

简 报

## 通过热灭活棒状杆菌原生质体融合 选育谷氨酸高产菌株

洪益国\* 郑幼霞\*\* 杨颐康 顾萍燕

(华东师范大学, 上海)

自Fodor<sup>[1]</sup>和Schaeffer<sup>[2]</sup>分别用营养缺陷的巨大芽孢杆菌和枯草芽孢杆菌原生质体融合之后,应用原生质体融合研究不仅取得了种内、种间杂交的成功<sup>[3]</sup>,对于外源DNA转化<sup>[4]</sup>、质粒转移<sup>[5]</sup>以及基因定位<sup>[6]</sup>等亦都有成功的报道,而且越来越广泛地应用于工业育种<sup>[7]</sup>。

棒状杆菌属中某些种是氨基酸生产的工业用菌,通常用诱变的方法选育优良菌种,涉及到原生质体的研究所见报道甚少<sup>[8-9]</sup>。本研究选择谷氨酸棒状杆菌和北京棒状杆菌两种谷氨酸产生菌,分析其原生质体形成和再生的条件,通过热灭活原生质体融合选育谷氨酸高产菌株。

### 材料与 方法

#### (一) 材料

1. 菌株: 谷氨酸棒状杆菌 T613 [*Corynebacterium glutamicum* T613], 原养型, 产谷氨酸, 浙江平湖味精厂提供。北京棒状杆菌 AS1, 223 [*Corynebacterium pekinense* AS1, 223], 色氨酸缺陷型(Tr<sup>-</sup>)。其野生型菌株为 AS1, 299, 中国科学院北京微生物研究所提供。

2. 培养基: 有关常用培养基见文献[9]; 谷氨酸发酵种子培养基(%) 葡萄糖 2.5, 尿素 1.0, 玉米浆 3.0, NaCl 0.1, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.04, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.1, FeSO<sub>4</sub>·4—6H<sub>2</sub>O 1ppm, MnSO<sub>4</sub>·4—6H<sub>2</sub>O 1ppm, pH7.0; 15磅20min。谷氨酸发酵培养基(%): 葡萄糖 10.0, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.1, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.06, FeSO<sub>4</sub>·4—6H<sub>2</sub>O

1ppm, MnSO<sub>4</sub>·4—6H<sub>2</sub>O 1ppm, 麸皮水 0.6, pH7.0; 10磅8min。使用时加尿素至 2.4—3.5。

3. 有关溶液: 见文献[9—10]。

#### (二) 方法

1. 原生质体制备与再生: 见文献[9]。

2. 原生质体融合: T613 菌株的原生质体在 65℃ 处理 30min 后, 在 HMM 平板上测定存活菌数, 取活亲株 AS1, 223 与灭活亲株 T613 原生质体悬浮液各 3ml 混合, 具体融合步骤见文献[9]。用 DF 缓冲液替代 PEG6000 和 Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, 作为对照处理。又各取两亲株活原生质体悬浮液 3ml 混合, 含原生质体 1.0—5.0 × 10<sup>6</sup> 个/ml, 同对照处理。将涂布的各种平板置 34℃ 培养 1—2 天, 记数再生菌落, 计算融合频率, 融合频率 = [融合子数 - 双亲株原生质体存活数] ÷ 双亲株原生质体总数。

3. 融合子特性分析: (1) 点种法进行稳定性测定。(2) 谷氨酸发酵及其产率测定: 43 株稳定融合子和两亲株同时进行检测。斜面活化菌种, 转接于 200ml 发酵种子培养基; 34℃ 培养 10.5h 后, 接种 1.0% 种子发酵液于谷氨酸发酵培养基, 34℃ 振荡, 其间检查发酵液 pH, 添加尿素, 使 pH 保持在 7.0—7.2, 发酵时间为 48h。瓦勃氏呼吸法<sup>[11]</sup>测定谷氨酸产率, 产率按 100ml 发酵液中含谷氨酸的克数计算 (%)。

本文于 1987 年 10 月 26 日收到。

\* 中国科学院微生物研究所。

\*\* 中国科学院上海植物生理研究所。

# 结果与讨论

## (一) 影响原生质体形成和再生的因素

1. 青霉素G 预处理的影响：单因子试验表明：0.6—1.0μg/ml 青霉素 G处理对数生长期菌体 2—4h，原生质体形成率为90.0—99.0%，再生率也达20.0—30.0%，而未经青霉素G 处理的菌体，溶菌酶作用后形成率则只有40.0%。因而在棒状杆菌中，仅用溶菌酶消化去壁制备原生质体并不十分有效，青霉素 G的预处理是一个必要的前过程。

2. 溶菌酶消化细胞壁的活性：溶菌酶的作用主要表现在消化细胞壁的活性。试验表明细胞溶菌温度在 37℃、pH 6.7—7.0、溶菌时间12—14h，酶浓度500—1250μg/ml 是溶菌酶作用的合适条件，在此条件下原生质体形成率可达97.0—99.0%，再生率为20.0—50.0%。

3. 渗透压对原生质体形成和再生的影响：高渗缓冲液和高渗稳定剂对原生质体形成和再生均有影响，结果如图 1 图 2。

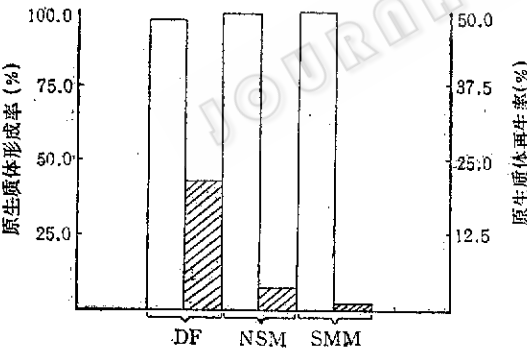


图 1 高渗缓冲液对原生质形成和再生的影响  
白色部分：原生质体形成率  
斜线部分：原生质体再生率

三种不同的高渗缓冲液DF、NSM、SMM都适于配制溶菌酶消化细胞壁，原生质体形成率约 99.0%，但再生率有明显的差异。DF 较适合于原生质体再生，再生率达 20.0% 以上，而 NSM 和 SMM 则不然，其再生率仅为 DF 中的 1/15—1/5。

以 0.5mol/L蔗糖和 0.5mol/LNaCl 作为高渗稳定剂对原生质体的再生表现出不同的影响，不

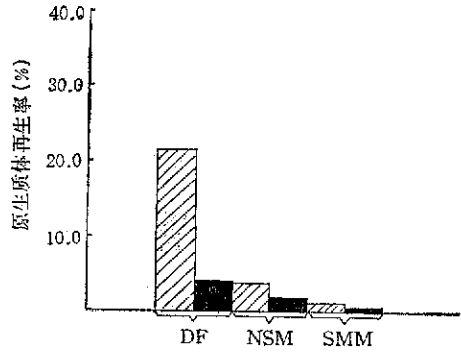


图 2 高渗稳定剂对原生质体再生的影响  
斜线部分：0.5mol/L蔗糖  
黑色部分：0.5mol/L NaCl

论菌体在哪一种高渗缓冲液中溶菌获得的原生质体，其在含 0.5mol/L 蔗糖 HCM 上的再生率比在含 0.5mol/LNaCl HCM 上的再生率高 2—5 倍。所以 0.5mol/L蔗糖是较合适的高渗稳定剂。

以上研究表明，合适的高渗缓冲液既要利于酶的作用，又能使原生质体保持较高的活性。

## (二) 原生质体融合

加热灭活的 T613 原生质体与 AS1.223 活的原生质体种间融合，在 HMM 平板上选择融合子。65℃ 热灭活 T613 原生质体存活率几近于零；AS1.223 的回复突变率为  $10^{-7}$ ，原生质体融合频率为  $10^{-4}$ — $10^{-5}$  (表 1)，自发融合频率低于 PEG 诱导融合频率的  $10^2$ — $10^3$  倍。在融合实验中添加了  $10\mu\text{g/ml}$  DNase，避免了游离的外源 DNA 由转化等造成遗传互补的可能性。在融合试验之后，对融合子的稳定性和谷氨酸产率做了分析。

表 1 原生质体融合——T613 (热灭活) × AS1.223 (Try<sup>-</sup>)

实验批次	原生质体存活数 (ml <sup>-1</sup> )	双亲株原生质体总数 (ml <sup>-1</sup> )	融合子数 (ml <sup>-1</sup> )	融合频率
I	148	$1.0 \times 10^8$	$5.8 \times 10^3$	$5.65 \times 10^{-5}$
II	102	$2.45 \times 10^8$	$2.4 \times 10^4$	$9.75 \times 10^{-5}$
III	200	$1.2 \times 10^8$	$8.81 \times 10^4$	$7.33 \times 10^{-4}$

1. 稳定性分析：从 HMM 平板上得到的初步融合子，点种到 MM 平板并转接 5 次。三批试验中，分别随机挑起 161、364、216 个初步融合

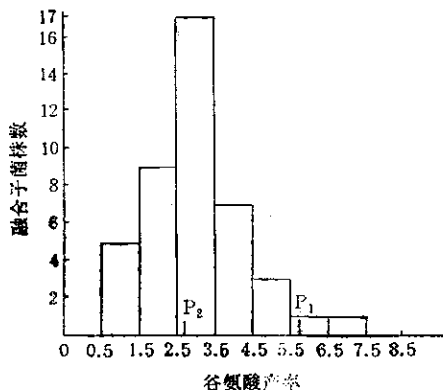


图3 43株融合子菌株谷氨酸发酵产率(%)分布

子,测定它们的稳定频率相应为9.32%、8.10%和12.97%,可见在大部分初步融合子中,稳定性较低而分离频率较高。

2. 谷氨酸发酵产率分析:选取43株稳定融合子,分析其谷氨酸产率。产率分布如图3,可见43株稳定融合子菌株均能不同程度地产生谷氨酸。亲株 T613、AS1.223 产率各为 5.66%、2.52% (图3中P<sub>1</sub>、P<sub>2</sub>示),融合子菌株的产率大多介于两亲株之间。融合子菌株F<sub>3</sub>、F<sub>4</sub>产率分别为5.76%、6.57%高于双亲株产率。有关谷氨酸发酵的其他数据未列出。

### 参 考 文 献

- [1] Fodor, k. et al., *Proc. Acad. Sci. USA*, 73; 2147—2150, 1976.
- [2] Schaeffer, P. et al., *Proc. Acad. Sci. USA*, 73; 2151—2155, 1976.
- [3] Hopwood, D.A., *Ann. Rev. Microbiol.*, 35; 237—272, 1981.
- [4] Levi-Meyruensis, C. et al., *Molec. Gen. Genet.*, 179; 589—594, 1981.
- [5] Hopwood, D. A. et al., *Nature*, 274; 398—400, 1978.
- [6] Baltz, R. H. et al., *J. Gen. Microbiol.*, 107; 93—102, 1978.
- [7] 王 宪等: 生物工程学报, 3:29—36, 1987.
- [8] Katsumata, R. et al., *J. Bacteriol.*, 159; 306—311, 1984.
- [9] 乔宝义等: 微生物学报, 23:33—43, 1983.
- [10] 诸葛健等: 微生物学报, 24:74—79, 1984.
- [11] 陈志民等: 生物化学与生物物理学报, 1:137, 1961.

# STUDIES ON SELECTING HIGH YIELD STRAIN OF GLUTAMIC ACID THROUGH INTERSPECIFIC FUSION OF HEAT-INACTIVATED CORYNEBACTERIA PROTOPLAST

Hong Yiguo\* Zheng Youxia\*\* Yang Yikang Gu Pingyan

(East China Normal University, Shanghai)

This paper reported the optimal conditions of protoplast formation and regeneration of *Corynebacterium glutamicum* T613. Bacterial pellet of logarithmic culture pre-treated with 0.5—1.0 $\mu$ g/ml penicillin G for 2—4h was suspended in hypertonic buffer DF and incubated with 500—1000 $\mu$ g/ml egg-white lysozyme for 12.5h at 37°C, the protoplast rate was up to 97.0—99.0%. The regeneration frequency was about 20.0—50.0% on HCM containing 0.5mol/L sucrose. Inactivated protoplast fusions between interspecies were further carried out, the fusion frequencies were about  $10^{-4}$ — $10^{-5}$ . Among them, about 10% were stable. By measuring the glutamic acid production after fermentation of 43 fusants, their productivity appeared the normal distribution, two of them F3 and F4 produced more glutamic acid than their parents.

## Key words

*Corynebacterium*; protoplast fusion; glutamic acid

\* Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing.

\*\* Institute of Plant Physiology, Academia Sinica, Shanghai.