

# 工业微生物生理 与遗传育种学

● 陶文沂 主编



中国轻工业出版社

# 工业微生物生理与遗传育种学

陶文沂 主编

陶文沂 周婉冰  
张星元 丁友昉 编著

中国轻工业出版社

**图书在版编目 (CIP) 数据**

工业微生物生理与遗传育种学/陶文沂主编. —北京:  
中国轻工业出版社, 1997. 6  
ISBN 7-5019-2066-4

I. 工… II. 陶… III. ①发酵-微生物-生理学②发酵-  
微生物-菌种-遗传育种 IV. TQ920.1

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (97) 第 04137 号

责任编辑: 唐是雯

中国轻工业出版社出版发行

(100740 北京市东长安街 6 号)

中国人民警官大学印刷厂印刷 新华书店经销

1997 年 6 月第 1 版 1997 年 6 月第 1 次印刷

开本: 787×1092 1/16 印张: 29.25

字数: 690 千字 印数: 1—3000 册

定价: 48.00 元

ISBN 7-5019-2066-4/Q·004

## 前 言

微生物育种离不开生理学和遗传学,因为育种是建立在生理学和遗传学的基础上的,这是多年来微生物发酵工程发展中积累的宝贵经验。诱变育种是在遗传学指导下进行诱变,在生理要求下进行选育和培养,务求发挥菌株的最大潜力。显然,在发酵工程、生物工程、微生物等专业,设立“工业微生物生理与遗传育种学”这一课程是十分必要的。

我们从当代生物工程各个方面来考虑,遗传育种与生理是不能分离的。例如单细胞蛋白(SCP)是生物量的积累,也是最简单的生物技术,但要获得最高生物量,营养要求、温度、供氧以及连续培养等生理知识都是必要的。代谢产物(初级代谢和次级代谢)的积累,更是远为复杂的生理过程,特别是抗生素这类次生代谢产物,它们的合成包括复杂的代谢途径和不同水平的调节。初级代谢产物如氨基酸发酵的育种,主要是解除合成途径关键酶的反馈抑制,常规方法是诱变后,选育对拮抗物有抗性的突变株。基因工程增加合成基因拷贝数,也必须在解除反馈作用的受体菌中才显示其作用。所以,氨基酸的诱变育种、抗性选育和基因拷贝数的增加两者是不可缺少的,近年,基因工程(重组DNA技术)的应用推进了抗性育种的效果,致使有的氨基酸,如赖氨酸达到120g/L的水平。次生代谢产物的育种更为复杂,调节有全局性调节(global control)和途径专一性调节(pathway specific control),后者尚有正的和负的调节之不同。当然,一个途径中还存在起到“瓶口”作用的关键酶,其基因拷贝数的提高可以大幅度提高产物的积累。尽管复杂,但诱变育种和基因工程的结合已看到成效。例如头孢菌素C的生产,由于一个关键酶(扩环酶)基因拷贝的提高,使一个生产菌株的头孢菌素C产量提高15%,这是常规遗传育种很难做到的。另一个显著的例子是调节基因的克隆,使泰乐霉素产量提高40%。所以,人们展望次生代谢产物的基因工程将使这类结构复杂、产值很高的产物发生革命性变革。但任何菌株的发酵都必须满足菌株的生理要求。

本书将生理学、遗传育种学基础知识,包括代谢调节、基因突变、基因重组、体外重组DNA技术等都作了详尽的介绍,对研究生和高年级生物技术专业的学生学习应该是重要的。本书最后一章还将工业微生物育种研究现状和进展进行了介绍,这为高年级从事论文和生产研究指明了方向。

总之,我认为这样的课程是重要的。本书的撰稿者,将老一辈的学识和经验,结合他们的心得写成这一教材是很有价值的。

焦瑞身

1996.10.16

## 内 容 简 介

本书是轻工高等院校工业发酵专业教材委员会组织编写的研究生教学用书。书中介绍了微生物生理学、遗传学和育种的基础理论、基本方法及进展情况，特别是针对工业生产上应用的微生物进行剖析，从细胞结构、微生物生长、分化、能量代谢出发，有机结合状态研究和改造，提出代谢调节育种的生理学依据和方案设计策略，进而从分子生物学水平系统介绍遗传育种原理和方法。内容包括：微生物细胞的结构与功能，微生物的营养及其输送，化能异养型微生物的代谢及细胞能学，微生物的代谢调节，菌种选育的生理学依据及选育方案的制订，基因突变及诱变育种，基因重组育种及遗传图谱研究，体外重组 DNA 技术基础，工业微生物育种研究现状和进展等。

本书内容全面系统，取材新颖，图文并茂，适用于发酵工程、微生物制药、生物化工等专业的研究生、本科生作为教科书，也可供有关研究人员、工厂技术人员参考。

# 目 录

## 第一章 绪 论

第一节 工业微生物生理与遗传育种学的研究对象和任务 .....	(1)
一、研究对象 .....	(1)
二、任务 .....	(1)
第二节 微生物生理与遗传育种学的发展 .....	(3)
一、微生物生理学的发展 .....	(3)
二、微生物遗传学和育种学的发展 .....	(4)
第三节 微生物生理与遗传育种的联系及对发酵工业的影响 .....	(6)
一、遗传物质的确证及其基本性质 .....	(6)
二、代谢调节理论与发酵工业 .....	(9)

## 第二章 微生物细胞的结构与功能

第一节 细胞结构的电子显微技术 .....	(11)
一、透射电子显微镜和扫描电子显微镜 .....	(11)
二、超薄切片技术 .....	(12)
三、冰冻蚀刻技术 .....	(13)
四、电镜细胞化学方法 .....	(15)
五、电镜下的微生物细胞 .....	(17)
第二节 微生物的细胞壁结构与功能 .....	(17)
一、细菌细胞壁 .....	(17)
二、酵母菌细胞壁 .....	(22)
三、霉菌细胞壁 .....	(23)
第三节 微生物的膜结构与功能 .....	(25)
一、生物膜的化学组成 .....	(25)
二、细胞膜的结构 .....	(27)
三、细菌质膜-间体系统的功能 .....	(30)
四、真核细胞的其它内膜与功能 .....	(31)
第四节 微生物的核结构 .....	(33)
一、原核生物的核质 .....	(33)
二、真核生物的细胞核 .....	(34)

三、原核生物与真核生物在遗传结构上的重要区别 .....	(39)
第五节 细胞质内的亚细胞结构 .....	(40)
一、线粒体 .....	(41)
二、核糖核蛋白体 .....	(46)
三、溶酶体和微体 .....	(47)
第六节 微生物细胞表面附属结构 .....	(48)
一、鞭毛和菌毛 .....	(48)
二、荚膜和粘液层 .....	(50)
第七节 细胞结构突变与菌种选育 .....	(51)
一、细胞壁缺陷——L型细菌 .....	(51)
二、酵母小菌落突变 .....	(52)

### 第三章 微生物的营养与生长

第一节 微生物的营养及其输送 .....	(53)
一、营养元素的生理功能 .....	(53)
二、营养物质跨膜输送机制 .....	(61)
三、物质输送的调节 .....	(68)
四、代谢产物的分泌 .....	(70)
第二节 细菌的生长与分化 .....	(75)
一、细胞结构的复制 .....	(75)
二、细胞分裂及控制 .....	(77)
三、形态分化及芽孢 .....	(80)
第三节 真核微生物的生长与分化 .....	(84)
一、细胞周期 .....	(84)
二、酵母菌的生长与分化 .....	(85)
三、霉菌的生长与分化 .....	(86)
第四节 微生物生长动力学 .....	(88)
一、分批培养 .....	(88)
二、连续培养 .....	(94)
三、补料分批培养 .....	(99)
第五节 极端微生物适应异常环境的机理 .....	(100)
一、极端微生物及其对环境的适应性 .....	(100)
二、嗜热性细菌和嗜冷性细菌 .....	(100)
三、嗜酸菌和嗜碱菌 .....	(104)
四、嗜盐细菌 .....	(105)
五、细菌的耐药机制 .....	(106)
六、对辐射损伤的修复 .....	(107)
七、利用异常环境选育菌种 .....	(108)

### 第四章 化能异养型微生物的代谢及细胞能学

第一节 葡萄糖分解代谢的主要途径 .....	(111)
------------------------	-------

一、EMP 途径 .....	(111)
二、HMP 途径 .....	(114)
三、ED 途径 .....	(116)
四、PK 途径 .....	(117)
五、葡萄糖直接氧化途径 .....	(119)
第二节 呼吸和发酵 .....	(120)
一、有氧呼吸作用 .....	(120)
二、无氧呼吸作用 .....	(123)
三、发酵作用 .....	(125)
第三节 生物能学和微生物能量产生的原理 .....	(132)
一、有关能量代谢的几个基本概念 .....	(132)
二、微生物进行生物氧化的细胞器及 ATP 合成酶 .....	(135)
三、电子传递链的组成及其功能 .....	(139)
四、电子传递链、ATP 合成酶及载体蛋白在膜上的分布 .....	(144)
五、化学渗透质子回路及其功能的有关讨论 .....	(146)
第四节 化能异养型微生物的降解代谢 .....	(148)
一、微生物的胞外酶对多聚物的水解 .....	(148)
二、化能异养型微生物对各种有机化合物的利用 .....	(150)
三、细胞内源化合物的氧化降解 .....	(163)
四、关于质粒编码 (Plasmid-encoded) 的降解代谢活性 .....	(163)
第五节 化能异养型微生物的合成代谢 .....	(164)
一、微生物对多糖的合成 .....	(165)
二、微生物对含氮有机化合物的合成 .....	(168)
三、微生物对脂类和类异戊二烯化合物的合成 .....	(172)
四、以葡萄糖为碳源合成微生物细胞物质时碳架物质的流动方向 .....	(175)

## 第五章 微生物的代谢调节

第一节 微生物细胞中代谢调节的部位 .....	(176)
一、原核生物细胞的代谢调节部位 .....	(176)
二、真核微生物细胞的代谢调节部位 .....	(177)
第二节 微生物代谢途径的调节模式 .....	(179)
一、影响酶活性的调节方式 .....	(179)
二、影响酶分子数的调节方式 .....	(183)
第三节 通过酶实现的代谢调节的机制 .....	(185)
一、基因及转录水平上的调节 .....	(185)
二、翻译水平上的调节 .....	(192)
三、蛋白质水平上的调节 .....	(194)
四、整个细胞水平的调节 (全局控制) .....	(201)
第四节 通过改变膜的选择性透性实现的调节 .....	(204)
一、膜脂质组成的调节 .....	(205)
二、膜蛋白对膜透性的调节 .....	(208)



三、细胞壁结构对膜透性的影响 .....	(210)
四、通过膜传递的环境条件对膜透性的调节 .....	(213)

## 第六章 菌种选育的生理学依据及选育方案的制订

第一节 微生物代谢体系及它们之间的相互关系 .....	(214)
一、微生物的主要代谢体系 .....	(214)
二、三种主要代谢体系的相互联系 .....	(215)
三、细胞经济及代谢产物在发酵液中的累积 .....	(216)
第二节 微生物的代谢流及代谢产物的过量合成 .....	(216)
一、微生物的代谢流 .....	(217)
二、微生物代谢产物的过量合成 (overproduction) .....	(218)
第三节 制订菌种改造方案的生理学依据和策略思想 .....	(222)
一、制订菌种改造方案的生理学依据 .....	(222)
二、菌种改造的策略及措施 .....	(231)
三、主动地开发利用微生物资源, 开创工业发酵新局面 .....	(236)
第四节 氨基酸高产菌种选育机理的研究和高产理想的实现 .....	(237)
一、谷氨酸产生菌及其有关突变株的代谢特性 .....	(238)
二、天门冬氨酸族氨基酸的育种原理分析 .....	(240)
三、氨基酸菌种选育的动向 .....	(243)

## 第七章 基因突变及诱变育种

第一节 自然环境中微生物性状的突变 .....	(245)
一、突变的种类 .....	(245)
二、自发突变及其可能机制 .....	(247)
三、自发突变的特点 .....	(252)
四、回复突变在工业发酵中的应用 .....	(253)
五、基因符号 .....	(254)
第二节 诱发突变及常规育种技术 .....	(255)
一、化学物质的诱变性能的检测 .....	(255)
二、诱发突变的过程及机制 .....	(257)
三、工业微生物诱变育种技术 .....	(268)

## 第八章 基因重组育种及遗传图谱研究

第一节 真菌的基因重组和遗传分析 .....	(273)
一、真菌的有性生殖 .....	(273)
二、真菌的准性生殖 .....	(286)
第二节 细菌接合及放线菌接合 .....	(292)
一、细菌的接合作用和遗传分析 .....	(292)
二、放线菌接合的特点 .....	(302)
三、采用接合技术进行育种 .....	(303)

第三节 转导	(303)
一、转导现象的发现及媒介物	(305)
二、普遍性转导机制	(316)
三、局限性转导机制	(317)
四、普遍性转导和局限性转导的比较	(319)
五、转导育种技术	(320)
第四节 转化	(321)
一、转化过程	(322)
二、转化过程的基因重组及育种	(330)
第五节 原生质体育种技术	(335)
一、原生质体融合育种	(335)
二、原生质体转化	(343)
三、原生质体诱变	(344)
第六节 遗传图的绘制及基因本质	(344)
一、遗传图的绘制	(344)
二、基因的精细结构分析及基因本质	(348)

## 第九章 体外重组 DNA 技术基础

第一节 染色体外遗传	(353)
一、染色体外遗传现象的判别依据	(363)
二、染色体外遗传物质的存在状态	(366)
三、染色体外遗传因子与核基因的相互作用及其进化	(373)
第二节 体外重组 DNA 技术的酶学	(373)
一、降解 DNA 的酶	(375)
二、合成 DNA 的酶	(375)
三、连接 DNA 的酶	(381)
第三节 载体	(381)
一、载体的制备及基本要求	(382)
二、质粒载体	(385)
三、噬菌体载体	(388)
四、载体的生物防范及保藏	(391)
第四节 重组 DNA 技术	(395)
一、目标 DNA 片段的获得	(395)
二、与载体的连接	(397)
三、引入宿主细胞	(400)
四、重组体的选择和鉴定	(401)
五、外源基因的表达	(402)
第五节 重组 DNA 技术在发酵工业上的应用	(404)
一、动物激素、干扰素类药物的生产	(407)

二、在常规发酵工业上的应用 .....	(405)
三、拷贝数及质粒的稳定性问题 .....	(407)

## 第十章 工业微生物育种研究现状和进展

第一节 细菌遗传育种进展 .....	(412)
一、芽孢杆菌育种 .....	(412)
二、假单胞菌育种 .....	(423)
三、其它细菌育种 .....	(429)
第二节 链霉菌遗传育种进展 .....	(430)
一、链霉菌的原生质体融合育种 .....	(430)
二、用作链霉菌克隆载体的质粒和噬菌体 .....	(431)
三、基因克隆技术在抗生素生产方面的研究 .....	(433)
四、链霉菌遗传工程的其它应用 .....	(434)
第三节 酵母菌遗传育种进展 .....	(435)
一、酵母原生质体融合和细胞融合技术 .....	(435)
二、酵母质粒和穿梭质粒 .....	(438)
三、嗜杀因子及在酵母育种中的应用 .....	(441)
四、脂质体中介的转化 .....	(445)
第四节 丝状真菌遗传育种进展 .....	(446)
一、 $\beta$ -内酰胺类抗生素生产菌株的遗传育种 .....	(447)
二、有机酸、酶及其它产物生产菌育种 .....	(450)
三、丝状真菌遗传转化育种 .....	(451)
主要参考文献 .....	(456)

# 第一章 绪 论

## 第一节 工业微生物生理与遗传育种学的研究对象和任务

### 一、研究对象

工业微生物生理与遗传育种学的研究对象是工业微生物。正如微生物一词并非生物分类学上的专门名词，而是对所有形体微小、单细胞的，或个体结构较为简单的多细胞的，甚或没有细胞结构的低等生物的统一统称。工业微生物是指在发酵工业上已经应用的或具有潜在应用价值的微生物，其范畴必然随着科学技术的发展而不断扩展。

工业微生物包括细菌、放线菌、酵母菌和霉菌，在某种意义上还包括病毒。

工业上应用的细菌发现较早的是醋酸杆菌、乳酸菌和酪酸梭菌等，目前在氨基酸、酶、有机酸、溶剂、抗生素等生产中使用的细菌、放线菌有假单胞菌科、棒杆菌科、乳杆菌科、丙酸杆菌科、肠杆菌科、芽孢杆菌科、链霉菌科诺卡氏菌等，其中绝大多数是异养型的。

在发酵工业中产值占很大比重的仍是酒和酒精工业，使用的主要是酿酒酵母及其变种，其它一些酵母菌还可用于甘油、饲料等生产。

霉菌的研究比细菌稍迟，但在工业上的应用历史悠久，其中重要的有曲霉、青霉、毛霉和根霉等属，在有机酸、酶、抗生素等工业上应用广泛，近年一些植物病菌如赤霉菌、麦角菌也已用于发酵工业以生产生长激素、生物碱等。

工业上应用的重要的病毒是指部分噬菌体，它们能对工业微生物起溶源或裂解作用，在微生物育种研究中人们利用它们作为媒介物进行基因转导及重组 DNA 的转染。

随着科学技术的发展，不仅是传统的和新型的发酵工业使用的微生物可称工业微生物，某些病原菌在严格控制的条件下可用来生产药物、遗传工程工具酶等，这些微生物也应属工业微生物范畴。

### 二、任 务

工业微生物生理与遗传育种学从字面看可以分为四个方面：

首先，研究的是工业微生物这一局部。

微生物生理学 (Microbial physiology) 是微生物学的一个分支，是从生理生化的角度研究微生物细胞的形态结构和功能，以及微生物生命活动规律的学科。

微生物遗传学 (Microbial Genetics) 是遗传学的一个分支，是以病毒、细菌、小型真菌以及单细胞藻类、原生动物的为研究对象，研究遗传和变异规律的学科。

育种 (breeding) 是指通过系统选择、诱变、杂交及体外基因重组等技术来培育具有人们所需特定遗传性质的生物的过程。育种学即育种的方法及原理。

综合上面四个方面, 工业微生物生理与遗传育种学作为工科院校发酵专业研究生的一门学位课, 融生理、遗传、育种于一体, 其任务是对发酵工业所涉及的主要微生物的生理与遗传现象作深入的探讨, 即研究微生物细胞结构、生长、代谢、调节等生理现象, 代谢产物积累、代谢途径的改变与微生物遗传的关系, 遗传变异的规律及育种技术在发酵工业上的应用。

细胞是微生物个体的基本结构单位, 对微生物细胞的细胞壁、细胞膜、细胞核以及某些细胞器等结构的深入研究, 不仅揭示了原核生物和真核生物, 革兰氏阳性细菌和革兰氏阴性细菌, 以及各种微生物之间的细胞结构和功能上的重要差异, 同时也为药物筛选、发酵工业条件控制、菌种改良等方面提供了理论依据。

新陈代谢是生物体与周围环境的物质交换, 是宇宙间普遍的不可抵抗的规律。新陈代谢包括分解代谢和合成代谢。分解代谢 (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, 它为细胞的合成代谢提供中间代谢物, 为细胞的生命活动和代谢活动提供能量, 不同的微生物、不同的环境条件可引起不同的分解途径, 产生不同的代谢产物, 这现象在理论研究和工业发酵实践上均有重要意义。合成代谢 (同化作用) 是指将简单化合物合成复杂的生物大分子物质的过程, 这些简单化合物可以由分解代谢提供, 或由环境提供, 这些生物大分子可以是细胞结构性大分子如细胞组分、细胞器等, 或者是功能性大分子如多糖、酶等。同样, 在不同的条件下, 不同微生物可进行不同的合成途径, 产生不同的合成产物。

生长繁殖是生物体的重要生理功能。微生物通过新陈代谢将外界营养物质转化为自身细胞物质, 个体长大或菌丝体延长, 质量增加, 并进行必需的细胞结构的复制和细胞分裂的过程称为个体生长。通过细胞分裂、孢子萌发或菌丝断裂等方式, 使群体数目增加称群体生长。生长的重要条件是适宜的环境不断提供营养, 使细胞在新陈代谢中同化作用的速度超过异化作用, 从而原生质总量增加, 出现生长。

新陈代谢是在酶催化下有序进行的生化反应, 它的突出特点是具有灵敏的自动调节, 对于环境给予的信号能在细胞的各种结构的协助下迅速作出反应。代谢调节控制酶的生物合成数量及酶的催化反应速度, 前者称反馈阻遏, 后者为反馈抑制。通过调节可保证生命活动的有序性, 生物对环境的适应性, 保证体内一系列复杂的代谢途径中数以千计的生物化学反应以精确的方式进行, “令行禁止”, 既保证了维持正常生命活动所需物质的合成, 又避免了浪费能量及原材料于合成多余的产物。微生物代谢调节机理的研究已为人类控制和利用微生物代谢活动、为现代发酵工业提供了理论依据。

微生物生理与遗传育种学既是应用科学, 又是基础理论科学。研究微生物的结构、生命活动规律、遗传规律等大大丰富了现代生物化学及分子生物学的概念, 对生物科学的基本理论研究作出了重要贡献。而正是这些理论与实践的结合导致了现代工业发酵的迅猛发展, 导致生物工程成为第三次工业革命的前沿技术之一。

## 第二节 微生物生理与遗传育种学的发展

### 一、微生物生理学的发展

关于微生物生理现象的初步知识是在人类与疾病作斗争及利用微生物酿造各种食品的过程中逐步积累起来的，这个过程可以追溯到纪元前数千年，但由于当时科学水平的限制，这些知识只能是经验性的。19世纪后期，巴斯德系统地研究了酒精、乳酸、丁酸等的发酵原理及某些疾病的病原微生物，奠定了微生物生理学的科学基础。Büchner证实酵母菌酒精发酵是酶的催化作用，将发酵生理和生物化学紧密联系起来，相互促进，推动了微生物生理学研究 and 发酵工业的发展。

20世纪开始，微生物学研究进入微生物基本生理机制·特别是代谢作用的研究阶段，在Cohn, Виноградский, Beijerinck, Kluyer, Stepheson和其它科学家的研究工作和科研思想推动下，微生物学和生物化学的联系愈来愈密切，生物化学上的许多基本机制的发现，如酵母酒化酶的分离（Büchner, 1897），有机辅酶的分离（Harden & Young, 1904），磷脂化作用的发现（Harden & Young, 1905; Lohman, 1929; Lipmann, 1941; Meyerhof, 1944等），生物氧化的脱氢作用（Weiland, 1913），活化氧分子的生物氧化作用（Warburg, 1920），细胞色素（Keilin, 1925），高能键（Lipmann, 1941）等均促进了微生物生理学的发展。而近代生物学研究技术的发展对于微生物生理学的发展更起到根本性的作用。

飞速发展的电子显微镜技术对于阐明细胞的功能与结构之间的关系起到决定性作用。在采用匀浆化及分级提取的方法研究细胞组成时，由于不同细胞的结构已经被严重破坏，无法确定结构与组分之间的关系。而应用现代电子显微镜技术就可免除上述人工损伤，在几分钟内即完成对细胞及其周围的半液态内含物的固定，使细胞器及其所附的大分子一如活时那样如实地保存下来，从而可以对细胞在接近于自然结构的情况下进行研究，为人们认识细胞的超显微结构及其功能，探讨生物微观世界提供了可能性。而DNA分子铺展技术的发现给电子显微镜应用于分子生物学研究开辟了方向，使长链DNA分子铺展于变性蛋白质单分子薄层上，用重金属真空喷涂，旋转投影，就可检查细菌、噬菌体的染色体结构，还可进行动态跟踪，观察到制备瞬间由噬菌体中释放出来的DNA。

超离心技术是纯化生物大分子及亚细胞部分的最有用技术之一。差级离心通过逐级提高离心速度（离心场强度），从而可以分离沉降速度差别在一个或几个数量级的颗粒。密度梯度离心通过介质的密度梯度来维持重力的稳定性，抑制对流，使比介质重的颗粒向下移动，而轻的向上漂浮，直至处于密度相同的区带内停止，形成沿密度梯度的不同密度颗粒的区带分离，可用于沉降速度差别较小的颗粒的分离。常用的介质有蔗糖（或甘油、Ficol），重金属盐。蔗糖先制成特定密度范围的不连续密度梯度或连续密度梯度，处于离心管上部的样品经离心后进入各自相同密度的区带中而分开。重金属盐如氯化铯可制成与样品分子密度相近的均一溶液，经较长时间离心后，盐分子在离心场中自行形成梯度，样品分子则呈区带分开，这种离心也称平衡密度梯度离心。

光谱技术用于研究化合物的结构和反应已有数十年，由于它一般不会损伤所研究的分子且易于精确化和自动化，因此对生物化学研究更为适宜。采用特殊的方法可以在相当不纯的系统中检测和分析含量极低的组分。可见光分光光度法可用于生物组分如蛋白质、肽、氨基酸、磷、糖类、核糖核酸、类固醇等的测定。紫外分光光度法用于DNA、蛋白质的扫描，定量及在线检测等。荧光光谱用于酶、蛋白质构象变化动力学研究、常规定量分析等。红外分光光度法及拉曼光谱可由偶极矩变化和极性变化的原子振动研究中大小分子的定性指数。原子吸收分光光度法和火焰分光光度法常用于金属元素。电子自旋共振波谱研究酶、自由基在环境中的变化。核磁共振波谱用于分子量小于20 000u ( $1u = 1.660540 \times 10^{-27} \text{kg}$ ) 的有机分子结构的研究。质谱用于微量物质 ( $10^{-6} \sim 10^{-9} \text{g}$ ) 定性及快速测定肽的一级结构等。

同位素技术在生物化学研究中常用于示踪代谢途径，在微生物培养环境中加入一种放射性物质，在不同时间取样，经提取、分离后定位放射性，从而得出有关代谢途径的重要资料，由此研究同化或异化过程，研究营养物质的吸收、转移的机制、途径和最终积累部位，研究特殊化合物的代谢周期。在酶催化反应中，利用同位素标记的底物可研究酶作用部位、机制等，并用于分子生物学的DNA顺序分析和基因探针。同位素技术中常用的测定方法有闪烁计数、放射自显影等。

层析技术是从混合物中分离纯化一种或几种化合物的一种方法。在生物化学上常利用的层析方法有吸附层析，离子交换层析，分配层析（如纸层析），气液层析，通透层析（如凝胶过滤），亲和层析，膜分离技术，高压液相色谱等，分别根据被分离物质的荷电情况、分子大小、在不同溶剂中的分配系数、与固定相的吸附或溶入情况、及特殊的亲和关系等分开不同的化合物。

电泳技术也是根据生物分子具有可电离基团，在溶液中能形成离子，不同分子由于电荷量的不同，分子大小的不同，因而荷质比不同，在电场中迁移状况不同而分离。利用某种物质掩盖生物分子原来所带电荷的区别，则电泳迁移状况只与分子大小有关，而可用于测定分子量（SDS—PAGE）。在pH梯度的介质中进行电泳分离时，各种生物分子移向与其等电点相一致的pH位置，由于在此位置分子不再呈现电性，从而不再在电场中泳动，由此可测定等电点及分离等电点不同的物质（等电聚焦）。

电位、电势、极谱技术，测压技术、超声破碎、染色技术等也广泛应用于生理学研究。这些技术使微生物生理学的研究水平逐步深入，由细胞到亚细胞水平、分子水平，由宏观的生长到能量代谢、物质代谢以及代谢调节机制的研究。随着量子力学的发展，科学家们正把生物学研究推向更高的水平——电子水平，量子力学创始人 Schrödinger 的名著《生命是什么》(What is life) 为物理学家和生物学家的结合，为微生物生理学的发展架起了桥梁，从电子结构来研究核酸组成及活性、蛋白质的性质、酶和底物的作用、酶与辅酶的作用、酶催化反应的特点、药物作用、变异等等，必将从新的高度推动微生物生理学的发展。

## 二、微生物遗传学和育种学的发展

遗传这个现象早在一万年前的新石器时代就已经引起了人们的注视，当时人们从野

生的生物培育家养动物和谷物，在繁殖有用的动植物变种方面作了种种努力。我国是世界上最早的作物和家畜的起源中心之一，在新石器时代的遗址中发现了粟、小麦和高粱的种子及家畜猪、羊、狗等骨头的化石。公元前几世纪在埃及与美索不达米亚已经对枣椰树进行人工授粉来育种，圣经上“毋令汝牝，配以异牡，毋令汝亩，植以异种”的戒条表明古代人对保持动植物纯系重要性的认识。但真正的遗传学研究才一个多世纪的历史，1865年，G. Mendel 在经过8年的科学研究的基础上发表了“植物杂交实验”，首次揭开了遗传的本质，创立了经典遗传学的两条基本规律。在细胞及染色体分裂现象发现后，人们把遗传与染色体联系起来，建立了染色体遗传学说。而 T. Morgan 的研究则证明了遗传物质在染色体上呈直线排列，利用遗传试验可以确定各个基因之间的距离，并发现基因交换现象，完善了经典遗传学。

微生物在自然界遗传和变异的现象早已引起人们注意并被用于生产实际，巴斯德曾经观察到炭疽杆菌 (*Bacillus anthracis*) 在高温中培养后，毒性大减而抗原性不变，这一变异被成功地用于制作疫苗。由于微生物细小，观察到的大量变异现象的本质久久没有揭开，本世纪40年代之前微生物学和遗传学间没有建立联系，微生物学家对于变异现象的认识仍然十分混乱及缺乏说服力。

40年代微生物遗传学的诞生建立于下面五个方面的成就之上：

1941年遗传学家 G. Beadle、生物化学家 E. Tatum 对链孢霉分生孢子进行 X 射线处理后成功地分离了一系列生化变异株——营养缺陷型，证明了某些代谢途径的阻断与某些突变基因之间的一一对应关系，使遗传学与微生物学、生物化学之间发生了联系，创立了用生化项目作为变异结果分析，进行基因作用机制研究及代谢途径阐明的新的有效的实验方法。

1943年 Delbrück 和 Luria 用严密的实验证实细菌的抗性是基因突变的结果，他们对于细菌变异的分析为微生物遗传研究提供了技术基础。

1944年 Avery 和他的同事发展了英国内科医生 Griffith 1928年对于肺炎球菌的转化实验，揭示了转化过程是由游离 DNA 作媒解物的，从而遗传物质的化学性质被发现。

1946年 Tatum 和 J. Lederberg 证明在细菌中也能发生遗传重组，即有性现象在最简单的生物中也有表现，两个不同遗传型的生化突变型细菌的培养物混合后，可分离出具有双亲基因的新类型，从而认为细菌也存在性别。

1946年 Delbrück 开展噬菌体遗传学研究，证明噬菌体也存在遗传重组现象。

微生物学、遗传学、生物化学等学科的汇合，结束了长期以来遗传学科之间分离的现象，并通过微生物遗传规律的研究推动了生化遗传学、分子遗传学以及遗传工程学的诞生和发展。

从那时以后的40多年中，微生物遗传学得到了迅速的发展，其中一些重要的研究成果有：1952年 N. Zinder 等描述了沙门氏菌的转导作用；1953年 Watson 和 Crick 提出 DNA 由嘌呤和嘧啶间的氢键连结的两个螺旋缠绕的链构成的模型；1955年 Benzer 研究出大肠杆菌噬菌体 T<sub>4</sub> 遗传物质的精细结构；1957年 Taylor 等使用氘化胸腺嘧啶作高分辨率放射自显影，以研究染色体复制机理；1958年 Crick 发现 tRNA；1961年，Jacob 和 Monod 提出操纵子学说；1966年 Gast 和 Yanofsky 确定大肠杆菌遗传图的阅读方向；



1967年 Goulian 等体外合成生物活性 DNA 成功;1968年 Hayes 鉴定第一个质粒 *E. coli* F 因子;1970年 Khorana 报道酵母丙氨酸 tRNA 基因全合成, H. Smith 等从流感嗜血菌 Rd 提取液中分离纯化一种限制性内切酶;1975年 Ames 试验法建立;Cohen 粘接两种不同性状的质粒成功,并转移到 *E. coli* 细胞中,杂种质粒能自我复制,表达两亲本质粒的遗传信息,这是遗传工程实验的首次成功;1975年 G. köhler 和 C. Milstein 建立淋巴细胞杂交瘤技术,用以产生单克隆抗体,引起免疫学的革命;F. Sanger 建立 DNA 顺序快速分析法;Southern 确立 DNA 转移技术;1976年 Fodor 和 Schaeffer 用 PEG 诱导细菌原生质体融合成功;1978年 K. Itakura 用大肠杆菌工程菌生产人胰岛素 A、B 链成功;Collins 和 Hohn 建立粘粒;1982年 OKayama 建立高效克隆全长双链 cDNA 的方法等等。这些成果同样也与生化实验技术的发展有密切联系。

必须指出,从发展的阶段看,是从经典遗传学到微生物遗传学到分子遗传学,但它们各自具有研究的侧重,不能代替。尽管目前在分子水平上研究遗传本质已经取得很大进展,但它只是在着眼点和研究方法上区别于微生物遗传学,它的研究材料大多数是微生物,而微生物遗传学虽然许多问题必须从分子水平去解决,但另一些问题仍须以个体为单位进行研究,因此微生物遗传学是不能被分子遗传学代替的一门独立学科。

我国自解放以来 40 多年中,微生物工作者对优良菌种的选育进行了大量的研究工作,取得了很大成就,有力地促进了抗生素、酶制剂、氨基酸、核苷酸发酵工业及酿造和食品工业的发展。在微生物遗传学基础理论研究方面,虽然同国际水平还有相当差距,但在某些方面有稳步进展,工作比较扎实,在突变、基因重组、质粒遗传、转座子遗传、噬菌体遗传、基因结构分析、核糖体遗传七个方面都取得很大的成就,以大量的资料为微生物遗传学发展作出贡献。

### 第三节 微生物生理与遗传育种的联系及对发酵工业的影响

#### 一、遗传物质的确证及其基本性质

确证遗传物质化学本质的三个著名实验是转化,病毒重建及噬菌体感染实验。

Avery 从 Griffith 对肺炎球菌的实验结果着手,进行转化因子化学本质的鉴定工作,他使用化学分离技术把无细胞提取物中各种组分加以分开,分别试验其转化能力,并使用酶技术进行逐一降解,以试验转化因子对哪一种酶敏感,由此确定 DNA 是转化因子。Taylor、Hotchkiss 等从另一些突变性状的试验也证明转化因子是 DNA,从而在 50 年代中期,肺炎球菌中遗传物质是 DNA 的观点得到广泛接受。

Fraenkel 和 Conrat 对烟草花叶病毒进行碱处理,分离蛋白质和 RNA 分子,证明蛋白外壳无感染能力,而纯化的 RNA 却能引起花叶病,由病灶上可获得完整的病毒颗粒,说明病毒各部分结构的信息来自 RNA 分子。用核糖核酸酶处理可消除 RNA 溶液的感染力而不影响完整的病毒颗粒的感染力,表明蛋白外壳能起保护作用。进一步用 TMV 的蛋白外壳和 HR 病毒的 RNA 合成杂种病毒,感染植株产生的病灶为 HR 型,分离得到的病毒其外壳是 HR 的外壳,表明病毒的遗传信息全部在它的 RNA 分子上。