

绮丽刺毛霉的一种新型甘氨酸氨肽酶的研究

马晓航* 孙桂芹 赵宇华 贾小明

(浙江大学生命科学学院 杭州 310029)

摘 要 研究了产自于绮丽刺毛霉(*Actinomucor elegans*)的一种甘氨酸氨肽酶。分子筛层析表明该酶的天然分子的分子量为 320kD, SDS-PAGE 分析表明蛋白质的亚基分子量为 56.5kD。该酶水解含有甘氨酸残基的底物(如 glycine-naphthylamine)的效率要较其它氨基酸残基高得多。该酶的最佳反应温度为 30℃, 最佳 pH 为 8.0。酶的 K_m 和 K_{cat} 值分别为 0.24mmol/L 与 100.8 s^{-1} 。1.0mmol/L Zn^{2+} , Cu^{2+} 和 Cd^{2+} 可完全抑制该酶的活性。作用于酶巯基的化学物质对酶活性都有抑制作用。根据络合剂反应的实验结果表明该酶是一种含有金属的酶。当与蛋白酶共同作用时该酶除了甘氨酸外还能提高脯氨酸、精氨酸及谷氨酸的水解率。

关键词 肽酶, 甘氨酸

中图分类号 Q814.4 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2004)04-0578-06

在自然界, 肽酶广泛存在于微生物中。它们在微生物分解蛋白质生成氨基酸及利用各种短肽为营养的代谢过程中起着至关重要的作用。

微生物所产生的肽酶可根据其基质谱分成两大类。其中一些肽酶(如肽酶 A、B、N、D)具有较宽的基质谱, 能分解多种底物。而另一些则只能分解一些特殊的肽类。例如肽酶 P 和 E, 它们分别只能降解含有脯氨酸和天冬氨酸残基的肽类^[1-3]。

在应用领域, 肽酶在食品工业中有重要的用途。在奶酪的生产过程中以乳酸菌作为发酵的接种物。由乳酸菌所产生的肽酶在分解酪蛋白生成短肽和氨基酸的过程中起着重要的作用^[4-8]。此外, 奶酪所特有的风味的形成也和肽酶的作用有关。为了更好地控制发酵过程, 人们对乳酸菌所产生的许多肽酶已进行了详细的研究^[9-12]。

绮丽刺毛霉是一种能产生蛋白质水解酶系的微生物。在我国人们利用该菌对豆制品进行发酵生产腐乳。在发酵过程中绮丽刺毛霉所产生的肽酶参与了水解肽类形成氨基酸过程, 它们的存在与腐乳的特殊风味的形成有关。由于该菌可产生多种蛋白水解酶类, 并通过长期的应用已经证明该菌及其代谢产物是安全可靠的, 因而可为现代生物工程提供各种食品级酶, 具有良好的应用前景。但目前为止

人们对这些肽酶的性质了解还非常之少。

本研究中从一株绮丽刺毛霉分离纯化了一种甘氨酸氨肽酶(glycine amino peptidase, GAP), 并对其特性及在生物工程中的潜在用途进行了研究。

1 材料和方法

1.1 微生物和培养条件

绮丽刺毛霉 IF06408 的菌种培养于马铃薯蔗糖培养基上。进行产酶发酵时培养基组成为: 棉籽蛋白 2.0%, 大豆蛋白 0.5%, 葡萄糖 0.5%, NaCl 0.3%, K_2HPO_4 0.1%, CaCO_3 0.2%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5%。

进行产甘氨酸氨肽酶发酵时, 绮丽刺毛霉先于马铃薯蔗糖培养基上活化, 然后接种于装有 30mL 产酶培养基的三角瓶中于 24℃ 培养 4d, 再将其转接至装有 3L 产酶培养基的 5L 发酵罐中进行培养, 培养时通气量为每分钟 1~1.5L。培养 4d 后, 过滤, 收集菌体, 用于酶纯化。

1.2 GAP 的纯化

酶的纯化在 4℃ 进行。收集的菌丝体用相同体积的 20mmol/L pH 8.0 的 Tris-HCl 缓冲溶液悬浮后用匀浆器处理 5min 破碎细胞。处理后的液体于 10 000 r/min 离心 10min。上清中(含有绝大部分的

GAP)用含有 10% 甘油的上述缓冲溶液进行透析。得到的粗酶依次用 Toyopearl HW65C 柱、DEAE-Toyopearl 柱和 Superdex 200HR 柱进行纯化。

1.3 酶活测定

于 0.8mL Tris-HCl 缓冲溶液(pH8.0 , 20mmol/L) 中加入 0.1mL 3mmol/L 的 glycine-β-naphthylamine (Gly-β-NA)溶液 在 37℃保温 3min 后加入 0.1mL 酶液 ,于 37℃再保温 10min 后加入含有 1mg/mL Fast Garnet GBC 和 10% Triton X-100 的 1mol/L pH4.0 乙酸盐缓冲溶液终止反应。反应液于 37℃放置25min 后测定 550nm 的 OD 值。酶活定义为 :在以上条件下每分钟水解 1.0μmol Gly-β-NA 的酶量为一个单位。

1.4 酶性质研究

提纯后的酶于不同的温度和 pH 条件下测定其活性 ,以确定其最佳反应条件 ;分别在酶液中加入 1.0mmol/L 的金属盐或 0.1 ~ 1.0mmol/L 的酶抑制剂 ,于 25℃处理 30min ,再于含有相同浓度化学物质的反应体系中测定酶活力 ,以确定各种化学物质对酶活力的影响。

2 结果

2.1 GAP 的纯化

接种后培养 4d ,分别测定菌丝体中和发酵液上清中的 GAP 活性。结果显示 ,约 95% 以上的酶活存在于细胞中。因此确定该酶是一种胞内酶。菌丝体收集后用于进行酶的纯化。

在 3L 发酵液中共得到湿菌丝体 590g。在收集的菌丝体中加入 590mL Tris-HCl 缓冲溶液 ,悬浮后用匀浆器将细胞破碎。然后于 10 000 r/min 离心 10min 去除细胞碎片。收集的上清用含有 10% 甘油的 Tris-HCl(20mmol/L , pH8.0)透析。透析后的粗酶液用于进一步纯化。

于粗酶液中加入固体硫酸铵至 50% 饱和度 , 10 000 r/min 离心 10min 去除沉淀。测定结果表明 GAP 酶活主要存在于上清中。将得到的上清上柱于一预先用含 50% 硫酸铵的 Tris-HCl 缓冲溶液(20 mmol/L , pH 8.0)平衡后的 Toyopearl HW 65C 疏水层析柱。然后用含 50% ~ 0% 硫酸铵的缓冲溶液进行酶的梯度洗脱。洗脱液中酶活性存在于第 45 ~ 60 管中(图 1)。收集第 52 ~ 56 管 ,合并后用 10mmol/L Tris-HCl 缓冲溶液(pH 8.0)透析 ,然后上预先以同缓冲溶液平衡后的 DEAE-Toropearl 离子交换柱。之后以含有 0 ~ 1.0 mol/L NaCl 的同缓冲液洗脱(图 2) ,

收集洗脱液第 56 ~ 62 管 ,用超滤法浓缩后得到的酶液用 Superdex 200HR 10/30 柱进行分离纯化。酶上柱后用含 0.1mol/L NaCl 的 Tris-HCL 缓冲液洗脱 , GAP 酶活存在于洗脱液的第 18 ~ 23 管中(图 3) ,收集 19、20、21 管作为纯酶用于进一步的研究。在此过程中酶纯化了 592 倍。纯化后的酶活为 14.2u/mg 蛋白。纯化步骤及结果列于表 1 中。

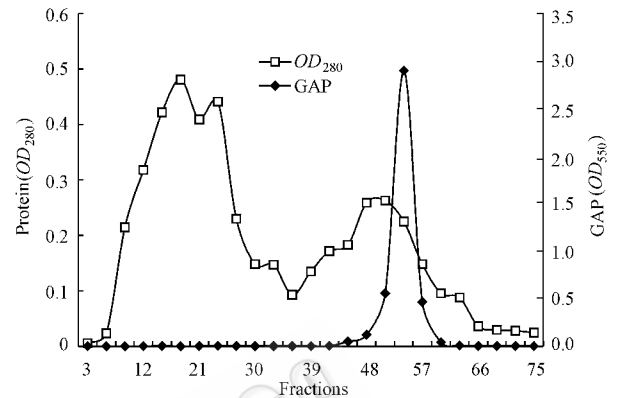


图 1 用 Toyopearl HW 65-C 疏水层析分离 GAP 时的洗脱结果

Fig. 1 The results of chromatographic purification of Toyopearl HW 65-C column

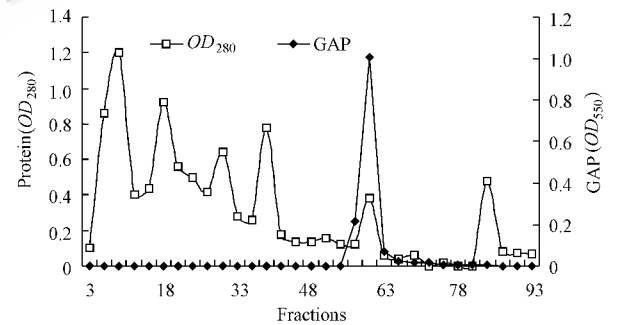


图 2 用 DEAE Toyopearl 离子交换层析分离 GAP 时的洗脱结果

Fig. 2 The results of chromatographic purification of DEAE Toyopearl column

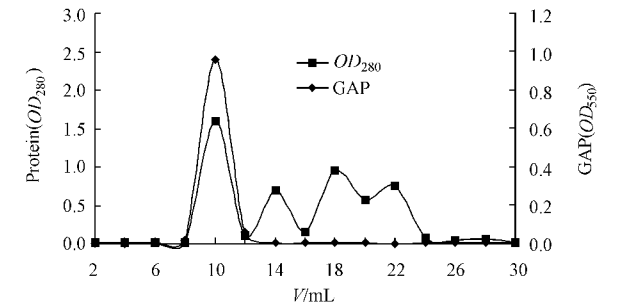


图 3 用 Superdex 200HR 10/30 分子筛层析分离 GAP 时的洗脱结果

Fig. 3 The results of chromatographic purification of a Superdex 200HR 10/30 column

表 1 GAP 纯化的主要步骤及结果

Table 1 The processes and results of purification of GAP

Steps	Total enzyme activities/u	Protein/mg	Specific activities(u/mg)	Yield/ %	Purification fold
Crude enzyme	600	25000	0.024	100	1.0
Toyopearl HW65C	160.4	329	0.49	26.7	19.6
DEAE-Toyopearl	39.4	10	3.94	6.6	158
Superdex 200 HR	19.9	1.4	14.2	3.3	592

2.2 GAP 的分子量

纯化后的酶经 SDS-PAGE 电泳显色后在凝胶上只观察到一条蛋白质条带 ,通过与标准蛋白质比较 ,GAP 的亚基分子量为 56.5kD (图 4)。

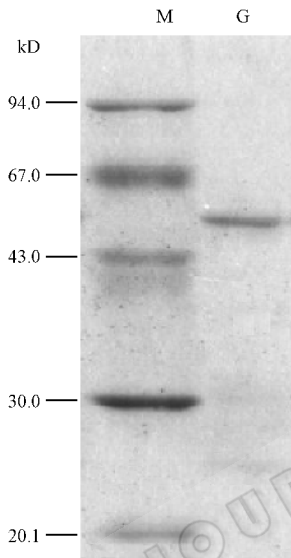


图 4 纯化后的 GAP 的 SDS-PAGE 结果

Fig. 4 The results of SDS polyacrylamide gel electrophoresis of purified GAP

M : standard protein markers ; G : GAP

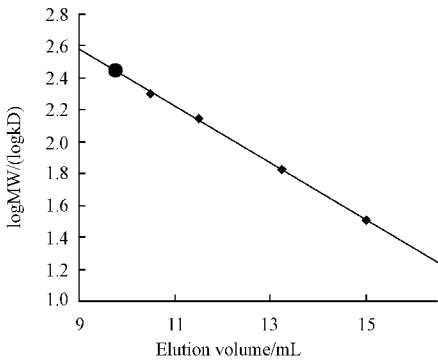


图 5 用凝胶过滤法测定的 GAP 天然酶的分子量

Fig.5 The native molecular mass of GAP estimated by gel filtration

Four protein markers were used : aminopeptidase P from *E. coli* , 200kD ; alcohol dehydrogenase from yeast , 140kD ; bovine serum albumin , 67kD ; and proline iminopeptidase from *B. coagulans* , 32 kD

为确定天然酶分子的分子量 ,纯化后的酶与标准蛋白混合后 ,上 Superdex 200HR 10/30 柱 ,然后用含 0.1mol/L NaCl 的 20mmol/L Tris-HCl (pH8.0)洗脱 ,结果显示 GAP 的天然分子量约为 320kD (图 5)。

2.3 pH 和温度对 GAP 活性的影响

用 40mmol/L pH 4.0 ~ 11.0 的缓冲液对酶进行稀释 ,测定其活性。结果显示酶活性在 pH 8.0 时最高。如以该点的酶活性为 100% ,在 pH 6.0 和 10.0 时活性为 40%左右 (图 6)。

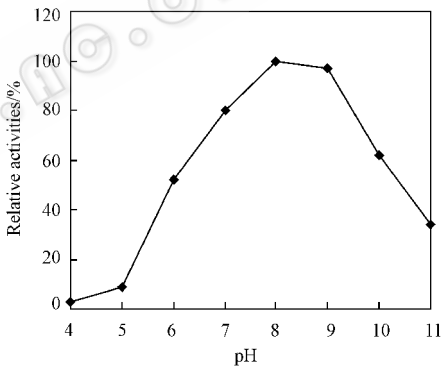


图 6 pH 对 GAP 活性的影响

Fig. 6 The effect of pH on the activity of GAP

在 20 ~ 60℃ 的范围内 ,于不同的温度条件下测定 GAP 的酶活 ,结果如图 7 所示 ,在 30℃ 时酶的活性最高 ,当温度高于 30℃ 时活性迅速降低 ,在 50℃ 时活性只有 30℃ 的 10%左右 (图 7)。

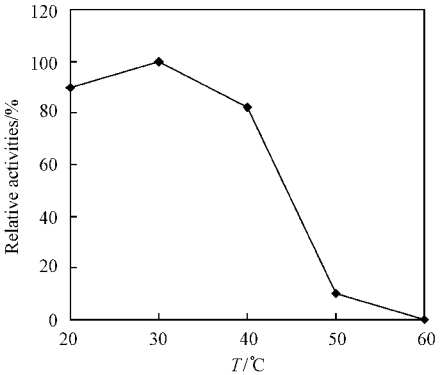


图 7 温度对 GAP 活性的影响

Fig. 7 The effect of temperature on the activity of GAP
© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

2.4 GAP底物的特异性

用了12种不同底物考察了GAP的底物特异性(表2)。结果显示GAP除了Gly-β-NA之外还能水解Ala-β-naphthylamine (Ala-β-NA), Met-β-naphthylamine (Met-β-NA), Leu-β-naphthylamine (Leu-β-NA) 及Ser-β-naphthylamine (Ser-β-NA),根据酶解速率进行比较,在以上这些基质中Gly-β-NA是GAP的最佳底物。结果还显示GAP对其它的基质如Trp-β-naphthylamine, Pyr-β-naphthylamine, Pro-β-naphthylamine, Asp-β-naphthylamine, Lys-β-naphthylamine 及Val-β-naphthylamine 无水解能力。

表2 GAP底物特性的试验结果

Table 2 Substrate specificity of the GAP		
Substrates	Activities/u	Relative activities/%
Gly-βNA	14.35	100
Ala-βNA	2.60	18.1
Met-βNA	0.91	6.3
Leu-βNA	0.37	2.6
Ser-βNA	0.50	3.5
Arg-βNA	0.90	6.3

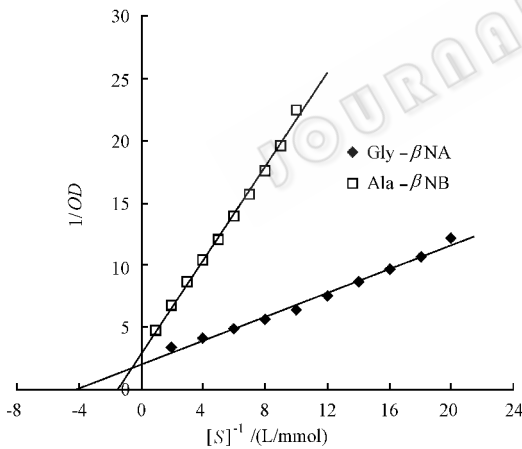


图8 GAP以gly-βNA和ala-βNA为底物时的双倒数曲线

Fig. 8 The linevear-burk plots of GAP for gly-βNA and ala-βNA

2.5 酶抑制剂及二价阳离子对GAP活性的影响

考察了各种抑制剂对该酶活性的影响。结果如表3所示,丝氨酸酶抑制剂diisopropyl flourophosphate (DFP)对该酶无抑制作用,而巯基蛋白酶抑制剂如P-chloromercuri-benzoicacid (PCMB)和碘乙酸 iodoaceticacid)则能对该酶产生明显的抑制作用。不同的络合剂对该酶的作用有所不同:EDTA对酶活性无抑制作用,而强络合剂邻菲罗啉对酶活有明显的抑制

作用。二价阳离子实验结果显示Mg²⁺和Ca²⁺对酶活性无不利影响,而Zn²⁺、Cu²⁺、Cd²⁺对酶活性的抑制作用最强,几乎抑制了全部酶活。Fe²⁺、Co²⁺、Ni²⁺和Mn²⁺对酶活的抑制作用中等,抑制了酶活的20%~80%左右。

表3 各种酶抑制剂及二价阳离子对GAP的作用

Table 3 The effect of inhibitors and divalent cations on GAP		
Inhibitors or divalent cations	Concentrations/(mmol/L)	Relative activities/%
Blank	0.0	100
DFP	1.0	103.3
Iodoacetic acid	1.0	41.7
PCMB	0.1	12.5
o-phenanthrolin	1.0	5.9
EDTA	1.0	113.5
Cd ²⁺	1.0	0
Ni ²⁺	1.0	18.5
Zn ²⁺	1.0	1.3
Fe ²⁺	1.0	61.9
Cu ²⁺	1.0	0.3
Mn ²⁺	1.0	80.1
Co ²⁺	1.0	58.0
Mg ²⁺	1.0	100.1
Ca ²⁺	1.0	101.1

2.6 GAP的催化动力学参数

根据该酶以Gly-β-NA及Ala-β-NA为底物反应时测定的双倒数曲线的斜率及截距计算出了该酶水解以上两种底物时的催化动力学常数。结果显示(图8,表4)该酶以Gly-β-NA及Ala-β-NA为底物时的K_m常数分别为0.24mmol/L和0.66mmol/L。这一结果显示该酶对Gly-β-NA的亲合力大于对Ala-β-NA的亲合力。但是Gly-β-NA在较高浓度的情况下(高于2mmol/L)可以观察到底物的抑制作用。在20mmol/L时酶活只有2mmol/L的50%左右。而Ala-β-NA为底物时没有发现这一现象。

表4 GAP以gly-βNA及ala-βNA为底物时酶的动力学常数

Table 4 The catalytic parameters of GAP for the gly-βNA and ala-βNA			
Substrates	K _m (mmol/L)	K _{cat} (1/s) (K _{cat} /K _m)(L/s·mmol)	
Gly-NA	0.24	100.8	420
Ala-NA	0.66	13.0	19.7

2.7 GAP对蛋白质酶解的促进作用

于2%的明胶溶液中加入0.5%蛋白酶与0.5mL GAP 50℃保温18h,测定水解生成的氨基酸。

GAP 能明显地促进蛋白酶的水解作用。与不含 GAP 的对照相比 ,GAP 的加入使生成的氨基酸总量提高了 13%。进一步分别测定各氨基酸的浓度表明 GAP 并不是对所有的氨基酸的水解都有相同的促进作用。水解液中的甘氨酸、脯氨酸、丙氨酸、精氨酸和谷氨酸的生成量有较大幅度的增加(表 5)。

表 5 GAP 对蛋白质水解产生氨基酸的促进作用
Table 5 The effect of glycine aminopeptidase on improvement releasing amino acids from protein

Amino acids	Concentration(mg/L)		Improved rate/%
	No GAP	0.5u/mL of GAP	
Gly	31.0	39.8	28.3
Pro	8.4	24.4	190
Glu	31.0	35.7	15.2
Ala	61.6	80.6	30.8
Arg	80.6	95.9	19.0

3 讨论

生物体内的 20 种氨基酸中甘氨酸是唯一的无手性碳原子的氨基酸 ,因而水解末端含甘氨酸残基多肽的酶有可能与其它的肽酶有所不同。迄今为止 ,所发现的肽酶对甘氨酸的水解效率一般都较低^[1,2,8-12]。本文首次报道了从绮丽刺毛霉中分离纯化了一种甘氨酸氨肽酶 ,该酶水解含有甘氨酸基团的速率高于其它氨基酸基团。这一点与现已报道的其它肽酶有明显的差异。考虑到除了 Gly-β-NA 之外 Ala-β-NA 是其最佳底物 ,在试验中比较了两种底物的 Km ,Kcat 和 Kcat/Km 值。结果显示与 Ala-β-NA 相比 Gly-β-NA 具有低的 Km 和高的 Kcat ,其 Kcat/Km 值是 Ala-β-NA 的 21.3 倍。这些结果显示 ,对 GAP 来说 Gly-β-NA 是其最佳底物。

在食品工业发展的早期 ,食品加工的过程中引进了化学方法对蛋白质进行水解 ,替代传统的酿造方法 ,以提高生产效率、降低生产成本(如酱油的生产) ,但今后随着社会的发展人们在选食品时会更加偏爱用传统方法酿造的食品。然而以传统方法进行食品的发酵生产 ,生产周期太长、生产成本太高是一个致命的弱点。为解决这一问题 ,用现代生物化学方法对传统的发酵工艺进行改造是一个可以选择的方案。本研究的目的是从传统食品发酵微生物中分离能水解蛋白的酶类 ,研究在食品加工过程中酶法蛋白质水解的可能性。实验结果表明 ,该酶的各种

反应特性都适合于食品加工的要求。由于目前已知的多数肽酶对 Gly-X 键的水解能力都很差 ,蛋白质的酶法水解过程中氨基末端甘氨酸残基的去除是主要的限速步骤。在本实验中加入 GAP 能明显促进蛋白质水解的效率。分析各氨基酸浓度发现 ,水解液中所提高的氨基酸种类和浓度与 GAP 的底物水解特性并不完全一致。例如 GAP 对脯氨酸残基并无水解活性 ,但在混合反应液中却能极大地促进蛋白酶对其水解作用。这也说明甘氨酸残基的存在可抑制其它氨基酸的水解。本研究结果还表明在蛋白质水解过程中采用多个不同底物特异性的酶可以提高处理工艺的效率。

SDS-PAGE 分析表明该酶蛋白质亚基分子量为 56.5kD ,分子筛层析表明该酶的天然分子的分子量为 320kD ,这说明该酶是由 6 个亚基所组成的寡聚酶。丝氨酸酶抑制剂 DFP 对该酶活性无抑制作用。表明在该酶的活性中心不存在丝氨酸残基。而 GAP 酶活不能被 EDTA 所抑制 ,但却能被有强络合能力的邻菲啰啉所抑制 ,这一现象说明该酶结合有金属离子 ,并结合的很紧密 ,不易被分离。实验结果还表明金属离子对 GAP 的抑制强度与它们所形成的硫化物的溶解度有关 ,Mg²⁺ 和 Ca²⁺ 不能形成硫化物 ,因而对酶活无抑制作用 ,而其它阳离子则能与 H₂S 反应生成不溶性的硫化物 ,对酶活产生强烈的抑制。这一现象表明这些阳离子对酶所产生的抑制作用很可能是通过与酶活中心或附近的巯基反应所造成的。巯基蛋白酶抑制剂 PCMB 和碘乙酸对酶的抑制实验结果也支持以上推测。

REFERENCES(参考文献)

[1] Yen C , Green L , Miller CG. Peptides accumulation during growth of peptidase deficient mutants. *J Mol Biol* , 1980 , **143** : 35 - 48
[2] Yen C , Green L , Miller CG. Degradation of intracellular protein in *Salmonella enterica* peptidase mutants. *J Mol Biol* , 1980 , **143** : 21 - 33
[3] Mathew Z , Knox TM , Miller CG. *Salmonella serovar* Typhimurium peptidase B is a leucyl aminopeptidas with specificity for acidic amino acid. *J Bacteriol* , 2000 , **182** (12) : 3383 - 3393
[4] Mierau E , Kunji R , Leehouts KJ *et al.* Multiple peptidase mutants of *Lactococcus lactis* are severely impaired their ability to grow in milk. *J Bacteriol* , 1996 , **178** (10) : 2794 - 2803
[5] Nilson D , Kilstrup M. Cloning and expression of the *Lactococcus lactis* purDEK genes , required for growth in milk. *Appl Environ Microbiol* , 1998 , **64** (1) : 4321 - 4327
[6] Leehouts K , Bolhus A , Boot J *et al.* Cloning , expression and chro-

- nopeptidase gene(*pip*) for food-grade application in *Lactococcus lactis* . *Appl Environ Microbiol* , **64** (1) : 4736 – 4746
- [7] Corroler D , Mangin L , Desmasures N *et al.* A ecological study of *Lactococcus* isolated from raw milk in the Camembert cheese registered designation of origin areas. *Appl Environ Microbiol* , 1998 , **64** (1) : 4729 – 4735
- [8] Dickely F , Nilson D , Hansen EB. Isolation of *Lactococcus lactis* nonsense expressor and construction of a food-grade cloning vector. *Mol Microbiol* , 1995 , **15** : 839 – 847
- [9] Sahlstrom S , Chrzanowska J , Sorhaug T. Purification and characterization of a cell wall peptidase from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* IMN-C12. *Appl Environ Microbiol* , 1993 , **59** : 3076 – 3082
- [10] Monnet V , Nardi M , Chopin A *et al.* Biochemical and genetic characterization of PepF , an oligopeptidase from *Lactococcus lactis* . *J Biol Chem* , 1994 , **269** : 32070 – 32076
- [11] Hellendoorn MA , Franke-Fayard BM , Mierau I *et al.* Cloning and analysis of the pepV dipeptidase gene of *Lactococcus lactis* MG1363. *J Bacteriol* , 1997 , **179** : 3410 – 3415
- [12] Fernandez-Espla MD , Rul F. PepS from *Streptococcus thermophilus* : A new member of the aminopeptidase T family of thermophilic bacteria. *Eur J Biochem* , 1999 , **263** : 502 – 510

Study on the Properties of a Novel Glycine Amino Peptidase from *Actinomucor elegans*

MA Xiao-Hang* SUN Gui-Qin ZHAO Yu-Hua JIA Xiao-Ming

(College of Life Sciences , Zhejiang University , Hangzhou 310029 , China)

Abstract The glycine amino peptidase of *Actinomucor elegans* was studied in this work. For the enzyme production *Actinomucor elegans* was cultured with an enzyme producing medium. Then the cells were collected and subjected to enzyme purification. The glycine aminopeptidase was purified 592 times by a DEAE-Toyopearl column , a Toyopearl HW 65-C column and a Superdex 200 column subsequently and the purified enzyme had a specific activity of 14.2 u/mg. The enzyme was estimated to have molecular mass of 320kD by gel filtration and a subunit size of 56.5kD by SDS-PAGE. It hydrolyzes glycine residue containing substrates such as glycine- β naphthylamine more efficiently than those containing other amino acid residue. Addition to Gly- β NA , the enzyme could also hydrolyze Ala- β NA , Met- β NA , Leu- β NA , Arg- β NA and Ser- β NA but it had no activity on the substrates such as Trp- β NA , Pyr- β NA , Pro- β NA , Asp- β NA , Lys- β NA , Val- β NA. It was also observed when the glycine- β naphthylamine concentration was higher than 2mmol/L the enzyme showed a substrate inhibition , and at the 20 mmol/L the enzyme only showed about 55% activity as it showed at the 2mmol/L. Whereas no such phenomenon was observed on the other substrate such as alanine- β naphthylamine. The optimal temperature and pH for the reaction of this enzyme is 30°C and pH 8.0 , respectively. The K_m and K_{cat} of the enzyme for glycine- β naphthylamine is 0.24 mmol/L and 100.8 s⁻¹ , respectively. Zn²⁺ , Cu²⁺ and Cd²⁺ suppress almost all activities of the enzyme at the concentration of 1.0 mmol/L. Based on the study of chelating reagents , GAP belongs to the metalloenzyme. When a gelatin solution was hydrolyzed with 0.5% of alkaline proteinase together with glycine aminopeptidase at 50°C for 18 hours , the glycine aminopeptidase could improve the hydrolysis degree of the protease. The total free amino acid was improved about 13% and although the enzyme mainly had the activity to hydrolyze the glycine residue , individual amino acids analysis with an amino acid analyzer showed that the contents of glycine , proline , alanine , arginine and glutamate were considerably increased. The results of this study showed that the glycine aminopeptidase would be useful in the food industry.

Key words peptidase , glycine

Received : 11-26-2003

* Corresponding author. Tel : 86-571-86971962 ; E-mail : maxiaohong@zju.edu.cn 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>