

今日的微生物学

(第2集)

焦瑞身 丁正民 周德庆 李碧城 编

复旦大学出版社

序 言

两年前，我们编撰了《今日的微生物学》，不绝如缕，现第2集又付梓。

众所周知，微生物界是一个绚丽多彩而又引人入胜的世界。除真菌、细菌、放线菌和病毒等类群外，10多年来，人类又发现了结构比病毒更简单的微生物类群——类病毒(viroids)和朊病毒(prion)；已知类群中新发现的成员也在与日俱增，震惊全球的爱滋病(AIDS)的病原——人类免疫缺陷病毒(HIV)即为一例。此外，人们还在实验室里创造新种，如借种间乃至属间原生质体融合而获得的融合子，这类融合子的问世给分类学工作者提出了难题。

微生物世界的芸芸众生蕴含着生命科学的无穷奥秘，方兴未艾的生物工程更体现了崭新的技术革命。难怪各国都在加紧开发各种微生物资源，我国“七·五”高技术计划也明确规定了应优先发展生物工程。

前已述及，本书绝非全面论述微生物学的鸿篇巨制，但它确实表达了上海市微生物学会的意愿——希望通过它向同志们提供微生物学的新信息，希望它有助于我们的教学和科研，互通情报，共同提高。

最后，得感谢责任编辑徐士菊同志和审校同志等的辛勤劳动，没有他们的切磋琢磨本书是不可能问世的。

编 者

1989.10.

目 录

我国人民在“史前期”对微生物的认识——《齐民要术》

及《天工开物》阅读札记·····	周德庆 (1)
微生物的线形质粒·····	郑幼霞 (7)
遗传工程叩开了发酵工业的大门·····	雷肇祖 (11)
微生物细胞的固定化技术及其应用·····	居乃琥 (20)
青霉素酰化酶·····	吴汝平 (33)
乳酸菌、酸乳和乳酸饮料·····	郭杰炎 (39)
微生物发酵产业的下游工程·····	朱守一 (47)
生物工程的新分析技术——生物传感器技术·····	李友荣、储炬 (54)
工业废水作为能源的研究进展·····	焦瑞身 (66)
噬菌体及发酵工业中噬菌体污染的防治·····	王家驹 (76)
植物类菌原体病害诊断·····	丁正民 (85)
日益引人注目的弯曲菌·····	陆德源 (90)
通过食物传播的一利新病原菌——单核细胞增多性李氏 杆菌·····	吴仲梁 (98)
人类肿瘤病毒病因最新研究进展·····	杜平、周瑶玺 (102)
抗毒素肽·····	闻玉梅 (117)
常用疫苗的发展前景·····	谢广中 (125)

我国人民在“史前期”对微生物的认识

——《齐民要术》及《天工开物》阅读札记

周德庆

(复旦大学微生物学系)

按人类对微生物本质的认识水平来看，整个微生物学发展史可分成5个时期，这就是史前期、初创期、奠基期、发展期和成熟期。

“史前期”是指人类还未能用显微镜来观察微生物（尤其是细菌）的个体形态，但却在自发地利用有益微生物和控制有害微生物生命活动的一段很长的历史时期。一般指1676年列文虎克用其单式显微镜观察到细菌的个体形态以前。

在“史前期”，人类对微生物的本质虽不了解，但在长时期与微生物的生命活动打交道中，却累积了许多丰富的实际经验。我国古代劳动人民在制曲、酿酒方面的贡献就是这方面最突出的例证。在这方面，他们不仅使我国在世界酿酒史上赢得历史悠久、工艺独特、经验丰富、品种多样四大特色，而且还在对微生物本质的认识方面赶在世界的前头。这可从远在公元6世纪出版的《齐民要术》（北魏贾思勰撰，以下简称《齐》）和在1637年出版的《天工开物》（明宋应星撰，下称《天》）两书中的有关论述来证明。

现从以下三方面来阐述。

一、观察记载了曲中的微生物群体及其生长特点

在《齐》的第七、八卷中，有多处描述到微生物尤其是霉菌的群体，而且对有益和有害的微生物群体还根据其外观特征分别给以专门名称。

（一）有益微生物群体（一般称衣）

1. 五色衣

指酒曲上正常长出的微生物群体。如“三七日曲成。打破，看饼内干燥，五色衣成，（曲）便出曝之；如饼中未燥，五色衣未成，更停三五日，然后出。”（卷第七·作秦州春酒曲法）

2. 黄衣（麦蘗）

指生长在整个麦粒上产生大量黄色孢子的霉菌群体。按现代微生物学观点来看，这里的黄衣似属于一类较纯、生长良好的黄曲霉群体。如：“七日，看黄衣色足，（曲）便出曝入，令干。”（卷第八·黄衣黄蒸及蘗第六十八）

3. 黄蒸

是指长在含麸面粉上产生大量孢子的霉菌群体，色黄。与黄衣相似，用作酱曲。

（二）有害的微生物群体

1. 乌肠

指曲因质量差或受潮后，在其中心部位孔的周围产生的呈黑褐色的不正常微生物群体，它往往是杂菌滋生的结果。

例，“穰盛者则曲乌肠，乌肠者，绕孔黑烂。”（卷第七·又造神曲法）

2. 白醭

指酒醅表面上长出一厚层白色杂菌，按现代观点来看，可能是野生酵母（包括白地霉）的污染。例：“（醋醅）发时数搅，不搅则生白醭，生白醭则不好。”（卷第八·作酢法第七十一）

在《天》中，对微生物群体（称“曲信”）的作用、它的生长条件、它的形态变化全过程等都有极详细的描述。这些内容至今仍不失其科学意义。例如，“凡酿酒，必资曲药成信。无曲，即佳米珍黍，空造不成。”“其曲一味，蓼身为气脉，而米麦为原料，但必用已成曲、酒糟为媒合。”为（曲蘖第十七卷·酒母）又如，“候视曲信入饭，久复微温，则信至矣。”凡曲饭入盘，每盘约载五升。其屋室宜高大，妨（防）瓦上暑气侵迫。室面宜向南，妨（防）西晒。一个时中，翻盘约三次。候视者七日之中，即坐卧盘架之下，眠不敢安，中宵数起。其初时雪白色，经一二日成至黑色，黑转褐，褐转代赭，赭转红，红极复转微黄。目击风中变幻，名曰‘生黄曲’。则其价与入物之力，皆倍于凡曲也。凡黑色转褐，褐转红，皆过水一度。红则不复入水。”（曲蘖第十七卷·丹曲）

二、早就认识到制曲、发酵与酿酒

（或制酱）间的联系

（1）“齐人喜当风颺去黄衣，此大谬：凡有所造作用麦麴（即黄衣）者，皆仰其衣为势，令反颺去之，作物必不

善矣。”（《齐》卷第八·黄衣黄蒸及蘖第六十八）这里已明确指出霉菌群体——“黄衣”是发酵制酱中“势”（即现代名词酶或生物催化剂之意）的来源，制曲时，决不能当风扬去。

（2）“浸曲三日，如鱼眼汤沸，酛米。”（《齐》卷第七·造神曲并酒第六十一）

（3）“曲势盛也，酛时宜加米……势弱酒厚者，须减米三斗。势盛不加，便为失候；势弱不减，刚强不消。加减之间必须存意。”（《齐》卷第七·笨曲并酒第六十六）

（4）“味足沸定为熟。气味虽正，沸未息者，曲势未尽，宜更酛之，不酛则酒味苦，薄矣。”（《齐》卷第七·又造神曲法）这里对微生物活动强弱的外观指标，形象化地称作“沸”。按现代微生物学观点来看，“沸”就是发酵液中微生物的大量生长而产生二氧化碳气泡的现象，这无疑是发酵的一个最重要的客观指标。当时已把沸、势、酛与酒味有机地联系了起来，亦即对微生物的发酵活动、酶的活力、反应底物的浓度和发酵产物的质量之间的关系有了相当深入的认识，这对于1,400多年前的古人来说，实在是难能可贵的。

（5）“酒冷沸止，米有不消者，便是曲势尽。”（《齐》卷第七·渍曲法）

三、对发酵过程中污染的原因及其防治措施的认识

在《齐》及《天》中，把杂菌的污染形象化地称为“动”

或“有咸气”，对正常发酵过程中的污染来源也有清楚的认识，认为不净的米、手指甲、脏手、不洁的河水与盛曲器具等都会引起污染，而且污染源只要有极少的量（“一毫滓秽”）即可引起重大事故。同时还提出用清洗手、剔净指甲或煮沸水甚至要煮沸五次即“五沸汤”等措施可有效地消除污染。这些都与现代的灭菌消毒的知识相吻合。有关实例很多，如：

（1）淘米必须极净。常洗手剔甲，勿令手有咸气，（有咸气）则令酒动，不得过夏。”（《齐》卷第七·笨曲并酒第六十六）

（2）“八月九月中作（颐酒）者，水未定，难调适，宜煎汤三、四沸，待冷然后浸曲，酒无不佳。”（《齐》卷第七·作颐酒法）

（3）“初冻后，尽年暮，水脉既定，收取则用；其春酒及余月，皆须煮水为五沸汤，待冷浸曲，不然则动。”（《齐》卷第七·河东神曲方）

（4）“凡造此物（指红曲），曲工盥手与洗净盘簪，皆令极洁。一毫滓秽，则败乃事也。”（《天》曲蘖第十七卷·丹曲）

从以上两本有关古籍的部分摘录中，就可看出我国古代人民在有效利用微生物生命活动并累积丰富经验的同时，还对有益微生物群体的生长特点、生长条件、它们与制曲、酿酒、制酱等的关系，以及如何防止和消灭有害微生物方面，都作了细致的观察和朴素的描述，特别是远在1,400多年前的贾思勰在《齐》中已明确指出微生物的群体——黄衣在酿造中的关键作用，提出酿造“皆仰其衣为势”的正确论断，更

为后世所敬仰。这说明有必要进一步发掘与整理更多的古籍遗产，以充分肯定我国人民在世界微生物学发展史上的重要地位。

参 考 文 献

- [1] [明] 宋应星著 (钟广言注释), 天工开物, 广东人民出版社, 1976。
- [2] [后魏] 贾思勰原著, 缪启愉校释, 缪桂龙参校, 齐民要术校释, 农业出版社, 1982。
- [3] 焦瑞身主编, 今日的微生物学, 复旦大学出版社, pp.22~58, 1987。

微生物的线形质粒

郑幼霞

(中国科学院上海植物生理研究所)

生物的遗传信息贮存在由两条核苷酸长链组成的 DNA 上。除了染色体DNA外,还有位于染色体以外的质粒DNA。以前的一些研究资料证明,不论是从真核或原核生物中发现的质粒DNA,其分子特征几乎全是共价闭环(covalent closed circular) DNA,即所谓CCC DNA,这已是人所共知并成为人们识别质粒DNA的主要特征之一。当人们从微生物细胞中把质粒DNA抽提出来时,质粒的CCC DNA因受到外力影响而产生一部分开环的(OC)和线状的构型。近年来,进一步揭示了质粒不一定全部都是CCC DNA,在某些微生物细胞中,事实上还同时存在天然的线形质粒,这是一个很有趣的发现。

早在80年代初就已经在微生物中鉴别出了一些线形质粒,它们的分子较小(5.4~17kb,一些很大的线形质粒在当时的技术条件下还不能把它们染色体DNA分别开来,特别是链霉菌中一些决定抗生素生物合成能力的质粒,虽经长期的努力,仍未能成功地把它分离出来,如天蓝色链霉菌(*Streptomyces coelicolor*)中的SCF1质粒(决定次甲基霉素生物合成及抗性)就是一个典型例子。到了1987年,有人采

用交变电场凝胶电泳技术 (orthogonal field alternation gel electrophoresis, OFAG) 终于证实在线霉菌中存在很大的线形质粒, 分子大小可达520kb, 约有染色体DNA的1/20, 并确证天蓝色链霉菌中决定次甲基霉素合成的全部基因由这种线形质粒所携带, 当它在细胞中以不同状态存在时, 其分子大小可随其存在的状态而异 (表1)。

表1 天蓝色链霉菌中的SCP1

菌 株	质粒状态	分子大小 (kb)
M138, M145	SCP1 ⁺	350
M124, M130	SCP1 ⁻	无质粒
A3 (2)	SCP1 ⁻ -SCP2	410~590
1984	SCP1 ⁻ -cysB	550

由表1可见, 线形的SCP1质粒DNA其分子大小为350 kb, 而且它常与环状质粒SCP2或染色体片段整合在一起成为整合体, 使SCP1'-SCP2 (整合数为2~8) 的分子大小落在410~590kb范围内, 而SCP1-cysB为550kb, 由此得知含cysB基因的染色体整合片段为200kb。这个结果显示了质粒分离技术上的突破, 以至第一次证明在原核生物中这种巨大线形质粒 (giant linear plasmid) 的存在, 并推测可能是链霉菌所具有的携带抗生素生物合成基因质粒的主要形式。

娄彻链霉菌 (*Streptomyces rochei*) 是兰卡杀菌素 (lankacidin) 的产生菌, 实验证明它带有两个线形质粒 pSAL1和pSAL2, 大小均为17kb。在对pSAL2的末端结构进行分析以后, 了解到它有一些特点: ①pSAL2基因组具

末端反向重复,而且在5'端有共价连接的末端蛋白。② pSAL2基因组和末端蛋白之间的连接是碱不稳定的,因之用碱处理可使5'-PO₄释放出来。③ pSAL2基因组含有3'-OH的平头末端。鉴于以上各点,可以想象,它的5'末端连接蛋白质并与DNA以共价方式

结合在一起从而把末端封锁了起来,用碱处理可以解除这种末端封锁而释放出5'-PO₄和3'-OH的平头末端。当末端封锁一经打开,人们就把pSAL2的完整末端克隆出来并测定了它们的顺序,发现有614bp的反向末端重复。按照这种特征,pSAL2的分子将具有类似球拍框架的形式(图1)。这是首次发现在微生物线形质粒DNA顺序中存在末端的重复,而这种通过蛋白质的作用使多条DNA链并列起来的结构可以在真核生物果蝇的唾液腺染色体中观察到。这也许是透露给我们一丝进化上的信息,提示链霉菌虽然属于革兰氏阳性的原核微生物,但在某些遗传特征上反映它更接近于真核生物。

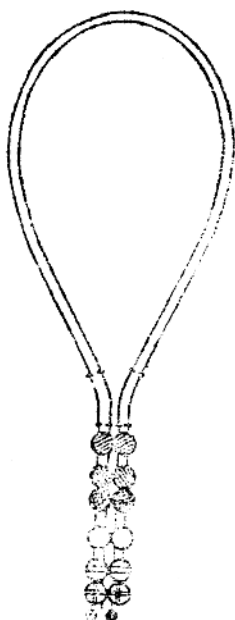


图1 球拍框架模型
●能启动DNA复制并具本身粘着特性的末端蛋白质;



能识别和连接特异DNA顺序并与之粘着在一起的蛋白质。

参 考 文 献

- [1] Horichika, I. *et al*, *EMBO J.* 3(4): 761, 1984.
- [2] Kinashi, H. *et al*. *Nature*, 328(30): 454, 1987.

遗传工程叩开了发酵工业的大门

雷肇祖

(上海市工业微生物研究所)

50年代初, Watson和Crick阐明了DNA的双螺旋结构。这一划时代的发现拉开了揭示生命的一大奥秘——遗传变异本质的帷幕, 从此, 一场生物学革命开始了。随着分子生物学、分子遗传学的发展, 人们对遗传物质——基因的化学本质、它在生物体内的重要作用、它的传递规律等等都有了深入的了解。到70年代初, 限制性核酸内切酶和连接酶以及作为基因载体的质粒等的相继发现和应用, 又把生命科学推到一个更新的高度, 为遗传工程(重组DNA技术)的建立和发展奠定了基础。

所谓遗传工程, 就是对DNA进行人工操作, 即把不同来源的DNA顺序结合在一起, 构建出自然界没有的新的DNA分子, 这一技术实际上就是基因拼接。人们可以把这样的基因组, 通过转化或转染等手段, 转移到受体生物中, 使之表达和扩增外来基因, 进而生产出人们所需要的产品, 如胰岛素、干扰素或人生长因子等。1986年, 美国食品和药物管理局(FDA)首先批准了抗乙型肝炎病毒的遗传工程疫苗的生产。同一年FDA又批准了借遗传工程方法生产的 α -干扰素的上市。从此, 一系列的遗传工程产品就陆续问世了。

遗传工程最初的对象微生物是大肠杆菌，因为人们对这种原核生物的遗传分析最为详尽，其遗传背景已大致搞清，并已绘制出相当详尽的基因图谱。作为基因的载体——质粒和 λ 噬菌体等已在大肠杆菌基因转移中得到广泛应用。但是，由于大肠杆菌在工业上的应用范围有限，而且会产生内毒素，故大大限制了它作为工程菌的价值。不过，作为遗传工程模式系统的大肠杆菌，实际上已为后来工业微生物的遗传工程研究及应用奠定了扎实的基础。

从自然界中选得的菌种，其代谢产物的产量一般不会很高，须通过诱变和筛选，筛出正变高产菌株。但诱变的方法随机性大，费时费力，因此，人们就自然而然地寄希望于遗传工程了。不过，这方面的困难也不少，首先是对大多数工业菌种的遗传背景并不清楚；其次是缺乏合适的基因转移体系或手段；第三，某些传统发酵产品（例如啤酒）的制造商不愿轻易更动其生产菌种的遗传背景。然而由于遗传工程的巨大潜力和分子生物学研究的飞速发展，时至今日，重组DNA技术已在发酵工业中得到了可喜的应用。

一、细 菌

非致病的棒杆菌是具有重要经济价值的工业微生物，用于制造各种L-氨基酸（如L-谷氨酸、L-赖氨酸等）和呈味核苷酸（如5'-肌苷酸等）。这类菌的生物合成途径、生物化学和酶学已经研究得较深入，但其基础分子生物学研究则起步还不久。主要原因是这类菌缺乏有效的基因转移系统。过去几年已陆续发现了不少可作为棒杆菌基因载体的质粒，如

乳糖发酵短杆菌 (*Brevibacterium lacto fermentum*) 的 pBL1 和谷氨酸棒杆菌 (*Corynebacterium glutamicum*) 的 pCG1 和 pSR1 等, 大小范围在 4kb 至大于 55kb, 大质粒拷贝数仅 1~2, 小质粒则可达 140。可是除少数质粒外, 大多数分离到的小质粒是隐蔽质粒, 因此构建克隆载体时要把选择标记引入质粒。通过氨基酸营养缺陷型互补的办法, 从棒杆菌的基因库中分离出氨基酸生物合成基因, 如编码预苯酸脱水酶的 *phe A* 基因, 该酶是棒杆菌芳香族氨基酸生物合成途径中催化预苯酸至苯丙酮酸反应的酶, 然后苯丙酮酸脱氨生成 L-苯丙氨酸。谷氨酸棒杆菌中的苯丙氨酸缺陷型都是由预苯酸脱水酶的失活所造成的。把带有编码预苯酸脱水酶的 *phe A* 基因的质粒转化到苯丙氨酸缺陷型中, 其预苯酸脱水酶活力与野生型相比增加了 4~5 倍。如果把同样的质粒转入野生型菌株, 则酶的相对比活力增加了 6 倍。这表明酶活力的增加只是基因剂量增加的结果。而且可以推断, 质粒基因的拷贝数相对于染色体是 5:1。另一个例子是遗传工程使大肠杆菌生产苏氨酸几乎增加了 5 倍, 达到 65g/L 的高水平。遗传上修饰的色氨酸合成酶使大肠杆菌生产色氨酸的浓度达到 78g/L, 并发生产品的沉淀。据一份资料的估计, 1986 年, 全世界氨基酸的产值高达 24 亿美元, 谷氨酸的年产量是 50 万 t, 赖氨酸为 5 万 t, 均为用微生物直接发酵法生产。因此, 遗传工程在氨基酸生产方面大有用武之地。

在细菌中, 对芽孢杆菌的遗传学也研究得较透彻。这类细菌具有一套有效的遗传传递系统, 对它们的遗传背景也了解得较多。这类菌中有不少成员是重要的工业菌种, 是公认的安全无害 (GRAS) 微生物, 并有长期发酵应用的历史。

发酵产品包括肌苷、鸟苷、细菌 α -淀粉酶以及碱性蛋白酶等。有人用枯草杆菌的遗传阻断突变型克隆出IMP脱氢酶，使之在枯草杆菌中表达，结果显著地提高了鸟苷的产量。菌株NA7821发酵后所产的鸟苷占总产苷量90%，但总产苷量较低。另一株菌（NA6128）能产大量嘌呤核苷，但大部分是

肌苷，同时，NA6128还保存高活力GMP合成酶，说明NA6128中鸟苷生产的限制速率反应是GMP生物合成途径的第一步反应，由IMP脱氢酶催化。因此，把NA7821的IMP脱氢酶基因转入NA6128，应有利于限制速率的第一步，从而提高鸟苷产量（图2）。

实验表明，转化子NA6128 (pBX 121) 的IMP脱氢酶活力比供体菌株的酶活力高2.2倍，鸟苷的产量增加了3倍，而肌苷产量则下降。若把高拷贝数载体的强启动子用于IMP脱氢酶的表达，估计还可进一步

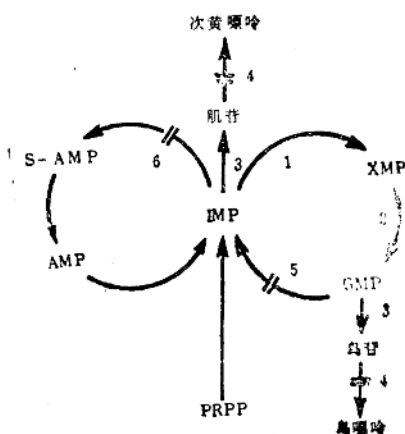


图2 枯草杆菌嘌呤核苷酸生物合成途径
PRPP, 磷酸核糖焦磷酸; IMP, 肌苷酸;
XMP, 黄苷酸; GMP, 鸟苷酸; S-AMP,
腺苷酸琥珀酸; AMP, 腺苷酸; 1, IMP
脱氢酶; 2, GMP合成酶; 3, 5-核苷酸酶;
4, 嘌呤核苷酸磷酸化酶; 5, GMP还原酶;
6, 腺苷酸琥珀酸 (S-AMP) 合成酶。