

## 用基因组重排技术选育赖氨酸高产菌株

赵凯<sup>1</sup>, 段巍<sup>1</sup>, 孙立新<sup>2</sup>, 周东坡<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup> 黑龙江大学生命科学学院, 微生物黑龙江省高校重点实验室, 哈尔滨 150080)

(<sup>2</sup> 黑龙江大学附属医院, 哈尔滨 150080)

**摘要** 【目的】以北京棒杆菌(*Corynebacterium pekinense*) 1 为研究对象, 选育赖氨酸高产菌株, 并探索赖氨酸产生菌基因组重排育种的基本规律。【方法】利用基因组重排技术选育赖氨酸高产菌株。【结果】通过四轮基因组重排成功选育出了 5 株遗传稳定的高产赖氨酸菌株, 其中 1 株重排菌株赖氨酸产量达到 16.95 g/dL, 比原始菌株 *Corynebacterium pekinense* 1 赖氨酸产量提高了 37.14%, 比亲本菌株赖氨酸产量提高了 17.46% ~ 31.19%。【结论】首次采用基因组重排技术改良赖氨酸产生菌, 成功选育出了 5 株产量较稳定的高产赖氨酸菌株, 具有潜在的应用价值。

**关键词**: 赖氨酸; 赖氨酸产生菌; 基因组重排

中图分类号: Q935 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2009)08-1075-06

赖氨酸是人体必需的氨基酸之一, 在食品、医药、饲料行业中得到了广泛应用。目前, 赖氨酸的生产方法主要采用微生物发酵法。但由于分离筛选到的菌株发酵产酸水平较低, 糖转化率低, 致使工业生产成本较高, 难以同进口产品竞争。因此, 选育对糖的高转化率、在发酵醪中高浓度地累积赖氨酸及缩短发酵时间的高产赖氨酸菌种成为当前的首要任务。

基因组重排(Genome shuffling)技术是近几年发展起来的一种极其高效的微生物育种方法<sup>[1-2]</sup>。Genome shuffling 育种对象是整个细胞, 把通过诱变改良的突变株进行杂交育种, 使得不同菌株来源的基因组能够充分重组, 不同正向突变整合到一个重组子中的机会大大增加, 大幅度提高了正变率。2002年, Zhang等<sup>[3]</sup>首次提出了基因组重排的概念, 并应用基因组重排技术提高了费氏链霉菌(*Streptomyces fradiae*)合成泰乐星的能力。Patnaik等

(2002)<sup>[4]</sup>和 Wang等(2007)<sup>[5]</sup>分别报道了采用基因组重排技术筛选乳酸杆菌耐酸菌株, 筛选到的新菌株大大提高了乳酸杆菌合成乳酸的能力。Zhao等(2008)<sup>[6]</sup>通过四轮基因组重排成功选育出了 3 株遗传稳定的高产紫杉醇菌株, 菌株 F4-26 紫杉醇产量比出发菌株 NCEU-1 紫杉醇产量提高了 64.41%, 比亲本菌株提高了 31.52% ~ 44.72%。

本试验研究采用的原始菌株为北京棒杆菌(*Corynebacterium pekinense*) 1(AEC<sup>+</sup>, Hser<sup>-</sup>, Bio<sup>-</sup>), 该菌株具有产酸率高、转化率高、发酵时间短等优点, 已申报国家发明专利。目前, 工业上使用的赖氨酸生产菌株大都是采用诱变选育方法获得的高产酸率变异株<sup>[7-10]</sup>, 如再继续采用常规诱变育种手段则难以获得显效。迄今为止, 国内外尚未见有关应用 Genome shuffling 技术选育高产赖氨酸菌株的报道。因此, 本研究旨在采用 Genome shuffling 技术对赖氨酸产生菌进行菌种选育, 深入研究这一新技术在赖

基金项目: 黑龙江省重大科技攻关项目(GA02C101); 黑龙江大学杰出青年科学基金项目资助

\* 通信作者。Tel/Fax: +86-451-86609016, E-mail: zhoudp2003@yahoo.com.cn

作者简介: 赵凯(1973-), 男, 黑龙江省阿城市人, 副教授, 博士, 主要从事于生物制药与微生物遗传育种方面的研究。E-mail: zk395@yahoo.com.cn

收稿日期: 2009-01-15; 修回日期: 2009-04-04

氨酸产生菌中的应用,选育出高产赖氨酸的优良变异菌株。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株** :试验所采用的出发菌株 DU1-62、DU1-114、DU1-21、DU2-39、DU2-66 系由原始菌株 *Corynebacterium pekinense* 1( AEC<sup>-</sup>、Hser<sup>-</sup>、Bio<sup>-</sup> ,赖氨酸产量为 12.36 g/dL)经 UV、DES 及 UV 和 DES 复合诱变后获得的高产赖氨酸的突变株,其赖氨酸产量分别为 13.25 g/dL、12.92 g/dL、14.43 g/dL、13.76 g/dL、13.63 g/dL。

**1.1.2 培养基** (1)完全液体培养基、完全固体培养基、基本固体培养基、牛肉膏蛋白胨斜面活化培养基、高渗固体再生培养基、高渗半固体再生培养基按文献 [11] 配制。(2)种子培养基 :葡萄糖 25 g ,MnSO<sub>4</sub> 0.1 g ,(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 g ,MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.4 g ,KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.5 g ,FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.01 g ,乙酸铵 8 g ,烟酰胺 0.04 g ,味精 0.1 g ,VB<sub>1</sub> 0.01 g ,豆粕水解液 50 mL ,完全溶化后定溶至 1000 mL ,氨水调至 pH 7.0 ,121℃ 灭菌 30 min ,冷却至室温备用。(3)发酵培养基 :葡萄糖 250 g (发酵初始向培养基中添加葡萄糖 150 g ,发酵培养至 36 h 时再补加葡萄糖 100 g ) ,FeSO<sub>4</sub> 0.015 g ,K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2 g ,MgSO<sub>4</sub> 1.5 g ,豆粕水解液 100 mL ,VB<sub>1</sub> 0.0042 g ,生物素 0.0003 g ,完全溶化后定溶至 1000 mL ,氨水调 pH 至 7.0 ,121℃ 灭菌 30 min ,冷却至室温备用。

**1.1.3 溶液** (1)高渗液 :丁二酸钠 13.5 g ,EDTA 0.19 g ,MgCl<sub>2</sub> 0.2 g ,加蒸馏水定溶至 100 mL ,调 pH 5.0 ~ 8.0 ,灭菌 ,使用前加 DNase 0.5 mg。(2)新生磷酸钙溶液 :将 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.54 g ,CaCl<sub>2</sub> · H<sub>2</sub>O 29.4 g 分别溶于 100 mL 蒸馏水中 ,灭菌。用时等体积混合 ,反应生成磷酸钙溶液。(3)0.5 mg/mL L-赖氨酸标准溶液。

**1.1.4 主要试剂** :溶菌酶 (lysozyme) ,购自中国科学院生物化学研究所。酶液配制方法为 :称取溶菌酶 1 g ,用 100 mL 灭菌高渗液溶解后 ,用 G6 细菌过滤器过滤除菌后使用。

### 1.2 菌体培养和收集

首先 ,将 *Corynebacterium pekinense* 1 转接在牛肉膏蛋白胨斜面活化培养基上 ,32℃ 培养 24 h ,活化 2 ~ 3 次 ;再在完全液体培养基中再活化一次 (20 mL/250 mL 锥形瓶) ,32℃ ,96 r/min 震荡培养 12 h ;然后 ,取 1 mL 菌液接种至完全液体培养基

(20 mL/250 mL 锥形瓶)中 ,培养至对数生长期。加入终浓度 0.8 μg/mL 青霉素和 1% 丝氨酸 ,继续培养 3 h ,将培养好的菌液以 4000 r/min 离心 10 min ,收集菌体。

### 1.3 原生质体制备和再生

取一定量菌体 ,加入一定量的溶菌酶液 ,混匀后水浴保温酶解破壁一定时间 ,定时镜检。酶解后 ,消化液 3500 r/min 离心 10 min ,收集原生质体 ,用高渗液洗一次 ,悬浮于 5 mL 高渗溶液中 ,备用。取 0.5 mL 酶解好的原生质体悬液 ,用高渗溶液适当稀释 ,取 0.5 mL 稀释液至装有 4.5 mL 的高渗半固体再生培养基的试管中 (42℃ 保温) ,摇匀后迅速倾注于高渗固体再生培养基平板中 ,置于 32℃ 恒温培养至长出单菌落。

### 1.4 原生质体灭活

**热灭活** :将纯化后的菌株 *Corynebacterium pekinense* 1 原生质体悬液移入无菌试管中 ,分别置于 50℃、60℃、70℃ 水浴锅中 ,保温处理 1 min、2 min、3 min、4 min、5 min、6 min 进行热灭活 ,经再生培养检查灭活效果 ;

**紫外线灭活** :将纯化后的菌株 *Corynebacterium pekinense* 1 的原生质体悬液移入直径为 6 cm 的无菌平皿中 ,置于已预热稳定的 30 W 紫外灯下 ,垂直距离为 30 cm ,分别照射 60 s、70 s、80 s、90 s、100 s、110 s、120 s 进行紫外线灭活 ,经再生培养检查灭活效果。

原生质体灭活率计算公式为  $a = [1 - (b - c) / (d - e)] \times 100\%$

注 :公式中 a 表示原生质体灭活率 ;b 表示灭活后再生培养基上的菌落数 ;c 表示灭活后 PDA 培养基上的菌落数 ;d 表示灭活前再生培养基上的菌落数 ;e 表示灭活前 PDA 培养基上的菌落数。

### 1.5 基因组重排

对亲株 DU1-21、DU1-62、DU1-114 原生质体进行热灭活 ,DU2-39、DU2-66 进行紫外线灭活 ;之后 ,将灭活的原生质体用 35% PEG6000 (含有 0.02 mol/L CaCl<sub>2</sub>) 在 36℃ 条件下随机地融合 30 min ,经双层平板培养基再生 ,32℃ 恒温培养 3 ~ 5 d ,收集全部再生菌落即为 F1 代融合菌群 ;之后 ,将收集到的这些再生菌落混合制备原生质体 ,并按同样方法将其灭活后融合、再生 ,所得再生菌株即为第二轮融合菌群 ,即 F2 代。如此反复进行 4 轮循环原生质体融合、再生 ,不同融合子代标记为 F1、F2、F3、F4 ,将再生的菌株经初筛后进行摇瓶发酵培养 ,提取代谢产物 ,采用酸性茚三酮法测定赖氨酸产量 ,获得高产赖氨酸的

基因组重排菌株。

### 1.6 非基因组重排对照试验

将出发菌群的原生质体不进行融合,而直接采用双层平板培养法再生,收集再生菌株进行下一轮的原生质体制备和再生,如此反复重复进行  $n$  轮后得到亲株子代  $P_n$ 。将  $P_n$  发酵培养,与融合子代  $F_n$  进行比较。

### 1.7 高产重组子的筛选

初筛:将从重排后的子代中挑选出生长旺盛的菌落接种至斜面培养基上继代培养 3 代后,点接到基本固体培养基平板、完全固体培养基平板上,挑选在基本固体培养基平板上不生长,而在完全固体培养基平板上生长的单菌落,将其再点接到含有  $40 \mu\text{g}/\text{mL}$  高丝氨酸的基本固体培养基平板、含有  $4 \mu\text{g}/\text{mL}$  生物素的完全固体培养基平板、含有 AEC ( $10 \text{ mg}/\text{mL}$ 、 $12 \text{ mg}/\text{mL}$ ) 的完全固体培养基平板上,  $32^\circ\text{C}$  恒温培养  $48 \sim 72 \text{ h}$ ,挑取生长速度快、菌落直径大的单菌落,作为初筛得到的菌株,用来筛选赖氨酸高产菌株。

复筛:将初筛中得到的菌株转接到牛肉膏蛋白胨斜面活化培养基充分活化后,然后转入种子培养基( $250 \text{ mL}$  三角瓶装种子培养基  $20 \text{ mL}$ ),  $32^\circ\text{C}$ 、 $96 \text{ r}/\text{min}$  震荡培养  $16 \text{ h}$ 。以  $1\%$  ( $v/v$ ) 接种量将种子培养液转接于发酵培养基( $500 \text{ mL}$  三角瓶装发酵培养基  $30 \text{ mL}$ )中,  $32^\circ\text{C}$ 、 $96 \text{ r}/\text{min}$  发酵培养  $72 \text{ h}$ 。设 3 个平行样。

### 1.8 赖氨酸含量测定

采用酸性茚三酮法测定赖氨酸产量<sup>[12]</sup>。

### 1.9 重组菌株遗传稳定性的测定

对获得的高产重组菌株连续培养 10 代,并进行发酵筛选,选择遗传稳定性较好,赖氨酸产量稳定的重组菌株作为高产重组菌株予以保留。

## 2 结果和分析

### 2.1 原生质体的制备和再生

原生质体的制备和再生是进行原生质体诱变、

表 2 紫外线灭活时间对 *Corynebacterium pekinense* 1 原生质体致死率的影响

Table 2 Effects of UV inactivation time on the lethal rate of *Corynebacterium pekinense* 1 protoplasts

Time/s	60	70	80	90	100	110	120
Lethal rate/%	$21.0 \pm 1.07$	$61.4 \pm 1.13$	$76.2 \pm 1.69$	$89.8 \pm 2.47$	$96.9 \pm 2.84$	100	100

### 2.2 基因组重排选育高产赖氨酸菌株

2.2.1 出发菌群的获得:基因组重排需要在一个具有不同正突变的特定的遗传多样性群体中实现随机基因重组。为获得具有正突变的出发菌群库,本试验采用 UV、DES、UV + DES 复合诱变的方法对原始

融合和基因组重排等相关遗传育种方法的先决条件。因此,本文作者在试验研究过程中对影响赖氨酸产生菌 *Corynebacterium pekinense* 原生质体制备和再生的因素进行了重点深入研究,并获得了赖氨酸产生菌原生质体制备和再生的最佳条件(详细结果将另文报道),即用终浓度  $0.8 \mu\text{g}/\text{mL}$  青霉素和  $1\%$  丝氨酸处理培养至对数生长末期的菌体  $3 \text{ h}$  后,将菌体分散于  $\text{pH } 7.0$ 、 $2.0 \text{ mg}/\text{mL}$  溶菌酶中,  $38^\circ\text{C}$  恒温水浴下酶解  $4 \text{ h}$ ,原生质体的制备率及再生率最高,分别为  $(99.8 \pm 0.21)\%$  和  $(23.7 \pm 0.53)\%$ 。

### 2.2 原生质体灭活

2.2.1 热灭活原生质体:从表 1 可见,当菌株 *Corynebacterium pekinense* 1 原生质体在  $70^\circ\text{C}$  恒温水浴中处理  $3 \text{ min}$  时,原生质体致死率达到  $100\%$ 。但有报道认为,大多数细菌加热到  $60^\circ\text{C}$  时即可被杀死,当温度超过  $65^\circ\text{C}$  时,原生质体容易粘结成团,不利于原生质体的融合<sup>[13]</sup>。因此,本试验确定  $60^\circ\text{C}$ 、处理  $4 \text{ min}$  作为赖氨酸产生菌原生质体热灭活的条件。

表 1 热灭活时间和温度对 *Corynebacterium pekinense* 1 原生质体致死率的影响

Table 1 Effects of heat inactivation time and temperature on the lethal rate of *Corynebacterium pekinense* 1 protoplasts (%)

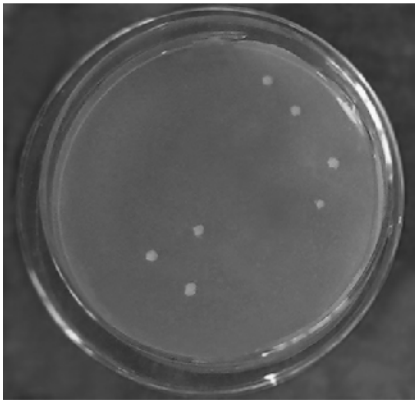
Time/min	Temperature		
	$50^\circ\text{C}$	$60^\circ\text{C}$	$70^\circ\text{C}$
1	$29.5 \pm 1.04$	$34.7 \pm 1.17$	$92.5 \pm 2.31$
2	$43.3 \pm 1.16$	$76.5 \pm 2.84$	$96.1 \pm 2.66$
3	$56.5 \pm 1.18$	$87.0 \pm 2.28$	100
4	$62.1 \pm 1.21$	100	100
5	$70.2 \pm 1.73$	100	100
6	$89.9 \pm 2.30$	100	100

2.2.2 紫外线灭活原生质体:从表 2 可以看出,当紫外线照射时间为  $110 \text{ s}$  时,赖氨酸产生菌原生质体致死率为  $100\%$ 。因此,选用紫外线照射  $110 \text{ s}$  作为赖氨酸产生菌原生质体紫外灭活的处理时间。

菌株进行诱变。通过诱变共获得了 5 株对 AEC 有抗性,且赖氨酸产量较原始菌株 *Corynebacterium pekinense* 1 有所提高的菌株,分别为 DU1-21、DU1-62、DU1-114、DU2-39、DU2-66。由于本试验不测定重组的频率,而是收集融合再生后的子代,所以不需要

稀释,经双层平板培养,使再生子代长成稠密的菌层即可,将再生菌落全部收集作为下一轮融合的亲本,进行原生质体制备、灭活、融合后培养到再生平板上,如此反复4轮后,挑取生长旺盛的子代接种PDA斜面培养基上培养,用来筛选高产赖氨酸的重组子。

**2.3.2 高产重组子的筛选:**从第三轮和第四轮再生获得的重组子代中,选择生长旺盛的菌落接种牛肉膏蛋白胨斜面培养基上继代培养3代后,适当稀释后涂布于含有AEC(10 mg/mL、12 mg/mL)的完全固体培养基选择平板及含有40  $\mu$ g/mL高丝氨酸的基本固体培养基选择平板、4  $\mu$ g/mL生物素的基本固体培养基选择平板上,32 $^{\circ}$ C恒温培养48~72 h。在选择平板上共长出了287个生长速度快、菌落直径大的单菌落(图1),作为初筛得到的抗性菌株。试验筛选了F3代的50个菌株和F4代的83个菌株;之后,将初筛得到的菌株进行摇瓶发酵培养72 h后,提取、纯化代谢产物,采用酸性茚三酮法测定赖氨酸产量。结果发现上述133株菌株中只有菌株F3-15、F3-34、F4-29、F4-36、F4-121赖氨酸产量较出发菌株有所提高,赖氨酸产量分别为15.38 g/dL、14.67 g/dL、16.04 g/dL、16.95 g/dL、15.63 g/dL,其中菌株F4-36的赖氨酸产量比 *Corynebacterium pекinense* 1 提高了37.14%,比亲本菌株提高了17.46%~31.19%。



初筛得到的赖氨酸产生菌的菌落形态

Fig. 1 Colony morphology of lysine-producing strains obtained by primary screening.

目前,在国内还尚未见有高于此菌株F4-36赖氨酸产量的报道,该菌株赖氨酸产量处于国内先进水平。

**2.3.3 对照组实验:**由于原生质体的制备和再生也具有一定的诱变性,可能会诱发子代表型的改变。为了证明菌株目的性状的改进是由基因组重排引起的,而不是反复的原生质体再生和制备引发的突变所致,本试验设计了对照组用以估计原生质体制备和再生中引起的突变对赖氨酸产量的影响。试验结果表明,子代群体P<sub>4</sub>在10 mg/mL AEC平板上长出了菌落,在12 mg/mL AEC平板上未长出菌落;而F<sub>4</sub>群体在12 mg/mL AEC平板上长出了少量菌落,F<sub>4</sub>群体较出发菌株和P<sub>4</sub>群体显著提高了对AEC的抗性。这一试验结果说明,F4代的表型显著改进与基因组重排有关,反复的原生质体制备与再生的影响很小,通过基因组重排有效的产生了群体间特定表型的重组体。

#### 2.4 重排菌株遗传稳定性的测定

将筛选出的5株高产赖氨酸菌株连续传代10次后,进行摇瓶发酵培养试验。通过酸性茚三酮法测定赖氨酸产量分析表明,传代后的菌株发酵合成赖氨酸的产量没有下降,表明(表3)试验筛选到的重排菌株的高产性状遗传特性较稳定。

### 3 讨论

传统诱变育种方法往往只能是一至几个基因的作用(也可能是邻近基因的突变效应),很难大幅度提高赖氨酸的产量;而Genome shuffling则是几个亲本菌株在全基因组的不同位置上同时发生重组,非常容易发生多交换和多基因重组,最终使引起正向突变的不同基因重组到同一个细胞株中,因此相对容易实现大幅度提高菌株合成的产量<sup>[14]</sup>。因此,Genome shuffling技术能够比传统诱变选育更快速的改良菌株,加快了人们模仿并加速大自然的进化方式的步伐<sup>[15-17]</sup>。另外,传统的诱变育种方法存在诱变效率低、筛选工作量大、周期长、重复诱变过程造

表3 高产赖氨酸菌株不同代数菌株产酸情况

Table 3 Lysine production of high lysine-producing strains from different generations

Strain	Lysine production(g/dL)										Mean $\pm$ SD
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
F3-15	15.21	15.14	15.43	15.76	15.45	15.32	15.74	15.27	15.36	15.46	15.41 $\pm$ 0.21
F3-34	14.73	14.82	14.66	14.47	14.36	14.72	14.39	14.53	14.78	14.69	14.62 $\pm$ 0.17
F4-29	16.21	15.83	16.57	16.44	15.75	16.38	16.27	15.72	16.13	16.06	16.14 $\pm$ 0.30
F4-36	16.89	17.46	17.03	16.94	17.26	17.11	16.75	17.16	16.82	16.94	17.04 $\pm$ 0.22
F4-121	15.62	15.07	16.14	15.67	15.76	15.49	15.71	15.84	15.53	15.65	15.65 $\pm$ 0.27

成一些无关的或负向突变的积累等缺点,从而导致菌株对诱变条件不敏感,很难再继续应用常规诱变育种提高产量,甚至出现生长速度减慢、对底物同化利用能力下降、对环境耐受能力下降等方面的退化。

由于 Genome shuffling 技术需要一个特定遗传的正向突变体库进行重排,在前人的研究中多采用单一诱变条件获得基因组重排的出发菌群<sup>[18]</sup>,本试验中所选择的出发菌群虽是源于共同的野生型菌株,结合多种诱变方法则易于获得遗传差异较大的群体,因此,该出发菌群虽具有相似的遗传背景,但差异较大的正向突变群体,远较前人的研究方法有所改进。

在理论上讲,某种灭活方式往往易于在染色体的相同部位发生损伤,如果几个亲本的原生质体用同种灭活方式灭活后,其融合子则难于再生。而本试验对各种亲本原生质体首次尝试了采用多种不同的灭活方法灭活后再融合,其菌株间染色体不同部位的致死损伤可以得到互补,筛选出具有生理活性的融合子,而且多亲本的原生质体灭活也避免了对亲株进行遗传标记等繁琐过程,节省了人力、物力,缩短了育种进程,并提高了重组子的筛选效率。

到目前为止,国内外尚未见有关应用 Genome shuffling 技术选育高产赖氨酸菌株的报道。本研究首次尝试采用 Genome shuffling 技术改良赖氨酸产生菌,成功选育出了 5 株产量较稳定的高产赖氨酸菌株。另外,本试验还成功的证明了 Genome shuffling 技术在菌种选育中的有效性及高效性,同时为进一步应用该技术选育高产赖氨酸菌株和研究赖氨酸产生菌的基因调控奠定了一定的理论基础。

## 参考文献

- [ 1 ] Stemmer WPC. Molecular breeding of genes ,pathway and genomes by DNA shuffling. *Journa of Molecular Catalysis B :Enzymatic* 2002 ,19 - 20 3 - 12.
- [ 2 ] Powell KA ,Ramer SW ,del Cardayre SB ,et al. Directed evolution and biocatalysis. *Angewandte Chemie International Edition* 2001 40 3948 - 3959.
- [ 3 ] Zhang YX ,Perry K ,Vinci VA ,et al. Genome shuffling leads to rapid phenotypic improvement in bacteria. *Nature* 2002 , 415 644 - 646.
- [ 4 ] Patnaik R ,Louie S ,Gavrilocic V ,et al. Genome shuffling of *Lactobacillus* for improved acid tolerance. *Nature Biotechnology* 2002 20( 7 ) :707 - 712.
- [ 5 ] Wang YH ,Li Y ,Pei XL ,et al. Genome-shuffling improved acid tolerance and L-lactic acid volumetric productivity in *Lactobacillus rhamnosus* . *Journal of Biotechnology* ,2007 , 129( 3 ) 510 - 515.
- [ 6 ] Zhao K ,Ping WX ,Zhang LN ,et al. Screening and breeding of high taxol producing fungi by genome shuffling. *Science in China Series C :Life Sciences* 2008 51( 3 ) :1 - 9.
- [ 7 ] 齐秀兰 ,万秀玉 ,张秋霞 ,等. L-赖氨酸高产菌株筛选. *沈阳药学院学报( Journal of Shenyang College of Pharmacy )* ,1994 ,11( 3 ) :195 - 200.
- [ 8 ] 李秀锦 ,仲飞 ,刘绍军 ,等. ZL-9601 赖氨酸生产菌某些特性及发酵试验的研究. *农业生物技术学报( Journal of Agricultural Biotechnology )* ,1998 ,6( 3 ) :300 - 305.
- [ 9 ] 富英华 ,沈永喜 ,苏令鸣. L-赖氨酸产生菌 FH128 菌株的研究. *上海化工( Shanghai Chemical Industry )* ,2000 , 2 :16 - 19.
- [ 10 ] 张卫国 ,顾正华. L-赖氨酸高产菌选育的研究. *食品与发酵工业( Food and Fermentation Industries )* ,2001 ,27 ( 8 ) :17 - 20.
- [ 11 ] 沈萍 ,范秀容 ,李广武. *微生物学实验*. 第三版. 北京 :高等教育出版社 ,1999.
- [ 12 ] 王福荣 ,庞玉珍 ,董国庆. 酸性茆三酮法测定赖氨酸的条件试验. *中国酿造( China Brewing )* ,2004 ,14( 5 ) : 75 - 79.
- [ 13 ] 周东坡 ,平文祥. *微生物原生质体融合*. 哈尔滨 :黑龙江科学技术出版社 ,1991.
- [ 14 ] Petri R ,Claudia SD. Dealing with complexity :evolutionary engineering and genome shuffling. *Current Opinion in Biotechnology* 2004 ,15 298 - 304.
- [ 15 ] Stephanopoulos G. Metabolic engineering by genome shuffling. *Nature Biotechnology* 2002 20( 7 ) :666 - 668.
- [ 16 ] 朱惠 ,金志华 ,岑沛霖. 纳他霉素产生菌基因组重排育种. *中国抗生素杂志( J China Antibiotics )* ,2006 ,31 ( 12 ) :739 - 742.
- [ 17 ] 王玉华 ,李岩 ,裴晓林 ,等. 基因组改组提高干酪乳杆菌耐酸性生产 L-乳酸. *中国生物工程杂志( China Biotechnology )* 2006 26( 2 ) 53 - 58.
- [ 18 ] 李立凤 ,潘力 ,彭昶 ,等. 基因组改组 :几株同源酱油曲霉的多亲株电融合育种. *中国调味品( China Condiment )* 2006 7 :14 - 18.

## Screening and breeding of high lysine-producing strains by genome shuffling

Kai Zhao<sup>1</sup>, Wei Duan<sup>1</sup>, Lixin Sun<sup>2</sup>, Dongpo Zhou<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup> Laboratory of Microbiology, College of Life Science, Heilongjiang University, Harbin 150080, China)

(<sup>2</sup> Hospital of Heilongjiang University, Harbin 150080, China)

**Abstract [ Objective ]** To screen and breed high lysine-producing strains by genome shuffling. **[ Methods ]** *Corynebacterium peginense* 1 was used as the starting strain in this study. High lysine-producing strains were screened by genome shuffling. **[ Results ]** Five hereditarily stable strains with high lysine production were obtained by four cycles of genome shuffling. A high lysine producing strain, F4-36, was obtained, which produced 16.95 g/dL lysine, 37.1% higher than that of the starting strain. **[ Conclusion ]** Genome shuffling can be an efficient tool to screen and breed high lysine production strains.

**Keywords:** lysine; lysine-producing strain; genome shuffling

(本文责编:王晋芳)

Supported by the Fifteen Important Items of Heilongjiang (GA02C101) and the Outstanding Young Scientist Foundation of Heilongjiang University

\* Corresponding author. Tel/Fax: +86-451-86609016; E-mail: zhoudp2003@yahoo.com.cn

Received: 15 January 2009/ Revised: 4 April 2009

### 1953年创刊以来所有文章全文上网

2008年1月中旬,《微生物学报》自1953年创刊以来的文章全文上网啦!欢迎广大读者登陆本刊主页(<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>)浏览、查询、免费下载全文!

建立全文数据库的工作是从2007年初开始的,经过多方人员的共同努力,历经半年多时间成功完成。由于《微生物学报》历史久远,其间经历了期刊的变化,变化情况统计如下,以供读者查阅参考。

#### 《微生物学报》刊、期统计表

2009年8月统计

时间	刊期	卷号	期号
1953 ~ 1956	半年刊	1 ~ 4	1 ~ 2
1957 ~ 1958	季刊	5 ~ 6	1 ~ 4
1959	季刊	7	1 ~ 2
1959 ~ 1962	停刊3年		
1962	季刊	8	3 ~ 4
1963 ~ 1965	季刊	9 ~ 11	1 ~ 4
1966	季刊	12	1 ~ 2
1966 ~ 1972	停刊6年半		
1973 ~ 1988	季刊	13 ~ 28	1 ~ 4
1989 ~ 2007	双月刊	29 ~ 47	1 ~ 6
2008	月刊	48	1 ~ 12
2009	月刊	49	1 ~ 8