

工业微生物诱变育种

章名春 编著

科学出版社

工业微生物诱变育种

章名春 编著

科学出版社

1984

内 容 简 介

本书介绍微生物诱变育种的基础知识和应用技术。内容通俗，材料丰富，适合广大从事工业微生物研究、生产的科技人员阅读，也可供有关专业的师生参考。

工业微生物诱变育种

章名春 编著

责任编辑 王伟济

科 学 出 版 社 出 版

北京朝阳门内大街137号

中国科学院印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

*

1984年7月第一版 开本：787×1092 1/32

1984年7月第一次印刷 印张：8 3/8

印数：0001—4,400 字数：162,000

统一书号：13031·2613

本社书号：3595·13—9

定价：1.30 元

前 言

微生物诱变育种技术对微生物工业曾建立过不朽的功勋。所有在生产上使用的菌种莫不是经诱变育种而大幅度提高产量的。随着近年来生物技术的惊人进展,生物工程发展的深度和广度势将有一个飞跃。在生物工程技术有关领域中,微生物起着极其重要的作用。作为生物工程环节之一的诱变育种技术的应用也会与日俱增。因此编者不揣拙陋贸然编写本书,以飨读者。

微生物诱变育种技术目前的趋势是:由经验式向理性化过渡。因而研究该技术必须具备微生物学、微生物生理学和遗传学等有关知识,诸如微生物细胞结构和功能、代谢和代谢调节、遗传和变异等基础知识。为此,本书除对诱变育种技术及其国内外发展概况加以阐述外,也对工业微生物学有关基础知识予以简要介绍,以供参考。由于编者水平所限,在本书中一定存在许多缺点和错误,敬请读者批评指正。

本书承盛祖嘉老师于百忙中给予审校,并承王蓉贞同志提供宝贵意见和部分有关资料,谨此致谢。

编著者

1982年

目 录

前言

1 微生物诱变育种的重要作用	1
1.1 微生物育种技术的回顾和展望	1
1.2 微生物诱变育种在微生物工业中的作用	6
2 诱变育种基础知识	13
2.1 菌种	13
2.2 微生物的培养	19
2.3 微生物的生长及其测定方法	29
2.4 微生物的代谢和代谢调节	32
2.5 微生物的次级代谢	36
3 高产菌株诱变育种的基础和准备工作——以抗生素 产生菌为例	40
3.1 菌落形态培养特征和群体模式	42
3.2 自然选择	51
3.3 发酵工艺流程的各个环节	53
3.4 固体(或液体)种子培养	54
3.5 摇瓶培养	65
4 突变及其物质基础	72
4.1 遗传变异的物质基础是 DNA	72
4.2 质粒	78
4.3 突变及其类型	78
4.4 突变的分子机制	79
4.5 突变的通性	84

4.6	突变的修复	91
4.7	突变迟延现象	95
4.8	突变的形成过程	96
5	诱变剂	99
5.1	物理诱变剂	99
5.2	化学诱变剂	113
5.3	生物诱变剂: 噬菌体	147
5.4	小结	147
6	高产菌株诱变育种的若干问题	152
6.1	高产菌株诱变育种的特点	152
6.2	诱变育种方案的设计	155
6.3	诱变过程的若干问题	163
6.4	筛选过程的有关问题	173
6.5	诱变育种实例	184
7	突变株的筛选	190
7.1	营养缺陷型突变株	190
7.2	抗性突变株	201
7.3	回复突变株	209
7.4	细胞透性改变突变株	211
7.5	形态突变株	212
7.6	突变株的超显微结构差异	213
7.7	抗生素生物合成中的“关键酶”	214
7.8	温度条件突变株	214
7.9	其他类型突变株	216
7.10	利用平皿特殊反应筛选突变株	218
8	诱发突变的多种用途	221
8.1	诱变产生新抗生素	221
8.2	突变合成	225
8.3	改变代谢产物的组分	229

8.4	局限突变和共突变	231
8.5	无活性阻断突变株的共合成	233
8.6	应用阻断突变株研究次级代谢途径	234
8.7	突变产生新代谢产物的若干问题	236
8.8	突变株用于致癌物质的检测	238
8.9	突变株用于检测模型	240
9	高产突变株的退化和保藏	241
9.1	高产突变株的退化	241
9.2	菌种保藏	249

1 微生物诱变育种的重要作用

1.1 微生物育种技术的回顾和展望

工业微生物菌种质量的优劣对发酵工业有极其重要的影响。微生物育种和高等动植物的育种一样,不论是人工从自然突变中选择或是人工有计划诱变的选择,都是建筑在遗传和变异的基础上的。遗传和变异这一对矛盾是生命活动的基本属性之一。没有变异生物界就失去进化的素材;而没有遗传,变异也无从积累。同样,就良种选育来说,没有变异就没有选择的素材;没有遗传,选到的优良性状也不能进行培育。由此可见,微生物遗传学与微生物育种学是息息相关的。下面将对微生物育种技术的发展,以及微生物遗传学的研究成果对微生物育种的巨大推动作用进行简单的回顾。

早在几千年前,我国劳动人民在酿酒作醋等方面就有丰富的经验。虽然当时人们还不知道微生物的存在和作用,但已注意到种曲的质量,并在生产实践中,不断地从自然界选择良曲。尽管这是原始的人工选择,但它对生产起了很重要的作用。

随着微生物学的发展,特别是发明微生物纯种培养法以后,开始了微生物纯种的自然选育,对微生物育种有很大的影响。当时在酒精发酵中,推广了自然选育的纯系良种,扭转了

酒精生产不稳定的现象。这是最早应用遗传学原理于微生物育种实践,提高发酵产物生产水平的一个成功实例。自然选育方法虽已沿用多年,迄今仍是微生物育种的重要手段之一。

由于自然突变频率低,突变幅度也不大,单纯依赖自然界存在的微生物群体来进行的自然选育无疑有很大局限性,不能满足生产实践的需要。特别是抗生素工业兴起以后,对微生物育种的发展要求更为紧迫。青霉素卓越疗效的发现,是发酵工业的大事,也是国计民生的大事。但菌种生产水平太低和不适应大规模沉没培养条件的缺陷阻碍了生产的发展。从自然界广泛地寻找新的生产菌或者用单孢子纯化方法来自然选育良种,都未获得令人满意的成效。当时借助于高等植物辐射诱变育种方法,采用人工诱发遗传物质结构突变选取高产突变株,却取得惊人的效果。如青霉素突变株生产能力有了成倍的提高;利用X射线诱变产黄青霉菌 NRRL 1951·B25 的纯化菌株(生产能力为 250 单位/毫升),筛选获得生产能力提高一倍左右的突变株 X-1612 (500 单位/毫升)。以后用紫外光进一步处理 X-1612,又筛选获得生产能力提高到 900 单位/毫升的突变株 Q-176,该菌株不但生产能力较高,而且没有影响产品质量的黄色色素。微生物诱变育种在短期内成效如此卓越,这是与微生物的内在特点以及微生物遗传学发展的理论准备分不开的。微生物诱变育种的效果远远超出植物诱变育种,是由于它具有下列特点:①微生物繁殖速度快,操作方便,短期内能大量繁殖后代。②细胞体积小,与外界环境直接接触,对外界环境选择作用特别敏感,很

容易发生变异,并遗传到后代。③微生物繁殖方式简单,多为单倍体,一旦发生变异,已经变异的新的遗传特性很容易传递下去。

四十年代初遗传学实验开始采用微生物作为研究材料,对基因的作用及基因突变机制等的研究获得很大进展。一方面采用 X 射线和紫外光等辐射因子来诱变红色脉孢霉(红色面包霉)等微生物,获得营养缺陷型,因而比德尔(Beadle)和塔特姆(Tatum)于 1941 年提出“一个基因一种酶”的学说,阐述基因与酶功能的直接关系;另一方面,1944 年通过细菌转化因子,即基因的化学本质鉴定,进一步证明了遗传的基因物质是 DNA,使遗传学从细胞水平发展到分子水平。上述丰硕的微生物遗传学研究成果,促进了育种技术的发展。

经验式诱变育种技术应用于工业微生物育种,成绩辉煌,菌株生产能力突飞猛进,所以在目前诱变育种仍然是世界各国经常使用而且行之有效的重要方法。但它也有不少缺点,首先,诱发突变是随机而不定向的,高产突变频率很低,因此随机筛选工作繁重琐碎,盲目性大,周期较长。要提高产量,必须经过长期诱发突变处理,多次使用诱变剂一步步累积处理才能达到。对于每一步诱变处理来说,提高幅度是不大的。至于经过长期累积处理的菌种,再用诱变剂诱变,处理效果往往不够理想,有饱和现象出现,再进一步提高显得相当困难。因而育种工作者就希望开辟新的途径来选育高产菌株。

诱变育种是以人工诱发基因突变或染色体畸变为基础的。值得探索的新途径是从遗传变异的另一方面着手,就是

以基因的不同组合或者以新组合为基础，进行遗传性改变的杂交育种。早在1937年，就有人在面包酵母育种中，应用挑单孢子进行杂交以获取同源或异源双倍体培育良种。当时杂交育种仅限于有性世代明确的微生物，对于多数进行无性繁殖的微生物杂交育种方面却一无所知。直到1946—1947年，在大肠杆菌中发现有重组现象，以及摸索到真菌的准性生殖以后，人们开始认识到细菌和高等生物遗传规律的一致性。1952—1955年期间，青霉菌和链霉菌的遗传重组现象也被发现了，这给微生物遗传学应用于工业微生物育种，即杂交育种的工业应用开辟了道路。杂交育种技术虽已有相当大的发展，但到目前为止，实践效果却不如预期那么明显。在作为集合有利性状，提高经长期诱变处理的菌种对诱变因子的敏感性方面，杂交育种有其重要作用。目前世界各地的多数实验室都采用自然选育、人工诱变育种和杂交育种三种选育菌种方法，进行工业微生物高产菌株的选育。近年来发展起来的原生质体融合技术，对提高杂交频率，扩大重组范围，提供了有效的手段。

· 对于初级代谢合成途径的深入了解以及代谢调节酶系统等有关生化遗传学知识的累积，特别是1961年雅各布（F. Jacob）和莫诺（J. Monod）提出了操纵子学说阐明原核生物性状表达的调控机制以后，给氨基酸和核苷酸产生菌的诱变选育提供了足够的理论基础。在此基础上发展起来的解除代谢调节控制的突变株选育技术，已取得令人鼓舞的成绩。它成为经验式诱变育种向控制育种进展的实例。近年来又发展了

采用灵活手法筛选营养缺陷型或抗代谢同衍物突变株，结合转化或转导等遗传手段，来选育组合多重变异的高产突变株。

抗生素等次级代谢产物的高产菌株选育，与初级代谢产物高产菌株选育相比，在建立合理的高效选育方法上存在不少困难。主要是对抗生素生物合成途径及其调节机制还不清楚；与生物合成酶系统有关的遗传图的绘制，在多数菌株中尚未进行；甚至微生物为什么会产生抗生素这样的基本问题，也还没有满意的答案。

染色体外质粒的研究表明，多数抗生素的产生和质粒有一定关系（除了少数几种抗生素如佐尔博霉素和放线紫红素等只受染色体控制），设想增加细胞内质粒的拷贝数量或解除受质粒控制酶的形成的抑制，从而提高抗生素的生产能力。随着抗生素产生与质粒之间的关系的深入研究下去，我们有可能了解到抗生素生物合成有关的酶系的结构基因和控制基因，也有可能揭示出与那种细胞膜透性有关的基因和自身耐药基因。这些基因既主宰着抗生素向细胞膜外透出，也主宰着细胞对合成抗生素的基质材料的吸收。通过质粒基因作用的了解以及分离质粒 DNA 技术的进展，有可能将分离得到的离体质粒 DNA 进行诱变处理，再通过转化或转导技术的应用，使之转入细胞。

七十年代，随着分子遗传学不断向纵深发展，新的理论和新的技术不断涌现，可以期望，通过重组遗传、遗传图绘制、共突变技术、复杂调控机制的了解和解除、突变机制的研究、质粒基因扩增和结合基因工程研究，将有可能建立起快速、有效

而合理的高产菌株选育方法，并在选育合成新代谢产物突变株方面提供有效的武器，使微生物育种学朝着定向改造微生物的遗传结构的道路迈进。

1.2 微生物诱变育种在微生物工业中的作用

上节已谈到，突变是遗传变异的源泉。虽然杂交所引起的基因不同组合也是变异的根源之一，但是突变更为重要，没有突变所造成的不同等位基因，根本谈不上基因的重新组合。人工诱发突变是加速基因突变的重要手段，其突变频率比自然突变频率提高成百上千倍。以人工诱发突变为基础的微生物诱变育种的重要性也就可想而知了。因此，在目前，微生物诱变育种在发酵工业的菌种选育中独占鳌头，也是很自然的。当前国内外发酵工业中所采用的各种生产菌种品系绝大多数都是诱变菌株，特别是抗生素工业所使用的菌种几乎全部是诱变所得的品系。因为从自然界分离所得的野生菌种，不论在产量上或质量上均不适应发酵工业的要求。因而从自然界存在的产生某种代谢产物的菌种经筛选分离→育种（包括自然选育和人工诱变育种）→保藏优良菌种，已成为工业菌种管理上的必要程序。下面分诱变育种的直接应用和间接应用两个方面来讨论诱变育种在微生物工业中的重要作用。

1.2.1 诱变育种的直接应用

(1)提高产量。在抗生素和氨基酸的生产菌种选育中,生产能力提高的效果最为显著。从土壤中挖土筛选出来的抗生素产生菌野生菌,其生产能力和经过一系列诱变选育的生产菌种相比,可以相差几十倍甚至几百倍。以号称抗生素之王的青霉素产生菌来说,从自然界分离出来的野生菌种的生产能力最高仅达 20—100 单位/毫升,而目前生产上应用的、经多次诱变育种所得高产菌种的生产能力最高可达 50,000—60,000 单位/毫升(个别阶段可能插入杂交育种方法)。其他一些抗生素产生菌经过诱变育种,也都取得可喜的成效(表 1.1)。

表 1.1 诱变育种效果

名称	原始野生菌株生产能力 (单位/毫升)	经诱变获得的高产菌株生产 能力(单位/毫升)
青霉素	20 (1943年)	50,000—60,000 (1979)
链霉素	50 (1945 年)	20,000—25,000 (1973)
土霉素	400(1950 年)	25,000—30,000 (1979)
四环素	200(1948 年)	25,000—30,000 (1979)
红霉素	100(1955 年)	10,000 (1979)

氨基酸产生菌利用代谢调控原理设计诱变育种方案,已取得明显效果。如赖氨酸产生菌生产能力可达 20—29 毫克/毫升,经过一系列诱变育种,有的氨基酸可以由每毫升几个微克,提高到 10—20 毫克/毫升,达到可以进行工业生产的水

平。

(2) 改善菌种的有利性状。通过一系列诱变育种措施,人们不但能提高菌种的生产能力,还可改善菌种的某些性状,使之适应人类的需要。这些有利性状涉及范围很广,主要是产品质量和发酵工艺所要求的、令人满意的一些性状。例如,产青霉素的原始生产菌种,在发酵过程中产生黄色色素,这种色素在提炼精制过程中不易消除,以致影响产品质量。经诱变育种获得一株无色素的突变株,从而改进了产品质量。又如链霉素产生菌,在发酵过程中除产生链霉素外,还大量产生一种抗菌活性低的甘露糖链霉素,它在代谢过程中不仅陡然消耗原材料,并且干扰链霉素的分离纯化。通过诱变育种获得一株突变株,既能产生大量链霉素,同时又只产生极少或不产生甘露糖链霉素。多数抗生素产生菌所产的抗生素都是多组分的,除所需组分外,还有一些抗菌活性低或毒性强的其他组分。通过诱发突变来获得消除或减少无益组分的优良高产突变株的事例,也是屡见不鲜的。

在适应发酵工艺所要求的有利性状方面的诱发突变例子相当多,而且有利性状是多种多样的。例如:①生长发育旺盛的突变株,即产孢子能力强,孢子丰富的突变株,这种性状对大规模生产是非常重要的;生长迅速和旺盛也极重要,否则会给扩大繁殖带来麻烦。②抗生素发酵过程中发生泡沫少的突变株,一方面可以减少用油或消沫剂用量,一方面能提高发酵罐的利用率(可适当增加装量)。③原材料利用率高的突变株,可以降低原材料消耗。如氨基酸谷氨酸发酵用废糖蜜为

原料,由于废糖蜜的生物素高达 300 微克/公升,影响生产水平,如利用油酸缺陷型突变株,即使有高含量生物素存在,也能大量形成谷氨酸。④青霉素生产需要苯乙酸或苯氧乙酸为前体,有的菌种氧化前体能力强,不少昂贵的前体都被氧化掉。通过诱变来选取结合前体进入青霉素分子的能力高(即有关酶系活性高)而氧化前体能力低的突变株,就可以提高前体利用率。⑤抗噬菌体或其他杂菌污染的高产菌株,也可通过诱变筛选得到。这一点在发酵工业中是很重要的措施。杂菌污染(包括噬菌体污染)是抗生素、氨基酸或有机溶剂等发酵工业中的重大问题。由于杂菌(或噬菌体)污染往往使数十吨配料不得不忍痛报废。经诱变选育抗某些杀菌剂的抗药性突变株,对于发酵能提供很大的方便。例如谷氨酸的抗五氯酚、链霉素、硝基呋喃、福马林等各种混合杀菌剂的抗性突变株,能在谷氨酸生产中有效地应用,是一个令人满意的例证。⑥丝状菌发酵菌丝生长形状,自溶迟早及菌丝量多少,对于菌丝滤除后的发酵滤液得率影响很大,可通过诱变选育适合工艺要求的突变株。总而言之,多种多样的、适应发酵工艺要求的突变株,都可以通过诱变育种来获得。

(3) 创造新品种。通过诱变育种来扩充发酵产品的品种,已有不少成功的例子。在抗生素品种方面,有由四环素产生菌通过诱变育种获得去甲基金霉素或去甲基四环素的产生菌,可以提供新品种二甲氨基四环素的原料。又有由柔红霉素产生菌诱变,选得能产生抗癌新药阿霉素的产生菌。氨基酸类及核苷酸类初级代谢产品的生产,只有通过诱变,只有通过诱变,只有通过诱变,

筛选那些突破、排除或绕过微生物本身所具有的反馈机制的突变株,才能生产不同的代谢物或代谢中间产物,从而大大地扩充微生物工业的品种。

1.2.2 诱变育种的间接应用

(1) 诱发突变应用于转导或杂交。①将不同突变的基因集合在一体中,比起单纯地把原始亲本杂交,更能获得完满的结果。例如,产生色氨酸的大肠杆菌,采用调节基因缺陷型和反馈基因缺陷型两株突变株的转导技术,能由低产菌株获得色氨酸高产菌株。通过突变改变了亲本的基因,然后通过诱导或杂交等遗传方法,使突变基因集合于一体,从而培育出良种。又如高产氨基酸产生菌,多数是一些打破、排除或绕过反馈调节的多重突变株,如抗代谢同衍物、营养缺陷或分解能力缺陷等多重突变的组合,但有些突变标记有时相互有交叉性,如依次解除反馈抑制或反馈阻遏有一定困难,常使用诱发突变和转化或转导相结合的方法,选育高产突变株。②经长期诱发突变选取出来的高产菌株中,经常杂有生活力低等不利性状的菌株,可以通过杂交来提高生活力。所获得的杂交菌株必需经过多次累积处理,才能明显地提高其生产能力。因此,杂交和诱发突变相结合的方法,也是培育高产菌株的一种有效方法。③进行杂交、转导以及其他基因工程方面的分子生物学研究工作,都需要选取标记菌株作为研究素材,诱发突变能提高获取标记菌株的速度和数量。④真菌的异核体中,产