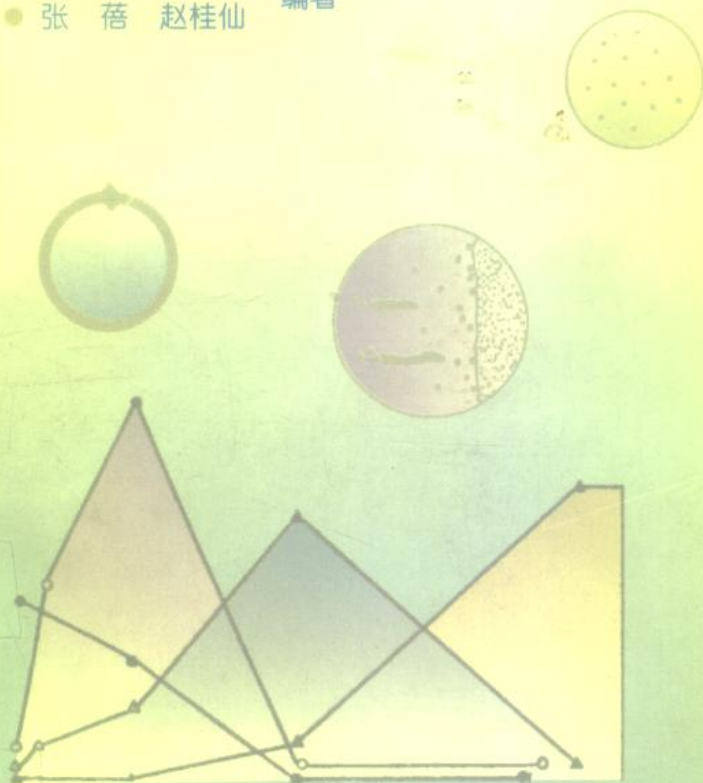


• 高等学校轻工专业教材 •

代谢控制发酵

Metabolic Control Fermentation

● 张克旭 陈 宁 编著
● 张 蓓 赵桂仙



中国轻工业出版社

82.941

549

高等学校轻工专业教材

代谢控制发酵

张克旭 陈宁 张蓓 赵桂仙 编著

图书在版编目 (CIP) 数据

代谢控制发酵/张克旭等编著. —北京: 中国轻工业出版社, 1998.5
高等学校轻工专业教材
ISBN 7-5019-2175-X

I. 代… II. 张… III. 工业发酵, 代谢控制-高等学校-教材 IV. TQ920.6

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (97) 第 25348 号

责任编辑: 唐是雯 李菁

*

中国轻工业出版社出版发行

(100740 北京市东长安街 6 号)

北京市卫顺印刷厂印刷 新华书店经销

1998 年 5 月第 1 版 1998 年 5 月第 1 次印刷

开本: 850×1168 1/32 印张: 14.375

字数: 373 千字 插页: 1 印数: 1—3000 册

定价: 32.00 元

ISBN 7-5019-2175-X/TS · 1368

前 言

本书是根据轻工专业“代谢控制发酵”教学大纲编写的。于1996年12月在无锡轻工大学召开的发酵专业教学指导小组会议上被定为轻工高等院校教材。

代谢控制发酵是发酵工业的基础理论，发酵工业就是一种控制微生物代谢的生物化学过程。代谢控制发酵技术是微生物发酵工业的第3个转折期。它产生于分子生物学的研究，同时又促进了分子生物学的发展。我们在编写这部书时，既系统介绍了代谢控制发酵的基础知识，又重点介绍了国内外目前本学科发展的概况及新的科研方法和实验手段。

本书是在作者多年教学及科研的基础上，参考国内外最新出版的教科书及科技资料编写而成的。涉及面较宽，并有一定的深度。在体例安排上，首先介绍了代谢控制发酵的基本思想和基本技术。鉴于基因工程技术在代谢控制发酵中所占的比例越来越大，且工院校学生所具备的基因工程知识比较缺乏，故以三章的篇幅扼要地介绍了基因工程的基础知识、基本操作及体外诱变方法。这样就可以使学生对代谢控制发酵中所涉及的基因工程问题迎刃而解。最后分别介绍了糖类、脂类、氨基酸、核酸类物质及抗生素发酵的代谢与控制，并详细介绍了某些目的产物的代谢控制发酵育种。

全书共分11章。第一、二章由张克旭执笔，第三、九、十章由陈宁执笔，第四、五、八章由张蓓执笔，第六、七、十一章由赵桂仙执笔。全书由张克旭教授负责最后的统稿和定稿，经发酵专业教学指导小组审定后出版。

本书中凡成分的含量、浓度等以%表示的，一般均指质量分数。

在编写过程中，我们得到了中国轻工总会、发酵专业教学指导小组及天津轻工业学院领导的关怀和支持，在此一并谨示谢忱。由于水平有限，书中难免有不妥之处，恳请读者批评指正。

作 者

目 录

第一章 绪论	1
第二章 代谢控制发酵的基本思想	6
第一节 微生物细胞的调节机制	6
一、酶活力的调控	11
二、酶合成的调控	22
三、反馈抑制与反馈阻遏的比较	30
第二节 代谢控制发酵的基本思想	31
一、切断支路代谢	31
二、解除菌体自身的反馈调节	34
三、增加前体物的合成	40
四、去除终产物	43
五、特殊调节机制的利用	44
六、条件突变株的应用	47
七、选育不生成副产物的菌株	48
八、选育生产代谢拮抗物质的菌株	49
第三节 微生物代谢控制发酵的措施	50
第四节 环境条件控制	52
第三章 代谢控制发酵育种的基本技术	54
第一节 诱变	54
一、诱变剂	55
二、诱变育种中的几个问题	61
三、突变型菌株的分离	65
四、育种实例	74
第二节 原生质体融合	77

一、概述	77
二、育种实例	86
第三节 转导	88
一、概述	88
二、育种实例	89
第四节 转化	92
一、概述	92
二、育种实例	96
第五节 杂交	98
一、霉菌的杂交育种	99
二、酵母菌的杂交育种	101
三、放线菌的杂交育种	104
第四章 基因工程概论	107
第一节 载体-宿主系统	108
一、载体	108
二、宿主	122
第二节 工具酶	127
一、限制性内切酶	127
二、其他工具酶	131
第三节 目的基因的制备与克隆化	132
一、利用理化方法分离基因	132
二、利用分子杂交技术分离基因	132
三、利用鸟枪法分离基因	133
四、人工合成基因	134
五、分子克隆的建立和目的基因的表达	135
第五章 重组 DNA 技术	138
第一节 基本操作	138
一、质粒 DNA 的快速制备	138
二、利用氯化铯-溴化乙锭超速离心分离质粒 DNA	141
三、采用 Sepharose 4B 柱分离质粒 DNA	144
四、凝胶电泳	148

五、DNA 的溴化乙锭染色及染色 DNA 的确认	150
六、凝胶中 DNA 的回收	152
七、DNA 限制性内切酶的酶切处理	154
八、核酸杂种的形成——遗传同源性的确定	156
九、DNA 的标记	163
十、细菌的转化	167
十一、真核细胞 mRNA 的制备与分离	169
十二、互补链 DNA (cDNA) 的合成	172
第二节 细菌的基因克隆	175
一、DNA 的分离方法	175
二、基因克隆	178
三、转化	193
第三节 酵母菌的基因克隆	195
一、DNA 的分离方法	195
二、LEU2 基因的克隆	200
三、转化	201
四、克隆的选择	204
第六章 利用体外诱变制备突变株	206
一、概述	206
二、操作	212
第七章 糖代谢与控制	223
第一节 糖代谢与调节	223
一、EMP 途径	223
二、HMP 途径	226
三、ED 途径	227
四、TCA 循环	229
五、乙醛酸循环	233
六、CO ₂ 固定反应	236
七、各种代谢途径的利用率	237
八、电子传递系统与氧化磷酸化	240
九、糖代谢的调节	243

第二节 D-核糖发酵	247
一、D-核糖的生物合成途径	247
二、D-核糖的发酵机制	247
三、D-核糖发酵的代谢控制育种	248
第三节 柠檬酸发酵	251
一、柠檬酸的生物合成途径	251
二、柠檬酸的发酵机制	251
三、柠檬酸发酵的代谢控制育种	252
第八章 脂类代谢与控制	257
第一节 脂类的代谢与调节	257
一、脂肪酸的分解 (β -氧化作用)	257
二、脂肪酸的生物合成	260
三、脂代谢的调节以及与糖代谢的相互关系	263
四、磷脂的代谢	265
第二节 多不饱和脂肪酸发酵的代谢控制育种	269
一、 γ -亚麻酸发酵的代谢控制育种	270
二、花生四烯酸发酵的代谢控制育种	273
第三节 谷氨酸发酵的代谢控制育种	276
一、谷氨酸的生物合成途径及代谢调节机制	277
二、谷氨酸生产菌的育种思路	281
第九章 氨基酸的代谢控制与发酵	288
第一节 天冬氨酸族氨基酸的代谢控制育种	288
一、天冬氨酸族氨基酸的生物合成途径及代谢调节机制	288
二、赖氨酸发酵	292
三、苏氨酸发酵	302
四、蛋氨酸发酵	314
五、高丝氨酸发酵	315
六、天冬氨酸发酵	318
第二节 芳香族氨基酸的代谢控制育种	319
一、芳香族氨基酸的生物合成途径及代谢调节机制	319
二、色氨酸发酵	327

三、苯丙氨酸发酵	334
四、酪氨酸发酵	337
第三节 分支链氨基酸发酵的代谢控制育种	338
一、分支链氨基酸的生物合成途径及代谢调节机制	338
二、分支链氨基酸发酵的代谢控制育种	342
第四节 其他氨基酸发酵的代谢控制育种	345
一、精氨酸的生物合成途径及代谢调节机制	345
二、精氨酸发酵的代谢控制育种	347
三、其他氨基酸发酵的代谢控制育种	349
第十章 核酸类物质的代谢控制与发酵	354
第一节 核苷酸的生物合成途径	354
一、嘌呤环的前体	354
二、嘌呤核苷酸的全合成途径	355
三、嘧啶核苷酸的全合成途径	357
四、补救途径	358
第二节 调节及其分子机制	359
一、肌苷酸生物合成的代谢控制	359
二、嘌呤核苷酸互变的代谢控制	360
三、嘧啶核苷酸的代谢控制	363
第三节 代谢控制及育种	366
一、肌苷发酵的代谢控制育种	366
二、鸟苷发酵的代谢控制育种	382
三、5'-肌苷酸发酵的代谢控制育种	387
四、cAMP 的代谢控制育种	395
第十一章 抗生素发酵的代谢与控制	399
第一节 抗生素产生菌的代谢与调节	399
一、次级代谢产物和初级代谢产物的关系	400
二、抗生素产生菌的几种主要代谢调节机制	403
三、细胞生长期和抗生素生产期的相互关系	407
四、抗生素合成的关键酶	409
五、影响次级代谢产物产量的因素及改进措施	411

第二节 青霉素发酵的代谢控制育种	411
一、青霉素和头孢菌素的生物合成途径及代谢调节机制	411
二、选育青霉素生产菌的方法	416
三、发酵控制	419
第三节 链霉素发酵的代谢控制育种	423
一、链霉素的生物合成机制和代谢调节	423
二、链霉素生产菌的育种思路	428
三、发酵控制	430
第四节 四环类抗生素发酵的代谢控制育种	434
一、四环类抗生素的生物合成机制和代谢调节	434
二、四环类抗生素产生菌的育种思路	441
三、发酵控制	443
主要参考文献	446

第一章 绪 论

新陈代谢是宇宙间普遍存在的不可抗拒的规律。新陈代谢包括合成代谢和分解代谢两大方面，它们是对立统一的。分解代谢又称异化作用，是指由复杂的营养物质分解成简单化合物的过程；合成代谢又称同化作用，是指由简单化合物合成复杂的细胞物质的过程。新陈代谢具有三大特点：

- (1) 生物反应都在温和条件下进行，大多为酶所催化；
- (2) 反应具有顺序性；
- (3) 具有灵敏的自动调节机制。

在一个活细胞内，生命物质种类甚多，据估计，一个大肠杆菌染色体 DNA 约含 400 万个碱基对，用于编码一个含 500 个氨基酸多肽的基因约有 3000 个。然而，一个细胞内物质代谢的转换，犹如一个自动化的工厂。各种基因、结构蛋白、酶系统和代谢物等高度组织在一起，各种代谢反应错综复杂，但其相互制约、彼此协调，且随细胞内外条件的变化而迅速改变代谢反应的速率、方向和流量，既不使代谢物蓄积而造成浪费，也不致因代谢物的缺损而供不应求，保持各种代谢物的浓度相对稳定和动态平衡，结果使细胞得以生长。

细胞除具有内源性调节机制外，对外界反应也有自我调节的能力。细胞受到诸如离子、激素、代谢物等特异或非特异信息的刺激时，可以调整自己的酶活性水平、基因表达水平，给出正调节（激活）或负调节（抑制），以适应外界环境的变化。

应用微生物工业上将所有通过微生物的培养，使某种特定代谢产物大量积累的过程都称为发酵。如各种有机酸发酵、维生素发酵、酶制剂发酵、氨基酸发酵、核酸类物质发酵、抗生素发酵

等。早在 40 年代就已开始了抗生素（青霉素）的发酵生产，那时只能采取自然选择的方法，以 10^{-6} 突变的几率来筛选所谓高产菌株，因为没有代谢控制发酵理论的指导，直到 60 年代仍处于盲目的经验式阶段。1957 年日本的木下等人研究谷氨酸的发酵生长，也很盲目。随着世界各国对代谢控制发酵理论的深入研究，许多国家也转向了发酵菌株本身的研究，获得了许多优秀的氨基酸高产菌株。随后，核酸类物质发酵生产菌也以代谢控制发酵理论去选育，并奋起直追成为后起之秀。氨基酸、核酸类物质代谢控制发酵理论的研究，进一步推动了抗生素发酵的研究与生产。可以看出，由于代谢控制发酵理论的作用，发酵已由野生型菌株的发酵向高度人为控制的发酵转移，由依赖于微生物分解代谢的发酵向依赖于生物合成代谢的发酵，即向代谢产物大量积累的发酵转移。在育种方面，将微生物遗传学的理论与育种实践密切结合，并不是像以往那样从大量的菌种中盲目地挑选高产菌株，而是先研究目的产物的生物合成途径、遗传控制及代谢调节机制，然后进行定向选育。

那么，什么是代谢控制发酵呢？所谓代谢控制发酵（Metabolic control fermentation，日文为：代謝制御発酵）就是利用遗传学的方法或其他生物化学的方法，人为地在脱氧核糖核酸（DNA）的分子水平上，改变和控制微生物的代谢，使有用目的产物大量生成、积累的发酵。

如前所述，在正常活细胞内，每种物质的代谢由于都有其严格的调控机制，其中间产物和终产物都不会被积累，若要选育某种代谢物大量积累的菌株，必须破坏或解除原有的调控关系并建立新的调节机制，方能达到目的。所以说，由发酵所生成的目的产物都是微生物中间代谢产物或终产物的积累，是对微生物正常代谢抑制的结果。换句话说，代谢控制发酵的关键，取决于微生物代谢控制机制是否能够被解除，能否打破微生物正常的代谢调节，人为地控制微生物的代谢。

代谢控制发酵的出现与发展，与以下几方面是密不可分的：

(1) 由于生物化学的发展，确立了代谢图，随着代谢途径研究的不断深入，发现了反馈调节机制，特别是酶的别构动力学指出了多种酶活性调节的基本类型。由于微生物遗传学的发展，发现了分解代谢途径操纵子（如乳糖操纵子、阿拉伯糖操纵子、组氨酸操纵子、麦芽糖调节子等）和合成代谢途径操纵子（如色氨酸操纵子、苯丙氨酸操纵子、苏氨酸操纵子、精氨酸调节子、组氨酸操纵子、嘧啶调节子等）的调控机制，从而阐明了微生物代谢的调节机制。

(2) 由于分子生物学和分子遗传学的发展，可以人为地在 DNA 分子水平上改变微生物的代谢，多方面利用微生物的代谢活性，使微生物的菌学性质按人为的目的变化。一般通过诱变选育各种突变株，如营养缺陷突变株、结构类似物抗性突变株、营养缺陷的回复突变株、渗漏突变株、条件突变株等；通过转导、转化、杂交、原生质体融合等细胞内基因重组方法获得目的重组子；通过重组 DNA 技术构建工程菌株等。

(3) 合理控制环境条件，采用过程控制方法，完善受控参数，对发酵过程进行最优化控制，使目的产物大量积累。

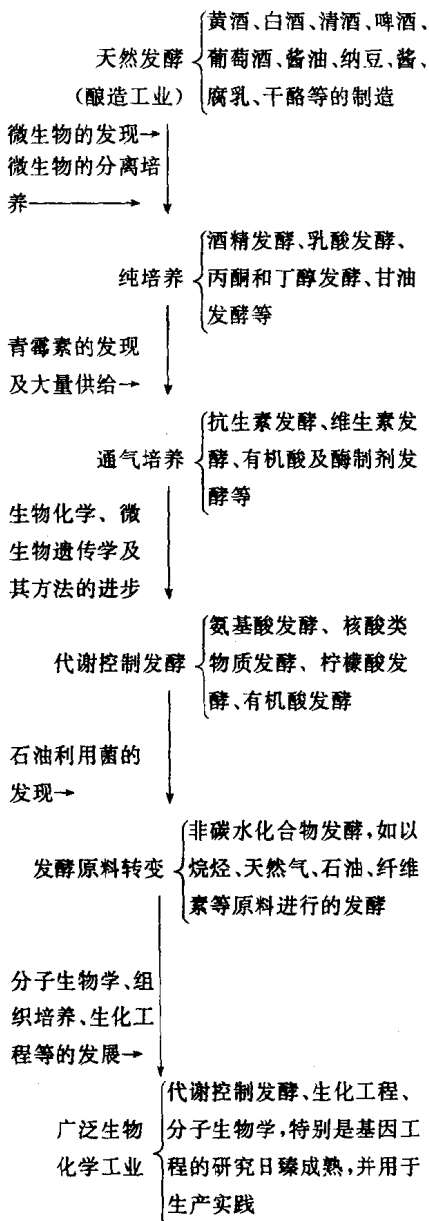
有关利用微生物进行发酵的发展情况，如图 1-1 所示。

随着代谢控制发酵理论的日臻完善，现已发展出代谢工程 (metabolic engineering) 这一分支。

Bailey 于 1991 年在《科学》杂志上撰文论述了代谢工程的应用、潜力和设计。同年，Stephanopoulos 和 Vallino 在《科学》杂志上论述了有关“过量生产代谢产物时的代谢工程”、“代谢网络的刚性”、“代谢流的分配、关键分叉点及速度限制步骤”等内容。代谢工程的具体思路如下。

1. 改变代谢流

改变分支代谢途径的流向，阻断有害产物，其困难在于代谢网络的刚性及细胞的应答反应等。可采取以下措施。



人们尚不清楚微生物与发酵的关系, 只是单凭经验而继承的产业
此时代称为天然发酵时代

发现发酵原理, 微生物纯分离培养成功, 设计了便于灭菌的密闭式发酵罐

纯培养技术为第 1 个转折期

青霉素的大量生产, 同时将通气搅拌技术引入发酵工业

通气搅拌技术为第 2 个转折期

1956 年谷氨酸发酵成功, 氨基酸、核苷酸发酵随之而起, 从 DNA 分子水平控制微生物代谢

代谢控制发酵技术为第 3 个转折期

60 年代采用烷烃、乙酸、天然气等为原料进行石油发酵, 后因公众舆论的压力而被迫停产

发酵原料的转变第 4 个转折期

随着现代生物技术, 特别是基因工程的发展, 可为人类定向育种提供新途径, 创造优秀杂合子、构建工程菌株为人类服务

现代生物技术可称为第 5 个转折期

图 1-1 利用微生物进行发酵的沿革

(1) 加速速度限制反应 通过克隆对生物合成起限速作用的关键酶基因, 加速代谢流的流动。

(2) 改变分支代谢途径的流向 通过提高代谢分叉点的某一个分支代谢途径酶系的活力, 以得到高产的末端代谢产物。

(3) 构建代谢旁路 用代谢工程方法可以阻断或降低副产物的合成, 特别是有毒产物的产生。例如, Aristidon 将枯草芽孢杆菌的乙酰乳酸合成酶基因克隆到大肠杆菌中, 改变了细胞的糖代谢流, 使乙酸处于低于细胞毒性的浓度, 从而进行高密度培养。

(4) 改变能量代谢途径 例如, Chen 成功地将血红蛋白基因导入到酿酒酵母中, 血红蛋白通过影响电子传递链, 间接影响了线粒体的乙醛歧化途径, 结果酿酒酵母的乙醇产量大幅度提高。

2. 扩展代谢途径和构建新的代谢途径

通过引入外源基因, 可以延伸原来的代谢途径; 通过利用新的底物, 构建新的代谢途径。

(1) 延伸代谢途径 将淀粉酶基因导入酿酒酵母中, 可改善乙醇发酵, 但由于淀粉酶基因表达太低, 因此通过 AOX1 启动子来表达淀粉酶基因, 使代谢途径得以延伸。

(2) 构建新的生物合成途径 Hopwood 将放线菌红素的生物合成基因簇分别导入 Granotcin 和麦迪霉素产生菌中, 获得具有新结构的杂合抗生素。

总之, 代谢控制发酵是发酵工业的基础理论, 是紧密联系生产实际的基础科学, 是工业微生物育种工作的理论基础。它产生于生物化学、微生物遗传学的研究, 又促进了分子生物学的发展。代谢控制发酵原理早已应用于发酵工业, 目前, 有机酸、脂肪酸、氨基酸、核酸类物质、抗生素、生理活性物质等发酵产品的产率比过去已有较大幅度的提高, 因此, 不论在理论研究上还是在生产实践上, 代谢控制发酵理论都日益显示出十分重要的作用, 为国民经济建设做出越来越大的贡献。

第二章 代谢控制发酵的基本思想

第一节 微生物细胞的调节机制

微生物细胞具有高度适应环境和繁殖的能力。细胞的各种结构能协调地进行工作，对环境的刺激和信息作出反应，进行自我调节。在一般情况下，细胞只合成本身所需要的中间代谢产物，严格防止氨基酸、核苷酸等物质的积累。当有氨基酸或嘌呤物质进入细胞后，细胞立即停止该物质的合成，一直到所供应的养料消耗到很低浓度，细胞才能重新开始进行合成。细胞中这种调节控制作用主要靠两个因素，即参与调节的有关酶的活性和酶量，也就是反馈抑制和反馈阻遏（如图 2-1 所示）。

根据代谢控制机制的研究证明，酶的生物合成受基因和代谢物的双重控制。一方面，从 DNA 的分子水平上阐明了酶生物合成的控制机制，酶的合成像普通蛋白质的合成一样，受基因的控制，由基因决定形成酶分子的化学结构；另一方面，是从酶学的角度探讨，仅仅有某种基因，并不能保证大量产生某种酶。酶的合成还受代谢物（酶反应的底物、产物及其类似物）的控制和调节。当有诱导物存在时，酶的生成量可以几倍乃至几百倍地增加。相反地，某些酶反应的产物，特别是终产物，又能产生阻遏作用，使酶的合成量大大减少。按操纵子学说，操纵子由细胞中的操纵基因和邻近的几个结构基因组成。结构基因能转录遗传信息，合成相应的信使 RNA（mRNA），进而再翻译合成特定的酶。操纵基因能够控制结构基因作用的发挥。细胞中还有一种调节基因，能够产生一种细胞质阻遏物，细胞质阻遏物与阻遏物（通常是酶反