



武汉大学
Wuhan University

第四章 生物制药技术与工程

主讲教师：台万一

武汉大学药学院



生物制药技术与工程简介

生物制药技术是指利用生物体或现代生物工程进行药物生产的技术。

主要包括：

- 生物体中天然有效成分的提取制备技术（主要指生物活性分子）
- 微生物发酵制药技术
- 以基因工程为核心的现代生物工程制药技术

狭隘定义的生物制药（发展主流）

天然生化药物

猪胰腺提取胰岛素

猪小肠提取肝素

蓖麻中提取蓖麻素

微生物发酵药物

氯霉素

青霉素

各种维生素

生物工程药物

各种疫苗

生物工程蛋白质

抗体

胰岛素

美国生物制药技术发展简况



武汉大学
Wuhan University

首家生物制药公司Cetus公司成立

1971

S. N. Cohan
的DNA重组

1973

Boyer的基因
重组表达

1977

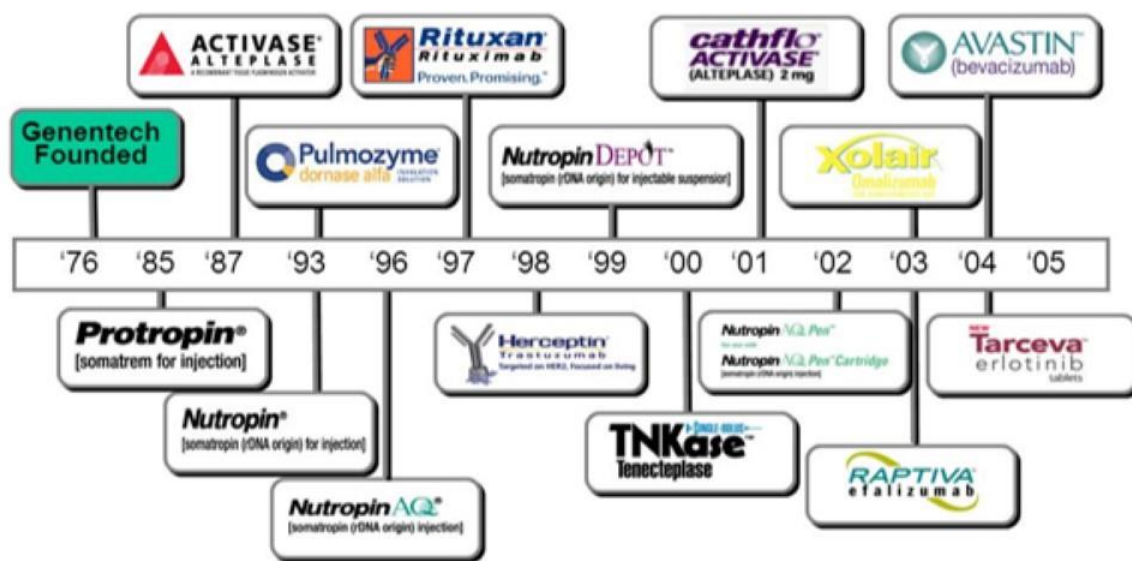
200多个生物
药物上市

2010

CAR-T疗法
基因编辑核
酸疗法

现在

1973年Boyer
和Swanson创
立Genetech



基因泰克公司

2009年罗氏花费
468亿美元购买剩
余股份

产品: Avastin, Herceptin, Rituxan, Perjeta, Kadcyla, Gazyva, Tarceva, Ocrevus, Polivy, Tecentriq, Xofluza, Hemlibra, Venclexta, Esbriet, Cotellic, Alecensa, Zelboraf, Nutropin, Actemra, Lucentis, Xolair, Activase, Cathflo Activase, Xeloda, Boniva, TNKase, CellCept, Pegasys, Pulmozyme, Tamiflu, Valcyte, Anaprox, Cytovene, EC-Naprosyn, Erivedge, Fuzeon, Invirase, Klonopin, Kytril, Naprosyn, Rocephin, Roferon-A, Romazicon, Valium, Xenical, Zenapax



生物药物与生物技术药物

包括:

- 从植物、动物、微生物及海洋生物等生物体中制取的生化药物（天然生化药物）；
- 通过发酵生产的微生物药物；
- 运用以基因工程为核心的现代生物技术生产的生物技术药物；

→ 生物技术药物 (Bio Drugs) 得到了迅速发展，成为另一新的制药工业门类。

① 基因工程药物

应用基因工程和蛋白质工程技术制造的重组活性蛋白、多肽及其修饰物，如治疗蛋白、抗体、疫苗、连接蛋白、融合蛋白和可溶性受体等。

② 基因药物

治疗基因、反义核酸和核酶等。

③ 天然生化药物

动物、植物、微生物和海洋生物来源的天然生化活性物质。

④ 合成或半合成的生物药物。

生物技术药物的地位

表 4-1 目前已上市的主要生物技术药物

- 2017年生物技术药物市场1864.7亿美元。
- 生物技术药物的开发成功率是小分子药物的2倍
- 生物技术药物可用于很多小分子药物无法或难以治疗的病症
- 目前有1500个生物技术药物处于临床试验中
- 生物技术药物的生产成本高

商品名	化学名	生产公司	申报日期	通过日期	评审时间/月	评估中心	评价	孤儿药 (Orphan Drug)
重组蛋白								
avonex	interferon beta-1A	Biogen	22/05/95	17/05/96	11.9	CBER	P	Y
优泌乐	insulin Lispro	Eli Lilly	14/03/95	14/06/96	15.0	CBER	S	N
retavase	reteplase	Boeringher Mannheim	30/06/95	30/10/96	16.0	CBER	S	N
benefix	factor IX	Genetics Institute	05/09/96	11/02/97	5.2	CBER	P	Y
follistim	follitropin beta	Organon	10/01/96	29/09/97	20.6	CBER	S	N
gonal-f	follitronin alpha	Serono	14/09/93	29/09/97	48.5	CBER	S	N
infergen	interferon alphacon-1	Amgen	13/04/96	06/10/97	17.8	CBER	S	B
neumega	opreleukin	Genetics Institute	20/12/96	25/11/97	11.2	CBER	S	Y
regranex	becaplemin	R. W. Johnson	16/12/96	16/12/97	12.0	CBER	S	N
refludan	lepirudin	Hoechst Marion Roussel	31/12/96	06/03/98	14.1	CBER	P	Y
glucagen	glucagon	Novo Nordisk	18/09/97	22/09/98	9.1	CBER	P	N
enbrel	etanercept	Immunex	08/05/98	02/11/98	5.8	CBER	P	N
lymerix	oSP. A	Smith Kline Beecham	15/09/97	21/12/98	15.2	CBER	S	N
ontak	denileukin diftitox	Seragen	09/12/97	05/02/99	13.9	CBER	P	Y
novoseven	factor VILA	Novo Nordisk	10/05/96	25/03/99	34.5	CBER	P	Y
单抗								
rituxan	rituximab	Idec/Genentech	28/02/97	26/11/97	8.9	CBER	P	Y
zenapax	dacliximab	Hoffman-La Roche	10/06/97	10/12/97	6.0	CBER	P	Y
simulect	basiliximab	Novartis	12/11/97	12/05/98	6.0	CBER	P	Y
synagis	palivizumab	Medimmune	19/12/97	19/06/98	6.0	CBER	P	N
remicade	infiximab	Centocor	30/12/97	24/08/98	7.8	CBER	P	N
herceptin	trastuzumab	Genentech	25/05/98	25/09/98	4.7	CBER	P	N
polyclonal antibodies								
respigam	RSV immunoglobulin	Medimmune	17/02/93	18/01/96	35.0	CBER	S	Y
thymoglobulin	thymoglobulin	Sangstat	17/01/97	30/12/98	23.4	CBER	S	N
非重组蛋白								
sucraid	sacrosidase	Orphan Medical	06/05/97	09/04/98	11.1	CDER	P	Y
惠福仁	interferon alpha-N1	Glaxo Wellcome	30/09/97	25/03/99	17.8	CBER	S	N
反义寡核苷酸								
vitravene	formivirsen	ISIS Pharmaceuticals	09/04/98	26/08/98	4.6	CDER	P	N

注：稀少病症药物，Y=是，N=否。

生物技术药物的市场地位



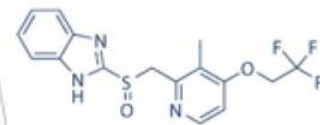
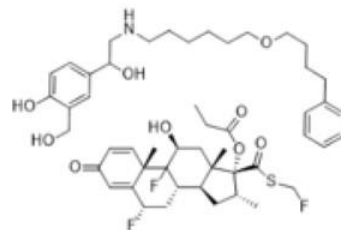
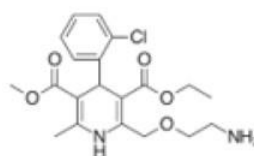
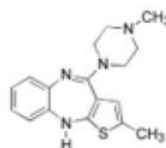
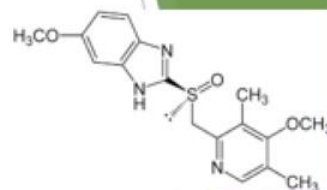
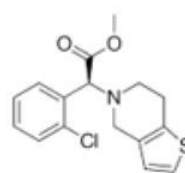
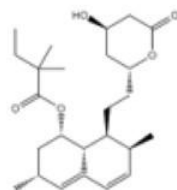
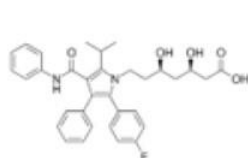
武汉大学
Wuhan University

The blockbusters

Top ten brands, global sales, 2004, \$bn

Lipitor (cholesterol-lowering)	12.0
Zocor (cholesterol-lowering)	5.9
Plavix (anti-clotting)	5.0
Nexium (anti-ulcerant)	4.8
Zyprexa (anti-psychotic)	4.8
Norvasc (anti-hypertensive)	4.8
Seretide/Advair (anti-asthma)	4.7
Erypo (blood-cell booster)	4.0
Prevacid (anti-ulcerant)	3.8
Effexor (anti-depressant)	3.7

Source: IMS Health



排名	药品	中文名	公司	2019预测销售额 (亿美元)
1	Humira	修美乐	艾伯维	196.04
2	Revlimid	瑞复美	新基	109.18
3	Keytruda	可瑞达	默沙东	98.01
4	Eliquis	艾乐妥	BMS	76.66
5	Opdivo	欧狄沃	BMS	73.41
6	Avastin	安维汀	罗氏	61.51
7	Stelara	喜达诺	强生	58.74
8	Prevnar 13	沛儿13	辉瑞	58.06
9	Herceptin	赫赛汀	罗氏	55.99
10	Rituxan	美罗华	罗氏	53.58

← Fc融合抗体药

← PD-1抗体药

← 抗体药

← 抗体药

← 抗体药

← 抗体-药物偶联

← 抗体药

← 抗体药



生物技术药物的制备方法

- 培养提取制备天然生化药物
- 发酵生产的微生物药物（抗生素）
- 现代生物技术生的生物技术药

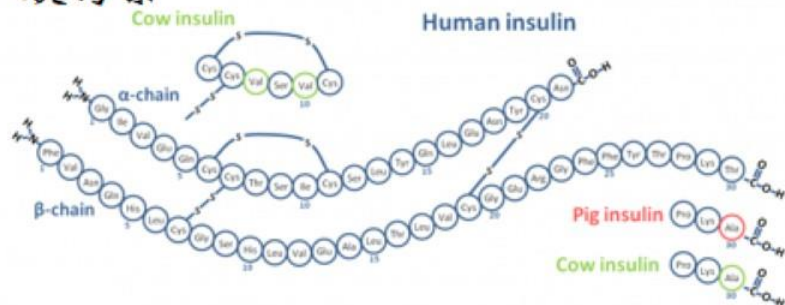
生物药物主要制备方法



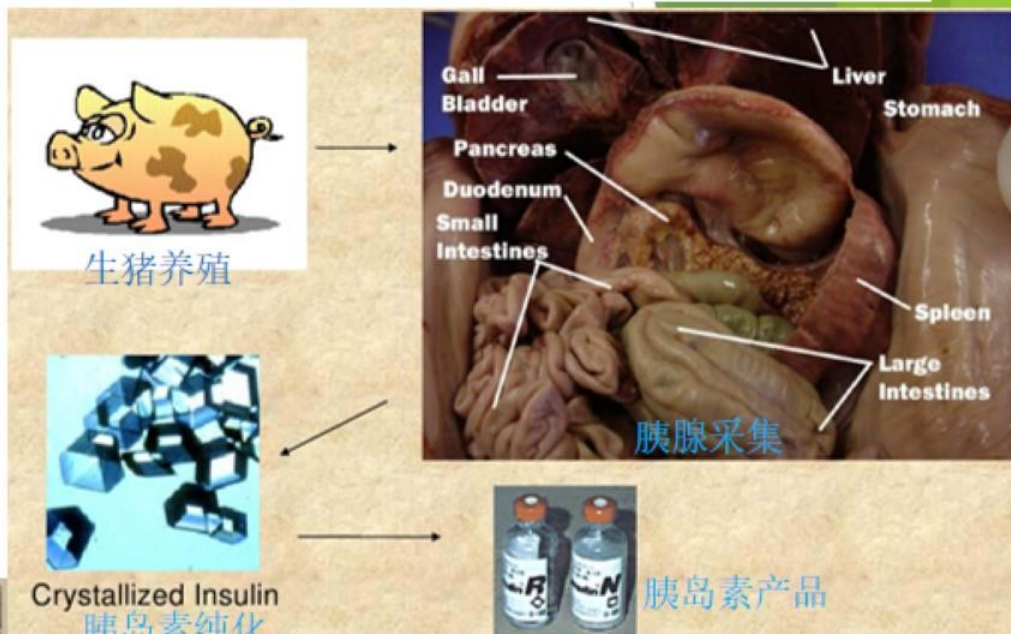
武汉大学
Wuhan University

(1) 提取法 运用各种生化提取分离技术，从动物、植物、微生物等的细胞、组织或器官中提取、分离和纯化各种天然有效成分的工艺过程称为提取法。

胰岛素



1920s礼来制药的胰岛素车间



10公斤猪胰腺生产1g猪胰岛素，约需30头猪



(2) 发酵法

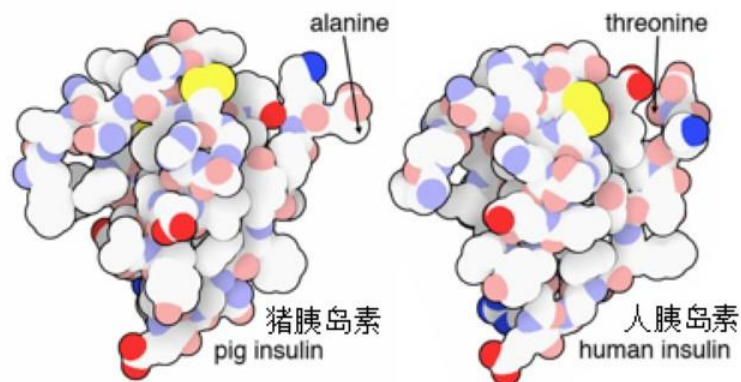
发酵法是现代生物技术制药的主要方法之一



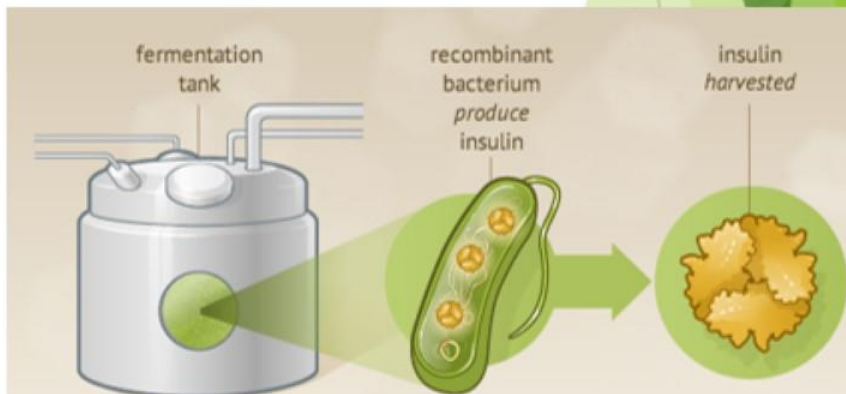
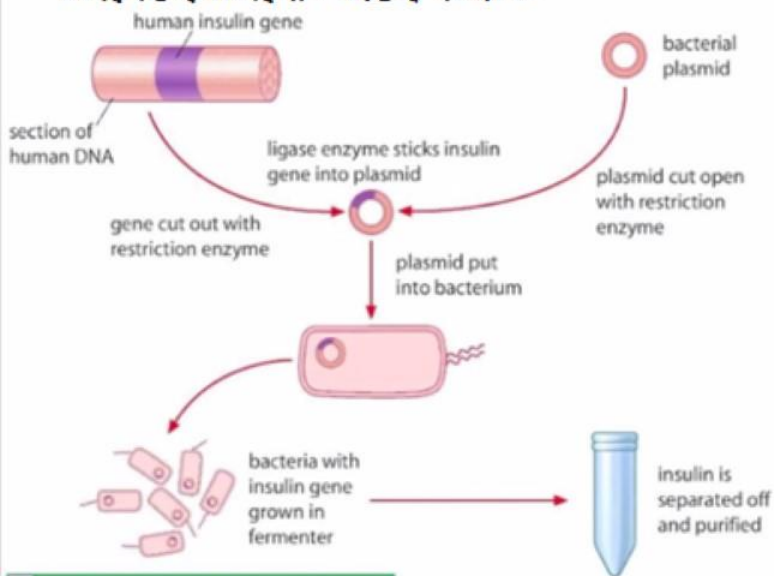
武汉大学
Wuhan University

发酵法是通过人工培养微生物（细菌、放线菌、真菌）生产各种生物药物的方法。它是从发酵液中，获取微生物产生的代谢产物或多余的营养物质，或破坏菌体细胞，分离出生物药物，或利用菌体中的酶体系，加入前体物质进行药物的生物合成。

- 猪胰岛素和人胰岛素结构略有不同，活性不同



- 细菌发酵法制备人胰岛素原理



细菌发酵生产胰岛素原理

(3) 组织培养法

利用植物组织和动物组织培养制备生物技术药物。

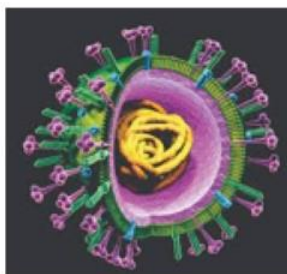
鸡胚胎制备病毒疫苗



自动化注射



孵育



病毒结构

将病毒注入鸡蛋胚胎中



孵育，病毒复制



抽取含病毒
的清液
并灭活病毒

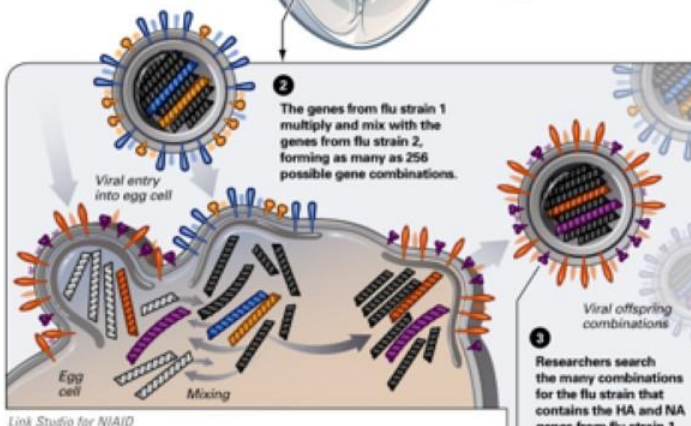
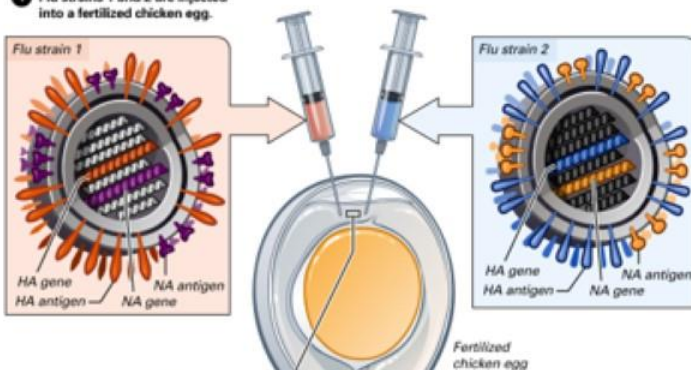


加入辅料，
包装得疫苗

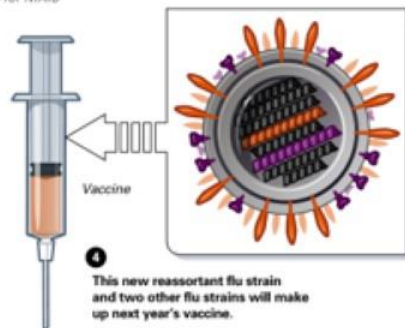
灭活疫苗制备

A flu virus contains eight gene segments. The goal is to combine the desired HA and NA genes from flu strain 1 with genes from flu strain 2, which grows well in eggs and is harmless in humans.

1 Flu strains 1 and 2 are injected into a fertilized chicken egg.



Link Studio for NIAID



4 This new reassortant flu strain and two other flu strains will make up next year's vaccine.

(4) 工程细胞法



武汉大学
Wuhan University

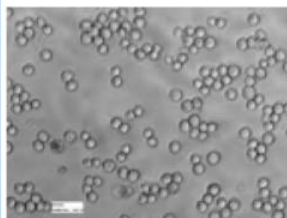
细胞工程制药是细胞水平上的生物学方法，将其应用于药物的工业生产。

主要用于重组蛋白质药物，抗体药物的生产。

主要产品有干扰素、白细胞介素、肿瘤坏死因子、红细胞生成素、碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF)、人胰岛素、人生长激素 (hGH) 和细胞集落刺激因子 (CSF)、各种疫苗、单克隆抗体等。



生物反应器



悬浮细胞



生物反应器

第一节 天然生化药物

天然生化药物



武汉大学
Wuhan University

指从生物体、生物组织、细胞、体液等原料中提取的一类用于预防、治疗和诊断的制品，包括综合利用生物化学、生物技术的方法人工制造的这类产品。

(1) 植物原料

从菠萝中提取的菠萝蛋白酶，木瓜中提取的木瓜蛋白酶，瓜蒌中分离出的引产药天花粉蛋白以及从蓖麻籽中提取的抗癌毒蛋白蓖麻毒素等

(2) 动物原料

最初的生物药物实际上大多数都来自动物的脏器中提取的荷尔蒙激素等。
如胰岛素，肝素

(3) 微生物原料

各种微生物酶以及生物工程技术合成的生化药物。
如各种抗生素、维生素

(4) 海洋生物原料

海藻多糖， GV-971



天然生化药物的特点

1. 天然提取生化药物的药理学特性

①治疗的针对性强

由于治疗的生理、生化机制合理，疗效可靠，因此治疗的针对性强。

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。

③毒副作用小，营养价值高

由于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，因此对人体不仅无害而且还是重要的营养物质。

④常有生理副作用发生

由于生物药物是从生物原料制得的。而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，其中尤以分子量较大的蛋白质（含酶）更为突出。这种差异使得在用生物药物时就表现出副作用，如产生免疫反应、过敏反应等。



天然生化药物的特点

2. 生产、制备中的特殊性

①原料中的有效物质含量低

如胰腺中胰岛素含量仅为0.002%，长春花植物中长春生物碱含量仅有0.0001%，杂质种类多且含量高，因此提取、纯化工艺复杂。

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，而生物大分子药物是以其严格的空间构象来维持其生物活性功能的，因此一旦其空间构象遭到破坏，就会失去其药理作用。

③易腐败

由于生物药物原料及产品均为营养价值较高的物质，因此极易染菌、腐败，从而导致有效物质被破坏，失去活性，并且产生热原或导致过敏的物质等。因此生产过程中往往严格要求在低温和无菌下操作。

④多用于注射给药

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、有效性等都有严格要求。同时对其理化性质、检验方法、剂型、剂量、处方、储藏方式等亦有明确的要求。



天然生化药物的特点

3. 检验的特殊性

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。

另外，很多天然生化药物是从动植物中直接提取的，提取过后的产品中往往含有很多**杂质**，特别是结构和药物类似的杂质，检验是需要特别的标准规范。

- 胰岛素的检测除了检测含量和纯度外，胰岛素还可能会变性，失去生物活性，因此还需要检测活性。
- 肝素是从猪小肠中提取的，可能会有肝素类似物的干扰，比如硫化皮质素。



天然生化药物的分类与作用

生物药物发展至今，已经形成了较为齐全的品种门类，按照生物药物的化学本质和化学特性进行分类，主要分为以下几类。

(1) 氨基酸类

蛋氨酸用于防治肝炎、肝坏死和脂肪肝；谷氨酸用于防治肝昏迷、神经衰弱和癫痫；N-乙酰半胱氨酸用于黏痰、脓性痰、呼吸道黏液的溶解药等，也可用复方氨基酸作血浆代用品和向病人提供营养等。

(2) 多肽和蛋白质类

主要是人体内的生理活性因子，如激素、免疫球蛋白和细胞生长因子。人胰岛素（用于糖尿病的治疗）、人生长激素等

(3) 酶及辅酶类

助消化酶类，消炎酶类，心血管疾病治疗酶，抗肿瘤酶类

辅酶在酶促反应中起着传递氢、电子或基团的作用，对酶的催化反应起着关键作用。如辅酶Ⅰ (NAD)、辅酶Ⅱ (NADP)、黄素单核苷酸 (FMN)、黄素腺嘌呤二核苷酸 (FAD)、辅酶Q10、辅酶A等已广泛用于肝病和冠心病的治疗。



天然生化药物的分类与作用

(4) 核酸类及其衍生物

包括核酸 (DNA, RNA)、多聚核苷酸、单核苷酸、核苷、碱基等。

(5) 糖类

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。

多糖类药物来源广泛，它们有抗凝、降血脂、抗病毒、抗肿瘤、增强免疫功能和抗衰老等多方面的生理活性。

肝素、硫酸软骨素A、透明质酸、壳聚糖、取自海洋生物的刺参多糖，真菌多糖具有抗肿瘤、增强免疫功能

(6) 脂类

①磷脂类 脑磷脂、卵磷脂可
多价不饱和脂肪酸，胆酸类



天然生化药物的分类与作用

(7) 生物制品

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、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。如疫苗

(8) 动物器官或组织制剂

这是一类对其化学结构、有效成分不完全清楚，但在临床上确有一定疗效的药物，俗称脏器制剂，近40种，如动脉浸液、脾水解物、骨宁、眼宁等

(9) 小动物制剂

如蜂王浆、蜂毒、地龙浸膏、水蛭素等。

大部分天然生化药物来源于动物

动物来源生物药物是指以动物组织或器官为原料，运用各种生化提取分离技术经提取、分离和纯化得到的一类天然药物。以酶及辅酶、多肽激素及蛋白质、核酸及其降解物、糖类及脂类等药物为主。

动物来源生物药物的特点：

(1) 原料来源丰富

动物原料主要有牛、猪、羊等的器官、组织、腺体、血液、毛角等。

(2) 需重视安全性

由于动物与人体族群差异较大，因此活性物质的结构也有一定的差异；另外还有一个免疫毒性的问题。

另外，提取纯化过程中的污染问题。

动物来源生物药物的制备

(1) 动物药物原料的选择、预处理与保存方法

(2) 药物的提取

生物组织与细胞的破碎

磨切法， 压力法， 反复冻融法， 超声波振荡， 自溶法或酶解法

提取

(3) 药物的分离纯化

蛋白质类药物

{ 沉淀法；
按分子大小分离的方法，超滤法和透析法；
离子交换柱色谱法、电泳法、亲和色谱法

核酸类药物的分离纯化方法

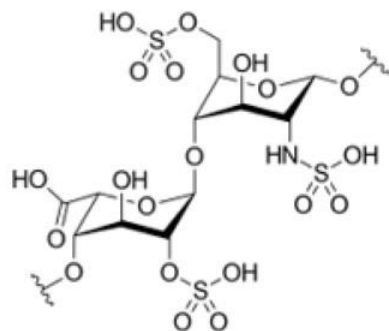
糖类药物的分离纯化方法

动物来源生化药物-案例分析



武汉大学
Wuhan University

肝素的工业化生产



肝素 (Heparin), 是一种天然糖胺聚糖抗凝血剂, 可用来治疗及预防深静脉血栓、肺栓塞、动脉栓塞, 也可用于治疗心肌梗塞以及不稳定型心绞痛。

- 肝素是一种高度硫化的糖胺聚糖。结构复杂, 肝素的分子量介于 12 到 15 kDa 之间。
- 药品级的肝素是从屠宰动物的黏膜 (如猪肠或牛肺) 纯化而来。全合成肝素的技术正持续地研发。
- 肝素年产量大概 100 吨, 年销售额有 30 亿美元。

Capacity of Major Heparin API Companies in China as of June 2014

Unit: Billion Units

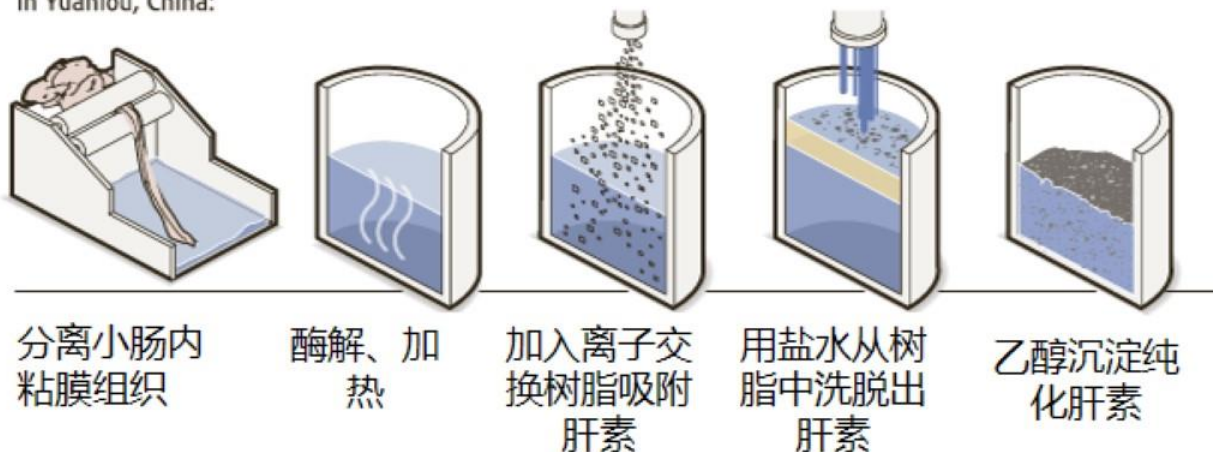


Source: China Heparin Industry Report, 2014-2017

中国供应全美国 60% 肝素原料药

The Birth of a Medicine

Heparin, a type of sugar that can help prevent blood clots, has its origins in slaughterhouses and sausage-casing factories in China. How the process unfolds at the Yuan Intestine and Casing Factory in Yuanlou, China:



Note: Illustration is schematic.

Source: Yuan Intestine and Casing Factory

动物来源生化药物-案例分析



武汉大学
Wuhan University

肝素提取场景



中国一年养殖7亿头猪



分离小肠黏膜



加热、酶消化、乙醇沉淀



柱分离的粗品



质控

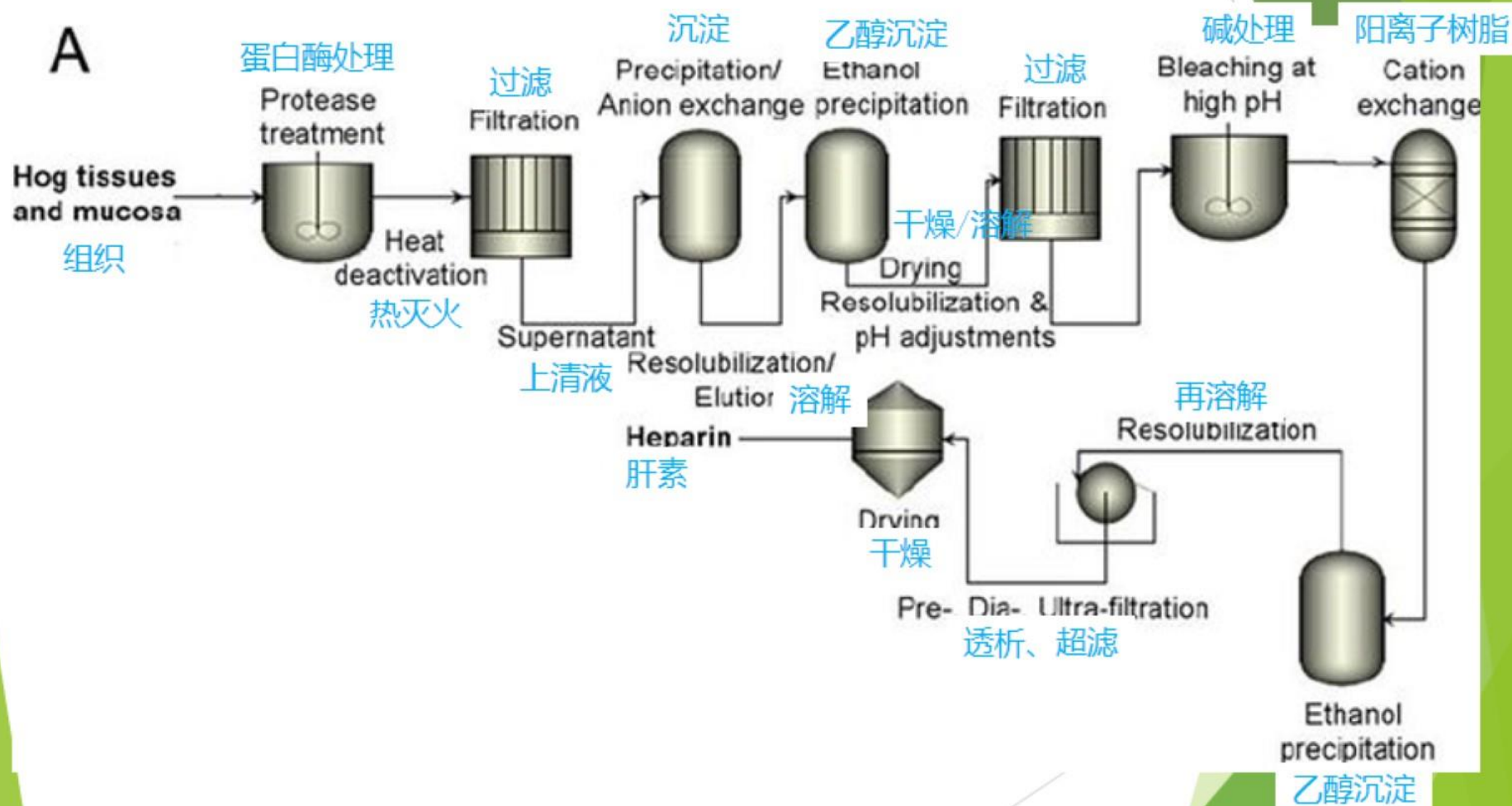


动物来源生化药物-案例分析



武汉大学
Wuhan University

肝素生产设备流程图





动物来源生化药物-案例分析

肝素等动物来源药物的安全问题：

- 污染问题

相比于完全由化学合成的治疗药剂，由动物来源萃取纯化的肝素潜在的杂质多得多了

结构与肝素类似的污染物，比如硫化皮肤素

肝素制剂遭到粘质沙雷氏菌污染

肝素遭到硫化软骨素污染，至少有十九个人因此死亡

- 药源保障安全问题

非洲猪瘟让全球肝素供应紧张



第二节 微生物发酵生化药物

微生物发酵制药的基本原理与工艺



武汉大学
Wuhan University

适用于微生物发酵制药生产的药物类型：

① 抗生素类

土壤微生物，占全部已知抗生素的70%左右，有价值的抗生素几乎全是由微生物产生

② 氨基酸类药物

用微生物生产氨基酸的方法分微生物细胞发酵法和酶转化法

典型代表是味精

③ 核苷酸类药物

核苷酸类物质和氨基酸等类似，是微生物的初级代谢产物

④ 维生素类药物

微生物发酵技术生产的维生素类药物及其中间体有维生素B₂（核黄素）、维生素B₁₂（氰钴氨素）、2-酮基-L-古龙酸（维生素C原料）、 β -胡萝卜素（维生素A前体）、麦角甾醇（维生素D₂前体）

微生物发酵制药的基本原理与工艺



武汉大学
Wuhan University

⑤甾体类激素

前可的松、氢化可的松、泼尼松、地塞米松及确胺舒松等甾体激素化学合成工艺

⑥药用酶及酶抑制剂



微生物发酵制药的基础

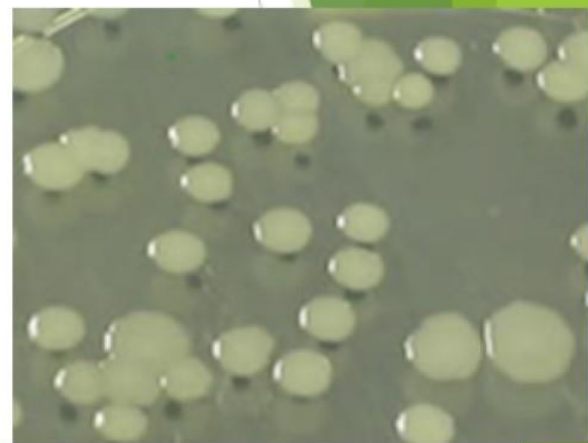
在微生物发酵制药中，常用微生物种类：细菌、酵母、放线菌、霉菌

1) 细菌(bacteria)

- 分布广泛，且数量最多，常以单细胞形式存在。
- 细菌个体很小，一般在 $0.5 \sim 5\mu\text{m}$

球菌、杆菌和螺旋菌

微生物发酵制药工业中应用的细菌多为杆菌



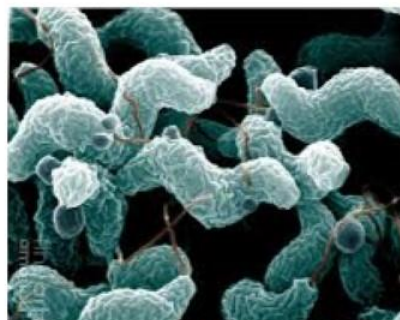
细菌的菌落形态



球菌



杆菌



螺旋菌



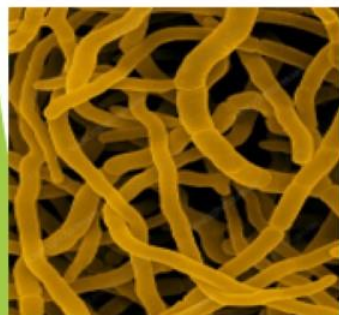
微生物发酵制药的基础

(2) 放线菌 (actinobacteria)

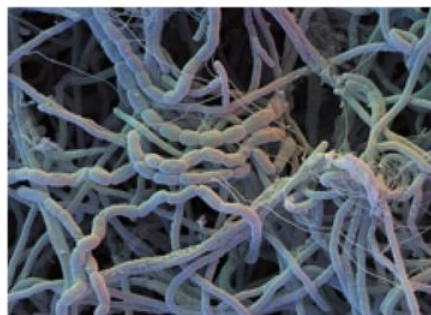
放线菌亦属于原核微生物，其大小介于细菌与霉菌之间，直径 $1\mu\text{m}$ 左右，广泛存在于泥土之中。

数千种微生物产生的抗生素中，约有80%以上是由放线菌产生的。

在工业微生物与深层发酵技术的研究领域内对放线菌的研究最多，相关发酵技术也最成熟。微生物发酵制药工业中常用的放线菌有龟裂链霉菌（产土霉素）、金黄色链霉菌（产金霉素）、灰色链霉菌（产链霉素）、红链霉菌（产红霉素）、红小单胞菌（产庆大霉素）、委内瑞拉链霉菌（产氯霉素）、卡那链霉菌（产卡那霉素）



龟裂链霉菌



链霉菌



单胞菌



链霉菌的菌落形态



微生物发酵制药的基础

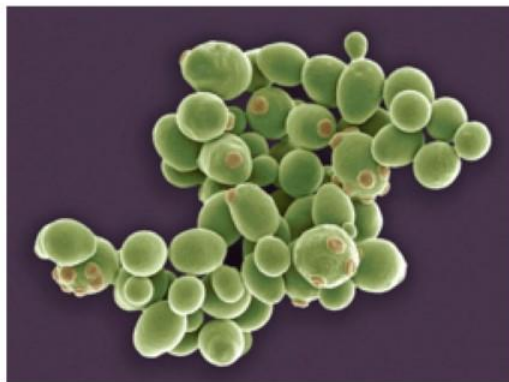
(3) 酵母菌 (Yeast)

酵母菌及霉菌皆属真菌，但酵母为单细胞，形状简单，呈卵圆形、圆形或圆柱形。

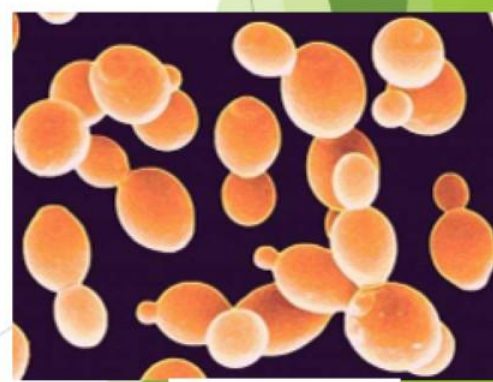
酵母菌广泛地生存于空气、土壤、水及果实表皮等处。

相对于细菌和放线菌来说，霉菌和酵母菌的个体显得比较大。

微生物发酵制药工业中常用酵母菌有酿酒酵母属及假丝酵母属。



酵母



酵母出芽



微生物发酵制药的基础

(4) 霉菌 (mold)

霉菌广布于自然界，其既可引起食品、粮食、衣物及生活品霉烂变质，亦用于生产多种有用物质。

霉菌呈丝状，与放线菌相似，但菌体大得多。

霉菌可无限生长，以致肉眼可见，且其菌丝由多细胞组成，细胞间有隔膜，故霉菌为多细胞微生物。

微生物发酵制药工业中常用霉菌发酵生产抗生素、酶类、有机酸、维生素、激素及酒精等。

应用最多的是曲霉属，如黑曲霉（产淀粉酶、蛋白酶、柠檬酸及葡萄糖酸等）；青霉属，如产黄青霉（产青霉素）及产灰青霉（产灰黄霉素）；根霉属，如米根霉（制曲及生产乳酸等）



青霉

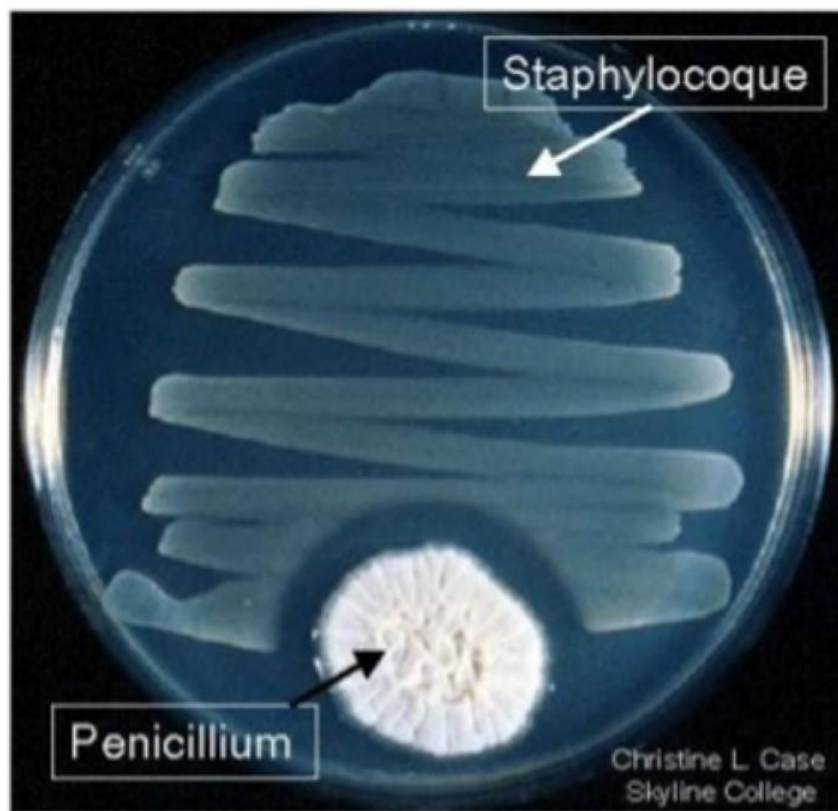


产黄青霉

霉菌产生抗生素用于抑制细菌生长

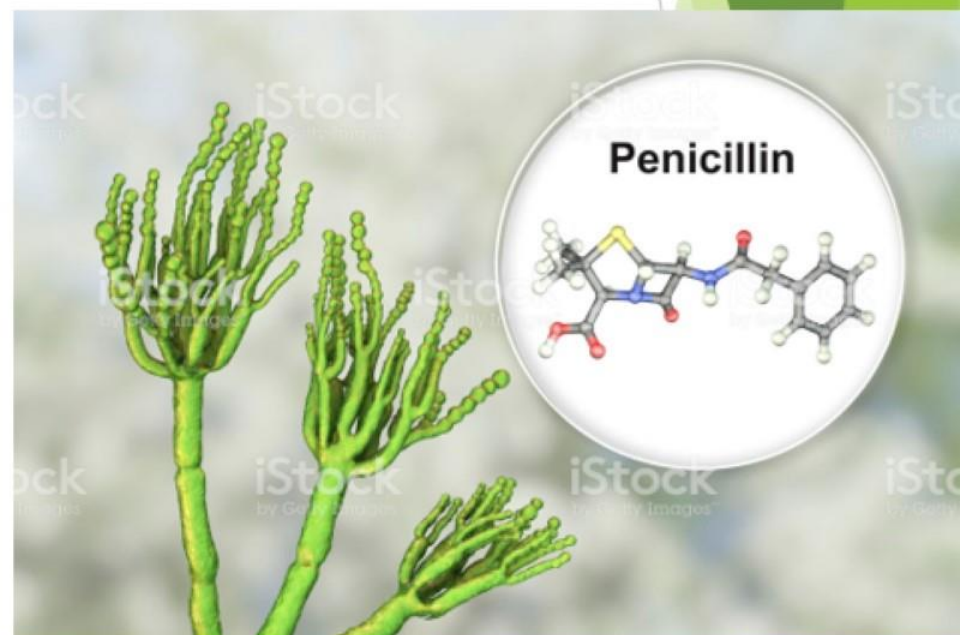


武汉大学
Wuhan University



抗生素作为霉菌的次生代谢产物，
被霉菌作为武器，用于霉菌和细菌对环境
中营养成分的竞争。

产黄青霉（黄白色）的代谢产物青霉素杀灭葡萄球菌（灰白色），为青霉菌竞争得营养和生长空间。

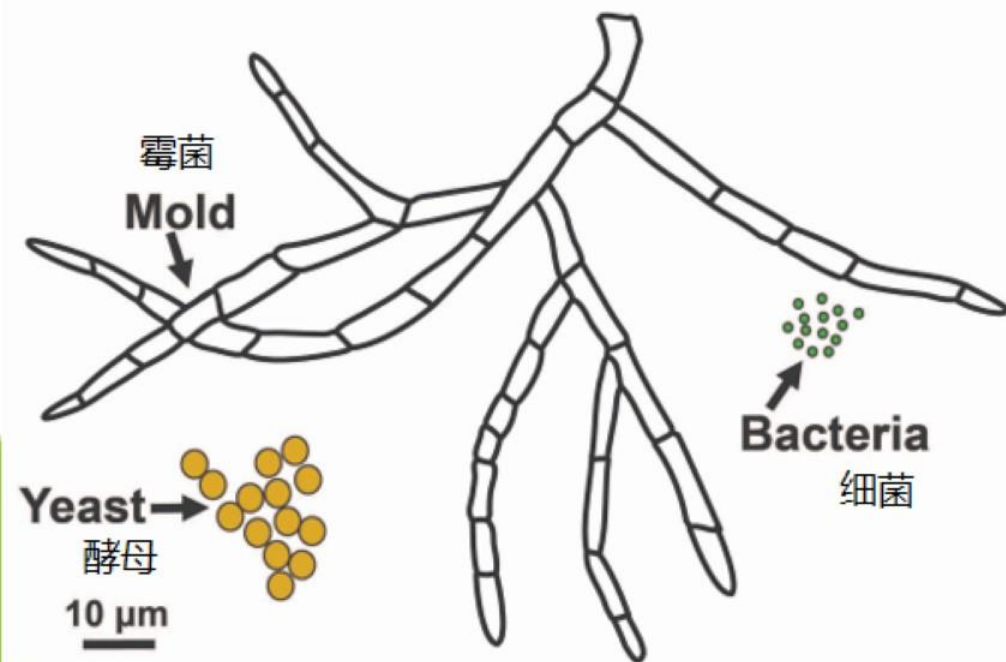


常见微生物的显微比较（形态与大小）

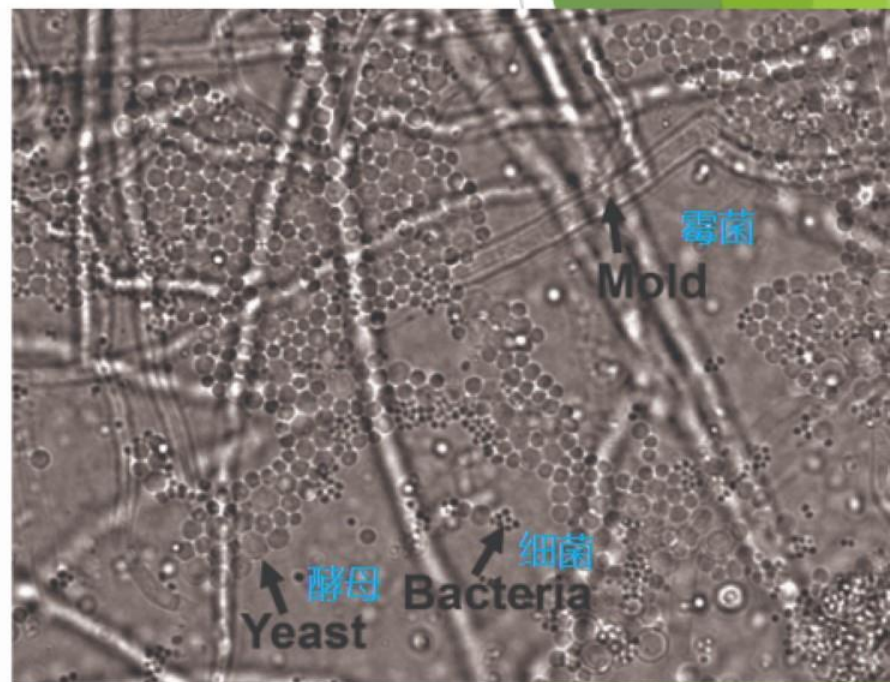


武汉大学
Wuhan University

微生物形态示意图



微生物显微图





微生物培养基

营养物质进入生物体内后，一方面为生物自身的合成代谢提供物质源，另一方面也为生命活动提供能量。

根据微生物的营养需求配制一组营养物质，这组营养物质就称为**培养基**。

微生物培养所需的营养物质按其类别：

(1) 碳源

主要营养与能量来源。碳源分为有机碳源和无机碳源。有机碳源如葡萄糖、蔗糖、淀粉、脂肪酸、豆油等，无机碳源即 CO_2

特殊碳源。对于食品工业的发酵，碳源一般是食物，比如葡萄酒发酵的碳源是葡萄。

(2) 氮源

氮源是微生物细胞中含氮物质（如氨基酸、蛋白质和核酸等）的主要来源，也是微生物培养过程中仅次于碳源的重要元素。

同样氮源可以分为**有机氮源**和**无机氮源**。有机氮源如玉米浆、花生饼粉、蛋白胨和酵母膏等，无机氮源有硫酸铵、硝酸盐、氨水、尿素等。

微生物培养基



武汉大学
Wuhan University

(3) 无机盐

无机盐也是微生物代谢所需的重要物质，其功用主要是构成菌体成分，作为酶的辅基或激活剂，**调节微生物体内pH值及维持渗透压**。但无机元素对菌体生长的影响颇为复杂，一般为浓度较低时，促进生长，浓度过大时抑制生长。

培养基的渗透压与pH值缓冲能力

无机元素有主要元素和微量元素

硫、钠、钾、钙及镁等，需在配制培养基时添加；
后者包括锰、铁、铜、锌等，需要量极微，有时常以“杂质”形式存在于其他主要成分中而无需另外添加。

(4) 微量生长素

主要是各种维生素和一些特殊的氨基酸等

必需氨基酸 + 非必需氨基酸

(5) 水和氧气



微生物培养条件及控制

(1) 温度的影响及其控制

菌体生长及产物形成均是在酶作用下实现的，但温度对酶活性影响极为显著。要保持正常发酵过程，需维持最适温度

对微生物而言，最适温度有最适生长温度和最适次级代谢温度之分。

表 4-2 某些微生物不同生理过程的最适温度

菌 名	最适生长温度/℃	最适发酵温度/℃	菌 名	最适生长温度/℃	最适发酵温度/℃
乳酸链球菌	34	40	卡尔斯伯酵母	25	4~10
灰色链霉菌	37	28	枯草杆菌(Bf7658)	37	37~38
酒精酵母	28	32~33	丙酮丁醇梭状芽孢杆菌	37	38~40

随着菌体对培养基的利用及机械搅拌作用，将使温度上升，而反应器的散热及水分蒸发亦带走部分热量，因此基质温度将发生改变，故需采取适当措施控制反应温度。

(2) pH值的影响及其控制

不同种类的微生物对环境中的pH值有不同的要求，

真菌喜欢酸性的环境，放线菌喜欢碱性的环境，细菌因种类的不同而两者皆有，但大部分细菌是在微酸性的条件下生长。

不同微生物生长发酵所需的最适pH值是不一致的。

表 4-3 微生物生长的 pH 值范围及最适 pH 值范围

微生物类型	最低 pH 值	最适 pH 值	最高 pH 值
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

微生物生长和发酵过程中生产的代谢产物会改变的培养基pH

- 增强培养基的pH值缓冲能力；
- 通过补料来控制发酵液中的pH值



微生物培养条件及控制

(3) 溶解氧的影响及其控制

由于在制药工业中所使用的微生物菌种基本上都是好氧性微生物，因此在发酵生产中溶解氧的控制连同搅拌的控制也是微生物培养条件中的重要内容。

在液体培养条件下，微生物只能吸收溶解在发酵液中的溶解氧，因此发酵过程中氧的供应通常是个关键因素。

在实际生产中影响溶解氧浓度的因素包括

培养温度、通气量、罐压、搅拌速度、菌体的生长速率（即微生物的不同生长阶段的速度）、发酵液的黏度、发酵罐内培养液的装量等。

从供氧方面考虑就是尽可能地通过增加通气量、提高搅拌速度（搅拌使微生物和氧气充分接触）、提高罐压、使用空气分布器和挡板等措施来保证氧的供应量大于氧的消耗量。

微生物培养条件及控制

微生物发酵生物反应器

无菌空气入口
酸碱调节剂入口
无菌密封



微生物群体生长规律



武汉大学
Wuhan University

微生物在有限培养基的液体培养条件下，群体生长规律（即生长过程）可以用微生物的生长曲线来表示。

微生物的生长曲线由以下四个部分组成。

(1) 延迟期

少量的微生物被接入到更大体积的新鲜培养基中后，将在一段时间内表现为微生物的细胞个数并没有明显增加，这段时间称为微生物生长的延迟期。

(2) 对数生长期

微生物细胞开始快速生长和大量繁殖，菌体内的代谢活动十分活跃，个体粗壮，胞内化学组成恒定。

(3) 稳定期

当菌体的数量达到一定值以后，发酵液中的主要营养物质已基本耗尽，对生长不利的废物（或称有害物质）也在不断积累，从而使菌体的生长繁殖速度减慢。此时活菌数保持在一个恒定值上，即新增加的活菌体量等于死亡的菌体量。

(4) 衰亡期

随着发酵液中营养成分的进一步耗尽，死亡菌体的数量逐步增加，微生物群体进入了衰亡期。宏观上表现为菌体浓度（菌体的沉降量）减少，发酵液的pH值上升，次级代谢产物的产量基本恒定，不再增加。

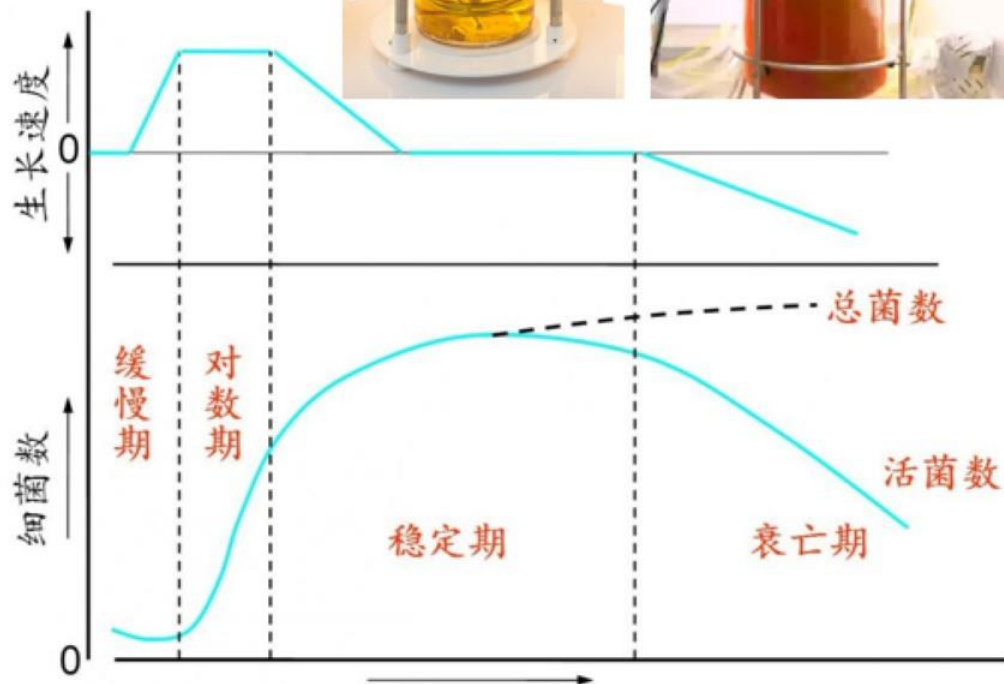


图 微生物生长曲线图

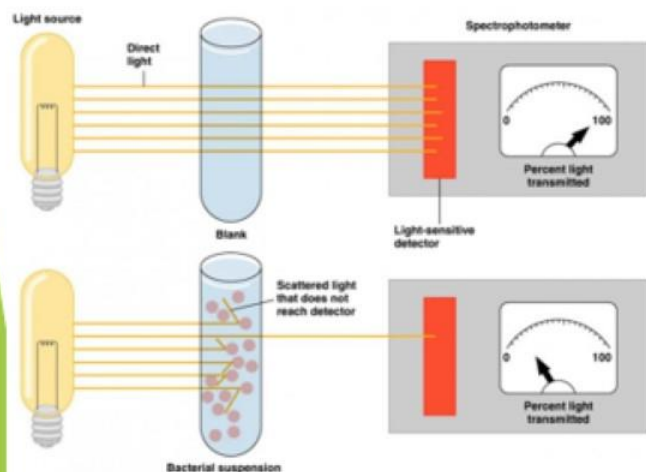
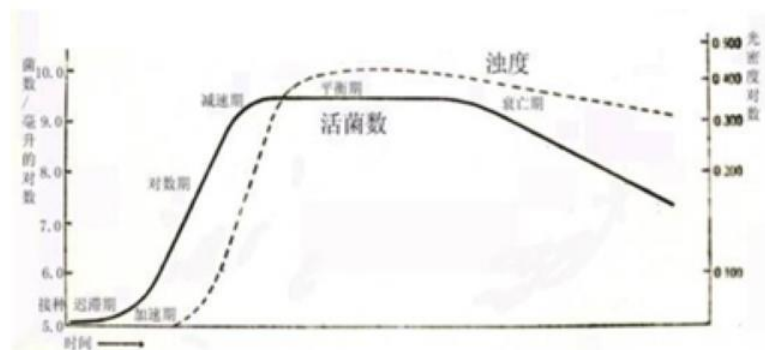
微生物生长的监测



武汉大学
Wuhan University

比浊法：

当光线通过微生物菌悬液时，由于菌体的散射及吸收作用使光线的透过量降低。



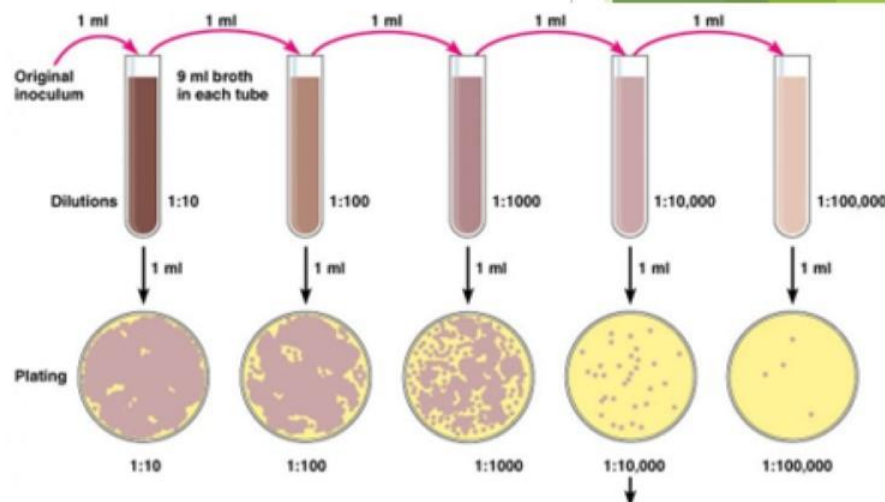
分光 光度计 测量

图比浊法示意图

比浊法一般测量600-800nm的光吸收度，因为在此范围光干扰小

液体稀释培养法：

记数方法所计算的菌数是培养基上长出来的菌落数，故又称活菌计数



Calculation: Number of colonies on plate $\times$ reciprocal of dilution of sample = number of bacteria/ml
(For example, if 32 colonies are on a plate of $1/10,000$ dilution, then the count is $32 \times 10,000 = 320,000$ /ml in sample.)

图 液体稀释培养计数法示意图



微生物生长代谢调节规律

次级代谢产物的产生具有滞后性

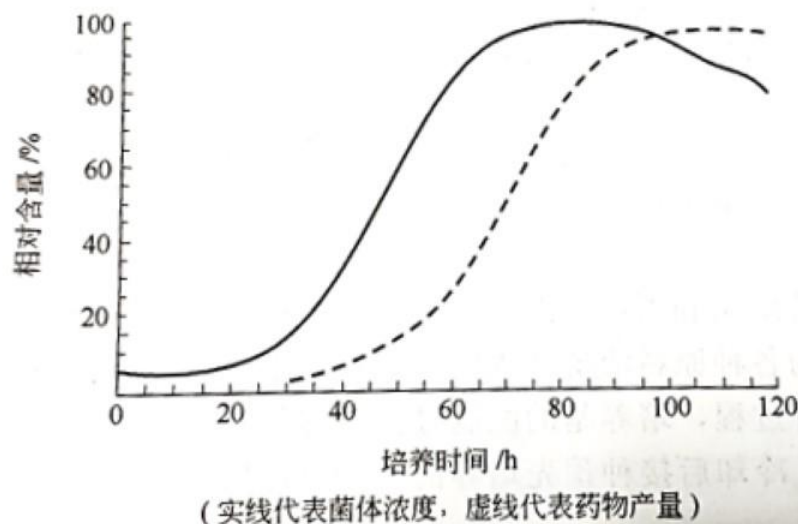


图 4-3 微生物生长曲线和次级代谢产物的产量

代谢产物的用途将代谢活动分为初级代谢和次级代谢。

初级代谢所得到的产物的种类和数量应是恰好能满足微生物在维持生命和生长繁殖过程中的需要量，是微生物的主要代谢活动。

次级代谢产物往往在种类上或数量上都不是微生物所需要的，亦即对微生物来说是属于额外的代谢产物。

大部分发酵生产的抗生素药物为次级代谢产物



微生物发酵制药的基本工艺

微生物发酵制药从原料到产品的生产过程非常复杂，包含了一系列相对独立的工艺过程。一般来说，微生物发酵制药的生产过程主要包括以下环节。

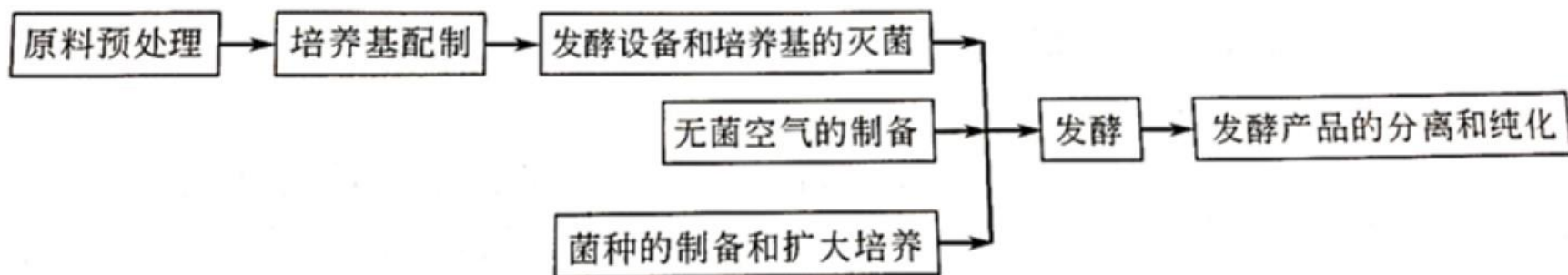


图 4-4 微生物发酵制药过程简图



微生物发酵制药的基本工艺

(1) 原料的预处理

选用玉米、薯干、谷物等相对廉价的农产品

对于很多不能直接利用淀粉或者直接利用淀粉效率不高的微生物，发酵前还需要将淀粉质原料水解为葡萄糖。

除碳源外，微生物的生长还需要氮源、磷、硫及许多金属元素

(2) 发酵培养基的配制和灭菌

发酵培养基大多数是液体培养基，它是根据不同微生物的营养要求，将适量的各种原料溶解在水中，或者与水充分混合而制成的悬浮液。

间歇发酵过程，培养基的配制过程通常就在发酵罐中进行。

最常用的培养基灭菌方法是采用高压水蒸气直接对培养基进行加热，从而杀死其中的微生物，称为蒸汽灭菌或湿热灭菌。

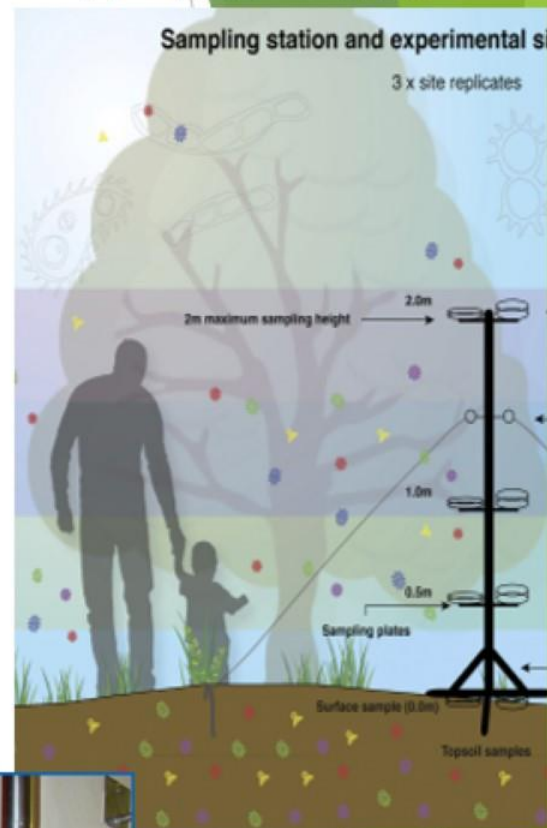
高空采风降低污染风险

发酵工业上一般都采用空气作为氧气的来源。自然界的空气中含有各种各样的微生物，因此在将空气通入发酵罐之前，必须除去空气中的微生物以保证发酵过程不受杂菌污染，使耗氧发酵能正常进行。这样制备的不含微生物的空气称为无菌空气。

一般每升高10m, 空气中微生物含量减少一个数量级。

高空采风、经空气压缩机加压后采用加热和过滤等手段灭菌。

无菌空气过滤装置





微生物发酵制药的基本工艺

(4) 微生物种子的制备

种子必须是生命力旺盛、无杂菌的纯种培养物。

种子的量也要适度，根据微生物的不同，通常接种体积要达到发酵罐体积的1% ~ 10%。

种子通常在小型发酵罐中培养，因其目的是培养种子，为有别于最后以生产产物为目的的大发酵罐，一般称为**种子罐**。

种子培养需要一个**逐级扩大**的过程，包括从斜面接种到摇瓶，再从摇瓶接入种子罐，通过若干级种子罐培养后再接种到发酵罐。

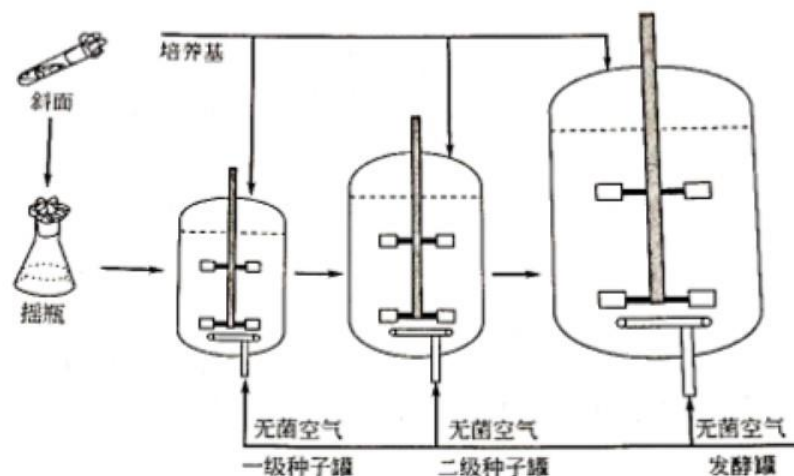


图 4-5 三级发酵扩大培养过程

微生物发酵制药的基本工艺



武汉大学
Wuhan University

(5) 发酵过程的操作方式

工业发酵分为三种模式，即间歇发酵、连续发酵和流加发酵。

① 间歇发酵

是发酵工业上最常见的操作方式，也称分批发酵或批式发酵。

将发酵罐和培养基灭菌后，向发酵罐中接入种子，开始发酵过程，发酵结束后，整批放罐。

操作简单、不容易染菌、投资低，主要缺点是生产能力效率低、劳动强度大，而且每批发酵的结果都不完全一样，对后续的产物分离将造成一定的困难

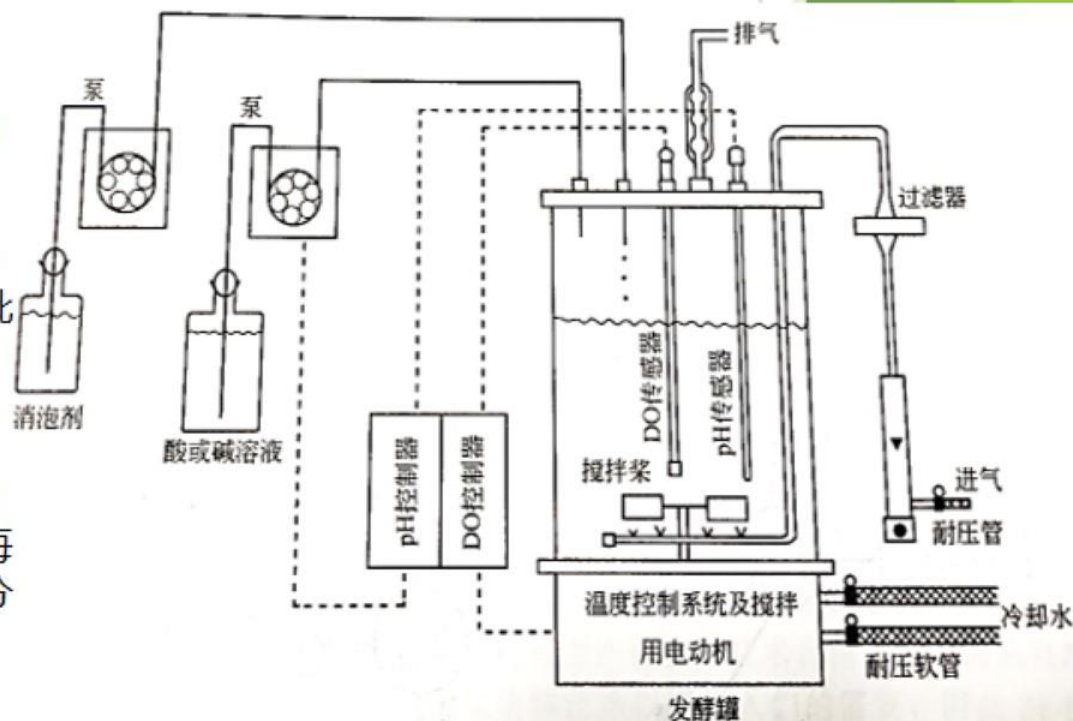


图 4-6 间歇发酵系统



微生物发酵制药的基本工艺

②连续发酵

指在发酵过程中向生物反应器连续地提供新鲜培养基（进料）并排出发酵液（出料）的操作方式。

通常在稳定操作时，进料和出料的流量基本相等，因而反应器内发酵液体积和组成（菌体、糖及代谢产物等）保持恒定。

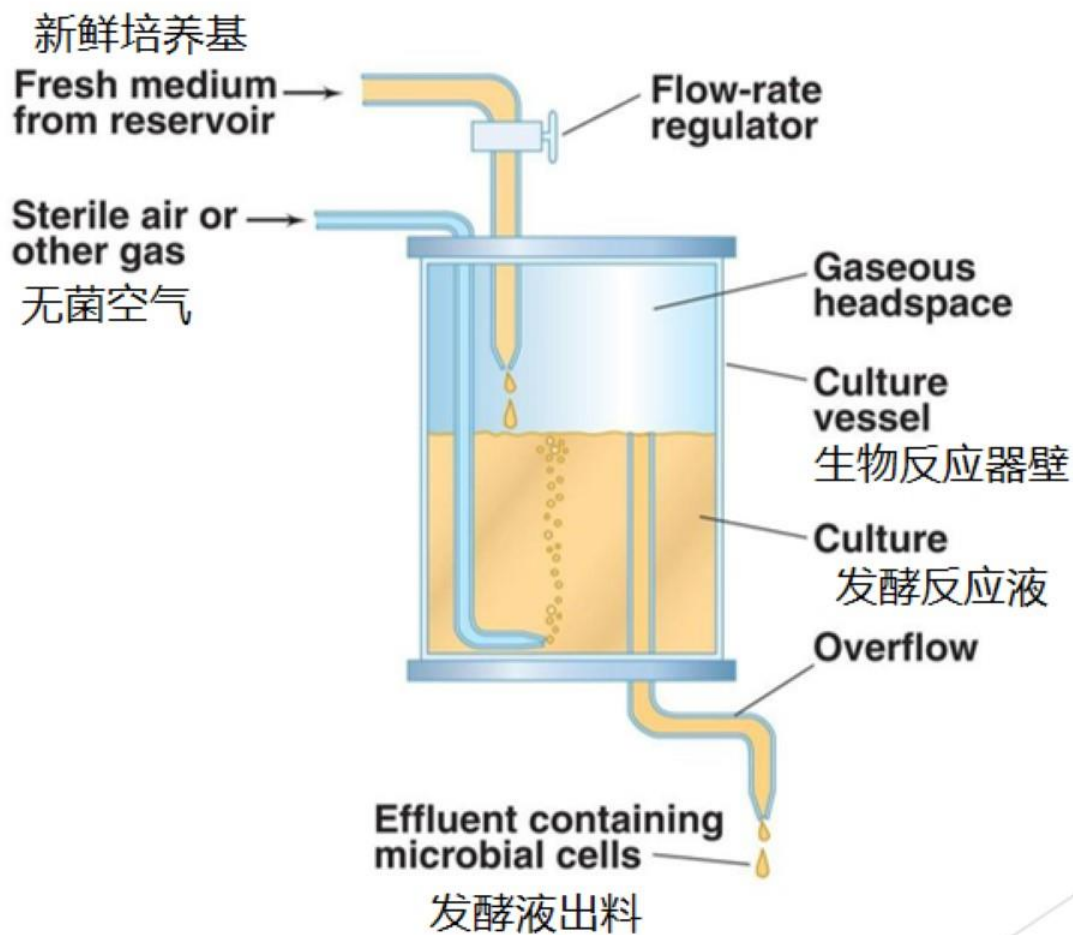
连续发酵的优点是可以长期连续运行，生产能力可以达到间歇发酵的数倍。

缺点：

- 投资一般要高
- 杂菌污染的控制和微生物菌种的变异

常见于实验室进行发酵动力学研究，在工业发酵中的应用不多见

连续发酵





微生物发酵制药的基本工艺

③流加发酵

流加发酵是介于间歇发酵与连续发酵之间的一种操作方式。

在工业上比较常用的操作方式

按一定的规律向发酵罐中连续地补加营养物和（或）前体，由于发酵罐不向外排放产物，罐中发酵液体积将不断增加，直到规定体积后放罐。

流加发酵能够大大延长细胞处于稳定期的时间，增加抗生素积累。

表 1 流加补料程序

Tab.1 Fed Batch Procedure

t/h	补料量/ $g (L \cdot h)^{-1}$
0~1	8~11
1~2	14~16
2~3	18~21
3~38	22~30



发酵产品的分离和纯化

发酵产物一般可分为三大类

- 能量代谢或初级代谢产物

碳源分解代谢产生能量的过程有关

如醇类、有机酸及大部分氨基酸等

- 次级代谢产物

产物往往与细胞的生长没有直接的关系，如抗生素等

- 基因重组产物

产物为发酵微生物受基因调控而生产

根据产物所处位置分为胞内及胞外产品，决定分离纯化工艺步骤



发酵产品的分离和纯化

发酵产物往往具有如下特点：

- 产物浓度低、组成复杂；
- 许多具有生物活性的产物对温度、pH值、离子强度及剪切力等敏感；
- 用于医药对最终产物的纯度和安全性要求高。

因此，发酵产物的分离提纯在生物工程中具有十分重要的地位，分离提纯的投资和操作费用都占有相当大的比重。

抗生素类生化药物常常采用有机溶剂萃取的方法将产物从培养基中分离出来。

发酵产品的分离和纯化



发酵产物分离提纯的一般工艺。主要有：细胞破碎（只用于释放胞内产物）、固液分离去除细胞或细胞碎片、产物的初步分离和浓缩、产物的提纯和精制、产物的最终加工和包装。

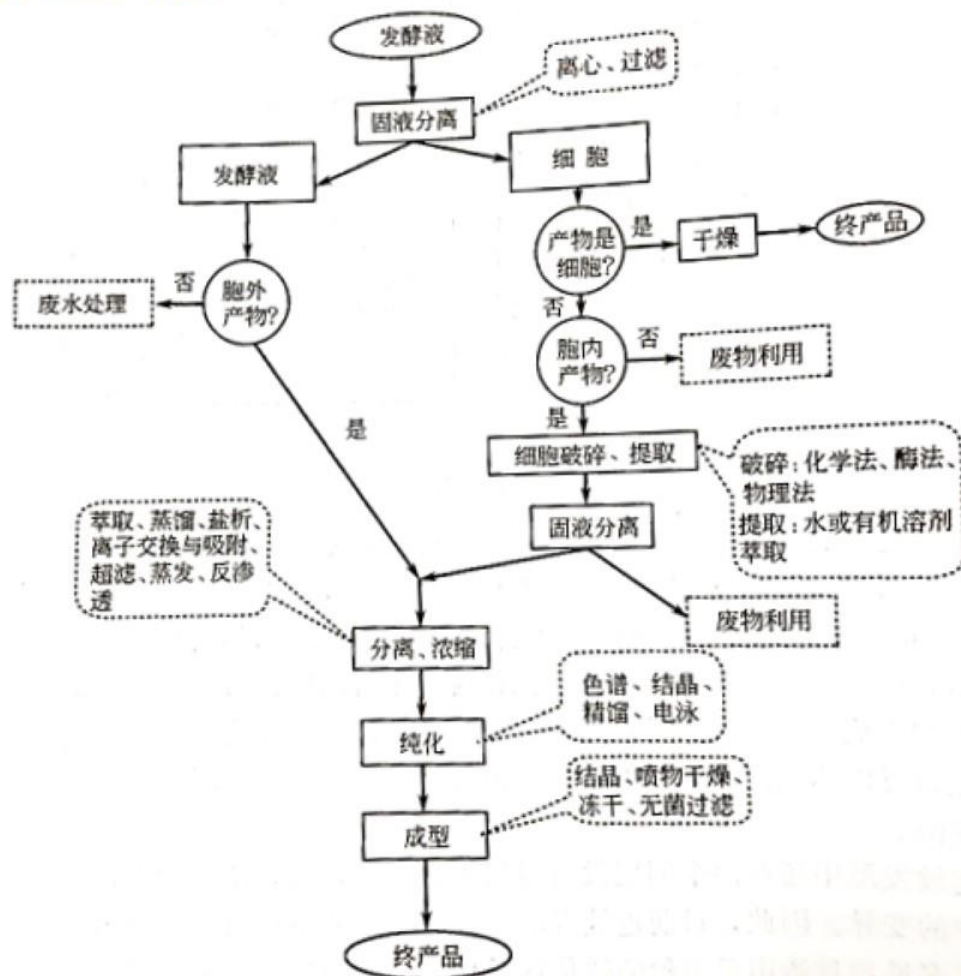


图 4-7 发酵产物的分离提纯工艺简图

青霉素工业生产设备流程图



武汉大学
Wuhan University

