

编号: (75)005

出国参观考察报告

日本微生物研究概况

科学技术文献出版社

出国参观考察报告

日本微生物研究概况

(只限国内发行)

编辑者: 中国科学技术情报研究所

出版者: 科学技术文献出版社

印刷者: 中国科学技术情报研究所印刷厂

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经销

开本 $787 \times 1092 \cdot \frac{1}{16}$ 3.5印张 85千字

统一书号: 13176·3 定价: 0.20元

1975年9月出版

毛主席语录

列宁为什么说要对资产阶级专政，这个问题要搞清楚。这个问题不搞清楚，就会变修正主义。要使全国知道。

自力更生为主，争取外援为辅，破除迷信，独立自主地干工业、干农业、干技术革命和文化革命，打倒奴隶思想，埋葬教条主义，认真学习外国的好经验，也一定研究外国的坏经验——引以为戒，这就是我们的路线。

目 录

一、菌种保藏	(1)
二、微生物分类	(2)
三、抗菌素的研究和生产	(6)
四、酶的研究和应用	(12)
五、微生物遗传学	(21)
六、石油发酵	(31)
(一) 菌体蛋白	(32)
(二) 由正烷烃生成有机酸及其他	(37)
(三) 特殊石油制品的微生物转化	(41)
七、废水处理	(42)
八、细菌冶金	(47)
九、技术设备概况	(48)

附录 I 访问单位

附录 II 《国际链霉菌计划》(ISP) 所用的培养基

日本微生物研究概况

中国科学院微生物考察组

中国科学院微生物考察组一行六人应日中文化交流会的邀请，于1974年10月11日至11月1日赴日本访问。期间，共参观访问了东京、京都、大阪等地区的三所大学、十四个研究所和四个发酵工厂（见附录I）。

遵照毛主席关于“独立自主、自力更生”和“洋为中用”的教导，考察组将在日本参观访问所见分专题整理汇报如下，供参考。由于访问时间较短，参观单位较少，加之，考察组成员水平所限，所介绍的情况在广度和深度上都是不够的，不当之处，希批评指正。

一、菌种保藏

日本保藏菌种的机构有30多个，专业不同，规模各异。我们参观了几个比较重要的工业微生物保藏单位，一般设备都是具备的。除通风良好的无菌操作室（接种室）、不同温度的温室、温箱、冷室、冰箱、冷冻干燥器等以外，还有低温实验室、低温离心机、适温测定仪、超低温设备以及单孢分离器等装置。保存方法通常以琼脂斜面和冷冻干燥为主，再配合应用液体石蜡、沙土管等。斜面定期移植为久经考验的传统保藏方法，但有不少缺点，如费工、菌种易生变异、易于污染或弄错。生孢子多的菌种适于沙土保存。不生孢子的以液体石蜡保存为宜。通常以冷冻干燥法效果最好。根据工业技术院微生物工业技术研究所菌种保藏室统计，细菌冷干保存6年，存活率达80—90%，有些半知真菌冷干保藏存活率不高，正在试用其他方法。各类菌种用固体氮冷冻到零下160—170℃超低温保存，效果很好。

大阪发酵研究所是专门保存工业微生物菌种的机构。世界各国的菌种大部都有。1972年版的菌种名录约含8,600株菌：丝状真菌（大部是霉菌，少数是蘑菇等）约5,000，酵母1,800，细菌1,000，放线菌800。此外，还有20余种噬菌体。据说，近年来又有所增加，将达9,000株。这些菌种全部公开出售。1972年每只标价，对非谋利单位，国内1000日元，国外1500日元；对商业单位，国内3000日元，国外4000日元。最近又涨价，国外分别为2,000和5,000日元。值得提到的是，该所邮寄菌种用小安瓿管装液体培养，纸盒包装，小巧灵便，比我们通常用的试管、木盒经济多了，也可大大减轻邮递的负担。该所共有22人，除保藏菌种外，还研究这些微生物的分类鉴定、生理、遗传等。

微生物工业技术所菌种保藏室负责保存日本专利菌种，只包括丝状真菌、酵母、放线菌和细菌。法律规定，申请专利之前，必须先将菌种交该所保存1年3个月不变，时常从收到菌种到专利批准需要5年，专利有效期15年。因此每株菌至少保存20年。现在保存菌种将近一万株，每年出入经手也约一万株，而该室只有4个工作人员。规定专利菌种只售与本国单

位, 不卖给外国人, 如外人需要, 可託日本友人转购。

东京的微生物化学研究所存有《国际链霉菌计划》研究过的 460 种链霉菌, 名单已送给考察组。

东京的科研化学公司保存的放线菌菌种比较齐全, 根据菌种管理员清野昭雄提供的名单, 共有 37 属 826 种 969 株 (表 1)。标明可以免费赠送, 但更希望与其他单位交换。各属的种数和株数列于表 1。必须指出, 表内的放线菌属所含各种都不是嫌气的真正放线菌, 而是苏联著者以放线菌属名发表的链霉菌菌种。因此后一属实际上为 658 种 769 株。如将轮丝链霉菌属的菌也归入链霉菌属, 这属菌的种和株数就更多了。

表 1 科研化学公司保存的放线菌

属 名	胞壁型	种 和 株 数	属 名	胞壁型	种 和 株 数
<i>Actinobifida</i> 两歧放线菌	III, IV	4(5)	<i>Micromonospora</i> 小单孢菌	II	18(20)
<i>Actinomadura</i> 马杜拉放线菌	III	5	<i>Micropolyspora</i> 小多孢菌	IV	3
<i>Actinomyces</i> * 放线菌	I	96	<i>Microtetrastora</i> 小四孢菌	III	4
<i>Actinoplanes</i> 游动放线菌	II	7	<i>Nocardia</i> 诺卡氏菌	IV	18(23)
<i>Actinopycnidium</i> 袍器放线菌	I	1	<i>Oerskovia</i> 厄氏菌		2
<i>Actinosporangium</i> 孢囊放线菌	I	1	<i>Pilimelia</i> 发仙菌	II	2
<i>Agromyces</i> 土壤霉菌		1	<i>Planobispora</i> 游动双孢菌	III	2
<i>Amorphosporangium</i> 无定形孢囊菌	II	1	<i>Planomonospora</i> 游动单孢菌	III	3
<i>Ampullariella</i> 小瓶菌	II	4	<i>Promicromonospora</i> 原小单孢菌		1
<i>Chainia</i> 钦氏菌	I	13(14)	<i>Pseudonocardia</i> 假诺卡氏菌	IV	2
<i>Dactylosporangium</i> 指孢囊菌	II	2	<i>Rothia</i> 罗氏菌		1(2)
<i>Dermatophilus</i> 嗜皮菌	III	2	<i>Spirillospora</i> 螺孢菌	III	1
<i>Elytrosporangium</i> 鞘孢囊菌		1	<i>Sporichthya</i> 鱼孢菌	I	1
<i>Geodermatophilus</i> 地嗜皮菌	III	2	<i>Streptomyces</i> 链霉菌	I	562(673)
<i>Intrasporangium</i> 间孢囊菌		1	<i>Streptosporangium</i> 孢囊链霉菌	III	11
<i>Jensenia</i> 金森菌		1	<i>Streptoverticillium</i> 轮丝链霉菌	I	25(28)
<i>Microbispora</i> 小双孢菌	III	10(12)	<i>Thermoactinomyces</i> 高温放线菌	III	5(6)
<i>Microechinospora</i> 小棘孢菌		1	<i>Thermomonospora</i> 高温单孢菌	IV	4
<i>Microellobosporia</i> 小耳孢囊菌	I	4	<i>Thermopolyspora</i> 高温多孢菌		4
种和株总数					826(969)

*实际上都是链霉菌

二、微生物分类

(一) 放线菌的分类方法和系统

大阪教育大学的信夫隆治教授, 以植物学的观点研究放线菌分类学多年。从 1954 年就陆续发表论文, 建立了一些新种, 1965 年发表了一本轮生链霉菌的专论, 1972 年又发表了《链

霉菌科分类学指征的研究》，介绍了放线菌分类学的历史和以往各家的分类系统。又对于形态、生理和培养特征等进行了详细的探讨，工作细致，有参考价值。

科研化学公司菌种管理员清野昭雄也搞放线菌分类，他介绍了美国新泽西州鲁特格斯大学微生物所办学习班用的《用化学方法划分放线菌各属》的两套操作规程，包括细胞壁成分分析和诺卡氏菌及其近似微生物细胞所含枝菌酸 (mycolic acids) 分型的方法，可以作为参考。

1. 放线菌胞壁化学分析

放线菌细胞壁成分分析现已逐渐成为划分属的必要的资料。放线菌的细胞壁除都含有较多的丙氨酸、谷氨酸、氨基葡萄糖和壁酸 (muramic acid) 外，不同的菌还含有不同的主要组分。大部可归入 4 个型，个别的属和种还有特殊的化学组分 (表 1, 2)。因此，必须鉴别细胞壁所含的某些氨基酸和糖类。

表 2 放线菌细胞壁的主要组分

胞 壁 型	主 要 组 分*
链霉菌 <i>Streptomyces</i> 型或 I 型	L-DAP**甘氨酸
小单孢菌 <i>Micromonospora</i> 型或 II 型	meso-DAP 甘氨酸，可能还有羟基-DAP
马杜拉放线菌 <i>Actinomadura</i> 型或 III 型	meso-DAP
诺卡氏菌 <i>Nocardia</i> 型或 IV 型	meso-DAP，阿拉伯糖、半乳糖
厄氏菌 <i>Oerskovia</i>	赖氨酸、天门冬氨酸、半乳糖
牛型放线菌 <i>Actinomyces bovis</i>	赖氨酸、天门冬氨酸
衣氏放线菌 <i>Actinomyces israelii</i>	赖氨酸、鸟氨酸
土壤霉菌 <i>Agromyces</i>	二氨基丁酸 (DAB) **、甘氨酸
游动枝菌 <i>Mycoplana</i>	meso-DAP、多种氨基酸

*全部细胞壁制品都含有多量的丙氨酸、谷氨酸、氨基葡萄糖和壁酸 (muramic acid)

**DAP = 2,6-二氨基庚二酸。DAB = 2,4-二氨基丁酸

(1) 氨基酸分析 主要要区别所含的二氨基庚二酸是什么型的，是左旋的 L-2, 6-diaminopimelic acid (简称 L-DAP)，还是内消旋的 meso-DAP (后者不必与右旋的 D-DAP 相区别)。此外，还须鉴别甘氨酸、赖氨酸、天门冬氨酸、鸟氨酸以及二氨基丁酸 (2, 4-diaminobutyric acid 简称 DAB)。整个细胞或菌丝体用 6 个当量的盐酸装硬玻璃管封闭，100°C 沙内水解 18 小时，过滤，冲洗，干燥。水溶液点样，以标准 DAP 和其他氨基酸为对照进行下行纸层析，溶剂为甲醇：水：10NHCl：吡啶 (按体积 80:17.5:2.5:10)。用含 0.4% 茚三酮的水饱和丁醇喷洒以显色，DAP 斑点呈橄榄绿色，褪色后变黄；其他氨基酸斑点呈绛红或蓝色。在纸谱上，DAP 比其他氨基酸移动慢得多，其比移值 (Rf)，如以 L-DPP 为 1，则 meso-DAP 为 0.8。

(2) 糖类分析 整个细胞或菌丝体用 1 个当量的硫酸在敞口管内沸水浴水解 1 小时，用氢氧化钡饱和溶液中和水解液至 pH 5.0—5.5，离心去掉沉淀，上浮液加氯仿防止杂菌生长，干燥，加水点样，以标准糖为对照进行下行纸层析。溶剂为正丁醇：水：吡啶：二甲苯 (按体积 5:3:3:4)。纸谱干后，用酸性酞酸苯胺喷洒。偶数碳糖如己糖，斑点呈褐色；单数

碳糖如戊糖，斑点呈粉褐色。各种糖的比移值，如核糖为1，则半乳糖为0.28，阿拉伯糖为0.55，马杜拉糖为0.63。

根据这份材料按胞壁化学成分划分的科属，再加上形态特征，我们初步拟定放线菌各科属检索表，列入表3。

2. 诺卡氏菌及其近似菌内枝菌酸型鉴别

诺卡氏菌、分枝杆菌和棒状杆菌的菌株，用一般的分类鉴定方法不易分清，因为它们的形态和胞壁成分都相似或相同。近年来，发现这3属菌的细胞脂肪内所含的枝菌酸不同：分枝杆菌的枝菌酸约含80个碳原子，诺卡氏菌的诺卡枝菌酸约含50个碳原子，棒状杆菌的棒状枝菌酸约含32个碳原子。热解后，第一种也就是真正的枝菌酸释放 C_{22} ， C_{24} ， C_{26} 型的脂肪酸，后两种枝菌酸则释放 C_{12} ， C_{14} ， C_{16} ， C_{18} 等较小的脂肪酸。因此，用热解法可把分枝杆菌与其他两属的菌分开，必须用气层析法才能把后两属菌明确分开。

以往主要是根据菌丝体是否断裂，有无孢囊、分生孢子单个或成链等形态特征划分放线菌各属。近年来，越来越多地应用化学方法进行分属，使放线菌分类学的根据更为充实，基础更加巩固，逐渐进入分子水平，面貌焕然一新了。

(二) 旋孢线霉的分类

大阪发酵研究所的横山多年研究寄生在窄叶型钝齿溲疏 (*Deutzia crenata* f. *angustifolia*) 活的叶子上的一种旋孢线霉。先定名为溲疏旋形菌 (*Helicospira deutziae*)。最近根据其营养菌丝体、分生孢子梗和分生孢子均无色而与前属分开另建立新属—无色旋形菌属 (*Hyalohelicospira* gen. nov. Yokoyama 1974)，以溲疏无色旋形菌 (*Hyalohelicospira deutziae* (Yokoyama) Yokoyama) 为模式种。著者拟定寄生在植物上的旋孢线霉各属检索表，列于表4。

表3 放线菌各科属检索表

- 一、菌丝体在各平面分裂，孢子有能运动阶段，胞壁Ⅲ型.....嗜皮菌科
Dermatophilaceae
 - 1. 人和动物皮肤寄生菌，胞壁含马杜拉糖*.....嗜皮菌属 *Dermatophilus*
 - 2. 土壤微生物，胞壁不含马杜拉糖.....地嗜皮菌属 *Geodermatophilus*
- 二、菌丝体只垂直于菌丝主轴分裂
 - A. 有孢囊.....游动放线菌科 *Actinoplanaceae*
 - a. 孢囊孢子能运动
 - 1. 胞壁Ⅱ型
 - (1) 孢囊浑圆或棒状，孢囊孢子浑圆.....游动放线菌属 *Actinoplanes*
 - (2) 孢囊形状很不规则，孢囊孢子时常不能运动.....无定形孢囊菌属
Amorphosporangium
 - (3) 孢囊瓶形，孢囊孢子杆状.....小瓶菌属 *Ampullariella*

* 马杜拉糖 Madurose = 3-0-甲基半乳糖

(4) 孢囊指状从生, 每个孢囊只含一行孢囊孢子……………指孢囊菌属
Dactyloporangium

2. 胞壁Ⅲ型

(1) 孢囊成行并列, 只含一个孢囊孢子……………游动单孢菌属 *Planomonospora*

(2) 孢囊杆状含一纵对孢子……………游动双孢菌属 *Planobispora*

(3) 孢囊球形, 孢囊孢子杆状、弯曲, 具侧生鞭毛……………螺孢菌属 *Spirillospora*

b. 孢囊孢子不能运动

1. 胞壁Ⅰ型。孢囊棒状, 只含一短孢子链……………小耳孢囊菌属 *Microellobosporia*
(有人主张归入链霉菌科内)

2. 胞壁Ⅲ型。孢囊近球形, 孢囊孢子浑圆或短杆状……………孢囊链霉菌属
Streptosporangium

B. 无孢囊

a. 胞壁Ⅰ型……………链霉菌科 *Streptomyces*

1. 气丝通常丰茂, 基丝一般不断裂

(1) 分生孢子链非轮生……………链霉菌属 *Streptomyces*

(2) 分生孢子链轮生……………轮生链霉菌属 *Streptoverticillium*

(3) 有菌核……………钦氏菌属 *Chainia*

(4) 有分生孢子器……………孢子放线菌属 *Actinopycnidium*

(5) 有假孢囊……………孢囊放线菌属 *Actinosporangium*

2. 气丝少, 一级菌丝体通常断裂……………类诺卡氏菌属 *Nocardioides*

3. 只有气丝, 无基丝……………鱼孢菌属 *Sporichthia*

b. 胞壁Ⅱ型。无气丝, 基丝上生单个孢子……………小单孢菌科 *Micromonosporaceae*

1. 基丝不断裂……………小单孢菌属 *Micromonospora*

c. 胞壁Ⅲ型……………高温放线菌科 *Thermoactinomycetaceae*

1. 基丝和气丝上形成单个孢子……………高温放线菌属 *Thermoactinomyces*

2. 气丝上形成纵对的孢子……………小双孢菌属 *Microbispora*
(二瓦氏菌属 *Waksmania*)

3. 气丝上形成4个孢子的链……………小四孢菌属 *Microtetraspora*

4. 气丝上形成短孢子链

(1) 有马杜拉糖……………马杜拉放线菌属 马杜拉型 *Actinomadura madurae*

(2) 无马杜拉糖……………马杜拉放线菌属 达松维尔氏型
Actinomadura dassonvillei

d. 胞壁Ⅳ型。无枝菌酸, 但可能有诺卡枝菌酸……………诺卡氏菌科 *Nocardiaceae*

1. 只在气丝上形成单个孢子……………高温单孢菌属 *Thermomonospora*

2. 孢子柄两歧分枝……………双歧放线菌属 *Actinobifida*

3. 在基丝和气丝上形成短孢子链……………小多孢菌属 *Micropolyspora*

4. 在基丝和气丝上形成柱形孢子链……………假诺卡氏菌属 *Pseudonocardia*

5. 形态多变化。可能无气丝, 两种菌丝都断裂。有诺卡枝菌酸。……………诺卡氏菌属
Nocardia

e. 胞壁非 I 至 IV 型, 无气丝, 只有基丝……………放线菌科 Actinomycetaceae

1. 胞壁含大量 2,4-二氨基丁酸。基丝断裂。无能运动小体。……………土壤霉菌属
Agromyces

2. 胞壁含大量赖氨酸

(1) 基丝断裂为能运动小体

i 固紫阳性……………厄氏菌属 *Oerskovia*

ii 固紫阴性……………枝动菌属 *Mycoplana*

(2) 微量好气至嫌气, 人和动物寄生菌……………放线菌属 *Actinomyces*

本表内缺一类重要的放线菌, 即与植物共生并能固定大气氮的弗兰克菌科 *Frankiaceae* 的弗兰克菌属 *Frankia*。这属菌内各种不易分离培养, 还缺乏胞壁成分的资料。

表 4. 植物寄生旋孢线霉 (*Helicosporae*) 各属检索表

1. 营养菌丝体、分生孢子梗和分生孢子有色…………… 2

2. 分生孢子梗发育不良, 分生孢子在横隔处缢缩, 圆酵母状……………旋角菌属
(*Helicoceras* = *Gyroceras*)

2. 分生孢子梗发育良好, 分生孢子不在横隔处缢缩, 弯曲或旋卷形…………… 3

3. 分生孢子梗聚合成孢梗束 (*synnema*) ……………带盘菌属
Trochophora

3. 与前不同…………… 4

4. 分生孢子梗单生。分生孢子的脐和在分生孢子梗上的着生痕显著加厚……………
……………拟旋形菌属 *Helicominopsis**

4. 分生孢子梗有分枝。分生孢子着生痕和脐不加厚……………
……………旋形菌属 (*Helicomina*)

1. 营养菌丝体、分生孢子梗和分生孢子无色…………… 2

2. 分生孢子梗发育良好。分生孢子不在横隔处缢缩, 弯曲或旋卷形。分生孢子着生痕和脐不加厚……………无色旋形菌属 *Hyalohellicomina*

三、抗菌素的研究和生产

考察组在访日期间, 参观了日本最大的抗菌素工厂——明治制果公司足柄工厂和综合性发酵工厂——协和发酵工业公司防府工厂, 访问了专研究抗菌素的微生物化学研究所和综合性研究单位——物理化学研究所、武田药品公司中央研究所以及东京大学应用微生物研究所抗菌素研究室等四个单位。另外, 还访问了日本抗生物质协议会事务局, 了解了日本抗菌素的生产情况, 参观了中央抗菌素药品质量检定单位——预防卫生研究所抗菌素检定室。参观访问的

*微生物所陈庆涛同志建议以下各属译名改为 *Helicoma* Corda 旋孢菌属, *Helicomina* Olive 寄生旋孢菌属, *Helicomycetes* Link 无色旋孢菌属, *Helicominopsis* 拟寄生旋孢菌属 *Hyalohellicomina* 无色寄生旋孢菌属。(我们如按拉丁文译名, *Helicoma* 和 *Helicomycetes* 可分别名为旋菌属和旋霉属)。

几个研究和生产单位在日本都具有一定的代表性，但由于时间较短，参观单位有限，只能对于日本抗菌素的研究和生产的现状和方向有个一般的了解。

(一) 日本抗菌素研究和生产的特征和水平

日本抗菌素起步迟于英美。1945年以前也曾研究过青霉素的生产，但第二次世界大战后从美国请来专家并进口了技术，抗菌素事业才开始发展。由于日本发酵工业技术有一定的基础，才能比较快地赶上来。发现了卡那霉素以后，又陆续找到多种新抗菌素。资本主义制度下以利润为目的的生产方式决定了日本以寻找新抗菌素为主的研究方向。因为青霉素、链霉素、四环素类等常用的老抗菌素，产量较大，市场竞争激烈，获利较难；筛选新抗菌素，取得专利，更可名利双收。各研究和生产单位大力筛选的结果，至今世界上40%以上的抗菌素都是日人发现的。但有些新抗菌素的疗效与已知抗菌素大同小异，因此日人发现的真正投入生产用于临床的抗菌素只占世界上生产的品种的10%多一些。

近年来，在日本通过微生物对抗菌素耐药机制的遗传学和生物化学的研究，阐明了耐药机制，从而改造卡那霉素等氨基糖苷类抗菌素的化学结构，获得了对耐药菌有效的新抗菌素（如3',4'-DKB）；发现和生产了灭瘟素、春雷霉素、多氧霉素、有效霉素等农用抗菌素以及自力（绦裂）霉素、争光（波莱）霉素等抗癌抗菌素，在这两方面处于领先地位，总之，日本抗菌素的研究和生产，虽起步较晚，但已达到世界先进水平。

(二) 日本抗菌素生产品种和产量的变化

大量使用抗菌素造成了一些不良的后果，如耐药菌的产生、体内微生物区系的改变、副作用的积累等。因此，临床上不断要求新的抗菌素，遂使生产品种不断发生变化。日本抗菌素的应用和生产可分为四个演变阶段：（1）青霉素、链霉素阶段，抗菌素临床应用初期，大量生产和使用这两种抗菌素是相当普遍的现象。（2）四环素类和氯霉素的时期。由于青霉素链霉素大量使用，产生了耐药菌。这两种抗菌素又有过敏和毒性问题，逐渐以四环素和氯霉素替代。（3）红霉素等大环内酯类抗菌素的时期。由于四环素类大量使用，耐药菌越来越多，氯霉素又有严重毒性，遂以红霉素等大环内酯类抗菌素代替。目前日本生产的大环内酯类抗菌素品种就有红霉素、竹桃霉素、柱晶白霉素、约瑟（交沙）霉素、螺旋霉素、明治制果霉素（Medecamycin）等七种。其总产量超过四环素类的总产量。由于氯霉素使用量减少，协和发酵公司放弃了以石油为原料发酵生产氯霉素的企图。近来，红霉素耐药菌渐增，这种抗菌素的临床效果已不如前。因此抗菌素的生产应用即将进入（4）半合成青霉素、半合成头孢菌素和氨基糖苷类抗菌素新衍生物的时代了。我国社会制度与日本不同，抗菌素的生产品种不一定与日本相同，但抗菌素临床上大量使用以后产生的某些客观规律是有共性的，日本抗菌素生产的品种及其产量的演变情况值得我们注意。

日本目前生产的抗菌素品种，仅人用的就有78种，比我国多。但有些，由于专利关系，一家生产的品种，另一家不能生产，因而时常生产大同小异的品种。有些是外国专利，与国外合作进行生产或进口原药加以分装。从抗菌素大类来看，个别品种除外，日本在生产的我园都能生产。抗菌素总产量，我国比日本多得多。但从品种组成和产量比例来看，有显著的差别。如日本青霉素类抗菌素中，半合成青霉素比一般的青霉素多，品种也多，头孢菌素的

产量和品种也比我国多。

(三) 抗菌素生产工厂的技术水平与技术改造的现状

资本主义制度决定了日本抗菌素生产以利润为目的，主要考虑的是市场和成本。成本中，原材料、动力和工资三大项费用占很大比例。日本抗菌素工业生产的技术工作的中心和技术改造都围绕着市场和成本来考虑。从明治制果公司足柄工厂和协和发酵工业公司防府工厂的现状来看，他们集中力量抓了“三化和三省”，值得我们注意。三化是：

1. 设备大型化

大设备大生产比小设备小生产成本低，但大设备生产抗菌素时，最大的威胁是发酵染菌。日本在发酵工艺上采取了以下措施尽量减少发酵染菌的危害：

- (1) 尽可能采用低浓度的液体培养基，发酵过程中进行补料。
- (2) 用柜式连续消毒器进行培养基的连续消毒。
- (3) 发酵空罐消毒尽量自动控制，消除操作引起的染菌。
- (4) 用喷射泵高压水冲洗发酵罐以利于减少培养基的堆积。
- (5) 用无油空压机供应空气。空气过滤流速控制为 $5 \text{ 米}^3/\text{厘米}^2/\text{秒}$ 。

一般采用比我国大的240或300吨的发酵罐（450马力，马达100转，罐高度/直径为18米/6米）进行发酵。以5吨体积的离子交换柱进行离子交换。

2. 操作机械化、自动化

为了节省劳动力减少工资费用，在生产流程中，除了免去需要繁重劳动的工序之外，尽量采用操作机械化、自动化。例如：

(1) 发酵过程中的温度、空气流量、溶解氧、酸碱度、搅拌转数、加油消沫等都采取了自动控制。但菌丝量、培养基中糖和氮、发酵单位等测试工作尚不能自动测定。

(2) 发酵罐罐顶上装有旋风气液分离器。由排气管逃出的发酵液，经过气液分离器分离后，又倒回发酵罐。不产生逃液，可以节省值班人员。

(3) 费劳动力较多的发酵液过滤，一般尽量减免或采用真空鼓式过滤器进行连续操作。如青霉素采取真空鼓式过滤器，通过一层硅藻土连续过滤。用对反提炼机（提炼工作量11吨/小时/台）进行提取。链霉素、卡那霉素等离子交换提取都免去过滤工序。连溶媒提炼的红霉素类也免除过滤工序。协和发酵工业公司防府工厂的螺旋霉素提炼方法是：发酵液经振动筛筛去硬块后，与甲基乙酰胺进行逆流混合，用高速碟式出渣离心机进行分离。螺旋霉素第二次提到甲基乙酰胺，再提入缓冲液。以同样方法，第三次提到甲基乙酰胺，浓缩得成品。由于使用了价廉的石油化工副产品甲基乙酰胺，采用不过滤提炼因而增加溶媒损耗对成本影响也不大。

(4) 离子交换提炼时的交换、洗脱、树脂活化等操作也都是自控。但还不是用电子计算机进行控制，而是通过预先试验，决定了一定的流速后，进行自控。

(5) 抗菌素效价的杯碟法生物测定，采用日本旭光精工公司创造的抑菌圈自动计算装置，用电子计算机进行自动计算测定。

(6) 半合成青霉素的原料——青霉素核的生产，采用酶解法，将青霉素酰胺酶固定在

Cephalex-醋酸纤维素上,进行连续裂解。

3. 一套设备生产品种多样化

哪个品种市场需要赚钱最多就生产哪个品种。因此,各工厂都生产多品种,一套设备轮流生产提炼方法相同的多种抗菌素。

三省是:

1. 省劳动力 操作机械化、自动化,都是省劳动力的措施。

2. 省原料

日本资源缺乏,原料昂贵,因而利用威士忌酒蒸馏渣、玉米浆等代替大豆或花生饼粉等做为氮源,用石油化工副产品甲基乙酐酮做为溶媒等都考虑到原料的充分利用。

3. 省动力

动力费用在抗菌素成本中约占1/3,为了降低成本,必须抓动力的节约。特别对电、水、通气量的节省比较重视。明治制果公司发酵罐总容量为2300吨,但空压机装置容量只有800立方米。其比例大约为1:0.3,而我国抗菌素厂发酵罐总容量与空压机装置容量比都在1:0.8—1:1.0以上。他们除在发酵罐中安有溶解氧自动测定装置外,还预先研究发酵过程每个阶段的需氧量与抗菌素产生的关系,以便于不同阶段向罐内通入不同的空气量,从而节省动力。

日本抗菌素工厂之间竞争很激烈,为了生存、赚钱,除在技术工作和技术改造方面抓了“三化三省”之外,在产量质量上也特别注意。为了减少产品中黑点白点等异物,无菌室的通风,除常规处理外,还加了一道电除尘设备以净化进入成品间无菌室的空气。武田药品公司中央研究所专设人工气候保存室,模拟热带地区、潮湿地区的气候条件,以观察药品的保存期限。据介绍,在温度34℃相对湿度95—98%的环境中保存3个月,两个重复结果,药品质量不变,则认为该药品能保存2年。

在三废处理方面,都设有活性污泥曝气池,分解发酵废液中有有机物质,使BOD达到国家标准后,放入河海。协和发酵公司除将BOD较低的发醇废液用活性污泥处理外,BOD较高的发醇废液,经过薄膜浓缩后,加入磷酸钙成为颗粒状有机肥料。

染菌率、发酵单位、提取收率等工业生产技术水平都属于保密范围。但从发酵罐总容量与抗菌素总产量的比例推算,除了个别品种的技术经济水平高于我国(如青霉素发酵单位为27,000单位)之外,总的来看,与我国不相上下,而从设备利用率来看,则低于我国的水平。

(四) 日本抗菌素研究工作的现状

资本主义社会制度决定了日本抗菌素研究工作也是以获得利润为目标。研究成功一个新产品,可以取得15年的专利权,任意提高价格。研究单位在专利有效期内,可得到按工厂出厂价格5%的专利费。因此,日本各有关研究单位都以开发新产品为中心任务。当前新产品研究的主要内容如下:

1. 新结构抗菌素的寻找

随着近年来改造抗菌素化学结构而取得各种新半合成抗菌素的进展,过去筛选新抗菌素的概念也发生了变化。根据专利法的规定,虽然在结构上大同小异的抗菌素也可以获得专利,但结构上相似的抗菌素可以从已知其结构的抗菌素,利用化学和生物学的方法获得。因

此,寻找新抗菌素的重点时常放在新化学结构抗菌素的筛选上。目前日本找到的新结构抗菌素有具聚醚结构的含盐霉素(Salinomycin)和双环霉素(Bicyclomycin)、绿色霉素(Viridomycin)等。其中双环霉素,虽抗菌活力低,但毒性小、结构新异,特别引人注目。目前正在集中力量改造其结构,企图获得高效的新抗菌素。

新抗菌素的早期鉴别,主要靠研究人员的工作经验。微生物化学研究所,根据产生菌的分类鉴定指征和抗菌素的抗菌谱以及对各种溶媒的反应等,创造出一套机械化的筛选仪器,能够比较快地测知所研究的抗菌素与某一已知抗菌素相似或相同还是新的抗菌素。据说,这套设备对经验较少的研究人员帮助较大。

理化研究所新抗菌素研究室,为了分离新的放线菌,在筛选培养基和土样处理方面,有所改进。如加大分离培养基中氯化铵、氯化钾或磷酸盐的含量或者使用pH12左右的含有碳酸钠的培养基分离嗜碱性放线菌。为了分离小单孢菌,用丙酮、二甲苯、酚等溶剂处理土样以减少真菌和细菌以及一般放线菌的污染,增加小单孢菌的出菌率。然后用pH8的酪蛋白淀粉培养基分离。

2. 已知抗菌素的改造从而获得抗耐药菌和疗效更高的抗菌素

半合成青霉素、半合成头孢菌素和力复霉素新衍生物等的研究工作,日本不如英美。武田药厂研制出来对绿脓杆菌和变形杆菌有效的半合成青霉素—Sulbenicillin与Carbenicillin相差不多。藤泽药厂出的半合成头孢菌素—Cefazolin,疗效与Cephathin和Cephalexin,相差无几。其母核的生产方法是按英国专利做的。日本企图用其他方法生产母核。如武田药厂中央研究所研究了从青霉素生产7DACA的方法,取得了专利,即将苄青霉素分子重新排列后制成Phenylacetyl 7DACA然后用大肠杆菌或枯草杆菌的乙酰酶切断苯乙酰侧链,得7DACA母核。利用混浊葡萄杆菌(*Gluconobacter turbidans*)或柠檬酸黄单孢菌(*Xanthomonas citricus*)的酶以90—95%的收率从7DACA和苯丙氨酸做成了Cephalexin。

在日本,研究工作做得最多的是,卡那霉素一类氨基糖抗菌素的化学结构改造,从而取得领先地位。特别是阐明了细菌对卡那霉素的耐药机制,是卡那霉素C'-6部位氨基的乙酰化和C'-3部位羟基的磷酸化以及C"-2, C"-3部位的腺苷化,从而获得了对耐药菌有效的3'-4'脱氧卡那霉素乙(3'-4'-deoxy-Kanamycin B简称DKB)并已开始工业生产。DKB的大量使用后,也有可能产生因C"-2, C"-3部位腺苷化而引起的耐药,因此准备改造C"-2, C"-3的化学结构。

1971年发现了丁基菌素Butyrosin A, B对卡那霉素耐药菌有效,注意到丁基菌素与卡那霉素的化学结构差异是,除了卡那霉素3-氨基-D-葡萄糖不同之外,还在于卡那霉素的 α -脱氧链霉胺(α -deoxystreptaurin)的C-1部位的胺基上结合了(s)-4-氨基-2-羟基丁基((s)-4-amino-2hydroxy-butyryl简称AHB)。因此,从卡那霉素A的C-1胺基结上AHB的新衍生物BB-K8(Amikacin),除对耐药菌有效之外,对变形杆菌也有较好的作用。此外,卡那霉素B的AHB衍生物以及改造核定霉素(Ribostamycin)结构制成丁基菌素和托布拉霉素(Tobramycin)等的研究工作在日本文也极为活跃。

3. 抗癌抗菌素的寻找研究

目前日本有关生物学科都在为解决肿瘤问题进行大量工作。抗菌素等天然物化学方向也以防治癌症做为主要目标。

(1) 寻找新的抗癌抗菌素

日本有关研究单位都认为筛选抗癌抗菌素的主要方法还是利用试验动物进行体内筛选, 利用微生物生化变株等体外筛选方法意义不大。体内筛选所需人力物力较多, 因此象大学的研究室等人力物力较少的单位, 一般难于开展这项研究工作。但理化研究所抗菌素室的铃木三郎认为利用大肠杆菌缺乏脱氧核糖核酸重组的变种 *E. coli Rec⁻* 可供筛选抗癌药物之用。根据该研究室经验, 争光(波莱)霉素和自力(丝裂)霉素都可用此法选出。但用 *E. coli Rec⁻* 选出来的抗癌抗菌素多数都属于争光霉素一类。利用核糖核酸依赖性脱氧核糖核酸多聚酶的筛选方法, 从理论上看来可以考虑, 但在实际应用上效果不大。

微生物化学研究所的抗癌抗菌素的筛选步骤如下: 在菌学部筛选各种抗菌素的产生菌时, 除观察对常规试验微生物的活性之外, 还观察引起吉田肉瘤的形态变化以了解其抗癌活性。然后结合其他项目的观察和研究人员的经验, 将其中有产生新抗癌抗菌素希望的菌种交与制癌物质部做进一步体内筛选。所用试验瘤为艾氏腹水瘤、艾氏固形瘤和血瘤 L1210 等 3 种。体内筛选, 重复两次有抗癌作用者, 加以发酵提取, 进行毒性试验和化学治疗系数的测定。选毒性小的(抗肿瘤作用虽强但毒性也大的不要), 进一步发酵, 提纯得结晶, 决定其化学结构。然后将此化合物制成同位素标记物质注射到感染动物体内, 观察并测定其在各组织中的分布、引起的细胞变化和疗效。该所研究人员说, 十年之内如有 3 个左右的新抗癌抗菌素能达到上述研究阶段就很不错了。

(2) 已知抗癌抗菌素的结构改造

为了降低已有的抗肿瘤抗菌素的毒性并扩大其抗癌谱, 正在开展自力(丝裂)霉素和争光(波莱)霉素化学结构改造的工作。协和发酵公司东京研究所认为自力霉素疗效比较令人满意, 因此改造的重点放在降低毒性方面。

微生物化学研究所研究波莱霉素各个组分的疗效和副作用, 从而不断修改这种抗菌素的产品规格。该所认为控制 A_2/B_2 的比例很重要, B_4 副作用大, 应尽量减少其含量。为了提高 A_2 的含量, 在发酵过程中加入 A_2 的前体, 使发酵液中 A_2 含量从 55% 提高到 82%, 加入 A_5 的前体, 可产生 100% 的 A_5 。加入 B_2 前体, B_2 含量从 26.7% 提高到 45%。同时还产生去胍基 B_2 , 但加入 A_1 和脱甲基 A_2 的前体, 则不能提高其含量。象 6APA, 7ACA 等半合成青霉素和头孢菌素一样, 用酶或化学方法裂解波莱霉素, 切断其侧链, 制成波莱霉素酸。以此为母核, 结上各种新的侧链, 获得新的波莱霉素, 已研究成功。利用镰刀霉的酶水解 B_2 得波莱霉素酸或将 A_2 脱甲基得脱甲基 A_2 , 再用化学方法切断其侧链, 也可制成波莱霉素酸。化学裂解方法收率较高, 利用此法做成波莱霉素核, 再用化学方法结合新的侧链制成多种新的争光霉素, 其中已有一种, 通过药理试验的考验, 即将送至临床试验。

(3) 寻找微生物来源的抗癌免疫物质

某些禾本科植物和真菌来源的多醣化合物具有增加体内抗肿瘤抗体的作用。但抗肿瘤免疫物质的研究中心是担子菌来源的多醣化合物。微生物化学研究所从担子菌的发酵液中得每立升 7 克产量的新的抗肿瘤的免疫物质, 其化学结构如图 1。这种物质使动物体的抗肿瘤活力提高 2—5 倍。

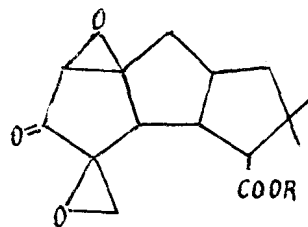


图 1

(五) 农用和畜用抗菌素

为了防治水稻的两大病害——稻瘟病和纹枯病，日本广泛使用农用抗菌素以利于减少公害。春雷霉素和灭瘟素（杀稻瘟素S）都能防治稻瘟病。前一种毒性低、无药害、产量较多，但容易产生耐药菌。更因为这是一种农医两用的抗菌素，耐药菌的发生尤不利于卫生医疗事业。灭瘟素副作用虽较大，但在制剂中加入钙离子后，副作用减少、不再发生药害，而且不易产生耐药菌，因此，这种抗菌素的生产一直未停。对纹枯病有效的多氧霉素和有效霉素都在工业生产。日本制造的有效霉素基本上是单一成份，只对纹枯病病原菌有作用。毒性低，比多氧霉素优越。但多氧霉素有多种成份，其中 R_1 为COOH基的组分对纹枯病有效，而 R_1 为 CH_2OH 基的组份对其他植物病害如交链孢（*Alternaria*）引起的果树黑斑病等有效。因此，正在用多氧霉素产生菌生产D，E，F以外的成份，专用于果树黑斑病的防治。

大部抗菌素用于禽畜饲养都有促进生长作用，此外还可以治病。因此在畜牧业中抗菌素的应用极为广泛。除了人用抗菌素可用于畜牧兽医外，还专生产畜用抗菌素如丰加霉素（Mikamycin），硫肽菌素（Thiopeptin）、玛碳霉素（Macarbomycin）。后一种抗菌素能防止耐药菌的传播，特别引人注意。

四、酶的研究和应用

(一) 酶法制造葡萄糖

日本酶法制造葡萄糖以参松工业公司为例。参松工业公司的发展是日本葡萄糖工业发展的缩影。

1. 历史 1916年参松公司在东京市深川区建立工场，最早开始了日本酸水解法生产液体葡萄糖；1925年在千叶建设葡萄糖工场；1930年正式开始生产结晶葡萄糖；1955年粉末水葡萄糖生产成功；1959年6月日本利用酶法生产葡萄糖首次成功；1960年理化学研究所提供技术，开始利用液体培养生产糖化酶；1965年建立无水结晶设备，生产无水结晶葡萄糖成功；1967年由工业技术院微生物工业技术研究所提供技术，为世界最早异构化糖（葡萄糖异构酶）在日本生产成功。

2. 参松千叶工场生产情况 每日投粉量为300吨，原料为甘薯淀粉、马铃薯淀粉和玉米淀粉；产品种类有粉糖、水糖、液体葡萄糖、有水结晶葡萄糖、无水 α 型和 β 型结晶葡萄糖、异构化糖等；总收率为100—105%。

酶的来源： α -淀粉酶，从外面购买来。葡萄糖淀粉酶，是本厂用黑曲霉变异株（不含转移葡萄糖苷酶）的液体发酵液，发酵培养基浓度为4—5%，糖化酶的活力为100克淀粉加酶液5毫升； β -淀粉酶外面购买（是由麦芽产生的）；葡萄糖异构酶由本厂生产固相化酶，产生菌是放线菌（链霉菌）。固相化条件是将产生葡萄糖异构酶的放线菌发酵液加热70—75℃10分钟，过滤，取其菌体，即成为可备多次使用的固相酶。

3. 酶法制造葡萄糖工艺流程（见图2）

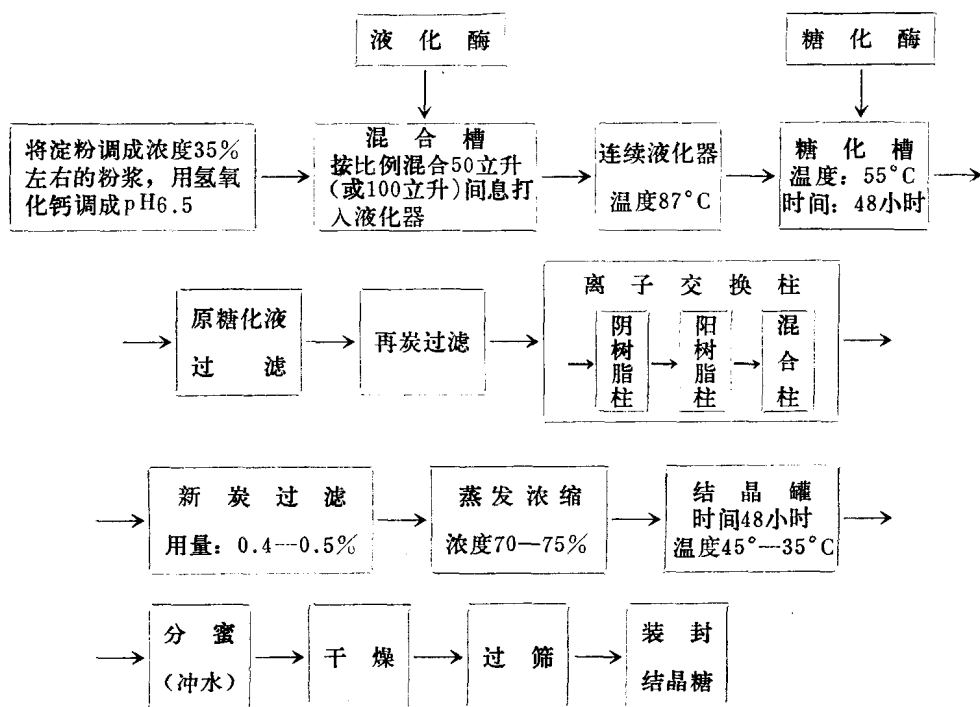


图2 酶法制造葡萄糖工艺流程

(1) 淀粉浆浓度为35% (W/W) 左右，用氢氧化钙调pH6.5，用氢氧化钙调pH解决了糖化液过滤的困难。

(2) 混合槽将淀粉浆和 α -淀粉酶液分别从两个管道加入混合槽（按比例加入），大约50—100立升左右一起打入第一次连续液化器（管式环形液化器，加入口是淋头式），液化温度87℃，时间约一小时，然后打入加压器，加压温度120—125℃，10—15分钟，降温打入第二次液化器，温度87℃， α -淀粉酶用量为一次液化用量的1/3，在第二次液化器中控制液化液的DE度18%左右为宜（甘薯和马铃薯的淀粉液化温度80℃就够了）。

(3) 糖化槽，每100克淀粉加5毫升糖化酶液，糖化温度为55℃，pH4.5—5.0，糖化时间48小时，糖化液DE度一般为97%。

(4) 无炭过滤，将糖化液不加活性炭先过滤一次；再炭过滤是用已用的活性炭加入糖液过滤。

(5) 离子交换，是将再炭过滤的糖液经过离子交换树脂柱，离子交换的顺序是，第一个柱是阴离子交换柱，第二个是阳离子交换柱，第三个是阴阳离子树脂的混合柱。

(6) 新炭过滤是用新炭加入糖液中，加热至90℃并搅拌约半小时，然后经板框压滤机过滤，新炭的用量为0.4—0.5%。糖液蒸发浓缩浓度为70—75%，一次完成。

(7) 结晶：结晶用卧式不锈钢罐，结晶糖液温度开始为45℃，随结晶时间下降，最后降至35℃，结晶时间48小时；

(8) 分蜜机1450转/分，每次分蜜重量约200—300公斤，离心时要冲水，这样有利提