

紫外诱变选育多聚赖氨酸高产菌株的研究

杨玉红¹, 于雪骊², 刘长江²

(1. 沈阳农业大学 生物科学与技术学院 辽宁 沈阳 110161; 2. 沈阳农业大学 食品科学与工程学院, 辽宁 沈阳 110161)

摘要:以实验室筛选的一株白色链霉菌 B-215 为出发菌株, 采用紫外诱变的方式对其进行菌株选育。通过紫外诱变, 得到一株 ϵ -聚赖氨酸产量为 0.75 g/L 的突变株 BU-215, 比未诱变的产量提高 20.97%。其发酵液抑菌圈的 H/C (抑菌圈直径与滤纸片直径之比) 为 1.56 比对照菌株高 25.81%。

关键词: 紫外诱变; 选育; 高产菌株

中图分类号: Q 345⁺.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2007)09-0045-02

ϵ -聚赖氨酸能在人体内分解为赖氨酸, 而赖氨酸是人体必需的 8 种氨基酸之一, 也是世界各国允许在食品中强化的氨基酸^[1,2]。目前生产及研究的可发酵产 ϵ -聚赖氨酸的菌主要是白色链霉菌, 其它菌少有报道^[3,4]。利用理化因子对链霉菌进行诱变, 从各种基因突变中筛选有利突变的诱变育种是传统的育种方法, 也是最常用、最有效的。因此, 为了取得更大的经济效益, 试验以从长白山土样中筛选的白色链霉菌 B-215 为出发菌株, 进行菌种选育, 以期获得一株 ϵ -聚赖氨酸高产菌株。

1 材料与方法

1.1 出发菌株

白色链霉菌 B-215 由实验室筛选, 敏感菌株; 金黄色葡萄球菌。

1.2 培养基

PDA 培养基 (g/L): 马铃薯 200, 琼脂 17, 水 1 000 mL, pH 自然; 发酵培养基 (g/L): 葡萄糖 50, 酵母浸膏 5, 硫酸铵 10, 磷酸二氢钾 1.2, 磷酸氢二钾 0.8, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.4, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.04, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.02; 高氏一号合成琼脂培养基 (g/L): KNO_3 1, K_2HPO_4 0.5, MSO_4 0.5, $NaCl$ 0.5, $FeSO_4$ 0.01, 琼脂 20, 可溶性淀粉 20, 水 1 000 mL, pH 7.2~7.4。

1.3 白色链霉菌的紫外线(UV)诱变

1.3.1 单孢子悬浮液的制备 取一环菌体于贝特纳斜面培养基、30℃培养、5~7 d, 待铺满孢子, 取适量无菌水冲洗试管斜面孢子, 在振荡器上充分震荡, 使孢子均匀分散, 经过无菌漏斗 (内有棉花) 过滤除去菌丝制成单孢子悬浮液。

子悬浮液。

1.3.2 紫外线(UV)诱变 取 10 mL 单孢子悬浮液于无菌平皿中, 磁力搅拌, 置于 30 W 紫外灯下 25 cm 处, 照射时间分别为 10、20、40、60、80、100、120、150 s, 取不同照射剂量的处理液适当稀释涂平板, 28℃避光培养 5~10 d, 待长出菌落, 进行活菌计数。以未诱变的孢子悬浮液的活菌数为基准, 计算致死率。根据致死率确定最佳诱变时间, 然后对突变株进行筛选和进行高产菌株的稳定性研究, 在致死率为 90% 的条件下对孢子进行诱变处理 (以下相同)。取 0.1 mL 涂布平板上。

1.4 测定方法

菌体浓度: 血球计数板法^[5]。 ϵ -聚赖氨酸测定: 文献^[6]的方法。发酵过程中 pH 值: pH 计。

2 结果与分析

2.1 最佳诱变时间的选择

取不同照射剂量的处理液适当稀释涂平板, 28℃培养 7 d。待长出菌落, 进行活菌计数。以未诱变的孢子悬浮液的活菌数为基准, 计算致死率^[7,8]。照射 20 s 时, 致死率为 52.06%, 照射 40 s 时致死率为 79.65%, 照射 60 s 时致死率 89.65%, 试验选用 60 s 作为紫外线的诱变时间。

表 1		诱变时间与致死率					
诱变时间/s	0	20	40	60	80	120	150
致死率/%	0	52.06	79.65	89.65	93.50	98.35	100

2.2 突变株初筛结果

将经过诱变的孢子悬浮液稀释后, 涂布于高氏平板上, 28℃培养 7 d, 长出的菌落即为经紫外线诱变处理后得到大量突变株。这些菌株在形态上差异较大, 依据其菌落形态、菌落大小、颜色等特征划分为 4 类, 列入表 2。将每类菌株各挑选若干株进行摇瓶初筛, 对试验数据进行分析统计, 结果见表 2。从表 2 的试验结果可以看出, 突变株的菌落形态与 ϵ -PL 发酵产量之间存在有一定的

第一作者简介: 杨玉红(1973-), 女, 辽宁大连人, 博士, 讲师, 主要从事微生物工程和食品生物技术研究。E-mail: kzlyangyuhong。
基金项目: 辽宁省教育厅高等学校科学技术研究资助项目(2004D236)。
收稿日期: 2007-03-26

对应关系, B2 类菌株与原菌的 ϵ -PL 发酵产量相差不大; 产量普遍偏高。即菌落呈圆形或不规则形、表面粗糙、干燥、孢子量大、丰满且菌落较小的突变株。

B4 类菌株 ϵ -PL 发酵产量最低; 而 B3 类菌株 ϵ -PL 发酵

表 2 突变株的形态特征和发酵性能				
分类	菌落形态	生长情况	菌落直径/mm	ϵ -PL 的含量/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$
对照	表面平坦 银白色	生长快 菌落结实	3.5~4.5	0.62
B1	草帽形, 表面平坦	生长较快	3.0~4.0	0.45
B2	草帽形, 有的中央凹陷	较粗糙	3.0~4.0	0.56
B3	黄白色, 表面干燥	生长慢 稀薄	1.5~2.0	0.76
B4	表面平坦 白色, 有黄色角变	生长快 稀薄	4.0~5.0	0.29

表 3 突变株复筛部分结果											
突变株	对照	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
ϵ -PL 量/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	0.62	0.72	0.75	0.68	0.70	0.43	0.60	0.58	0.62	0.52	0.60
H/C	1.24	1.41	1.56	1.48	1.38	无	1.30	1.11	1.33	无	无

注 H/C 为抑菌圈直径/滤纸片直径

2.3 突变株复筛结果

对 B3 类菌株的若干株进行摇瓶发酵筛选, 比较抑菌圈和多聚赖氨酸产量, 结果见表 3。由表 3 可看出: 突变株 2 为多聚赖氨酸发酵的优质菌株, 其 H/C 为 1.56, 比对照菌株高 25.81%, 多聚赖氨酸产量为 0.75 g/L, 比对照高 20.97%, 将其命名为 *Streptomyces albulus* BU-215。

2.4 突变株遗传稳定性鉴定结果

对 *Streptomyces albulus* BU-215 进行传代, 将诱变保存的菌种斜面转接高氏斜面, 30℃培养 5 d 后作为 F₁ 代, 接连传代到 F₃, 然后分别将 F₁、F₂、F₃、斜面同时转接高氏斜面扩大培养, 取上述分别培养了 5 d 的 F₁、F₂、F₃ 代培养体, 接种到发酵培养基中培养 3 d, 测其 ϵ -PL 的含量、生物量、pH 指标, 结果如表 4。由表 4 可以看出 *Streptomyces albulus* BU-215 遗传性状稳定。

表 4 BU-215 遗传稳定性结果			
传代次数	1	2	3
ϵ -PL 的含量/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	0.78	0.75	0.76
生物量/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	1.62	1.65	1.64
pH	4.21	4.30	4.21

3 结论

通过紫外诱变, 得到一株 ϵ -聚赖氨酸产量 0.75 g/L

的突变株 *Streptomyces albulus* BU-215, 比对照菌株产量提高 20.97%。其发酵液抑菌圈的 H/C 为 1.56, 比对照菌株高 25.81%。

参考文献

[1] 刘慧, 徐红华, 王明丽. 等. 聚赖氨酸抑菌性能的研究 [J]. 东北农业大学学报, 2000, 31(3): 294-298.

[2] 凌关庭. 天然食品添加剂手册(M). 北京: 化学工业出版社, 2000; 16-18.

[3] Pihardi K. Enhancement of ϵ -PL production *Streptomyces albulus* strain 410 using pH control[J]. Journal of bio-science ang bioengineering 2001, 91 (2): 190-194.

[4] 徐红华, 王英东, 赵新淮. 多聚赖氨酸在食品抑菌方面的研究进展 [J]. 粮油食品科技, 1999(7): 33-34.

[5] Itzhaki R F. Colorimetric method for estimating poly-lysine and poly-arginine[J]. Anal Biochem, 1972, 50: 569-574.

[6] 杜珠还, 张皋渡, 华祖尧, 等. 紫外线和氯化锂对棒状杆菌原生质体的诱变作用 [J]. 生物工程学报, 1985, 1(4): 59-62.

[7] 王虹, 齐奔兰, 李福博. 紫外诱变原生质体建育赖氨酸高产菌株 [J]. 生物工程学报, 1990(6): 32-38.

[8] 方善康, 王晓辉. 酒化根霉原生质体的诱变育种 [J]. 中国造酒, 1990 (1): 28-29.

[9] 李庆泉, 朱宝臣, 李潞滨, 等. 维生素产生茵陈原生质体诱变选育 [J]. 微生物学报, 1990, 30(4): 312-314.

The Study of Selection and Breeding of ϵ -PL High-producing Strain with UV Mutation

YANG Yu-Hong¹, YU Xue-li², LIU Chang-jang²

(1. Biological Science and Technology Institute, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, China; 2. College of Food and Engineering, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, China)

Abstract: In this essay we took *Streptomyces albulus* B-215 as test bacterium, treated it with UV to select and breed High-producing Strain. Through UV mutation, we got the mutant BU-215 whose productivity of ϵ -polylysine was 0.75 g/L, which was 20.97% higher than the comparison. And its H/C of inhibitive circle was 1.56, which is 25.81% higher than the comparison.

Key words: UV mutation; Selection and breeding; High-producing strain