

一种多聚羟基烷酸产生菌的诱变育种

赵良启 张丽珍 张建国 李季伦*

(山西大学生命科学系 太原 030006)

摘要 以野生型自养黄杆菌为出发菌株,经亚硝酸、紫外线、 ^{60}Co γ 射线诱变处理选得三株性状优良的突变株(U γ -1、U γ -17、U γ -20)。U γ -1突变株的菌落形态为菊花形,白色。U γ -17和U γ -20突变株的菌落形态均为圆凸光滑型,微黄色。40h的摇瓶发酵结果表明,U γ -1、U γ -17、U γ -20突变株的干细胞产量分别为8.1g/l、11.2g/l、10.5g/l,其产物对干细胞的得率系数($y_{p/x}$)分别为0.74、0.75、0.79。与野生型菌株相比,这些突变株的干细胞产量和 $y_{p/x}$ 分别增加了20%和7.2%以上。

关键词 自养黄杆菌,诱变育种,P(HB-co-HV)

分类号 Q93-3

经济发展与环境保护已成为国际社会的热点论题。以石油为原料的化工合成塑料尽管推动了社会经济的发展,然而日益严重的“白色污染”已经成为一种公害,反过来影响人们的生产和生活。在寻找塑料替代物的研究中发现了由细菌合成的多聚羟基烷酸(PHA)是一类具有生物可降解性、生物相容性、光学活性和压电性的无毒、无污染、多用途的理想新型热塑材料^[1,2]。

我们采用自养黄杆菌进行此类材料的发酵研究,发现所用菌株可以葡萄糖等碳水化合物作碳源合成一种性能优良的PHA,即羟基丁酸和羟基戊酸共聚体[P(HB-co-HV)]。然而这个菌株的一些特性,如产生黄色素,影响下游加工过程,故我们以亚硝酸、 ^{60}Co γ 射线、紫外线等诱变剂对其进行了诱变育种,并取得了一定程度的进展。

1 材料与方 法

1.1 细菌菌株

自养黄杆菌 PHA-01 (*Xanthobacter autotrophicus* PHA-01)

1.2 培养基

1.2.1 斜面种子培养基(g/l): 葡萄糖 1.0, 蛋白胨 5, 牛肉膏 3, 酵母膏 1, NaCl 5, 琼脂 20, 蒸

馏水定容, pH7.0。

1.2.2 摇瓶种子培养基(g/l): 斜面种子培养基配方不加琼脂即可。

1.2.3 摇瓶发酵培养基(g/l): 葡萄糖 40, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 7, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 9, KH_2PO_4 1.5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.02, 柠檬酸铁铵 0.06, 酵母水解粉 1, 微量元素^[3] 1ml, 蒸馏水定容, pH7.0。

1.3 诱变处理

用斜面培养基将出发菌株活化,以无菌水制成所需细胞浓度的菌悬液后,进行亚硝酸(NSA)、紫外线(UV)、 ^{60}Co γ 射线及复因子处理^[4,5]。

1.4 初筛

将诱变处理后的平皿置于30℃下培养7d。挑选不产色素或菌落形态有别于出发菌株菊花型的菌落于斜面培养基上。然后再将斜面菌种接入摇瓶发酵培养基;于X γ -x3摇床(偏心距4cm)30℃、180r/min条件下培养36h,用苏丹黑染色法制片,在显微镜下直接观察菌体形态和PHA形成情况。选出菌落形态发生变异,细胞内含PHA颗粒多的菌株,留菌种保藏。

* 李季伦教授在中国农业大学生物学院工作

1997-11-10收稿

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

1.5 复筛

将初筛菌种接入摇瓶种子培养基,在上述摇床条件下培养12h至对数期,镜检测定种子液的OD₆₀₀值,以等生物量的接种量接入摇瓶发酵培养基中,按照上述培养条件培养40h。在培养过程中测定OD₆₀₀值、耗糖率、耗氮率、细胞生长速率、PHA合成速率。根据这些指标选出优良菌株。

1.6 检测方法

1.6.1 细胞形态及PHA颗粒观察:苏丹黑染色法^[6]。

1.6.2 生物量的测定:干重法及比浊法^[7,8]。

1.6.3 葡萄糖浓度测定:3,5-二硝基水杨酸法^[9]。

1.6.4 氨离子浓度测定:靛酚蓝比色法^[10]。

1.6.5 P(HB-co-HV)含量测定:硫酸降解法及¹H-NMR法^[11~14]。

2 结果与讨论

2.1 诱变剂量

在大量的诱变育种工作开始之前,我们先进行了诱变剂量的选择试验。结果表明,以0.5M的亚硝酸作诱变剂,依次处理3、6、9、12min,其杀菌率分别为82.5%、91.3%、98.2%、99.8%,而菌落突变率分别为 3×10^{-5} 、 1.8×10^{-5} 、 4.5×10^{-4} 、 6×10^{-3} 。以紫外灯(30W,灯距45cm)处理0.5、0.75、1.0、1.5、2.0、2.5min,其杀菌率依次为85.6%、90%、95.2%、99.85%、99.98%、100%,而菌落突变率只计算了前三个处理样,依次为 6.7×10^{-4} 、 1.4×10^{-3} 、 2.1×10^{-3} ,后三个处理样因菌落数较少,未做突变率计算。

根据实验结果和有关资料介绍^[4],为了提高诱变处理的突变率,我们在使用亚硝酸诱变时,采用98%的杀菌率,处理时间9min;用紫外线诱变时,采用95%的杀菌率,处理时间1min。两者均采用高剂量诱变,而用⁶⁰Co γ射线诱变时,采用较为适中的诱变剂量,杀菌率75%,550Gy。进行NSA与UV、UV与γ射线复因子处理时,采用上述相应剂量的组合。

2.2 诱变选育

2.2.1 亚硝酸-紫外线诱变:出发菌株经亚硝

酸、紫外线单因子处理后,经两者的复因子处理选得NU5-1、NU6-3、NU7-1三个菌株。将这三个菌株与出发菌株同时进行摇瓶发酵40h,测得生物量依次为8.9、8.5、7.2、6.3(干细胞g/l),细胞得率系数(Y_x/s)分别为0.79、0.62、0.73、0.65。除突变株NU6-3的 Y_x/s 稍低于出发菌株外,突变株的其它测试参数均高于出发菌株。虽然突变株的菌落形态未发生变化,仍为菊花型,但其分泌的色素少得多,为浅黄色。由实验结果可以看出NU5-1的性状较为优良,因此将其作为进一步诱变处理的出发菌株。

2.2.2 紫外线-⁶⁰Co γ射线诱变:对NU5-1菌株进行了⁶⁰Co γ射线单因子和⁶⁰Co γ射线-UV复因子处理,再次选得Uγ-1、Uγ-17和Uγ-20三株突变型。它们的菌落特征都不同程度地发生变异,虽然突变株Uγ-1的菌落形态仍为菊花型,但不再分泌色素,菌落呈白色,而突变株Uγ-17和Uγ-20的菌落为浅黄,圆滑型,均有别于出发菌株。经40h的摇瓶培养,Uγ-1、Uγ-17、Uγ-20、出发菌株的生物量依次为8.1、11.2、10.5、6.7(g/l),生长速率为0.20、0.28、0.26、0.17(g/l/h),耗糖量为28.5、35、37.4、25.1(g/l), Y_x/s 为0.284、0.32、0.281、0.265, Y_p/x 为0.74、0.75、0.79、0.69,经计算这三个突变菌株的生物量与产物对干细胞的得率系数(Y_p/x)分别增加了20%和7.2%以上,干细胞对基质的产物得率系数(Y_x/s)也都有了不同

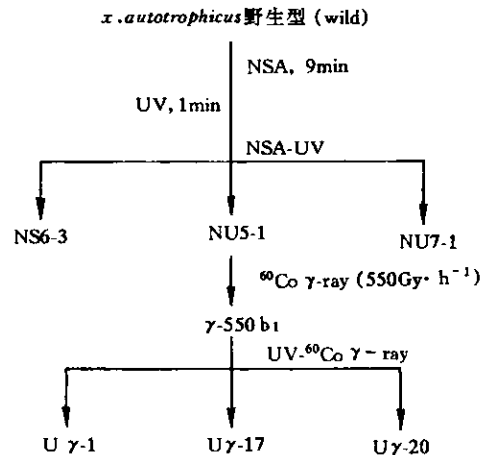


图1 X. autotrophicus 诱变育种系谱图

程度的提高。

2.2.3 选育系谱: 汇总整个诱变过程绘出育种系谱如图1。

总结整个自养黄杆菌诱变育种工作,可以得到如下启迪:(1)使用紫外线、亚硝酸、 ^{60}Co γ 射线单因子的效果远不如这些因子复合处理的效果好。(2)诱变剂的剂量在高杀菌率时,负变率高,采用亚致死量会提高正变率。(3)由 $U_{\gamma-1}$ 突变株的性状可推测出自养黄杆菌产生色素的基因与 PHA 的合成基因不存在连锁关系。至于突变株细胞结构的变化将另行研究。

参 考 文 献

- [1] Anderson A J, Dawes E A. *Microbiol Rev*, 1990, 54: 450~472.
 [2] Zhong H, Obias V, Gonyer K *et al.* *Appl Environ Microbiol*, 1994, 60:1198~1205.
 [3] 赵良启,田杰士,李季伦等. *微生物学报*, 1996, 36(5): 352~359.
 [4] 章名春. *工业微生物诱变育种*, 北京: 科学出版社,

- 1984, 99~147.
 [5] 陈琦,易祖华,黄和容. *微生物学通报*, 1994, 21(6): 333~335.
 [6] 中国科学院微生物研究所细菌分类组编著. *一般细菌常用鉴定方法*, 北京: 科学出版社, 1973, 193~198.
 [7] Lillo J G, Valera F R. *Appl Environ Microbiol*, 1990, 56:2517~2521.
 [8] 易祖华,黄和容,翁维琦等. *微生物学通报*, 1995, 22(1): 21~31.
 [9] 张龙翔. *生化实验方法和技术*, 北京: 高等教育出版社, 1989, 9~11.
 [10] 李酉开. *土壤农业化学常规分析法*, 北京: 科学出版社, 1983, 96~98.
 [11] Ward A C, Dawes E A. *Anal Biochem*, 1973, 52: 607~613.
 [12] Karr D, Waters K J, Emerich D W. *Appl Environ Microbiol*, 1983, 49:1339~1344.
 [13] Doi Y, Kawaguchi Y, Nakamura Y *et al.* *Appl Environ Microbiol*. 1989, 55:2932~2938.
 [14] Hahn S K, Chang Y K, Kin S B *et al.* *Biotechnol Bioeng*, 1994, 44:256~261.

MUTATION BREEDING OF *XANTHOBACTER AUTOTROPHICUS* PRODUCING POLY (HYDROXYBUTYRATE-CO-HYDROXYVALERATE)

Zhao Liangqi Zhang Lizhen Zhang Jianguo Li Jilun*

(Department of Life science, ShanXi University, Taiyuan 030006)

Abstract The wild strain of *X. autotrophicus* was mutated by induction of nitrous acid, ultraviolet ray and ^{60}Co γ -ray. Three mutant strains ($U_{\gamma-1}$, $U_{\gamma-17}$ and $U_{\gamma-20}$) were obtained by the initial and duplicate selections. The colony morphology of $U_{\gamma-1}$ mutant is chrysanthemum type and it is White. The colony morphology of $U_{\gamma-17}$ and $U_{\gamma-20}$ are circular, smooth and yellowish. The shake flask fermentation was carried out for 40h. The results showed that the dry cell yield of $U_{\gamma-1}$, $U_{\gamma-17}$ and $U_{\gamma-20}$ mutant strains were $8.1\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, $11.2\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ and $10.5\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ respectively. And the yield of P(HB-co-HV) to the dry cell ($y_{p/x}$) of the three mutant strains were 0.74, 0.75 and 0.79 respectively. Compared with the wild strain, the dry cell yield and $y_{p/x}$ of the mutant strains increased by over 20% and 7.2%, respectively.

Key words *Xanthobacter autotrophicus*, Mutation breeding, P(HB-co-HV).

* Prof. Li Jilun works in the college of biology of China Agricultural University