

生物工程资料汇编

中国科学院图书馆

前 言

为了配合新技术革命情报图书资料展览，我们赶编了这本《生物工程资料汇编》。除了有二篇文章是从公开杂志上转载者外，其余都是我馆同志著译、组译或曾在我馆出版的内部刊物上发表的。

内容有：一、从国际生物工程讨论会看生物工程进展；二、美国《科学》(Science) 1983年219卷4585期(生物工程专辑)译文；三、为“基因结构、克隆、表达”学术讨论会(中国生物学会，1983，西安)准备的综述报告专辑。四、生物工程科普知识、生物工程的投资、机构、专刊、专题文献的介绍等四个部分。

本书可供从事生物工程的科研工作者，有关高等院校的师生和科技情报工作人员参考使用。

由于时间仓促和印制上的困难，内容编排和技术处理上定有错误和不当，敬请读者批评指正。

中国科学院图书馆

1984年7月

目 录

(一)

从国际生物工程讨论会 (Biotech 83)

看生物工程进展..... 莽克强 焦瑞身 (1—20)

(二)

美国《科学》杂志 1983年219卷 4585期 (生物工程专号)

译文..... (1)

1. 生物技术的定义..... (3)
2. 植物遗传工程展望..... (4)
3. 从植物培养细胞分离有农业价值的突变体..... (9)
4. 通过植物种间原生质体融合转移遗传物质..... (14)
5. 林产生物技术..... (18)
6. 生物技术研究与第三世界农业..... (23)
7. 抗生素生产菌的遗传操作..... (29)
8. 微生物产物的新应用..... (32)
9. 细菌、病毒和真菌杀虫剂..... (35)
10. 用作催化剂的固定化酶和固定化细胞..... (39)
11. 生物反应器的设计和作用..... (44)
12. 化工原料的生产..... (47)
13. 单细胞蛋白质..... (52)
14. 用重组DNA方法生产人胰岛素..... (56)
15. 利用酵母分泌人干扰素..... (59)
16. 治癌新途径: 免疫毒素..... (62)
17. 诊断人类传染病用的单克隆抗体..... (65)

18. 由大肠杆菌生物合成狂犬病病毒糖蛋白类似物..... (69)
19. 影响Vs40 病毒增强因子的多点突变作用..... (73)
20. 与蛋白质上预决定位点起反应作用的抗体..... (75)
21. 蛋白质工程..... (78)
22. 微量蛋白质顺序自动分析..... (81)

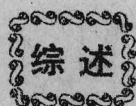
(三)

《基因的结构、克隆和表达》学术讨论会

- (中国生化学会, 1983年, 西安) 综述报告专辑..... (1—74)
1. 纪念DNA双螺旋结构发现30年(前言).....李载平
 2. 核酸顺序测定研究中的一些体会.....洪国藩 (1)
 3. 基因合成.....陈常庆 (3)
戚志红
 4. 细菌转座子及其在基因工程中的应用.....陆德如 (17)
 5. 重复顺序与基因表达.....蔡夏琬 (22)
 6. 真核基因转录和调控.....忻纪厚 (31)
 7. 真核细胞的基因的组织.....顾健人 (36)
 8. 外源基因在原核细胞中表达.....沈绿萍 (46)
 9. 外源基因在真核细胞中的表达.....李文裕 (54)
 10. 酵母分子生物学研究的某些新进展与动向.....匡达人 (62)
 11. 植物基因的克隆、结构与表达.....薛中天 (66)

(四)

- 前程似锦的生物工程.....吴志纯 (1)
- 有前途的基因工程的飞跃发展.....铃木三男 (4)
- 蓬勃发展的生物工程业.....张树庸 (14)



从国际生物工程讨论会(Biotech83) 看生物工程进展

莽克强 (中科院微生物所) 焦瑞身 (中科院上海植生所)

一、大会概况:

本届大会由各国生物工程公司, 专家和儿国与生物工程有关的政府人员共同发起, 于1983年5月4—6日在伦敦召开。大会参加人数有一千余人, 展出公司90余家, 学术活动分三部份进行, 有17个分组, 各组内容如下:

第一部份: 发展生物工程的背景条件——生物工程面临的挑战; 各国的战略与发展; 工业界的意见; 从研究到生产实际; 专利与许可证问题; 生物工程的安全。

第二部份: 生物工程的必要技术——生物加工工程; 发酵与后处理; 保健生物工程; 微生物促进石油回收; 农业方面的遗传学进展。

第三部份: 技术上的进展——生物量; 生物催化剂; 生物传感器与生物燃料电池; 生物电子学、环境生物工程。全会共有70篇报告, 印有大会会议录一册, 共1084页。

与学术报告同时进行的尚有展览, 共有90多家公司展出, 包括生物工程书籍、期刊、仪器设备, 特别是中型发酵罐, 展出者有8家之多。

在大会结束后我们参加英国ICI公司的单细胞蛋白工厂集体参观。这是一个规模最大, 技术最先进的一项生物工程产品, 之后我们参观了下列学校和研究单位:

1. London大学 Queen Elizabeth College 微生物系

Queen Mary College 微生物系

university College 生化学

2. Imperial College of Science and Technogy 的生物工程中心的中试车间。

3. Cranfield Institute of Technology 的生物工程中心

4. 皇家学会及其一年一度的成果展览会。

5. Medical Research 国立医学研究所的病毒系

6. 剑桥大学MRC分子生物学研究所病毒系

7. John Innes Institute 的病毒系

8. Animal virus Research Inst. Pirbright Surrey。

二、生物工程及其进展

生物工程或生物技术 (Biotechnology) 一词的产生是由于分子生物学, 细胞生物化

学、计算机等基础科学的迅速发展,并派生出一套如基因工程,组织培养,细胞培养,固定化细胞,固定化酶,生物传感(Biosensor),细胞培养过程中的自动化调控以及培养后产物大规模的分离提取技术,从而使人们有可能利用微生物、动物或植物细胞的培养来得到人类在医药、食品、农业、化工、能源、环保方面所要获得的产品或要达到的特殊目的。从它产生的背景和所包含的内容不难看出生物工程是多种基础学科和多种先进技术结合所产生出的一门崭新的跨学科的(Interdisciplinary)新兴学科,它远远的超出了传统的发酵工程的含义。近年来国内外科学界、商界、政界谈论此项技术的愈来愈多,甚有生物工程热之感,它所以这样吸引人们的注意是有道理的,因为:

1. 从长远的能源危机看:按资本主义国家的专家们估计,全世界的原油照现在的消耗量计算,到下世纪的中期将趋于枯竭,而不得不转向煤,但终有一天化石性燃料(fossil Fuel)被人类耗尽时,最终还得转向太阳能,利用生物工程技术将大量的生物量(Biomass)转化为人类所需的能源形式是解决人类能源危机的出路之一。

2. 从环境污染危机看,利用生物技术以动植物的残骸为底物能生产化工所需的大量原材料,不仅是节能的途径同时也是防止环境污染的治本之道。

3. 从人类的食品危机看,过去近半个世纪内主要农作物如玉米、小麦、水稻、高粱、马铃薯等大幅度的增长,特别是20—30年代的杂交玉米,50—60年代的优良小麦品种,以及60—70年代的优良高产水稻品种的出现,人们喻为绿色革命。据美国统计其中至少50%的增产是遗传学的功劳。植物组织培养,植物细胞的再生技术,以及植物遗传工程的兴起,将这些新技术与传统的遗传育种方法结合起来,会增大选育出不仅产量高、质量好、而且抗不良因子性能强的品种的可能性。

利用工业废水废料或天然¹⁴C培养蛋白质含量极高的微生物,提取的所谓单细胞蛋白已在畜牧业上开始发挥作用。

4. 从近期能解决的医药食品看,生物工程能解决过去常规方法所不能生产的疫苗、激素、免疫调节蛋白,及其他一些新药物,也可能使抗生素的生产大幅度的增加。

因此西方专家预测在今后5—20年内,随着这门新兴学科的不断发展和用于生产实践,不仅会收到巨大的经济效益,甚至与之有关的工业结构也会发生深刻的变化,因此有人喻之为第三次工业革命也不是毫无根据的,问题在于我们如何把已有的基础研究成果用于生产,同时不断的加强有关的基础研究,为不断开发生物工程学科提供手段。

以Biotech 83会议内外耳闻目睹汇集的一些资料所反映的进展,也许更加增强了人们的上述想法。

从进展的总形势看生物工程还处于开发的阶段,用大会开幕式主席剑桥大学著名生物学家Hans Kornberg爵士的话说,我们正处于开始的末期,是否可这样理解,就西方水平看该学科正处于起步的末期,大踏步前进的前夕。从生物工程能解决的问题看大多集中在医药、食品、农业方面,而化工、能源、环保、三次采油等方面,成功实例较少或仍处于开发或探索的阶段。现将生物工程在各方面的应用分述如下:

(一) 医药方面

1. 激素:胰岛素和生长激素释放抑制因子(somatostatin)这些较小的肽(前者为51个氨基酸,后者只有14个氨基酸)在E.coli中表达后,最近人的生长激素(Human

Growth Hormone由191个氨基酸组成简称HGH)和人的绒毛膜生长激素 (Human chorionic somato mammatropin, 简称HCS) 也在E.Coli中获得表达。HGH和HCS的基因都是通过其mRNA的反转录得到的。Genetech现在与澳大利亚Howard Florey实验生理和医学研究所合作, 用rDNA来生产松弛素 (Relaxin) 该素是妇女顺产所必需可用于减少剖腹产, 还可能有治疗风湿性关节炎的作用, 因为临床经验知道, 孕妇往往使该种关节炎消失, 产后又复发, 但究竟有无疗效因Relaxin很难得到足够量进行测试。该项合作很有可能成功, 因早在两年前的Relaxin基因已得到克隆。Genetech公司以及一些其它公司已申请专利获得生产HGH, HCS以及Relaxin的权利。特别是Genetech公司最近完成72000Ft²的生产车间, 除生产上述激素外还将生产口蹄疫的疫苗。

美国应用分子遗传学公司 (AMGen) 从鸡脑垂体中获得鸡生长激素 (chicken growth Hormone CGH) 的mRNA, 将其双链cDNA通过pBR322—SV40杂合运载体在E.coli中克隆, 然后用牛或鼠的生长激素的cDNA做探针来筛选所需要的克隆, 该克隆用含有色氨酸启动子的pBR322载体在E.coli中表达, 所得产物在大鼠中测试有生物活性, 正在雏鸡体内试验, 目前雏鸡需要8周投放市场假若施用CGH能在投放市场时间, 食品利用率增重、脂肪含量等方面有10%—15%的改进, 则可想象在鸡、火鸡、鸭等禽类方面会有世界性的经济利益, 该公司已在Chicago选地投资1千3百万美元建中试场准备生产上述的人或动物激素。

2. 干扰素物质, 当前有种舆论认为干扰素在临床应用上副作用太大, 甚至进而责备何以以巨大投资研究遗传工程法生产干扰素, 这种批评似乎不甚公正, 要知道干扰素发现至今已二十五年, 其临床应用之价值, 长期得不到确切结果的重要原因恰恰是由于得不到足够量的干扰素, 很多激素也有类似情况, 正是遗传工程方法才使临床试验有足够量的药物得以进行, 才有可能正确地评价这些药物的作用和最适施用方法。

芬兰利用 α -干扰素治疗多发性硬化 (multiple sclerosis) 发现有发烧、疲劳的副作用; 美国利用rDNA方法生产 α -干扰素治疗乳腺癌症发现有严重不正常脑波、昏睡甚至糊涂的副作用; 法国有四个病人因施用污染而不纯的干扰素致死的情况, 也有正面的结果, 如 α -干扰素治疗转移性肾肿瘤 (metastatic, Kidney tumor) 有不同程度的缓解和萎缩。在英国用 α -干扰素做鼻腔喷射预防普通感冒认为有较好效果, 本想进行大规模试验, 后因美国报道有头痛、鼻充血的副作用而暂停, 看来 α -干扰素的临床应用还有待进一步观察。 β -干扰素今年三月已被西德政府批准, 只能用来治疗带状疱疹 (Herpes Zoster), 德、日、美各国公司都在准备大量生产。

干扰素的另一个争论问题, 干扰素的糖基化作用对临床效果的影响问题。天然的干扰素是糖蛋白, 用E.coli生产的则是未糖基化的, 未糖基化的 α -干扰素似无甚影响。但美国资料认为糖基化对干扰素的抗原性很有影响, 有糖基可使某些氨基酸序列隐蔽而不被机体免疫体系识别。因此采用人的细胞培养来生产干扰素如用初生的人成纤维细胞 (Primary Human fibroblasts) 或人的淋巴母细胞 (?) (Human lymphoblastoid) 生产糖基化的干扰素, 但人体细胞培养成本高, 又往往有污染致癌的DNA之危险, 因此又将干扰素基因转入鼠的L-细胞系。从干扰素的这段故事不难看出, 利用生物工程方法生产某些药物成功, 并非意味着问题的完满结束, 而恰恰是问题的开始复杂化, 其他

某些药物如激素等也许会存在着类似的问题，对此我们应有足够的认识。

3. 日本科学家今年三月发表了利用rDNA方法将Interleukin—2, IL—2)成功地克隆并在E.coli中表达, IL—2是T-细胞生长繁殖的必要因子, 它有可能刺激T-细胞杀死瘤细胞, 或治疗免疫缺陷病如麻疯病, 所有这些基础问题和实际应用价值都有待证明, 生物工程技术为此提供了可能。

4. 过去治疗血栓病多采用尿激酶(Urokinase)或链激酶(streptokinase), 这两种酶都是人体血内的血纤维蛋白溶酶原(Plasminogen)的激活剂, 能使该酶原转化为血纤维蛋白溶酶(Plasmin)而该酶对构成血栓的主要组分—纤维蛋白(Fibrin)一有极高的持异亲合力, 使之降解溶去血栓。但上述两种激活剂共同的缺点是造成普遍性出血的倾向。链激酶是非人体蛋白, 从而引起体内免疫系统的反应, 尿激酶虽无此缺点但仍是量有限价昂贵。美国两家公司Genetech和Integrated Genetics都成功地把另一种无上述缺点的激活剂—组织内血纤维蛋白溶酶原激活剂(Tissue plasminogen Activator)(TPA)用rDNA在E.coli中表达, TPA为527个氨基酸残基组成, 是糖基化的蛋白质, 为此Integrated Genetics公司准备在酵母或哺乳动物细胞中生产。

5. 治疗血友病的因子Ⅷ称抗血友病因子(Antihemophilic factor)已被很多公司用遗传工程方法生产。

6. 美国Genex公司, 日本的Ajinomoto都准备大规模利用生物工程方法生产氨基酸, 后者准备8年内使销售量翻一翻, 日本Mitui Taotsu公司准备以每年200吨的规模开始生产L-色氨酸。

7. 单克隆抗体(MAB)

目前MAB在实践上的应用, 主要一方面利用它极强的特异性, 在体内或体外测定激素, 癌标记物, 某些特异的蛋白因子等等从而达到诊断的目的, 如测定甲胎蛋白, Rh因子, 癌细胞表面抗原, 人绒毛膜促性腺激素 β -亚基(妊娠的诊断)或病毒病。另一方面则是利用它进行纯化、分离的工作, 如纯化尿激酶, Interleukin 2, 干扰素等。至于将MAB与适当药物联结进行治疗的工作正处于研究准备的阶段, 如偶联的方法, 偶联后能否影响其特异性或中和抗原之能力, 目前虽已有人的细胞杂交瘤, 但需要得到活力更强更稳定的细胞系, 按英国Celltech公司估计这要到1985年完成。MAB做为运载适当药物的载体达到治疗日地恐怕要到80年代的末期。利用MAB做被动免疫可能会首先在兽医方面实行, 因在人体内做被动免疫需要极其严格的检验。目前已知对牛的兰舌病、牛的轮状病毒等进行这方面的研究。

最近加拿大政府批准分子遗传公司生产口服的单克隆抗体预防由致病性E.coli所引起的小牛或胎牛腹泻。

8. 疫苗

当前对大多数病毒病流行的有效防治方法是靠疫苗、化疗方法进展缓慢而某些病毒病的疫苗无法用常规方法培养(如乙型肝炎病毒)或能培养但活苗不安全(如口蹄疫)为此利用基因工程方法生产亚单位疫苗则应运而生, 目前呼声较大的是:

(1) 口蹄疫(FMDV) 早在1981年底美国农业部的梅岛动物病害中心与美国Genentech公司联合发表了在E.coli利用色氨酸启动子成功地表达了FMDV的主要表面抗原

• VP₁，并在6头牛、两头猪上进行免疫试验证明能产生高效价的中和抗体，并能保护牲畜不受病毒之侵染，该公司已申请专利准备大规模生产。西欧国家首先以Biogen公司为首在德、比、英等国也进行了同类工作，早在1981年初即得到克隆，也进行了表达，但至今未见有在大牲畜上的试验报告，此次访英与其著名的动物病毒研究所的同行接触，得知Biogen所得VP₁蛋白已交英国Wellcome研究所进行大牲畜试验，据闻免疫原性很差。英动物病毒研究所是世界FMDV研究中心，该所相当多的工作者对美国梅岛研究所的结果，公开坦率地表示不相信，认为最大问题是免疫原性问题，根据该所多年经验，全病毒颗粒免疫原性最好，空壳（只是外壳蛋白）次之，VP₁则更次。

2. 乙型肝炎病毒表面抗原虽已在E. Coli中表达但产量低，免疫原性也差，因此又转向在酵母中表达。日本已在今年初发表，HBsAG克隆利用酸性磷酸酶启动子（在酵母的一种穿梭质粒上）在酵母中表达产量可达 5×10^5 分子/细胞，并能形成与天然病毒颗粒相似的20—22nm大小的颗粒也具有免疫原性。美国Genentech则是把HBsAG的cDNA与从SV40衍生的质粒重组，该质粒可在E. coli或许可性的猴细胞中繁殖，在猴细胞中的产量很高，而抗原是糖基化的，可分泌的并经过翻译后的加工处理的。HBsAG能在真核细胞中表达，从而在产量和免疫原性上有较大的提高，这为亚单位疫苗的生产又开创了更为成熟的条件。

最近美国立过敏和传染病研究所将HBsAG插入到牛痘病毒的TK基因位置上，牛痘病毒的侵染并不需TK基因，同时TK基因缺失提供了选择标记。这种牛痘-肝炎病毒重组体在兔内做免疫测定所产生的抗体效价约为保护不受肝炎病毒侵染所需的20倍。大大提高了免疫原性，其原理是牛痘肝炎病毒所提供的是活疫苗而不是钝化的死疫苗。将流感病毒（含RNA的病毒）血凝素（HA）基因用同样方法插入牛痘病毒也得到较好的免疫反应。口蹄疫病毒也可做类似的尝试，这样就为提高亚单位疫苗的免疫原性，及其制备提供了新而经济的方法。

3. 幼畜腹泻的亚单位疫苗：最近荷兰的AKBO美国的Cetus以致病的E. coli上的菌毛（pili）为抗原的基因工程方法，成功地获得疫苗。正在或准备制做亚单位疫苗的其他病毒是：

1. 疱疹病毒Ⅱ型是美国流行的一种性病，该病毒的DNA有较高的侵染性因此制做亚单位疫苗是安全之计。

2. 牛的兰舌病（bluetongue）美农业部已得到对BTV17型的单克隆抗体而且在四头羊，10只小鼠上试验有保护作用，因此有可能进一步克隆其外壳蛋白基因制做疫苗用于牛和羊，该病毒造成羊、牛的流产。

除针对病毒外目前也还针对某些细菌或寄生虫研究亚单位疫苗，如霍乱菌（V. cholerae）的肠道毒素的β-亚单位，已被克隆并转入E. coli中或另一种无毒性的霍乱菌株中进行表达，其产物也有生物活性。

（二）在农业方面的应用

近年来利用生物工程的一些技术如组织培养，细胞融合，大规模的植物细胞培养生产次生产物，以及植物基因工程等方法于农业生产实践都有不同程度的进展，现分述如下：

1. 组织培养

(1) 利用无性繁殖 (clonal propagation) 培育珍贵的, 或用常规方法需时很长的一些观赏植物如兰花, 羊齿植物、草莓、凤梨以及 *Asparagus* 等。此法繁殖之植物其优点是快、均一、大量, 或无病毒或增产或早熟, 其中有些已商品化。

利用无性繁殖来保持, 繁殖常规育种中所需的雄性不孕的杂种也是很有价值的, 因用常规选育的方法来保持, 繁殖雄性不孕是非常费时间的。

一旦选育了好的品种也可用此法大量繁殖植物, 如美国用此法大量繁殖除虫菊 (*Pyrethrum*, *Chrysanthemum Cinerariaefolium*)

(2) 利用茎尖培养脱病毒 (Virus-free)

生长迅速的茎尖分生组织, 由于缺少维管束之类的输导组织, 病毒运转困难, 处于迅速分裂的顶端细胞, 由于某种不祥的原因病毒很难侵入, 因此利用茎尖分生组织的培养所得植株能摆脱病毒, 此法已成功地在我国和世界其他国家用来防治马铃薯退化。近年来为了获得百分率更高的无毒植物采用培养前用 34—36°C 热处理的办法, 此处理可抑制病毒因此可切取较大的分生组织块从而增加无毒植物的成活率, 如菊花用热处理后可得 98.5% 的无毒植物, 对照则只有 15%。已知草莓斑駁病毒, 木薯花叶病毒, 花椰菜花叶病毒, 柑桔病毒等都能用此法防治。

植物的愈伤组织也具有分生组织细胞那样的特性, 因此不断将愈伤组织传代培养, 然后诱生整株植物也是无毒的。

(3) 利用体细胞的变异

从愈伤组织, 或原生质球再生的植株常获得非整倍体的, 不孕的, 形态的变异、或抗病之特性, 这些特性都有可能用于农业生产如:

从甘蔗的无性繁殖系中选出抗斐济病毒病 (Fiji), 霜霉病和眼点病 (Eye-spot) (后两者均为真菌病害) 等三种病害的品种; 从马铃薯叶肉原生质球再生植株中选育出抗晚疫病和早疫病, 马铃薯 X 或纺锤块茎病 (类病毒所致) 的品种。遗憾的是利用体细胞变异来培育由种子繁殖的大田作物研究的极少, 最近用蕃茄所做的实验, 可得到稳定的突变株令人鼓舞。

(4) 单倍体植物的培育

利用单倍体植物很易获得人工诱导的双倍体的纯合子 (Homozygotes Diploid) 从这种群体中能较快的选出所要的固定性状可大大缩短常规育种的时间, 如利用此法获得大麦新品种从常规的 12 年到只有 5 年。这种纯合子已用在水稻、玉米、大麦、小麦、黑麦、甘蓝属和 *Asparagus* 属植物。利用单倍体加倍的纯合子, 便于做遗传分析, 比用双倍体要简单的多, 如分析菸草抗病基因的数目; 检测双倍体不易表达的一些隐性等位基因等。

目前多用常规的杂交方法更多是利用花药培养获得单倍体。花药的培养成功与取材的发育阶段, 培养基培养前温度的预处理很有关系。1983 年统计已商品化的单倍体植物已达 29 种。

2. 细胞 (原生质体) 的融合

尽管目前使细胞融合不成问题并找到不少选择细胞杂种的办法, 而且也在属间种间

进行了融合,但至今还无法在育种实践中应用如大豆+菸草,胡萝卜+矮牵牛的远缘融合成功,但所形成的杂交细胞系由于彼此遗传上的不相容无法再生形成杂种植物。即使相近属之间的融合如西红柿+马铃薯,欧芹Parsley+胡萝卜已得到杂种植物但都是不孕植物,无法参加到常规的育种计划之中。从融合的植物看大部份局限在茄科植物,少数是伞形科的胡萝卜属或十字花科的甘蓝属,因此细胞融合这项新技术开始在农业生产上发挥作用之前有待于大量的基础工作。尽管它的应用存在着各种困难,毕竟近几年来也有了一些令人鼓舞的新进展如:

(1) 体细胞杂种的选择方法:如利用隐性的白化突变体;利用白化突变株与培养基结合;利用形态上的变异;利用对抗生素抗性的突变标记;利用硝酸盐还原酶缺乏株;利用不同种的再生能力;利用代谢上的互补,甚至利用显微镜的直观法等等。回顾自Carlson 1972年第一次利用杂种的对生长素(Auxin)的自养型选择杂交细胞以来的10年间选择系统有了较明显的进步。

(2) 原生质球融合使种间相互转移核的或细胞质的遗传信息。近年来已知不少的农业生产上有用的性状如雄性不孕,抗病,抗除草剂,抗抗生素等性状不是由细胞质中的叶绿体基因就是线粒体基因所控制,已经利用细胞质杂交成功地转移了由线粒体控制的雄性不孕和由叶绿体控制的抗除草剂(Arazinc)基因。利用 *N. tabacum* *tuberosum* + *s. chacoense* 抗马铃薯X病毒的性状,其中有些体细胞杂种能进行回交,便于进一步分离鉴定稳定的抗病性状。

(3) 体细胞杂种变异性的利用:原生质球融合后再生的植株比一般的有性杂交具有更大的变异性如叶形、叶大小、花长度、花色、花粉的活力等等。如最近报导马铃薯原生质球融合后的杂种在抗病、产量方面都有极大的变异。其它农业上可利用的性状还有待开发。

3. 利用植物细胞培养生产次生代谢产物

多年来人类需要的很多药物、酶制剂、调味剂、香料、杀虫剂等是从天然的植物体中提取的,目前处方所开药物中约25%仍然全部地或部份地来自植物界,如治疗疟疾的奎宁、治癌的长春碱、避孕药重要原料薯蓣碱、治高血压的利血平、麻醉剂吗啡因、可待因、杀虫剂除虫菊、制做香料的茉莉油、蔷薇油等,最近从玉米或非洲一些植物找到了比目前食糖要甜几千倍到十几万倍的甜味剂如高果糖玉米甜味剂(High-Fructose corn Sweetener, HFCS),从非洲一些植物中提取的 Thaumatin, monellin 等,这些植物资源大多来自热带或亚热带的发展中的或不发达国家成为这些国家重要的传统的出口物资。随着植物细胞组织培养技术尤其是固定化细胞培养技术的改进,这些来自植物体的传统产物有的已能在试管内生产,有的已有商品如抗肿瘤白血病的 camptothecin, 长春碱、避孕药原料薯蓣碱等,因此西方科学家预言随着这些技术的不断改进,利用植物细胞培养很有可能取代这些传统的生产。这种趋势的确应当引起做为药材传统输出的我国和一些有关的发展中国家的警惕。

像培养微生物那样大规模培养植物细胞似乎是不可能的这是由于:①植物细胞长的很慢一个细胞数目加倍所需时间为20—60小时,而细菌只需30分钟因此非常容易污染微生物;②植物细胞生长最迅速所需之条件与使细胞产生所需之代谢产物条件不同,而且

往往是生长最适的条件却抑制该产物基因之表达；③假若像培养细菌那样培养植物细胞很容易被强烈的搅拌所破碎；而且在液体中做悬浮培养，很易集成大团，使生长速度下降。假若将已分化好的细胞——即产生的代谢产物最适的细胞——固定在膜之间、凝胶内，琼脂钙内（Alginate calcium—一种藻类的多糖有两价离子时可交链成凝胶）或是一些球状载体的表面做成所谓固定化细胞，供给这种细胞所必需的营养液，则能大大提高所需化合物的产量，而且有些产物能分泌到培养基中大大方便了产物的分离纯化。一旦这种技术进一步发展为“工厂化生产”则不受气候、病虫害的影响，而且有可能便于创造高产条件或诱变产生天然所没有的新化合物。

4. 关于植物的基因工程

自从利用外源DNA直接转化植物原生质球所得结果似是而非以来人们更多的注意力转向Ti-质粒，企图利用这种天然的基因工程载体。近几年来确有很大的进展，如T-DNA的所编码的基因，T-DNA整合至宿主染色体DNA的机制；外源基因插入T-DNA的最好位置，都有了很大的进展。利用这一载体，外源基因可以表达并能经受住减数分裂而通过种子传代。尤其最近，美欧科学家相继完成小的Ti-质粒（mini-Ti-plasmid）的组建，这种小质粒即可在E.coli中也可在Agrobacteria tumefaciens中增殖。外源DNA可以直接插入T-DNA中，在此工作基础上进一步研究完全有可能使这种小的Ti-质粒保持T-DNA整合的功能而丢失致癌基因同时使插入T-DNA中的外源基因得到充分表达。尽管载体方面有了不少可喜的进展，然而找到控制农业重要性质，如丰产、抗病、抗不良环境的基因，并进而分离纯化这些基因仍然是个大问题，不少与农业性质有关基因不是单基因而是更多基因所调控，有待植物生化和植物分子遗传学的进一步发展。此外原生质球再生成完整植株能力的植物范围狭小也是一个很大的限制因素。突破这一限制，使农业价值重要的单子叶植物体细胞，也具有再生的全能性还需艰苦的工作。据此西方科学家一般认为植物基因工程在生产上发挥威力，获得经济效益，至少还需15—20年的努力。一旦获得成功，将是革命性的无法估价的经济意义。

（三）食品和饲料工业方面

不久前国外食品和饲料公司对遗传工程和生物工程新技术并不关心。据美国会“技术评议办公室”估计，美国对应用遗传学的投资仅有13%是与食品和饲料有关，而医疗药品则占48%，化学品占26%。最近几年来，情况有显著改变，这是因为淀粉、甜味剂和新型的单细胞蛋白（SCP）等的出现，引起了食品与饮料行业对生物工程的重视。

1. 淀粉、甜味剂

国外对甜食和饮料消耗巨大，从而要求蔗糖以外的“低热量”的甜味剂。在这种情况下，就有高果糖浆和人工合成的甜味剂的出现，其中Aspartame（苯丙酰门冬氨酸甲酯）较为出名。

（1）高果糖浆

蔗糖、葡萄糖与果糖甜度比为1:0.7:1.6以第一代高果糖浆含果糖42%，工业化生产由日本人于1966年初步成功，生产量2000吨，应用一株链霉菌，其异构酶源由木糖诱导。次年美国应用同一种菌种，果糖含糖达42%，年产量60万吨。所用酶为热固定后的菌体，或DEAE吸附的酶。1980年美国高果糖浆年产量已达430万吨，而预计1983年

可达600万吨。

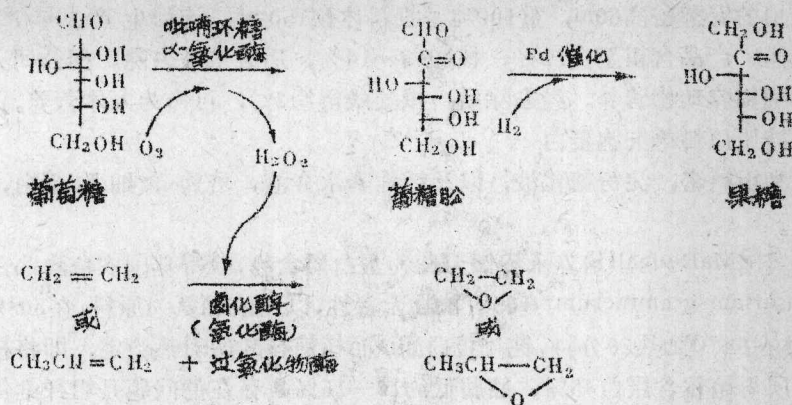
(2) Aspartame 苯丙酰门冬氨酸甲酯 (APM)

蔗糖与Aspartame甜度比为 1 : 200

它本身不是由淀粉转化而来,而其中两个组分则都是微生物发酵产生。美国FDA于1981年通过APM在食品中的使用。

门冬氨酸我国已在小规模生产,而苯丙氨酸则尚缺乏,而后者如能以发酵法供应,则APM生产即可解决。

(3) 新的果糖法 (Cetus公司)



第一步反应用的酶来自多孔菌 (*polyporus obtusus*) 葡萄糖转化成果糖的工艺已中试成功,收率几乎100%。附属反应的经济效益尚待验证。

(4) 天然蛋白质甜味剂,最著名的是产自西非植物中,名叫monellin和thaumatin,比蔗糖甜10万倍。如能将两甜蛋白的基因从植物中转移到微生物,就可大量生产。这是一项值得注意的基因工程研究,国外迄今尚未报导。

2. 单细胞蛋白 (SCP)

单细胞蛋白 (SCP) 是指微生物细胞,如藻类、放线菌、细菌、酵母、霉菌和高等真菌,在大规模条件培养,用作人类食品或动物饲料的蛋白质来源。虽然,这些微生物主要是做为蛋白质来源,但细胞中尚含有糖类、脂肪、维生素、矿物质,以及非蛋白质含氮物质如核酸。除核酸外其他组份均有一定营养价值。

有关单细胞蛋白的研究,到目前各国均注意到分离,筛选与发酵条件的研究,应用当代遗传操作的工作仅有一例,就是英国ICI公司的甲醇细胞蛋白的研究,采用了代谢调节和基因工程技术,与先进的发酵技术,取得巨大的成功。(见下)

就原料而论,单细胞蛋白可分为下列三种类型:

(1) 石油蛋白

1970年以前,由于低价石油的供应,大量正烷烃(炼油副产品)用于单细胞蛋白的生产,英国BP公司投入大量研制经费,采用解脂假丝酵母进行生产。但到70年代中期,由于石油危机和价格、毒性问题,BP即行停产。其他国家如美国、日本、意大利等石油蛋白研制与生产的基本停止。

(2) 甲醇蛋白

甲醇蛋白的研制和生产, 英国ICI取得杰出的成功。该公司对甲醇氧化细菌 *Methylophilus methylotrophus* 进行一系列的应用基础研究:

1. 经过代谢研究明确这一甲醇细胞氮的同化是通过在能量利用上比较浪费的GS (即谷氨酰胺合成酶) 途径, 而不是能量上节约的GDH (即谷氨酸脱氢酶) 途径。

2. 先将细菌的GS途径基因缺失, 并通过基因工程技术将大肠杆菌的GDH途径的基因转入到GS途径缺失的突变株, 从而获得利用GDH途径同化氮的甲醇菌突变株。

ICI就应用这一经过基因工程技术改造过的菌株进行培养。经采用先进的发酵工艺, 空气提升式发酵罐, 经过15年努力最后成功了, 可能是目前世界最大最先进的生物工程技术。现在采用的发酵罐高60m, 重100吨, 投料体积150m³, 连续生产, 年产量5000—7000吨干菌体。产品含粗蛋白72%, 核酸12—14%, 后者未被去除。据公司人称, 核酸的存在不影响饲养动物营养。经去除后, 核酸残留约2%, 可作为人体营养。

(3) 糖质原料单细胞蛋白

各国都利用糖蜜, 淀粉糖化液, 以及纤维素水解液, 培养单细胞蛋白, 所用工艺均属常规。

1980年英国MaDougall培养禾谷镰刀菌为蛋白质食物, 获得英国农渔食品部的批准。所用菌种 *Fusarium graminearum* A35对植物无毒性, 以糖液和氮为原料, 在30℃1300升缶中培养, 菌体在64℃加热20分钟, 钝化蛋白酶, 而核糖核酸酶对热稳定, 即将核酸由10%降到1%。所得菌体含蛋白45%, 脂肪低约10—15%, 存在的问题是粗纤维仍高约20—25%, 此外也缺铁和锌, 须加补充。这项产品的人体营养试验已作, 小动物传代试验尚待进行。总之, 这一单细胞蛋白在生产工艺和质量上有其特点, 能否成为大量生产的人用蛋白食物有待验证。

(四) 在化学工业及生物量方面的应用

1. 在化学工业方面:

过去30年来, 化学工业和发酵工业之间存在着竞争。有几十种化学品原由发酵生产, 以后逐年由新兴的石油化工所取代。例如在1946年, 美国27%的酒精用谷物, 27%用糖蜜, 少量用马铃薯, 纸浆废液, 乳清等生产, 仅36%用石油气。到1975年, 石油来源的酒精则增长到60%。另外, 富马酸、原油发酵生产, 后被苯氧化代替。但是有些化学品一直用发酵法, 如柠檬酸、氨基酸和乳酸。乳酸可由化学合成和发酵两种方法生产。

近年来, 国外在化学品生产上的明显趋向是应用生物工程技术, 从生物量生产。导致这一转变的原因是石油危机和生物量合理利用的探索, 有关生物量的利用研究, 各国均予以重视。

在美国, NSF和能源部都很支持这一领域的研究, 不幸的是后者在1983年有关太阳能和再生能源研究经费削减了60%。美国认为发展煤和核能更为迫切。日本由于缺乏石油, 所以对生物量的利用付出更大的努力。有32家公司联合成立了“石油代用研究会”

(RAPAD) (1980) 这一个包括石油, 化工和发酵工业的研究会受到国际贸易和工业部 (MITI) 的资助 (75%), 7年计划中的前3年的合成燃料规划的资金有3400万美元之多。纤维素酶法糖化和发酵工艺是主要方面。目的则在酒精生产, 这方面的工作已进

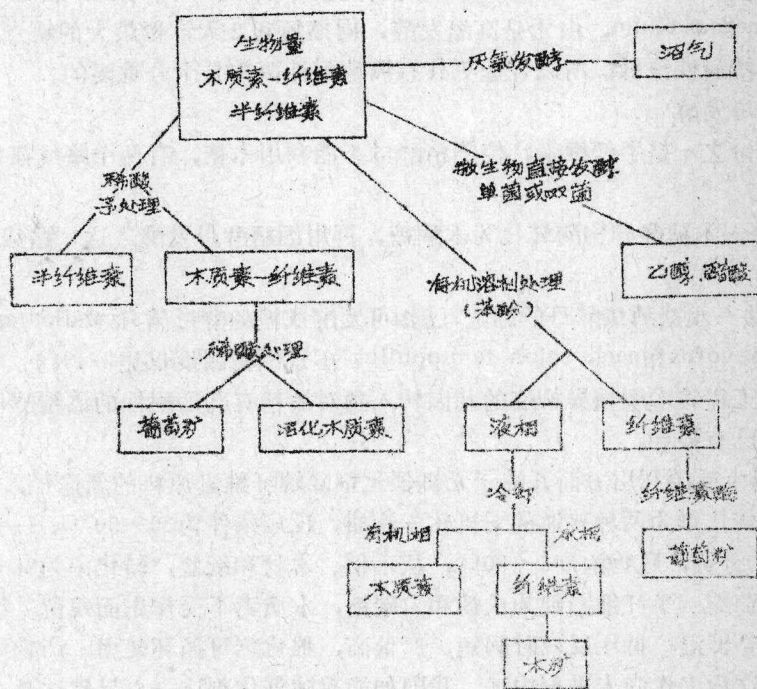
入中试规模。用装有1000升的固相定化酵母菌进行。除上述MITI—RAPAD规划外，日本科学工艺组和农、林、渔部也都有生物量利用规划，分头在各所属研究室进行。在加拿大也有规模巨大的生物量研究。对加拿大联邦政府所属的生物能R与D的资助在1982—1983是160万美元。其努力方向也是从纤维素生产酒精，采用的路线是酸水解纤维素，1984—1985年完成中试（1-5吨/天）经费是700万美元。

近年发酵工程有较大的进展，其特点略如下表：

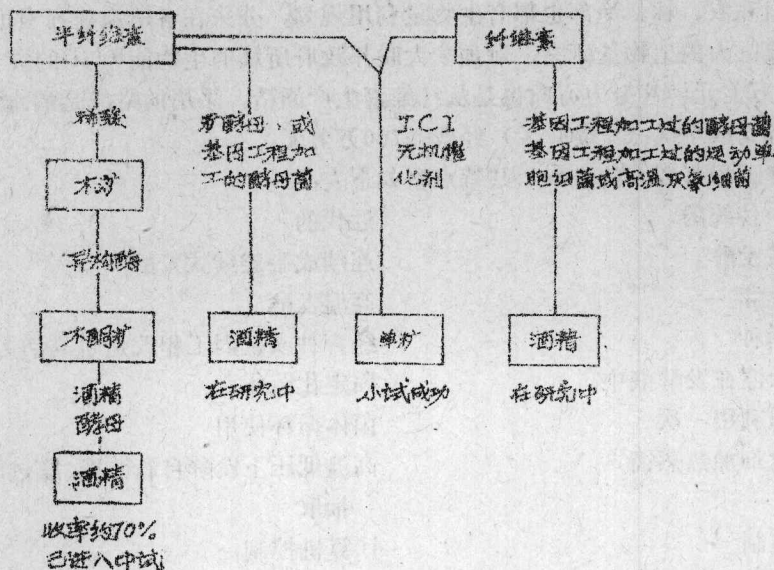
传统的	近代的
1. 分批试发酵	连续或半连续式发酵
2. 常温发酵	高温发酵
3. 天然菌种	经育种或基因工程改造过高活力菌种
4. 菌体悬浮在发酵液中	固定化菌体
5. 菌体只利用一次	菌体循环使用
6. 产物溶剂加热蒸馏	高温低压下发酵自行蒸馏、膜过滤、液—液抽取
7. 简单控制	计算机控制

2. 生物量的利用

（1）生物量利用的一般工艺路线：一般采用的路线略如下图：



(2) 在再生能源的发酵方面国外探索的路线如下:



在上述探索路线中, 下面几方面的工作颇值得注意:

①有关高温厌氧细菌直接发酵纤维素的研究报导很多, 其中采用较多的菌种是 *Clostridium thermocellum*, 由于是高温发酵, 周期短到 2 天, 但最大的缺点是 *C. thermocellum* 对酒精耐性很低, 所以育选更具有酒精耐性菌株是十分重要的。

②戊糖酵母发酵

生物量组份之一是半纤维素, 但酒精酵母不能利用木糖, 有两个路线研究戊糖的利用:

i) 两步法—木糖经异构酶转化为木酮糖, 再用酒精酵母发酵。这一路线已进入中试。

ii) 一步法—戊糖酒精酵母的筛选, 已知可发酵戊糖的酵母菌有 *candida sp.*, *kluyveomyces aellobiovorus* 和 *pachysolon tannophilus* 不过酒精耐度仅达 3-4%。

利用基因工程将木酮糖异构酶的基因转入到对酒精有高度耐性的酒精酵母中, 这方面的研究工作已有报导。

③ICI 在再生能源利用方面开辟了无机催化剂降解纤维素原料的新途径, 因系该厂机密, 只说明催化剂为两种普通的无机化学物质, 反应条件为 30—90°C, 1—8 大气压, 反应时间 1—20 分钟, 底物浓度 5—30%, 从禾稻、木材和纸盆, 转化率为 86—90%, 纤维素产物为葡萄糖, 半纤维素则为戊糖和六碳糖, 木质素不受作用而残留。该公司反应这一方法优点是低温, 低压反应时间短, 产量高, 催化剂可循环使用, 产物中不需要的付产品很少。这项工作尚未进行中试。我国如能攻破催化剂这一点显然这是一个极有实用价值的利用再生能源的途径。

④酒精发酵

除纤维素, 半纤维素直接利用外, 近年来作为发酵研究的“热点”的酒精发酵工艺

中受到重视是高温发酵和固相菌发酵。(见先进发酵材料表)

1.) 高温酒精发酵

thermoanaerobactor ethanoli 1.8M酒精/M葡萄糖69°C发酵。

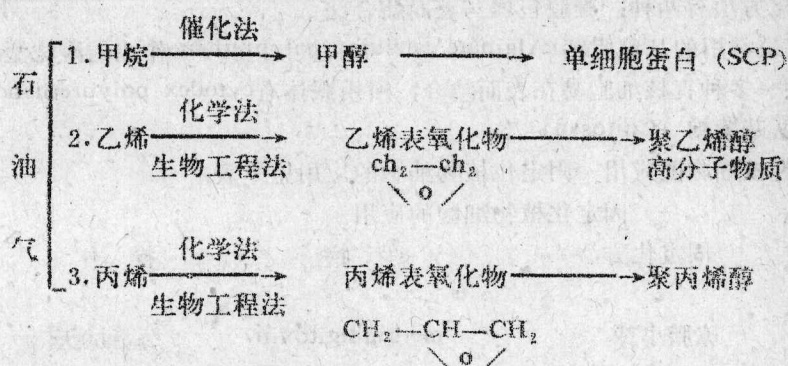
Bacillus stearothermophilus LLD—15, 在70°C酸性大, 酒精产量与酒精酵母相同, 但速度快一倍, 在连续发酵条件下可降低酒精成本10%, 看来这可能用于糖蜜发酵酒精, 从而代替酒精酵母。

2. 固相酒精酵母连续发酵

见三“固相酶、固相菌一节”。

3. 石油气的利用

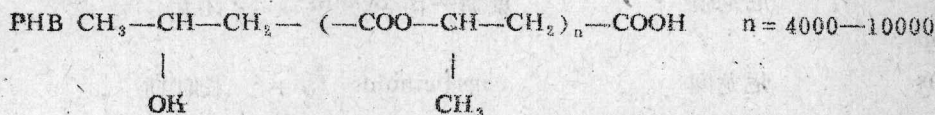
国外在再生能源利用之外, 也十分重视石油气的充分利用, 特别是便宜的生物工程途径的开辟。



化学催化法反应比较复杂, 成本较高, 国外在研究利用微生物加氧酶 (monooxygenase dioxygenase) 但均未报产。我国石油资源丰富, 应及早将石油气的生物工程利用提到日程上来。

4. 微生物合成PHB

ICI在开发微生物资源上另辟途径, 已将众所周知的细菌贮藏物质聚羟基丁酸 (poly (3) hydroxy—butyric acid) 开发利用。



聚—3—羟基丁酸有热塑性, 因此可用模具塑造, 又作为包装材料—制成薄膜, 另一重要特点是对生物无毒并可被微生物所降解, 故无环境污染问题。当前生物工程产物成本尚高于化学合成, 该公司在采用生物工程技术, 提高产量, 降低成本。

(五) 固定化酶和固定化菌研究及其应用的进展

固定化酶和固定化细胞技术已成为酶工程的主体。这次会议中讨论了真核细胞固相化的进展, 酶膜反应器, 以及固相化酵母在大规模酒精发酵上的应用。

(1) 真核细胞固相化研究和应用的前景

能催化单一反应的单酶固定化已是成熟的工艺, 当前人们的兴趣则是将这一工艺扩展到更复杂多步骤的生物合成过程的固相化。整体细胞自然就是进行化学合成最好的材