

超高静压在琥珀酸生产菌株选育中的应用

姜 岷* 陈可泉 蔡 婷 吴 昊 韦 萍

(南京工业大学制药与生命科学学院 材料化学工程国家重点实验室 南京 210009)

摘 要: 采用超高静压对一株产琥珀酸放线杆菌 A3 进行诱变育种, 进一步提高其生产性能。考察了压力、变压速度、生长期对菌株致死率的影响。在压力为 200 MPa, 50 MPa/min 变压速度的诱变条件下对稳定期菌株进行诱变, 筛选到一株突变菌株产琥珀酸放线杆菌 B19, 琥珀酸产量达到 32.2 g/L, 比出发菌株 A3 提高了 17.9%, 代谢副产物乙酸的产量降低了 11.5%, 经过 6 次传代表明突变菌株具有稳定的遗传特性。

关键词: 超高静压, 产琥珀酸放线杆菌 B19, 琥珀酸, 诱变育种

The Application of Ultra High Hydrostatic Pressure in the Screening of Succinic Acid Producing Strain

JIANG Min* CHEN Ke-Quan CAI Ting WU Hao WEI Ping

(State Key Laboratory of Materials-Oriented Chemical Engineering, College of Life Science and Pharmacy, Nanjing University of Technology, Nanjing 210009)

Abstract: *Actinobacillus succinogenes* A3 was mutagenized by ultra high hydrostatic pressure for improving the production ability of succinic acid. The effects of pressure, rate of pressure changes and growth periods on the lethality rate of the strain were investigated. The strain in stationary phase was mutagenized at 200 MPa with the pressure changes at the rate of 50 MPa/min. As a result, a mutation strain *Actinobacillus succinogenes* B19 was obtained, and the concentration of succinic acid could reach 32.2 g/L, which was 17.9% higher than that of the original strain, and in the meanwhile the concentration of acetic acid was decreased by 11.5%. After six generation, the mutant also has good stability of descendibility for succinic acid production.

Keywords: High hydrostatic pressure, *Actinobacillus succinogenes* B19, Succinic acid, Mutation

自从 1895 年 H.Royer 等报道了利用超高静压技术(一般认为 100 MPa 以上压力为超高静压)可以杀死微生物以来, 有关应用超高静压技术的研究在国内外陆续报道, 但仍局限于在食品科技领域用于杀菌和加工处理等^[1,2]。随着人们认识的提高, 近

年来超高静压技术逐步成为深海生物学、分子生物学和生物医学等交叉领域研究中的热点^[3]。高压会影响生物细胞内生化反应、酶的活性、基因表达等^[2,4,5,6]。高翔等^[7]用 220 MPa 高压处理大肠杆菌后发现突变菌株的部分蛋白质组与原始菌株存在着差

异;李桂双等^[8]利用 75 MPa 高压处理水稻种子,可以提高水稻叶片中类胡萝卜素含量;王岁楼等^[9]采用 150 MPa 压力诱变漆酶产生菌灵芝,发现突变株产酶酶活提高了 283%。因此,超高静压可以作为一种物理诱变手段用于工业微生物的诱变育种。本研究采用超高静压对一株琥珀酸生产菌株产琥珀酸放线杆菌 A3 进行诱变育种,以获得优良性能的生产菌株。

1 材料与方法

1.1 菌种

产琥珀酸放线杆菌 A3(本实验室筛选并保存)。

1.2 培养基

(1) 平板培养基(g/L): 葡萄糖 2.5, 水解酪蛋白 17, NaCl 5, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 2.5, 琼脂 20, pH 7.5。

(2) 平板初筛培养基(g/L): 平板培养基添加莫能菌素 0.02, 溴百里香酚蓝 0.1。

(3) 种子培养基(g/L): 葡萄糖 10, 胰蛋白胨 5, $NaHCO_3$ 10, $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 9.6, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 15.5, pH 7.0。

(4) 发酵培养基(g/L): 葡萄糖 50, 胰蛋白胨 10, 富马酸二钠 1, KH_2PO_4 3, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.3, $CaCl_2$ 0.3, NaCl 1, $MgCO_3$ 30, pH 7.0。

1.3 实验方法

1.3.1 培养方法: 平皿置于厌氧培养箱(含混合气: $N_2:H_2:CO_2=8:1:1$)中 37℃ 培养 12 h 后用于种子培养基的接种, 种子培养条件为 37℃, 120 r/min。种子培养 8 h 后接种至血清瓶发酵培养基于 37℃, 180 r/min 摇床培养 30 h。5 L 发酵罐装液量为 3 L, 保持 CO_2 通气量 0.3 L/min, 温度 37℃, 200 r/min, NaOH 调节 pH 为 6.8。

1.3.2 诱变处理方法: 将出发菌株进行预培养, 取新鲜发酵液于 7000 r/min 冷冻离心 20 min 后用无菌生理盐水洗涤, 制成菌悬液, 取 300 μ L 置于无菌四氟乙烯管中, 放置于超高静压装置中进行诱变处理。

1.3.3 筛选方法: 初筛: 将诱变处理过的菌液稀释合适浓度后涂布于平板初筛培养基上, 置于厌氧培养箱中培养, 选择变色圈较大、生长迅速的单菌落进行复筛。

复筛: 将初筛选定的单菌落接种至血清瓶发酵培养基中进行培养, 发酵结束后检测发酵液中有有机

酸含量。

1.3.4 超高静压诱变处理: 考察超高静压对菌株致死率的影响时初始处理条件为: 压力 200 MPa, 变压速度为瞬间变压, 当改变一个处理条件时其他处理条件保持不变。实验过程中不保压即达到最大处理压力时就开始降压。

1.3.5 发酵液中有机的测定方法: 见文献[10]。

2 结果与讨论

2.1 超高静压对菌株致死率的影响

2.1.1 压力大小对菌株的致死率的影响: 不同种类菌株对压力的敏感程度不一样, 考察压力在 100 MPa~400 MPa 条件下对菌株致死率的影响。由图 1 可知, 稳定期菌株在压力为 100 MPa~300 MPa 范围内, 随着压力的增高, 致死率呈梯度增加, 当压力升至 300 MPa 后, 致死率接近 100%。对数生长期菌株对压力变化比较敏感, 在压力为 100 MPa 时, 菌株致死率已达到 100%。

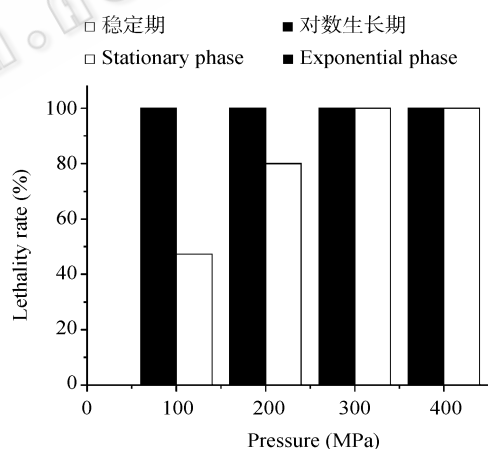


图 1 压力大小对不同生长期菌株致死率的影响

Fig. 1 Effect of pressure on the lethality rate of the strain at the different growth phase

2.1.2 变压速度对致死率的影响: 考察变压速度分别为 10 MPa/min、50 MPa/min、瞬间变压的条件下, 对比菌株致死率的影响。由表 1 可知, 3 种变压速度下对数生长期菌株致死率均达到 100%, 而稳定期菌株致死率呈不规则变化。当速度为 10 MPa/min 时, 稳定期菌株致死率达 100%, 可能由于速度较低的情况下, 保压时间相应延长, 导致致死率较高。对比 50 MPa/min 和瞬间变压, 虽然前者的保压时间长于后者, 但致死率却低于后者, 可能是因为快速变

压过程中, 细胞结构发生严重损伤, 失去其紧急修复能力, 因此适当的缓和变压将提高受压菌株的存活率。

表 1 变压速度对菌株致死率的影响 Table 1 Effect of pressure changes on the lethality rate of the strain		
Pressure changes(MPa/min)	Lethality rate (%)	
	Stationary phase	Exponential phase
10	100	100
50	73.6	100
Moment	80	100

2.1.3 生长期对致死率的影响: 通过以上实验研究表明, 在相同的压力处理条件下, 对数生长期菌株致死率均比稳定期菌株高。据文献报道^[11], 处于对数生长期的微生物比处于稳定期的微生物对压力的反应更敏感, 稳定期菌株细胞在卸压后能够将压致受损的细胞膜重新密封, 卸压后其细胞修复能力较强, 因此耐压能力比对数生长期的细胞要强。因此, 本实验选择稳定期菌株作为诱变出发菌株。

2.2 突变株的筛选

通过以上超高静压处理条件的研究, 选择 200 MPa 压力, 50 MPa/min 的升降压速度对产琥珀酸放线杆菌 A3 进行处理。实验结果表明该处理条件下的菌株平均致死率为 78.0%, 正变率达到

15.5%, 正突变菌株的丁二酸产量平均提高 9.8%, 其中突变株产琥珀酸放线杆菌 B19, 琥珀酸产量可达 32.2 g/L, 比出发菌株 A3 提高了 17.9%, 质量收率达 64.4%, 代谢副产物乙酸产量降低了 11.5%, 甲酸和乳酸产量变化不大(图 2)。

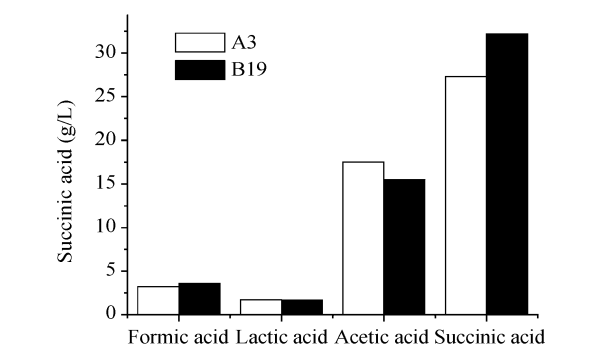


图 2 突变株 B19 与出发菌株 A3 的有机酸产量的差别
Fig. 2 The comparison of organic acid production between mutant B19 and original strain

2.3 突变株的遗传稳定性

经过初筛复筛选出 6 株高产正突变株, 经过 6 次传代, 考察传代对丁二酸产量的影响, 结果见表 2。由表 2 可知, 经过诱变产生的正突变菌株经过 6 次传代后, B19、B39、B56 具有稳定的遗传特性。综合筛选和稳定性分析的结果, B19 生产能力最强, 且遗传性状稳定, 为获得的最佳突变株。

表 2 传代对突变株丁二酸产量的影响(g/L) Table 2 Effect of different generations on succinic acid production by mutants (g/L)						
Mutants	Generation					
	1	2	3	4	5	6
B10	29.6	29.4	28.9	28.7	28.6	28.1
B19	32.4	33.3	32.9	33.5	32.1	33.5
B32	31.8	31.0	30.5	29.9	29.3	28.8
B39	30.4	31.2	30.3	30.5	29.6	30.8
B47	31.2	30.8	30.6	30.5	29.4	28.9
B56	29.3	29.5	29.2	29.6	29.0	29.5

3 结论

采用超高静压对产琥珀酸放线杆菌 A3 进行诱变选育, 考察了压力、变压速度、生长期对菌株致死率的影响, 选择 200 MPa 压力, 50 MPa/min 的升降压速度对产琥珀酸放线杆菌 A3 稳定期菌株进行

处理, 菌株平均致死率为 78.0%, 正变率达到 15.5%, 正突变菌株丁二酸产量平均提高 9.8%, 其中突变株产琥珀酸放线杆菌 B19, 琥珀酸产量可达 32.2 g/L, 比出发菌株 A3 提高了 17.9%, 质量收率达 64.4%, 代谢副产物乙酸产量降低了 11.5%, 且经过 6 次传代具有稳定的遗传特性。由此可见, 超高静压可以

作为一种新型的、操作简便、无污染的物理诱变手段应用于微生物诱变育种领域,进一步加强超高静压诱变机理的研究将会有助于该技术的推广应用。

致 谢: 南京工业大学理学院沈临江老师和李冀蜀老师提供超高静压反应装置, 并对实验提供宝贵意见, 特此致谢。

参 考 文 献

- [1] Rikimaru H. High pressure in bioscience and biotechnology: pure science encompassed in pursuit of value. *Biochemical et Biophysical Acta*, 2002, **1595**: 397-399.
- [2] 王岁楼, 吴晓宗, 郝莉花, 等. 高压对微生物的影响及其诱变效应探讨. *微生物学报*, 2005, **45**(6): 970-973.
- [3] Bartlett DH. Pressure effects on in vivo microbial processes. *Biochemical et Biophysical Acta*, 2002, **1995**: 367-3811.
- [4] Osumi M, Yamada N, Sato M, *et al.* Pressure effects on yeast cell ultrastructure: change in the ultrastructure and cytoskeleton of the dimorphic yeast. *High Pressure and Biotechnology*, 1992, **3**: 9-12.
- [5] Isaacs NS. Microbial inactivation of microorganisms. *High pressure processing of foods*, 1995, **4**: 65-80.
- [6] Allen EE, Facciotti D, Barelett DH. Monounsaturated but not polyunsaturated fatty acids are required for growth at high pressure and low temperature in the deep sea bacterium *Photobacterium profundum* strain SS91. *Appl Environ Microbiol*, 1999, **65**: 1710-1720.
- [7] 高 翔, 李 炯, 阮康成. 高压力诱变的耐压大肠杆菌. *生物化学与生物物理学报*, 2001, **33**(1): 77-81.
- [8] 李桂双, 白成科, 段 俊, 等. 高静水压诱导水稻产生突变的研究. *高压物理学报*, 2006, **20**(4): 421-428.
- [9] 王岁楼, 吴晓宗, 段旭昌, 等. 超高压对漆酶产生菌的诱变效应研究. *工业微生物*, 2006, **36**(2): 31-35.
- [10] 陈可泉, 韦 萍, 姜 岷, 等. 反相高效液相色谱在发酵制备琥珀酸中的应用. *生物加工过程*, 2005, **3**(2): 50-52, 57.
- [11] Marie J, Corne P, Gervais P. A new design intended to relate high pressure treatment to yeast cell mass transfer. *Journal of Biotechnology*, 1999, **41**: 95-98.

科技信息

微生物防治蝗虫的研究与应用

蝗虫是世界性大害虫, 危害粮食作物和经济作物, 造成重大经济损失。为确保粮食作物安全, 充分运用微生物技术治蝗是行之有效的方法和最佳选择。微生物以及植保研究人员认为研发生物防治蝗虫制剂大有可为。如绿僵菌(*Metarrhizium* sp.)治蝗制剂在许多国家如英国、澳大利亚等已实现商品化, 进行大量生产和应用。在澳大利亚, 每年防治蝗虫近 25000 公顷, 治蝗效力达到 90%~95%。实践证明, “以菌治虫”有很强的生命力。

灭蝗除绿僵菌之外, 从一种蘑菇菌种中提取的一种特殊油状溶液用于治蝗也取得了良好的效果, 此液一旦黏上蝗虫体表面, 菌的孢子就在虫的表面萌发、生长繁殖, 菌丝体侵入虫体内部, 约 1 周后虫体即死亡, 致死率达到 90% 以上。此项灭蝗虫技术的应用对土壤、空气等自然环境不产生负面效应, 有望研制出新一代灭蝗产品。

在我国, 重庆大学和中国农业科学院等单位研究人员在研发绿僵菌灭蝗制剂方面取得了可喜的成绩, 专家认为, 有效利用天敌和生物制剂治蝗灾是今后的发展方向。这里还应感谢我国邱式邦院士, 他从事植保工作 20 年, 在与蝗灾斗争中开创了新中国的治蝗事业, 给人们留下了深刻的记忆(注: 邱式邦院士现年 97 岁, 1911 年 8 月 10 日生, 浙江人, 中国科学院院士, 中国农业科学院研究员)。

(柯为供稿)