

长期战争岁月,他自己从壮年开始就身患重病。然而,那又是资本主义蓬勃发展的时期,生产对科学技术的需要和尊重知识尊重人才的优良传统是他成功的客观环境,但更重要的是巴斯德本人的天才和他的勤奋,而他勤奋的动力则来自对祖国和人类的热爱。

是巴斯德,首先利用他精确的实验和敏锐的观察把被发现了近200年的微生物作为科学研究的对象,同时建立了微生物研究的基本技术,从而奠定了微生物学的基础。巴斯德曾写道:“自然界中极小之物作用极大”。他通过对物质腐败和酒类变质原因的研究,对人类、畜禽和昆虫传染病病原及防治原理的研究,揭示了发酵过程和传染病的本质,开辟了人类驾驭微生物的宽广道路,为发酵工业、食品工业、畜牧业、养蚕业和医疗卫生事业的发展作出了不朽的贡献。和巴斯德同时代的著名英国生理学家赫胥黎曾说过,单是巴斯德作出的发现就足以抵偿法国在1870年付给德国的五十亿战争赔款。

机会只照顾有准备的头脑。巴斯德年轻时

受到过严格的化学知识和试验技能的培养,他用这些技能研究当时还远远不能进行定量研究的微生物,再加上他尊重实验结果,实事求是的科学态度,使他取得了别人难以取得的成就。他曾写道:“亲爱的合作者,永远保持你们最初的那股热情。但是,这种热情应永远服从于严格的试验和检验,永远不要提出无法用简单而有决定性的办法证明的论点。”正因为他得到的实验结果是那样确凿,所以巴斯德敢于推翻权威们的错误理论,给世人一个明确的答案。巴斯德推翻自然发生论的经典试验之所以至今仍然广泛地被用在教科书上,就是因为他所用的方法是“简单而有决定性的”。

巴斯德是一位赤诚的爱国者。他曾说过:“如果我离开处于忧患中的祖国去追求超越祖国所能提供的优厚物质享受,那末我觉得自己应该受到罪同逃兵那样的惩罚。”他又说过:“虽然科学不分国界,科学家却应该记住,要尽一切力量为祖国争光,在每一个伟大的科学家身上都可以同时看到他是一个伟大的爱国者。”

纪念巴斯德逝世一百周年 ——浅谈巴斯德理论与现代微生物学

相 阳

(中国科学院微生物研究所,北京 100080)

在这21世纪即将来临的世纪之交,我们纪念法国杰出的科学家路易斯·巴斯德 Louis Pasteur (1822. 12. 27—1895. 9. 28) 逝世一百周年,回顾他对微生物学的发展作出的伟大贡献,探索虽经百余沧桑考验,并没有变得过时与陈旧的那些发现与观察结果,反倒越来越显出巨大生命力的内涵,将具有重要的理论和实践意义。

1 发酵和生物工程

糖变成酒,酒再变酸。究竟是自然发生,还

是由微生物发酵引起的。这个问题争论已久。1857年8月巴斯德向里尔科学协会呈上自己的“关于乳酸发酵的记录”一文,同年12月又向科学院送交题为“酒精发酵”的论文。在这著名的论文中,阐述了糖分解为酒精和碳酸气两种物质与生命现象有关的结论。这样巴斯德就接过了与自然发生说进行论战的旗帜。经过四、五年的辛勤工作,1864年6月在科学研究院组织的演讲会上,自然发生说者终于就范。而到了1866年11月巴斯德在奥尔良关于“酒再变酸”

的演讲之后,自然发生说者便全线败北了。

概括起来,巴斯德为微生物发酵奠定了这样一些基础技术:

1857年首次提到某些细菌在酸性培养基中生长最好,而有些细菌在碱性培养基中生长旺盛,若改变培养基的酸碱性就可能选择到所需要的微生物,或者抑制要剔除的微生物。显然这是pH值在培养基配制中重要性的最初认识。

1860年,他发表了自己设计的适宜细菌生长的第一种半合成培养基。其中含有铵盐、酵母粉和蔗糖;但因为液体,所以在获得纯培养时遇到了很多难题。

厌氧微生物由巴斯德重新发现,并第一次涉及了兼性厌氧菌。

巴斯德创立了培养基和玻璃器皿的灭菌方法,并且建立了稀释和继代培养的无菌技术。

在证实自然发生是否可能的试验中,巴斯德证明灭菌时湿热比干热的效率高得多,并证明将尿在加压下加热到115—120℃时,可以达到灭菌目的。这就是现今我们惯用培养基灭菌温度的依据。

在1866年的一本著作中,提出了把葡萄酒加热到68℃并保持10min,然后迅速冷却的防止葡萄酒变酸的方法。这技术成为有名的“巴斯德灭菌法”。现在仍广泛地应用于乳制品等的消毒,以杀灭活的结核菌、布鲁氏菌和其它致病菌。

巴斯德当初提出“用化学定量的培养基来培养微生物,其结果是什么样的微生物就会导致什么样的发酵。”这套理论至今人们还在广泛使用。巴斯德还表明,酵母菌在含糖培养基上进行有氧代谢时,能产生高于无氧条件下20倍之多的细胞物质。证实在有氧条件下发酵会被抑制,这是第一个代谢调控的模式系统。

现在,遍布世界各地的各种类型的发酵工厂和形形色色的生物工程公司,廉价地大规模地生产各种微生物产品(有些产品还能创造二次价值,例如酶制剂),无一不是根据巴斯德当初的科学发现建立起来的。举个例子:500kg

的酵母菌,在24h内可提供50000kg蛋白质;而一头重500kg的牛,在同样的时间内只能提供0.5kg的蛋白质。这说明微生物合成蛋白质的速度比其它动物快10万倍。可见这是一项附加值极高的技术。现在全世界微生物产业的年产值可达2000亿美元。难怪当初巴斯德精辟地指出:“总的原理已经发现,人们不能不相信未来是充满巨大希望的。”所以他被誉为:“发酵学之父”是当之无愧的。

2 从病原微生物到医药工业

巴斯德曾经指出:“传染病、接触性传染病和感染性传染病的原因,本质上全在于有微小生物的存在。”不言而喻,疾病是病原微生物引发的。

巴斯德之所以有这样的精辟论断,是以他化学方面的高深造诣并通过研究发酵实质和在有关自然发生说论战的实践中,摸索升华出来的。巴斯德曾将上述理论应用于蚕病,炭疽病和鸡霍乱等病原的寻找与防治上,获得了巨大成功,挽救了法国乃至整个欧洲的即将全部覆灭的养蚕业和养殖业。英国外科医生李斯特(Lister)将巴斯德的理论应用于外科手术创伤治疗上,获得了成功。这些做法改革了外科学,也避免了产褥热的继续蔓延,从而形成了现代外科消毒学,构成了预防医学史上最光辉的一页。

1877年,巴斯德和朱伯特(Joubert)发表了一篇论文,报道他们在炭疽芽孢杆菌培养物感染动物的观察。这种培养物若被腐生细菌污染不会使动物发病。他们指出:“从治疗的观点出发,这些事实可能带来极大的希望”。这一预言被忽略了一百多年,直到20世纪初弗莱明(Fleming)发现青霉菌的分泌物能抑制病原微生物生长的医用价值才被证实。随后,人们又陆续发现了很多新抗生素,直至现在又出现了半合成抗生素和杂种抗生素,总数超过万余种。

从生物学实验室得到的科研成果跻身于工业之林,是从本世纪40年代中期开始的。加上生产工艺不断完善,又引入一系列新技术,新方法,就青霉素而言,现今每升培养液产量已超过

20g, 产率也比当初提高了10000倍。而1990年全世界20种畅销药物中有4种是微生物产品, 占总销售额的15%, 接近30亿美元。其中从膨胀弯颈霉(*Tolypocladium inflatum*)制取到环孢素A(cyclosporin A), 不仅能治疗慢性炎症, 干扰淋巴细胞T, 而且还可以用作免疫抑制剂, 提高了人体器官移植手术的成活率。这一项微生物产品获得了1990年诺贝尔医学和生理学奖。可见抗生素工业是微生物应用中最成功的实例。与此同时, 医药工业领域利用微生物有益的一面, 生产甾体药物、有机酸、维生素、氨基酸和酶制剂等也有了飞跃的发展。

1944年, 美国医生埃弗里(Avery)通过肺炎球菌的研究, 首次发现并证实DNA是遗传因子, 不是别的任何物质, 从此打开了分子生物学的大门, 这一突破性的发现, 使沃森(Watson)和克里克(Crick)相继发现了DNA的双螺旋体的结构及其复制方式。由此引发出来的1973年重组DNA技术进一步发展了巴斯德的事业, 为大量制造在工、农、医各行各业有广泛用途的异源蛋白质铺平了道路, 其中如胰岛素、人生长激素、干扰素、单克隆抗体等。预计到2000年, 全世界市场规模可达240亿美元。医药工业也由此跨上了一个崭新的台阶。

3 从免疫疫苗到糖基工程

1880年巴斯德在研究炭疽病和鸡霍乱病理学后, 宣布了两项巨大的进展, 一项是两次传代培养之间的时间间隔的长短, 直接影响减毒程度的大小; 另一项是用减毒的病毒接种, 鸡则可产生全毒力的抵抗力。巴斯德把鸡霍乱的减毒菌株称为疫苗。这个名称一直沿用至今。1881年巴斯德通过实验, 培养了没有荚膜的炭疽菌, 奠定了最早炭疽疫苗的基础。

1884年, 巴斯德开始了狂犬病的经典研究工作。他利用上述研究基础, 掌握了减毒的一般原则, 于1885年发明了抗狂犬病疫苗, 并首次予以使用。这种方法使遭受狂犬咬过的动物能对这种毒力得到中和和产生免疫, 效力高超而方法简易。这样就为预防医学和免疫学的诞生起到了开拓性的作用。为了进一步研究狂犬

病等疾病的防治, 1888年在巴黎创建了巴斯德研究所。不久俄国梅契尼科夫(Mechnikov)提出免疫力是来自细胞而不是体液。德国欧利希(Ehrlich)提出涉及免疫学现象的“侧链”或“受体”理论。他们俩人分享了1908年的诺贝尔医学和生理学奖。

嗣后, 科学家们又发现大多数微生物都能产生血清学上有特异性的可溶性物质, 唯有碳水化合物是与抗原特异性相关。这些碳水化合物是由两个或两个以上的不同糖链组成的碳水化合物复合物。这种糖链由于其性质, 分子构型以及糖苷链联接位置等空间构型各异而显示出具有不同的免疫特异性。

随着研究的深入, 人们发现细胞表面有一些象接收天线般的糖链, 即细胞受体, 它是挂在埋入胞膜内的有着重要生理功能的糖蛋白上; 外源物质作用于细胞, 首先接触到的就是这些糖链, 它们在细胞之间起着信息传递、识别, 调节生物体内机能的作用。病变的糖链与正常的糖链是有区别的, 故而据此可以诊断疾病, 调节体内的免疫机能。

研究糖链的上述功能, 并进行控制糖链合成与分解, 以期加以有效地利用。这样不仅有助于弄清疾病, 特别是癌症的发病机理, 并予以治疗和预防; 还将为设计新药、人工脏器、开发功能性食品等开辟新途径。糖链虽然不直接受基因调控, 但由于基因调控酶, 受作用的酶可再生产特定用途的碳水化合物; 后者也便成为基因的二次产物了。一种名为“唾液酰(Lewi X)”的商品实际是由四糖构成的寡糖分子, 每公斤价值30亿美元。现在采用酶法生产, 用高度特异性的唾液酰糖基转移酶, 从活化单糖一步步合成新型糖链, 成本会大大降低。有资料表明, 未来的新型超级抗原是糖质, 而不是蛋白质构成的。这就是当今生物学研究领域中新热点——糖工程又叫糖基工程。

4 结语

巴斯德是位科学家也是一位普通的人, 这两者在成长过程中密不可分, 感情和才智共同

(下转第279页)

发酵成苹果酸。

直接发酵法的另一要求是发酵液中杂酸的含量应尽可能低,这不仅直接关系到L-苹果酸的转化率,而且对后提取产品的纯度有较大的影响。经过对发酵液的多次高压液相色谱分析,在总酸中,苹果酸含量在69.41%—74.41%之间,平均72.07%(九批平均值)。杂酸中最多的可能是柠檬酸,最高时可达总酸的21.0%。为使杂酸含量尽可能降低,除了在菌种筛选方面要做必要的工作外,也应控制发酵条件。其中培养基中的无机离子的种类和含量对于杂酸的控制,可能有较大的影响,但这方面的工作仍

需进一步考察。

参 考 文 献

- [1] Abe S, Furuya A, Saito T, *et al.* Methods of producing L-malic acid by fermentation, U. S. Patent: 3, 063, 910, 1962.
- [2] Fabrizio F G, Antonio F, Pietrino D, *et al.* Applied Microbiol Biotechnol, 1984, 19: 427—429.
- [3] Emil B, Yoav P, Amir B, *et al.* Biotech and bioeng, 1991, 37: 1108—1116.
- [4] Saisamorn Lumyong, Atsushi Yokota, Fusao Tomita, 日本农芸化学会年会大会讲演要旨, 1992, 66(3): 381.
- [5] 金其荣, 张继民, 魏伟, 等. 无锡轻工业学院学报, 1982年创刊号, 89.

USING SWEET POTATO POWDER HYDROLYSATE FOR DIRECT FERMENTATION OF L-MALIC ACID BY *ASPERGILLUS FLAVUS*

Jin Qirong Xu Ganrong Bao Huiyan Wu Yanping

(Department of Biotechnology, Wuxi Institute of Light Industry, Wuxi 214036)

Abstract A strain of *Aspergillus flavus* TH5007 producing L-malic acid was isolated and selected after a series of subsequent mutation. Various fermentation conditions were studied to obtain process optimization, characterized by the direct fermentation with the hydrolysate from sweet potato powder. The concentration of L-malic acid in the fermented broth can reached to about 6.0%. Among the total acids in the fermentation broth, The content of malic acid amounts to above 72%. Citric acid predominated in the other organic acids than malic acid. The content of fumaric acid can be controlled below 0.02%. Production of L-malic acid with the fed-batch process is better than that with the batch process.

Key words L-Malic acid, Direct fermentation process, *Aspergillus flavus*, Sweet potato

(上接第262页)

支配着他的一生。他那创造性的想象力和对事实进行严谨观察后的洞察力,使他推翻了许多陈腐的错误观念,为多门现代科学奠定了基础。巴斯德曾对自己成功的原因作过高度的概括:“是靠了辛勤的劳动,并无特殊的天赋。只是靠

了不屈不挠的努力和对伟大而美好的事物的憧憬。”我国的科学工作者,将根据自己的实际情况,发扬巴斯德的精神,在巴斯德开创的微生物和生命科学中不断创新,为人类福利作出更多贡献。