

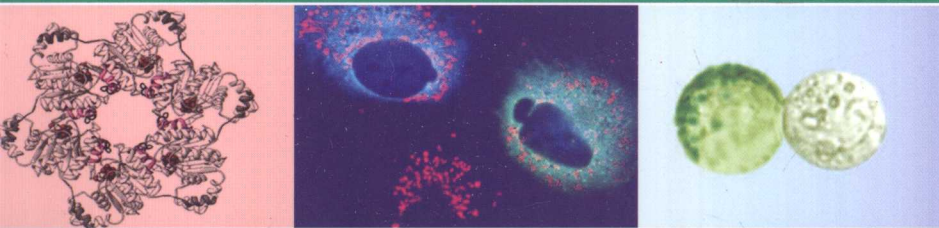



21世纪高等职业教育规划教材
生物学系列

工业微生物育种技术

GONGYE WEISHENGWU YUZHONG JISHU

■ 主编 犹联莲 王志勇



 教育部直属师范大学
华中师范大学出版社

SHENGGWUXUE

工业微生物育种技术

主 编：犹联莲 王志勇
副主编：唐志强 汪 峻 别运清
编 者：(以姓氏笔画为序)
王志勇 尹 利 艾炎军
付秀芹 犹联莲 别运清
汪 峻 李从军 徐 艳
唐志强

内 容 提 要

本书是为高等院校生物技术类专业编写的专业课教材,内容包括微生物育种的遗传基础、工业微生物育种出发菌株的分离与筛选、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、基因工程育种、菌种保藏和有关的实训操作,注重讲清概念,理论与实践相结合,着重培养学生的应用能力和动手能力。每章配有学习目标、生产实例、本章小结、思考题,以便学生更好地学习和掌握有关知识。

本书可供生物技术、生物工程、制药工程等生物类专业作为教材使用,亦可供相关技术人员参考。

新出图证(鄂)字 10 号

图书在版编目(CIP)数据

工业微生物育种技术/犹联莲 王志勇 主编.

—武汉:华中师范大学出版社,2009.8

ISBN 978-7-5622-3967-3

I. 工… II. ①犹… ②王… III. 工业微生物学—菌种—遗传育种 IV. Q 939.97

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2009)第 094460 号

工业微生物育种技术

主 编: 犹联莲 王志勇

选题策划: 华中师范大学出版社第二编辑室 电 话: 027—67867362

出版发行: 华中师范大学出版社©

地 址: 武汉市武昌珞喻路 152 号 邮 编: 430079

销售电话: 027—67863426 67863040 67867371 67861549 67867076

邮购电话: 027—67861321 传 真: 027—67863291

网 址: <http://www.ccnupress.com> 电子信箱: hscbs@public.wh.hb.cn

责任编辑: 肖 颖 责任校对: 张晶晶 封面设计: 罗明波

印刷者: 孝感日报印刷厂 督 印: 章光琼

开本/规格: 787 mm×960 mm 1/16 印 张: 14.5 字 数: 275 千字

版次/印次: 2009 年 8 月第 1 版 2009 年 8 月第 1 次印刷

印 数: 1—3 100

定 价: 26.50 元

欢迎上网查询、购书

敬告读者: 欢迎举报盗版, 请拨打举报电话 027—67861321。



前 言

数千年前我国劳动人民就会利用微生物来生产酒和酿造食品。但直接从自然界得到的微生物菌株，其目的产物的产量都比较低并且生产性能不稳定，不能直接用于工业化大规模生产。利用工业微生物育种技术对微生物进行改造，可以提高目的产物的产量、质量或获得新的目的产物，并符合工厂化生产的要求，从而使抗生素、酶制剂、氨基酸、维生素、核苷酸、生物碱、激素等微生物产品产量成倍甚至成千倍增长，同时产品质量也不断提高，各色微生物产品已深入到人类生活的各个方面。

工业微生物育种技术是高等院校生物技术类专业的专业课。目前有关工业微生物育种的教材主要是本科和研究生教材，在内容上偏深，缺少配套的实训操作内容。因此，编者参考多种相关教材和专著后，编写了这本《工业微生物育种技术》教材，供高等院校生物技术类专业使用。

本书的特色是注重讲清概念，理论与实践相结合，着重培养学生的应用能力和动手能力。在编写过程中，适当降低理论知识的深度和广度，注意贯彻“以应用为目的，以必需、够用为度，以掌握概念、强化应用为重点”的原则，尽量与生产应用实践保持同步。教材涉及微生物的遗传与变异、菌种的采集与分离筛选、微生物的各种育种手段与变异株的选育、微生物的代谢调控和菌种保藏等内容，图文并茂，讲解深入浅出。每章配有学习目标、生产实例、本章小结、思考题，以便学生更好地学习和掌握有关知识。

本教材第一部分理论知识的第一章由犹联莲（湖北生物科技职业学院）编写，第二章由付秀芹（武汉生物工程学院）编写，第三章由艾炎军（湖北生物科技职业学院）编写，第四章由汪峻和尹利（湖北生物科技职业学院）编写，第五章由别运清（襄樊职业技术学院）和王志勇（咸宁职业技术学院）编写，第六章由唐志强（湖北生态工程职业技术学院）编写，第七章由徐艳（荆楚理工学院）编写，第八章由犹联莲和李从军（湖北生物科技职业学院）编写，第二部分实训操作由编写相关章节内容的老师完成。



本教材的编写广泛参考和引用了众多专家、学者的著作和论文，限于篇幅未能一一列出，特向原作者致以诚挚的谢意。本教材在编写过程中得到了华中师范大学出版社的大力支持和编辑审定人员的精心运作，在此一并表示衷心感谢。

鉴于编者水平有限，书中不足和错漏之处在所难免，敬请各位专家、同行和广大读者批评指正。

编者

2009年6月



目 录

第一部分 理论知识	1
第一章 绪论	3
第一节 工业微生物	3
第二节 工业微生物育种技术	4
一、自然选育 (选择育种)	4
二、诱变育种	5
三、代谢控制育种	5
四、杂交育种	5
五、基因工程育种	6
本章小结	6
复习思考题	6
第二章 微生物育种的遗传基础	7
第一节 细胞分裂及遗传学意义	7
一、有丝分裂	7
二、减数分裂	9
三、微生物的繁殖方式	12
第二节 微生物的遗传物质	16
一、核基因	16
二、核外基因	17
第三节 基因突变	18
一、基因突变的类型	18
二、基因突变的修复	19
三、突变体的形成	22
第四节 微生物的基因重组	22
一、原核微生物的基因重组	22
二、真核微生物的基因重组	26
本章小结	27
复习思考题	27



第三章 工业微生物育种出发菌株的分离与筛选	28
第一节 育种出发菌株的选择	29
一、育种出发菌株的特性	29
二、育种出发菌株的来源	29
第二节 微生物样品的采集	30
一、采样	30
二、富集培养	34
第三节 纯种分离	37
一、好氧微生物的分离	37
二、厌氧微生物的分离	45
第四节 出发菌株的筛选和产物活性的测定	47
一、出发菌株的筛选	47
二、产物活性的测定	49
本章小结	50
复习思考题	51
第四章 工业微生物诱变育种	52
第一节 工业微生物育种诱变剂	52
一、物理诱变剂	52
二、化学诱变剂	57
三、生物诱变剂	64
第二节 诱变育种的步骤与方法	65
一、诱变出发菌株的选择与纯化	65
二、单细胞(或单孢子)悬液的制备	67
三、诱变剂及诱变剂量的选择	69
四、诱变剂的处理方式与方法	72
五、影响诱变效果的因素	74
第三节 典型诱变菌株的筛选	76
一、营养缺陷型菌株的筛选	76
二、温敏突变株的筛选	81
三、抗噬菌体菌株的选育	83
本章小结	86
复习思考题	87
第五章 工业微生物代谢控制育种	88
第一节 微生物的代谢及产物	88
一、初级代谢及其产物	89



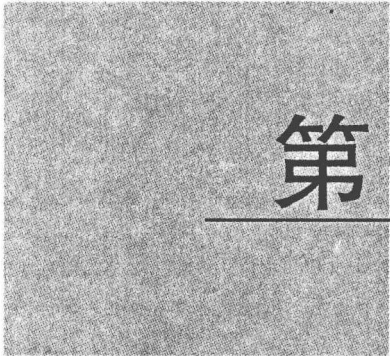
二、次级代谢及其产物	89
三、初级代谢与次级代谢的关系	91
第二节 初级代谢的调控	92
一、酶合成的调节	92
二、酶活性的调节	97
三、反馈抑制与反馈阻遏的比较	100
第三节 次级代谢的调控	100
一、碳源分解调节	101
二、氮源分解调节	101
三、磷酸盐调节	102
四、代谢产物反馈调节	102
五、细胞膜透性调节	103
第四节 代谢控制育种	104
一、组成型突变株的选育	104
二、抗分解调节突变株的选育	105
三、抗反馈调节突变株的选育	109
四、细胞膜透性突变株的选育	113
五、营养缺陷型在代谢调节育种中的应用	115
六、渗漏缺陷型在代谢调节育种中的应用	116
本章小结	117
复习思考题	118
第六章 工业微生物杂交育种	119
第一节 微生物杂交育种	119
一、微生物杂交育种的意义	119
二、微生物杂交育种的一般程序	120
三、微生物杂交育种方法	121
第二节 细菌杂交育种	122
一、细菌杂交的特点	122
二、细菌杂交育种的方法	122
第三节 放线菌杂交育种	123
一、放线菌杂交的特点	124
二、放线菌杂交育种的方法	125
第四节 酵母菌杂交育种	129
一、酵母菌杂交的特点	129
二、酵母菌杂交育种的方法	130



第五节 霉菌杂交育种	132
一、霉菌杂交的特点	132
二、霉菌杂交育种的方法	133
第六节 原生质体育种	138
一、原生质体再生育种	139
二、原生质体诱变育种	140
三、原生质体转化育种	143
四、原生质体融合育种	146
本章小结	156
复习思考题	157
第七章 基因工程育种	158
第一节 基因工程简介	158
一、基因工程的特点	158
二、基因工程中常用的工具酶	159
三、基因工程中常用的载体	160
第二节 基因工程育种	162
一、目的基因的获取	162
二、载体的制备	164
三、目的基因与载体 DNA 的体外重组	165
四、重组 DNA 导入受体细胞	166
五、重组菌的筛选、鉴定与分析	167
第三节 基因工程育种的应用	169
一、在工业上的应用	169
二、在医学上的应用	170
三、在农业上的应用	171
本章小结	173
复习思考题	174
第八章 菌种保藏	175
第一节 菌种的退化及防止措施	175
一、菌种退化的现象	175
二、菌种退化的原因	176
三、防止菌种退化的措施	177
第二节 菌种保藏方法	178
一、斜面低温保藏法	178
二、普通冷冻保藏法	179



三、超低温冷冻保藏法	179
四、液氮超低温保藏法	179
五、沙土管保藏法	180
六、冷冻真空干燥保藏法	181
七、液体石蜡保藏法	182
本章小结	183
复习思考题	184
第二部分 实训操作	185
实训一 培养基的配制及灭菌	187
§1 牛肉膏蛋白胨培养基和高氏 1 号培养基	187
§2 马丁(链霉素、孟加拉红、去氧胆酸钠)培养基和 豆芽汁葡萄糖培养基	188
实训二 微生物采样、富集和分离纯化	190
§1 土壤微生物的采样	190
§2 土壤微生物的富集培养(淤泥红螺菌)	191
§3 土壤微生物的分离纯化(细菌、放线菌、酵母菌、霉菌)	192
实训三 紫外线诱变育种	196
§1 出发菌株的分离纯化	196
§2 紫外线诱变剂量的选择与诱变育种	198
§3 高产突变株的初筛	201
§4 高产突变株的复筛	202
实训四 基因工程育种操作	205
§1 少量质粒 DNA 的提取和鉴定	205
§2 PCR 扩增制备目的基因	209
§3 大肠杆菌感受态细胞的制备和转化	211
§4 重组菌的筛选、鉴定与分析	213
实训五 菌种保藏	217
参考文献	219



第一部分

理论知识





第一章 绪 论

✱ 知识目标

1. 了解工业微生物的演变过程。
2. 掌握工业微生物应具备的特征。
3. 熟悉工业微生物育种技术。

第一节 工业微生物

远在 4 000 多年前,我国古代劳动人民就在实践中发现了发酵现象,并利用它来生产酒和酿造食品。虽然他们当时并不知道微生物是何物,也不明白发酵过程的本质所在,却能利用微生物的作用,制造出今天依然可以称道的各色名酒、名醋和颇具中国特色的各类酱制品等发酵制品。我国古代劳动人民根据生活经验的积累和反复实践,把古代的酿造业发展到了相当完善的程度,为后人奠定了发酵生产的基础。

1676 年,荷兰商人列文虎克用自制的世界上第一台显微镜观察到一个肉眼看不到的神秘微观世界——微生物世界,他所观察到的这些微生物就是古代酿造业和现代发酵工业的主角。

法国葡萄酒在世界上享有盛誉,但在 19 世纪中叶,葡萄酒在酿造过程中经常会发生酸败。法国微生物学家、化学家巴斯德经分析研究,发现葡萄酒酸败的原因是原来所进行的酒精发酵被另一种发酵代替,那就是葡萄糖不是转化成酒精,而是部分地转化成乳酸。他用显微镜在发生酸败的葡萄酒桶上找到了一种与酵母菌形态不一样的呈杆状或球状的乳酸杆菌,并提出应对糖液或酒进行加温消毒,这种灭菌方法就是赫赫有名的巴氏消毒法。他还提出“一切发酵过程都是微生物作用的结果”,因此巴斯德被称为发酵工业之父。

1881 年,德国科学家柯赫利用明胶热熔冷凝的特性制成了固体培养基,第一次分离到了微生物纯种。正是由于他创立了微生物分离和纯化技术,才使啤酒发酵有可能排除有害菌,获得纯种优良菌种,使发酵过程得以稳定,将发酵业推向了大规模的工厂化生产。



除传统的发酵产品外,微生物还源源不断地为我们提供越来越多的新产品,就像动物、植物一样成为人类生活中不可缺少的一部分。自然界的微生物,其目的产物的产量都比较低,这是微生物的生存环境所决定的,因此它们不能直接用于发酵工业生产。只有经过改造,用于发酵工业生产的微生物才叫工业微生物。工业微生物应具备以下特征:

- (1) 菌种要纯。
- (2) 目的产物的产量较高且稳定。
- (3) 生长快,易繁殖。
- (4) 抗杂菌和噬菌体的能力强。
- (5) 微生物的发酵培养基来源广、价格低。
- (6) 生产目的产物的时间短。
- (7) 目的产物易分离提纯。

以上特征是保证发酵产品产量、质量和获得良好经济效益的前提。

第二节 工业微生物育种技术

对微生物进行人工改造,使其成为工业微生物菌种的操作过程,就是工业微生物育种技术。育种不仅可为发酵工业提供合适的菌种,还可不断提高发酵产品的产量和质量,甚至可培育出全新的菌种以生产新的发酵产品。

工业微生物育种技术建立在遗传与变异的基础之上,遗传使优良性状得到积累和稳定,而变异则有利于选育有优良性状的菌种,通过遗传与变异的有效组合来改良微生物并培育出各种优良的工业微生物菌种。工业微生物育种技术的方法如下。

一、自然选育(选择育种)

利用纯培养技术可从自然界混杂的微生物群体中分离、筛选、培育适合工业发酵的菌种。通过纯培养技术不仅可以得到目的微生物的纯培养物,还可以使目的微生物的发酵产量和品质提高,从而选育出适于发酵工业的优良菌种。自然选育利用的是自然变异。虽然选育本身并不改变个体的基因,但选育可以改变群体的遗传结构,从而提高发酵产品的产量和质量。自然选育的纯培养技术使酿酒业最先得到实惠,扭转了酒精生产不稳定的现象。

纯培养技术是工业微生物育种技术的重要手段之一,它不仅可用于自然界微生物的选育,其他育种方法也都离不开它的参与。



二、诱变育种

从自然变异中选育工业微生物菌种是有限的,而且可能是低产甚至不产所需产物,只有经过人工改造才能真正用于工业发酵生产。通过人工的方法使微生物产生变异,从中选育优良菌种,可大大加快工业微生物的育种速度。用物理、化学或生物的方法人工诱导微生物以提高其基因的突变频率,从中选育优良菌种,称为诱变育种。如青霉素产生菌产黄青霉刚从自然界分离出来的野生菌种,青霉素的产量是 $20\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$,在此基础上,经四十多年的诱变育种,到目前已达 $60\,000\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 以上,比原始菌株的产量提高了上千倍。诱变育种具有速度快、收效大、方法简单等优点,是培育高产菌的重要手段,特别是抗生素的高产菌种,大都是由原来的每毫升培养液几十个单位提高到目前的几万个单位。发酵工业所使用的生产菌种绝大部分是人工诱变选育而成,特别是抗生素的高产菌。

三、代谢控制育种

代谢控制育种建立在诱变育种的基础之上。在正常情况下,微生物有一套完善的代谢调节机制,代谢产物既不会缺少也不会过量积累。代谢控制育种就是通过诱变降低或切断(消除)代谢途径中某些支路或目标产物以后的代谢产物,人工控制其代谢过程,以此解除微生物正常的代谢反馈调节机制,使人类需要的目标产物大量积累。微生物代谢控制育种措施有很多,主要包括营养缺陷型突变株、渗漏缺陷型突变株、营养缺陷回复突变株、抗反馈调节突变株、组成型突变株、细胞膜透性突变株等的选育。

代谢控制育种标志着诱变育种发展到理性阶段,在初级代谢产物氨基酸、核苷酸及某些次级代谢产品的生产中得到广泛的应用,取得了引人注目的成就,推动了发酵工业的发展。

四、杂交育种

杂交育种就是把两个遗传组成不同的优良菌株杂交,通过微生物细胞内的基因重组,产生优良性状组合的变异而获得优良菌种。杂交育种不仅可以克服诱变育种的不良反应,提高菌株的生活力,同时还是增加产品新品种的手段之一。杂交育种是选用已知性状的两个菌株进行基因重组育种,是目的性比较强的重要育种方法。

原核生物的杂交育种包括接合、转化、转导等,真核生物的杂交育种包括有性生殖、准性生殖等。20世纪70年代发展起来的原生质体融合技术,打破了微生物种属间的亲缘关系,使微生物基因间重组范围扩大,已成为微生物遗传育种的有效手段。

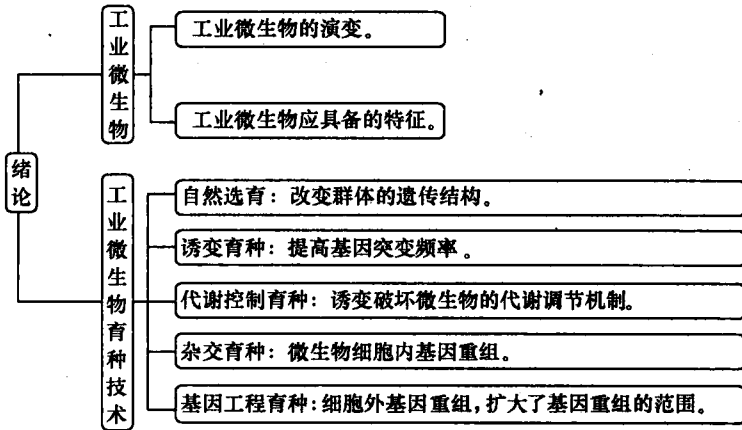


五、基因工程育种

基因工程是 20 世纪 70 年代以后兴起的一门先进的育种技术,是指用人工的方法使基因在细胞外重组,即将分离到的或合成的基因经过改造,插入载体中,导入受体细胞内,使其扩增和表达,从而获得基因产物,或者使生物表现出新的性状。基因工程育种的目性很强,能像工程一样预先设计和控制,按人类所需要的目标培育出全新的菌种或改良现有的工业微生物菌种。基因工程育种的另一个重要作用是使生物间基因重组范围空前扩大,为工业微生物基因重组育种提供了更多的材料。

基因工程操作流程主要包括目的基因的获得、载体的选择、目的基因与载体 DNA 重组、重组 DNA 导入受体细胞、重组菌的筛选与鉴定等。基因工程菌的应用有广阔的发展前景。

本章小结



复习思考题

1. 用于发酵工业的微生物菌种应具备哪些特征?
2. 工业微生物育种技术的基础是什么? 具体作用有哪些?
3. 工业微生物育种技术有哪几种方法? 其原理是什么?



第二章 微生物育种的遗传基础

✧ 知识目标

1. 了解细胞分裂的过程和遗传学意义及常见微生物的繁殖方式。
2. 了解微生物的遗传物质。
3. 了解微生物的基因重组及基因突变的相关知识。

✧ 能力目标

1. 能解释常见微生物育种中的遗传问题。
2. 能根据实际情况选择合适的突变修复方式。

微生物育种以遗传和变异为基础。要做好育种工作,首先须对微生物育种的遗传学基础有深刻的认识。

第一节 细胞分裂及遗传学意义

无论是单细胞还是多细胞的生物体,其细胞的生命都是有限的,要延续细胞的生命必须进行细胞分裂。即使是有性繁殖生物的性细胞,也是通过特殊形式的细胞分裂而形成的。因此,细胞分裂是生物体生长、繁殖和世代间遗传物质传递的必要方式。在细胞分裂过程中,作为遗传物质的染色体通过一系列有规律的变化使自身得以合理分配,从而保证了遗传物质在世代间传递的稳定性和延续性。细胞分裂的主要方式为有丝分裂(mitosis)和减数分裂(meiosis)。

一、有丝分裂

有丝分裂是细胞分裂的主要形式。它包括两个紧密相连的过程:先是细胞核分裂,即细胞核一分为二;后是细胞质分裂,即细胞质一分为二,各含一个核。为了便于描述,一般以分裂时不同的特点为标志把细胞核的分裂分为四个时期:前期(prophase)、中期(metaphase)、后期(anaphase)和末期(telophase)。在连续两次