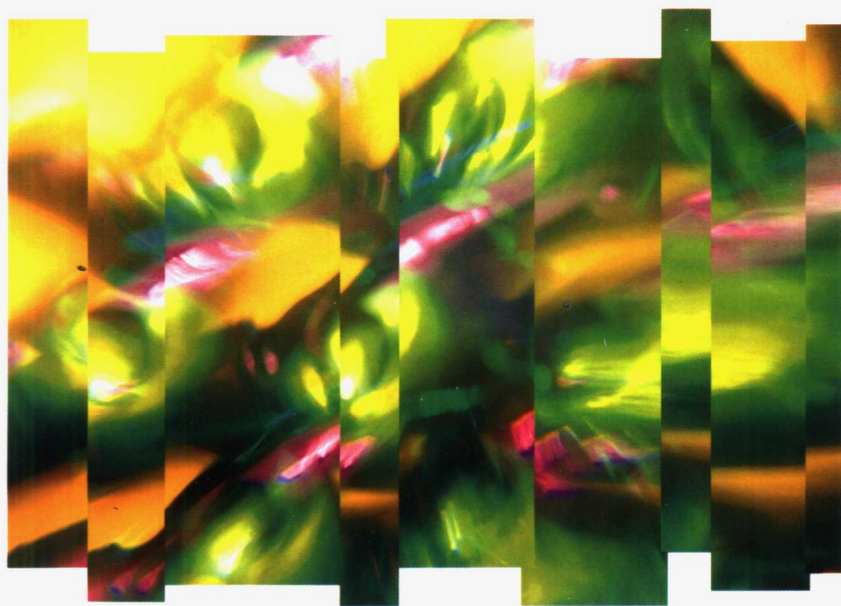


现代发酵工程丛书

现代发酵微生物 实验技术

● 诸葛健 主编 ●



Chemical Industry Press



化学工业出版社
现代生物技术与医药科技出版中心

现代发酵工程丛书

现代发酵微生物实验技术

诸葛健 主编

沈 微 唐雪明 方慧英 副主编



化学工业出版社

现代生物技术与医药科技出版中心

· 北京 ·

(京) 新登字 039 号

图书在版编目 (CIP) 数据

现代发酵微生物实验技术/诸葛健主编. —北京:
化学工业出版社, 2005. 4
(现代发酵工程丛书)
ISBN 7-5025-6653-8

I. 现… II. 诸… III. 发酵学: 微生物学-实验
IV. TQ920.1-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2005) 第 011155 号

现代发酵工程丛书
现代发酵微生物实验技术

诸葛健 主编

沈 微 唐雪明 方慧英 副主编

责任编辑: 孟 嘉 傅四周 周 旭

文字编辑: 伊守亮

责任校对: 蒋 宇

封面设计: 关 飞

*

化 学 工 业 出 版 社 出版发行
现代生物技术与医药科技出版中心

(北京市朝阳区惠新里 3 号 邮政编码 100029)

发行电话: (010) 64982530

<http://www.cip.com.cn>

*

新华书店北京发行所经销

大厂聚鑫印刷有限责任公司印刷

三河市延风装订厂装订

开本 720mm×1000mm 1/16 印张 15½ 字数 257 千字

2005 年 4 月第 1 版 2005 年 4 月北京第 1 次印刷

ISBN 7-5025-6653-8/Q·135

定 价: 28.00 元

版权所有 违者必究

该书如有缺页、倒页、脱页者, 本社发行部负责退换

序

中国 20 世纪早期的发酵工业多限于厌氧发酵产品的生产，如乙醇、丙酮、丁醇及酿酒等。20 世纪 40 年代初，需氧的青霉素发酵在多位科学家的通力协作下，在美国投入了工业化生产。关于从自然界筛选和优化菌种的方法，以及需氧发酵过程中诸多规律性研究成果——《生化工程学》也伴随而生。这标志着现代发酵工业新纪元的开始。它不但以很快的速度催生了多系列的需氧发酵产业，同时也使原有的厌氧发酵业界受益匪浅。择其要者简述如下：

抗生素 中国 20 世纪 50 年代早期在上海开始生产青霉素。如今中国是青霉素的生产大国，并具有多家综合性大型抗生素厂，医用抗生素种类基本齐全，但半合成头孢菌素的生产能力不足。

氨基酸 中国用微生物发酵法代替面筋酸水解法工业化生产谷氨酸，于 1964 年在上海投产。现在几乎全部的 L-氨基酸都可用发酵法生产；只有少数几种氨基酸采用固定化菌体（酶）催化不对称水解化学合成的 DL-氨基酸 N-酰化衍生物的方法，实现光学拆分，最终获得高得率的 L-氨基酸。

酶制剂 中国的微生物酶制剂发酵工业于 1965 年在无锡首先投产。当时品种虽少，但相关工业行业受益颇丰。1990 年美国食品和药物管理局（FDA）批准以安全菌株构建的凝乳酶基因工程菌投入工业使用之后，国外大型酶制剂生产公司的基因工程菌酶制剂于 20 世纪 90 年代中期进入中国，并建立了控股公司或独资公司，销售 3 个等级 10 多个系列的产品。

有机酸 中国用发酵法生产有机酸是 20 世纪 80 年代兴起的。以柠檬酸、L-乳酸、L-苹果酸和衣康酸等为主。其中柠檬酸产量居世界第二位，年出口额 2 亿美元以上，为世界第一，也是中国化工行业单项出口额最大的产品。

维生素 维生素发酵在我国起步较早，已形成规模化生产的主要是维生素 B₁₂、维生素 B₂ 和维生素 C。中国科学家于 20 世纪 70 年代末期发明的双菌协同发酵生物合成维生素 C 的“二步发酵法”，一举取代了沿用近半个世纪的“莱氏化学合成法”，成为当今国际通用的维生素 C 生产法。中国已成为维生素 C 的生产大国，也是技术强国。

燃料乙醇 汽油中添加 10%~15% 的无水乙醇可获得良好的抗震性，乙醇的助燃性可明显降低汽车尾气对城市的大气污染。中国多省已法定在车用汽油中添加定量无水乙醇，全国大有跟进之势，因而燃料乙醇业有望成为中国最大的发酵产业之一。生产燃料乙醇所消耗的能量大于产出燃料乙醇的能量，是国际上多年来尚未攻克的难题。

酿酒工业 以大曲酒为代表的蒸馏酒传承着中国独有的酿造文化和历史，不同的香型和口感具有明显的产地特征，造就了不少驰名中外的名牌。啤酒源于外国，但近十余年来国内啤酒业已经实现了集约化和现代化，产量位居世界第二。如今酿酒工业的年产值逾千亿元。

当前，中国发酵工业多数产品的技术经济指标均落后于国际先进水平。特别是产品的分离纯化技术进步不快，高纯度等级产品的产量低、成本高。以氨基酸、酶制剂为例，尽管中国不乏优良的生产菌株，可是高纯度等级的产品需要进口。要扭转这种局面，从业人员的继续学习是必由之路。另外，优良的生产菌种是发酵工业的源头，菌种又是在生产过程和环境中极易流失的资源。期待这种产权尽快得到切实、有力的保护，以促进跨学科间的协作。

《现代发酵工程丛书》着眼于提升发酵工业水平的共性技术。内容侧重实用，原理的阐述深入浅出。丛书约十册，先期出版以下五册。

一、现代发酵微生物实验技术

微生物是发酵工业的根本，优良菌株是上佳发酵结果的前提，生产过程中不断强化菌种的性能是保持技术经济优势的必需。中国青霉素发酵液的效价从 20 世纪 50 年代的每毫升数千国际单位，提高到 6 万国际单位以上。据业界总结，菌种强化的贡献约为 50%。

本书含 81 项实验。包括显微技术、细胞特殊结构的观察、代谢调控育种、原生质体融合育种和基因工程等定向育种技术，以及相关新型仪器设备的使用。书中图文并茂，特别适于在学者学习和在职者继续学习时阅读参考。

二、高细胞密度发酵技术

许多发酵的产物积累于菌体细胞内部。要获得这些产物的高生产强度，理想的办法是在维持产率系数和比生产率不降低的同时，尽可能提高发酵液内细胞的密度。但实现高密度发酵并非易事，这涉及液内传质的强化、加速溶氧的供给、基质改良和流加优化控制、有害副产品的随程移除和反应器合理设计等问题的解决。

高细胞密度发酵技术是随着基因工程重组药物生产的需要而发展起来的一项发酵工程新技术。书中详细阐述了它的进展和应用实例，显示了该技术广阔的应用前景。

三、微生物酶与应用生物催化

本书着重阐述微生物酶与生物转化的基本知识与应用，具有实用性和前瞻性。微生物酶不但具有所催化底物的专一性，还有底物分子上相同反应基团所在位点的专一性，以及消旋体异构物的选择性，后者对手性化合物的合成具有特别重要的价值。结合固定化酶或固定化细胞技术的生物转化法，大大拓宽了发酵工业的领域。目前，愈来愈多的原来用化工合成的药物和其他精细化工产品改用生物转化法生产，获得高效率、低能耗和低污染的结果。

四、现代固态发酵与酶制剂生产

固态发酵源于中国，酱油发酵已有千年的历史。固态发酵技术用于酶制剂生产的潜在优势早就引起国内外学者的重视。本书主要取材于近10年来数百篇国外研究论文，结合作者的研究经验，详细地介绍了固态发酵的理论基础、过程参数的测量方法和控制技术、固态发酵动力学的研究方法和过程的优化控制技术等。书中还介绍了多种酶制剂的固态发酵的生产实例。

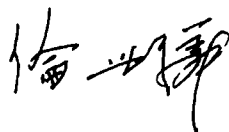
五、发酵过程解析、控制与检测技术

发酵过程的在线检测、实时在线控制和流加过程的优化是提高发酵总体水平的有效途径。本书结合具体的发酵实例，归纳、阐述和系统地总结了发酵过程在线检测、在线自适应控制和最优化控制理论，并对模糊逻辑推理、人工神经网络、代谢网络模型、状态预测模型或识别等方法与技术作了介绍。

本书对所论述的控制方法和技术均附有应用实例，有助于继续学习者对

内容的理解。

本丛书的作者都是多年来工作在科研第一线的学者。他们在百忙之中不辞辛劳，为读者撰写了这套丛书。相信该丛书的面世将会为发酵工业技术水平的提升有所贡献。

A handwritten signature in black ink, appearing to read '林世强' (Lin Shiqiang), written in a cursive style.

2005年3月

前 言

作者所在单位（江南大学）的发酵工程学科是我国最早授予的国家重点学科之一。《微生物学》历来是发酵工程及相应的以生物技术为手段的农副产品深加工等有关专业的重要学位课程，是一门理论教学和实验技术并重的重要专业基础课。

作为发酵工程学科的微生物学硕士点，其课程设置和内容的侧重点明显有着理工结合的特征，《现代发酵微生物实验技术》作为该硕士点的学位课程就是在这一背景下设立的。

所谓“现代”就有“新”和“高”的含义，但也会有某些常用的经典内容，这样的编写也许有其一定的连续性和系统性，有利于学习和应用。

依据微生物学和发酵工程学科的结合与发展，本书的内容主要涉及显微技术、微生物细胞特殊结构的观察、噬菌体、标记菌种的获得与应用、原生质体系列育种技术、基因操作及其育种技术和固定化细胞生物转化等共计81项实验。这些内容在本科微生物学曾有所涉及，但实验方面由于学时和层次的限制多数无法实施。进入研究生学习阶段，进一步学习和实践这方面的知识与技术就有了可能。

这本《现代发酵微生物实验技术》的编写有其特色，即本书图文并茂，有论述，有操作，有结果，还有某些新设备的介绍。目的是使初学者有一个完整的概念，并力图在思维上有所发展。

参与编写者在教学与科研上都有较为丰富的实践经验和研究成果，所以《现代发酵微生物实验技术》中许多内容都有较强的可行性，而且也为读者与作者进一步交流提供了途径。

本书是由江南大学（原无锡轻工大学）生物工程学院工业微生物研究中心集体创作的，许多博士和硕士研究生参加了基础工作，他们是于海、余秉琦、周礼红、湛斌、张晓梅、谢涛、张永光、周小玲、王晨霞、李琛、刘建

伟、徐敏、郭亮、匡小婴、马骏双、赵有玺、邱重晏、李艳丽、牛丹丹、陈献忠、路志群、段绪果。姜琳同学和吴亢高级工程师也参加了编写工作，还参考了由诸葛健、王正祥编写的《工业微生物实验技术手册》的有关内容。本书由诸葛健教授担任主编，沈微、唐雪明、方慧英三位副教授为副主编。

限于编写人员的学识和写作水平，书中难免有所缺陷，甚至是错误，希望广大师生和读者不时提出宝贵意见。

编 者

2004年10月于江苏无锡

内 容 提 要

本书是江南大学（原无锡轻工大学）生物工程学院工业微生物研究中心的集体创作，作者所在的发酵工程学科是我国最早授予的国家重点学科之一，参与编写者在教学与科研上都有较为丰富的实践经验和研究成果。全书共分七章，内容主要涉及显微技术、微生物细胞特殊结构的观察、噬菌体、标记菌种的获得与应用、原生质体系列育种技术、基因工程育种技术和固定化细胞生物转化等计 81 项实验。

本书的编写有其特色，不仅图文并茂，而且有论述，有操作，有结果，还有某些新设备的介绍，特别是书中有关基因操作的技术内容，是与同类微生物实验技术书相比的新颖之处。适合高等院校微生物学、发酵工程、生物工程、食品工程等专业的低年级本科生及研究生使用，也可供相关科研人员参考。

目 录

第一章 显微技术	1
第一节 显微观察	1
一、相差显微镜	1
【实验 1-1】相差显微镜的使用	2
二、荧光显微镜	5
【实验 1-2】荧光显微镜的使用	8
三、电子显微镜	8
【实验 1-3】细菌、酵母菌超薄切片的透射电镜观察	12
【实验 1-4】噬菌体的透射电镜观察	14
【实验 1-5】质粒 DNA 的透射电镜观察	15
【实验 1-6】酵母细胞的扫描电镜观察	18
第二节 显微摄影	20
【实验 1-7】显微摄影、菌落摄影和凝胶摄影	21
第三节 放射自显影	25
【实验 1-8】硝酸纤维素滤纸上标记 DNA 的放射自显影	25
第四节 显微操作技术用于单细胞分离	27
【实验 1-9】显微操纵仪用于单细胞分离	29
【实验 1-10】显微操纵仪用于酵母子囊的解剖及子囊孢子单孢化	30
【实验 1-11】玻璃微型工具的制作	31
第二章 微生物细胞特殊结构的观察	33
第一节 染色技术	33
一、染色的基本原理	33
二、染料	34

三、染色	36
【实验 2-1】真菌的荧光染色与观察	36
第二节 细胞主要结构成分的分离与观察	38
【实验 2-2】革兰阳性细菌细胞壁的准备	39
【实验 2-3】酵母细胞壁甘露聚糖的制备	41
【实验 2-4】细胞壁的形态观察	42
【实验 2-5】革兰阴性菌细胞外膜蛋白的分离	43
【实验 2-6】细菌荚膜的观察	44
【实验 2-7】细菌鞭毛的观察	45
【实验 2-8】微生物细胞核的观察	47
【实验 2-9】细菌染色体 DNA 的分离与观察	49
【实验 2-10】异染颗粒的观察	51
【实验 2-11】酵母细胞内脂肪颗粒和肝糖颗粒的观察	52
【实验 2-12】酵母液泡及线粒体的提取	54
第三节 芽孢、子囊孢子和假菌丝的观察	57
一、芽孢	57
【实验 2-13】细菌芽孢形成及发芽的观察	59
【实验 2-14】伴孢晶体的观察	60
二、酵母子囊孢子	61
【实验 2-15】酵母子囊孢子的形成及观察	63
【实验 2-16】酵母单倍体的分离与鉴定	64
三、酵母假菌丝	66
【实验 2-17】酵母假菌丝的观察	66
第三章 噬菌体	69
【实验 3-1】噬菌体的分离与纯化	72
【实验 3-2】高效价噬菌体原液的制备	74
【实验 3-3】溶源菌的鉴定	75
【实验 3-4】抗噬菌体产 α -淀粉酶菌株的选育	77
第四章 标记菌种的获得与应用	79
第一节 富集培养技术在获得标记菌种中的应用	79
一、营养缺陷型富集法在原核细胞中的应用	79

二、营养缺陷型富集法在真核细胞中的应用	81
三、浓度梯度法富集抗性突变株	82
四、富集法在研究次级代谢的重组 DNA 技术中的应用	84
第二节 营养缺陷型标记菌种的获得	84
一、诱变方法	85
二、淘汰野生型	85
三、检出缺陷型	85
四、营养缺陷型生长谱的确定	87
【实验 4-1】芽孢杆菌营养缺陷型的筛选	89
【实验 4-2】酵母营养缺陷型的筛选	91
【实验 4-3】青霉菌营养缺陷型菌株的筛选	92
第三节 呼吸缺陷型标记菌种的获得	94
【实验 4-4】酵母呼吸缺陷型的筛选	94
第四节 抗反馈调节抗性突变株的获得与应用	95
【实验 4-5】氨基酸抗反馈调节突变株的选育	98
第五章 原生质体系列育种技术	101
第一节 工业菌种育种的策略	101
第二节 原生质体融合育种	102
一、原生质体融合育种的特点	103
二、原生质体融合育种步骤与要点	107
三、原生质体再生率和融合率的计算	115
【实验 5-1】芽孢杆菌的原生质体融合	115
【实验 5-2】链霉菌原生质体融合	119
【实验 5-3】小单胞菌的原生质体融合	124
【实验 5-4】酿酒酵母的原生质体融合	125
【实验 5-5】丝状真菌的原生质体融合	128
第三节 原生质体转化育种	134
【实验 5-6】芽孢杆菌原生质体转化	134
【实验 5-7】质粒 DNA 转化链霉菌原生质体	137
【实验 5-8】酿酒酵母的原生质体转化法	138
【实验 5-9】真菌原生质体转化	139
第四节 原生质体诱变育种	141

【实验 5-10】芽孢杆菌种间融合子 F-26-2 原生质体诱变育种	142
【实验 5-11】紫外线诱变原生质体选育 L-谷氨酸高产菌	143
第五节 原生质体技术中的一些特殊技术	145
一、紫外线照射原生质体增加融合率	145
二、供体原生质体的热灭活	146
三、原生质体电融合技术	147
【实验 5-12】电诱导酵母原生质体融合	147
四、遗传转移	148
【实验 5-13】原生质体融合法转移酵母线粒体及杀伤质粒	148
第六章 基因工程育种技术	151
第一节 基因工程的基本过程和原理	151
一、载体	152
二、DNA 重组用酶	154
三、宿主细胞	155
四、外源 DNA	156
第二节 大肠杆菌基因工程	160
一、大肠杆菌感受态细胞的制备和转化	160
【实验 6-1】用氯化钙制备和转化感受态大肠杆菌 (I)	161
【实验 6-2】用氯化钙制备感受态大肠杆菌 (II)	162
【实验 6-3】用 PEG 制备和转化大肠杆菌感受态细胞	163
【实验 6-4】大肠杆菌的电击转化	164
二、大肠杆菌中质粒的提取与纯化	166
【实验 6-5】质粒的大量提取与纯化	166
【实验 6-6】质粒的小量提取	168
【实验 6-7】用硅胶膜分离法小量提取质粒	169
三、微生物染色体 DNA 的提取与 PCR 扩增	170
【实验 6-8】枯草杆菌染色体 DNA 的提取	170
【实验 6-9】真菌染色体 DNA 的简易提取方法	171
【实验 6-10】枯草杆菌淀粉酶基因的 PCR 扩增	173
【实验 6-11】从电泳凝胶中分离枯草杆菌淀粉酶基因	174
四、外源基因在大肠杆菌中的高表达	175
【实验 6-12】载体和基因的酶切	180

【实验 6-13】基因与载体的连接	180
第三节 非大肠杆菌微生物基因工程	184
一、芽孢杆菌基因工程	185
【实验 6-14】枯草杆菌感受态细胞的制备和转化	186
【实验 6-15】地衣芽孢杆菌感受态细胞的诱导形成及其高效电转化	187
【实验 6-16】枯草杆菌转化子质粒的提取和检测	188
【实验 6-17】高碱性蛋白酶基因多拷贝重组菌的构建	190
二、酵母基因工程	194
【实验 6-18】酵母染色体 DNA 的提取	196
【实验 6-19】酿酒酵母的乙酸锂完整细胞转化法	197
【实验 6-20】单链载体 DNA 的制备	198
【实验 6-21】酵母菌质粒 DNA 的提取	199
【实验 6-22】巴斯德毕赤酵母的电转化方法	200
【实验 6-23】羧酸还原异构酶基因多拷贝重组啤酒酵母的构建	201
第七章 微生物细胞固定化方法	205
第一节 载体结合法	206
一、表面吸附法	206
二、共价结合法	207
第二节 交联法	208
第三节 包埋法	208
一、海藻酸钙凝胶包埋法	209
【实验 7-1】酿酒酵母的海藻酸钙固定化	211
【实验 7-2】固定化枯草杆菌连续生产耐热 α -淀粉酶	213
二、 κ -角叉胶包埋法	215
【实验 7-3】 κ -角叉胶一步包埋法	215
【实验 7-4】 κ -角叉胶二步包埋法	217
【实验 7-5】固定化酵母连续生产酒精	218
【实验 7-6】固定化细胞的回收与活细胞计数	219
三、聚丙烯酰胺凝胶包埋法	219
【实验 7-7】大肠杆菌的聚丙烯酰胺凝胶固定化	220
四、光交联树脂前聚体包埋法	221
【实验 7-8】光交联树脂固定化原生质体	221

五、其他载体包埋方法·····	222
第四节 几种固定化细胞方法联用·····	224
一、包埋-交联法·····	224
二、吸附-交联法·····	225
三、包埋-吸附法·····	225
第五节 其他固定化方法·····	225
第六节 固定化微生物细胞方法的选择·····	226
一、固定化微生物细胞方法的选择·····	226
二、固定化细胞技术的评价指标·····	227
第七节 微生物细胞固定化技术前景展望·····	227
主要参考文献·····	229

第一章

显微技术

显微技术是微生物实验与研究中的基本技术之一。由于微生物体积小，常以微米 (μm) 或纳米 (nm) 来描述其大小，因此，要对它们进行观察则必须借助显微镜。显微镜种类很多，可以根据所要研究的对象和要求选用，这里描述的是相差显微镜和荧光显微镜。要观察更小的微生物和胞内的微小结构，还得采用透射电子显微镜和扫描电子显微镜。

为了及时记录观察到的现象，还可以用显微摄影的方法将其记录下来，现代的数字技术已经很容易做到。

第一节 显微观察

一、相差显微镜

人的眼睛能够分辨光波（颜色）和振幅（亮度）的差异。显微镜下观察的物体，大都是由于光波、振幅的改变，致使物体表面的明暗不同。微生物细胞的染色主要是改变了光波波长，因而易于观察。但染色的结果是使细胞的内部自然结构受到破坏，不利于对微生物的正确观察。透明的物体不能改变振幅和波长，只能使光波的相位发生改变，而人的肉眼却无法分辨光波相