

用原生质体融合技术选育谷氨酸高产菌

张克旭 陈 宁 张永志 刘永生 常佳春

(天津轻工业学院, 天津)

利用原生质体融合技术,在不对亲株做任何诱变的前提下,成功地使天津短杆菌 TG-866 与钝齿棒杆菌 B9 的原生质体进行融合,获得兼有两亲株遗传性状——细胞个体大、产酸高的融合子 F263 及 F288。

确定了两亲株原生质体制备、再生及融合的最佳条件。在该条件下,其原生质体形成率均在 99.9% 以上,再生率分别为 23% 及 28%,原生质体融合率为 3.2×10^{-5} 。在最佳摇瓶发酵条件下, F263 及 F288 的谷氨酸产率分别为 8.4g/dl 及 8.03g/dl。通过连续 10 次摇瓶传代,发现该融合子较稳定,因而具有较高的应用价值。

关键词 原生质体融合;谷氨酸

钝齿棒杆菌 B9 和天津短杆菌 T613 是我国氨基酸发酵工业上的重要菌株。B⁹ 菌细胞个体大,发酵后谷氨酸易提取,收率高,结晶颗粒大,有光泽,但 B⁹ 菌产酸与转化率较 T613 菌偏低,我们以 B⁹ 菌和产酸高(8.0g/dl 以上)的 TG-866 为亲株,通过原生质体融合技术,成功地选育出细胞个体大(与 B⁹ 菌相同)、产酸高(8.44g/dl)的融合子 F263 与 F288。由于提取收率比 T613 菌提高 2—3%,所以经济效益十分明显。

材料与方 法

(一) 材料

1. 菌株:天津短杆菌(*Brevibacterium tianjinense*)TG-866 (本室保存菌种),遗传标记 S_m^r (链霉素抗性);钝齿棒杆菌 (*Corynebacterium crenatum*) B⁹ (由北京酱油厂提供),遗传标记 L_s^r (洁霉素抗性)。

2. 主要试剂:蛋清溶菌酶(中国科学院生物物理研究所生化试剂厂产品);青霉素 G 钾盐(华北制药厂产品);聚乙二醇 6000(上海试剂一厂产品);硫酸链霉素(烟

台人民制药厂产品);盐酸洁霉素(广州天心制药厂产品);DNase (SIGMA 化学公司产品);丁二酸钠(天津市化学试剂一厂产品);谷氨酸脱羧酶(天津味精厂提供)。

3. 培养基:

(1) 液体培养基(%):葡萄糖 0.1,牛肉膏 1,蛋白胨 1,酵母膏 0.5, NaCl 0.5, pH7.0—7.2。

(2) 固体培养基:在液体培养基中加入 2% 的琼脂。

(3) 再生培养基(L):在固体培养基中加入丁二酸钠 135g, MgCl₂ 2g, EDTA 1.9g, DNase 5mg (灭菌后加入)。

(4) 选择培养基:在再生培养基中加入链霉素 75u/ml 和洁霉素 120u/ml (灭菌后加入)。

(5) 初筛产酸试验培养基(%):葡萄糖 6, K₂HPO₄ 0.16, MgSO₄·7H₂O 0.06, 玉米浆 0.6, 麸皮水 3, 尿素 1.2 (单独灭菌), Fe²⁺、Mn²⁺ 2ppm, pH6.7—7.0。

(6) 种子培养基(%):葡萄糖 3,

本文于 1989 年 5 月 21 日收到。

K_2HPO_4 0.16, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.06, 玉米浆 3.0, 尿素 0.5, pH7.0—7.2。

(7) 摇瓶发酵培养基(%): 葡萄糖 16, K_2HPO_4 0.16, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.06, Fe^{2+} 、 Mn^{2+} 2ppm, 尿素 0.8, 玉米浆 0.8, pH7.0。

4. 有关溶液:

(1) 高渗液(L): 丁二酸钠 135g, $MgCl_2$ 2g, EDTA 1.9g, DNase 5mg (灭菌后加入), pH7.0。

(2) 新生磷酸钙溶液: K_2HPO_4 0.54g, $CaCl_2 \cdot H_2O$ 29.4g, 分别溶于 100ml 水中分别灭菌, 用时等体积混合。

(3) PEG 溶液: 在高渗液中加入 40% 的 PEG 6000, pH7.0。

(4) 蛋清溶菌酶溶液: 1g 蛋清溶菌酶加到 100ml 灭菌的高渗液中, G2 漏斗过滤, 4℃ 保藏。

(5) 谷氨酸脱羧酶溶液: 100g 谷氨酸脱羧酶加到 90ml 水和 10ml 乙酸-乙酸钠缓冲液中。

(6) 乙酸-乙酸钠缓冲液: 11.8ml 冰乙酸, 27.2g 乙酸钠分别溶于 100ml 水中, 灭菌, 用时等体积混合。

(7) 青霉素 G 钾盐溶液: 将青霉素 G 钾盐 (40 万单位) 配成 40u/ml 溶液, G2 漏斗过滤, 4℃ 保藏。

(二) 方法

1. 抗性标记的筛选: 通过梯度培养皿方法, 发现 TG-866 为链霉素抗性, B9 为洁霉素抗性 (上述两亲株在本研究中均未经任何诱变处理)。

2. 菌体形态及大小的测定: 通过扫描电子显微镜观察菌体形态并测定其大小。

3. 菌体培养: 取新鲜菌斜面 1 环于 30ml 液体培养基中, 于 32℃ 振荡培养 (96r/min) 24 小时。取 0.5ml 该菌液于 30ml 液体培养基中, 同上振荡培养 2.5 小

时, 加入青霉素 (TG-866 为 0.4u/ml, B9 为 0.9u/ml), 继续培养 2 小时。

4. 原生质体的制备: 取上述菌体培养液各 5ml, 4000r/min 离心 10 分钟, 弃去上清, 用高渗液洗 2 次, 悬于高渗液中。加入蛋清溶菌酶 (TG-866 为 1mg/ml, B9 为 0.8mg/ml), 于 34—36℃ 保温 15—17 小时。然后, 4000r/min 离心 10 分钟, 弃去上清, 用高渗液洗 2 次, 悬于高渗液中备用。

5. 原生质体再生及再生率计算: 将获得的原生质体经如下两个步骤加以处理:

(1) 用无菌水适当稀释, 涂布于完全培养基平板上, 32℃ 培养 24 小时后, 计数菌落, 为未形成原生质体的菌落 (此数为 B)。

(2) 用高渗液适当稀释, 用夹层法培养于高渗培养基平板上, 32℃ 培养 48 小时后, 计数菌落, 为形成的原生质体与未形成原生质体的菌数之和 (此数为 C)。

设 A 为溶菌酶处理前的菌数

$$\text{形成率} = \frac{A - B}{A} \times 100\%$$

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

6. 原生质体的融合: 将亲株原生质体各 2.5ml 混合, 4000r/min 离心 10 分钟, 弃去上清, 加入 4.8ml 的 35% PEG 溶液, 并加入 0.2ml 的新生磷酸钙溶液, 混合均匀, 36℃ 保温 30 分钟, 离心, 用高渗液洗涤、稀释, 取 0.1ml 用夹层法培养于高渗选择培养基平板上, 32℃ 培养 3 天。

7. 融合子的检出: 用牙签法将高渗选择培养基上长出的菌落移接在选择培养基上, 计数后, 32℃ 培养。利用显微测微尺挑出细胞个体大 (与 B9 菌相当) 的融合子, 保存。

8. 谷氨酸发酵 (初筛): 取 1 环经活化的融合子于 20ml 初筛发酵培养基中, 于

32℃ 振荡培养 (96r/min) 48 小时, 发酵終了测其产酸情况。

9. 谷氨酸发酵(复筛): 取 1 环经活化的融合子于 30ml 种子培养基中, 于 32℃ 振荡培养 (96r/min) 10 小时, 然后, 以 2.5% 的接种量接于摇瓶发酵培养基中, 在变速调温下, 视 pH 变化而及时流加尿素, 发酵 40 小时, 测其产酸情况。

10. 谷氨酸发酵的检测: 谷氨酸测定, 用华勃氏微量呼吸检压法; 还原糖测定, 用

斐林氏法; OD 值测定, 用 751 G 型分光光度计测定其 OD_{660} ; pH 测定, 用精密 pH 试纸 (pH6.4—8.0)。

结果与讨论

(一) 亲株原生质体的形成与再生

1. 青霉素浓度的确定: 由图 1 可以看出, 当青霉素浓度为 0.4u/ml 时, 不但对 TG-866 菌体生长没有抑制作用, 而且还能提高该菌对溶菌酶的敏感性, 因此选择

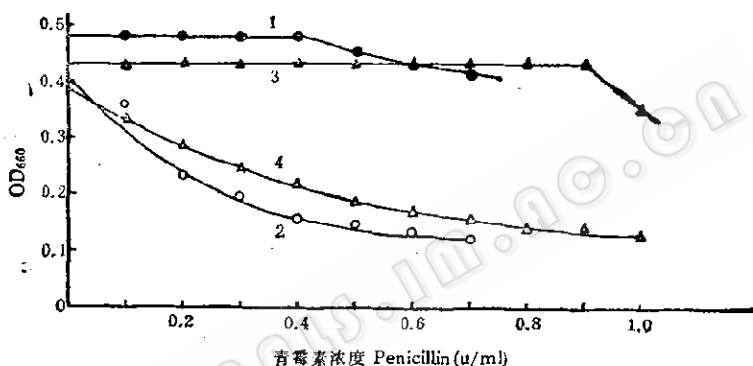


图 1 青霉素浓度与溶菌酶的敏感性

Fig. 1 Penicillin concentration and lysozyme sensitivity

1. TG-866 酶解前 OD_{660} OD_{660} of TG-866 Strain before enzyme dissolving;
2. TG-866 酶解后 OD_{660} OD_{660} of TG-866 strain after enzyme dissolving;
3. B9 酶解前 OD_{660} OD_{660} of B9 strain before enzyme dissolving;
4. B9 酶解后 OD_{660} OD_{660} of B9 strain after enzyme dissolving

青霉素预处理的最佳浓度为 0.4u/ml。基于同样道理, 选择 B9 菌青霉素预处理的最佳浓度为 0.9u/ml。

2. 酶浓度的确定: 由图 2 可以看出, 当酶浓度为 1mg/ml 时, TG-866 的原生质体形成率即达 99.9%, 此时的再生率为 23.1%。因此, 选定 1mg/ml 溶菌酶为 TG-866 的最佳酶浓度。B9 菌破壁的最佳酶浓度为 0.8mg/ml。

3. 酶解温度的确定: 酶解温度与亲株原生质体形成率和再生率的关系如表 1。

TG-866 的最佳酶解温度为 34℃, B9

的最佳酶解温度为 36℃。

4. 酶解时间的确定: 由图 3 可以看出, TG-866 菌的最佳酶解时间为 17 小时, B9 菌的最佳酶解时间为 15 小时。

(二) 原生质体的融合

影响原生质体融合的各个因素见表 2。

由表 2 可知, TG-866 与 B9 菌原生质体融合的最佳条件为: 35% 的 PEG, Ca^{2+} 浓度为 50mmol/L, 在 36℃ 融合 30 分钟, 融合时的 pH 为 10.5。在该条件下, 原生质体融合率为 3.2×10^{-5} 。图 4 表示在扫描

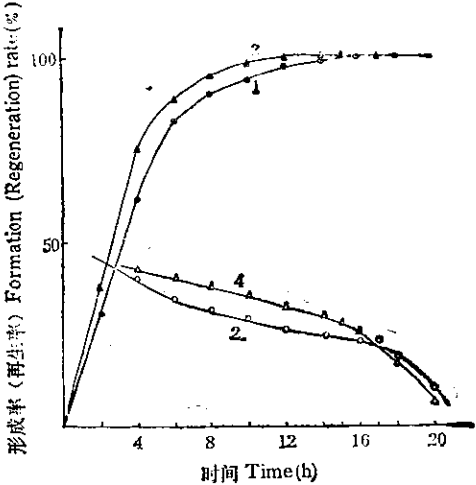
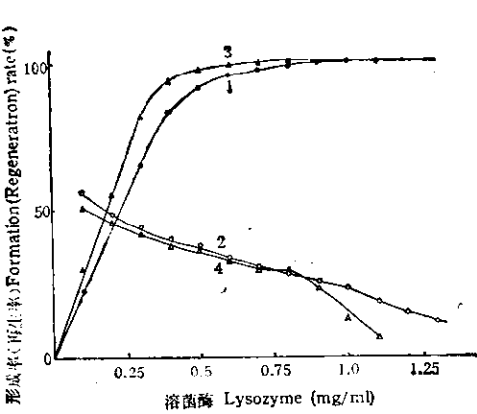


图2 酶浓度与形成率和再生率的关系
Fig. 2 Relations between enzyme concentration, formation rate and regeneration rate
1. TG-866 菌原生质体形成率
Protoplast formation rate of TG-866 strain;
2. TG-866 菌原生质体再生率
Protoplast regeneration rates of TG-866 strain;
3. B9 菌原生质体形成率
Protoplast formation rates of B9 strain;
4. B9 菌原生质体再生率
Protoplast regeneration rates of B9 strain

图3 酶解时间与形成率和再生率的关系
Fig. 3 Reakations between enzyme dissolving time, formation and regeneration
1. TG-866 菌原生质体形成率
Protoplast formation rates of TG-866 strain;
2. TG-866 菌原生质体再生率
Protoplast regeneration rates of TG-866 strain;
3. B9 菌原生质体形成率
Protoplast formation rates of B9 strain;
4. B9 菌原生质体再生率
Protoplast regeneration rates of B9 strain

电子显微镜下原生质体融合的情况。

（三）融合子的检出和稳定性

将经 PEG 处理的原生质体悬液直接用夹层法培养于高渗选择培养基中，32℃培养至长出菌落。在选择培养基上不断传代，从中选出稳定的融合子。经连续 10 次传代，在选择培养基上生长的融合子可以

认为是较稳定的。

在相差显微镜下对较稳定的融合子逐个测量，选出细胞个体大的(与 B9 相同)融合子，保存。经该步骤，共选出 310 株细胞个体大的融合子。

表 1 酶解温度与形成率和再生率的关系
Table 1 Relation among enzyme dissolving temperature, formation and regeneration

		32℃	34℃	36℃	37℃	38℃	40℃	42℃	44℃
TG-866	形成率(%) Formation	93.7	99.9	99.9	99.9	99.9	99.9	99.9	99.9
	再生率(%) Regeneration	36.5	23.9	14.7	9.1	8.0	4.9	4.5	1.5
B9	形成率(%) Formation	93.5	97.6	99.9	99.9	99.9	99.9	99.9	99.9
	再生率(%) Regeneration	36.8	31.0	27.9	24.2	19.6	9.8	5.6	1.0

表 2 不同因素对融合率的影响
Table 2 The effects of factors on fusion rates

PEG 浓度(%) PEG concentration	10	20	30	35	40	50
融合率 Fusion rate	7.1×10^{-7}	2.5×10^{-6}	1.3×10^{-5}	3.2×10^{-5}	0.5×10^{-5}	5.1×10^{-7}
时间(分钟) Time (min)	10	20	25	30	35	40
融合率 Fusion rate	3×10^{-6}	8.6×10^{-6}	2.0×10^{-5}	3.2×10^{-5}	1.4×10^{-5}	6.5×10^{-6}
Ca ²⁺ (mmol/L)	5	10	50	75	100	200
融合率 Fusion rate	$<10^{-8}$	1.8×10^{-7}	3.2×10^{-5}	9.6×10^{-6}	3.1×10^{-6}	3.7×10^{-7}
温度(℃) Temperature	32	34	36	37	38	40
融合率 Fusion rate	8×10^{-6}	1.5×10^{-5}	3.1×10^{-5}	1.9×10^{-5}	5.2×10^{-6}	6.5×10^{-7}
pH	6.5	7.0	8.0	9.0	10.5	12.0
融合率 Fusion rate	$<10^{-8}$	1.3×10^{-7}	5.1×10^{-7}	2.7×10^{-6}	3.2×10^{-5}	$<10^{-8}$



图 4 TG-866 和 B9 的原生质体融合
Fig. 4 Protoplast fusion between TG-866 and B9 strains

亲株及融合子的细胞形态如图 5。

由图 5 可以看出,选出的融合子为微弱的杆菌,两端钝圆,无分枝。其大小为

$0.75 \times 2.0 \mu\text{m}$, 比 TG-866 大($0.6-0.7 \times 1.2-1.5 \mu\text{m}$), 而与 B9 相当 ($0.6-0.76 \times 1.67-2.0 \mu\text{m}$)。但其与 B9 菌亦不同, B9 菌为一端膨大的棒状, 而它的两端是相同的。因此融合子的细胞形态既不同于 TG-866, 又不同于 B9, 但其最大的特点就是细胞个体大。

(四) 初筛

对获得的 310 株融合子进行了初筛, 列出几个有代表性的结果如表 3。

融合子 F263 及 F288 初筛产酸较高, 分别为 2.75g/dl 及 2.63g/dl, 因此对其进行了复筛。

(五) 复筛及摇瓶小试条件

1. 一级种子种龄的确定: 测定了培养时间与 OD_{650} 、pH 的关系, 10 小时为 F263 一级种子的最适种龄, F288 的一级种子最适种龄亦为 10 小时。

2. 初糖浓度的确定: 在初糖浓度为

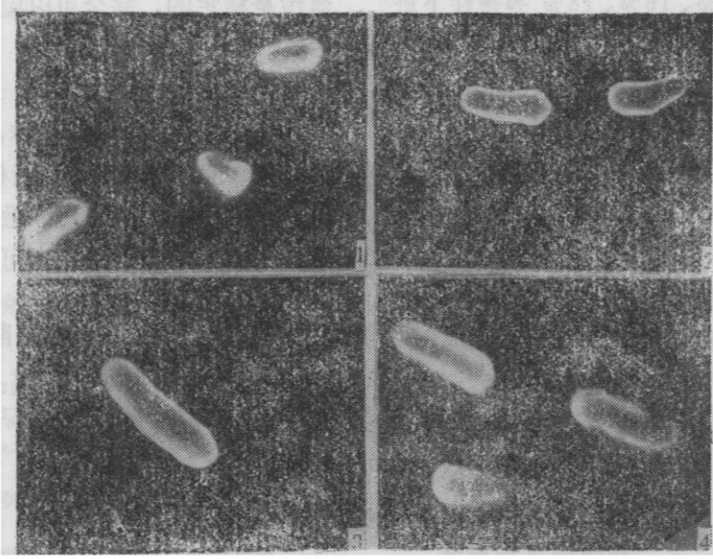


图5 亲株及融合子细胞形态

Fig. 5 Cell morphology of parents and fusion hybrids

1. TG-866 菌($\times 8000$) TG-866 strain ($\times 8000$);
2. E9 菌($\times 8000$) B9 strain ($\times 8000$);
3. 融合子 F263 ($\times 12000$) F263 fusion hybrid ($\times 12000$);
4. 融合子 F288 ($\times 10000$) F288 fusion hybrid ($\times 10000$)

表3 融合子初筛结果

Table 3 Initial selection results of fusion hybrid

菌 号 Strain No.	Glu 产率 (g/dl) Glu (g/dl)	菌 号 Strain No.	Glu 产率 (g/dl) Glu (g/dl)	菌 号 Strain No.	Glu 产率 (g/dl) Glu yield
F5	0	TG-866	2.53	B9	1.59
F38	0	F80	2.0	F160	0.16
F268	0.12	F263	2.75	F220	0
F309	0.46	F288	2.63	F300	0.06

表4 目的融合子的稳定性

Table 4 Stability of objective fusion hybrid

代 数 Generations	Glu 产率 (g/dl) Glutamate yield		转化率(%) Conversion efficiency	
	F263	F288	F263	F288
第1代 1st generation	8.3	8.03	51.88	50.2
第2代 2nd generation	8.18	8.1	51.1	50.6
第9代 9th generation	8.09	8.0	50.6	50.0
第10代 10th generation	8.41	7.94	52.6	49.6

12%、13%、15%、16%、18% 等条件下进行发酵试验,发现 F263 和 F288 均以 16% 的初糖进行发酵时谷氨酸产率最佳,其谷氨酸产率分别为 8.3g/dl 及 8.03g/dl。

3. 玉米浆对产酸的影响: 在玉米浆为 0.6%、0.7%、0.8%、1.0%、1.2% 等条件下进行发酵试验,发现玉米浆为 0.7% 时 F288 产酸达 8.0g/dl,玉米浆为 0.8% 时 F263 产酸达 8.44g/dl。

4. 温度对产酸的影响: 对 F263 及 F288 的最佳发酵温度进行了测定,发现其在高温下 (34—40℃) 产酸较低温下的高,说明其可以耐高温,应用价值较高。

(六) 目的融合子遗传稳定性测验

对目的融合子 F263 及 F288 连续摇瓶传代 10 次,检测其遗传稳定性,结果见表 4。

由表 4 看出,融合子 F263 及 F288 的

遗传是稳定的,完全可以应用到味精生产中。

通过上述一系列实验,获得了细胞个体大、谷氨酸产率高的菌株,融合子 F263 及 F288 成功地表现了两亲株的优良遗传性状,说明利用原生质体融合技术来选育高产谷氨酸生产菌是完全可行的。

参 考 文 献

- [1] Kaneko, H. and K. Sakaguchi: *Agric. Biol. Chem.*, **45**(5):1009—1013,1979.
- [2] 乔宝义、徐浩: *微生物学报*, **23**(1), 33—43, 1983.
- [3] 唐沢昌彦、戸坂修: *公開特許公報*, 昭 58-152485.
- [4] 唐沢昌彦、戸坂修: *公開特許公報*, 昭 58-224684.
- [5] Karasawa, M. et al.: *Agric. Biol. Chem.*, **50**:339,1986.
- [6] 王岳五、陈宁等: *生物工程学报*, **4**(3), 230—233, 1988.
- [7] 张克旭等: *工业微生物*, **18**(5), 1—6, 1988.

BREEDING OF EASY-EXTRACTED HIGH PRODUCING GLUTAMATE STRAIN USING THE PROTOPLAST FUSION TECHNIQUE

Zhang Kexu Chen Ning Zhang Yongzhi Liu Yongsheng Chang Jiachun

(Tianjin Institute of Light Industry, Tianjin)

Using the protoplasts fusion technique, *Brevibacterium tianjinense* TG-866 and *Corynebacterium crenatum* B9 were successfully fused. Fusion hybrids F288 and F263 were obtained which contained hereditary properties of the parents i.e. big size and high acid productivity.

The best condition for protoplast formation, regeneration and fusion were found. Under these conditions, the rate of obtained protoplast was more than 99.9%, the rate of regeneration was respectively 23% and 28%,

the rate of protoplast's fusion was 3.2×10^{-3} . The best condition of flask-shaking fermentation of F263 and F288 was found. The producing of glutamic acid was respectively 8.4 g/dl and 8.02 g/dl. after 10 generations in the shaking-flask, they keep the original characteristics and have high applied value.

Key words

Protoplast fusion; Glutamic acid