

## 原生质体融合选育赖氨酸高产菌种的研究

周东坡 平文祥 贾树彪 宋秀娟 刘桂荣 洪建中 洪岩 郭德栋

(齐齐哈尔师范学院生物系, 齐齐哈尔)

刘桂清 孙波 张智 郝芳兰 沈瑞萼 魏凤桐 梁金中 王建华

(黑龙江省轻工业研究所, 哈尔滨)

北京棒杆菌 1134 衍生株与枯草芽孢杆菌 151 衍生株的原生质体融合得到了一株可以以甜菜糖蜜为原料, 在摇床与小罐发酵均能稳定产赖氨酸 6.50% 以上的高产菌株——Q4413。Q4413 菌落形态类似于 1134 株, 而菌体形态区别于双亲, 呈较短的杆状, 无鞭毛, 但有较稀疏的纤毛。生理生化研究表明: Q4413 耐盐性、蔗糖发酵、石蕊牛奶试验产碱状况酷似于 151 株, 而与 1134 株略有差异; 运动性、糊精、柠檬酸盐利用、MR 试验、酪素水解、明胶水解、石蕊牛奶还原, 又酷似于 1134 株而区别于 151 株; Q4413 的最适生长温度、pH 值居双亲之间; Q4413 为原养型加三重抗性 [ $Rif^r$ ,  $AEC^r$ ,  $NaI^r$ ]; 其细胞 DNA 含量与 GC 比测定结果均居双亲之中, 而且生物量测定结果也均与双亲有一定的差异。

**关键词** 枯草芽孢杆菌; 北京棒杆菌; 原生质体融合; 赖氨酸高产菌

以甜菜糖蜜为原料的工业用 L-赖氨酸产生菌株, 以往是用常规育种法经多次诱变获得。自 1976 年首次成功地进行了种内细菌细胞融合<sup>[1,2]</sup>以来, 又相继发表了枯草杆菌、棒杆菌种内或种间原生质体的形成、再生和融合等的初步研究<sup>[3-12]</sup>。但尚未见有通过该二菌株原生质体融合而获得可用于工业生产的赖氨酸高产菌种的报道。本文旨在通过科间原生质体融合发挥远缘杂交的优势, 以期综合双亲株的优良性状、提高产酸率、探索选育更为理想的赖氨酸高产菌种的可行途径。

### 材料和方法

#### (一) 材料

1. 菌株: 北京棒杆菌 (*Corynebacterium pekinense*) 1134 衍生株 [ $Hser^-$ ,  $Bio^-$ ,  $NaI^r$ ,  $AEC^r$ ]; 系由黑龙江省轻工所提供的 1134 株 [ $Hser^-$ ,  $Bio^-$ ,  $AEC^r$ ],

在齐齐哈尔师范学院生物系微生物实验室经 UV 诱变后, 用梯度平皿法获得了  $NaI^r$  的遗传标记(文中简称 1134)。枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) BR151 衍生株 [ $Met^-$ ,  $Trp^-$ ,  $Rif^r$ ] 是由中国科学院微生物研究所赠送的 BR151 株 [ $Met^-$ ,  $Trp^-$ ,  $Lys^-$ ] 经本室分别用 UV 诱变法与梯度平皿选择法衍生而来的(文中简称为 151)。

2. 溶菌酶: 上海禽蛋厂出产的蛋清溶菌酶(酶活力为 10 000u/g)。

#### 3. 培养基:

(1) CM 液体、固体培养基: 按文献 [9] 配制。

(2) 改良的 DM<sub>3</sub> 固体、半固体培养基: 按 Chang<sup>[13]</sup> 等配方灭菌后加入适量的人血清白蛋白。

本文于 1989 年 6 月 11 日收到。

(3) 基本、补充与选择培养基: (A) 基本培养基 MM(1L): 葡萄糖 5g, 柠檬酸钠 1g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  6g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  14g,  $\text{MgSO}_4$  0.2g,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  2g。pH7.0; (B) 补充培养基: 为 MM 各加所需的三种生长因子或四种生长因子; (C) 选择培养基: 为 CM 加有关药物。

#### 4. 溶液:

(1) 改良的 HM 制备液: 按文献[7, 9]对 Fodor<sup>[2]</sup> 的 HM 液改良配方, 灭菌后加入适量人血清白蛋白(后面 HM 均指加入人血清白蛋白的 HM)。

(2) HMD 液: HM 液加 DNase, 使终浓度达  $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 。

(3) 巯基乙醇及果胶酶液: 用 HM 液配制成  $10 \text{mmol}/\text{L}$  和  $0.5 \text{mg}/\text{ml}$  的贮液。

(4) PEG 贮液: 用 HMD 液配成 40% 的 PEG (MW6000) 液。

(5) 嘌呤酮酸贮液: 用  $1 \text{mol}/\text{L}$  的 NaOH 配成  $10 \text{mg}/\text{ml}$  的贮液。

5. 细胞壁引物: 枯草杆菌 151 与棒杆菌 1134 细胞壁碎片, 参照前文<sup>[9]</sup>的方法制备。

## (二) 方法

1. 原生质体的制备与再生: 151 和 1134 株原生质体的制备按前文<sup>[9,10]</sup>的方法制备; 形成率和再生率按前文<sup>[7,9]</sup>计算。

2. 原生质体融合: 分别取  $\text{DM}_3$  液悬浮的 1134 株与 151 株原生质体各 1ml 等量混合, 离心收集原生质体, 并用 0.2 ml HMD 液悬浮, 再加入 1.8 ml 冷却的 PEG 贮液, 摇匀, 立即置 KF-2 型低温浴槽中, 经  $4^\circ\text{C}$  低温处理 1—2 分钟, 即刻加入 3 倍体积的 HMD 液稀释, 离心弃上清后用  $\text{DM}_3$  液悬浮。稀释后加入双亲细胞壁碎片倾注于  $\text{DM}_3$  双层平皿上,  $32^\circ\text{C}$  培养 48—72 小时。

3. 融合子的检出: 按文献[8]的方法,

从融合的再生平皿上随机挑出若干个菌落, 点种于 CM 母平皿上, 然后用影印法印至一系列的选择平皿上, 经  $32^\circ\text{C}$  培养 48 小时, 连续传代 4 次, 再影印传代进行鉴定, 并按下式计算融合率。

$$\text{融合率}(\%) = \frac{A \times \frac{B}{C}}{D} \times 100\% \\ = \frac{E}{D} \times 100\%$$

式中:

A——融合的再生平皿上总菌落数;

B——在实挑出的菌落中检出的融合子数;

C——实挑出的菌落数;

D——某一亲本再生的菌落数;

E——再生的融合子数。

4. 高产融合子的筛选: 将传代稳定的融合子逐个挑到以甜菜糖蜜为主要原料的发酵液中, 进行摇床发酵培养, 72 小时后用酸性茚三酮法<sup>[17]</sup>测定其 L-Lys 的产酸率与糖酸转化率, 再经反复多次的分离纯化, 并复筛测定其产酸率及稳定性。

5. 融合子 Q4413 的生理生化测定方法按文献[18—22]进行。

6. 融合子 Q4413 基因型、生物量、DNA 含量和克分子 GC 比的测定按文献[15, 16, 23, 24]进行。

## 结果和讨论

### (一) 原生质体制备率、再生率与融合率

统计结果如表 1。从一次融合的平皿上挑出的菌落中, 经鉴定有 409 株不同类型的融合子, 计为 36 种类型。其中综合双

\* 培养基(3)中氨基酸用量为  $40 \mu\text{g}/\text{ml}$ ; 生物素为  $4 \mu\text{g}/\text{ml}$ ; Nal. Rif 均为  $30 \mu\text{g}/\text{ml}$ ; AEC  $3 \text{mg}/\text{ml}$ 。

表 1 双亲株原生质体的制备、再生与融合结果

Table 1 Results of protoplast preparation, regeneration and fusion

菌株 Strains	酶解前活菌计数 Viable count before enzymolysis (cells/ml)	再生菌落数 Regeneration colonies/ml	原生质体制备率 Preparation rates ( $\bar{X} \pm \delta$ )%	再生率 Regeneration rates (%)	融合子数 (个/ml) Fusants/ml	融合率 Fusion rate
151 衍生株 Derivative from 151	$1.25 \times 10^7$	$1.135 \times 10^7$	$99.99 \pm 0.8$	90.8	$2.97 \times 10^4$	$3.9 \times 10^{-4}$
1134 衍生株 Derivative from 1134	$3.57 \times 10^7$	$7.6 \times 10^6$	$99.98 \pm 1.0$	21.3		

亲株遗传性状的融合子: 即 [Met<sup>+</sup>, Trp<sup>+</sup>, Hser<sup>+</sup>, Bio<sup>+</sup>, Nal<sup>r</sup>, Rif<sup>r</sup>, AEC<sup>r</sup>]、[Met<sup>-</sup>, Trp<sup>-</sup>, Hser<sup>-</sup>, Bio<sup>-</sup>, Nal<sup>r</sup>, Rif<sup>r</sup>, AEC<sup>r</sup>] 共 11 株, 占融合子总数的 2.69%; 综合双亲部分遗传性状的融合子共 398 株, 占 97.31%。各种类型的融合子数量分布见表 2。

本实验的科间融合率已高达  $3.9 \times 10^{-4}$ , 可能是由于采用了较好的原生质体制备、再生条件及融合时采用较低温度和短时间的 PEG 处理, 减少了毒性作用, 从而提高了原生质体的活性与再生率, 进而提高了其融合率。这证明用原生质体融合法从事远缘工业微生物育种, 在理论上是可行的。

## (二) 融合子的菌落与菌体形态

肉眼观察菌落大体可分为三种类型。菌体形态也可分为三种类型, 详见表 3。

## (三) 融合子的产酸性能与稳定性

经多次融合实验筛选出数株高产赖氨酸的融合子, 又进一步反复分离并连续传代后, 获得了一株以甜菜糖蜜为原料的高产融合子 Q4413。在摇床上同代五批次发酵平均产酸率为 6.56%, 最高为 7.13%, 在小罐上发酵平均产酸率为 6.52%, 糖酸转化率为 40.25%。其它摇床试验结果较亲株(1134 衍生株, 原产酸率为 3.7%) 提高了 77.3%。并且经传代试验(连续传十

代)和保藏试验(半年以上)均证明该融合子确实是稳定的。

## (四) 融合子的可靠性

由于已知双亲株均是无质粒的非溶原菌, 又是多重营养缺陷型标记加抗药性标记。融合过程又加入了 DNase, 故排除了融合子是由接合、转化、转导、转染导致的可能性, 对照试验又排除了是由某一亲株回复突变产生的可能性。另外, 抗药性标记可避免杂菌污染, 减少育种工作中的麻烦, 增加检出融合子的可靠性。

## (五) 生理生化试验

生理生化试验表明: Q4413 确系区别于双亲的融合子。如 Q4413 的耐盐性(10%的 NaCl), 石蕊牛奶试验的产碱(-)状况, 酷似于 151 株, 而与 1134 株略有差异; 其运动性(-)、糊精利用(±)、柠檬酸盐利用(-)、MR 试验(+)、酪素水解(-)、明胶水解(-)、果胶水解(-)、石蕊牛奶还原性(-)等均酷似于 1134 株而区别于 151 株; 其最适生长温度(30—32℃)、最适生长 pH 值(7.2—7.5)均居于双亲之中。

## (六) 遗传学的研究

遗传学研究表明: Q4413 株确系区别于双亲的融合子。基因型为原养型加三重抗性 [Hser<sup>+</sup>, Bio<sup>+</sup>, Try<sup>+</sup>, Met<sup>+</sup>, Rif<sup>r</sup>, AEC<sup>r</sup>, Nal<sup>r</sup>]; 每个细胞的 DNA 平均含

表 2 各种类型重组子的数量分布\*  
Table 2 The quantity distribution of different types of recombinants

序号 No.	重组子类型 Recombinants	表 型 Phenotypes							数量 Numbers	占重组子的比例 Proportion to the sum of recombinants obtained(%)	小计 Total (%)
		Met <sup>+</sup>	Trp <sup>+</sup>	Hser <sup>+</sup>	Bio <sup>+</sup>	Nal <sup>+</sup>	AEC <sup>+</sup>	Rif <sup>+</sup>			
1	综合双亲遗传 标记的重组子 Recombinants with the genetic markers of parents	Met <sup>+</sup>	Trp <sup>+</sup>	Hser <sup>-</sup>	Bio <sup>+</sup>	Nal <sup>+</sup>	AEC <sup>+</sup>	Rif <sup>+</sup>	4	0.98	2.69
2		Met <sup>-</sup>	Trp <sup>-</sup>	Hser <sup>-</sup>	Bio <sup>-</sup>	Nal <sup>+</sup>	AEC <sup>+</sup>	Rif <sup>+</sup>	7	1.71	
3	综合双亲 部分遗传 标记的重组子 Recombinants with the partial genetic markers of parents	Met <sup>+</sup>	Trp <sup>+</sup>	Hser <sup>+</sup>	Bio <sup>+</sup>	Nal <sup>+</sup>	AEC <sup>+</sup>	Rif <sup>+</sup>	6	1.47	97.31
4		Met <sup>-</sup>	Trp <sup>-</sup>	Hser <sup>-</sup>	Bio <sup>-</sup>	Nal <sup>+</sup>	AEC <sup>+</sup>	Rif <sup>+</sup>	4	0.98	
5		Met <sup>-</sup>	Trp <sup>-</sup>	Hser <sup>-</sup>	Bio <sup>-</sup>	Nal <sup>+</sup>	AEC <sup>+</sup>	Rif <sup>+</sup>	1	0.24	
6		Met <sup>+</sup>	Trp <sup>+</sup>	Hser <sup>+</sup>	Bio <sup>+</sup>	Nal <sup>+</sup>	AEC <sup>+</sup>	Rif <sup>+</sup>	3	0.73	
7		Met <sup>+</sup>	Trp <sup>+</sup>	Hser <sup>+</sup>	Bio <sup>+</sup>	Nal <sup>+</sup>	AEC <sup>+</sup>	Rif <sup>+</sup>	4	0.98	
8		Met <sup>+</sup>	Trp <sup>+</sup>	Hser <sup>+</sup>	Bio <sup>+</sup>	Nal <sup>+</sup>	AEC <sup>+</sup>	Rif <sup>+</sup>	5	1.22	
9		Met <sup>-</sup>	Trp <sup>-</sup>	Hser <sup>-</sup>	Bio <sup>-</sup>	Nal <sup>+</sup>	AEC <sup>+</sup>	Rif <sup>+</sup>	2	0.49	
10		Met <sup>+</sup>	Trp <sup>+</sup>	Hser <sup>+</sup>	Bio <sup>+</sup>	Nal <sup>+</sup>	AEC <sup>+</sup>	Rif <sup>+</sup>	2	0.49	
11		Met <sup>-</sup>	Trp <sup>-</sup>	Hser <sup>-</sup>	Bio <sup>-</sup>	Nal <sup>+</sup>	AEC <sup>+</sup>	Rif <sup>+</sup>	3	0.73	
12		Met <sup>+</sup>	Trp <sup>+</sup>	Hser <sup>+</sup>	Bio <sup>+</sup>	Nal <sup>+</sup>	AEC <sup>+</sup>	Rif <sup>+</sup>	9	2.20	
13		Met <sup>-</sup>	Trp <sup>-</sup>	Hser <sup>-</sup>	Bio <sup>-</sup>	Nal <sup>+</sup>	AEC <sup>+</sup>	Rif <sup>+</sup>	6	1.47	
14		Met <sup>-</sup>	Trp <sup>-</sup>	Hser <sup>-</sup>	Bio <sup>-</sup>	Nal <sup>+</sup>	AEC <sup>+</sup>	Rif <sup>+</sup>	5	1.22	
15		Met <sup>+</sup>	Trp <sup>+</sup>	Hser <sup>+</sup>	Bio <sup>+</sup>	Nal <sup>+</sup>	AEC <sup>+</sup>	Rif <sup>+</sup>	8	1.96	
16		Met <sup>-</sup>	Trp <sup>+</sup>	Hser <sup>+</sup>	Bio <sup>+</sup>	Nal <sup>+</sup>	AEC <sup>+</sup>	Rif <sup>+</sup>	2	0.49	
17		Met <sup>-</sup>	Trp <sup>+</sup>	Hser <sup>+</sup>	Bio <sup>-</sup>	Nal <sup>+</sup>	AEC <sup>+</sup>	Rif <sup>+</sup>	4	0.98	
18		Met <sup>+</sup>	Trp <sup>-</sup>	Hser <sup>-</sup>	Bio <sup>+</sup>	Nal <sup>+</sup>	AEC <sup>+</sup>	Rif <sup>+</sup>	3	0.73	
19		Met <sup>+</sup>	Trp <sup>+</sup>	Hser <sup>+</sup>	Bio <sup>-</sup>	Nal <sup>+</sup>	AEC <sup>+</sup>	Rif <sup>+</sup>	17	4.16	
20		Met <sup>-</sup>	Trp <sup>-</sup>	Hser <sup>-</sup>	Bio <sup>+</sup>	Nal <sup>+</sup>	AEC <sup>+</sup>	Rif <sup>+</sup>	14	3.42	
21		Met <sup>+</sup>	Trp <sup>+</sup>	Hser <sup>+</sup>	Bio <sup>-</sup>	Nal <sup>+</sup>	AEC <sup>+</sup>	Rif <sup>+</sup>	12	2.93	
22		Met <sup>+</sup>	Trp <sup>+</sup>	Hser <sup>+</sup>	Bio <sup>-</sup>	Nal <sup>+</sup>	AEC <sup>+</sup>	Rif <sup>+</sup>	10	2.44	
23		Met <sup>+</sup>	Trp <sup>+</sup>	Hser <sup>-</sup>	Bio <sup>-</sup>	Nal <sup>+</sup>	AEC <sup>+</sup>	Rif <sup>+</sup>	18	4.40	
24		Met <sup>-</sup>	Trp <sup>-</sup>	Hser <sup>+</sup>	Bio <sup>+</sup>	Nal <sup>+</sup>	AEC <sup>+</sup>	Rif <sup>+</sup>	20	4.89	
25		Met <sup>+</sup>	Trp <sup>+</sup>	Hser <sup>-</sup>	Bio <sup>-</sup>	Nal <sup>+</sup>	AEC <sup>+</sup>	Rif <sup>+</sup>	9	2.20	
26		Met <sup>-</sup>	Trp <sup>+</sup>	Hser <sup>-</sup>	Bio <sup>-</sup>	Nal <sup>+</sup>	AEC <sup>+</sup>	Rif <sup>+</sup>	21	5.13	
27	Met <sup>+</sup>	Trp <sup>-</sup>	Hser <sup>+</sup>	Bio <sup>+</sup>	Nal <sup>+</sup>	AEC <sup>+</sup>	Rif <sup>+</sup>	26	6.36		
28	Met <sup>+</sup>	Trp <sup>-</sup>	Hser <sup>-</sup>	Bio <sup>-</sup>	Nal <sup>+</sup>	AEC <sup>+</sup>	Rif <sup>+</sup>	24	5.87		
29	Met <sup>-</sup>	Trp <sup>+</sup>	Hser <sup>+</sup>	Bio <sup>+</sup>	Nal <sup>+</sup>	AEC <sup>+</sup>	Rif <sup>+</sup>	20	4.89		
30	Met <sup>+</sup>	Trp <sup>+</sup>	Hser <sup>+</sup>	Bio <sup>-</sup>	Nal <sup>+</sup>	AEC <sup>+</sup>	Rif <sup>+</sup>	17	4.16		
31	Met <sup>+</sup>	Trp <sup>+</sup>	Hser <sup>-</sup>	Bio <sup>+</sup>	Nal <sup>+</sup>	AEC <sup>+</sup>	Rif <sup>+</sup>	23	5.62		
32	Met <sup>-</sup>	Trp <sup>-</sup>	Hser <sup>+</sup>	Bio <sup>-</sup>	Nal <sup>+</sup>	AEC <sup>+</sup>	Rif <sup>+</sup>	20	4.89		
33	Met <sup>+</sup>	Trp <sup>+</sup>	Hser <sup>-</sup>	Bio <sup>-</sup>	Nal <sup>+</sup>	AEC <sup>+</sup>	Rif <sup>+</sup>	27	6.60		
34	Met <sup>-</sup>	Trp <sup>-</sup>	Hser <sup>+</sup>	Bio <sup>+</sup>	Nal <sup>+</sup>	AEC <sup>+</sup>	Rif <sup>+</sup>	21	5.13		
35	Met <sup>+</sup>	Trp <sup>+</sup>	Hser <sup>-</sup>	Bio <sup>-</sup>	Nal <sup>+</sup>	AEC <sup>+</sup>	Rif <sup>+</sup>	19	4.65		
36	Met <sup>-</sup>	Trp <sup>-</sup>	Hser <sup>-</sup>	Bio <sup>+</sup>	Nal <sup>+</sup>	AEC <sup>+</sup>	Rif <sup>+</sup>	13	3.17		

\* Hser: 同型丝氨酸; Met: 蛋氨酸; Trp: 色氨酸; Lys: 赖氨酸; Bio: 生物素; Nal: 喹啉酮;  
AEC: S-(2-氨基乙基)-L-半胱氨酸; Rif: 利福平

表 3 融合子的菌落与菌体形态

Table 3 Colony and cell morphology of the fusants

融合子类型 Types of fusants	菌落形态 Colony morphology	菌体形态 Cell morphology
似 151 株类型 151 type	乳白色圆型大菌落(D = 5—7mm) 扁平,中间密度较大,边缘不清,锯齿 状,干燥,似皱膜状	呈链状排列的较大杆菌
似 1134 株类型 1134 type	乳黄色,圆型小菌落(D = 1mm), 边缘整齐,隆起,有光泽,湿润,光滑	较小的八字形棒状杆菌
中间类型 Intermediate type	有的乳白色,扁平,中等大小,圆菌 落,边缘较整齐或不很整齐,中间略突 起,密度较大,较干燥或稍湿润	菌体似杆状,在链状排列中有八字 形分枝;有的菌体似棒状,但可产芽孢 菌体形态特殊,无鞭毛,但有较稀疏的 纤毛着生

表 4 高产融合子 Q4413 与双亲株的产量和 DNA 含量的差异

Table 4 Comparison of lysine output and DNA content between  
fusant Q4413 and its parents

菌株 Strain	赖氨酸产量 Output of lysine (%)	DNA 含量 DNA contents (g/cell)	G + C 克分子百分比 G + C content in DNA (mol%)
Q4413 株 Fusant Q4413	6.56	$2.6 \times 10^{-11}$	58.56
亲株 1134 衍生株 Parent strain derived from 1134	3.7	$2.3 \times 10^{-11}$	68.3
亲株 151 衍生株 Parent strain derived from 151	0	$5.1 \times 10^{-11}$	42.7

量与 GC 比均为双亲之中间值(表 4)。其生物量的测定结果也与双亲有一定差异(图略)。

综上所述,通过原生质体融合法选出了一株稳定高产赖氨酸的融合子,为远缘工业微生物育种展示了前景。

### 参 考 文 献

- [1] Schaeffer, P. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **73** (6): 2151—2155, 1976.
- [2] Fodor, K. et al.: *Ibid.*, **73** (6): 2147—2150, 1976.
- [3] 江行娟等: *遗传学报*, **8**(1): 1—7, 1981.
- [4] 李鸣凤等: *遗传学报*, **8**(2): 109—115, 1981.
- [5] 诸葛健等: *微生物学报*, **24**(1): 74—79, 1984.
- [6] 乔宝义等: *微生物学报*, **23**(1): 33—43, 1983.
- [7] 郭德栋等: *实验生物学报*, **17**(1): 119—127, 1984.
- [8] 周东坡等: *微生物学杂志*, **9**(2): 19—23, 1989.
- [9] 周东坡等: *微生物学杂志*, **5**(4): 51—54, 1985.
- [10] 杜珠环等: *生物工程学报*, **1**(4): 59—62, 1985.
- [11] 平文祥等: *微生物学杂志*, **7**(4): 19—23, 1987.
- [12] [日]唐沢昌彦: 公开特许公报, 昭和 58-158184 (1)—(5), 1983.
- [13] Chang, S. et al.: *MGG.*, **168** (1): 111—115, 1979.
- [14] Miller, J. H.: *Experiments in Molecular Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory, p. 431—432, 1977.
- [15] Herbort, D. et al.: *Method in Microbiology*, **5B**: 324, 1977.
- [16] 周德庆: *微生物学实验手册*, 第 363—367 页, 上海科学技术出版社, 上海, 1986 年.
- [17] 石渡昭男: *特許公报*, **20**: 874, 1975.
- [18] Cappuccino, J. G. et al.: *Microbiology—A Laboratory Manual*, p. 111—113, Addison-Wiley Publishing Company, 1983.
- [19] 无锡轻工业学院等: *微生物学*, 第 338—339 页, 轻工业出版社, 北京, 1983 年.
- [20] 中国科学院微生物研究所细菌分类组: *一般细菌常用鉴定方法*, 第 98—193 页, 科学出版社, 北京, 1978 年.

- [21] 王大耜: 细菌分类基础, 第 133—158 页, 科学出版社, 北京, 1977 年。
- [22] 范秀蓉等: 微生物学实验, 第 56—65 页, 高等教育出版社, 北京, 1985 年。
- [23] America Society for Microbiology: Manual of Methods for General Bacteriology. p. 504—507, 1984.
- [24] Marmur, J.: *J. Mol. Biol.*, 3:208, 1961.

## STUDIES ON THE BREEDING OF HIGH-YIELD LISINE PRODUCING STRAIN BY PROTOPLAST FUSION

Zhou Dongpo Ping Wenxiang Jia Shubiao Song Xiujuan Lu Guirong  
 Hong Jianzhong Hong Yan Guo Dedong  
 (Biology Department of Qiqihar Teachers' College, Qiqihar)

Liu Guiqing Sun Bo Zhang Zhi Hao Fanglan Shen Ruie  
 Wei Fengtong Liang Jinzhong Wang Jianhua  
 (Heilongjiang Institute of Light Industry, Harbin)

The fusion strain Q4413 which used sugar beet molasses with high output of above 6.5% lysine in shake flask and small fermenter was obtained through the protoplast fusion between *Bacillus subtilis* BR151 derivative and *Corynebacterium pekinense* 1134 derivative. The morphology of the colony of this strain was similar to *C. pekinense* 1134, but the cell appearance was different from either parent's. It looked like a short rod, with sparse pili and without flagellum. The physiological and biochemical characteristics of the strain resembled *B. subtilis* BR151 in some tests, e.g. halo-tolerance and alkali production of litmus milk tests, and looked like *C. pekinense* 1134 in other tests, e. g. dextrin and citrate utiliza-

tion tests, and casein, gelatin and pectin hydrolysis tests as well as litmus milk reduction and MR tests, etc. The optimum growth temperature and pH of Q4413 were between the two parents'. Q4413 was a complete prototroph with Rif<sup>r</sup>, AEC<sup>r</sup> and NaI<sup>r</sup>, and its DNA content and GC ratio were in between of its parents'. The results of biomass measurement varied from that of the two parents.

### Key words

*Bacillus subtilis*; *Corynebacterium pekinense*; Protoplast fusion; High-yield strain of lysine