



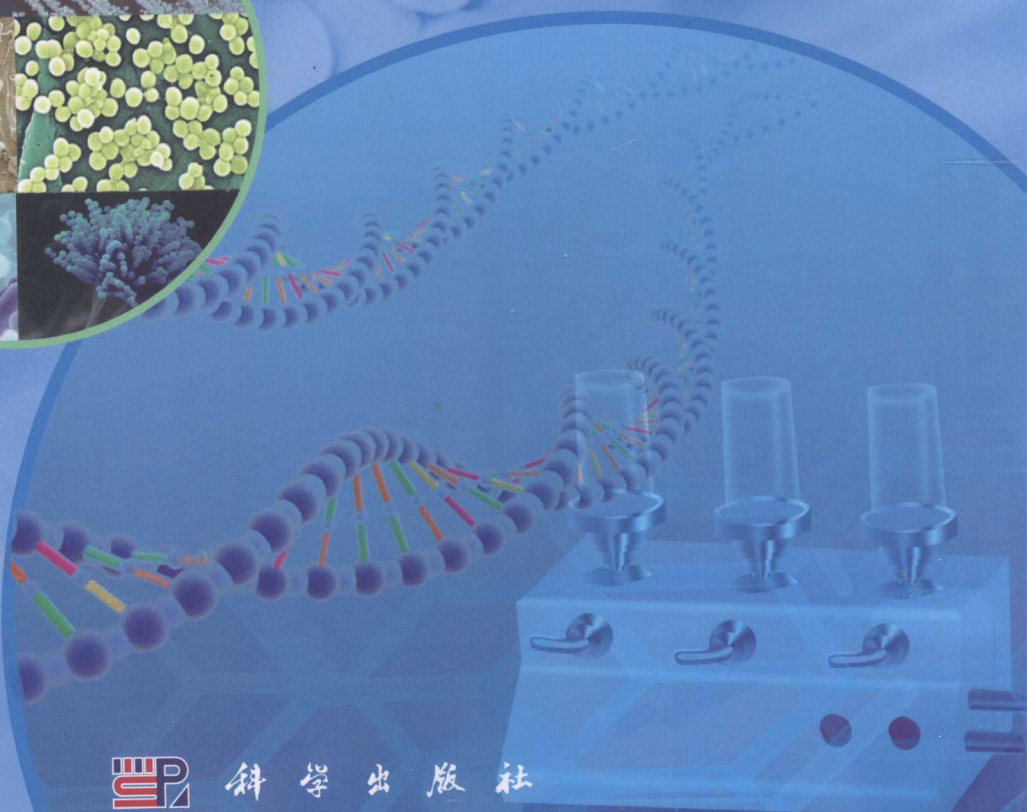
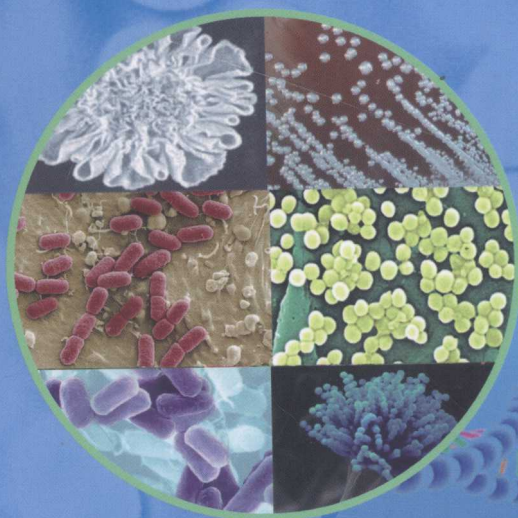
普通高等教育“十二五”规划教材



工业微生物育种学

(第四版)

施巧琴 吴松刚 主编



科学出版社

普通高等教育“十二五”规划教材

工业微生物育种学

(第四版)

主编 施巧琴 吴松刚

ISBN 978-7-03-027512-9

福建师范大学
图书馆
藏书印记

1035992



T1035992

科学出版社

北京

内 容 简 介

本书是在《工业微生物育种学》第三版的基础上修订改编而成的。新版中编入了近年来工业微生物育种所采用的新方法和取得的新成果,尤其是在分子定向进化育种、基因敲除育种和全局转录机器工程育种等方面的许多成功实例。同时,在第三版原有传统工业微生物三大育种技术——诱变育种、代谢控制育种及杂交育种的基础上,还补充了工业微生物生产菌株的培养基优化及工程菌株的高密度发酵技术等章节,完善了工程菌株目的产物的高效表达的发酵工艺过程,具有实际应用价值。

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.—4版.—北京:科学出版社,2013
普通高等教育“十二五”规划教材
ISBN 978-7-03-036738-9

I. ①工… II. ①施…②吴… III. ①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(2013)第 033944 号

责任编辑:席 慧/责任校对:郭瑞芝
责任印制:阎 磊/封面设计:迷底书装

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>

北京市安泰印刷厂印刷

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:23
2013 年 1 月第 四 版 字数:574 000

定价:45.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

编写人员名单

主编

- 施巧琴 工业微生物发酵技术国家工程研究中心(福建师范大学)
吴松刚 工业微生物发酵技术国家工程研究中心(福建师范大学)

编者(按姓氏笔画排序)

- 王明兹 工业微生物发酵技术国家工程研究中心(福建师范大学)
李惠珍 工业微生物发酵技术国家工程研究中心(福建师范大学)
杨建国 澳大利亚悉尼大学
吴伟斌 麦丹生物集团(福州)生物工程研究院
吴松刚 工业微生物发酵技术国家工程研究中心(福建师范大学)
林俊 福州大学应用基因组学研究所
林跃鑫 宁德师范学院
郑毅 工业微生物发酵技术国家工程研究中心(福建师范大学)
施巧琴 工业微生物发酵技术国家工程研究中心(福建师范大学)
施碧红 工业微生物发酵技术国家工程研究中心(福建师范大学)
黄钦耿 麦丹生物集团(福州)生物工程研究院

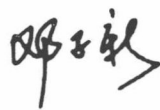
第三版序

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

第二版序

随着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地提高,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。

福建师范大学微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的作用。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

第四版前言

《工业微生物育种学》第三版于2008年中秋定稿,2009年3月由科学出版社出版。4年来该书已印刷三次,发行量达万册,受到了广大读者的欢迎。

考虑到这4年中我们通过建立产学研联合体,与生产企业建立了密切的合作关系,使研究成果能较快地转化为生产力,积累了一定的实际经验。同时,由于在生产中得到了成功应用,从工业微生物育种角度看,这些研究成果具有较强的实用性和较高的可用性,不但可丰富本书作为教科书的实际内容,而且对生产企业和研究单位具有实际应用价值。因此,我们决定在第三版的基础上,进行必要的补充和修改,出版第四版。

第四版主要补充了“新型物理诱变剂”、“基因的表达系统”、“载体诱变技术”、“基因敲除育种”、“全局转录机器工程育种”、“发酵培养基优化及高密度发酵技术”和“基因工程菌的保存”等具有实用性的育种技术。同时,也对个别章节作了适当调整,使其更有系统性和科学性。

福建师范大学在组建工业微生物教育部工程研究中心的基础上,获得国家发展与改革委员会批准组建工业微生物发酵技术工程研究中心,更加明确地提出要为生产企业服务,与生产企业密切合作,使企业成为科技创新的主体。因此,在第四版编写中,我们邀请了生产企业工程技术人员参加编写,同时,也适当邀请外校教师参加编写,为本书增添新鲜内容。

在本书再版编写过程中,由于时间紧迫,编著者水平有限,书中不足之处在所难免,敬请读者谅解和指正。

编著者

于福州仓山华庐
2012年中秋、国庆

第三版前言

本书《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。

科学出版社
北京 100070

编著者
于福州仓山华庐
2008年中秋

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微生物工程研究所,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	1
第二版序	1
第一版序	1
第四版前言	1
第三版前言	1
第二版前言	1
第一版前言	1
第一章 绪论	1
第一节 工业微生物育种在生物发酵产业中的地位	1
第二节 工业微生物育种的进展	1
思考题	4
第二章 遗传物质的基础	5
第一节 染色体	5
一、染色体形态	5
二、原核生物及病毒染色体结构	6
三、真核生物染色体结构	7
四、染色体数目	7
第二节 核酸	9
一、核酸	9
二、RNA	9
三、DNA	10
第三节 基因的组织与结构	11
一、基因组	11
二、基因	12
三、遗传密码	13
思考题	15
第三章 基因突变	16
第一节 突变的分子机制	16
一、基因突变	17
二、染色体畸变和染色体组变	19
第二节 突变引起遗传性状改变及突变型的种类	20
一、突变引起遗传性状改变	20
二、突变型的种类	22
第三节 突变体的形成	25

一、突变体的形成过程	26
二、突变的修复	27
三、突变的表型效应	32
四、表型延迟	33
思考题	34
第四章 工业微生物育种诱变剂	35
第一节 物理诱变剂	35
一、物理诱变剂的生物学效应	35
二、非电离辐射——紫外线	36
三、电离辐射	39
四、近年来发展的新型物理诱变剂	41
第二节 化学诱变剂	43
一、碱基类似物	44
二、烷化剂	47
三、脱氨剂(以亚硝酸为例)	52
四、移码诱变剂	54
五、羟化剂(以羟胺为例)	54
六、金属盐类	55
七、其他化学诱变剂	55
八、化学诱变剂的安全操作	57
思考题	57
第五章 工业微生物产生菌的分离筛选	58
第一节 含微生物样品的采集	58
一、从土壤中采样	58
二、根据微生物生理特点采样	60
三、特殊环境下采样	61
第二节 含微生物样品的富集培养	61
一、控制培养基的营养成分	62
二、控制培养条件	62
三、抑制不需要的菌类	63
第三节 好氧微生物的分离	63
一、稀释涂布分离法和划线分离法	64
二、利用平皿中的生化反应进行分离	64
三、组织分离法	67
四、单细胞或单孢子分离法	68
五、通过控制营养和培养条件进行分离	69
第四节 厌氧微生物的分离	70
第五节 产目的产物的野生菌的筛选和菌株鉴定	74
一、初筛	74

二、复筛	75
三、菌株鉴定	76
第六节 极端环境微生物的分离筛选	76
一、极端环境微生物的采样、分离筛选	77
二、极端微生物酶分子生物学研究	80
第七节 生物可降解塑料菌株的分离筛选	82
一、生物可降解塑料概况	82
二、获得生物可降解塑料的微生物途径和菌株分离方法	83
三、PHA 的合成机制和发酵特点	85
思考题	85
第六章 工业微生物诱变育种	86
第一节 诱变育种的试验设计和准备工作	87
一、诱变前对出发菌株的了解	88
二、全面了解菌种特性及其与生产性能的关系	89
三、了解影响菌种生长发育的主要因素	90
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	91
五、建立一个准确、简便、快速检测产物的方法	92
六、研究最佳的菌种保藏培养基和培养条件	92
第二节 诱变育种的步骤与方法	92
一、出发菌株的选择	92
二、出发菌株的纯化	95
三、单孢子(或单细胞)悬液的制备	96
四、诱变剂及诱变剂量	97
五、诱变剂的处理方法	101
六、影响突变率的因素	103
思考题	105
第七章 工业微生物变株传统筛选和高通量筛选	106
第一节 突变株的传统分离与筛选	106
一、突变株分离过筛选的基本环节	107
二、筛选的程序	107
三、分离和筛选	108
四、摇瓶液体培养	114
五、产物活性测定	114
六、摇瓶数据的调整和相关菌株特性的观察分析	116
七、培养基和培养条件的调整	117
八、变种的特性研究与鉴定	117
九、诱变育种实例	119
第二节 突变株高通量筛选	121
一、常用仪器设备	121

二、高通量筛选技术中的常用方法	126
三、高通量筛选应用实例	131
思考题	134
第八章 营养缺陷型菌株的筛选	135
第一节 营养缺陷型菌株的分离和筛选	135
一、营养缺陷型的诱发	135
二、淘汰野生型菌株	136
三、营养缺陷型的检出	137
四、营养缺陷型的鉴定	138
第二节 通过耐结构类似物方法筛选高产菌株	142
一、直线合成途径	144
二、分支途径	144
思考题	145
第九章 抗噬菌体变株的选育	146
第一节 抗噬菌体突变株的分离与筛选	146
一、烈性噬菌体及其效价的测定	146
二、温和性噬菌体及溶源菌	147
三、抗噬菌体菌株的选育	148
四、抗性菌株的特性研究	149
第二节 抗噬菌体菌株的选育实例	150
一、菌种	150
二、培养基成分	150
三、噬菌体的分离纯化和原液制备	151
四、噬菌体菌株的选育	151
五、菌株抗噬菌体性能的检验	152
六、摇瓶发酵试验	152
七、发酵罐发酵试验	152
思考题	152
第十章 工业微生物代谢控制育种	153
第一节 代谢调节控制育种	153
一、组成型突变株的选育	154
二、抗分解调节突变株的选育	155
三、营养缺陷型应用于代谢调节育种	160
四、渗漏缺陷型应用于代谢调节育种	164
第二节 抗反馈调节突变株的选育	164
一、回复突变引起的抗反馈调节突变株	164
二、耐自身产物突变株选育	166
三、累积前体和耐前体突变株的选育	167
四、细胞膜透性突变株的选育	170

思考题	171
第十一章 工业微生物杂交育种	172
第一节 微生物杂交	172
一、微生物杂交育种的基本程序	172
二、杂交过程中亲本和培养基的选择	172
三、杂交育种的遗传标记	174
第二节 霉菌杂交育种	175
一、霉菌的细胞结构和繁殖	175
二、霉菌杂交的原理和杂交技术	176
三、高产重组体的筛选	185
思考题	185
第十二章 工业微生物原生质体融合育种	186
第一节 微生物原生质体融合育种	187
一、直接亲本及其遗传标记的选择	187
二、原生质体制备与再生	188
三、原生质体融合	196
四、融合体再生	198
五、融合重组体检出与遗传特性分析	201
六、原生质体融合的应用	204
第二节 放线菌原生质体融合育种	205
一、放线菌细胞壁组成、结构及水解	206
二、放线菌原生质体融合育种技术	206
第三节 霉菌原生质体融合育种	209
一、霉菌原生质体制备	211
二、原生质体的再生	213
三、原生质体融合和再生	213
四、融合重组体分析与鉴定	215
第四节 工业微生物基因组改组育种	215
一、微生物基因组改组育种意义和原理	215
二、基因组改组育种技术及应用实例	218
思考题	222
第十三章 基因工程育种	223
第一节 概述	223
一、基因工程在微生物育种中的应用	224
二、基因工程原理和步骤	225
第二节 基因工程载体	226
一、质粒载体	227
二、 λ 噬菌体载体	232
三、柯斯质粒载体	236

171	第三节 基因工程所用的酶	237
171	一、限制性内切核酸酶	238
171	二、DNA 聚合酶	240
171	三、依赖于 DNA 的 RNA 聚合酶	242
171	四、连接酶、激酶及磷酸酶	242
171	五、核酸酶	243
171	第四节 基因工程的主要步骤	244
171	一、DNA 的制备	244
171	二、目的基因的产生与分离	246
171	三、DNA 的连接	247
171	四、重组体导入大肠杆菌	248
171	五、含重组质粒的细菌菌落的鉴定	250
171	六、目的基因的表达过程	251
171	第五节 基因的表达系统	253
171	一、原核表达系统	253
171	二、真核生物表达系统	257
171	思考题	262
171	第十四章 分子定向进化育种	263
171	第一节 理性设计	264
171	一、寡核苷酸引物介导的定点突变	264
171	二、PCR 介导的定点突变	266
171	三、盒式突变	267
171	第二节 非理性设计——蛋白质(酶)分子定向进化技术	267
171	一、蛋白质(酶)分子定向进化的发展	268
171	二、蛋白质(酶)分子定向进化策略	268
171	三、定向进化文库的筛选方法	278
171	四、酶分子工程的应用和发展前景	279
171	思考题	281
171	第十五章 基因敲除育种	282
171	第一节 基因敲除育种原理	282
171	一、基因敲除育种概述	282
171	二、基因重组系统	283
171	第二节 工业微生物基因敲除育种技术及应用	287
171	一、基因敲除育种技术	287
171	二、基因敲除育种技术的应用	289
171	思考题	291
171	第十六章 全局转录机器工程育种	292
171	第一节 全局转录机器工程育种的原理	292
171	第二节 全局转录机器工程育种实施策略及方法	294