

钝齿棒状杆菌产赖氨酸突变株的选育

李泰俊*

(朝鲜)(平壤轻工业大学, 发酵讲座)

用 N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍(NTG)对钝齿棒状杆菌(*Corynebacterium crenatum*) W L1.0245 进行了诱变处理,获得了高丝氨酸、蛋氨酸、亮氨酸及丙氨酸营养缺陷型和S-(2-氨基乙基)-L-半胱氨酸(AEC)抗性突变株,并经摇瓶筛选出几株能产生L-赖氨酸的钝齿棒状杆菌 AEC 抗性株、高丝氨酸缺陷型株和高丝氨酸缺陷型兼 AEC 抗性突变株。TR-275 菌株(Thr⁻AEC^r)在筛选培养基中发酵累积 L-赖氨酸盐酸盐 25.6mg/ml(对葡萄糖的转化率 25.6%)。

一、前言

对利用微生物发酵法生产 L-赖氨酸的研究,已经有不少报道。

早在 1958 年 Kinoshita 等^[1]和 1961 年 Nakayama 等^[2]就先后报道了利用谷氨酸棒状杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)的高丝氨酸(或苏氨酸和蛋氨酸)和蛋氨酸缺陷型,以糖质原料直接发酵产生大量赖氨酸的研究。1967 年 Sano 和 Shiio^[3]报道了利用黄色短杆菌(*Brevibacterium flavum*)的营养缺陷型生产赖氨酸的研究。1974 年中国科学院微生物研究所^[4]报道了北京棒状杆菌(*Corynebacterium pekinense*) AS.1.299 营养缺陷型变异株生产赖氨酸的研究结果。

1970 年 Sano 和 Shiio^[5]报道了利用黄色短杆菌(*Brev. flavum*) AEC 抗性突变株高产赖氨酸;1973 年 Nakayama 和 Araki^[6]报道了谷氨酸棒状杆菌(*Coryn glutamicum*)的高丝氨酸和亮氨酸缺陷型兼 AEC 抗性株生产赖氨酸的研究工作。

此外,对乳糖发酵短杆菌(*Brev. lactofermentum*)营养缺陷型和抗 AEC 性突变株生产赖氨酸的研究也获得了很好的成绩。

本文报告对钝齿棒状杆菌营养缺陷型、AEC 抗性突变株以及营养缺陷型兼 AEC 抗性突变株的发酵产生 L-赖氨酸的能力进行的研究。

二、材料和方法

1. 出发菌株

Corynebacterium crenatum WL1.0245(Thr⁻)

由无锡轻工业学院发酵系微生物教研室菌种保藏组提供。

*作者为我院的朝鲜进修生

本文1986年7月11日收到

2. 培养基

1) 完全培养基 牛肉膏 1%, 蛋白胨 1%, 酵母膏 0.5%, NaCl 0.5%, 琼脂 2%, 自来水配制, pH7.0, 1kg/cm² 灭菌 20 分钟

2) 基本培养基 葡萄糖 2%, (NH₄)₂SO₄ 1%, 尿素 0.25%, K₂HPO₄ 0.1%, MgSO₄·7H₂O 0.04%, FeSO₄·7H₂O 1mg/100ml, MnSO₄·H₂O 1mg/100ml, d-生物素 5μg/100ml, 维生素 B₁ 20μg/100ml, 水洗琼脂 2%, 蒸馏水配制, pH7.2 1kg/cm² 灭菌 20 分钟

3) 摇瓶种子培养基 葡萄糖 2%, 玉米浆 1.5%, 豆饼水解液(以水解以前豆饼粉的干重计算) 1.5%, (NH₄)₂SO₄ 0.4%, K₂HPO₄ 0.1%, MgSO₄·7H₂O 0.05%, CaCO₃ (先经干热灭菌) 1.0%, 自来水配制, pH7.2~7.4, 分装 500ml 三角瓶, 每瓶装 20~40ml, 1kg/cm² 灭菌 20 分钟。

豆饼水解液的制作 1kg 豆饼粉加 1.5 升水和 1.2 升浓盐酸, 1kg/cm², 水解 16 小时, 然后过滤, 用氨水中和到 pH4.0 左右, 备用

4) 筛选培养基 葡萄糖 10%, 玉米浆 2%, 豆饼水解液 2% (以水解前豆饼粉干重计), CaCO₃ (先经干热灭菌) 4%, K₂HPO₄ 0.1%, MgSO₄·7H₂O 0.05%, 自来水配制, pH7.2~7.4, 分装 500 毫升三角瓶, 每瓶装 20 毫升, 1kg/cm², 灭菌 10 分钟

3. 培养条件

1) 恒温箱 30±1℃

2) 摇床 往复式 96r/min, 振幅 6cm, 温度 30±1℃

4. 主要试剂

1) N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍(NTG) 瑞士产(原装), 由无锡轻工业学院微生物教研室提供。

2) 高丝氨酸 Sigma 公司产品, 由无锡轻工业学院微生物教研室提供。

3) S-(2-氨基乙基)-L-半胱氨酸(AEC) Sigma 公司产的单盐酸盐(AEC·HCl), 由无锡轻工业学院微生物教研室提供

4) L-赖氨酸单盐酸盐(L-Lysine·HCl) 上海生物化学研究所产品, 层析纯, 由无锡轻工业学院微生物教研室提供

5. 诱变方法

取对数生长期的菌液, 用生理盐水离心洗涤 2~3 次后, 用 0.1M 的 pH7.0 的磷酸盐缓冲液制成菌体浓度约为 5×10^8 /ml 的单细胞悬液。用 0.1M 的 pH7.0 的磷酸盐缓冲液配制 2mg/ml 的 NTG 溶液(随配随用)。按 NTG 浓度 250μg/ml 往悬液中滴加 NTG 溶液, 搅匀后立即置水浴, 在 30℃ 下处理 30 分钟后, 立即离心, 用同样的缓冲液离心洗涤菌体 2—3 次。

6. 筛选方法

1) 平板上的筛分 ①各种营养缺陷型突变株的筛分 用点种法^[7]和 Ledevberg^[8]影印法 ②AEC^r 突变株的筛分 将上述经处理后的单细胞悬液适当稀释后涂布在添加 L-苏氨酸 2—4mg/ml 的培养基 B 平板上, 然后在培养基表面上放上每片含 AEC 10mg 的纸片。倒置培养 4—7 天, 在抑菌圈内形成的菌落即为 AEC^r 突变株

含 AEC 纸片的制作 精确称取 AEC 100mg, 溶于 0.5ml 无菌蒸馏水得 200mg/ml 的 AEC 溶液。(此液需保存于冰箱)

用打孔机将新华 5 号滤纸打成直径为 6~8mm 的小圆片,在灭菌后的每片纸片上注射 50 μ l (分 10 次注射)无菌 AEC 溶液,40℃ 下干燥(制成纸片后需保存于冰箱)

2) 摇瓶筛选 将从平板上筛选分离出的菌落移接到培养基 D 的摇瓶,30℃ 下振荡培养 72 小时,将发酵液离心(3000r/min, 10 分钟)。将上清液经酸性茚三酮法测定其 L-赖氨酸的含量

7. 分析方法

1) 菌体生长 样品菌液摇匀后吸出 0.2ml 加入 4ml 0.25mol/ml HCl 溶液,620nm 处读 OD 值。

2) 发酵液中氨基酸组成的纸层析 在东洋 No.51 滤纸上点样 0.5~1 μ l 发酵液,以正丁醇:醋酸:水(4:1:2)为展开剂,展开后,以 0.5% 茚三酮液喷雾,在 80~100℃ 显色

3) L-赖氨酸的定量分析 采用石渡昭男^[9]的酸性茚三酮法。

三、结果及讨论

1. NTG 处理的不同条件对突变率的影响

将 NTG 处理的不同条件对突变的影响进行了比较。其结果见表 1。

表 1 不同浓度 NTG 对突变的影响*

项 目	NTG(μ g/ml)	250	500	750
存活率(%)		17.2	2.3	0.5
营养缺陷型出现率(%)		4.4	2.6	2.2

*处理条件: 30℃, pH7.0, 30 分钟

本研究以后采用 250 μ g/ml 的 NTG 剂量。

2. 诱变结果

诱变和筛选总谱见图 1。

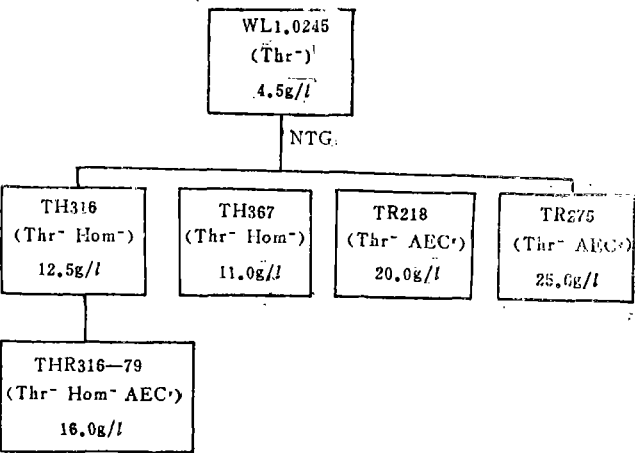


图 1 诱变和筛选总谱系

如图1所示,数据为每个菌株在培养基D(含葡萄糖10%)中的赖氨酸产率,在括号中的是遗传标记。

经诱变,以WL1.0245(Thr⁻)为出发菌株获得了7株高丝氨酸缺陷型株(Hom⁻,Thr⁻) 26株蛋氨酸缺陷型株(Thr⁻Met⁻)、21株亮氨酸缺陷型株(Thr⁻Leu⁻)、6株丙氨酸缺陷型株(Thr⁻Ala⁻)、25株丝氨酸缺陷型株(Thr⁻Ser⁻)和293株AEC抗性株(Thr⁻AEC^r)。

以TH316株(Thr⁻Hom⁻)为出发菌株在同样的诱变处理条件下获得了340株AEC抗性突变株(Thr⁻Hom⁻AEC^r)。

3. 不同氨基酸缺陷型突变株产赖氨酸的比较

对各种营养缺陷型突变株进行了产酸的比较。其结果见表2。

表2 钝齿棒状杆菌 WL1.0245 的不同氨基酸缺陷型突变株产赖氨酸的比较*

菌 号	要 求 的 氨 基 酸	赖氨酸产量 (g/l)	菌 号	要 求 的 氨 基 酸	赖氨酸产量 (g/l)
WL1.0245	苏 氨 酸	4.5	TM258	蛋氨酸 + 苏氨酸	9.7
TH17	苏氨酸 + 高丝氨酸	10.5	TM365	蛋氨酸 + 苏氨酸	7.2
TH287	苏氨酸 + 高丝氨酸	10.1	TM429	蛋氨酸 + 苏氨酸	9.2
TH316	苏氨酸 + 高丝氨酸	12.5	TM512	蛋氨酸 + 苏氨酸	9.2
TH367	苏氨酸 + 高丝氨酸	11.0	TL885	亮氨酸 + 苏氨酸	8.7
TH510	苏氨酸 + 高丝氨酸	7.3	TL945	亮氨酸 + 苏氨酸	8.3
TH587	苏氨酸 + 高丝氨酸	9.2	TA-1117	丙氨酸 + 苏氨酸	6.7
TH630	苏氨酸 + 高丝氨酸	8.7	TS-819	丝氨酸 + 苏氨酸	7.5

* 培养基: 豆饼水解液3%的培养基D, 培养时间: 72小时

从表2可以看出以Hom⁻株赖氨酸产率为最高。这与对其它细菌的研究结果是一致的。在添加3%豆饼水解液的培养基D, TH316株(Thr⁻Hom⁻)和产酸率为12.5g/l, 同样条件下, 亲株WL1.0254(Thr⁻)的产酸率为4.5g/l。

4. 不同量豆饼水解液对高丝氨酸缺陷突变株产赖氨酸的影响

试验采用了上述培养基D, 但豆饼水解液分别加入1%、2%、3%、4%及5%, 同上述的方法进行发酵培养。测得产赖氨酸结果见表3。显然, 摇瓶培养基中豆饼水解液的含量对本研究中高丝氨酸缺陷型突变株的赖氨酸产量影响很大, 其最适量在3%左右(干重计)。

5. AEC抗性突变株的筛选结果

在以WL1.0245(Thr⁻)为出发菌株获得的AEC抗性突变株(Thr⁻AEC^r)中, 大多数菌株的赖氨酸产量在5g/l以上, 产率在10g/l以上的菌株有好几株, 其中菌株TR275(Thr⁻AEC^r)赖氨酸产率为25.6g/l。

以高丝氨酸缺陷型突变株TH316(Thr⁻Hom⁻)为出发菌株经诱变处理获得的抗AEC性菌株(Thr⁻Hom⁻AEC^r), 在对AEC具抗性后, 产赖氨酸能力的增长不大, 增长最大的是THR-79(16.0g/l), 这可能跟生长缓慢有关。

总的来说:

表3 不同量豆饼水解液对赖氨酸产量(Lys·HCl g/l)的影响

菌 号	豆 饼 水 解 液(干 重%)				
	1	2	3	4	5
WL1.0245(Thr ⁻)	—	4.1	4.5	4.0	—
TH17(Thr ⁻ Hom ⁻)	—	5.4	10.5	9.0	—
TH316(Thr ⁻ Hom ⁻)	—	4.5	11.8	10.3	8.3
TH287(Thr ⁻ Hom ⁻)	—	4.5	10.3	9.1	5.9
TH367(Thr ⁻ Hom ⁻)	7.0	7.0	11.2	8.3	7.3
TH510(Thr ⁻ Hom ⁻)	3.8	6.0	7.1	—	—
TH587(Thr ⁻ Hom ⁻)	4.5	4.5	9.2	7.7	7.4
TH630(Thr ⁻ Hom ⁻)	3.8	5.6	8.8	5.6	4.0

1) 亲株 Thr⁻ 株在获得 Hom⁻ 后, 产赖氨酸能力有增长

2) 亲株 Thr⁻ 株在对 AEC 具抗性后, 产赖氨酸能力有较大的增长

3) Thr⁻Hom⁻ 双重缺陷型菌株在对 AEC 具抗性后, 产赖氨酸能力有改善。

本研究尚未做系统的条件试验, 从已做的豆饼水解液含量的试验基础上, 进一步调整培养基配方, 提高培养基中葡萄糖的含量, 赖氨酸产量可望较大幅度的提高。此外, 关于实变珠的稳定性试验, 也期待着进一步的研究。

参 考 文 献

- [1] Kinoshita, S. et al; J. Gen Appl Microbiol. 4, 128—129, 1985
- [2] Nakayama, K. et al; J. Gen Appl Microbiol 7; 145—172, 1961
- [3] Sano, K. and Shiio, I; J. Gen Appl Microbiol. 13; 349—358, 1967
- [4] 陈琦等, 《微生物学通报》, 1, 5—9, 1974
- [5] Sano, K. and Shiio, I; J. Gen Appl Microbiol. 16, 373, 1970
- [6] Nakayama, K. and Araki, K. 1973, Process for producing L-lysine.
U.S. Patent. 3, 708, 395, Jan. 2
- [7] 章名春, 《工业微生物诱变育种》, 1984
- [8] Lederberg, J. and Lederberg E. M., J. Bacteriol., 63, 399, 1952
- [9] 石渡昭男, 《特许公报》, 昭 50—20, 878, 1957