

荧光假单胞菌抗噬菌体菌株的选育

沈淑瑜 王怡平 乔昌济 金 晶

(安徽大学生物系, 合肥 230039)

许鸿发

(安徽生物研究所, 合肥 230031)

摘要 本实验从荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*) AS-3 菌株的不正常发酵液中分离到一种噬菌体, 将其命名为 PFAS。AS-3 菌株能利用葡萄糖发酵产生 D-异维生素 C 的前体物质 2-酮基-D-葡萄糖酸。电镜观察表明 PFAS 噬菌体呈蝌蚪形, 具有直径为 66nm 的六角形头部及长 117nm 的尾部。通过紫外线诱变及自然选育两种途径, 配合简便有效的初筛方法, 经多次分离、纯化、复筛最终在摇瓶发酵试验中获得 6 株产量稳定地高于对照敏感菌的抗噬菌体菌株, 可望用于生产。

关键词 荧光假单胞菌, 噬菌体, 2-酮基-D-葡萄糖酸, D-异抗坏血酸 C

早在 1940 年 Stubbs 等^[1]首先从假单胞菌属(*Pseudomonas*) 中分离到 2-酮基-D-葡萄糖酸的产生菌。在我国, 1993 年由许鸿发等人报道利用荧光假单胞菌(*P. fluorescens*) AS-3 菌株发酵生产该产物。2-酮基-D-葡萄糖酸是 D-异维生素 C(D-异抗坏血酸 C, 简称异-Vc)的前体物质, 而异-Vc 作为抗氧化剂已广泛地应用于食品工业中。

1993 年春季, 国内某工厂在利用 AS-3 菌株发酵生产过程中, 出现种子罐早期溶菌, pH 异常变化, 镜检时发现异常细胞以及发酵液伴随杂菌污染等不正常现象。以 Adams 双层琼脂法^[3]我们从该厂不正常发酵液及污水污泥中分离到形态单一的针眼状噬菌斑。电镜观察表明该噬菌体呈蝌蚪形, 将其命名为 PFAS 噬菌体。

通过自然选育及紫外线诱变等手段, 采用一种简便有效的初筛方法, 经反复分离、纯化、初筛、复筛等过程, 最终在摇瓶发酵试验中获得六株 2-酮基-D-葡萄糖酸产量明显高于敏感菌株的抗噬菌体菌株。

1 材料与方法

1.1 菌株和噬菌体

1.1.1 出发菌株(对噬菌体 PFAS 敏感的生产

菌株): 荧光假单胞菌(*P. fluorescens*) AS-3 菌株(由安徽生物研究所提供)。

1.1.2 噬菌体 PFAS: 从某工厂异常发酵液中分离得到。

1.2 培养基及培养条件

1.2.1 斜面培养基(%): 牛肉膏 0.3, 蛋白胨 1, 酵母膏 0.3, NaCl 0.5, 琼脂 2~2.5, pH7.0~7.5。供保藏菌种, 分离纯化及浓缩噬菌体时制备双层培养基(上层琼脂 1%, 下层琼脂 2~2.5%)时用。

1.2.2 种子培养基(%): 蛋白胨 1, 酵母膏 0.3, 葡萄糖 1, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3, pH7.0~7.5。供发酵摇瓶培养用, 装量为 50ml/500ml 三角瓶。

1.2.3 指示培养基(%): 葡萄糖 5, CaCO_3 1, 其余成分同发酵培养基。供产量初筛时用。

1.2.4 蛋白胨液(%): 蛋白胨 1, pH7.0~7.5。供稀释噬菌体或敏感菌液时用。

以上培养基均需经 $1 \times 10^5 \text{Pa}$ 湿热灭菌 25min 后使用。细菌培养温度为 $35 \pm 1^\circ\text{C}$, 旋转式摇床转速为 200r/min, 振幅 5cm。

1.3 化学试剂

用于 2-酮基-D-葡萄糖产量测定的药品及试剂: ①4N H_2SO_4 , ②0.05N 碘液^[4], ③淀粉指示剂: 称取 1g 可溶性淀粉, 加 5ml 水搅匀, 缓缓倾入 100ml 沸水中, 边加热边搅拌, 煮沸 2min 后冷却即可使用。

1.4 噬菌体的分离、纯化和原液制备

取异常发酵液经离心 (3000r/min, 20min), 上清液经细菌滤器除菌, 按 Adams 双层琼脂法进行噬菌体分离。以单斑穿刺纯化法连续重复 3~5 次, 并采用固体双层平板法增殖浓缩噬菌体, 制备噬菌体原液。

1.5 噬菌体的电镜观察

取效价为 10^{10} pfu/ml 的噬菌体原液, 用 pH7.0 的 2% 磷钨酸 (PTA) 负染 5~10min, 悬滴于附有火棉胶薄膜的铜网上, 经 JEM-1005X 型电镜 (日本电子 JEOL 公司产) 观察并摄影 (由安徽大学现代试验技术中心电镜室拍摄)。

1.6 抗噬菌体菌株的选育

1.6.1 自然选育: 取振荡培养 8h 达对数生长期的敏感菌种子液 5ml, 按感染系数 (M. O. I) 为 0.01 吸取噬菌体原液, 一并加入种子培养基中, 振荡培养 18~24h 后经适当稀释涂布于斜面培养基上, 培养 24h, 从中挑取形态与出发菌株相似的单菌落, 移接到平皿或斜面上。

1.6.2 紫外线诱变: 取对数生长期的敏感菌种子悬液 5ml, 离心 (3000r/min, 20min), 洗涤两次, 以生理盐水定容至 5ml, 吸取 3ml 此菌悬液 (10^8 细胞/ml) 在紫外灯 (功率 30W, 间距 45cm, 波长 253.7nm) 下搅拌照射 15s。取 1ml 经照射的悬液于新鲜种子培养基中, 按 M. O. I 为 0.01 加入噬菌体。振荡培养 48h, 同上法挑取单菌落。

1.7 抗株生产力测定及抗性确证

1.7.1 初测—固体溶钙圈法: 将以上筛得的抗性菌落, 用拉直的接种针分别点种在含指示培养基的平皿上, 每皿约点种 6~8 个单菌, 同时设敏感菌为对照。于 $35 \pm 1^\circ C$ 恒温培养 3d, 该菌产物——2-酮基-D-葡萄糖酸与培养基中的 $CaCO_3$ 作用, 产生肉眼清晰可见的溶钙圈, 此

圈的大小直接指示该菌落产酸量的高低。挑取溶钙圈大小与敏感菌相当或略大的抗性菌落, 再经分离、纯化后测定溶钙圈, 如此重复 3~5 次。

1.7.2 复测—摇瓶发酵及碘液滴定法: 摇瓶发酵试验。将初筛所获溶钙圈较大的抗株进行含有噬菌体的摇瓶发酵试验, 按 M. O. I 为 0.1~0.01 接种细菌和噬菌体于种子培养基中, 同时设不加噬菌体的敏感菌作为对照组, 培养过夜。再按 8% 的接种量接入发酵培养基中, $35 \pm 1^\circ C$ 振荡培养 72h, 测定 2-酮基-D-葡萄糖酸含量。

复测试验最初每个抗株接种一瓶, 从中选出产量较高的菌株再按每株重复三瓶进行复测, 连续 3~5 次, 最终选出产量高的菌株保留。

1.7.3 2-酮基-D-葡萄糖酸含量测定^[1]。

1.7.4 抗性确证: 采用划线点滴法^[5]。

2 结果

2.1 噬菌体的分离、纯化及浓缩

用双层琼脂及单斑穿刺法, 从异常发酵液中连续 3~5 次分离纯化后, 获形态大小一致的针眼状噬菌斑, 将其命名为 PFAS 噬菌体 (图 1)。

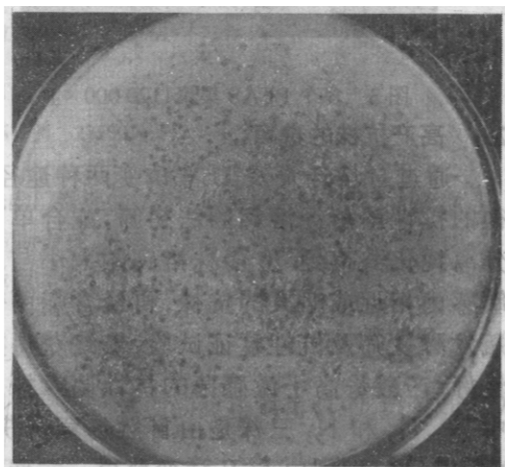


图 1 PFAS 噬菌斑形态

用固体浓缩法获得效价为 10^{10} pfu/ml 的

噬菌体原液。

2.2 电镜观察

电镜观察 PFAS 噬菌体呈蝌蚪形,其六角形头部直径为 66nm,尾部长为 117nm(图2,图3)。

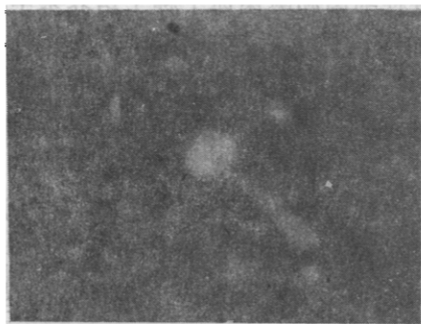


图2 PFAS 噬菌体形态(120 000×)



图3 多个 PFAS 集聚(120 000×)

2.3 高产抗株的选育

通过自然选育及 U.V 诱变两种途径,获得的抗性菌落经溶钙圈法初筛,配合单菌落分离纯化共得到 70 多株溶钙圈大小与对照敏感菌相近或略大的抗株,再经含噬菌体摇瓶发酵复筛及抗性复证试验,最终获得重复性好,产酸量高于敏感菌的抗性菌六株。其中 N_1 , N_2 和 N_3 三株是由自然选育所获,而 U_1 , U_2 及 U_3 则由 U.V 诱变获得。六株抗噬菌体菌株的最终复筛平均产酸水平(用耗碘量表示)见表 1。

表1 抗株及敏感株的摇瓶复筛产酸水平的比较

方 法	菌 株	发酵 pH(72h)	平均产酸水平**
对 照	AS-3	4.6	7.09
自然选育	N_1	4.6	7.16
	N_2	4.4	7.39
	N_3	4.6	7.14
U.V 诱变	U_1	4.6	7.27
	U_2	4.5	7.65
	U_3	4.4	7.77

*: 除对照外,其余各抗株的发酵摇瓶内均加噬菌体 (M.O.I=0.1)

** : 以耗碘毫升数表示

3 讨论

本文作者从荧光假单胞菌中分离到噬菌体,在国内尚属首次报道。该噬菌体与 1971 年 Kelln 等报道的荧光假单胞菌噬菌体 ϕ -S₁ 在形态上有明显的差异^[6]。

在育种工作中,为了筛选高产菌株,除了采用接近大罐生产的摇瓶发酵方法外,选择一种简易有效的初筛方法极其重要。本实验采用的固体溶钙圈法不仅操作简便,而且效果明显,实验证明此初筛方法与复筛摇瓶发酵结果有明显的相关性,由于这一方法的应用,使得筛选工作效率大大提高。

经 U.V 诱变的 U_2 和 U_3 抗株,在摇瓶发酵试验中除了产量明显高于对照敏感株外,发酵周期也大大地缩短。原敏感菌株需振荡培养 72h 才能达到最高产酸水平,而 U_2 和 U_3 抗株仅需 48h 即可达最高产酸水平,这一优良的生产性能将会大大降低成本。因此 U_2 和 U_3 抗株经发酵条件摸索后,可望成为工业生产中的替换菌株。

参 考 文 献

- [1] Stubbs J J. Ind Eng Chem, 1940, 32: 1626.
- [2] 许鸿发,胥世荣,张来祥,等.专利公报第9卷第21号上册(总第 376 号),p.52,中华人民共和国专利局.1993 年 5 月 26 日.
- [3] Adams M H. Bacteriophages. Interscience publishers.

Inc, New York. 1959, 29.

232~237.

[4] 王祖农, 魏凤鸣, 谢其明, 等. 微生物学词典, 北京: 科学出版社, 1990, 189.

[6] Kelln R A, Warren R A J. Can J Microbiol, 1970, 17: 677~682.

[5] 余茂劲, 那淑敏, 董扣洪, 等. 微生物学报, 1986, 26(3):

SCREENING OF PHAGE-RESISTANT STRAINS IN *PSEUDOMONAS FLUORESCENS*

Shen Shuyu Wang Yiping Qiao Changji Jin Jing

(Department of Biology, Anhui University, Hefei 230039)

Xu Hongfa

(Anhui Institute of Biology, Hefei 230031)

Abstract A phage, named PFAS, was separated from the abnormal fermentation broth of *P. fluorescens* AS-3 strain which produced 2-keto-D-gluconic acid i. e. the precursor of D-isovitamin C. The PFAS phage was tadpole-like with a hexagonal head of 66nm in diameter and a tail of 117nm long observed by electromicroscope. Four thousand resistant colonies against PFAS were obtained by using U. V. light as a mutagen and through nature selection. Their resistance was confirmed.

After repeated separation, purification and selection, six resistant strains against the PFAS were finally obtained based on shaking flask fermentation result. They gave a higher yield in 2-keto-D-gluconic acid than the original sensitive strain and could be used in industrial fermentation process.

Key words *Pseudomonas fluorescens*, phage, 2-keto-D-gluconic acid, D-isovitamin C