

21世纪高等院校教材  
生·物·工·程·系·列

INDUSTRIAL  
MICROBIAL  
BREEDING SCIENCE

# 工业微生物 育种学 (第三版)

主编 ● 施巧琴 吴松刚



科学出版社  
www.sciencep.com

21 世纪高等院校教材——生物工程系列

# 工业微生物育种学

(第三版)

施巧琴 吴松刚 主编

科学出版社

北京

## 内 容 简 介

本书是在2003年出版的由施巧琴教授和吴松刚教授主编的《工业微生物育种学》第二版基础上,根据五年来工业微生物育种的新发展、新方法和新经验,重新进行编写的第三版。全书分14章,包括:绪论、遗传物质的基础、基因突变、工业微生物育种诱变剂、工业微生物产生菌的分离筛选、工业微生物诱变育种、工业微生物代谢控制育种、工业微生物杂交育种、工业微生物原生质体育种和原生质体融合育种、微生物基因组改组育种、基因工程育种、分子定向进化育种、高通量筛选技术、工业微生物菌种复壮与保藏等。

本书可用作高等院校生物工程专业或相关专业教材,也可供相关科研单位和工厂企业的科技人员与工程技术人员参考。

### 图书在版编目(CIP)数据

工业微生物育种学/施巧琴,吴松刚主编.—3版.—北京:科学出版社,2009

21世纪高等院校教材.生物工程系列

ISBN 978-7-03-024258-7

I. 工… II. ①施…②吴… III. 工业微生物学-菌种-遗传育种-高等学校-教材 IV. Q939.97

中国版本图书馆CIP数据核字(2009)第036387号

责任编辑:王国栋 周 辉/责任校对:李奕莹

责任印制:张克忠/封面设计:耕者设计工作室

**科 学 出 版 社 出 版**

北京东黄城根北街16号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

**源海印刷有限责任公司印刷**

科学出版社发行 各地新华书店经销

\*

1991年12月第 一 版 福建科学技术出版社出版

2003年1月第 二 版 开本:787×1092 1/16

2009年3月第 三 版 印张:25

2009年3月第一次印刷 字数:650 000

印数:1—4 000

**定价:40.00元**

(如有印装质量问题,我社负责调换〈明辉〉)

## 编写人员名单

主 编 施巧琴 吴松刚  
编 者 (按姓氏笔画排序)

王明兹	吴松刚	李惠珍
林跃鑫	郑毅	施巧琴
施碧红	唐良华	黄鹭强
章文贤	谢必峰	蒋咏梅

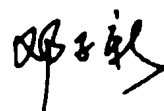
## 第三版序

为解决日益严重的自然资源短缺、能源危机和环境污染等制约人类实现可持续发展的重大问题,全球把目光投向了工业生物技术,继医药生物技术和农业生物技术后,工业生物技术已在世界范围内掀起了生物技术革命的第三次浪潮,其最大亮点在于通过工业微生物的生物转化和生物催化,建立生物炼制技术体系,形成绿色和清洁的生产工艺,生产出各种生物化合物、生物材料和生物能源。

选育和构建工业微生物优良菌株是工业生物技术产业化的重要前提,没有优良的工业微生物菌种,工业生物技术产业就寸步难行。因此,工业微生物育种是工业生物技术最为关键的技术,也是生物工程学家最为关注的生物技术领域之一。

福建师范大学工业微生物教育部工程研究中心施巧琴教授和吴松刚教授主编的《工业微生物育种学》(第三版),是在已大量发行的第二版基础上,根据广大读者和出版者的要求,增补了工业微生物育种的前沿技术,包括:工业微生物基因组改组育种、工业微生物分子定向进化育种及工业微生物学高通量筛选技术等章节,还补充了诸多应用实例,使该书更能反映近年来工业微生物育种的最新技术。该书第三版系统地保留了前二版的理论与实践、技术与实例、原理与应用有机融合的优点,具有很强的实用性,除作为高等院校生物工程类教材外,还深受生物技术研究单位以及工厂企业的研究人员和工程技术人员的欢迎,使他们在研发和生产过程中受益。

该书是目前我国工业微生物育种领域的一部好书,我乐之为其作序,我深信该书的再版一定能进一步得到广大读者的喜爱,并将对我国工业微生物育种的发展作出更大的贡献。



于上海交通大学  
2008年10月

## 第三版前言

《工业微生物育种学》(第二版)于2002年初夏定稿,2003年1月由科学出版社出版,至今已有5年。在这5年中,该书已印刷8次,发行量超过2万册,受到了广大读者的欢迎。

基于本领域5年来无论在研究技术路线、具体研究方法以及生产应用实例等方面均有很大的进展,从编写者角度看,第二版所包括的内容已不能适应工业微生物育种现有的发展现状,还需补充新鲜内容。与此同时,福建师范大学获准立项组建工业微生物教育部工程研究中心与福建省现代发酵技术工程研究中心,并与福建麦丹生物集团有限公司、厦门金达威维生素集团有限公司、国际安发科技集团以及深圳绿微康生物工程有限公司等建立产学研基地,在承担国家及省部级诸多项目攻关和研发过程中,也积累了一定的工业微生物育种的新经验和新模式,还需加以总结和归纳。正在此时,科学出版社根据本书印刷次数和发行数量的不断增加,结合近年来本学科发展的实际需要,提出本书第三版的出版框架意见,并很快付诸实施。

为此,在强化本书编写力量的基础上,除对第二版内容作必要的修改和调整外,结合编写者自身的研发实践,着重增加了“微生物基因组改组育种”、“分子定向进化育种”、“高通量筛选技术”、“极端环境微生物的分离筛选”、“生物可降解塑料菌株的分离筛选”以及“微生物发酵过程优化的响应面试验设计”等章节。

在本书再版编写过程中,中国科学院院士、上海交通大学邓子新教授给予了全程的支持和关心,并在本书第三版出版之际,为本书作序,在此深表谢意!

在本书第三版编写过程中,虽尽力注意补充最新的研究成果,收集更多研究方法并充实生产实例,但由于时间紧迫和水平有限,不足之处难免存在,敬请读者谅解和指正。

编著者

于福州仓山华庐

2008年中秋

## 第二版序

现代生物技术的进展,使愈来愈多的产品可以通过生物技术来生产,工业微生物菌种无疑是生物技术产品生产的关键。工业微生物菌种的选育,不仅可提高目的物的产量,使目的物产量上百倍上千倍的提高,大大降低生产成本,提高经济效益;通过工业微生物菌种的选育,还可简化工艺,减少副产物,提高产品质量,改变有效成分组成,甚至获得活性更高的新组分,因此工业微生物育种深受人们的广泛关注和重视。

由施巧琴、吴松刚教授编著的《工业微生物育种学》一书第一版出版以来深受广大工业微生物育种工作者的欢迎,作者不仅论述了工业微生物育种的基本理论,而且还通过许多育种的实例介绍育种的技术路线和选育的具体方法,密切联系生产实际,有很好的实用性,使该书不仅成为大学本科生和研究生的教材和参考书,而且也是工业生产第一线从事工业微生物育种的科技人员的重要参考书。该书第一版出版10年来已经为我国工业微生物的发展、提高我国生物技术产品的经济效益起到了很好的作用,我深信:施巧琴、吴松刚教授在近年来工业微生物育种取得新成就的基础上,再版该书,将受到我国新一代工业微生物育种工作者和广大读者的欢迎,也必将对我国工业微生物产业的发展、进一步提高工业微生物产业的经济效益起很大的作用。

沈鱼初

2002年11月20日

## 第二版前言

《工业微生物育种学》第一版于1990年初夏定稿,1991年12月由福建科学技术出版社出版,至今已10周年。

在这10年中,本领域发生了很大的变化:

其一,工业微生物育种又有了新的进展,取得了令人鼓舞的成就,丰富了工业微生物育种学的内容。尤其基因工程菌的构建及其应用,不但有许多成功的实例,而且很具有生命力。

其二,我国本领域学者已有新作问世,如岑沛霖、蔡谨编著的《工业微生物学》、陶文沂主编的《微生物生理及遗传育种》等,相比之下,第一版书中的内容显得有局限性和陈旧感,必需修订、补充。

其三,本书第一版在我国发行10年来,读者多达数千人,包括有高等院校相关专业的教师和学生;相关研究单位的科技人员;相关工厂企业的工程技术人员以及技术管理部门的相关人员。本书既作为教科书,又作为参考书,目前已无存书。不同人群、不同专业对本书内容要求不同,但普遍认为本书基本上做到了:理论与实践、技术与实例、原理与应用三并重,具有科学性、系统性、广泛性和实用性等特点。希望能够再版,并补充新鲜的有实用价值的内容。

基于以上几点,本书再版已势在必行。正在此时,科学出版社的谢灵玲编辑给予极大的支持,构思了本书再版的框架,并付诸于实施,十分感谢!

福建师范大学生物工程学院和福建师范大学生物工程研究所,在我国近十年的改革开放浪潮中,已培养出一批有作为的中青年骨干教师,他们既是课堂知识的传播者,又是科技成果转化为生产力的实践者,既有基础理论,又有实际经验。在本书再版之时,我们组织了本院所的16位中青年教师参加了本书再版的编写工作,希望这些补充修改的内容有助于本书质量的提高。

我国著名工业微生物学家陈驹声教授在他92岁高龄时为本书第一版写了序言。不幸在本书出版时,他离开了我们。我们时刻怀念陈驹声先生,他的渊博学识、胸怀大志、关心晚辈的高尚品质将永远留在我们心中。

在本书再版之时,承蒙我国著名工业微生物学家、中国工程院院士、浙江工业大学校长沈寅初教授为本书作序,在此深表谢意!

在本书再版编写过程中,虽经多次修订补充,但由于水平有限,缺点错误难免,敬请读者指正。

编著者  
于福州仓山华庐  
2002年初夏



## 第一版序

我国利用微生物酿造各种食品已有数千年历史,闻名于世界,形成了具有特色的传统发酵。新中国成立之后,不但传统酿造得到改良,而且新兴了抗生素、酶制剂、氨基酸、有机酸、核酸类物质、酒精、甾体激素、维生素、赤霉素等发酵工业,形成了工业微生物的新体系。笔者20世纪70年代以来亲历其事,深知近代工业微生物发展的原因所在。

工业微生物菌种选育所取得的成就,对微生物工业的发展起了极为重要的推动作用。例如,1929年,英国弗莱明发现青霉素后,通过菌种选育,使发酵单位提高1000倍以上。1955年,日本首先发现谷氨酸产生菌,实现了发酵法生产味精,再经选育,可以产生赖氨酸、苏氨酸发酵产品。1981年,吴松刚教授从我国土壤中分离出灰黄霉素野生型菌株4541,经耐前体抗性选育,获得D-756变株。短短6年,发酵单位提高60倍以上,跃居世界领先水平。这都说明工业微生物育种的重要性。

工业微生物育种到目前为止,仍是以使用物理诱变、化学诱变或两者复合诱变的诱变育种作为最主要的方法,原生质体融合方法较为简便,已为工业微生物育种工作者所通用。体外基因重组方法虽为先进的定向育种,但目前应用此法选育菌种尚在积极研究之中。

福建师范大学生物工程研究所吴松刚教授和施巧琴教授有鉴于此,在多年来讲授工业微生物育种学基础上,结合他们自己的科研实践和科研论文,编写成这本《工业微生物育种学》。该书理论与实践并重,方法与实例并重,重点阐述诱变育种、杂交育种和代谢控制育种这三大育种原理和技术。该书既可作为高等院校的教科书,又可作为工业微生物生产厂家和科研单位的参考书,笔者深信此书的出版发行,对我国近代工业微生物学发展将起促进作用。是为序。

九十二叟 陈驹声

写于上海科技大学生物工程系

1990年6月

## 第一版前言

工业微生物育种所取得的成就,导致了微生物工业发展的飞跃。这是已经存在的现实,并且越来越显现出巨大的生命力。

就工业微生物育种本身而言,无论其方法、内容以至技术路线,都日新月异,进展惊人,逐步形成了独立的体系——工业微生物育种学。编者希望,这本书能够以微生物遗传学为理论基础,尽可能突出工业微生物育种的主要方法和手段——诱变育种、杂交育种和代谢控制育种。至于基因工程技术,暂不列入本书的内容,拟在有较多成功实例的情况下,再另册撰写。本书力求做到既有方法,又有实例,能反映出国内外先进水平和最新进展,力争做到系统性、条理性和科学性融为一体。

本书系我们在福建师范大学生物工程学院为工业微生物专业学生和微生物生化硕士研究生讲授工业微生物育种学的基础上,参阅大量国内外有关资料并结合自己的科研实践而写成的,虽然已修改过多次,但由于水平所限,书中缺点错误难免,敬请读者批评指正。

本书编写过程中,承蒙福建师范大学微生物工程研究所陈松生副教授和李惠珍教授等提出宝贵意见。福建师大附中温青老师为本书绘制了全部插图。我国著名工业微生物学家、上海科技大学生物工程系陈驹声教授专为本书写了序言,在此一并致谢。

编著者

于福州仓山意园

1990年初夏

# 目 录

第三版序	
第三版前言	
第二版序	
第二版前言	
第一版序	
第一版前言	
<b>第一章 绪论</b> .....	1
第一节 工业微生物育种在发酵工业 中的地位 .....	1
第二节 工业微生物育种的进展 .....	1
<b>第二章 遗传物质的基础</b> .....	4
第一节 染色体 .....	4
一、染色体形态 .....	4
二、原核生物及病毒染色体结构 .....	5
三、真核生物染色体结构 .....	6
四、染色体数目 .....	6
第二节 核酸 .....	8
一、核酸 .....	8
二、RNA .....	8
三、DNA .....	9
第三节 基因的组织与结构 .....	10
一、基因组 .....	10
二、基因 .....	11
三、遗传密码 .....	12
<b>第三章 基因突变</b> .....	15
第一节 突变的分子机制 .....	15
一、基因突变 .....	16
二、染色体畸变和染色体组变 .....	18
第二节 突变引起遗传性状改变 .....	19
一、突变引起遗传性状改变 .....	19
二、突变型的种类 .....	21
第三节 突变体的形成 .....	24
一、突变体的形成过程 .....	25
二、突变的修复 .....	26
三、突变的表型效应 .....	31
四、表型延迟 .....	32
<b>第四章 工业微生物育种诱变剂</b> .....	34
第一节 物理诱变剂 .....	34
一、物理诱变剂的生物学效应 .....	34
二、非电离辐射——紫外线 .....	35
三、电离辐射 .....	38
四、近年来发展的新型物理诱变剂 .....	40
第二节 化学诱变剂 .....	41
一、碱基类似物 .....	42
二、烷化剂 .....	45
三、脱氨剂(以亚硝酸为例) .....	50
四、移码诱变剂 .....	52
五、羟化剂(以羟胺为例) .....	53
六、金属盐类 .....	53
七、其他化学诱变剂 .....	54
八、化学诱变剂的安全操作 .....	54
第三节 生物诱变剂 .....	56
一、噬菌体 .....	56
二、基因诱变剂 .....	56
<b>第五章 工业微生物产生菌的分离筛选</b> .....	59
第一节 含微生物样品的采集 .....	59
一、从土壤中采样 .....	59
二、根据微生物生理特点采样 .....	61
三、特殊环境下采样 .....	62
第二节 含微生物样品的富集培养 .....	62
一、控制培养基的营养成分 .....	63
二、控制培养条件 .....	63
三、抑制不需要的菌类 .....	64
第三节 好氧微生物的分离 .....	64
一、稀释涂布和划线分离法 .....	65
二、利用平皿中的生化反应进行分离 .....	65
三、组织分离法 .....	68

四、单细胞或单孢子分离法 .....	69	养条件 .....	94
五、通过控制营养和培养条件进行 分离 .....	69	第二节 诱变育种的步骤与方法 .....	94
第四节 厌氧微生物的分离 .....	71	一、出发菌株 .....	94
一、厌氧培养中几种除氧方法 .....	71	二、出发菌株的纯化 .....	97
二、红螺菌的分离 .....	72	三、单孢子(或单细胞)悬液的制备 .....	98
三、反硝化细菌的分离 .....	73	四、诱变剂及诱变剂量 .....	100
四、脱氮硫杆菌的分离 .....	74	五、诱变剂的处理方式 .....	103
五、乳酸菌的分离 .....	74	六、影响突变率的因素 .....	106
第五节 野生型目的菌株的筛选和菌 株鉴定 .....	76	第三节 突变株的常规分离与筛选 .....	107
一、初筛 .....	76	一、诱变育种的基本环节 .....	108
二、复筛 .....	77	二、筛选的程序 .....	109
三、菌株鉴定 .....	77	三、分离和筛选 .....	110
第六节 极端环境微生物的分离筛选 .....	78	四、摇瓶液体培养 .....	115
一、极端环境微生物的采样、分离 筛选 .....	78	五、产物活性测定 .....	116
二、极端微生物酶分子生物学研究 .....	82	六、摇瓶数据的调整和有关菌株特性 的观察分析 .....	118
第七节 生物可降解塑料(PHA)菌株 的分离筛选 .....	83	七、培养基和培养条件的调整 .....	118
一、生物可降解塑料概况 .....	83	八、变种的特性研究与鉴定 .....	119
二、获得生物可降解塑料的微生物途 径和菌株分离方法 .....	84	九、诱变育种实例 .....	120
三、PHA的合成机制和发酵特点 .....	86	第四节 营养缺陷型菌株的筛选 .....	122
第六章 工业微生物诱变育种 .....	88	一、营养缺陷型菌株的分离和筛选 .....	123
第一节 诱变育种的试验设计和准备 工作 .....	89	二、营养缺陷型突变株的应用 .....	130
一、诱变前对出发菌株的了解 .....	90	第五节 温敏突变株的筛选 .....	130
二、全面了解菌种特性及其与生产 性能的关系 .....	91	一、温敏突变株的特性 .....	130
三、了解影响菌种生长发育的主要 因素 .....	92	二、温敏突变株的筛选方法 .....	131
四、了解菌种有效产物中的各种组分 在代谢合成过程中与培养条件的 关系 .....	93	三、温敏突变株在发酵工业中的应用 .....	133
五、建立一个准确、简便、快速检测产 物的方法 .....	94	第六节 抗噬菌体菌株的选育 .....	136
六、研究最佳的菌种保藏培养基和培 养条件 .....	94	一、烈性噬菌体及其效价的测定 .....	136
		二、温和性噬菌体及溶源菌 .....	138
		三、抗噬菌体菌株的选育 .....	139
		四、抗性菌株的特性研究 .....	140
		五、抗噬菌体菌株选育的实例 .....	141
		第七节 微生物发酵过程优化的正 交法 .....	143
		一、正交的含义 .....	143
		二、正交试验设计方法 .....	143

三、正交试验结果 .....	145	五、杂交育种方法 .....	197
第八节 微生物发酵过程优化的响应		第二节 放线菌杂交育种 .....	197
面法试验设计 .....	148	一、放线菌细胞结构与繁殖 .....	197
一、微生物发酵过程优化过程概述	148	二、放线菌杂交概况和原理 .....	198
.....	148	三、放线菌的杂交技术 .....	201
二、响应面法 .....	149	第三节 酵母菌的杂交育种 .....	206
三、响应面法的应用实例 .....	150	一、酵母菌的细胞结构和菌落形态	207
<b>第七章 工业微生物代谢控制育种</b> .....	155	.....	207
第一节 概论 .....	155	二、酵母菌的生活史和繁殖方式	207
一、初级代谢产物和初级代谢 .....	156	.....	207
二、次级代谢产物和次级代谢 .....	156	三、酵母菌的杂交 .....	207
三、初级代谢与次级代谢的关系 .....	156	第四节 霉菌杂交育种 .....	209
第二节 初级代谢的调节控制 .....	157	一、霉菌的细胞结构和繁殖 .....	210
一、酶合成的调节 .....	158	二、霉菌杂交的原理和杂交技术	210
二、酶活性的调节 .....	161	.....	210
三、反馈阻遏与反馈抑制的比较	165	三、高产重组体的筛选 .....	219
.....	165	<b>第九章 工业微生物原生质体育种和原</b>	
第三节 次级代谢的调节控制 .....	166	<b>生质体融合育种</b> .....	221
一、次级代谢产物的诱导调节 .....	167	第一节 原生质体育种 .....	221
二、次级代谢产物碳源分解调节 .....	167	一、原生质体再生育种 .....	221
三、次级代谢产物氮源分解调节 .....	168	二、原生质体诱变育种 .....	222
四、次级代谢反馈调节 .....	169	三、原生质体转化育种 .....	225
五、磷酸盐的调节 .....	170	四、原生质体融合育种 .....	225
六、细胞膜透性的调节 .....	171	五、其他微生物原生质体育种 .....	225
第四节 代谢调节控制育种 .....	171	第二节 微生物原生质体融合育种	226
一、组成型突变株的选育 .....	172	.....	226
二、抗分解调节突变株的选育 .....	173	一、直接亲本及其遗传标记的选择	228
三、营养缺陷型在代谢调节育种中	177	.....	228
的应用 .....	177	二、原生质体制备与再生 .....	228
四、渗漏缺陷型在代谢调节育种中	181	三、原生质体融合 .....	236
的应用 .....	181	四、融合体再生 .....	239
五、抗反馈调节突变株的选育 .....	182	五、融合重组体检出与遗传特性分析	242
六、细胞膜透性突变株的选育 .....	191	.....	242
七、其他抗性突变株的选育 .....	192	六、原生质体融合的应用 .....	245
<b>第八章 工业微生物杂交育种</b> .....	193	第三节 细菌原生质体融合育种 .....	246
第一节 微生物杂交 .....	193	一、概述 .....	246
一、杂交的意义 .....	193	二、细菌原生质体融合育种一般程序	248
二、微生物杂交育种基本程序 .....	193	.....	248
三、杂交过程中亲本和培养基的选择	194	三、细菌原生质体融合育种技术	248
.....	194	.....	248
四、杂交育种的遗传标记 .....	195	第四节 放线菌原生质体融合育种	

.....	252	四、连接酶、激酶及磷酸酶 .....	296
一、放线菌细胞壁组成、结构及水解 .....	253	五、核酸酶 .....	296
二、放线菌原生质体融合育种技术 .....	253	第四节 基因工程的主要步骤 .....	297
第五节 酵母菌原生质体融合育种 .....	257	一、DNA 的制备 .....	297
一、酵母菌细胞壁结构和遗传标记 .....	257	二、目的基因的产生与分离 .....	299
二、酵母菌原生质体融合育种技术 .....	258	三、DNA 的连接 .....	301
第六节 霉菌原生质体融合育种 .....	261	四、重组体导入大肠杆菌 .....	301
一、霉菌原生质体融合育种程序 .....	262	五、含重组质粒的细菌菌落的鉴定 .....	303
二、培养基及相关溶液 .....	262	六、目的基因的表达 .....	304
三、霉菌原生质体融合的关键步骤 .....	262	第五节 基因定位诱变 .....	306
第十章 微生物基因组改组育种 .....	268	一、定位诱变方法 .....	307
第一节 微生物基因组改组育种意义和原理 .....	268	二、将变异基因送回染色体 .....	310
一、基因组改组育种概述 .....	268	第十二章 分子定向进化育种 .....	313
二、基因组改组育种技术基本原理 .....	269	第一节 理性设计 .....	313
第二节 基因组改组育种技术及应用实例 .....	271	一、寡核苷酸引物介导的定点突变 .....	314
一、基因组改组育种技术 .....	271	二、PCR 介导的定点突变 .....	315
二、基因组改组育种技术应用实例 .....	272	三、盒式突变 .....	317
第十一章 基因工程育种 .....	276	第二节 非理性设计——蛋白质(酶)分子定向进化技术 .....	317
第一节 概述 .....	276	一、蛋白质(酶)分子定向进化的发展 .....	317
一、基因工程在微生物育种中的应用 .....	276	二、蛋白质(酶)分子定向进化策略 .....	318
二、基因工程原理和步骤 .....	278	三、定向进化文库的筛选方法 .....	327
第二节 基因工程载体 .....	279	四、酶分子工程的应用和发展前景 .....	328
一、质粒载体 .....	280	第十三章 高通量筛选技术 .....	331
二、 $\lambda$ 噬菌体载体 .....	286	第一节 常用仪器设备 .....	331
三、柯斯质粒载体 .....	289	一、微孔板 .....	331
第三节 基因工程所用的酶 .....	291	二、微孔板恒温振荡培养器 .....	332
一、限制性内切核酸酶 .....	291	三、多通道移液器 .....	332
二、DNA 聚合酶 .....	293	四、连续移液器 .....	332
三、依赖于 DNA 的 RNA 聚合酶 .....	295	五、多道连续移液器 .....	333
		六、全自动移液工作站 .....	333
		七、酶标仪(微板光度计) .....	334
		八、流式细胞仪 .....	334
		九、条形码 .....	335
		十、数据分析软件 .....	336
		第二节 高通量筛选技术中的常用 .....	

---

方法 .....	337	.....	346
一、微孔板的使用和光学检测法 .....	337	第一节 菌种的退化与复壮 .....	346
二、工程菌菌体裂解 .....	337	一、菌种退化的原因 .....	347
三、报告基因 .....	338	二、菌种退化的防止 .....	349
四、流式细胞术 .....	341	三、菌种的复壮及其方法 .....	352
五、蛋白质芯片 .....	342	第二节 工业微生物菌种的保藏 .....	353
第三节 高通量筛选应用实例 .....	343	一、菌种保藏 .....	353
一、漆酶的筛选 .....	343	二、菌种保藏注意事项 .....	364
二、OmpT 蛋白酶的筛选 .....	344	三、目前国内外主要菌种保藏机构 .....	365
第十四章 工业微生物菌种复壮与保藏 .....		参考文献 .....	368

# 第一章 绪 论

## 第一节 工业微生物育种在发酵工业中的地位

工业微生物菌种选育在发酵工业中占有重要地位,是决定该发酵产品能否具有工业化价值及发酵过程成败与否的关键。现代发酵工业之所以如此迅猛发展,除了发酵工艺改进和发酵设备更新之外,更重要的是由于进行了菌种的选育及其改良,为发酵工艺提供了人类需要的各种类型的突变菌株,从而使抗生素、酶制剂、氨基酸、有机酸、维生素、核苷酸、激素、色素、生物碱、不饱和脂肪酸以及其他生物活性物质等产品的产量成倍甚至成千倍地增长,同时产品的质量也不断提高。因此,工业微生物育种对于提高发酵工业产品的产量和质量,进一步开发利用微生物资源,增加发酵工业产品的品种,具有重大意义。

用于工业生产的微生物菌种,要具有以下特性:

- (1) 在遗传上必须是稳定的。
- (2) 易于产生许多营养细胞、孢子或其他繁殖体。
- (3) 必须是纯种,不应带其他杂菌及噬菌体。
- (4) 种子的生长必须旺盛、迅速。
- (5) 产生所需要的产物时间短。
- (6) 比较容易分离提纯。
- (7) 有自身保护机制,抵抗杂菌污染能力强。
- (8) 能保持较长的良好经济性能。
- (9) 菌株对诱变剂处理较敏感,从而可能选育出高产菌株。
- (10) 在规定的时间内,菌株必须产生预期数量的目的产物,并保持相对地稳定。

具备以上条件的菌株,才能保证发酵产品的产量和质量,这是发酵工业的最大目的和最低要求。野生型菌株是不可能具备上述条件的,必须通过对野生型菌株的选育才能实现。发酵工业为人们提供了各种各样的发酵产品,而工业微生物育种为发酵工业的上述贡献奠定了必不可少的基础。

## 第二节 工业微生物育种的进展

工业微生物育种,无论从自然变异中选择或是人工诱变的选择,都是建立在遗传和变异的基础上。遗传和变异是生物界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,变异也无法积累。同样,就优良菌株的选育来讲,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,工业微生物育种学是建立在微生物遗传学基础上,而两者是相辅相成的。

微生物本身,在漫长的进化过程中,达到适合于它的生存和繁衍的水平。野生型微生物经自然选择,能适应它的周围环境,能适应同其他物种的竞争,但却不能按人的意志生产人们需要的物质。因此,从人类的利益出发,须对工业微生物菌种进行改良,使之产生数量远远超



出微生物本身需要的物质,或者不是它正常产生的新物质。

对工业微生物菌种进行有目的的改良,是在有关微生物遗传学知识被人们了解并掌握之后才成为可能的。同时,这种改良涉及多学科领域。

1927年,发现了X射线诱发突变。1945年后,各种具有诱变能力的辐射和化学诱变剂的发现,为这种改良提供了非常有用的工具。通过诱变和筛选的“随机选择”,不仅在提高现有产品的发酵单位上发挥了巨大作用,而且在当前多种新发酵产品的改进方面也具有很大潜力。通过对诱变作用和DNA修复机制的深入了解,可以设计出所希望的突变型的最佳方案。对基因表达和代谢途径调控机制的进一步阐明,可以设计出使所需要的突变特性得以充分表达的筛选条件。自动仪表装置和微机的应用,则可使单位时间内获得分离的菌株数量大大增加。这些技术的综合应用,使获得优良菌株的概率大为提高。

工业微生物育种技术的发展,大致经历如下阶段:

随着微生物学的发展,特别是发明微生物纯种培养法之后,开始了微生物纯种的自然选育,对工业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。这是最早应用微生物遗传学原理于微生物育种实践而提高发酵产物水平的一个成功实例。自然选育方法虽已沿用多年,迄今仍是工业微生物育种的手段之一。

由于自然突变频率低,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。继而进行了人工诱变选育,取得了很大效果。

20世纪40年代初,Beadle和Tatum采用X射线和紫外线等辐射因子来诱变红色面包霉等,获得了各种代谢障碍的变株,并于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,使遗传学从细胞水平发展到分子水平,促进了工业微生物育种技术的发展。

诱变育种是以人工诱变基因突变为基础的,过去是工业微生物育种的主要方法,至今仍是世界各国行之有效的重要方法,尤其发酵工业中的各种优良高产菌株绝大部分都是以诱变育种方法获得的。

如抗生素生产中的青霉素产生菌特异青霉(*Penicillium notatum*)是1929年英国Fleming发现的。当时表层培养只有1~2 U/ml,1943年美国北部地区研究所实验室分离出产黄青霉(*Pen. chrysogenum*) NRRL9551同时伴以沉没培养成功,达到20 U/ml,在此基础上,经过四十多年的诱变育种,到目前已达60 000 U/ml以上,比原始菌株的产量提高了上千倍。至于其他抗生素品种如链霉素、土霉素、四环素、红霉素及灰黄霉素等,都由原来的几十单位提高到目前的几万单位。

除抗生素外,其他许多重要发酵产品也都由于进行了有效的菌种选育工作,在产量和质量上都取得明显的提高,其主要手段也都是诱变育种。

但是,某一菌株长期使用诱变剂处理之后,除产生诱变剂“疲劳效应”外,还会引起菌种生长周期的延长、孢子量减少、代谢减慢等,这对发酵工艺的控制是不利的。而杂交育种可以作为育种的另一手段,其成功不仅表现在种内杂交上,而且在种间杂交以至属间杂交都取得令人满意的结果。

杂交育种的最主要目的在于把不同菌株的优良经济性状集中于重组体中,克服长期用诱变剂处理造成的上述缺陷,同时杂交还是增加产品新品种的手段之一。当然,杂交育种也应当建立在诱变育种的基础上,没有诱变育种,杂交菌株的产量是难以继续提高的。

代谢控制育种以20世纪50年代末谷氨酸发酵取得成功使发酵工业进入第三转折期——代谢控制发酵时期,并在其后的年代里得到飞跃的发展。