

全国高校基础微生物学讲座
及教学经验交流班

生物工程与微生物学的关系

中科院上海植物生理研究所微生物室

焦瑞身

一九八四年八月 上海

生物工程与微生物学的关系*

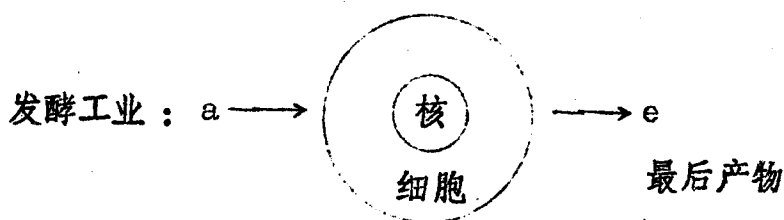
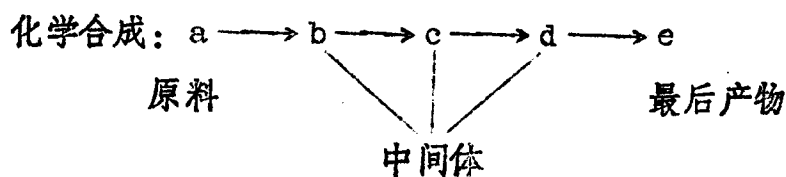
近几年来，生物工程学 (biotechnology) 在国外深受重视，很多国家政府直接或间接投资于生物工程各方面的开发，私人资本经营的生物工程公司如雨后春笋，已有几百家之多，在商业上也确有新产品如人体胰岛素、干扰素、猪痢疫苗等提供。显然，生物工程学是我国急待大力发展的学科。本文在介绍生物工程学的一些概念，以及近年国外有关生物工程的主要动向。

(一) 什么是生物工程学?

首先应该谈谈发酵工程学.

人类利用微生物已有悠久的历史。但近代的发酵工程学是从40年代中期抗生素的兴起而开始，现已在各国成长为巨大的工业。发酵工业的产品也随着人们掌握微生物能力的提高而扩展，不仅包括医疗药品，而且还有食品添加剂、化工原料、能源、农药、饲料等。众所周知，发酵工程有几个特点，也值得提出。

1. 一步生产: 发酵工程以微生物细胞催化(生物催化), 实行一步生产法, 这是与化工生产不同的。



在发酵中，所有中间步骤都在细胞中进行，无须如化学工业那样经过几个中间产物的步骤。

2. 采用温和条件——生物过程是在与生物体相适宜的条件下进行，无须高温高压或高度酸碱条件。化学工业须用高温高压等，这些过程都耗费较多能源而且易出事故。

3. 原料便宜——发酵工程所需要原料主要是农副产品，工业废水，再生能源等，而不象化学工业所需原料居多是纯品。

4. 设备投资较小，而且具有“多能性”——各种发酵过程基本相同，不论应用什么微生物、什么培养基或什么产品，同一设备或略加修改，可用于生产多种产品。

5. 减少环境污染——生物过程是高度专一性的，可控制产物形成，减少副反应等。所以需要处理的污染可以大大减少。

当然，和化学工业相比，发酵工程也有它的缺点：例如产品较稀，混有较多异物，提取纯化工艺较繁，从而提高成本。

近20年来，基础学科如微生物学、遗传学、细胞学、分子生物学、生化工程以及分析技术的发展，微生物工程发生了革命性的变革，不仅吸收了基因工程、细胞工程、连续化新技术，而且扩大领域到环境保护，可更新能源等方面。80年在加拿大召开的第六届“国际发酵讨论会”，正式宣布改名为“生物工程讨论会”，会后出版的论文集改名为“生物工程学进展”，而且将在1984年2月份在印度召开的下一届讨论会改为“国际生物工程学讨论会”。在这三大册论文集的序言中编言开始就说：

“生物工程学是一个多学科的领域，从生物学、化学和工程学相互渗透产生，而其基础则是微生物化学，如在几个世纪以来发酵工业所实践的那样。近年来在基因工程、燃料电池工艺、固相化体系、生物反应器设计等方面革命性的进展，以及对可更新能源更好

* 1983年4月在天津市召开的中国微生物学会四代会和同年上海市微生物学会年会上的发言。

地利用，卫生方面的改善和环境的更好管理，引起全世界对生物工程学的兴趣。鉴于这个迅速的发展，国际纯粹和应用化学联合会（IUPAC）决定从1984年开始将国际发酵讨论会改名为国际生物工程学讨论会。本论文集书名就在庆祝这个历史性的变化”。

这一见解当然受到从事本领域活动的人们赞赏的。很明显的是今日所谓生物工程学的基础仍是微生物发酵，但受到基因工程、固相菌（酶），可更新能源利用等的冲击，增加新的内容，新的强有力的技术，推动了这个领域向前发展。根据以上情况，我们可以把今日的生物工程学与发酵工程的关系用一示意图表示（图1）。

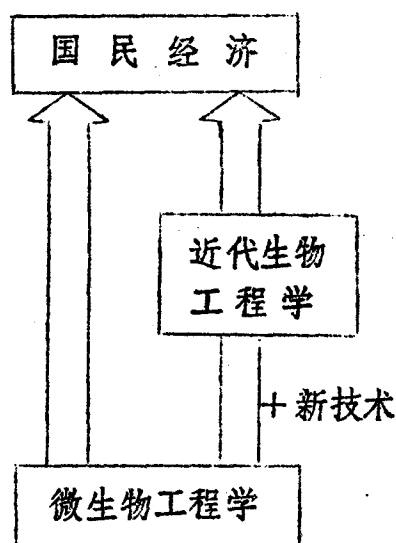


图1 生物工程学与微生物工程学

（二）生物工程学包括什么新技术？

如图1所示，生物工程学并不是全新的学科，而是在发酵工程学基础上吸收了新发展起来的基因工程，细胞融合与固相化菌，固相化酶进行连续化生产作业而成长起来，所以生物工程学和发酵工程一样是应用活的生物体（主要是微生物，包括动植物细胞）或其

组成部份(细胞器和酶)在控制的最适条件下进行工业生产。为了获得高产,在生产过程中,必须对重要参数进行检测,并进一步做到计算机程序控制,生物工程的最终目的是使每一单元操作都能做到最优化,从而整个过程也达到最优化。所谓生物工程最优化就是以最少原料最短时间,消耗最少能源,生产最高量的合格产品。

(三) 生物工艺流程

从上面的讨论中,我们可以明确,生物工程是以发酵工程为基础,采用新的技术方法,扩大产品范围,而且要做到最优化生产。为了进一步明确新技术在这一个综合性的技术科学领域中的相互关系,我们把一般生物工艺流程用图2表示。(图2见末页)

进行生物工程学工作,首先要解决具有优良性状的菌种,这里除传统方法外,细胞融合和基因工程大可发挥作用。有了菌种(克隆),下一步则是生理研究,目的在解决菌种的营养要求,最适宜的培养基,培养条件等。在生理研究的基础上,再在发酵缶中进行生长动力学和产物形成动力学研究。这些动力学研究可为生产控制,模拟放大、最优化控制以及电子计算机的程序控制提供模型。生物工程工作的效益须从成品来体现,所以生物工程工作是几步工作的接力赛。当前基因工程是十分引人入胜的技术,但基因工程如无菌种生理研究、中试、生产和产物提取与精制,则不能体现其优越性。同样,酶工程生产如无前面几步预备工作,酶工程工作将成为无源之水,无本之木。显而易见,生物工程学是多学科的一种综合技术科学,它所涉及的有基础学科,也有技术科学,要一项生物工程的成功,各个环节必须密切协作的。

这里应特别提出的是近年各种酶电极的研制,对生物工程的发展起着愈来愈重要的作用,酶电极的发展与纤维性蛋白膜的成功分不开。这种模的电化学应用,为固相化酶和菌体提供有效的方法,从而使制备连续使用的稳定生物催化剂如酶电极成为可能。许多有机化合物就可通过装有固相化酶或菌体的电化学装置进行监测,这些装置有下列优点:

- (1) 根据产生的电信号很方便地直接测定。
- (2) 反应迅速, 在发酵中“就地”测定, 无须采样。
- (3) 适用于有色样品。
- (4) 生物催化剂可多次使用。

这些装置主要是应用于临床化验和发酵缸监测参数, 特别在发酵缸上, 为研究动力学过程和最佳化工作提供有利条件。

三种类型的电化学生物传感器, 列如表 1:

(见 Applied Biochemistry and Bioengineering 3, 145—174, 1981; Topics in Enzyme and Fermentation Biotechnology 2, 120—151, 1978; Biotech 83, 613—663, 665—704, 1983)

表 1 电化学生物传感器

传感器类别	组 成	特 性
(I) 采用固相化酶的 生物电化学生物 传感器		(底物浓度, 反应时间, 寿命)
(1) 过氧化氢传感器	过氧化氢酶—胶原蛋白 + O_2 —电极	食品、纺织业上监测 H_2O_2 (0.1—15 mM), 反应时间 1 分 (20 °C)
(2) 蔗糖传感器	转化酶 + 变旋酶 + 葡萄糖氧化酶—胶原蛋白 + O_2 电极	临床, 工业测定蔗糖 (1—10 mM), 寿命 10 天
(3) 单胺传感器	单胺氧化酶—胶原蛋白 + O_2 电极	食品上测肉类鲜度组胺, 酪胺, 异丁胺 (1 mM 以下), 寿命 2 周以上

传感器类别	组 成	特 性
(4) 胆固醇传感器	胆固醇氧化酶—胶原 蛋白 + O_2 电极	监测游离胆固醇 (-0.2 mM), 反应 时间几分钟
	胆固醇酯酶—胆固醇 氧化酶—辛基琼脂糖 + O_2 电极	监测总胆固醇 (20— 400 $\text{mg}/\text{升}$), 反应 时间2分寿命1月
(5) 中性脂传感器	酯酶—胶原蛋白膜 + 玻璃电极	中性脂 反应时间30分
	酯酶—聚苯乙烯膜 + PH 电极	中性脂 反应时间1分
(6) 磷脂传感器	磷脂酶 D—胆碱氧化 酶—琼脂糖凝胶 + Pt 电极	磷脂 反应时间3分
(7) 葡萄糖传感器	葡萄糖氧化酶 —PVC 膜	葡萄糖 反应时间1分钟
(8) 酒精传感器	乙醇脱氢酶—胶原蛋 白膜 + Pt 电极 + 碳 —阴极	乙醇 (10 mM 以下)
(9) 尿酸传感器	尿酸酶—胶原蛋白膜 + O_2 电极	尿酸 (到 1 mM)
(10) 乳酸传感器	乳酸氧化酶 + 乙酰纤 维素膜	乳酸 (到 1 mM) 反应时间2分, 寿命2 周以上

传感器类别	组 成	特 性
(II) 采用固相化菌体的生物电传感器		
(1) BOD传感器	土壤和活化污泥微生物, 固相化于聚丙烯酰胺凝胶+O ₂ 电极	污水BOD, 反应时间10—15分, 寿命10天以上
(2) 乙酸传感器	固相化 <u>Trichosporon brassicae</u> -Teflon膜+O ₂ 电极, 样品pH < 4.75	乙酸(5—54 mg/升), 反应时间30分, 甲酸甲醇无干扰, 寿命3周
(3) 乙醇传感器	同 上	乙醇浓度(2—22.5 mg/升), (pH5.2—6.0) 甲醇、甲酸、乙醇无干扰
(4) 制霉菌素传感器	固相化酵母—滤纸+O ₂ 电极	浓度(0.5—5.4 u/ml) 反应时间1小时, 可用于测定其它多烯抗生素
(5) 头孢菌素	固相化 <u>Citrobacter freundii</u> —胶原蛋白膜+玻璃电极	可监测Cephaloridine, Cephalothin, CPC, 苯乙酰—7ADCA, 反应时间10分, 寿命1月

传感器类别	组 成	特 性
(6) 烟酸传感器	固相化 <u>Lactobacillus arabinosus</u> 于琼脂凝胶 + 玻璃电极	浓度 $5 \times 10^{-2} - 5 \times 10^{-6} \text{ g/ml}$ 寿命 1 月
(7) 维生素 B ₁	Pt 阳极, Ag_2O_2 阳极电池, 样品加入 <u>Lactobacillus fermenti</u>	培养时间 6 小时, 监测电流
(8) 微生物生长 (酵母, 乳酸菌)	同 上	
(9) 氨传感器	硝化细菌 - Teflon 膜 + O_2 电极	浓度 (1—40 mg/l) 反应时间 10 分, 寿命 10 天
(10) 葡萄糖传感器	固相化 <u>Pseudomonas fluorescens</u> + O_2 电极	浓度 2—20 mg/l 果, 亚, 甘, 乳, 木, 麦等糖谷氨酸, 干酪素水介液无干扰
(III) 采用固相化蛋白的生物电化学传感器		
A. 免疫传感器—梅毒病免疫传感器	Cardiolipin 乙 酰—纤维素膜 + $\text{Ag}-\text{AgCl}$ 电极	5 分钟

传感器类别	组 成	特 性
B. 酶标免疫传感器—IgG 的酶标免疫传感器	anti-IgG-乙酰纤维素膜+O ₂ 电极欲测定的未标记的IgG+定量Catalase 标记的IgG, 洗	反应20分, 未标记IgG浓度0.1—2.0 mg/ml 再生用Gly 甘氨酸-HCl, pH 3 洗
-HCG 酶标免疫监测	固相化 anti-HCG 抗体于乙酰纤维素膜, HCG 用 Catalase 标记	HCG 2×10^{-2} — 10^2 Iu/ml 用于怀 孕监测

四 基因工程在生物工程中的重要作用

这里我们应先谈种的问题, 因为生物工程是应用活的生物体或其组成部份, 大规模地生产有用产品。显然, 这个“种”是最为重要的, 来源不外图2中所列; 从自然界中分离, 通过常规育种或更好应用“合理”的菌种选育, 获得高产菌种。这些操作一般是

- (1) 对原来存在的形成产物的结构基因无改变。
- (2) 对调节基因引起突变, 解除反馈调节变诱导型为组成型等。
- (3) 阻断支路代谢, 提高前体的供应。

(4) 改变了菌体的渗透性, 有利于产物的积累等。但对结构基因拷贝不能有所增加, 原来不存在的结构基因更不能产生。所以过去几十年的发酵工业, 虽取得很大的经济效益, 但在菌种的改造上还是有限制性的。一直到70年代基因工程的出现才为微生物工业

开创了一个新的时代，人们开始按自己的意图改造菌种遗传性状了。

基因工程，遗传工程，或重组 DNA 技术 (rDNA) 本身不是一个工业，而是分子遗传学的产物，一个实验室技术，它是在 DNA 分子水平上动“手术”，将一种细胞 (动植物或微生物) 的结构基因 (带有发动子等) 转到另一种细胞 (当前常用的寄主是微生物) 从而赋予寄主细胞新的遗传性状，让转化的基因表达出来，就可获得大量的产物。

寄主细胞遗传性状的改造犹如我们进行电子工程一样，按要求设计线路，是按人们的意图设计和安装遗传物质 DNA，所以叫做“基因工程”。

(I) 多肽蛋白质的基因工程

基因工程已用于小分子量的多肽合成生产了。1977年 Genentech Inc 应用这种新技术合成了 Somatostatin，这是人体含 14 个氨基酸的多肽。1978 年美国 city of Hope 的 Nationam Medical Center 合成了胰岛素两个基因，Genentech 把两个基因克隆出来。经过 4 年的努力，美国 Eli Lilly 公司已将基因工程获得的克隆 (菌种) 在发酵罐生产出来，1982 年 10 月美国 FDA 通过这种生物工程产生的胰岛素商品名为 Humulin。英国则在 6 个星期前通过了临床应用 Humulin。

以上多肽的基因工程的成功，就为生物工程产品开辟了新的领域。我们知道，许多人体多肽有治疗作用，今后可望通过基因工程将基因克隆化于微生物，再采用发酵工程大量地生产出来。

1. 激素类多肽——有临床应用价值的多肽见表 2 和表 3。它们都可能由基因工程克隆化后，应用生物工程大量生产，特别是比较大的多肽 (见 Impacts of Applied Genetics - Microorganisms, plants, and Animals, congress of the US Office of Technology Assessment, 1981)

表2 可能有临床价值的大多肽

名 称	人体 部位	氨基酸 残 基	分子量	作 用
(1)催乳激素 (prolactin)	脑垂 体	198		开始乳汁分泌
(2)胎盘催乳激素 (placental lactogen)	胎盘	192		刺激脑垂体分泌 生长激素和催乳 激素
(3)生长激素 (Somatotro- pin)	脑垂 体	191	22,005	促进软组织骨骼 生长, 治疗侏儒 病等
(4)神经生长因子		118	13,000	影响神经的发育。 维持和修复, 用 于手术后神经恢 复
(5)副甲状腺激素 (PTH)		84	9,562 (牛)	治疗骨骼病
(6)胰岛素		51	5,734	治疗糖尿病
(7)胃液抑制多肽 (GIP)		43	5,104 (猪)	
(8)促肾上腺皮质激素 (ACTH)		39	4,507 (猪)	维持正常生长和 发育促进其它激 素分泌, 促进胃 液分泌

名 称	人体 部位	氨基酸 残 基	分子量	作 用
(9)大胃激素 (BG)		34		促进胃液分泌
(10) PTH 的活性片 段		34	4,109 (牛)	
(11)缩胆囊肽 (CK-33)		33	3,918 (猪)	抑制食欲, 可作 为减肥剂
(12)降钙素		32	3,421 (人)	降低血钙和磷用 于骨骼病
(13)脑啡肽		31	3,456	止痛作用
(14)胰高血糖素 (glucagon)		39	3,483 (猪)	
(15)胸腺素 (Thymosin -α)		28	3,108	
(16)* 肠促胰液肽 (secretin)		27		
(17)* ACTH 活力片 段		24		

* 已用于医学实践

表 3

可能有医疗价值的天然小多肽

名 称	氨基酸 残 基	分子量	作 用
(1) Dynorphin	17		活力最强止痛剂 1 2 0 0 倍于吗啡
(2) 小促胃酸激素 (LG)	17	2178	
(3) Somatostatin	14	1639	抑制脑垂体激素分泌
(4) 蛙 素 (Bombesin)	14		
(5) 黑素细胞激素	13	1655	
(6) Dynorphin 活性片段	13		
(7) 微促胃酸激素 Minigastrin (c13)	13		
(8) 血管紧张肽 Angiotensin-1	10	1297	
(9)* 后叶加压素 Vasopressin (ADH)	9		
(10)* 催产素 Oxytocin	9	1007	
(11) 血管紧张肽 II	8	1046	
(12) 血管紧张肽 III	7	931	
(13) MSH / ACTH 4—10	7		影响记忆, 集中精力

* 已用于医学实践。

= 1 3 =

2. 免疫蛋白质——包括免疫系统所有蛋白质如抗体、干扰素 Cytokines 等。

(1) 抗体(疫苗)——新的纯疫苗由 rDNA 产生, 如口蹄病 (FM) 疫苗已由 USDA 和 Genentech, 将 FM 病毒基因组的片段克隆化, 从而产生纯的抗原, 可能在 85 年成为商品。

人体肝炎疫苗, 各国都在进行, 日本大阪大学的工作 (Proc. Natl. Acad. Sci 80(1) 1, 1983) 采用病毒的表面抗原, 在酵母克隆化后表达出来, 美国加州大学也有类似工作发表, 我国南北也都在进行这一工作, 并取得可喜进展。

第三个引起重视的疫苗是小猪痢疾, 由大肠杆菌引起, 致死率可达 15%。疫苗已由美国密执安大学研究成功, 并获得批准使用。该大学研究证明, 抗体的作用在阻止细菌的绒毛 (pilli) 与肠壁粘着, 细菌即不能在肠壁上繁殖, 从而防止痢疾发生。他们还证明小猪产后当天可以发病, 但小猪接种 1 周以上后才有抗体产生, 为了提高效用, 母猪也进行接种, 抗体可以乳质中传给小猪。

密执安大学还在研究旅行者腹泻的疫苗。

不但病毒病, 细菌病的疫苗也可用基因工程克隆出来, 一些寄生虫病的疫苗也应该采用同样方法获得。如钩虫、沙眼、疟疾、血吸虫病、昏睡病。

(2) 干扰素——这是十分引人注目的工作, 已有成功报导。不过, 糖蛋白还不能用基因工程克隆成功。所以报导的干扰素均不含糖基, 幸而不含糖基者仍具有相似作用。

3. 各种酶——如尿激酶已可用基因工程克隆化了

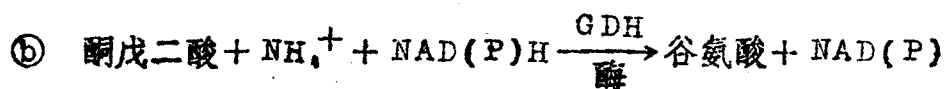
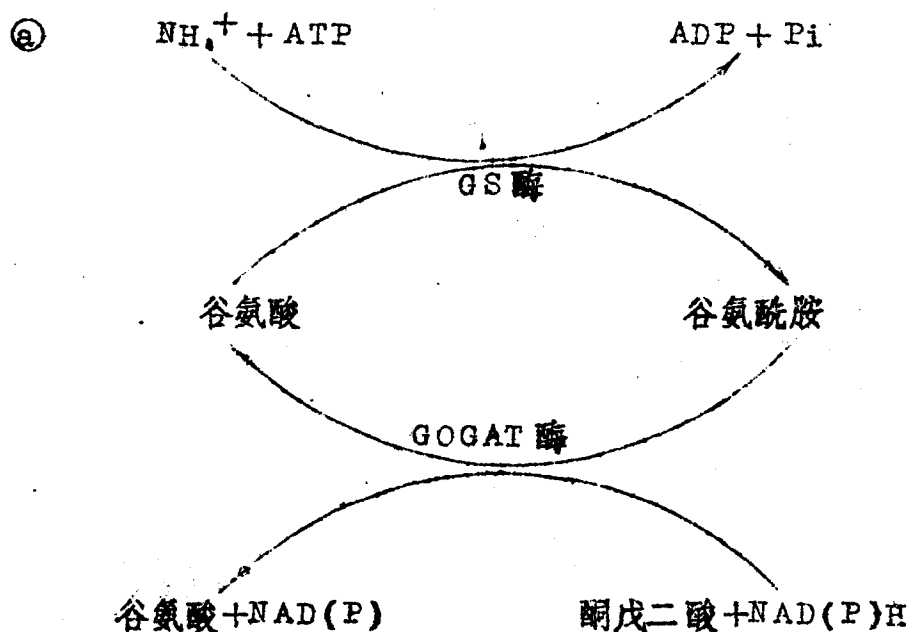
(II) 代谢产物的基因工程

基因工程在单个基因编码的蛋白质和多肽方面的成功, 人们自然要考虑应用这种新的技术于代谢产物的生产上。人所共知, 初级和次级代谢产物的合成是比较复杂的过程, 是多个基因的产物, 这些基因的代谢活动是精密协调着的, 由此可以看出, 要想有效地改变细胞的代谢, 简单地引入一个或多个基因到细胞中是不行的。例

外情况也有，就是说在一个途径中存在一个限制步骤，一个关键酶。这个关键酶的扩增，可使整个途径，甚至细胞生长受到促进，例如英国 ICI 公司对甲醇细菌的改造。

1. 关键酶已找到

ICI 公司应用专一性甲醇菌，*Methylophilus methylotrophus* (AS1) 生产单细胞蛋白，为了提高碳的转化率，改变了氮的同化途径：



②与⑥两条同化氮的途径在功能上是相同的，但途径②有消耗 ATP，而途径⑥无此消耗，所以途径⑥在能量上是经济的。ICI 采用基因工程将原来的途径②与大肠杆菌的途径⑥进行交换，使经重组后的甲醇菌在碳的转化上提高 5—7%。

和 ICI 甲醇细菌的情况相似，凡是找出一个代谢途径中的关键酶，看来都可采用基因工程技术，将这个关键酶加以扩增，从而提高整个合成途径的流量，也就是最终代谢产物。

2. 存在正负调节的代谢途径

人们对氨基酸合成途径了解比较清楚，特别是对大肠杆菌存在于各个途径的正负调节的认识也比较详细。最近，在应用基因工程于大肠杆菌的氨基酸合成方面取得成功的有几个报导：苏联的 L-苏氨酸和 L-高丝氨酸（1980），美国 BRL 公司的 L-脯氨酸（1982），日本大阪大学的 L-色氨酸（1982）。下面对苏联的工作，略作介绍。

L-苏氨酸和 L-高丝氨酸合成途径如图 3。

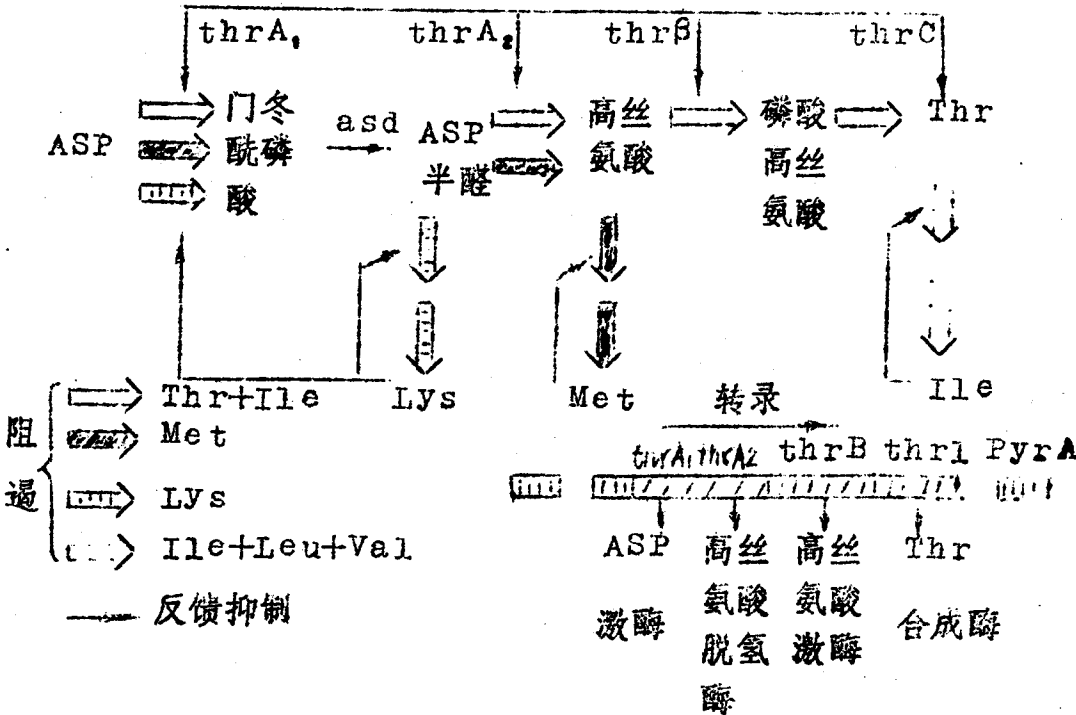


图 3 L-苏氨酸和 L-高丝氨酸合成途径