

紫外线诱变原生质体选育苏氨酸高产菌株

常尊学 马 莉 石松华* 耿 杰**

(沈阳药学院微生物教研室, 沈阳)

王 玉 林

(中国医科大学制药厂, 沈阳)

摘要 以黄色短杆菌 T6-13 的苏氨酸产生菌 GSR8-25 为出发菌株, 利用溶菌酶制备其原生质体后进行紫外线 (UV) 诱变处理, 从再生株中筛选出苏氨酸高产菌株。经多次连续诱变处理得到一苏氨酸高产菌株 25-20, 在含 10% 葡萄糖的培养基中摇瓶发酵 60 小时可积累苏氨酸 19.5mg/ml。分离纯化后得菌株 25-202, 其苏氨酸产量可达 21.5mg/ml, 比出发菌株提高 43.3%。

关键词 黄色短杆菌; 原生质体; 苏氨酸

L-苏氨酸是人体必需的 8 种氨基酸之一, 广泛应用于医药, 食品和饲料工业。目前国内苏氨酸的来源主要靠进口, 因此开发利用苏氨酸具有十分重要的意义。自 1953 年 Weibull^[1]首次用溶菌酶处理巨大芽孢杆菌得到原生质体以来, 原生质体技术已有了很大发展。70 年代以来, 原生质体技术已成为工业微生物菌种选育的一种重要手段, 并取得了很大成效。利用原生质体融合进行苏氨酸产生菌选育的研究国外已有报道^[2]。本研究把原生质体技术与常规诱变育种方法相结合, 选育出高产苏氨酸菌株 25-202, 其苏氨酸产量在同样发酵条件下从 15 mg/ml 提高到 21.5mg/ml, 提高率达 43.3%。从而证明, 采用紫外线处理原生质体的选育技术是获得高产苏氨酸产生菌的一个有效途径。对黄色短杆菌 T6-13 的原生质体制备、再生

以及对其原生质体的直接诱变处理的研究, 尚未见报道。

材 料 和 方 法

(一) 菌株与试剂

1. 苏氨酸产生菌 GSR8-25: 由黄色短杆菌 T6-13 (*Brevibacterium flavum* T6-13) 经 NTG 和 UV 诱变处理选育的苏氨酸产生菌。

2. 菌株 F11: 从北京棒杆菌 (*Corynebacterium pekinense*) AS1.299 选育的苏氨酸缺陷型, 用于苏氨酸生物测定。

3. 试剂: 常用分析纯或化学纯试剂。

(二) 培养基

1. 完全培养基 (CM)^[3]。

* 本校 52 期专题学生; ** 本校 53 期专题学生。

2. 基本培养基 (MM)^[7]。

3. 发酵培养基 (FM)^[7]。

4. 再生培养基 (DM): 在 100ml CM 中补加: 蔗糖 15.74g, MgCl₂ 0.4g, 硫酸素 0.02mg, PVP 1.5g, 腺素 5mg, 丝氨酸 0.01g, pH7.2, 0.7kg/cm² 灭菌 30 分钟。

5. 高渗稀释液 (DF): 蔗糖 85.6g, MgCl₂ 2.03g 丁二酸钠 67.5g, EDTA 0.292g, K₂HPO₄ 4.56g, KH₂PO₄ 15.0g, 加蒸馏水至 1000ml, pH7.0, 0.7kg/cm² 灭菌 20 分钟。

(三) 生长曲线绘制

将待测菌株斜面 32℃ 18 小时活化一次, 取两环活化的斜面培养物接种于装有 100ml 肉汤 (CM) 的 250ml 三角瓶中, 32℃ 摇床培养 18 小时, 再按 2% 接种量转接到装有 30ml 肉汤 (CM) 的 250ml 三角瓶中, 计 24 瓶。32℃ 振荡培养, 每隔 1 小时取样测定其 OD 值 ($\lambda = 620\text{nm}$), 以 OD 对培养时间作图。

(四) 原生质体的紫外线诱变处理与再生培养

将原生质体液 0.5 ml 用高渗液 (DF) 稀释到 10⁻⁵, UV 处理 1—4 分钟, 涂双层再生平板, 培养 3 天, 从再生平板上挑取再生株。

原生质体制备, 制备率与再生率计算, 参见文献[8]。

(五) 苏氨酸高产菌株筛选

按文献[7]进行摇瓶发酵, 并测定其苏氨酸产量, 筛选高产菌株。

结果与讨论

(一) 出发菌株 GSR8-25 生理和遗传特性鉴定

从图 1 可见, 菌株 GSR8-25 从第 3 小时进入对数生长期, 第 11 小时进入稳定期。对数生长中期确定在第 7 小时。把冰箱保存 1 年之久的菌株 GSR8-25 分别进行 AHV、AEC、利福平抗性以及缺陷型鉴定, 结果表明此菌株抗性没有改变, 且仍为蛋氨酸缺陷型, 说明该菌株遗传特性稳定。

(二) 菌株 GSR8-25 原生质体制备与再

生条件

1. 菌株 GSR8-25 对甘氨酸和青霉素的敏感性: 青霉素和甘氨酸可干扰细菌细胞壁的合成, 有利于制备原生质体, 但浓度过高可抑制菌株的生长。因此, 首先考查不同浓度的青霉素和甘氨酸对出发菌株生长的影响。从图 2 和图 3 可以看出, 对数生长时期的细菌对甘氨酸和

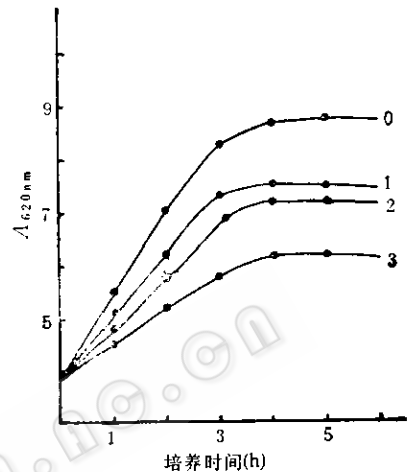


图 1 加入甘氨酸后对菌体生长的影响

0. 对照; 1. Gly 1mg/ml;
2. Gly 2mg/ml; 3. Gly 3mg/ml

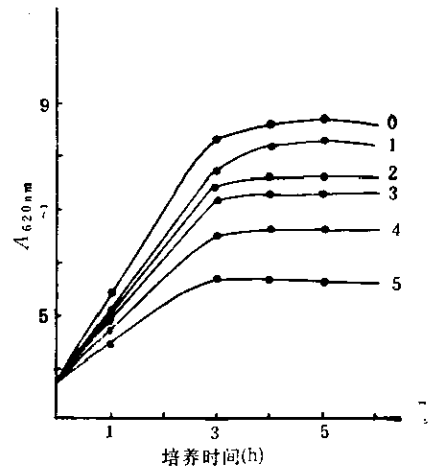


图 2 加入青霉素后对菌体生长的影响

0. 对照; 1. 0.2u/ml;
2. 0.4u/ml; 3. 0.8u/ml;
4. 1.2u/ml; 5. 1.6u/ml

青霉素比较敏感, 随其浓度的提高, 菌株的生长受抑制越来越明显, 因此可以确定甘氨酸和青霉素抑菌作用的亚适量浓度范围分别为 1—3

表 1 甘氨酸和青霉素预处理对菌株 GSR8-25 原生质体制备的影响

青霉素 u/ml	预处理时间(hr)			1.5			2.5			3.5		
	Gly (mg/ml)											
	原生质体形成率 (%)			0	1	5	0	1	5	0	1	5
0					9	15		12	21		16.5	22
0.2				33	34.5		39	43		46.5	49	
0.8				67.5	75		73.5	88.5		75	93	
1.2				79.5	87		87	94.5		86	97	

mg/ml 和 0.2—0.8 u/ml, 作用时间少于 3.5 小时。在此条件下甘氨酸和青霉素对菌体胞壁合成起一定作用, 又不明显影响菌体的正常生长。

2. 甘氨酸和青霉素预处理对原生质体制备的影响: 从表 1 可以看出, 单纯的甘氨酸预处理对原生质体的制备没有明显的影响, 而青霉素的预处理明显地提高了原生质体的制备率, 且与青霉素浓度相关。如在青霉素的基础上再加 1mg/ml 的甘氨酸更有助于原生质体的形成。

在青霉素 1.2u/ml、甘氨酸 1mg/ml 预处理 2.5 小时, 采用 5mg/ml 的溶菌酶制备原生质体, 原生质体的制备率可达 99.5%。

3. 缓冲液和菌浓对原生质体制备的影响: 采用 3 种不同的缓冲液^[4,5,6] 制备原生质体, 发现以 DF 高渗稀释液作为制备原生质体的缓冲液最佳, 制备率可达 96%。其他条件为: 甘氨酸和青霉素预处理浓度为 1mg/ml 和 0.8u/ml, 预处理 3 小时, 溶菌酶 5mg/ml, 酶解 13 小时。

实验结果还表明, 菌浓度也影响到原生质体的制备, 以 OD = 1.5(λ = 620nm) 的菌液最有利于原生质体的制备。

4. 再生培养基的确定: 把原生质体液分别涂于 3 种再生培养基^[2,5,6], 培养 3 天, 并分别计算再生菌落数平均值, 结果表明, 以 DM 作为再生培养基原生质体的再生率最高(表 2)。

5. 综合考查原生质体制备条件对再生率的

表 2 培养基对原生质体再生的影响

再生培养基	No. 1	No. 2	No. 3
再生菌落数	103	44	13

No. 1: 培养基 DM^[4]; No. 2: 培养基^[5]; No. 3: 培养基^[5]

影响: 由表 3、4 可见原生质体的再生受青霉素和溶菌酶影响较大, 随着两者浓度的提高和作用时间的延长制备率也提高, 但再生率却相应下降。为兼顾制备率和再生率而确定菌株 GSR 8-25 的原生质体制备条件为: 青霉素浓度

表 3 因素水平表

F	S					
	1	2	3	4	5	6
A	0.6	0.8	1.0	0.6	0.8	1.0
B	2.5	3.5	1.5	2.5	3.5	1.5
C	6	4	5	6	4	5
D	9	13	17	9	13	17

A: 青霉素浓度 (u/ml), B: 青霉素预处理时间 (h), C: 溶菌酶作用浓度 (mg/ml), D: 溶菌酶作用时间 (h)。

表 4 试验方案表[选用 U, 表变为 U₀(6')]

E	F	S				制备率 (%)	再生率 (%)
		A	B	C	D		
1	1	2	3	6		97.0	29.5
2	2	4	6	5		94.7	57.3
3	3	6	2	4		83.9	49.5
4	4	1	5	3		91.4	45.0
5	5	3	1	2		98.3	40.2
6	6	5	4	1		99.0	21.6

0.8u/ml, 甘氨酸 1mg/ml, 预处理 2.5 小时, 溶菌酶浓度为 5mg/ml, 酶解 13 小时, 此时原生质体制备率为 94.7%, 再生率为 57.3%。鉴于试验结果明显, 未经回归分析。

(三) 紫外线诱变处理

1. 紫外线处理原生质体: 随机筛选经 UV 处理的原生质体再生菌落 100 株, 正变株为 35%, 其中菌株 PV54-8 和 PV54-30 的苏氨酸产量比出发菌株提高 20%, 达到 17~18mg/ml, 且产酸稳定, 冰箱保存一年产量无明显下降。

表 5 UV 对原生质体的处理结果

处理时间 (s)	30	60	120	180	240
致死率(%)	19.0	52.1	78.5	92.0	99.5
正变率(%)	27.5	68.0	52.5	34.7	36.0
负变率(%)	20.0	23.5	31.6	47.0	38.7

2. 高产菌株 25-202 的获得: 以 PV54-8 为出发株, 利用不同剂量的 UV 处理原生质体, 结果表明 UV 照射 2 分钟以上诱变效果好, 高产菌株获得的机率大。继续用 UV 诱变原生质体 3 次, 共挑取再生株 247 株进行苏氨酸发酵, 其中菌株 25-20 的苏氨酸产量较高, 为 19.5 mg/ml。通过单菌落分离纯化得菌株 25-202 (图 3), 发酵 60 小时苏氨酸产量达到 21.5mg/ml, 比原始出发菌株 GSR8-25 提高了 43.3%。

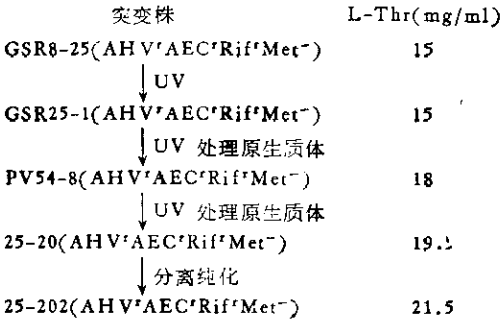


图 3 苏氨酸产生菌 25-202 的选育谱系

以摇瓶考查菌株 25-20 的发酵过程, 结果如图 4。从图中可见菌体从第 12 小时开始进入快速生长期, 而大量合成苏氨酸从第 18 小时开始。到第 48 小时菌体生长和苏氨酸合成已趋停止。

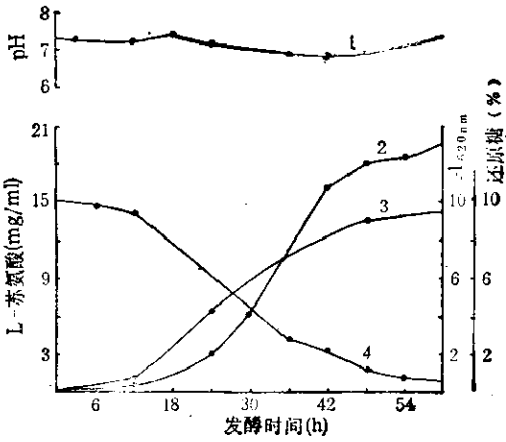


图 4 菌株 25-20 的苏氨酸发酵过程

1. pH; 2. L-苏氨酸; 3. A 值; 4. 还原糖

(四) 讨论

1. 本实验除利用 UV 处理原生质体外, 还进行了菌株 GSR8-25 与赖氨酸产生菌 102-100^[3] 间的原生质体融合的研究, 以利用菌株 102-100 中高活性的天冬氨酸激酶来提高苏氨酸的产量。经长时期研究, 筛选出不少融合子, 但没有取得满意的结果。这可能由于在菌株 GSR8-25 中控制苏氨酸产量的两个关键酶天门冬氨酸激酶 (AK) 和高丝氨酸脱氢酶 HD 中, AK 已不再是决定苏氨酸产量的限制酶。因此进一步提高 HD 活力可进一步提高苏氨酸产量。

2. 从表 5 中可以看出, 不具细胞壁的原生质体对 UV 的抵抗力比具有细胞壁的菌体还要强, 这是没有预想到的。

3. 从图 4 中可以看出菌体的生长和苏氨酸的积累是平行的, 发酵到 48 小时由于营养物质的消耗, 生长和苏氨酸的积累已趋停止, 如果采取某些措施如补充营养物质等, 苏氨酸的产量可望进一步提高。

参 考 文 献

1. Weibull C: *Bacterial*, 66: 688—695, 1953.
2. Harumi Kaneko et al.: *Agr. Biol. Chem.*, 43(5): 1007—1013, 1979.
3. Masahiko Karasawa: *Agr. Biol. Chem.*, 50(2): 339—346, 1986.
4. Landman O E and Hall S: *J. Mol. Biol.*, 7: 721, 1963

5. 唐孝宣等: 工业微生物, 17(3): 31—35, 1987。
6. 檀耀辉、杨虹: 工业微生物, 4: 7—15, 1986。
7. 常尊学、李福德: 沈阳药学院学报, 7(3): 185—188, 1990。
8. 王弘等: 生物工程学报, 6(1): 32—38, 1990。
9. Landman O E and S Hall: *J. Mol. Biol.*, 7: 721, 1963.