

第一篇 总论

第一章

绪 论

一、发酵工程的沿革

世界上的发酵工程是从作为家庭工业的食品酿造业诞生开始的，具有悠久的历史。西方的啤酒、葡萄酒、面包、奶酪，东方的酱、酱油、米酒，中东地区的乳酸发酵产物等都是人类巧妙地利用尚不认知的微生物对多种果实和食物进行天然发酵后获得的产品。3000 多年前，中国史书上记载的用长霉的豆腐治疗皮肤病的医案，表明我们的祖先已经发现微生物体或其代谢产物的医疗价值。

发酵 (fermentation) 是由拉丁语“翻涌” (fervere, 亦可译为发泡) 派生来的，是指果实或食物发酵时产生的碳酸气泡鼓起翻动的现象。微生物学的鼻祖巴斯德研究酒精发酵的生理学意义时提出，发酵是酵母在无氧状态下的呼吸过程，是“生物体获得能量的一种形式”。近代对多种微生物的厌氧、需氧发酵的生理学研究表明，厌氧发酵是微生物体内提供能量的氧化还原反应，不需要氧的参与，同时形成多种代谢产物的生物化学过程；需氧发酵则是微生物体内进行的氧化还原反应需要氧的参与，同时产生若干种与微生物的生长繁殖相关和不相关的代谢产物的过程。

地球上有了生命活动，就有了发酵现象。发酵产物与人类生活密切相关，但对发酵现象本质的认识却是近 300 年的事。1675 年荷兰人吕文虎克发明了显微镜，首次用肉眼通过显微镜直接观察到细菌和酵母等微生物（当时称为微动物）。巴斯德的多项研究结果证实了，酒精发酵是酵母菌的生命活动过程产生的，认识到发酵现象是微生物在基质中进行的化学反应过程。他连续对当时的乳酸发酵、葡萄酒酿造、食醋制造等多种发酵现象进行了仔细的研究，明确提出这些不同类型的发酵是由形态上可以区别的各种微生物所引起的，即各种微生物在各自的发酵过程中表现出不同的化学反应过程，至此，人们对天然发酵的生理学意义有了认知。此时期的发酵是混合菌种的自发发酵。其后不久，布雷菲尔德建立了霉菌的分离与纯培养技术，柯赫等创立了细菌的分离与纯培养技术，汉逊等创建了酵母菌的分离与纯培养技术。从此，人类可以控制某种微生物的生命活动，并可进行单一微生物的发酵。

1897 年巴克纳 (Buchner) 阐明了微生物发酵中的化学反应本质。他用磨碎的酵母细胞制成酵母汁，加入大量的砂糖之后，发现有 CO_2 和乙醇的形成。这就说明酵母汁中含有具备发酵能力的物质，当时称为酒化酶。证明了酒精发酵是酵母细胞中的酶催化了一系列化学反应的结果。许多科学家相继对多种微生物体内的酶进行了深入研究。这

些研究成果为后来的发酵工艺研究和发酵机制的探讨奠定了坚实基础。

第二次世界大战之前，发酵的主要产品是酵母菌体、乳酸、柠檬酸、酒精、甘油、丙酮丁醇等。酵母菌体和有机溶媒的发酵过程研究的较多，取得很大进展，如面包酵母的发酵是个需氧过程，在丰富的麦芽汁培养基中，酵母菌生长迅速，培养液中的溶解氧很快被消耗尽，导致菌体生长停滞而产生乙醇。如果限制发酵开始时的麦芽汁浓度，可以降低酵母菌的生长速度，在发酵过程中少量多次的补入麦芽汁而控制菌体生长速度，就解决了因菌体生长速度过快造成的溶解氧不足的难题。这就是现在称作的补料分批发酵培养法。此种方法已在多种发酵工业中应用，获得良好的效果。在丙酮丁醇的厌氧发酵中，发酵前期较易受到需氧菌的污染，而在发酵后期又易受到厌氧菌的污染。早在第一次世界大战期间，由于制备炸药需要大量的丙酮，另外丙酮还大量用于制造人造橡胶，所以英国、加拿大、美国等研究其发酵技术。除了建造低碳钢的圆柱形发酵罐外，在生产中还采用了加压蒸汽灭菌技术、无菌接种技术，同时建立起了纯种培养技术，解决了丙酮丁醇发酵过程的杂菌污染问题。这不仅满足了当时市场上对丙酮丁醇的商业需求，更重要的是为以后的需氧纯种发酵工艺的研究奠定了基础。

第二次世界大战期间，需求大量的青霉素。当时的青霉素生产采用表面培养法，菌种的生产水平很低，易受到杂菌污染。科学家借鉴了丙酮丁醇的纯种厌氧发酵的培养技术。1941年研究深层培养法，建造了带有搅拌和通风装置的钢制发酵罐，采用了培养基和发酵设备的灭菌技术、空气的净化除菌工艺和无菌接种技术，制订和完善了发酵过程中的发酵液 pH、温度、营养物质浓度等监控参数，最终于 1943 年建立起完整的液体深层发酵技术。这是微生物发酵工业史上的重大变革和成就，也是微生物发酵工业兴旺发达的开端。为了提高青霉素生产菌种的生产能力，满足工业生产之需要，建立了改造微生物遗传特性的菌种选育技术。1940 年，希特利等人对青霉素的提取纯化进行了深入研究，从酸化后的发酵液中将青霉素提取到有机溶媒相中，再在中性条件下将青霉素转移至水相中。以后的试验证明这种简单的提取方法是一系列纯化工作的关键性一步，为工业生产提供了技术保证。上述的液体深层发酵技术和提取纯化技术，为后来发现的若干种抗生素的工业化生产奠定了技术基础。

青霉素在临床应用的奇异疗效，以及链霉素作为抗菌药用于肺结核病等的治疗获得令人震惊的效果，激发了世界各国的微生物学家、化学家及相关的学者从土壤微生物的代谢产物中寻找抗生素的研究热情。除了发现青霉素、头孢菌素 C 等 β -内酰胺类抗生素外，还发现若干类其他的抗生素。如氨基糖苷类抗生素，主要品种：1943 年美国科学家 Waksman 发现的链霉素，1957 年日本科学家梅泽滨夫发现的对耐药菌有效的卡那霉素，1963 年 Weinstein 发现的毒性较低的庆大霉素，1967 年美国礼来公司发现的对铜绿假单胞菌（绿脓杆菌）作用强且毒性低的妥布霉素。四环素类抗生素，主要品种：1948 年 Dugger 发现第一个可供口服的抗生素品种金霉素，1949 年 Finlay 发现了土霉素，1953 年 Doothe 发现了四环素，这类抗生素对革兰阳性菌、革兰阴性菌和某些大病毒等有抑杀作用，称为广谱抗生素。大环内酯类抗生素，主要品种：1952 年 McGuire 发现第一个有临床应用价值的红霉素，1957 年以后相继发现了柱晶白霉素、麦迪霉素、螺旋霉素等，均已用于临床治疗。1957 年 Sens 发现了安莎类抗生素的第一个成员利福

霉素，对其分子结构进行化学改造获得利福平等一系列衍生物，是治疗肺结核、麻风病的有效药物。20世纪60年代以来人们开发出若干种有效的抗肿瘤抗生素、抗病毒抗生素、杀虫抗生素和农牧业用抗生素等。抗肿瘤抗生素如丝裂霉素、柔红霉素、博莱霉素。抗病毒抗生素如阿糖腺苷、偏端霉素A（他利霉素）。农牧业上用的杀虫抗生素如盐霉素、莫能菌素、阿维菌素，农牧业上用的抗菌抗生素如春雷霉素、有效霉素、井冈霉素、安普霉素。上述均是有临床应用价值的天然抗生素。此时期已形成独立的抗生素发酵工业体系，其发酵技术，包括菌种选育技术、培养基和发酵设备的灭菌技术、空气净化除菌技术、补料分批发酵技术、发酵过程的参数检测与分析方法、产品的提取纯化技术等均得到了充分的完善和发展，为其他微生物发酵工业的创建与发展提供了有利的条件。

20世纪50年代以来也是维生素、氨基酸、酶制剂、有机酸等直接用微生物发酵生产法生产的创建和迅速发展时期。用棉阿舒囊霉深层发酵生产维生素B₂（核黄素）的发酵工业进一步完善，产量显著提高。用丙酸菌直接发酵生产维生素B₁₂的生产工艺也建立起来了。自从谷氨酸细菌发酵生产法在日本建立并投产后，世界各国的微生物学工作者对各种氨基酸产生菌的寻找和生物合成机制的研究日益深入，至目前为止，赖氨酸、苏氨酸等18种蛋白质氨基酸均直接用微生物的发酵法进行生产，其生产工艺实现了大型化、自动化。

1949年开始采用深层通风培养法进行细菌的淀粉酶的生产，并用细菌淀粉酶和糖化酶进行淀粉的糖化，确立了酶法制备葡萄糖的生产工艺，以后世界各国不仅用细菌发酵法生产大量的 α -淀粉酶、葡萄糖异构酶，还创立了微生物发酵法直接生产蛋白酶、纤维素酶、果酸酶、转化酶、凝乳酶、脂肪酶、青霉素酰胺酶、天门冬酰胺酶等品种的深层发酵技术。此间，以柠檬酸为代表品种的有机酸微生物深层发酵生产技术，以肌苷、肌苷酸、ATP、辅酶A等为代表的核酸类发酵生产技术均日益完善与壮大。

以微生物深层培养法生产抗生素、氨基酸、维生素、酶制剂等一套近代发酵技术，不仅用于以后多种工业微生物的实验研究和工业生产中，也为动、植物的细胞组织培养等其他发酵技术提供了若干有益的经验及设备上的借鉴。因此说，现在的发酵工业已不是单纯的天然微生物产品的发酵技术，而是包括动、植物细胞等细胞培养和下述的“基因工程菌”培养的新型发酵技术。新型生物反应器和传感器的开发与计算机用于发酵过程控制，使发酵工艺参数实现了在线检测，对发酵技术的发展起了重要的促进作用。发酵工程处于基因工程、细胞工程、酶工程等现代生物技术的中心位置，所以，深入研究各种类型的发酵机制和相应的工艺学，是促进现代生物技术快速发展的重要环节。

新中国成立后，我国原有的少数酒精厂、啤酒厂、酵母厂等得到改造和壮大，同时建立了以抗生素生产为主体的医药发酵工业，如1953年在原上海第三制药厂投产了我国第一个抗生素品种——青霉素，1958年我国最大的抗生素生产基地华北制药厂建成投产，相继我国各地区建立起一批抗生素生产厂。临床应用的主要抗生素品种我国均能生产，不仅满足国内医药市场的需要，并有一定的出口量。以淀粉酶、碱性蛋白酶为代表的酶制剂发酵工业，以柠檬酸发酵生产为代表的有机酸发酵工业，以谷氨酸和赖氨酸发酵生产为代表的氨基酸发酵工业，以肌苷发酵生产为代表的核酸发酵工业，以维生素

B₂、维生素 C 为代表的维生素发酵工业等均得到空前的发展。20 世纪 70 年代我国研究成功的维生素 C “二步发酵法”处于国际领先地位，其发酵技术已转让国外。

二、现代生物技术的兴起与发酵工程的进展

20 世纪 70 年代以来生物技术迅速发展，形成一个以基因工程为主导，发酵工程为中心的包括酶工程、细胞工程的现代生物技术体系。主要的生物技术包括：重组 DNA 技术、原生质体与原生质体融合技术、突变生物合成、组合生物合成、选择性生物催化合成、代谢途径工程、淋巴细胞杂交瘤技术、单克隆抗体、组织培养技术、基因治疗等。这些新生物技术首先应用于医药领域。利用 DNA 重组技术成功地研制出胰岛素、干扰素、白细胞介素、生长激素、红细胞生成素、肿瘤坏死因子等各种人体活性蛋白多肽和因子，用于治疗难以治疗的多种疑难疾病；利用 DNA 重组技术改造抗生素等多种微生物药物产生菌的遗传学特性，提高了菌种的生产能力或改进了产品质量；利用基因重组技术构建出新的对氧利用不敏感的发酶菌种来提高能量利用效率；运用突变生物合成和组合生物合成技术研制结构新颖的微生物药物；应用代谢途径工程研究若干种微生物药物（包括基因工程药物）的生物合成、调控机理以及代谢途径延伸生物合成新化合物的机制；利用生物转化（微生物产生的特异性酶的催化作用）技术选择性生物催化合成手性药物中的各种复杂的立体异构体，解决了有机化学合成方法很难合成的，甚至是不能做的不对称合成，并能达到工业化生产的需要；采用克隆技术将微生物体内编码淀粉酶的基因和牛体编码胃凝乳酶基因等多种酶基因克隆到他种微生物体内，不仅成倍地提高酶制剂产量，而且还实现动物酶的基因工程菌的发酵生产；应用细胞融合技术研制多种单克隆抗体的诊断试剂和单克隆抗体的治疗药物供给临床快速诊断和治疗恶性肿瘤等的有效方法；应用基因补偿、基因纠正、代偿性基因交换和反义核酸技术等进行临床治疗，为无法医治的遗传性疾病带来希望，为肿瘤和艾滋病的治疗开辟新的途径；运用转基因动物和转基因植物成功研制出新的生产体系，用于生产安全、方便、廉价的有效药物。

现代生物技术的发展，使发酵工程经历了前所未有的变革，其内涵自然是丰富多彩的，主要包括育种技术，发酵过程的优化，生物合成和调控机制，产品的分离纯化技术，微生物资源的开发，新型生物反应器的研制等。发酵工程是生物细胞产物进行工业化生产的必备技术。发酵产品种类繁多，主要用于医药、食品、轻工与农牧业等领域，其中医药领域为主导，因此医药领域的发酵工业已经发展成为规模庞大的工业微生物体系，对国民经济的发展，提高人类健康水平起到促进作用。

在发酵工业中生产菌种的选育仍是中心工作，在传统发酵工业的发展中，诱变育种对生产的发展起到巨大的推动作用，如青霉素产生菌的原始菌种只产几个单位，现在的发酵生产水平达 6 万单位/ml 以上。近年来，随着微生物代谢产物的分子遗传学机制和生物化学的深入研究，人们对其代谢途径，代谢的调控机制有了深入的了解，所以，运用分子遗传学和生物化学的基本原理，根据产物的分子结构特点，已知的或可能的生物合成途径，生物合成过程的调节控制环节等设计出一些理化筛选模型。将各种类型的理化筛选模型与传统的诱变方法结合起来建立了一系列新的诱变育种方法，大大提高

了育种工作效率，广泛用于微生物各类产物产生菌的育种工作中，获得令人满意的效果，并将继续发挥其在菌种选育工作中的主导作用。

20 世纪 70 年代中期出现的重组 DNA 技术为发酵工程开辟了广阔领域，特别是医用的蛋白多肽和各种因子的研制开发，在各国均兴起生物工程产业，而重组 DNA 技术在微生物代谢产物的产生菌的育种工作中显示出特殊功能。采用重组 DNA 技术构建出青霉素酰化酶、 α -淀粉酶、凝乳酶原、碱性蛋白酶和头孢菌素酰化酶等的工程菌，现已投入工业化生产；Eli Lilly 公司与牛津大学合作采用反向遗传学技术构建了头孢菌素 C 产生菌的工程菌，其中一个转化子增多了拷贝的扩环酶 [催化青霉素 N 转化为脱乙酰氧头孢菌素 C (DAOCS)] 基因，使头孢菌素 C 产量提高 15%，并已用于大生产了；将 *Fusarium solani* 的 D-氨基酸氧化酶基因与缺陷假单孢菌的头孢菌素酰化酶基因克隆到头孢菌中，两个基因所编码的两种酶在体内将受体菌原来合成的头孢菌素 C 降解为 7-氨基头孢烯酸 (7-ACA)，构建出直接生产 7-ACA 的工程菌。抗生素生物合成遗传学研究结果表明，绝大多数抗生素生物合成基因成簇存在，抗性基因也是基因簇的一部分，即与合成基因连锁，基因簇中往往带有调节基因，这为菌种选育提供了理论基础。俄罗斯和德国科学工作者根据维生素 B₂ (核黄素) 合成遗传学研究结果构建出的芽孢杆菌工程菌株，维生素 B₂ 产量达 10g/L 以上；Anderson 等通过构建基因工程菌实现了从 D-葡萄糖经一步发酵生产 2-酮基古龙酸 (2-KGA，维生素 C 的前体)，他们将棒状杆菌 (*Cronebacterium sp*) 的 2, 5-二酮基-D-葡萄糖还原酶基因克隆转化到一株草生欧文氏菌体中，构建的工程菌可将 D-葡萄糖经一步发酵即可转化为 2-KGA，转化率达 47.7%。科学工作者将一种丝状细菌贝氏硫杆菌种 (*Vitreoscilla*) 的血红蛋白 (VHb) 基因克隆到大肠杆菌和放线菌体内，即促进有氧代谢和菌体生长，又可促进抗生素的生物合成。Martin 等报道带有 VHb 基因的工程菌株能合成更多的头孢菌素 C，在相同条件下，工程菌株的产量为对照菌株的 250%。在氨基酸等产生菌的菌种选育中也应用了重组 DNA 技术，获得满意的效果。

应用固定化细胞法生产多种发酵产品是发酵技术改良的重要内容。应用细菌固定化细胞以淀粉水解液为原料进行酒精连续发酵，其发酵速度为游离酵母的 2.65 倍；以固定化酵母进行糖蜜的连续发酵，乙醇生产能力约为游离酵母的 10 倍。用固定化细胞或固定化酶连续生产 6-氨基青霉烷酸 (6-APA)。有机溶剂等采用固定化细胞连续发酵生产均获好的效果。

发酵工程在微生物资源开发方面发挥重要作用，如用土曲霉生产的衣糠酸 (亚甲基丁二酸) 及其脂类是制造合成树脂、合成纤维、橡胶、塑料、表面活性剂、润滑油添加剂等的好原料，用它制成的塑料，填充玻璃纤维即成为高强度的玻璃钢，代替钢材可用于飞机、造船制造业等，它的聚合物因其有特殊光泽、透明，则用于制造人造宝石和特殊的透镜。由兽疫链球菌发酵生产的透明质酸 (是一种酸性粘多糖)，可用于眼球的移植，关节炎治疗，肝硬化诊断等。日本武田药品公司通过一种产碱杆菌发酵生产热凝多糖 (curdlan)，于 80℃ 以上可凝固，制成一种“生物造物剂 - 21 (Biocleal - 21)”，用于生产“生物混凝土”产品，本产品已进行商品化生产。我国天津工业微生物研究所通过发酵途径生产一种水泥外加剂 (YCH) 的生物制品，是一种新型超级缓凝型高效减水

剂，为制造新型的水泥制品开辟了新途径。

在现代生物技术发展中，高效率低能耗的生物反应器的研制起了重要的作用，它的高效率取决于它的自动化程度和精细控制系统。传统的混合式发酵罐是发酵工业中应用的最重要的生物反应器，搅拌通气发酵罐较大容积的达 500m^3 ，气升式发酵罐容积达到 3000m^3 。发酵过程采用计算机控制，生产过程实行了连续化、自动化，在今后的传统发酵产品和新型发酵产品的生产中仍将发挥重要作用。但随着不同类型发酵产品工艺的要求，传统反应器的结构和控制系统还需要不断完善和创新。我国研制的 100m^3 的气升式双环流谷氨酸发酵反应器，产酸量为 $25\text{g}/100\text{ml}$ ，糖转化率为 54.7% ，与 60m^3 机械搅拌发酵罐比较，每生产 1t 谷氨酸可节能约 30.7% 。经济效益显著，操作简便，易于控制，可用于其他发酵产品。英国科学家设计一种“光生物反应器”培养水藻，通过光合作用，将太阳能转化为生物量燃料。这种生物量也可转化成液体或气体燃料。充分发挥“光生物反应器”技术的作用，不仅为解决能源和节约能源开辟了新途径，而且在减轻温室效应，维持地球生态平衡方面起重要作用。

三、微生物发酵工业产品类型

微生物发酵工业产品种类繁多，但就其发酵类型而言可分为下列几种类型：微生物菌体为产品的微生物菌体发酵；酶制剂和酶调节剂的微生物发酵；以微生物的代谢产物（包括初级代谢产物和次级代谢产物）为目的产物的微生物发酵；微生物转化发酵；工程菌和工程细胞产物的发酵等，现在常在发酵名词的前面冠以产物的名称，称为某某发酵，如青霉素发酵、维生素发酵等。

（一）微生物菌体发酵

微生物菌体具有不同的用途，可以根据不同微生物的生理学特性采用不同的生产工艺大量生产菌体，供人类之需。传统的菌体生产有用于面包制造业的酵母发酵和用于人类或动物食品的食用微生物菌体（称单细胞蛋白，SCP）发酵。20世纪初期，面包酵母已经大量生产并作为人类食品，酵母菌体经提取出核酸后，余下的蛋白还可作为辅助饲料。20世纪60年代，作为食品蛋白来源和动物饲料蛋白来源的微生物发酵得到很大的发展，由于机械搅拌发酵罐的规模小、生产成本偏高，加之烃类有机物作为发酵培养基的成分之一，需要充足的溶氧条件，因此开发出氧传递速率高的加压喷射发酵罐和加压循环发酵罐装置。成功采用 3000m^3 的连续带压循环（即气升式）发酵罐，操作时间达100天以上，建立起单细胞蛋白的发酵工业。

很久以前我国就已药用的多种真菌现在被充分研制开发，如担子菌的灵芝，依赖虫蛹生存的冬虫夏草，与天麻共生的密环菌、多孔科的茯苓菌，还有香菇、猴头菇等，在医疗上均有重要用途。这些药用真菌产品均以人工培养方式生产出来，与天然产品具有同等功效。人工发酵生产的冬虫夏草菌体内含有的氨基酸、微量元素、虫草素、甘露醇等与天然虫草相同，其制剂（宁心宝、金水宝等）用于心脏病、气喘病等的治疗，疗效显著，同时具有提高机体免疫功能的功效。从药用真菌中提取出来的多种真菌多糖，如香菇多糖、灵芝多糖、云芝多糖、虫草多糖等能提高人体的免疫功能，同时在肿瘤的治疗中显示一定的疗效。药用真菌的人工发酵生产研制成功，是医药发酵工业发展的一个

新体系。

农业用的微生物菌体发酵近来获得快速发展，如苏云金芽孢杆菌、蜡样芽孢杆菌等细胞中的伴孢晶体可毒杀鳞翅目、双翅目等害虫。世界各国均在研制开发毒力更强，选择性好的新苏云金芽孢杆菌品系，以满足市场之需。丝状真菌的白僵菌、绿僵菌可防治松毛虫等。研制微生物杀虫剂的发酵技术也是值得注意的一个侧面。

（二）微生物酶制剂与酶调节剂发酵

酶是由活细胞产生的蛋白质性质的生物催化剂，普遍存在于动物、植物和微生物细胞中很早人类是从动物和植物组织中提取某些酶制剂，如从动物胃膜和胰腺中提取蛋白酶，从植物麦芽中提取淀粉酶。随着酶制剂的应用日益广泛，需求量猛增，用微生物发酵法生产的酶制剂可满足市场的需求。因为微生物的种类多，产生的酶多种多样，发酵生产能力可以不受限制的扩大，生产技术稳定，生产成本低，若干种酶制剂均可用发酵法生产，形成了酶发酵工业。微生物酶制剂广泛用于食品和轻工业中。采用酶固定化技术用于生产，如用固定化糖化酶由淀粉生产葡萄糖，用固定化氨基酰化酶拆分 DL-氨基酸等，实现了生产的连续化、规范化。

酶制剂与酶调节剂在医药领域获得广泛应用和发展，如青霉素酰化酶用于青霉素的水解，制备生产半合成青霉素产品的中间体 6-氨基青霉烷酸（6-APA），葡萄糖氧化酶用于检验血液中葡萄糖含量等等。20 世纪 60 年代梅泽滨夫从链霉菌代谢产物中分离出二肽化合物 Bestatin 对氨肽酶 B 及亮氨酸氨肽酶有特异性抑制作用，后来的研究表明，该活性物质还可以刺激细胞免疫，增加巨噬细胞和脾细胞对白细胞介素-1 及白细胞介素-2 的释放。这一卓有成效的研究结果，鼓舞了许多研究单位开展了此一领域的研究工作。各国学者报告，从不同微生物代谢产物发现了若干种酶抑制剂，并阐明了化学结构及临床应用情况，如血管紧张素转化酶抑制剂（ACE）用于治疗高血压；糖苷酶抑制剂治疗肥胖病、糖尿病和高脂蛋白血症；磷脂酶抑制剂治疗胰腺炎；3-羟-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶（HMG-CoA 还原酶）抑制剂和乙酰辅酶 A：胆固醇乙酰转移酶（ACAT）抑制剂治疗高胆固醇血症和动脉粥样硬化等等。有的酶抑制剂是免疫增强剂，如氨肽酶抑制剂有治疗癌症的作用。有的酶抑制剂是免疫抑制剂，如环孢菌素 A 专门抑制 T 淋巴细胞的功能，它的临床应用使器官移植发生了一场“革命”，大幅度提高器官移植成功率。医药用酶制剂和酶调节剂的临床特异疗效，加速了新品种的研究开发进程，同时促进了酶发酵工业的发展，生产菌种的选育技术，发酵过程的自动控制，酶制品的分离纯化技术等日益完善，已成为酶发酵工业的重要组成部分。

（三）微生物代谢产物发酵

微生物在天然和人工配制的营养条件和生活环境下进行多种代谢活动（分解代谢、合成代谢、无定向代谢等）完成其生命活动的周期。在其生长繁殖的生命活动周期中，依据细菌的生长繁殖速率的不同，可将生长周期分为延迟期、对数生长期、稳定期和衰亡期四个阶段，在各阶段内菌体进行的代谢活动产生种类繁多的代谢产物，已知的产物有 40 余类，其中用作药物的达 23 类，根据产物在微生物体内产生的时期和与菌体生长繁殖的相互关系，可分为两大类型代谢产物。

在菌体的延迟期和对数生长期产生的代谢产物，如氨基酸、蛋白质、核苷酸、核

酸、酶类、糖类、脂类等是生命物质的基本构建材料，是菌体的初级代谢产物。形成这些基本构建材料的初级代谢对所有的有生命的生物来说，即使种属关系相差甚远的，也基本上是相同的。若干种初级代谢产物不仅是某些工业生产中必需的物质，而且还是重要的医药产品，如微生物产生的某些酶、维生素、有机酸、氨基酸、蛋白质、核酸、多糖等。因此形成了相应的发酵工业。菌体对初级代谢活动有着严格的自调系统，不能积累多余的初级代谢产物。因此，人们为了获得上述有重要作用的初级代谢产物，就必须打破菌体的自调系统，就必须明确其代谢的调控机理，进而改造初级代谢的遗传学性质，改进营养条件和培养环境，让其改良后的生产菌种积累有益的初级代谢产物，提高生产量，造福于人类的生活和健康。

在微生物生命周期的静止期，甚至衰亡初期内，许多种微生物能合成在生长期不能合成或合成量很少的一类物质，这些物质对微生物体的正常生命活动没有什么明显作用，产量往往是很少的，甚至是微量的，如抗生素、酶类、毒素、生物碱、植物生长素等。形成这些产物的生物合成途径十分复杂，产物的结构多种多样，这类产量少、作用大的代谢产物称为次级代谢产物。能够合成次级代谢产物的不是各类微生物共有的代谢途径，具有非常明显的种属特异性，就是变种之间也有显著差异。从现有的研究报道看，次级代谢产物的产生菌一般是放线菌、丝状真菌和产孢子的细菌。其中放线菌科中的链霉菌属产生的次级代谢产物为最多，丝状真菌中不完全菌纲、担子菌纲产生的多。近年来从稀有放线菌和某些产孢子的细菌中发现了许多的次级代谢产物产生菌。从海洋生物中发现了不少具有生物活性的次级代谢产物。从稀有放线菌和海洋生物中寻找具有特异生物功能且结构新颖的次级代谢产物，是当前研究的热点。

在次级代谢产物中最具应用和医药价值的是抗生素，是最大一类发酵生产的微生物次级代谢产物，据不完全统计其结构类型有 14 类，抗生素不仅有广泛的抗菌作用，而且还有抗癌、抗病毒、抗虫及其他生物活性，已成为发酵工业的最重要部分。近年来，从微生物代谢产物分离获得抗感染、抗肿瘤以外的生理活性物质，如酶抑制剂、受体拮抗剂等，它们与抗生素一样，均是微生物的次级代谢产物，在生物合成机制、筛选研究程序及生产工艺等多方面有共同之处。Monaghan 将这些物质称为生物药物素 (Biopharmaceutin)。现在可将微生物产生的药用初级代谢产物、抗生素和生物药物素统称为微生物药物 (Microbial Medicine)。

微生物产生的次级代谢产物与初级代谢密切相关，初级代谢过程中形成的中间体或产物是次级代谢产物生物合成的前体和起始物。次级代谢产物的生物合成与初级代谢一样受到遗传调节和环境条件的控制，要提高产生菌的生产能力，就要解除上述的瓶颈反应，增大代谢流量，提高发酵产品产量。

(四) 微生物转化

微生物转化就是利用微生物代谢过程中的某一种酶或酶系将一种化合物转化成含有特殊功能基团产物的生物化学反应。19 世纪 80 年代巴斯德发现乙酸杆菌能将乙醇氧化为乙酸，相继发现用微生物可将异丙醇转化为丙醇，甘油转化成二羟基丙酮，L-酪氨酸转化成 L-多巴胺，葡萄糖转化成葡萄糖酸进而转化成为 2-酮基葡萄糖酸或 5-酮基葡萄糖酸，山梨醇转化成山梨糖等。微生物转化方法有分批培养转化法 (生长细胞转

化)、静置细胞转化法、干细胞转化法、孢子转化法、渗透细胞转化法、固定化细胞转化法。微生物转化反应在药物合成中应用愈来愈广泛,其特点是对立体结构合成上具有高度的专一选择性,包括结构的化学选择性和非对映异构体选择性,严格的区域选择性,面选择性和对映异构体选择性;微生物转化反应条件温和,公害小;反应速率快,收率高,成本低。微生物转化反应的生化反应类型主要有氧化反应(包括单一氧化反应、羟基化反应、环氧化、氮-杂基团的氧化、硫-杂基团氧化、 β -氧化、脱氢反应),还原反应,水解反应(和内酯的水解、光学对映体的选择性转化、醚的水解开裂、硫醚的水解开裂、酰胺水解、苷的水解、内酰胺水解、环氧水解开环、水解脱氨、水解氨烷基中烷基),缩合反应(醇醛缩合、氨醇缩合、偶姻缩合),胺化反应(醇基转化成氨基、酮基转化成氨基、羟基转化成酰胺),酰基化反应(羟基酰基化、氨基酰基化),降解反应(脱羧反应、脱羧还原),脱水反应等。能够进行上述各种转化的微生物主要有霉菌(羟基化反应、还原反应、水解反应等)、酵母(还原反应、水解反应)、细菌(脱氢反应、碳-碳键开裂反应、水解反应)、放线菌(羟基化反应)。

微生物转化反应在药物研制中的应用始于 20 世纪 30 年代,20 世纪 50 年代形成大规模工业生产。现已广泛用于激素、维生素、抗生素和生物碱等多种药物的生产中,如在维生素 C 生产中,应用醋酸杆菌将山梨醇转化为山梨糖,再用氧化葡萄糖酸杆菌与巨大芽孢杆菌的自然组合进行第二步转化,将山梨糖转化成维生素 C 的前体 2-酮基古龙酸。我国发明的这种维生素 C 二步发酵法已推广到世界各国,该方法不仅简化了“莱氏法”生产工艺,排除有毒化学药品的污染,而且该工艺实行液体化发酵,实现了工业生产的连续化、自动化,大大提高了维生素 C 产量。甾体激素类药物的工业生产主要是改造天然的甾体产物,甾体激素包括醋酸可的松皮质激素和黄体酮等,广泛用于临床。用单纯化学方法在天然甾体母核 C_{11} 位上导入一个氧原子改造成醋酸可的松需要 37 步反应,收率为十万分之二,用黑根霉进行生物转化,一步就在 C_{11} 位上导入一个羟基,使原来的合成过程减少到 11 步,收率达 90%,这时才使可的松问世。从胆固醇化学合成雌酚酮,要进行 6 步反应,采用生物转化法可省去 3 步。甾体的微生物转化研究结果已阐明,微生物对甾体每个位置几乎都能进行转化反应,其中的许多转化反应是化学合成方法办不到的,就是动物体内酶也不能转化的。

(五)工程菌发酵

20 世纪 70 年代基因工程诞生以来,最先应用该技术且目前仍是最活跃的研究领域便是医药领域,迄今累计已有 40 余种基因工程药物投放市场。这类药物是通过基因工程菌的发酵实现的。基因工程菌的构建过程是先将目的基因分离纯化,通过体外的 DNA 重组技术将目的基因插入载体,拼接后转入新的宿主细胞,构建成工程菌(或细胞)并使目的基因在工程菌体内进行复制和表达,从而获得目的产物。工程菌的发酵工艺不同于传统的抗生素等的发酵,需要对影响目的基因表达的各种因素及时进行分析和优化,如培养基的组成不仅影响工程菌的生长速率,而且还影响重组质粒的稳定性和外源基因的高效表达;培养温度对工程菌的高效表达有显著调控作用,其作用位点是基因的复制、转录、翻译或小分子调节分子的合成方面,培养温度的高低还影响蛋白质的活性和包涵体的形成在不同的发酵条件下,工程菌的代谢途径可能发生变化,因而对产

物的分离纯化工艺造成影响。因此在高表达高密度的前提下尽量建立有利于产品纯化的发酵工艺，以便提高产品的纯度。详见《生物技术制药》。

（六）动、植物细胞培养

细胞是一切动、植物生命体的基本组成单位。细胞虽小（直径 $10\mu\text{m}$ 左右），但其生理生化功能却非常精密、复杂，并有巨大的生产效率，可以生产出若干种维持机体生命活动必需的产物。随着基因工程的发展，人们逐渐认识到许多基因产物不能在原核细胞内表达，它们需要真核细胞所特有的翻译后修饰及正确的切割、折叠后，才能形成与自然产物分子一样的功能和抗原性。人们采用细胞操作技术，从原代细胞、转化细胞系等进行融合和重组构建出工程细胞系。利用上述的各种细胞系在特制的动植物细胞反应器中，在适宜的培养条件下进行组织培养，获取含有不同代谢产物的细胞群体。再用适当的方法从细胞群体中提取纯化所需的代谢产物。详见《生物技术制药》。

四、发酵培养方法与过程

从现有的发酵培养方法看，基本上分为两种类型：表面（浅层）培养法和深层培养法。表面培养方法是指将微生物接种于基质的表面上进行培养，由于使用的培养菌种类不同，又分为固体表面发酵培养和液体表面发酵培养。液体深层发酵培养是微生物细胞于液体培养基深层（需氧或厌氧）中进行培养的方法。

（一）表面发酵培养方法

此种方法指的是将微生物接种于灭过菌的固体或半固体或液体培养基上，在一定的培养条件下进行培养。多数情况下需氧菌在固体或液体培养基表面上形成微生物膜，而霉菌或放线菌又容易长入到固体基质中去。经过一定的培养时间，菌体代谢产物或扩散到培养基中，或滞留于细胞内，或两者均有，依产生菌和产物的特性而定。液体表面（浅层）培养法曾用于青霉素生产初期和某些酶的生产，因其产量低，易污染，劳动强度大，因此已被深层发酵培养所代替。固体表面发酵培养至今仍在某些品种的生产中采用，如农用赤霉素的生产，采用稳定的生产菌种（如藤仓赤霉 P-3），以麦麸作为固体发酵载体进行发酵，糖的转化率和生产量均较高，生产成本低，其发酵结果优于液体深层发酵的结果。纤维素酶、某些糖化酶的工业化生产仍采用固体发酵培养法。冬虫夏草的固体栽培技术是人工生产冬虫夏草的方法之一。固体发酵培养法具有投资小，所需生产设备少，简便易行，适于品种的小型化生产等特点。继续深入研究开发固体发酵培养工艺，有益于发酵工业的发展。

（二）液体深层发酵培养

这是微生物细胞在液体深层中进行厌氧或需氧纯种培养过程，需氧深层发酵培养的供氧方式有振荡培养和深层通气（带搅拌）培养两种，其培养的基本过程如下：

菌种 → 孢子制备 → 种子制备 → 发酵 → 发酵液预处理 → 提取精制 → 成品检验 → 成品包装。

1. 菌种

从自然界土壤样品中分离获得能产生代谢产物（初、次级代谢产物）或具备某种转化能力的微生物，再经过分离纯化和菌种选育等工作，获得的有工业化生产价值的菌种

投入发酵生产。优良的菌种应保持其自身生长繁殖较快，能大量的生物合成目的产物，其发酵过程易于控制。一般说生产菌种经过多次移植时发生变异而退化，故在生产过程中必须经常进行菌种的选育工作，采用自然分离和诱变育种等手段保持和提高菌种的生产能力和产品质量。此外还必须重视菌种的保藏工作，一般以低温法保藏的菌种遗传特性稳定，很少发生变异。

2. 孢子制备

这是发酵工程开始的一个重要环节。制备孢子时，先是将处于休眠状态的冷藏孢子，通过严格的无菌操作技术将其接种于灭过菌的固体斜面培养基上，按生产工艺要求进行培养。这样培养出来的孢子数量还是有限的，为了获得大量的孢子以供生产需要，如用孢子直接接入种子罐，进行菌体繁殖以满足发酵罐接种量要求，必须进一步采用较大面积的固体培养基如小米或麸皮进行扩大培养。

3. 种子制备

这一培养过程目的是使孢子发芽、生长繁殖以获得足够数量的菌体，供发酵罐接种用。种子制备有两种形式：一是从摇瓶培养开始，再接入种子罐中进行逐级扩大培养，二是孢子直接接入种子罐开始种子培养，再进行逐级扩大培养。种子制备是否需从摇瓶培养开始和种子扩大培养级数的多少，取决于生产菌种的遗传特性、生产规模和生产工艺特点。种子制备一般在种子罐（小型发酵罐）中进行，扩大培养级数一般为二级，种子制备过程中要定时取样做无菌检查，菌浓测定，菌丝形态观察，生化指标分析，确保种子质量后方可移种。

4. 发酵

这一过程的主要目的是使微生物能积累大量的代谢产物，是整个发酵工程的中心控制环节。因是纯种的深层发酵，所以在发酵开始之前，所用的培养基和相应设备必须先行灭菌，要采用无菌接种技术，通入的空气必须要净化除菌，发酵过程中，补加的各种料液和消沫剂要高温灭菌，总之要使发酵过程始终处于纯种培养状态。发酵过程中用于过程控制的物理化学与生物学参数主要有菌体形态和浓度、各种基质浓度、溶解氧浓度、发酵液的 pH、发酵液粘度、培养温度、通风量、排气中的 CO_2 含量、发酵产物浓度等的变化量。微生物代谢产物的生物合成过程复杂，尤其是抗生素等次级代谢产物生物合成更为复杂，至今仍有许多生物合成过程中的环节不十分清楚，又是涉及初级代谢和次级代谢的多基因控制产物。影响发酵效果的因素错综复杂，各种因素相互影响，相互制约，因此要想获得预期的发酵效果，需要各方面密切配合和严格操作。

5. 提取和精制

发酵结束后，发酵液即进行预处理，产品的提取和精制。利用某些物理化学方法将发酵产物制备成符合产品质量要求的成品。在提取前，需将发酵液进行过滤分离，将菌丝体和发酵上清液分开，若产物在滤液中就要将滤液进一步进行预处理，除掉部分杂质，以利于以后的提取；如产物含在菌体内，通常先用有机溶媒进行萃取，然后采用相应的方法进行精制。提取精制的方法详见《分离纯化工艺原理》。

6. 成品检查

发酵产品为药品时，就要按药典上的质量标准逐项对产品进行检验分析，包括产品

的外观性状检查，产品的鉴别，有关物质的检查，含量检定，毒性试验，热原试验，无菌检查，升降压物质试验等。非医药用的微生物产物按各行业的质量标准逐项进行产品的质量分析。

7. 成品包装

微生物发酵产物一般有大包装和小包装两种包装方法。依产品的稳定性采用不同的包装材料和包装形式，如产品的吸湿性强，要采用防湿包装材料。

(沈阳药科大学 白秀峰)

主要参考文献

1. 熊宗贵等，发酵工艺原理，北京：中国医药科技出版社，2000
2. 褚志义等，生物合成药物学，北京：化学工业出版社，2000
3. 陈代杰，微生物药物学，上海：华东理工大学出版社，1999
4. 陈驹声，近代生物工程的进展（综述），工业微生物，1993，22（1）
5. 焦瑞身，发酵工程的进展（综述），生物工程进展，1993，1（13）：16~32
6. 罗明典，发酵工程若干方面的研究进展（综述），食品与发酵工业，1993，4：72~77

第二章

菌种选育理论与技术

利用工业微生物发酵生产的过程中，决定生产水平高低最主要的因素有三个：生产菌种、发酵工艺和后提取工艺。其中最重要的是生产菌种。从自然界分离得到的菌种，由于生产能力低，往往不能满足工业上的需要。因为在正常生理条件下，微生物依靠其代谢调节系统，趋向于快速生长和繁殖。但是，发酵工业的需要就与此相反，需要微生物能够积累大量的代谢产物。为此，采用种种措施来打破菌的正常代谢，使之失去调节控制，从而大量积累我们所需要的代谢产物。要达到此目的，主要措施就是进行菌种选育和控制培养条件。

菌种选育的最初目的是改良菌种的特性，使其符合工业生产的要求。菌种选育工作大幅度提高了微生物发酵的产量，促进了微生物发酵工业的迅速发展。通过菌种选育，抗生素、氨基酸、维生素、药用酶等药物的发酵产量提高了几十倍、几百倍，甚至几千倍。菌种选育在提高产品质量、增加品种、改善工艺条件和产生菌的遗传学研究等方面也发挥了重大作用。例如青霉素的原始生产菌种产生黄色色素，使成品带黄色，经过菌种选育，产生菌不再分泌黄色色素；卡那霉素产生菌经选育后，由生产卡那霉素 A 变成生产卡那霉素 B；土霉素产生菌在培养过程中产生大量泡沫，经诱变处理后改变了遗传特性，发酵泡沫减少，可节省大量消沫油并增加培养液的装量；红霉素等品种发酵遇有噬菌体侵袭时，发酵产量大幅度下降，甚至被迫停产，菌种经诱变处理获得抗噬菌体的特性，就可保证发酵生产的正常进行。随着这门技术研究的不断深入及相关学科的发展，菌种选育的目的已不仅仅局限于提高产量、改进质量，而且可用来开发新产品。如果以科研为目的，则通过菌种选育可了解菌种的遗传背景、增加菌种遗传标记、分析生物合成机制和提供分子遗传学研究材料。菌种选育的这些目的可用图 2-1 概括。

根据菌种自然变异而进行的自然选育，以及用人工方法引起菌种变异或形成新的杂种，再按照工业生产的要求进行筛选来获得新的变种或杂种，这是当前菌种选育的基本内容。

生产上广泛应用的自然选育、诱变育种等方法属于经验育种的范畴，主要是通过突变和筛选来获得优良的菌株。此外还有原生质体技术、杂交育种、分子生物学方法等现代菌种选育技术。本章将分别介绍自然选育、诱变育种、原生质体技术、杂交育种和分子生物学在菌种选育中的应用。

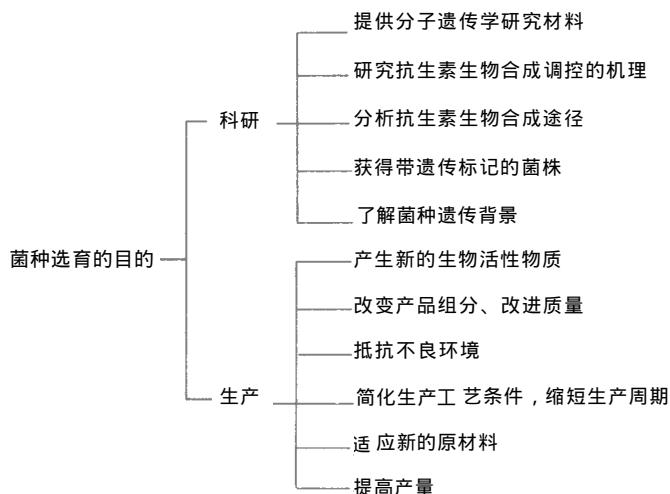


图 2-1 菌种选育的目的

第一节 自然选育

自然选育是一种纯种选育的方法。它利用微生物在一定条件下产生自发突变的原理，通过分离，筛选排除衰退型菌株，从中选择维持原有生产水平的菌株。因此，它能达到纯化、复壮菌种，稳定生产的目的，生产上将该方法又称为自然分离。自然选育有时也可用来选育高产量突变株，不过这种正突变的几率很低。

发酵工业中使用的生产菌种，几乎都是经过人工诱变处理后获得的突变株。这些突变株是以大量生成某种代谢产物（发酵产物）为目的筛选出来的，因而它们属于代谢调节失控的菌株。微生物的代谢调节系统趋向于最有效地利用环境中的营养物质，优先进行生长和繁殖，而生产菌种常常是打破了原有的代谢调节系统的突变株，因此常常表现出生活力比野生菌株弱的特点。此外，生产菌种是经人工诱变处理而筛选到的突变株，遗传特性往往不够稳定，容易继续发生变异。上述这些特点使得生产菌株呈现出容易发生自然变异的特性，如果不及时进行自然选育，通常会导致菌种发生变异，使发酵产量降低。但是，自然变异是不定向的，有的变异是菌种退化，使发酵产量降低，也有的变异是菌种获得优良性状使发酵产量提高。因此，经常进行自然选育工作，淘汰衰退的菌株，保存优良的菌株。

自然选育得到的纯种能够稳定生产，提高平均生产水平，但不能使生产水平大幅度提高，这是因为菌种在自发突变过程中，自发突变的几率极低，变异过程亦十分缓慢，所以获得优良菌种的可能性极小，因此难以依赖自然选育来获得高产突变株。

了解菌种衰退的原因是自然选育工作的基础，下面我们先分析一下菌种衰退的原因，然后再介绍自然选育的一般方法。

一、菌种退化与变异原因

抗生素生产是纯种发酵过程，但生产菌在长期使用、保藏过程中都会产生退化和变异，究其原因，有细胞内在因素，也有外在的环境因素。

1. 遗传基因型的分离

抗生素产生菌多为放线菌和丝状真菌，它们的菌丝体是由多个细胞组成，大多数细胞含有一个细胞核，有的含有多个细胞核，因而其遗传物质基础具有多样化和复杂性。微生物又属群体繁殖模式，在群体繁殖过程中，不可避免地会产生不同遗传基因型的分离。

以抗生素产率等数量性状而言，其群体表现型表现为正态分布，即群体中各个体间的抗生素生产能力不是同一水平，大部分个体处于平均水平，少量个体的抗生素产率处于较高或较低的水平，如不进行选择，在传代使用过程中，群体产量的分布曲线有向低值移动的趋势，这是数量遗传的自体调节现象。

2. 自发突变的结果

自发突变也是不定向的，且多数是负向变异，如抗生素产量的下降、孢子形成能力的降低、存活率的降低等都是退化变异。微生物自发突变可因种类不同而异，但造成变异的主要原因可能是：①用沙土管等长期保藏；②菌种连续传代，这种自发突变比保藏过程中产生的比例要高，因为在生命活动过程中遗传物质更容易受环境因素的影响；③活细胞内进行的新陈代谢活动，能产生一些具有诱变作用的物质，如过氧化氢、有机过氧化物等，当这些物质在胞内累积到一定浓度时能诱发 DNA 结构的改变；④DNA 中存在的增变基因也能诱发基因突变；有的微生物的染色体上还存在有导致菌体退化的死亡基因，DNA 的代谢失调也会引起基因突变而造成菌种退化。

自发突变的产生特点是变异速度比较缓慢，因为导致变异的不利因素不是强烈因子；另外，一个基因发生突变不可能立即影响微生物群体的性状变异，变异要通过 DNA 复制才能传到下一代，并在一定的环境条件下才能体现出来。更重要的是必须在突变基因取得数量上的优势时，才能使群体表现出性状的变异。

3. 经诱变剂处理后的退化变异

菌种经人工诱变处理后，在初筛时选得的高产突变株，有的在以后的多次复筛中产量下降，不能体现初筛时的高产水平，这就是人工诱变后的退化变异。其产生原因有以下几种：初筛出的菌落可能是由成对或成堆孢子发育成的，其中只有一个细胞诱发了基因突变，在传代中细胞核分裂时，未发生基因突变的细胞逐渐在数量上占优势，便表现出产量下降。可能是诱变菌种的细胞是异核体，而发生基因突变的只是其中一个细胞核的遗传基因。那么在传代过程中由于产生细胞核的分离现象，高产突变基因的核在数量上失去了优势，便出现产量性状的退化变异。突变发生在无意义链上，在遗传信息传递过程中被丢失，致使正突变性状的消失。在诱变剂的作用下，被诱变菌种出现基因混杂，突变的高产基因虽然已经传递到下一代，但在传代使用过程中，当环境条件适合于低产型突变株繁殖时，使其在数量上占优势，便表现出低产水平。

综上所述，造成菌种退化变异的原因是多方面的，为保持生产菌种的稳定性，自然