

高等学校教材

工业微生物遗传育种学原理与应用

Principles and Applications of Genetic
Breeding for Industrial Microorganism

金志华 林建平 梅乐和 编著



化学工业出版社
教材出版中心

· 北京 ·

(京)新登字 039 号

图书在版编目(CIP)数据

工业微生物遗传育种学原理与应用/金志华, 林建平, 梅乐和
编著. —北京: 化学工业出版社, 2005.9

高等学校教材

ISBN 7-5025-7676-2

I. 工… II. ①金…②林…③梅… III. 工业微生物学-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 (2005) 第 109572 号

高等学校教材

工业微生物遗传育种学原理与应用

Principles and Applications of Genetic
Breeding for Industrial Microorganism

金志华 林建平 梅乐和 编著

责任编辑: 赵玉清

责任校对: 李 林

封面设计: 潘 峰

*

化学工业出版社 出版发行
教材出版中心

(北京市朝阳区惠新里 3 号 邮政编码 100029)

购书咨询: (010)64982530

(010)64918013

购书传真: (010)64982630

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

*

新华书店北京发行所经销

北京市彩桥印刷厂印刷

三河市前程装订厂装订

开本 787mm×1092mm 1/16 印张 12 $\frac{3}{4}$ 字数 309 千字

2006 年 1 月第 1 版 2006 年 1 月北京第 1 次印刷

ISBN 7-5025-7676-2

定 价: 25.00 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

前 言

工业微生物是指用于通过工业规模培养能够获得特定产品或达到特定社会目标的微生物。无论是传统的发酵工业，还是以基因工程为核心的现代生物技术都离不开工业微生物。由微生物参与的生物过程的效率主要是由所用微生物的遗传特性决定的，而微生物的遗传特性只有通过遗传育种才能得到改进。因此，过去、现在、将来，工业微生物遗传育种都是工业生物技术的研究热点之一。

本书在介绍与工业微生物育种有关的遗传学基础知识的基础上，系统地介绍了现代工业微生物育种的相关技术、应用实例，以及相关领域国内外的最新进展，如定向进化、代谢工程、基因组重排等。在章节安排上，第1章为绪论，第2~5章简洁、系统地介绍与微生物育种有关的遗传学基础知识，第6章介绍工业微生物的筛选，第7~10章介绍微生物育种的具体方法，包括具体应用实例与最新进展，第11章介绍菌种退化与菌种保藏。

本书原稿是作者在浙江大学和浙江大学宁波理工学院任课时所使用的讲义。它已经过6年试用，并经过3次修改，大量吸收了读者的反馈意见，使本书的内容更加系统、完善。在成书过程中，得到了各方面的支持与帮助。浙江大学材料与化工学院岑沛霖教授、生命科学学院钱凯先教授审阅本稿，并提出许多宝贵意见。化学工业出版社编辑为本书的出版付出了很多精力和劳动，在此一并表示感谢。

鉴于作者水平有限，疏漏和不足之处在所难免，欢迎读者批评指正。

作 者

2005年6月

目 录

1	绪论	1
1.1	工业微生物及其应用	1
1.1.1	工业微生物	1
1.1.2	工业微生物的应用状况	1
1.2	遗传学及其研究的对象	5
1.3	遗传学的形成与发展	5
1.3.1	孟德尔以前及同时代的一些遗传学说	5
1.3.2	遗传学的诞生	6
1.3.3	遗传学的发展	6
1.4	工业微生物遗传育种学及其研究进展	7
1.5	工业微生物遗传育种学的学习方法	8
2	遗传的物质基础	10
2.1	遗传物质基础的确定	10
2.1.1	肺炎链球菌转化实验	10
2.1.2	噬菌体的感染实验	11
2.1.3	烟草花叶病毒拆分和重建实验	12
2.2	DNA 的结构	13
2.3	原核生物基因组与真核生物基因组	15
2.3.1	原核生物基因组	15
2.3.2	真核基因组	16
2.4	核糖核酸	17
2.5	DNA 复制	18
2.5.1	细菌 DNA 复制	18
2.5.2	真核生物 DNA 复制	20
2.6	基因的概念及基因型和表型的表示方法	20
2.6.1	基因的概念	20
2.6.2	基因型和表型的表示方法	21
3	遗传信息的表达和调控	22
3.1	转录	22
3.1.1	原核生物的基因转录	23
3.1.2	真核生物的基因转录	25
3.2	翻译	26

3.3	原核生物基因表达调控	28
3.3.1	转录调节	28
3.3.2	乳糖操纵子	31
3.3.3	阿拉伯糖操纵子	34
3.3.4	色氨酸操纵子	35
3.3.5	翻译控制	37
3.3.6	可变 σ 因子的调控	37
3.4	真核生物基因表达调控	37
4	基因突变和诱变剂	39
4.1	突变的种类与机制	39
4.1.1	基因突变	39
4.1.2	染色体畸变	40
4.2	突变的表型效应	41
4.2.1	突变的表型效应	41
4.2.2	突变型的种类	43
4.3	回复突变和抑制突变	45
4.3.1	正向突变、回复突变和抑制突变	45
4.3.2	基因内抑制突变	45
4.3.3	基因间抑制突变	46
4.3.4	基因间间接抑制突变	47
4.4	增变基因和突变热点	48
4.5	突变体的形成与表型延迟	48
4.5.1	突变体的形成	48
4.5.2	表型延迟	49
4.6	突变的修复	49
4.6.1	光修复	49
4.6.2	复制前修复	50
4.6.3	复制后修复	50
4.6.4	SOS 修复	51
4.6.5	嘧啶二聚体糖基酶修复系统	51
4.7	诱变剂	52
4.7.1	物理诱变剂	52
4.7.2	化学诱变剂	54
5	基因重组	59
5.1	接合	59
5.1.1	细菌基因重组的发现和证实	60
5.1.2	大肠杆菌接合作用的解释	61
5.2	转化	64

5.2.1	转化 DNA 的特点	65
5.2.2	受体细胞的特点	65
5.2.3	枯草杆菌感受态和非感受态的生理区别	66
5.2.4	转化因子的吸收和整合	66
5.2.5	转化在遗传学分析中的应用	67
5.3	转导	67
5.3.1	普遍性转导	67
5.3.2	特异性转导	68
5.4	转座子与转座作用	71
5.4.1	插入顺序复合元件	71
5.4.2	转座的分子机制	71
6	工业微生物筛选	73
6.1	采样	74
6.1.1	从土壤中采样	74
6.1.2	根据微生物生理特点采样	74
6.1.3	在特殊环境下采样	75
6.2	富集培养	75
6.3	纯种分离	76
6.3.1	纯种分离的基本方法	76
6.3.2	通过控制营养和培养条件进行纯种分离	76
6.3.3	利用平皿的生化反应进行分离	77
6.4	代谢产物鉴别	78
7	诱变育种	79
7.1	诱变育种的作用和特点	79
7.1.1	诱变育种的作用	79
7.1.2	高产菌株诱变育种的特点	80
7.2	诱变育种前的准备工作	80
7.2.1	了解影响菌种生长发育的主要因素	81
7.2.2	了解菌株的菌落形态	81
7.2.3	了解菌种特性及其与生产性能的关系	82
7.2.4	建立一个准确、简便、快速检测产物的方法	82
7.2.5	研究合适的菌种保藏方法	82
7.3	诱变	82
7.3.1	出发菌株的选择和纯化	83
7.3.2	单孢子(或单细胞)悬浮液的制备	83
7.3.3	诱变剂的选择	84
7.3.4	诱变处理	85
7.3.5	影响突变率的因素	85

7.4	筛选	86
7.4.1	筛选方案	86
7.4.2	筛选方法	86
7.4.3	摇瓶培养	88
7.4.4	产物活性测定	89
7.4.5	摇瓶数据的调整和有关菌株特性的观察分析	89
7.4.6	培养基和培养条件的优化	89
7.5	常见突变株的筛选	89
7.5.1	营养缺陷型突变株的筛选	89
7.5.2	温度敏感突变株的筛选	94
7.5.3	抗噬菌体菌株的选育	96
8	推理育种	99
8.1	微生物代谢	99
8.1.1	初级代谢产物和初级代谢	99
8.1.2	次级代谢产物和次级代谢	100
8.1.3	初级代谢和次级代谢的关系	100
8.2	微生物代谢调节	100
8.2.1	初级代谢的调节机制	100
8.2.2	次级代谢的调节机制	105
8.3	推理育种的策略及应用实例	109
8.3.1	组成型突变株的选育	109
8.3.2	抗分解调节突变株的选育	109
8.3.3	营养缺陷型在推理育种中的应用	110
8.3.4	渗漏缺陷型在推理育种中的应用	111
8.3.5	抗反馈调节突变株的选育	111
8.3.6	解除磷酸盐调节突变株的选育	115
8.3.7	细胞膜渗透性突变株的选育	115
8.3.8	次生代谢障碍突变株的应用	116
8.3.9	抗生素酶缺失突变株的筛选	117
8.3.10	形态突变株的筛选	117
8.3.11	适应酶系统调节突变株的筛选	118
9	杂交育种	119
9.1	微生物杂交	119
9.1.1	杂交的意义	119
9.1.2	杂交过程中亲本和培养基的选择	119
9.2	细菌杂交育种	120
9.2.1	杂交亲本菌株选择、标记菌株和性别菌株的获得	120
9.2.2	杂交方法	120

9.3	放线菌杂交育种	121
9.3.1	放线菌杂交原理	121
9.3.2	放线菌杂交技术	122
9.4	霉菌杂交育种	124
9.4.1	异核体的形成	125
9.4.2	杂合二倍体的形成和检出	127
9.4.3	体细胞重组	127
9.4.4	高产重组体的筛选	128
9.5	酵母菌杂交育种	128
9.5.1	标记亲株的选择	129
9.5.2	杂交方法	129
9.6	原生质体融合	129
9.6.1	原生质体融合原理和程序	130
9.6.2	亲株遗传标记的选择	130
9.6.3	原生质体的制备	130
9.6.4	原生质体再生	132
9.6.5	原生质体融合	133
9.6.6	原生质体融合优越性	134
9.6.7	其他原生质体育种技术	134
9.7	转导育种	135
9.8	转化育种	135
10	微生物分子育种技术	136
10.1	重组 DNA 技术	137
10.1.1	重组 DNA 技术的基本过程	137
10.1.2	工具酶与相关技术	138
10.1.3	外源基因的获得	147
10.1.4	载体-宿主系统	150
10.1.5	重组 DNA 分子转入宿主细胞的方法	155
10.1.6	重组体的筛选和鉴定	157
10.1.7	基因的表达与调控	158
10.2	酶的定向进化	163
10.2.1	定向进化简介	163
10.2.2	定点突变	164
10.2.3	易错 PCR	168
10.2.4	DNA 重排	169
10.3	基因组重排	174
10.4	代谢工程	175
10.4.1	代谢工程概况	175
10.4.2	代谢网络的生物信息学	176

10.4.3	同源重组在代谢工程中的用途	177
10.4.4	初级代谢产物的代谢工程	177
10.4.5	次级代谢产物的代谢工程	178
11	菌种退化与菌种保藏	185
11.1	菌种的退化及防治	185
11.1.1	菌种退化	185
11.1.2	菌种退化的原因	185
11.1.3	菌种退化的防止	186
11.1.4	菌种复壮	186
11.2	菌种保藏	187
11.2.1	斜面保藏法	187
11.2.2	液体石蜡保藏法	187
11.2.3	干燥保藏法	188
11.2.4	冷冻干燥保藏法	188
11.2.5	低温保藏法	190
11.2.6	液氮超低温保藏法	190
11.3	菌种保藏机构	191
	主要参考文献	193

1 绪 论

工业微生物是指通过工业规模培养能够获得特定产品或达到特定社会目标的微生物。工业微生物与工农业生产和人们的日常生活有着极其密切的关系，无论是传统的发酵工业，还是以基因工程为核心的现代生物技术都离不开工业微生物。优良的微生物菌种是发酵工业的基础和关键，要使发酵工业产品的产量和质量有所提高，最关键的是要选育优质的微生物菌种。因此，工业微生物遗传育种一直是发酵工业的研究热点和难点，在发酵工业中占有极其重要的地位。

1.1 工业微生物及其应用

1.1.1 工业微生物

工业微生物是指应用于发酵工业的微生物。发酵一词来源于拉丁语沸腾的派生词，用于描述酵母作用于果汁或麦芽浸出液时的现象。其实，这种沸腾现象是由果汁或麦芽浸出液中的糖在缺氧条件下被降解而产生二氧化碳引起的。

在生物化学中，我们将没有外源的最终电子受体的生物氧化模式称为发酵，而将有外源的最终电子受体的生物氧化模式称为呼吸。根据外源电子最终受体是不是分子氧，把呼吸分为有氧呼吸（外源电子最终受体为分子氧）和无氧呼吸（外源电子最终受体为无机氧化物）。在工业微生物学中，发酵是指利用微生物进行的有机物的酶促转化过程。根据所用微生物的需氧情况，发酵可以分为厌氧发酵和好氧发酵。

作为工业微生物，一般要满足以下要求：遗传上稳定，又要对诱变剂敏感；容易产生营养细胞、孢子或其他繁殖体，种子的生长必须迅速、旺盛；必须是纯种，有自身保护机制，能抵抗杂菌污染；产生产物的时间短，在一定时间内能产出预期数量的产物；产物容易分离提纯。只有具备了这些条件的菌株，才能保证发酵产品的产量和质量，这既是发酵工业的最低要求，也是发酵工业的最大目的。

从土壤中分离得到的野生型微生物能适应环境，但不能按人的意志生产人类所需要的物质或产量很小。因此必须对野生型微生物进行菌种选育使微生物产生数量远远超过它本身需要的物质或不是它正常产生的新物质。

1.1.2 工业微生物的应用状况

1.1.2.1 氨基酸发酵 氨基酸发酵起始于1958年，其中谷氨酸是生产最早、产量最大的氨基酸。氨基酸发酵所用的微生物主要是短杆菌和棒杆菌属的一些种，如黄色短杆菌、乳糖发酵短杆菌、北京棒杆菌、谷氨酸棒杆菌等。由于氨基酸的应用范围不断扩展（从用于医疗疾

病到作为食品、饲料添加剂和调味品等)和微生物发酵技术的发展,近几十年通过发酵来生产氨基酸的规模不断扩大(如谷氨酸产量为37万吨/年,赖氨酸产量为4万吨/年),品种也不断增加(已有17种可以用发酵法或酶法生产)。

由于对氨基酸生物合成途径和代谢调节机制研究的深入,采用人工诱发营养缺陷型和代谢调节型突变株,使氨基酸发酵的品种不断增多和产量迅速增加,推动了氨基酸发酵工业的迅速发展。营养缺陷型突变株的遗传特性是缺失了生物合成目的氨基酸外的某种氨基酸或其他代谢产物的酶,从而使合成目的氨基酸的量大大增加;而代谢调节型突变株的生化特性是由于提高了合成目的氨基酸的酶的活力,从而使目的氨基酸的合成量大大增加。

除发酵法外,酶法也是氨基酸生产的一种重要方法。如天冬氨酸可用芽孢杆菌、大肠杆菌或琥珀酸杆菌由延胡索酸和铵盐转化形成;色氨酸可用异常汉逊氏酵母或藤黄微球菌由邻氨基苯甲酸或吡喹丙酮酸转化形成。酶法生产氨基酸主要运用了固定化酶技术,其特点是可连续生产,原料可直接转化为产品。

在发酵法生产氨基酸中最引人注目的技术是运用重组DNA技术构建基因工程菌,提高了氨基酸生产水平。如利用重组DNA技术构建的苏氨酸和高丝氨酸的基因工程菌进行发酵生产,使这些氨基酸的发酵水平得到了不断的提高。

1.1.2.2 抗生素发酵 自20世纪40年代青霉素应用于临床以来,抗生素为人类的健康做出了卓越的贡献。1928年英国科学家Fleming发现了在含金黄色葡萄球菌的平板上污染了青霉菌后,在青霉菌周围细菌不能生长的现象。他把这个青霉菌分离出来后再进行培养,发现其培养液能抑制各种细菌生长,并经动物试验证实其没有毒性,他依照青霉菌(*Penicillium*)的名字将其中的活性成分命名为青霉素(Penicillin)。十年后,Chain和Florey经过进一步研究得到了青霉素的结晶品并使其应用于临床。第二次世界大战期间,为了治疗细菌感染,美国政府邀请Chain和Florey到美国帮助开发青霉素的生产。经过Chain和Florey与美国制药公司的共同努力,建立了适合于工业生产的沉没发酵技术。他们主要采用X射线照射法进行诱变育种提高青霉菌合成青霉素的能力,以及采用含玉米浆的培养基进行发酵,使青霉素工业生产取得了成功,由此开创了抗生素时代。

青霉素在临床上的奇异疗效,激发了世界各国有关学者的研究热情。1944年Waksman发现了由链霉菌产生的链霉素用于治疗由细菌特别是结核杆菌引起的感染有特效。这个发现使人们对从土壤中寻找由放线菌产生的抗生素充满了信心。此后陆续发现了氯霉素、金霉素、土霉素、制霉菌素、红霉素、丝裂霉素C等,由此造就了抗生素发展的黄金时代。

一般认为抗生素的定义应为在低浓度下有选择性地杀死或抑制它种生物机能的微生物小分子次级代谢产物及其衍生物。根据抗生素的化学结构,通常将抗生素分为五大类:β-内酰胺类(如青霉素、头孢菌素)、氨基糖苷类(如链霉素、卡那霉素、庆大霉素)、大环内酯类(如红霉素、螺旋霉素、吉他霉素)、四环类(金霉素、土霉素、四环素)和多肽类(多黏菌素、放线菌素、杆菌肽)。生产抗生素所用的微生物种类很多,主要为放线菌(主要是链霉菌)和霉菌。

由于抗生素的大量使用,临床上出现了耐药菌,过敏反应也时有发生,这就促使药物化学家去寻找能对付耐药菌和提高疗效的药物。对已有抗生素进行结构改造来寻找具有更好疗效的衍生物是一个主要的研究方向,因此抗生素发展到20世纪60年代后出现了一个新的研究领域,即进入了半合成抗生素的时代。

近年来由于生命科学各领域的迅速发展,现在抗生素的研究已扩展到从微生物的代谢产

物中寻找具有生理活性物质（如酶抑制剂、免疫调节剂、受体拮抗剂和抗氧化剂等）的研究。

1.1.2.3 微生物酶制剂发酵 酶是一种具有催化活性的蛋白质。20 世纪 40 年代末，生产 α -淀粉酶的深层液体发酵首先在日本实现了工业化生产，标志着现代酶制剂工业的开始。酶制剂根据其来源可以分为动物、植物及微生物酶；依据其用途可分为工业用、分析用及药用。目前已有 100 多种酶能够大规模工业化生产，其中大部分是通过微生物发酵生产的。微生物作为酶源具有以下特点：可大量生产；筛选方便，短期内可处理上千个菌株；通过环境改变或遗传变异，有可能大大提高酶活性和酶产量；生产周期短，成本低；各种酶有高度专一性，而不同的微生物所产生的同一催化反应酶又有一定的差异，这些特性使酶可广泛适应不同的操作条件。

固定化酶和固定化活细胞技术、基因工程技术以及酶的改造和化学修饰等的研究，极大地推动了酶生产的工业化，尤其是淀粉酶和蛋白酶进展非常快。

酶制剂的用途非常广泛，尤其是作为临床医疗、诊断和分析用的酶制剂，是一个富有前景的领域，如链激酶（溶血栓、提高创伤和烧伤疗效）、己糖激酶（分析葡萄糖，诊断血糖及糖尿病）、乳酸脱氢酶（分析血清谷丙转氨酶，诊断病毒性肝炎、黄疸、急性心肌梗死）等。

1.1.2.4 有机溶剂和有机酸发酵 溶剂和有机酸都是微生物的初级代谢产物，与工业生产和人们的日常生活有着密切的关系，也是工业发酵中历史最悠久、吨位最大、价格最低的产品。自 20 世纪 50 年代以来，有机酸和溶剂发酵工业受到了来自石油化工的竞争，但由于微生物发酵的原料是可再生资源（如淀粉、纤维素等），获得的产品更适合于食品、医药等，加上微生物育种与生产工艺方面的进步，这些传统的发酵工业仍然具有强大的生命力。

微生物生产的溶剂及其他化工产品包括酒精、丙酮、丁醇、丁二醇等。重要的微生物有梭菌，它能产生各种各样的有机溶剂，如丙酮、丁醇、异丙醇、丁酸等，常用的梭菌有丁酸梭菌、丙酮丁醇梭菌、糖乙酸丁醇梭菌。丁二醇是合成橡胶工业的重要原料，它可由葡萄糖在气杆菌属和赛氏杆菌属的一些种的作用下产生。甘油可由耐高渗透压酵母如假丝酵母等在通风条件下用发酵法生产。

有机酸在食品加工、医药、化工等领域的许多方面都有广泛的应用。发酵法生产有机酸涉及的微生物主要是细菌、霉菌等。有机酸中生产最早、产量最大的是柠檬酸。

1.1.2.5 核酸类发酵 许多核苷酸类物质如 5'-IMP 和 5'-GMP 等具有强化食品风味的功能，因此利用微生物发酵生产核苷和核苷酸的主要应用领域是在食品工业中作为风味强化剂。核苷、核苷酸及其衍生物的另一重要应用领域是用于临床治疗药物，如嘌呤类似物 8-氮鸟嘌呤和 6-巯基嘌呤具有与抗生素类似的功能，可以用于抑制癌细胞的生长；S-腺苷甲硫氨酸及其盐类用于治疗帕金森氏症、失眠并具有消炎镇痛作用。

目前工业上主要通过酶法水解 RNA 来生产核苷酸。RNA 的来源很广，如啤酒厂的废酵母、单细胞蛋白及其他发酵工业的废菌体，其中以酵母中提取 RNA 为最常见。RNA 水解酶一般来自 *Penicillium citrinum* 和 *Streptomyces aureus* 两个菌种的突变株。有些核苷和核苷酸类产品采用直接发酵法生产，如肌苷、5'-IMP 和 5'-GMP 等。

1.1.2.6 微生物多糖发酵 微生物多糖在化工、医药方面的应用具有广泛的前途，如由甘蓝黑腐病黄单胞菌产生的黄原胶可用于石油工业和消防，也可作为增加食品黏度的添加剂；由大型真菌产生的多糖类物质则是传统的滋补性药物，具有抗癌功能。

1.1.2.7 微生物生理活性物质的发酵 随着生命科学各领域的迅速发展,从微生物的代谢产物中寻找具有生理活性的物质(如酶抑制剂、免疫调节剂、受体拮抗剂和抗氧化剂等)是近几年的研究热点之一。这类物质是在抗生素研究的基础上发展起来的。为了区别于一般抗生素并强调其在医疗上应用的可能性,Monaghan 等将这类物质称为“生物药物素”(biopharmacetin)。国内不少学者认为这类物质和一般抗生素均为微生物次级代谢产物,它们在生物合成机制、筛选研究程序及生产工艺等许多方面都有共同的特点,因此将它们统称为微生物药物(microbial medicine)。

(1) 酶抑制剂 从酶学研究的历史来看,第一代酶学研究是以阐明各种酶的一级结构和高级结构为标志;第二代酶学研究是以阐明酶的催化机制和限定分解机制为标志,这对理解酶的生理意义有着重要的作用;而对酶抑制剂的研究有可能对炎症、免疫、补体反应、致癌、癌的转移、病毒感染等各种疾病的病因予以阐明并提出治疗方案,这个领域被称为第三代酶学研究。如棒酸是 β -内酰胺类酶抑制剂,与 β -内酰胺类抗生素合用,可提高 β -内酰胺类抗生素的抗菌活性。洛伐他丁是3-羟基-3-甲基-戊二酰辅酶A还原酶(HMG-CoA,胆固醇生物合成过程中的第一个酶)的抑制剂,可用于降血脂。血管紧张素转化酶(ACE)能将无活性的十肽血管紧张素I转化为有活性的八肽血管紧张素II,还可将有血管舒张活性的血管舒张肽转化为无活性的七肽,对调节血压起重要作用,因此,ACE抑制剂具有降血压作用。蛋白激酶C(PKC)属于丝氨酸/苏氨酸特异性的一类蛋白激酶,对细胞的信号传导起重要作用,并有控制细胞生长分化和促瘤的活性,因此,PKC抑制剂有抗肿瘤活性。

(2) 免疫调节剂 微生物产生的免疫调节剂可以分为免疫抑制剂和免疫增强剂。免疫抑制剂对人体器官移植的抗免疫排斥反应起关键性的作用,如环孢菌素A、FK-506、雷帕霉素等。

(3) 受体拮抗剂 根据对受体配体结合的抑制作用筛选出来的受体拮抗剂可能具有特异性强、毒性小的药理作用。如由曲霉产生的缩胆囊素(CCK)受体拮抗剂可用于治疗与CCK有关的胃肠系统紊乱,由链霉菌产生的催产素受体抑制剂可用于延缓早产等。

1.1.2.8 维生素类生理活性物质 这类产品包括维生素A、B₂、B₁₂、C和D,以及一些维生素的前体,如维生素C的前体山梨醇,维生素A的前体 β -胡萝卜素以及维生素D的前体麦甾固醇等。

1.1.2.9 激素类药品 真菌和细菌的数十个属的许多种具有进行甾体转化的能力,用微生物进行的甾体转化主要有羟化、脱氢、加氢、环氧化等反应以及侧链或母核开裂反应等。

1.1.2.10 食品发酵 食品发酵是工业微生物最古老的内容,主要包括酿酒发酵和调味品发酵。酒类饮料主要利用酵母菌发酵制作。酒类大致可以分发酵酒(啤酒、葡萄酒、绍兴酒)、蒸馏酒(白酒)和配制酒(药酒)。调味食品主要有酱油、豆酱、食醋、乳制品。酱油和豆酱是用酱油曲霉酿制的;食醋是用醋杆菌进行有氧发酵生产的;乳制品是用乳酸菌或和酵母混合发酵制备的。

1.1.2.11 单细胞蛋白 单细胞蛋白(SCP)是以烃类、酒精或工农业废物为原料,通过大规模培养酵母或细菌,取出细胞,经干燥和灭菌后可以作为人类食物或动物饲料。制造单细胞蛋白的微生物种类繁多,因不同的原料而异。

1.1.2.12 微生物环境净化 环境保护已逐渐成为人类的共识,也是可持续发展战略的重要组成部分。微生物在环境保护中扮演着十分重要的角色,微生物法已经成为污水、废气和固体废弃物处理的主要方法。微生物在有毒、有害化合物的降解及受污染环境的生物修复中也

正在发挥着重要的作用。

微生物对工业废水的处理可分为厌氧处理法和好氧处理法两种。厌氧处理法是采用厌氧消化器把微生物可降解的有机物转换成甲烷、 CO_2 、水和其他气体。好氧处理法是指好氧微生物在污水中进行有氧发酵的处理方法。污水中的有机物被微生物吸附后，菌体繁殖成为凝块状的菌胶团，通过一系列的生化反应，包括有机物分解、菌体合成以及部分菌体死亡、自我消化等最终放出气体产物以及相应的热量，从而使污水得到净化。活性污泥菌胶团是由细菌、霉菌、藻类和原生动物等多种微生物形成的凝集团。

1.1.2.13 微生物冶金 利用微生物进行石油脱硫、探矿、冶金是近年来研究和开发的一项新技术，特别是细菌冶金，适用于贫矿、尾矿和稀有矿的处理。细菌冶金主要利用氧化亚铁硫杆菌等自养细菌具有把亚铁氧化为高铁、把硫和低价硫化物氧化为硫酸的能力，将含硫金属矿石（主要是尾矿、贫矿）中的金属离子形成硫酸盐而释放出来。用此法浸出的金属有铜、钴、锌、铅、铀、金等。

1.2 遗传学及其研究的对象

遗传学是生命科学领域中一门核心学科，主要研究遗传物质的结构与功能以及遗传信息的传递与表达。遗传学这一学科名称是由英国遗传学家贝特森（W. Bateson）于1909年首先提出的。遗传学可以进一步分为传递遗传学（也称为经典遗传学）、分子遗传学和群体遗传学三个主要的亚学科。经典遗传学主要研究遗传物质纵向传递的规律以及基因型与表型的关系。分子遗传学侧重研究基因的结构、功能和横向传递。结构是指遗传物质的化学本质与精细结构，功能是指遗传物质的复制、表达、调控、重组与变异。群体遗传学研究群体中基因频率和基因型频率以及影响其平衡的各种因素。

与生命科学其他学科相比，遗传学具有以下特点。

① 遗传学是一门推理性的学科。遗传学的研究方法是根据自然现象或实验数据推理出一种假设，然后通过实验加以验证。

② 多学科交叉与融合。遗传学主要建立在生物化学、细胞生物学和统计学的基础上，但又涉及生命科学的各个领域。

③ 发展快。遗传学的发展非常快，新理论、新技术、新成果层出不穷。

④ 应用性强，转化为生产力的周期短。以遗传学为理论基础，已派生出许多应用学科，如动植物及微生物育种学、优生学、生物工程学等。

1.3 遗传学的形成与发展

1.3.1 孟德尔以前及同时代的一些遗传学说

公元前5世纪希波克拉底（Hippocrates）提出了第一个遗传学理论，他认为子代之所以具有亲代的特征是因为在精液或胚胎里集中了来自身体各部分的微小代表元素。按照这一观点，后天获得的性状是可以遗传的。100年后亚里士多德（Aristotle）认为亲代残缺，下一代不一定残缺，因而提出精液不是提供胚胎组成的元素，而是提供后代的蓝图。生物的遗传不是通过身体各部分样本的传递，而是个体胚胎发育所需信息的传递。可惜这一精辟的见

解当时未能引起人们的重视。

1809 年拉马克 (J. B. Lamarck) 提出了用进废退的进化论观点, 并由此得出获得性状 (acquired characteristics) 是可以遗传的。这是拉马克一生中最大的错误, 可悲的是这一错误观点一直延续到十九世纪六十年代。

1866 年达尔文 (Darwin) 提出了泛生论 (hypothesis of pangensis), 认为身体各部分存在一种胚芽或泛子 (pangens), 它决定所在细胞的分化和发育。各种泛子随着血液循环汇集到生殖细胞中, 在受精卵发育过程中, 泛子又不断流到不同的细胞中控制所在细胞的分化, 产生一定的组织器官。显然这一观点是受到希波克拉底理论的影响, 但在血液中根本就找不到所谓的泛子, 所以这一理论是不能成立的。

1883 年威廉 (W. Roux) 提出有丝分裂和减数分裂的存在可能是由于染色体组成了遗传物质, 他还假定了遗传单位沿着染色体作直线排列。1883 年和 1885 年魏斯曼 (Weismann) 提出了种质论, 认为许多细胞可分为种质和体质两部分, 种质是独立的、连续的, 能产生后代的种质和体质。种质的变异将导致遗传的变异, 而环境引起的变异是不连续的。

1869 年高尔顿 (F. Galton) 用数理统计方法研究人类智力的遗传, 发表了“天才遗传”, 认为变异是连续的, 亲代的遗传性在子女中各占一半, 并彻底混合, 即“融合遗传论”。由于他所选择的研究性状是数量性状, 所以虽然他的结论是正确的, 但只适合于数量性状, 不能作为遗传的普遍规律。

1.3.2 遗传学的诞生

在孟德尔以前就已经有一些植物学家做了植物杂交实验, 并取得了显著的成绩。如 1797 年奈特 (T. Knight) 将灰色和白色的豌豆进行杂交, 结果杂交一代全部是灰色, 而杂交第二代产生灰色和白色。1863 年诺丹发表了植物杂交的论文, 他认为: ① 植物杂交的正交和反交的结果是相同的; ② 在杂种植物的生殖细胞形成时负责遗传性状的要素互相分开, 进入不同的性细胞中, 否则就无法解释杂种二代所得到的结果。

1866 年奥地利遗传学家孟德尔 (G. J. Mendel) 根据 8 年植物杂交实验, 发表了“植物杂交实验”的论文 (即现在的孟德尔分离定律和自由组合定律), 但他的工作当时并未引起重视。直到 1900 年, 狄夫瑞斯 (H. Devries)、科伦斯 (C. F. J. Correns) 和切尔迈克 (E. V. Tschermak) 三位植物学家分别同时发现了这篇论文和它的价值, 才使孟德尔学说重见天日, 并建立了遗传学这门学科, 这就所谓孟德尔定律的重新发现。

1901 年狄夫瑞斯提出了“突变”这一名词。1902 年 Sutton 和 Boveri 首先提出了染色体是遗传物质的载体的假设。1902~1909 年贝特森先后创用了遗传学 (genetics)、等位基因 (allele)、纯合体 (homozygous)、杂合体 (heterozygous)、上位基因 (epistatic gene) 等名词。1909 年约翰逊 (Johannsen) 创用了基因 (gene)、基因型 (genotype) 和表型 (phenotype) 等名词。此时遗传学的雏形已形成, 遗传学作为一门新的学科终于诞生了。

1.3.3 遗传学的发展

遗传学的发展大致可分为三个时期。

第一个时期是细胞遗传学时期 (1910~1940 年)。此时期主要是确立了遗传的染色体学说。1910 年摩尔根 (Morgan) 和他的学生们用果蝇做材料研究性状的遗传方式, 提出了连锁交换定律, 并确定基因直线排列在染色体上。这样, 就形成了一套经典遗传学的理论体

系。经典遗传学的基本单位是一个不可再分而且是抽象的基因。

第二个时期是微生物遗传学和生化遗传学时期（1941~1969年）。这一时期的特点是遗传学研究的对象从真核生物转向原核生物，并更深入地研究基因的精细结构和生化功能。重大成果有“一个基因一个酶”的建立（Beadle与Tatum，1941年），遗传物质为DNA的确定（Avery，1944年）、跳跃基因的发现（B. McClintock，1951年）、DNA双螺旋结构模型的建立（Watson与Crick，1953年）、中心法则的提出（Crick，1958年）。此期间遗传的基本单位是顺反子（cis-trans），它是具有一定功能的实体，在不同的位点上可以发生突变和重组。

第三个时期是分子遗传学时期，从1953年双螺旋结构模型的建立到现在。此期间的主要贡献有乳糖操纵子模型的建立（Jacob与Monod，1961年），遗传密码的破译（Nirenberg与Khirana，1964年），逆转录酶（Temin，1975年），DNA合成酶（Kornberg，1958年），限制性内切酶的发现（Arber，1962年，1968年；Smith，1978年），DNA体外重组技术的建立（Berg，1972），DNA测序（Sanger与Gilbert，1977年），转座子的移动（Sharpino，1980年）核酶的发现（Cech与Altman，1981年），PCR技术的建立（Swithies，1986年），内含子的发现（Sharp与Roberts，1977年），体细胞克隆羊的成功（Wilmur，1997年）以及人类基因组计划的完成（1990年10月启动，2000年6月完成框架图，2002年2月完成精细图）。现在基因的概念是一段可以转录为功能性RNA的DNA，它可以重复、断裂的形式存在，并可转座。

1.4 工业微生物遗传育种学及其研究进展

工业微生物遗传育种学是一门应用科学技术，其理论基础是微生物遗传学和生物化学，研究对象为微生物遗传和变异，研究内容涉及范围非常广泛，最主要的是基因突变、重组以及突变菌株与重组菌株的筛选，研究目的是微生物代谢产物的高产、优质和新产品的开发。

工业微生物育种学是建立在微生物遗传和变异基础上的。所谓遗传就是指亲代与子代相似的现象，而变异是指亲代与子代之间或者同一亲代产生的不同子代之间存在的某种差异。遗传和变异是生命活动的基本属性之一。遗传与变异既对立又统一，变异是绝对的，遗传是相对的。没有变异，生物界就失去了进化的素材；而没有遗传，变异也无从积累和提升。对菌种选育而言，没有变异就没有选择（选育）的素材；没有遗传，选育得到的优良性状就不能进行培育。

微生物发酵生产水平的高低和产品质量的好坏是由所用菌种的遗传型和环境条件共同决定的。菌种的遗传型是内因，是决定微生物发酵生产水平高低和产品质量好坏的根本，可通过菌种选育来提高。环境条件包括培养基、培养条件及发酵装备，是外因，对微生物发酵生产水平和产品质量起着重要的作用，外因可以通过内因起作用，通过优化环境条件可以提高发酵的产量和质量。因此，工业微生物育种在发酵工业中占有重要的地位，它决定了发酵生产水平与产品质量，决定了发酵产品是否具有工业化生产价值以及发酵过程的成败。

工业微生物遗传育种技术主要有以下几种。

(1) 自然选育 自然选育是不经人工处理而利用微生物的自发突变进行的纯种分离方

法，又称单菌落分离。自然选育是一种简单易行的育种方法，通过自然选育可以达到纯化菌种、防止菌种退化、稳定生产、提高产量的目的。迄今为止，自然选育仍是工业微生物育种的重要手段之一，尤其在企业中广泛应用此法来稳定和提高菌种的生产能力。自然选育的局限性是自发突变频率低，难以提高菌种的生产水平。

(2) 诱变育种 诱变育种是以人工诱发基因突变为基础的育种技术。诱变育种过去是工业微生物育种的主要方法，至今仍然是行之有效的重要方法。大多数发酵产品的生产菌种都是用此法选育得到的，如青霉素通过诱变育种生产水平达到了 50g/L，比原始菌株提高了 4000 倍以上。

(3) 杂交育种 杂交育种是以基因重组为基础的育种技术。杂交育种可以把不同菌株的优良性状集中于重组体中，还能克服长期使用诱变剂后造成的生长周期延长，孢子减少，代谢缓慢等缺陷，另外，杂交育种还是增加新产品的手段之一。

(4) 推理育种 推理育种是根据微生物代谢产物的生物合成途径和代谢调节机制，通过人工诱发突变的技术筛选获得改变微生物正常代谢途径的突变株，从而人为地使目标代谢产物选择性地大量合成和积累的育种技术。从严格意义上来说，推理育种属于诱变育种的范畴。推理育种的特点是破坏了微生物正常代谢调节机制的天然屏障。与传统的诱变育种相比，它具有定向性、工作量适中、效率高等优点。推理育种的兴起标志着诱变育种已发展到理性阶段。

(5) 代谢工程育种 代谢工程是指利用基因重组技术对细胞代谢网络进行功利性修饰。要完成这一过程首先要对细胞的分解代谢和合成代谢中的多步级联反应进行合理设计，然后利用 DNA 重组技术强化和（或）灭活控制代谢途径的相关基因。代谢工程是一种定向的育种方法，它需要透彻理解细胞的代谢途径、编码生物合成酶的基因以及基因表达调控等基本问题。

(6) 基因组重排育种 基因组重排育种是 2002 年新报道的对微生物整个基因组进行重排的育种方法。基因组重排技术采用的具体方法是循环原生质体融合。循环原生质体融合产生同源重组的几率要比常规原生质体融合高得多，能产生各种各样的突变组合，从而达到快速进化微生物表型的目的。基因组重排技术的另一个优点是无需了解微生物的代谢途径、编码生物合成酶的基因以及基因表达调控等。

从工业微生物遗传育种的发展史可以看出，诱变育种是工业微生物育种的最主要和最基础的手段，但它是盲目的，工作量大、效率低。推理育种的兴起标志着诱变育种发展到理性阶段，导致了氨基酸、核苷酸、抗生素等微生物代谢产物的高产菌株大批地投入生产。代谢工程育种是工业微生物育种的比较先进的方法，是真正的定向育种。代谢工程在微生物代谢产物的菌种选育中已取得了很大的进展，并在初级代谢产物的生产中已经得到了广泛应用，但在次级代谢产物的生产中成功应用的实例还不多。这主要是由于目前对次级代谢产物的生物合成途径及编码生物合成酶的基因缺乏深入理解。基因组重排育种是 21 世纪新发展的育种技术，是一种行之有效的分子育种技术，它普遍适用于各种微生物代谢产物产生菌的遗传改造。

1.5 工业微生物遗传育种学的学习方法

工业微生物遗传育种学的理论基础是微生物遗传学和生物化学。因此，要学好工业微生物