

紫外诱变原生质体选育赖氨酸高产菌株

王 弘 齐秀兰 李福德

(沈阳药学院, 沈阳)

以钝齿棒杆菌102S₂-58为出发菌株, 在原生质体形成及再生的最佳条件下制备原生质体, 并对原生质体进行紫外诱变处理, 对大量的再生突变株进行发酵筛选, 获得了高产稳定株102-100号, 其发酵液经氨基酸自动分析仪测定L-赖氨酸积累量由出发菌株的50.0mg/ml提高到80.8mg/ml, 糖转化率达到63.88%, 发酵液中主要副产物——缬氨酸和蛋氨酸的量明显降低。

关键词 钝齿棒杆菌; 原生质体; 糖转化率

赖氨酸是人体必需的重要氨基酸之一, 在食品或饲料中赖氨酸含量不足时会限制其他氨基酸的利用, 所以赖氨酸广泛地应用食品(尤其是婴儿食品)的强化、动物饲料的添加剂和医药上配制氨基酸输液等, 由于它的重要性各国都在大力地发展赖氨酸的生产。我们所用的出发菌株102S₂-58是前人经紫外线、亚硝基胍反复处理获得的具有(HS⁺、AEC^r、Met^r)的三重突变株、赖氨酸产量达50mg/ml^[1]。如果再重复使用上述常规诱变方法来提高菌种的产酸能力将会受到较大限制。70年代以来, 原生质体技术迅速发展并用来改良微生物的菌种特性, 提高产率^[2,3]。但原生质体融合是两出发菌株基因的随机组合, 不能定向进行DNA重组来改变生物合成赖氨酸中某些关键酶的活性。因此融合株较难大幅度地提高产量。另外, 对双亲株进行遗传标记花费了许多人力和时间, 有时往往降低亲株的产量。根据文献报道^[4]和我们的实验结果发现, 对原生质体直接进行紫外诱变处理、方法简便、效果好、能在较短时间内较大幅度地提高菌种的生产能力, 因此这种方法是菌种选育中的一种行之有效的方

法。

材 料 和 方 法

(一) 材料

1. 菌种: 钝齿棒杆菌(*Corynebacterium crenatum*) 102S₂-58 (HS⁺、AEC^r、Met^r), 大连制药厂提供。

2. 培养基

(1) 完全培养基 CM (%) : 葡萄糖0.5、蛋白胨1.0, 酵母膏0.5, NaCl 0.25, pH7.0—7.2 (固体培养基加2%琼脂)。

(2) 种子培养基及发酵培养基: 参照文献[1]。

(3) 高渗稀释液 DF: 参照文献[5]。

(4) 再生培养基 DM₃: 琥珀酸钠90.05g, 水解酪蛋白5g, 葡萄糖5g, 酵母膏5g, MgCl₂·6H₂O 4.066g, KH₂PO₄ 1.5g, K₂HPO₄·3H₂O 3.5g, pH7.3, 加蒸馏水至1L, 琼脂2.0%。

本文于1988年10月10日收到。

本文承蒙戴祥鹏副研究员的热情指导与审定, 特此致谢。

3. 试剂

(1) 1%磷酸缓冲液(pH6.0): KH_2PO_4 7g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 0.6g, 加蒸馏水1L配成。

(2) 青霉素: 为大连制药厂产品, 用磷酸缓冲液配制成溶液。

(3) 溶菌酶: 上海禽类蛋品公司禽蛋二厂出品, 用DF液配制成溶液。

(二) 实验方法

1. 原生质体的制备及再生: 参照文献[6]。

从新鲜斜面上取两满环菌接入CM液中, 32°C振荡培养8.5h, 以2%的接种量转接到新鲜的CM液中, 再加1mg/ml的甘氨酸, 振荡培养到对数生长中期, 加0.4u/ml的青霉素, 继续振荡培养4h。取菌液离心去掉培养液, 用DF液离心洗菌体两次, 然后取菌液稀释到OD值为0.9左右, 用4mg/ml的溶菌酶32°C静止作用17h, 使之形成原生质体。将原生质体液离心去掉酶液, 用DM₃液洗涤一次, 然后用DM₃液系列稀释涂再生平皿, 培养3天, 长出再生菌落。

用活菌计数法求原生质体的制备率及再生率, 计算公式如下:

$$\text{原生质体制备率} = \frac{A-B}{A} \times 100\%$$

$$\text{再生率} = \frac{C-B}{A-B} \times 100\%$$

A、B: 溶菌酶处理前后完全培养皿上的菌落数。C: 溶菌酶处理后在高渗培养皿上菌落数。

2. 紫外线诱变处理原生质体及菌体: 按如前1.所述制成原生质体液, 然后用DM₃液稀释到 10^{-5} , 取5ml原生质体液加入平皿中, 在15W紫外灯下(波长2537Å), 距离30cm, 电磁搅拌下处理1、2、

3、4min, 然后避光培养25min。各取0.1ml原生质体液涂再生平皿, 32°C倒置培养。按前述1.制成菌液, 在未加溶菌酶前各取0.5ml菌液分别用生理盐水和DM₃液稀释成 10^{-5} , 在紫外灯下照射10—60s, 避光培养25min后各取0.1ml菌液涂完全平皿, 32°C倒置培养。

$$\text{原生质体死亡率} = \frac{A-B}{A} \times 100\%$$

$$\text{菌体死亡率} = \frac{C-D}{C} \times 100\%$$

A: 再生培养皿上菌落数。B: 紫外线照射后再生培养皿上菌落数。C: 完全培养皿上的菌落数。D: 紫外线照射后在完全培养皿上的菌落数。

3. 发酵方法: 初筛: 从再生平皿上挑单菌落斜接种培养24h, 取两环菌接入发酵培养液中(15ml/250ml三角瓶), 32°C摇瓶培养72h, 测发酵液中L-赖氨酸含量, 产量高的作为复筛的菌株。复筛: 高产菌株经斜面活化后, 取一满环菌接入种子培养液中(35ml/250ml三角瓶), 摇瓶培养18h, 然后各取1.5ml种子液加入三个发酵瓶中, 32°C摇瓶培养72h, 测三瓶发酵液的L-赖氨酸含量, 取其平均值, 确定高产稳定株。

4. 分析方法: 按文献[1]方法测定菌体生长量; 用国产pH6.4—8.0精密pH试纸和pHS-29A型酸度计测定pH值; 用3,5-二硝基水杨酸法^[7]测定发酵液中残糖; L-赖氨酸含量采用酸性茚三酮比色法^[8]测定。用日立835-50型氨基酸自动分析仪测定发酵液中氨基酸成分及含量。

结果与讨论

(一) 102S₂菌的生长情况及产酸量

102S₂ 菌革兰氏染色阳性，32℃条件下斜面培养24h长好，它的 L-赖氨酸产量为50.0mg/ml。图 1 是 102S₂ 菌在完全培养液中的生长曲线。生长曲线显示了菌种的对数生长期，在对数期的菌体生理状态相对一致，代谢旺盛，对青霉素、溶菌酶的敏感性强，易于进行破壁，使之形成原生质体。从图 1 看出：102S₂ 菌的对数生长中期是5.5h。在此加入亚适量的青霉素作用到对数生长末期，可以抑制细胞壁的合成，增强溶菌酶的破壁效果。

(二) 102S₂ 菌对青霉素作用的敏感性

如图 1 当102S₂菌摇瓶培养5.5h时，分别加入不同浓度的青霉素作用不同时间，考查 102S₂ 菌对青霉素作用的敏感性。由图 2 的结果看出：102S₂ 菌随着青霉素浓度的增大及作用时间的延长，敏感性逐渐增强。当青霉素浓度为 1.6u/ml，作用时间超过4h后，开始出现抑制生长的趋势，因此，选择青霉素预处理的亚适量范围应在0.4—1.6u/ml。

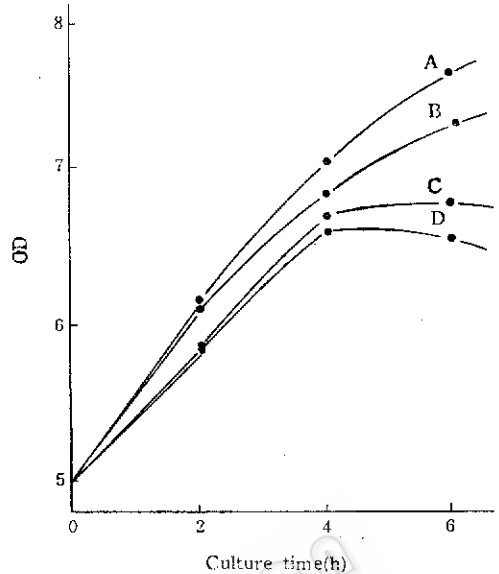


图 2 102S₂菌对青霉素作用的敏感性
Fig.2 102S₂ strain's sensitivity to penicillin treated
青霉素浓度 Concentration of penicillin(u/ml)
A. 0.4 B. 0.8 C. 1.2 D. 1.6

(三) 102S₂ 菌原生质体制备及再生的最佳条件

对原生质体制备率及再生率的影响因素，主要是青霉素浓度，作用时间和溶菌酶浓度及其作用时间。通过正交实验同时考查了这四个影响因素，找出了102S₂ 菌原生质体制备及再生的最佳条件。正交设计如表 1，实验结果见图 3。

从图 3 结果表明：原生质体制备率与再生率的最佳条件不尽相同，因为我们的目的是获得更多的再生株，以便扩大筛选高产菌株的几率，因此以再生率最佳为主、兼顾制备率的条件下找出了 102S₂ 菌原生质体制备率及再生率都较佳的条件为：青霉素浓度0.4u/ml，作用时间 4h；溶菌酶浓度4mg/ml，作用时间17h。在这最佳条件下，又对102S₂ 菌进行了细胞破壁及再生实验，求得原生质体的制备率为 96.7%，再生率为40.3%。

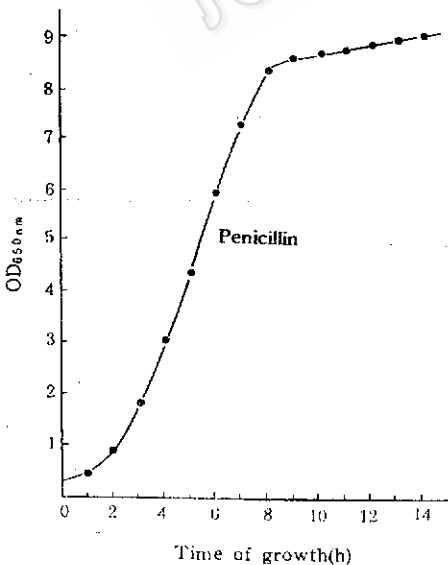


图 1 102S₂菌的生长曲线
Fig.1 Growth curve of the strain 102 S₂

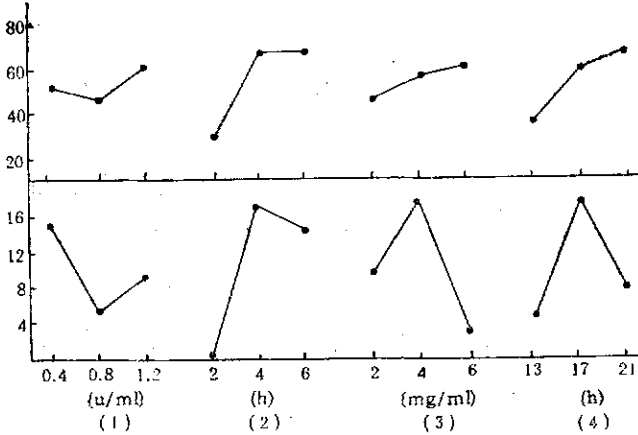


图 3 各影响因素对原生质体制备率及再生率的影响
Fig.3 Effects of different factors on preparation and regeneration frequency of protoplasts

- (1) 青霉素浓度(u/ml) Concentration of penicillin
 - (2) 青霉素作用时间(h) Time of penicillin treatment
 - (3) 溶菌酶浓度(mg/ml) Concentration of lysozyme
 - (4) 溶菌酶作用时间(h) Time of lysozyme treatment
- 注: 此图纵坐标上半部为制备率(%), 下半部为再生率(%)

表 1 原生质体制备及再生的影响因素分析
Table 1 Effect factors analysis of the preparation and regeneration of protoplasts

因素 Factor	青霉素浓度 Conc. of penicillin (u/ml)	青霉素作用时间 Time of penicillin treatment (h)	溶菌酶浓度 Conc. of lysozyme (mg/ml)	溶菌酶作用时间 Time of lysozyme treatment (h)
一水平 Level one	0.4	2	2	13
二水平 Level two	0.8	4	4	17
三水平 Level three	1.2	6	6	21

(四) 102S₂ 菌体及其原生质体对紫外线的耐受能力

见方法 2, 102S₂ 菌体及其原生质体在紫外线下照射的死亡率如表 2。

对菌体及原生质体的紫外线诱变处理

表 2 表明, 在菌的生理状态、浓度都

表 2 菌体在生理盐水和高渗液中的死亡率
Table 2 Cell death frequency in physiological saline and hypertonic solution

紫外线照射时间 Time of UV irradiation (s)		10	20	30	40	50	60	120	180	240
死亡率 Death frequency (%)	生理盐水 Physiological solution	79.60	86.39	93.69	96.42	98.89	99.72			
	高渗液 Hypertonic solution			31.5	56.5	73.6	88.3			
				7.6		9.4	41.4	51.0	74.4	

* 原生质体在高渗液中的死亡率 Protoplasts death frequency in hypertonic solution

相对一致的情况下，由于所用的稀释溶液不同，紫外线照射效果有较大差别，这说明高渗液对菌体有一定的保护作用。此外，原生质体对紫外线照射有明显的耐受能力。例如，紫外线照射1min时，原生质体死亡率为9.6%，而菌体死亡率为99.72%，差异如此大的原因还有待于进一步探讨。

(五) 不同剂量的紫外线照射对102S₂菌原生质体的诱变效果

将102S₂菌的原生质体在紫外线下分别照射1、2、3、4min，然后分别涂再生平皿，挑取直接再生株及经紫外线照射后再生株，按剂量不同各挑取100株（共500株），32℃发酵72h，测产酸量。每批发酵都以出发菌株作对照，求得不同剂量处理的再生株的正变率如表3。

结果表明，紫外线照射2和3min，诱变效果较好。

由图4看出，随着紫外线照射时间的增长，菌株产酸量分布逐渐分散，产酸量较高的菌株数明显增加，而且紫外线照射

表 3 直接再生株及紫外线处理后再生株的正变率
Table 3 Positive mutation rate of directly regenerative colonies and regenerative colonies after UV treatment

紫外线照射时间 Time of ultraviolet irradiation (min)	0	1	2	3	4
正变率 Positive mutative rate (%)	14	26	34	35	29

超过2min，获得高产菌株的几率增大。

(六) 102—100号高产菌株的获得

1. 获得途径：对102S₂-58菌进行单菌落纯化分离，挑取100株进行摇瓶发酵，从中获得产量较高的菌株17株复筛，选出了102S₂-58₍₇₎稳定株，并作为制备原生质体的出发菌株，其L-赖氨酸产量为50.0

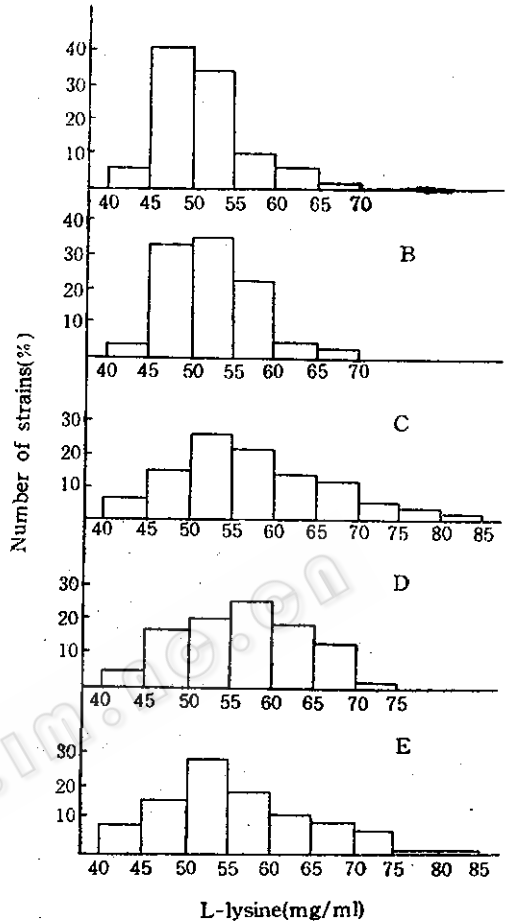


图 4 L-赖氨酸产量分布图
Fig.4 Distribution of L-lysine production
A. 未用紫外线处理 Without UV treating
B,C,D,E: 依次用紫外线处理 1,2,3,4min
UV treated 1, 2, 3, 4 min successively

mg/ml。对102S₂-58₍₇₎菌进行原生质体化，并用不同剂量的紫外线诱变处理，在再生平皿上获得再生实变株，共筛选500株再生突变株，从中选出了产量较高的55株进行复筛，选出了产酸量稳定在70mg/ml以上的菌株18株再次复筛，终于选出了高产稳定株102-100号，其产酸量为80.8 mg/ml。

用氨基酸自动分析仪分析了102S₂-58₍₇₎菌株和102-100号菌株发酵液中的氨基酸成分，结果见表4。

分析结果表明，102-100号菌株与出

表 4 102S₂-58(7)及102-100号菌株
在发酵液中氨基酸组分

Table 4 Amino acid composition in the
fermentation broth of the strains 102S₂-58(7)
and 102-100 (mg/ml)

氨基酸 Amino acid	菌株 Strains	
	102S ₂ -58(7)	102-100
Asp, Thr, Ser, Glu	—	—
Cys, His, Arg, Trp	—	—
Gly	0.52	0.99
Ala	4.53	4.95
Val	5.10	0.82
Met	1.07	0.60
Ile	1.21	1.50
Leu	0.32	0.67
Tyr	3.14	7.37
Phe	0.60	0.94
Lys	50.0	80.8
Pro	—	2.68
NH ₃	4.37	12.26

发菌株102S₂-58(7), 相比, 降低了发酵液中的主要副产物——缬氨酸和蛋氨酸的量。

2. 菌种 102-100 号的稳定性考查: 每隔一个月传接一次斜面, 将 5 个月的斜面同时活化进行发酵, 所得结果见表 6。表 5、6 的实验结果表明, 102-100 号菌株的遗传性比较稳定。

表 5 连续三批发酵的结果
Table 5 Fermentation results of three
batches successively

批次 Batch	第一批 Batch one	第二批 Batch two	第三批 Batch three
L-lysine·HCl (mg/ml)	83.44	80.16	82.30

表 6 斜面传代稳定性

Table 6 Stability of the strain 102-100 on CM slant agar

斜面培养时间 Time of slant culture	87年 9月	87年10月	87年11月	87年12月	88年 1月
L-lysine·HCl (mg/ml)	83.84	84.68	80.48	78.72	80.62

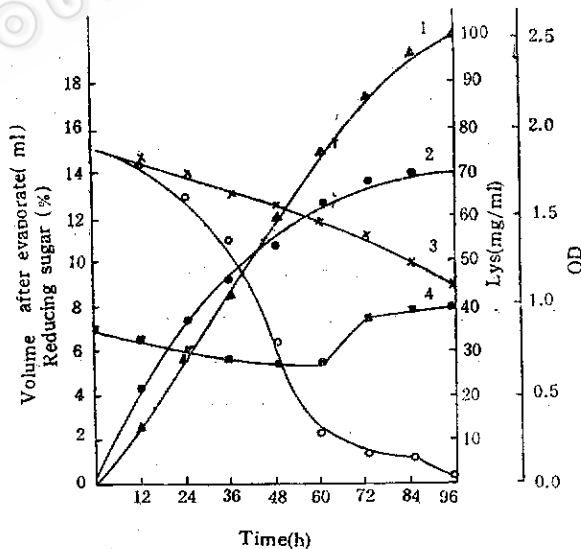


图 5 102-100号菌株L-赖氨酸发酵过程

Fig.5 Time course of fermentation of L-lysine by the strain 102-100

1. 赖氨酸产量 (mg/ml) L-lysine 2. OD

3. 蒸发后体积 Volume after evaporate(ml) 4. pH 5. 还原糖 Reducing sugar(%)

(七) 102-100号菌的发酵过程

通过四次正交实验,找出了102-100号菌发酵的最佳条件为每100ml发酵液中含:葡萄糖15g,硫酸铵3.0g,生物素20 γ ,盐酸豆饼水解液1.6ml,玉米浆2.5g,硫酸镁0.06g,碳酸钙2.5g,醋酸铵0.9g,磷酸氢二钾0.25g, pH 7.2, 装量15ml/250ml三角瓶,接种量10%,发酵时间

72h。

在最佳发酵条件下,考查了102-100号菌的发酵过程(图5)。从蒸发曲线看出,越到发酵后蒸发越快,虽然96h时L-赖氨酸积累量最高,但此时蒸发量也最大。因此综合起来看,发酵72h效果最好,此时L-赖氨酸产量为80.8mg/ml,糖转化率为63.88%。

参 考 文 献

- [1] 李福德等:微生物学杂志,3(3):34-40,1983.
- [2] 味の素:发酵と工业,40(8):762,1982.
- [3] 江井 仁:化学の领域,37(6):386-391,1983.
- [4] 杜珠还等:生物工程学报,1(4):59-62,1985.
- [5] 乔宝义等:微生物学报,23(1):33-43,1983.
- [6] Harami, K. et al.:Biochem., 45(5):1007-1013, 1979.
- [7] 张龙翔等:生化实验方法和技术,人民教育出版社,北京, p.9-11, 1982.
- [8] Chinard, F.D.:J.Boil.Chem., 199:91, 1952.

SELECTION HIGH-YIELD L-LYSINE PRODUCING STRAIN BY UV TREATMENT OF PROTOPLASTS

Wang Hong Qi Xiulang Li Fude

(Shenyang Conllege of Pharmacy, Shenyang)

Under the optimun conditions of formation and regeneration of protoplasts, protoplasts of *Corynebacterium crenatum* 102S₂-58 were prepared. The high-yield stable strain 102-100 were obtained by UV irradiation of protoplasts and screening of the fermentation of many regenerative mutants. Amino acids in the fermentation broth of the strain 102-100 were determined by the automatic amino acid analyzer. The strain 102-100 produced large amounts of L-lysine (80.8mg/ml) than parental strain 102S₂-58 which produced 50.0mg/ml of L-lysine. The conversion rate of glucose was 63.88%. The yields of other amino acids, such as valine and methionine, were reduced obviously.

Key words

Corynebacterium crenatum; protoplast; conversion rate of glucose