,以积累分枝代谢途径中某一末端产物。例如,曾采用不产肌苷酸的枯草杆菌(*Bacillus subtilis*)作为出发菌株,经紫外线照射得到腺嘌呤缺陷型菌株,发酵能产生肌苷;经紫外线再次处理得到腺苷酸、甲硫氨酸双重缺陷型,肌苷酸的产量在原有基础上提高了一倍。以后又先后经两次用硫酸二乙酯处理得到四缺陷型(腺苷酸、甲硫氨酸、组氨酸、烟酰胺)菌株,肌苷产量又有大幅度提高。营养缺陷型突变株不仅在工业生产上可以被用来生产氨基酸、核苷酸类物质,并可用来了解细胞内合成氨基酸和核苷酸等类物质的生物合成途径。产量突变及其他突变类型,在生产实践中也异常重要。

最近,有很多用突变株获得新的代谢产物的报道。利用特养型(ldotroph)菌产生杂交霉素(Hybrimycin)就是一个有代表性的例子,已广泛引起人们的注意。即从新霉素(Neomycin)产生菌中选育出2-脱氧链霉素阻断突变株,培养该突变株时,在培养基中添加2-脱氧链霉素类似物,从培养液中分离出新的抗生素即杂交霉素。阿霉素(Striamycin, 14-羟基柔红霉素)由柔红霉素产生菌波蜜链霉菌(*streptomycin peucetius*)的突变株产生,因其抗癌活性高而用于临床。

## § 1.3 微生物分离与纯化

微生物分离技术,从发现到不断改进,大大推动了微生物学的发展。随着科学技术的发展,显微操作技术的出现使得能用机械方法分离微生物。这项技术不仅在微生物遗传学方面,而且在各个领域都受到重视。微孔滤器的发明,对浓缩微生物样品起到重要作用,可以分离比细菌更小的微生物,如蛭弧菌(*Bdellovibrio*)。另一方面,生化试剂如氨基酸、核酸、维生素等的大量供应,使最初认为无法分离的微生物被分离成纯种。可以说,微生物学是随着微生物分离技术的发展而发展起来的。

### 一、微生物分离与纯化的原理

在自然界,除了极特殊的情况外,不同种类的微生物绝大多数都是混杂生活在一起的,而且它们往往处于一种同等数量相混的状态。因此要从其中分离所需的特定微生物种非常困难。尤其当一种微生物存在的数量与其他微生物相比非常少时,更是如此。这种获得微生物纯培养的方法称为微生物的分离与纯化。

为了获得某种微生物的纯培养,一般是根据该微生物对营养、酸碱度、氧等条件要求不

同，提供适宜的培养条件或加入某种抑制剂，造成只利于该微生物生长而抑制其他微生物生长的环境，从而淘汰不需要的微生物，分离纯化需要的微生物，直至得到纯菌株。

通常，工业微生物菌种的分离与纯化，根据目的不同，样品的来源也各异，用于分离的样品有：

(1) 在自然界，土壤、水体、空气、人及动、植物体中，到处都有微生物存在。特别是土壤，是微生物生活的大本营。土壤中生活的微生物无论数量或种类都极其丰富。因此土壤是开发利用微生物资源的重要基地，可以从其中分离、纯化许多有特殊功能或能产生新的代谢产物的有用菌株，开拓工业微生物的新领域、新产品。

(2) 被污染的生产及科研用菌。由于某种原因，菌种被其他微生物污染，为了获得纯种，根据污染菌与原有菌种的区别及污染程度，选择适当的分离方法进行分离。

(3) 在长期生产实践中，生产菌常常发生某些自然变异。例如，控制产量的基因发生负突变，就引起产量下降；控制孢子生成的基因发生负突变，则使菌种产孢子的性能下降。而且经常处于旺盛生长状态的细胞，比处于休眠状态的细胞发生突变的机率要大得多。尤其是在一定条件下，群体多次繁殖，可使退化细胞在数量上逐渐占优势，于是退化性状的表现就更为明显，最终导致菌种衰退。通过菌种的分离与纯化，可以把退化菌种细胞群体中一部分仍然保持原有性状的单细胞分离出来，经过扩大培养，就可获得纯种，恢复原菌株的典型性状。

(4) 根据需要采用诱变、杂交、原生质体融合及基因工程等手段对生产菌进行改良，使之获得比原菌株更为优良的性状。要达此目的，必须选用合适的分离方法。

## 二、新种分离的程序

微生物菌种资源的开发和应用前景十分广阔。但是，要从浩瀚的自然界分离和筛选出优良的生产用菌种，绝不是一件容易的事。链霉素发现者 S. A. Waksman 的研究小组曾从土壤中分离出约 1 万株放线菌，发现其中有 1000 株对预定实验菌有拮抗作用，但只有 100 株具有较好的液体发酵性能。经过大量的工作，又从其中筛选出 10 株产链霉素性能较好的菌株，最后才挑选出一株有生产价值的链霉素产生菌——灰色链霉菌 (*Streptomyces griseus*)。

新种的分离与筛选，不仅要把混杂的各类微生物有效地分开，而且还要依照生产实际要求、菌种自身的特殊性，有的放矢地采用各种分离方法，快速准确地把所需要的微生物从中挑选出来。新种分离、筛选大致分为采样、增殖（富集）培养、分离鉴定、性能测定等步骤。

### (一) 采样

根据分离筛选的目的、微生物的分布概况、菌种的特性及其与外界环境的关系等，决定采样地点。如果不知道生产某种产品的微生物的种类或特性，一般以土壤为样品进行分离。有机物较多的土壤，微生物数量也较多。在田园与耕作土壤中，以细菌和放线菌为主；在富含动、植物残骸的土壤和沼泽地中，酵母菌和霉菌较多。

### (二) 增殖培养

增殖培养是在与所需要富集的微生物的性质相应条件下，使特定微生物迅速繁殖，而达到富集分离的目的。如果样品中所需的菌种类型本来就多，就无需增殖而可以直接分离。如果一次增殖数量太少，还可以再次或多次进行增殖培养，直至达到分离要求。可以依据菌种特性，人为地加入一定的限制因素，使所需菌种增殖（富集）后，在数量上占优势，以便容易分离。

### (三) 纯种分离

通过增殖培养还不能得到纯种，因为样品本身含有不少种类的微生物。为了获得所需微



生物纯种，增殖培养后还必须进行分离。经过反复地初筛和复筛，检查确认为纯种后，依照分类学方法，进行必要的生理生化鉴定。

#### (四) 生产性能测定

要想得到较为理想的生产 and 科研用菌种，还需要进行一系列的生产性能测定，通过比较，才能筛选出性能稳定、符合生产要求的高产菌株。新种分离与筛选的程序如图 1—3 所示。

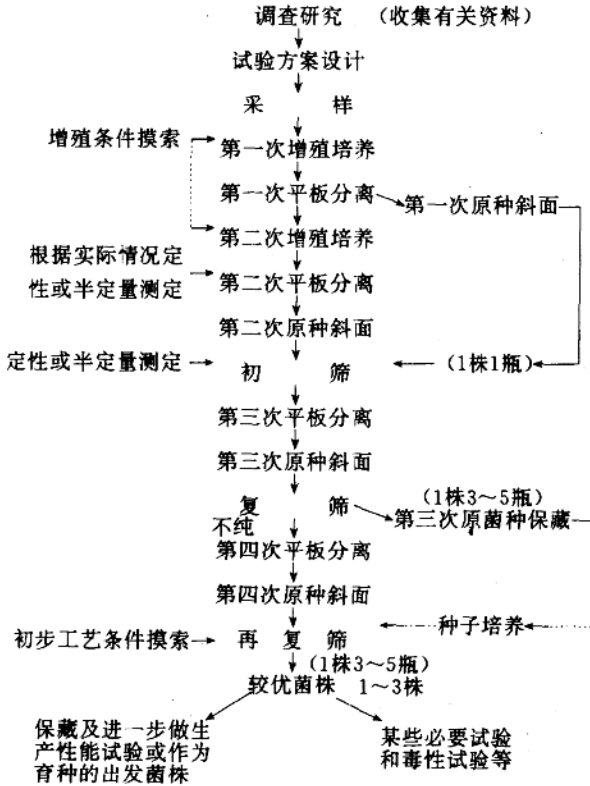


图1—3 新菌种分离与筛选的一般程序

### 三、新种分离的方法

分离微生物的方法很多，但都有一定的局限性，因此也各有利弊。平板稀释分离法（包括稀释涂布平板法、稀释混合平板法和平板划线分离法）是分离纯化微生物最常用的方法。这个方法操作简便，而且可以从样品中分离到较多种类的微生物。其操作方法如下：

(1) 将土壤或水体样品放入加有乳化剂的无菌水中，经充分振荡，使样品均匀分散，制成稀释悬浮液。

(2) 吸取 1 毫升上清液到 9 毫升稀释悬浮液中（或吸取 0.5 毫升上清液到 4.5 毫升稀释悬浮液中）依次按 10 倍稀释法稀释。根据具体情况，可以从  $10^{-1}$  稀释到  $10^{-10}$  不等。根据各类微生物在样品中的数量多少，选择经过适当稀释的悬浮液接种。一般真菌采用的稀释度为  $10^{-1} \sim 10^{-3}$ ，放线菌为  $10^{-3} \sim 10^{-5}$ ，细菌为  $10^{-4} \sim 10^{-6}$ 。

(3) 稀释悬浮液接种，可采用如下几种方法：

①混菌法：吸取 1 毫升稀释悬浮液于直径 9 厘米的无菌培养皿中，然后倾注已熔化并冷却至  $45^{\circ}\text{C}$  的选择性培养基约 15 毫升，与培养皿中的样品悬浮液充分混匀，待凝固后倒置保温