

工业微生物资源 开发应用与保护

诸葛健 编著

化学工业出版社
·北京·

(京) 新登字 039 号

图书在版编目 (CIP) 数据

工业微生物资源开发应用与保护/诸葛健 编著.
北京: 化学工业出版社, 2002.7
ISBN 7-5025-3904-2

I. 工… II. 诸… III. ①工业微生物-生物资源-资源开发②工业微生物-生物资源-资源保护 IV. Q939.97

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2002) 第 042234 号

工业微生物资源开发应用与保护

诸葛健 编著

责任编辑: 侯玉周 白 洁

责任校对: 洪雅姝

封面设计: 张 昊

*

化学工业出版社出版发行

(北京市朝阳区惠新里 3 号 邮政编码 100029)

发行电话: (010) 64982530

<http://www.cip.com.cn>

*

新华书店北京发行所经销

北京云浩印刷厂印刷

三河市延风装订厂装订

开本 787×1092 毫米 1/16 印张 18 字数 442 千字

2002 年 8 月第 1 版 2002 年 8 月北京第 1 次印刷

ISBN 7-5025-3904-2/Q·23

定 价: 40.00 元

版权所有 违者必究

该书如有缺页、倒页、脱页者, 本社发行部负责退换

前 言

工业微生物学是应用微生物学中的重要组成部分，其研究的范围及深度与日俱增，同国民经济发展的关系越来越密切。特别是在增加产品品种、产量提高和改进生产工艺有关的菌种发掘与改良、菌种代谢调控和发酵条件优化等方面的研究进展更为突出。

本书的编著出发点是在保持学科的系统性和完整性的基础上，尽量把较新的研究进展渗入其中，加大信息量，展示新热点。

如果说该书有些特点，可能是把作者所在研究中心的一些研究和教学成果也带入其中，甚至将一些以前在工业微生物学不曾触及的问题，如转基因食品、微生物与基因专利保护也予以介绍。

本书编写时特别注意有关应用技术的描述，但因篇幅有限，有些具体内容，读者可参考作者主编的《工业微生物实验技术手册》(中国轻工业出版社)。本书中的分子量，为相对分子质量。

本书的完成是作者的研究中心“团队”合作的结果，一批年轻有为的博士研究生和硕士研究生作出了巨大的努力。他们是王凡强、沈微、陈叶福、李艳、唐雪明、于海、郭雪娜、赵振峰、孙金凤、谢丽萍、刘桂香等同学，还有研究中心的金海如博士、方慧英老师和姚雨花同志。我的爱子诸葛斌和诸葛峰也在他们的专业范围给了我很大的支持。

本书可以作生物工程、发酵工程、生物制药、生物化工、生物技术、食品工程和应用微生物学等专业的本科学生和研究生的教学参考书，也可作为相应企业和研究所的技术人员和研究人员有实用价值的参考书。

诸葛健

于江南大学 (原无锡轻工大学)

2002 年 4 月

目 录

第一章 工业生产常用常见微生物的种类与形态	1
第一节 工业微生物的特征	1
一、分类学的规则.....	1
二、特殊分类方法.....	3
第二节 工业微生物包含的微生物类群	3
一、噬菌体.....	3
二、原核微生物.....	8
三、真核细胞微生物	12
第二章 工业微生物资源及代谢目的产物的筛选	31
第一节 工业微生物获得的一般途径	31
一、目的工业微生物应具备的特征	31
二、工业微生物的来源	31
三、从自然界分离和筛选微生物的一般方法	31
四、选择性培养基与富集培养	31
五、在液体培养基中富集不同的原核微生物	35
第二节 筛选目的菌株	38
一、收集微生物资源（采样）	39
二、初筛	41
三、复筛	45
四、辅助筛选	49
五、反应筛选模式	51
六、筛选与评价的区别	53
七、相关微生物学的分析	53
第三节 抗肿瘤化合物的初筛	54
一、抗肿瘤化合物筛选	54
二、基于抗微生物活性的筛选	55
三、细胞培养技术和多终点初筛	56
四、修复检测法	57
五、原噬菌体诱导检测法（ILB 方法）	57
六、使用 DNA 的初筛方法	57
七、培养液滤液中已知抗肿瘤抗生素的快速鉴定方法	58
第三章 生长、产物生成与营养	59
第一节 概述	59
一、细菌的生长	59
二、酵母的生长	60

三、菌丝体的生长	61
第二节 微生物生长的测量方法	62
一、细胞数的测量	62
二、细胞量的测量	65
三、细胞量的间接估算	67
第三节 环境对生长的影响	74
一、概述	74
二、微生物生长速率的多样性	75
三、物理环境因素对生长的影响	75
四、化学因素对生长的影响	80
第四节 培养基的设计	83
一、营养和环境的要求	84
二、工艺经济的合理性	88
第四章 微生物的纯种培养及其保藏	91
第一节 纯种培养技术	91
一、平皿分离法	91
二、液体试管稀释分离	93
三、双菌分离法	93
四、器具操作的单细胞分离	94
第二节 放大培养	94
一、典型的通风发酵概述	94
二、种母的制备	96
三、接种量	96
四、菌种的稳定性	97
五、杂菌污染的防治	97
六、发酵过程中的泡沫的控制	99
七、发酵模拟放大的实验方法	99
第三节 工业微生物的保藏	100
第四节 我国及国际上重要的菌种保藏单位	105
第五章 基础代谢过程	114
第一节 介绍	114
第二节 分解代谢的概念	114
一、催化作用	114
二、能量产生	115
三、能量偶合	116
第三节 跨膜输送	116
第四节 化能合成——碳水化合物代谢	117
一、EMP 途径	117
二、HMP 途径	118
三、ED 途径	119

四、PK 途径	119
五、各途径的联系	119
第五节 好氧代谢过程	120
一、三羧酸循环	120
二、乙醛酸循环和葡萄糖异生作用	122
三、甲烷和甲醇的氧化	123
第六节 厌氧代谢过程	123
一、酒精发酵	124
二、乙酸、丁酸、丙酮、丁醇发酵	126
三、丙酸和丁二酸（琥珀酸）发酵	128
四、乳酸发酵	129
五、丙乳酸发酵	130
六、双乙酰、3-羟基丁酮和丁二醇发酵	130
七、甲烷发酵	131
八、含氮化合物的形成	132
第七节 碳水化合物的代谢调节	132
一、巴斯德效应或氧的影响	132
二、Crabtree 或葡萄糖效应	133
第六章 工业微生物次级代谢的生物合成途径	135
第一节 初级代谢和次级代谢生物合成途径的前体	135
一、营养物质被吸收进入细胞	135
二、营养物质转化为中枢途径的中间产物	135
第二节 次级代谢物不同前体的生物合成	135
一、乙酸、丙酸和其他有机酸	135
二、异戊二烯单位	136
三、氨基酸	137
四、糖和氨基糖	139
五、环多醇和氨基环多醇	139
六、脒基	140
七、嘌呤和嘧啶碱基	140
八、芳香族氨基酸	140
九、甲基	140
第三节 经修饰（非常见）前体的生物合成	141
一、经修饰氨基酸的合成	143
二、经修饰糖和氨基糖的合成	143
三、经修饰的嘌呤和嘧啶碱基的合成	144
第四节 次级代谢物生物合成过程中的限制性前体	144
第五节 次级代谢物的生物合成	145
一、前体进入专用于生物合成次级代谢物的途径	145
二、聚合过程	145

三、次级代谢物结构的后期修饰·····	146
四、复合抗生素不同部分的装配·····	147
五、次级代谢物合成酶的底物专一性·····	147
第七章 工业微生物遗传学及代谢调控·····	148
第一节 遗传学原理·····	148
一、经典遗传学·····	148
二、分子遗传学·····	148
三、分子水平的突变·····	149
第二节 工业微生物的遗传系统·····	150
一、原核系统·····	150
二、真核系统(酵母和丝状真菌)·····	154
第三节 遗传学进展与应用·····	158
一、原生质体融合技术·····	158
二、工业微生物的 DNA 重组技术·····	158
第四节 调节·····	159
一、微生物代谢调节·····	159
二、初级代谢产物发酵的调节·····	167
三、次级代谢产物发酵的调节·····	170
第八章 诱变育种与基因重组育种·····	176
第一节 诱变育种·····	176
一、概况·····	176
二、诱变的遗传学背景·····	176
三、诱变类型·····	180
四、突变的固定·····	185
五、抗突变作用·····	186
六、工业微生物的突变·····	187
第二节 基因重组育种·····	190
一、简介·····	190
二、有性杂交过程·····	191
三、准性生殖过程·····	193
四、原生质体育种技术·····	195
五、基因工程技术用于工业菌种改良·····	210
六、转基因食品的安全性·····	212
第九章 微生物、植物和动物细胞的分批和连续培养·····	215
第一节 概况·····	216
一、理论和实验·····	216
二、培养基·····	227
第二节 应用·····	233
一、培养方式·····	233
二、质量转化·····	233

三、过程控制·····	234
第三节 植物细胞·····	237
一、植物细胞的培养·····	237
二、代谢和形态上的应用研究·····	240
第四节 动物细胞·····	240
第十章 生物学发明及其专利保护·····	244
第一节 专利·····	244
一、总评·····	244
二、专利制度概述·····	244
第二节 申请专利的要求·····	245
一、申请专利的基本要求·····	245
二、不授予专利权的发明创造·····	247
三、生物学发明的认定和专利权的授予·····	247
四、专利类型·····	248
第三节 专利申请文件·····	250
一、总评·····	250
二、请求书·····	250
三、说明书·····	250
四、权利要求书·····	251
五、说明书摘要·····	251
六、其他文件·····	251
第四节 微生物菌种保藏及其专利申请文件·····	251
第五节 国际承认用于专利程序的微生物保藏布达佩斯条约·····	252
第六节 基因的专利保护·····	253
一、基因是一种有限的资源·····	253
二、对基因的占有方式是“基因专利”·····	253
三、基因专利的商业价值·····	253
四、基因专利的法律效力·····	254
第七节 生物技术专利战略·····	254
附录一 伯杰氏细菌学手册中细菌分类·····	256
附录二 限制性酶和甲基化酶·····	260
参考文献·····	276

第一章 工业生产常用常见微生物的种类与形态

第一节 工业微生物的特征

工业微生物包括所有工业上应用的微生物，还必须处理一些工业生产中的杂菌。有时微生物既不是杂菌，也不是生产菌，例如产醋酸细菌在生产醋的生产中是生产菌，但它的醋酸化作用却会使啤酒或葡萄酒酸败。工业微生物学研究的主要内容为细菌学(bacteriology)和真菌学(mycology)。

每个工业技术人员都应熟悉自己研究的微生物。应能正确知道它的名称，知道必要的术语和鉴定方法，也要清楚在给定条件下微生物发酵的新陈代谢特征。如果精通分类学，便可采用迅捷的方法从混杂的微生物群体中选出特殊的具高产特征的目的菌。工业技术人员应会配制培养基，不断改良微生物，分离微生物，并防止来自空气、水、土壤或原材料中的杂菌污染，使生产费用最低。

仅仅认识工业微生物的用途和污染菌是不够用的，还必须注意它们的病原性。即使最终产物含有的是死菌体对操作人员也是很危险的。如果医治或制药过程必须用到致病菌，那么操作人员必须先学习如何安全操作这些细菌，应该从微生物的特征来考察一种微生物，如形态特征、生理特征、基因特征、免疫特征等。这些通常是经过长期的因袭而保存下来的，有些特征是根据需要而新加上去的，这些特征通称它的表观型。一种微生物的表观型能够解释在给定条件下的生物化学反应以及它在工业生产中的应用。

一、分类学的规则

分类学就是指如何对微生物分类以及如何(作为一种方法)应用这种分类方法的一门科学。微生物分类的理论研究，包括研究的基础、原理、过程以及规则，分类学的概念以及分类的原理。

分类学是最古老的生物科学之一，林奈(Linnalus, 1707—1778)是第一个采用双命名划分生物的科学家的。他的分类法和双命名法至今仍在应用。表 1-1 为微生物分类系列。

表 1-1 微生物分类系列

分类层次	尾 缀	举 例	分类层次	尾 缀	举 例
种 (Species)		<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	纲 (Class)	- phyceae(用于藻类)	Ascomycetes
属 (Genus)		<i>Saccharomyces</i>		- mycetes(用于真菌)	
科 (Family)	- aceae	Saccharomycetaceae	门 (Division)	- phyta(用于藻类)	Eumycota
目 (Order)	- ales	Endomycetates		- mycota(用于真菌)	

植物、动物和真菌的体系中个体的划分规则不一致是这种分类方法的缺陷，是为什么无法对物种(species)下一个一般定义的原因。“种”是该体系的基本单元，由有着共同祖先(其类似的行为，近似遗传特征)的微生物组成，在外界环境条件的不断的自然选择过程中，逐渐区别于其他微生物。

双命名法包括属名和种名，属名在前，字首大写，种名在后，字首小写。有时在种名后还有附加部分。属名规定了微生物的主要形态特征、生理特征等，而种名往往补充说明微生物的颜色、性状、用途等次要特征。种名是由一个的特征性形容词组成。属名由名词或用作名词的形容词(单数形式)组成，字首大写。相比之下，特征性形容词字首不大写。特征性形容词或是形容词必须在语法上与属名一致如枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、细尖克勒氏酵母(*Kloeckera apilata*)；或是主格名词与属名并列如逗号弧菌(*Vibrio comma*)、凸形假单胞菌(*Pseudomonas conjac*)；或是遗传学的名词如醋酸化醋杆菌(*Acetobacter aceti*)。为利于鉴别，一物种的命名必须准确而完整，应该引用第一位命名者的名字，这样才能便于日期的核对。当属名或种名被改变了而仍保留它的名字或特征性的描述，则原命名者的名字必须用圆括号括起，在后面写上更改者的名字如：*Saccharomyces* (Meyen) Reess, *Aureobasidium pulluans* (de Bary) Arnaud 等。

一个微生物种类可以划分为亚种、变种或型，这些构成了物种的亚结构。亚种、变种和型的名称属名及其后依次为特征性形容词、次要性状形容词。如果一个种被划分为两种或更多的次种或变种，具有这一典型的一类物种应用特征性形容词表明。

分类学同其他科学规则一样具有专门术语。一个经常用的术语是型(type)，它有好几种意思。其一是表观型，一种表观型也许是一个微生物的许多可测量特征或显著特征，例如，群体培养表观形态，涂片颜色，酶的产生、发酵产糖能力以及其他。相比之下，一个个体所有遗传密码(基因)组成了它的基因型。基因不能直接判断出来但可以通过表观型的表达得以发现。型的另一个意思是命名法，这类命名法是根据国际细菌学手册命名的任一类群的微生物来命名的。

当描述一个物种时，可通过收藏株中某一培养物来描述该种物名所指的最原始培养，称为主模式株，其他培养物称为补模式株。命名一个新的微生物，应用拉丁文名称。一个收藏菌中的某一种菌有时会死掉或它的表观型发生变化，可由类似于原始培养物的另一种培养物代替原始培养物，该培养物称为新模式株。有时同一菌株可能有几种不同命名。例如 *Torula utilis*, *Torulepsis utilis*, *Candida ulilis*。在这种情况下，应按规定使命名统一，其中之一为准确的，其余为同义词命名。上面例子中准确命名为产朊假丝酵母(*Candida utilis*)，另外两种命名为同义词命名。最后，可能发生两种不同微生物有相同的命名。例如，*Dozya* 是真菌(*fungus*)的名字，同时也是一种地衣(moss)的名字。该情况下哪个先用这一命名，则为有效命名。上面例子 *Dozya* 是 moss 的有效命名，这种共同名称为同系同义词。

微生物中许多种类广泛存在于自然界。例如大肠杆菌(*Escherichia coli*)；酿酒酵母(*Sacharomyces cerevisiae*)；出芽短梗霉(*Aureobasidium pullulans*)或黑曲霉(*Aspergillus niger*)。

含大量菌株的微生物种类称“大种”(great species)。根据微生物的地域不同可以划为生态型(ecotypes)，它们可能在生理特征上不同(biotype)或在血清学特征上不同(serotype)。可以通过微生物属性或微生物的形态、生物化学、基因、血清学以及其他方面的不同来评估一种大种菌株，它们的关系可以用统计法进行测定。第一次从自然界分离出的标本微生物不一定就是一个一般类型，它也可能是一个极端变异种，处于一类菌株范围的边缘。

有时一个属中的较大的种类中的个体可能发生重叠，很难确定一个过渡类型的菌株归哪一类别，这种在分类学上的连续性是由于自然变异造成的。但国际命名法是建立一个新物种名称来解决这个问题的。有时也会发生关系密切的两个物种在某一行行为方式上显著不同，这

是分类间断性，同时也是死亡或未被发现存在的证据。

这种利用典型培养物来作为微生物描述的分类学称为单型分类学。另一方面，统计意义上的平均微生物特征进行分类的方法称为多型分类学，例如数值分类法。数值分类法中对所有特征一视同仁，经常被认为是一种缺点，但这应归因于对该分类法的了解。与传统分类法比较，传统分类法优先考虑某些特征，而数值分类法考察所有特征，进行类别划分。

微生物学中“个体”通常是指单细胞细菌或真菌但对于一个个体细胞，只能采用显微镜甚至电子显微镜来评价它的一些特性，这种分类法有片面性，且几乎没有操作价值，但是微生物个体的群落，无性繁殖的群体（或纯培养）可避免以上缺点。微生物的培养物可能有许多特征，一类微生物区别于另一种微生物，但其他性质又类似。红酵母属（*Rhodotorula*）因为它的类胡萝卜素颜色而不同于酿酒酵母属（*Saccharomyces*），特性的差异影响到微生物的多样性。微生物特征的变化是独立进行的，红酵母区别于粉红色酵母、黄色酵母、黑色酵母，但颜色的差异取决于外界环境的影响，它改变三种主要类胡萝卜素化合物在酵母中的浓度。

二、特殊分类方法

近来分析技术的进步产生新的特殊的表观型分类法。实验方法经常要借助现代仪器的帮助。所有特殊的数值分类法根据一些单个特征进行分类，并且建立在分子生物学发展的基础之上。

血清学是最古老的特殊技术之一，这门技术也应用于微生物的鉴定。抗原如可溶性蛋白，或一些多糖物质，刺激人体或动物体内产生抗体。兔子或其他实验动物常应用于人工诱导免疫。当向它们体内注射死亡微生物时，它们体内会产生抗体。抗体具有与相同或相近种类的微生物细胞凝集的能力。各种不同血清学方法是在检测体外的凝集作用而发展起来的，例如，沉淀作用、双向扩散法等。该过程用于鉴定微生物间血清学的类似程度。该技术相对近期在海藻和真菌的鉴定中应用，但现在也广泛应用于鉴定其他微生物。

一些分类学家认为，微生物 DNA 的基本组成是最重要的分类法之一。通常表现为摩尔 DNA 中 GC 含量的不同。通过加热水溶液，双链 DNA 分子分离成两条单链，引起变化的特定温度可精确测量，温度越高，GC 百分含量越大。

染色体 RNA 可以与同源 DNA 杂交，根据 DNA-RNA 杂交原理，可以在相近菌株间进行杂交。一些分类学家认为 RNA-DNA 杂交法是一种较测定 DNA 中 GC 百分含量更好的分类依据。

以上分类学确定了物种的特征及命名。对于酵母菌、细菌、菌丝状真菌以及海藻类已有各自鉴定的方案。

第二节 工业微生物包含的微生物类群

一、噬菌体

感染原核微生物的病毒称为噬菌体（phage）。病毒（virus）体积很小，大小在 20～200nm 之间，低于光学显微镜的分辨范围，因此直到发明了电子显微镜，它的结构才被认清。1892 年发现了烟草花叶病毒的烟叶悬浮滤液的感染原理，证明了感染性粒子小于细菌。1935 年证明了该病毒的结晶特性，新的病毒被逐渐发现并深入研究。病毒是最小的生物体系，在它们的内部组织、化学组成及生长特性上，它们与非细胞微生物有很大的差别。病毒利用活细胞进行复制，能够在宿主细胞内大量繁殖。病毒包括一个或更多的 DNA 或 RNA

分子，而不会同时含有两种类型的核酸，具有复制和合成病毒的遗传信息。核酸存在于蛋白质形成的衣壳内，有时衣壳被一层膜包围，该膜部分来源于宿主细胞。衣壳的蛋白质包括一些复制需要的酶，例如聚合酶或逆转录酶。其他酶出现在囊膜上，例如溶菌体类似酶、神经氨酸酶、ATP 酶及其他酶，然而，大部分病毒并不含酶。一些病毒在脂蛋白和糖蛋白中含有脂类和蛋白质，最大病毒也含有维生素和金属离子。正常情况下，真核细胞中的 DNA 以双链存在，RNA 却以单链存在。但病毒中的 DNA 也可能是单链，RNA 可能为双链。一些噬菌体和动物病毒 DNA 为环状，两条链都连接成为一个环。但并不是所有病毒中 DNA 都为环状。依据病毒内部组成，衣壳可有螺旋（helical）或二十面体（icosahedral）。病毒具有两种类型的对称，头部是对称二十面体，尾部是对称螺旋体（图 1-1）。

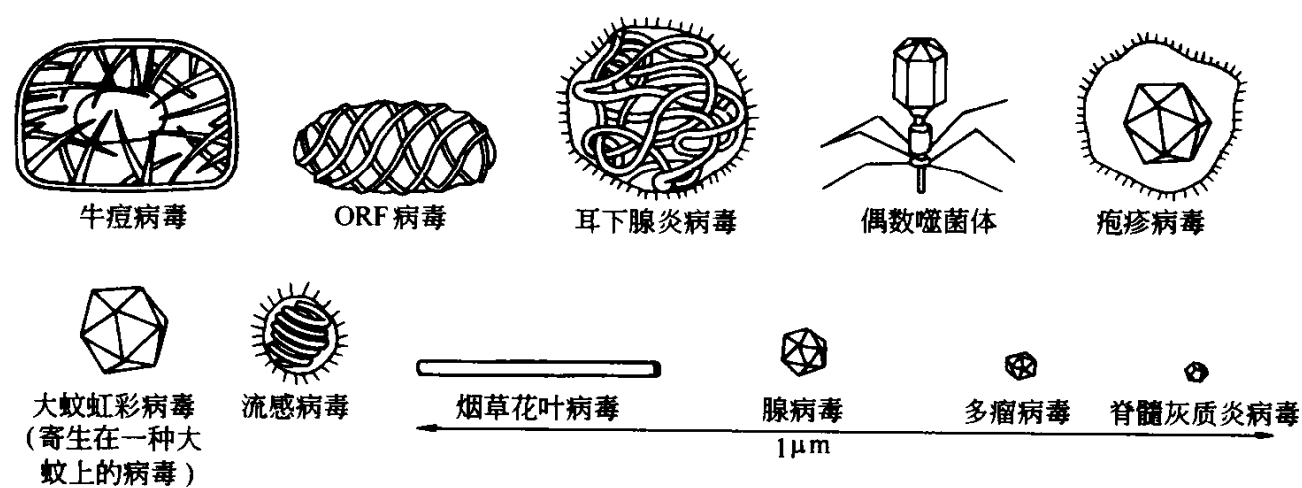


图 1-1 不同病毒的形状与大小

噬菌体的复制发生在宿主细胞中，由宿主细胞决定噬菌体能否繁殖。被感染的细胞称为感受态细胞，整个复制过程可分为四步（图 1-3）。



图 1-2 一群噬菌体在细菌细胞周围

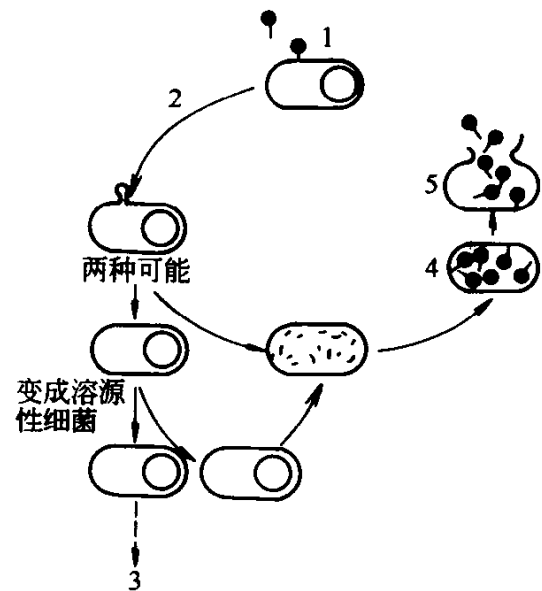


图 1-3 噬菌体的复制过程

1—吸附；2—侵入；3—复制；
4—组装；5—释放

- 吸附和侵入宿主细胞（图 1-2，图 1-4）。
- 合成复制噬菌体核苷酸所需的酶及合成病毒其他组成部分。
- 组装噬菌体结构组成部分成为一完整噬菌体。
- 从宿主细胞释放成熟噬菌体。

噬菌体复制机制，有些噬菌体具有与受体细菌表面特殊位点相作用的吸附位点。尾部通常为噬菌体的吸附器官。T-偶数噬菌体具有特殊的尾丝，可与细菌表面特殊部位吸附。被吸附的噬菌体把尾丝用作接种针，将 DNA 从头部通过尾髓注入细胞壁（图 1-4）。侵入的 DNA 立刻利用宿主 RNA 多聚酶转录噬菌体 mRNA 形成一系列多达 11 种新的酶，包括复制噬菌体 DNA 所必需的 DNA 多聚酶和被环宿主 DNA 的脱氧核糖核酸酶，合成新的外壳物质，DNA 被复制。对于双链 DNA 和单链 DNA 复制机制也不尽相同。完全成熟的噬菌体微粒产生溶菌酶，水解细菌细胞壁成分中的肽聚糖。细胞壁被破坏并由于高内渗透压而破碎，新形成的成熟噬菌体释放到介质中。

RNA 噬菌体是最简单的病毒，由一个单链 RNA 分子组成。噬菌体 RNA 侵入宿主细胞后，RNA 编码 3 种成分：外壳蛋白；一种特殊的复制酶用来催化噬菌体 RNA 的形成；蛋白质 A，服务于病毒组成部分的组装。单链 RNA 的功能是复制新的 RNA 螺旋的基质。新形成的螺旋释放，重复复制。

许多因素影响病毒对宿主细胞的侵入，例如，带电离子（经常是 Ca^{2+} ）能中和病毒氨基酸上的过量电荷或 pH 值。受体细胞起了最重要作用，在细胞壁上有两种受体粘蛋白和脂蛋白，正粘病毒与副粘病毒与粘蛋白质相连系，具有该类受体的末端基团为唾液酸（N-neuraminic acid）。若这些受体通过霍乱弧菌或肺炎球菌的过滤培养被除去，或通过唾液苷酶（神经氨酸酶）或链霉蛋白酶，则病毒不能够被细胞壁表面吸附。在高温下病毒会从这些凝集红细胞中被吸附出来，该方法可用来净化病毒制品。血红细胞的细胞表面有脂蛋白和粘蛋白，是许多病毒吸附的基础。

动物病毒进入宿主细胞质的过程称为胞饮作用或病毒胞吞（virophagy），为一种吞噬作用。在病毒的吸附位点，细胞壁凹陷，包围整个病毒。侵入细胞壁的酶解部分，病毒核酸释放，进入宿主细胞质。病毒在通过细胞壁的过程中会丢失衣壳，侵入所需能量由 ATP 或 ADP 提供。

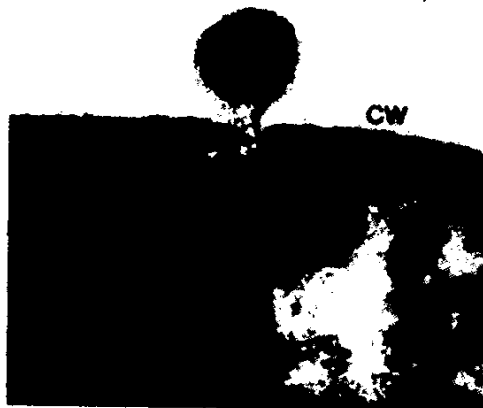


图 1-4 噬菌体对宿主细胞的吸附和侵入

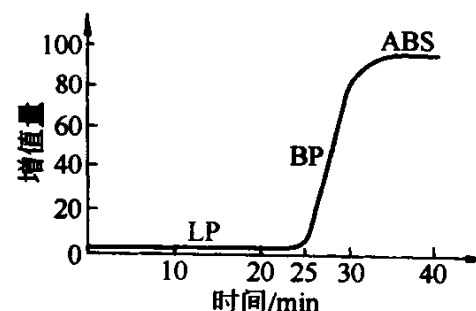


图 1-5 噬菌体典型的一步增殖曲线
LP—潜伏期；BP—裂解时间（min）；
ABS—增殖量

噬菌体核酸在宿主细胞质中进一步引起两个反应。核酸分子复制和蛋白质的合成。这是两个独立的反应，两种成分最终构成成熟的噬菌体。从侵入过程的完成到成熟噬菌体的形成，这段时间间隔（从细菌受噬菌体感染至感染性噬菌体颗粒成熟）称为潜伏期（图 1-5）。

当侵入的噬菌体核酸释放后处于一个“共处”的状态，这时噬菌体和宿主细胞形成一共同体。这时有的宿主细胞的核酸蛋白质的生物合成停止，合成过程用来进行噬菌体的复制；另一些情况下，噬菌体不影响宿主细胞的合成过程。

病毒的分类 1996 由国际病毒分类委员会（International Committee for virus taxonomy）

审查，至今有效。该体系依据病毒在宿主细胞内的行为，单一类群分为科和属两类。

大部分病毒对人体、牲畜、庄稼及生产细菌和真菌有害，因此微生物学家的任务之一就是阻止病毒的侵袭。人类和动物可以受特殊措施保护，例如种痘，或通过物理或化学方法进行抗病毒处理。由于对宿主细胞及组织的特殊性，病毒只能通过敏感性菌种中的培养获得。大病毒包括动物病毒、植物病毒和微生物病毒。传统上微生物病毒分为感染原核宿主细胞和真核宿主细胞两类。

感染原核细胞的病毒：感染细菌的病毒叫噬菌体，感染放线菌的叫噬放线菌体，感染蓝绿藻的为噬蓝藻体。

(一) 原核细胞噬菌体

几乎所有种类细菌都能成为一种或多种噬菌体 (phage) 的宿主。在细菌培养的工艺过程中，噬菌体是一个重要问题。噬菌体作用于敏感细菌，在生长期会导致宿主细胞溶菌和死亡。很容易证明这个过程：敏感的细菌在营养琼脂上划线培养，将几滴含噬菌体的溶液滴在划线部分，则该滤液的添加会产生小而清晰的区域，称为噬菌斑(图 1-6)。如果该滤液被充分稀释，则每个噬菌斑代表一个噬菌体，该方法可用来测定噬菌体数量。

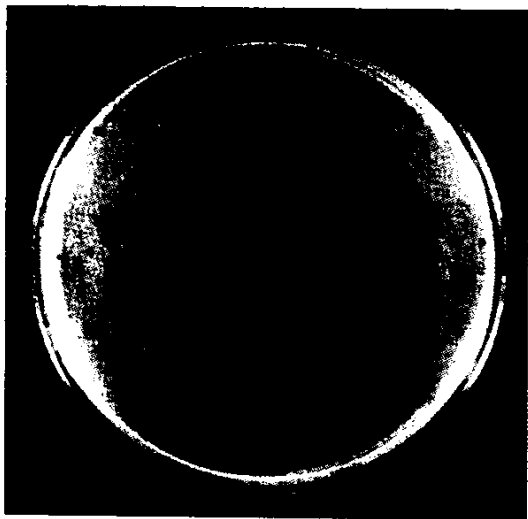


图 1-6 噬菌斑



图 1-7 大肠杆菌的 T 噬菌体

噬菌体可能为蝌蚪状，具有头部和尾部。尾或长或短或缺失。噬菌体头部结构可以是二十面体或螺旋体或为螺旋和二十面体的混合型。噬菌体感染大肠杆菌已研究得很透彻了。其中一种为 T-噬菌体 (T_1 到 T_7)。偶数 T-噬菌体 ($T_2 T_4 T_6$) 具类似特征 (图 1-7)。它们有类似的尾部结构 (fibres)，都含 5-羟甲基胸腺嘧啶而不是胞嘧啶。头部包含 DNA 分子，外壳有一个颈部。尾鞘端有一个连接器，另一端有基片，基片上有尾丝和尾针。头部和尾部独立形成，最后由颈圈和连接器连接并组装 (图 1-8)。

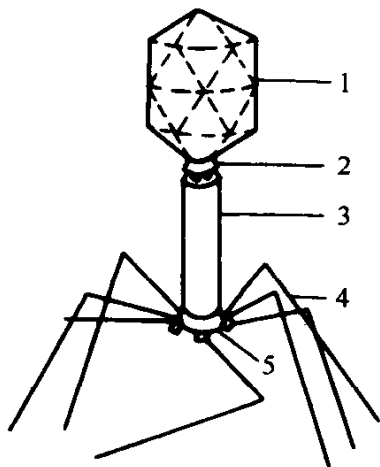


图 1-8 T_4 噬菌体形态
1—头部；2—颈部；3—尾鞘；
4—尾丝；5—基片

噬菌体依据它们与宿主细胞的关系可以划分为烈性噬菌体和温和噬菌体。烈性噬菌体引起细菌细胞的溶菌 (裂解周期)。相比之下，一个温和噬菌体的 DNA 侵入细菌细胞后，与细菌染色体整合，成为细菌基因的一部分，研究最透的温和噬菌体是大肠杆菌 T 噬菌体。噬菌体 DNA 随宿主细胞核内的复制而复制，这时的噬菌体称为原噬菌体，携带并且传递原噬菌体的细菌叫溶原

性细菌。这样的细菌对相关烈性噬菌体具免疫性（图 1-9）。

细菌对噬菌体很敏感，工厂中噬菌体的感染导致经济损失。螯合剂、非离子表面活性剂及抗菌剂可用于处理以下产品生产细菌的感染。

假单孢菌（2-酮葡萄糖酸）；短杆菌（L-谷氨酸）；链球菌（乳酪）；乳酸杆菌（乳酸）；明串珠菌（葡聚糖）；谷氨酸棒杆菌（L-谷氨酸）；芽孢杆菌（淀粉酶）；梭状芽孢杆菌（丙醇，丁醇）；链霉菌（链霉素，卡那霉素）。

噬蓝藻体发现于 1963 年。它具有双链 DNA，溶菌过程类似细菌。类似病毒的粒子吸附于蓝绿藻细胞表面，之后噬蓝藻体 DNA 从尾鞘注入寄主细胞并成为其核酸的一部分。

（二）真核细胞病毒

病毒及类似病毒的粒子在分类上包括在真菌、藻类及原生动物中所发现的。如绿藻门、褐藻门、红藻门、藻状菌纲、肉足总纲、孢子纲、纤毛纲。

有关真菌病毒的报道于 1948 年发表，首次关于双链 RNA(dsRNA)及双链 RNA 病毒在真菌中存在的物理和化学证明于 1967 年和 1968 年发表。真菌病毒分为两类，即小型丝状真菌(hyphal microfungi)病毒和酵母杀伤因子(killer)。

1. 小型丝状真菌病毒 所有真菌病毒共同特征是含 dsRNA 多面体形状。一些真菌病毒具多种成分，有些含单链 RNA(ssRNA)或没有 RNA。青霉及臭曲霉的病毒各含有两种血清学上无关并且电泳可辨的病毒。真菌病毒可诱发干扰素。外壳蛋白通常含两条多肽链。

含 dsRNA 的真菌细胞超微结构的检测表明病毒在细胞质中，粒子通常形成线状或环状聚集物且通常存在于与膜相连的液泡中。一个真菌细胞容纳许多粒子，而且不会伤害细胞的生长，也不会引起溶菌。进一步的溶菌引起自由病毒粒子的释放，在微生物成员之间的病毒传送表现为细胞质的传送，这并不需要进一步的溶菌和释放自由病毒粒子。在丝状真菌中，细胞质的交换依赖于遗传上配对细胞的相容性及细胞的相互接触，这些都发生在有性繁殖时。

霉菌培养过程中的溶菌在特殊条件下发生，包括在乳糖为基础的培养基上生长、dsRNA 病毒的出现及染色体位点上的突变。

2. 微生物中的杀伤因子 伴随毒性蛋白产生的类似病毒的粒子存在于酿酒酵母和黑粉菌(Vstilago)中。最近一些其他酵母属，也含有 dsRNA 病毒粒子，酵母中杀伤因子的研究最为深入。

某些酿酒酵母菌株，称为杀伤菌株，是能分泌一种毒性糖蛋白可杀死敏感菌的菌株（图 1-10）。

该酵母杀伤菌株的特性决定于细胞质因素 K 及核酸遗传物质。菌株产生 K 因素的表型标记为 K^+ ，不具杀伤力的 K 因

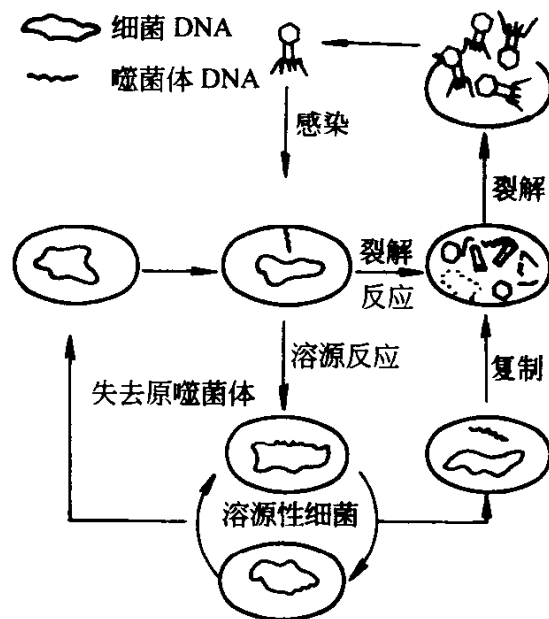


图 1-9 温和性噬菌体的生活史

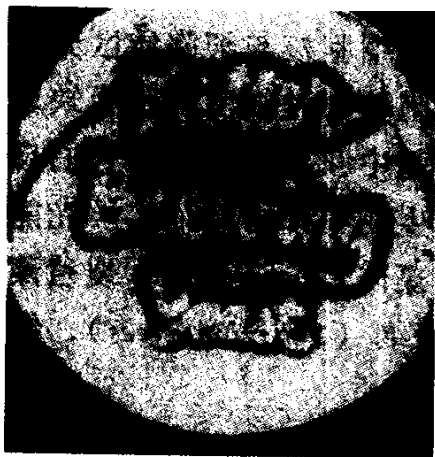


图 1-10 具有杀伤因子的啤酒酵母在敏感野生酵母平皿上的抑菌现象

素的标记为 K^- 。有时 K^W 用于标记微弱产生 K 因素， K^- 菌株对杀伤菌株十分敏感。

还有中性菌株，既不具杀伤力也不被杀死，通常它们只对一种毒素呈中性。对杀伤菌株作用呈现抗性的标记为 R^+ ；呈现敏感标记为 R^- ， R^W 表示弱抗性。这些杀伤菌株标记表型为 K^+R^+ ，中性菌株为 K^-R^+ ，敏感菌株为 K^-R^- ，组合 K^+R^- 不存在，因为杀伤菌株总是对他们自身的毒素有自动抵制能力。酵母细胞分泌的杀伤毒素含 dsRNA，该 dsRNA 以两种形式存在：L 或 P1 (mol (质量) 2.5×10^6) 和 M 或 P2 [mol (质量) $(1.4 \sim 1.7) \times 10^6$]，偶尔以 XL (mol (质量) 3.8×10^6) 形式出现。MdsRNA 被外壳包着，类似病毒粒子，它可能是杀伤质粒，各个杀伤酵母细胞存在大约 1.5×10^4 胶囊粒子。杀伤质粒的壳体含 3 条多肽链，相对分子质量为 7500, 5300, 3700。

杀伤因子的存在与复制至少需要 12 条染色体基因，10 条 mak 基因、kex1 及 kex2。抗性基因为 rex1。杀伤因子在高于 25°C ，pH 值 4.6~4.8 可在水溶液中被蛋白水解酶、放线菌酮或通气作用而失活。使杀伤因子失活的条件称为修复条件，酵母细胞称为痊愈细胞 (cured cell)。

近来，发现两种小分子 dsRNA：分子量为 5×10^5 的 SdsRNA，出现在抑制性非杀伤突变株中，是二倍体中抑制杀伤因子的决定因素。由抑制性菌株和缺少 MdsRNA 但是含有与亲本菌株水平相当 LdsRNA 的杀伤性菌株，缺少 MdsRNA 但是含有水平相当的 LdsRNA 的杀伤菌株形成双倍体。分子量为 2.5×10^5 ，很小的 IdsRNA，在含一个抗性基因 rex1 突变负免疫菌株中发现。也有一些叫超杀伤因子的菌株，含有比正常杀伤细胞多 2.5 倍的 MdsRNA。此外，有中性表型的突变株，它们与野生型相似，含 L 及 MdsRNA。该中性类型受核酸 (dex1, kex2, rex1) 及胞质基因 (n) 的影响。

杀伤菌株毒素及其作用机制：杀伤菌株毒素是由杀伤菌株分泌到培养基的敏感性大分子蛋白酶。从杀伤菌株中得到的纯化 100 倍的毒素制品含约 90% 的碳水化合物（全部为 D-甘露糖）和约 10% 蛋白质部分。蛋白质的一半（摩尔质量：10000）可被清洁剂从碳水化合物上分离下来，似为特殊的毒性成分，非杀伤因子缺少这种蛋白质，核酸在毒素制品中从未被发现。杀伤性毒素抑制 DNA、RNA 以及蛋白质和多聚糖的生物合成。当细胞存在于毒素条件下 60min 后，ATP 就开始进入培养基，以致培养基中 ATP 的累积量是原细胞内含量的 5 倍。

二、原核微生物

原核生物区别于真核生物的最基本的特征有：原核生物没有使细胞核与细胞质区分开来的核膜；缺少有丝分裂；典型原核生物的聚合物肽聚糖存在于细胞壁中，细菌细胞膜缺乏真核生物细胞膜中具有固醇。惟一例外是支原体，支原体从培养基中获得固醇，但它们自身不能合成固醇。一些抗菌素选择性的毒性作用在真核生物和原核生物中都得到证实。光能异养型和化能自养型仅在原核生物中出现。原核生物分为两类，蓝藻门 Cyanophyta [裂殖藻纲 (Schizophyceae) 和蓝绿藻] 及细菌门 (Bacteriophyta) [裂殖菌纲 (Schizomycetes)，细菌和放线菌目 (Actinomycetales)]。

(一) 细菌

细菌是单细胞微生物。细胞大小从约 500nm 到 2000nm。细胞为球状、杆状和螺旋状。这些细胞可以连接成分支状或四个一组成立方形或无规则组合群，一些细胞可能为分支状 (图 1-11)。

细菌细胞由原生质体组成，外面是细胞壁，细胞质膜在原生质体表面包围着原生质体及



图 1-11 球菌、杆菌和螺旋菌的扫描电镜形态

其他细胞器。图 1-12 为细菌细胞结构示意图。

用光学显微镜不能观察到细胞壁的结构，但经过染色可以区别组成成分。1884 年 GRAM 发明了一种新颖的染色技术，称革兰氏染色法。该方法将细胞分为两类：革兰氏阳性菌 (G^+) 和革兰氏阴性菌 (G^-)。革兰氏阴性菌脂类含量较高，肽聚糖含量较低，染色时乙醇溶解脂类物质，使细胞壁通透性增加，结晶紫-碘复合物容易被抽出，于是被脱色显红色。革兰氏阳性菌由于细胞壁肽聚糖含量高，脂类含量低，乙醇处理使细胞壁脱水，肽聚糖层孔径变小，通透性降低，结晶紫-碘复合物被保留在细胞内细胞不被脱色显紫色。革兰氏阳性菌含有较阴性菌多 2~4 倍的肽聚糖，而少 10 倍的脂类，含多达 50% 的磷壁酸，而这是阴性菌所没有的。

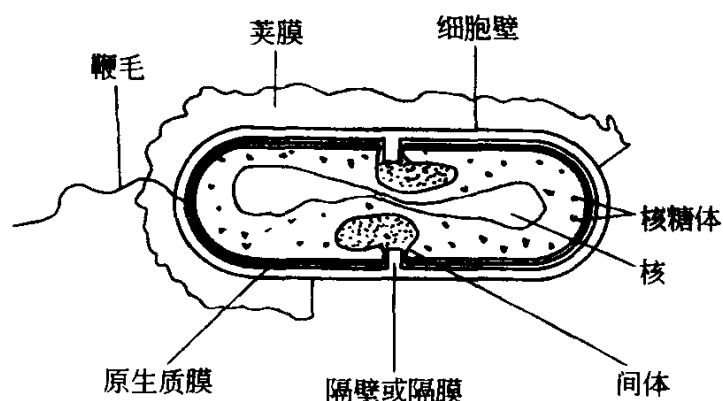


图 1-12 细菌细胞结构

细菌细胞壁很薄，约 10nm，坚韧而略有硬度，有保护和成形的作用。细菌对渗透压的变化没有活性机制，因此它们可以仅在细胞壁的保护下生活在低张力的培养基上。高度嗜盐细菌和支原体缺乏坚韧的细胞壁，后者以寄生动物的方式生活在等渗环境下。

细菌细胞壁的主要组成成分是由氨基糖和氨基酸组成的肽聚糖，典型的成分是二氨基庚二酸和 *N*-乙酰神经氨酸和 *N*-乙酰氨基葡萄糖。有趣的是甘氨酸和谷氨酸以 D-构型出现在细菌细胞壁中，而不是以蛋白质中常见的 L-构型。在革兰氏阳性菌和放线菌中，细胞壁主要成分是肽聚糖，该化合物形成一个完整的网状结构，贯穿整个细胞壁内壁。革兰氏阴性菌和蓝绿藻中肽聚糖形式仅在细胞壁内层出现。内层的最外层是膜层，革兰氏阳性菌没有该膜层 (图 1-13)。

大多数细菌分泌各种各样的粘液物质，以保护细菌免受外部不适环境的影响。当该粘液层相当厚时，称为荚膜 (capsule)，可通过负染色发观察得到 (图 1-14)。它通常只含一种化学成分，成分依种类不同而异。例如：肠膜状明串珠菌 (*Leuconostoc mesenteroides*) 产生葡萄糖多聚物葡聚糖；木质醋杆菌 (*Acetobacteracei* subsp. *xylinum*) 产生纤维素。荚膜的产生通常会影响到工厂的经济效益。但是荚膜也可用来生产葡聚糖，经加工后可作为血浆替代