

紫外线与氯化锂复合诱变选育 L-组氨酸产生菌

邱雁临, 梁亮, 汪亮

(工业微生物湖北省重点实验室, 湖北工业大学生物工程学院, 湖北 武汉 430068)

摘要: 以一株谷氨酸棒杆菌 (*Corynebacterium glutamicum*) S₆ 为出发菌株, 利用氯化锂、紫外线进行诱变, 通过实验证明氯化锂诱变剂量在 1.2% 时致死率达到 82.4%, 紫外线在照射 30 s 时致死率达到 81.8%。利用氯化锂诱变谷氨酸棒杆菌 S₆, 所得菌株 D₃ 的 L-组氨酸产量为 243 mg/L, 比出发菌株提高 10.5%; 以紫外线做诱变 S₆, 所得高产菌株 U₁ 产量 256 mg/L, 比出发菌株提高 8.5%; 以紫外线、氯化锂复合诱变 S₆, 所得菌株 N₁ 产量为 251 mg/L, 比出发菌株提高 13.6%, 结果显示, 经紫外线与氯化锂复合诱变后的菌株 N₁ 产 L-组氨酸的产量最高, 比氯化锂诱变后的菌株产 L-组氨酸量提高 3.1%, 比紫外线诱变后的菌株产 L-组氨酸量提高 5.1%。

关键词: 紫外线; 氯化锂; 复合诱变; L-组氨酸

中图分类号: TQ922; 文献标识码: A; 文章编号: 1673-9078(2008)03-0217-03

Mutation Screening of L-histidine Producing Strain by UV and LiCl

QIU Yan-lin, LIANG Liang, WANG Liang

(The province key laboratory of Industrial Microorganism, College of Bioengineering, Hubei University of Technology, Wuhan 430068, China)

Abstract: A L-histidine producing strain was mutated and screened from *Corynebacterium glutamicum* S₆ by LiCl and UV. Results showed that the UV-induced lethality was 81.8% with the irradiating time of 30s, while the LiCl-induced lethality was 82.4% with the LiCl concentration of 1.2%. Using three mutants, D₃ by LiCl, U₁ by UV, and N₁ multiple mutated by UV and LiCl, the L-histidine yields reached 256 mg/L, 243 mg/L and 251 mg/L, respectively, which were 8.5%, 10.5%, and 13.6% respectively higher than that by the original strain S₆.

Key words: UV; LiCl; Composite mutation; L-histidine

目前, L-组氨酸主要应用于氨基酸输液。氨基酸输液已成为中国医疗最常用的药物之一, 用量逐年递增, L-组氨酸生产已经成为制约我国氨基酸行业发展的瓶颈之一。但目前 L-组氨酸生产先进技术主要掌握在欧、美、日等发达国家手里, 主要采用发酵法^[1]。我国由于菌种产酸低, 故未能以发酵法来进行工业化生产。国内主要以猪血为原料, 经强酸水解后, 以离子交换层析法分离提纯得到 L-组氨酸, 污染大, 不宜大规模生产。

本课题通过紫外线与氯化锂复合诱变与用两种单诱变的诱变方法用于谷氨酸棒杆菌, 然后用含有 6-巯基嘌呤 (1 mg/mL) 的筛选培养基进行初筛, 发酵复筛。三种诱变方法分别得到的三株高产菌其产量分别比原始菌的产量提高了 13.6%, 8.5% 和 10.5%, 试验结果证明, 在 L-组氨酸菌株的选育过程中, 紫外线与

氯化锂复合诱变的效果优于它们的单因子诱变。通过本课题的研究, 为 L-组氨酸高产菌株的选育做了一点基础工作。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 出发菌株

本试验的谷氨酸棒杆菌 S₆ (*Corynebacterium glutamicum*) 由湖北工业大学再生资源微生物转化实验室提供。

1.1.2 培养基^[2]

1.2 方法

1.2.1 L-组氨酸的检测^[2]

1.2.2 氯化锂诱变^[3]

出发菌株在完全培养基中培养到生长对数期, 3000 r/min 离心 5 min, 去上清液, 加生理盐水制成菌悬液。0.2 mL 的菌体稀释涂布于氯化锂浓度梯度平板上 (氯化锂质量分数分别是 0.4%, 0.8%, 1.2%, 1.6%, 2.0%), 在 30 °C 培养, 挑取菌落进行筛选。

根据所得的致死曲线, 对菌株采用 80% 左右致

收稿日期: 2007-11-15

基金项目: 工业微生物湖北省重点实验室开放基金资助项目 (工大科[2004]4 号文)

作者简介: 邱雁临 (1942-), 女, 教授、博导, 研究方向为生化技术及再生资源利用

死率的诱变条件进行诱变。

1.2.3 紫外线诱变^[4]

15 W 紫外灯, 竖直距离 30 cm, 搅拌状态下照射, 然后在红光下进行稀释涂布完全培养基平板, 避光培养。

根据所得的致死曲线, 对菌株采用 80% 左右致死率的诱变条件进行诱变。

1.2.4 紫外线-氯化锂复合诱变^[3,5]

先采用紫外线 80% 左右致死率的诱变条件进行诱变, 然后诱变后的菌液采用氯化锂诱变 80% 左右致死率的诱变条件进行复合诱变。

1.2.5 筛选

用无菌牙签从复合诱变后在完全培养基平板上长出的菌落接种于含 1 mg/mL 的 6-巯基嘌呤的基本培养基平板上, 长出的菌落分别接种到斜面, 24 h 后挑取一环接种于种子培养基。12 h 后取 1 mL 接种于发酵培养基中, 发酵 3 d 后检测发酵液中 L-组氨酸的浓度。

1.2.6 菌株稳定性试验

对筛选出的菌株进行传代培养、发酵, 考察 L-组氨酸产量的稳定性。

2 结果与分析

2.1 氯化锂致死曲线

以时间为横坐标, 致死率为纵坐标作图, 得到 LiCl 诱变的致死曲线如图 1。

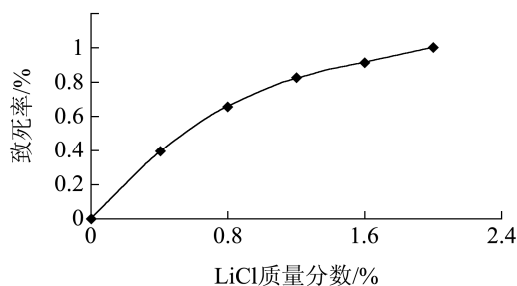


图1 氯化锂诱变致死曲线

Fig.1 Lethality curve of LiCl

如图 1 所示, 随着氯化锂浓度的提高, 菌株的死亡率上升, 在 1.2% 时, 菌株的致死率达到了 82.4%, 1.6% 以后死亡率达到了 90%。本实验选择 1.2% 氯化锂作为诱变剂量。

2.2 氯化锂诱变结果

表1 氯化锂诱变结果

Table 1 Result of LiCl mutation

菌株	S ₆	D ₁	D ₂	D ₃	D ₄
产量/(mg/L)	218	251	253	242	228

在含 1 mg/mL 的 6-巯基嘌呤的基本培养基平板上

挑取 17 株单菌落进行活化发酵, 挑出 L-组氨酸产量 (mg/L) 比出发菌株 S₆ 高的菌株 4 株, 如表 1 所示。

将这 4 株产量稍高的菌株进行传代发酵, 传代 2 次后, 有 2 株菌的产量 (mg/L) 稳定且比出发菌株高, 见表 2。

表2 氯化锂诱变后的传代稳定性结果

Table 2 Stability of L-histidine productivity after LiCl mutation

菌株	S ₆	D ₃	D ₄
第 1 代/(mg/L)	218	241	236
第 2 代/(mg/L)	222	245	242
平均值/(mg/L)	220	243	239

菌株 D₃ 较出发菌 S₆ 所提高程度 = (243-220) / 220 × 100% = 10.5%。

2.3 紫外致死曲线

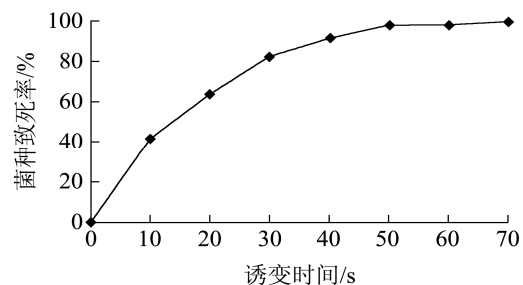


图2 紫外线致死曲线

Fig.2 Lethality curve of UV

如图 2 所示, 随着时间的延长, 菌株的死亡率上升, 在 30 s 时, 菌株的致死率达到了 81.8%, 40 s 以后死亡率达到了 90%。本试验选 30 s 为紫外照射时间。

2.4 紫外线诱变结果

在含 1 mg/mL 的 6-巯基嘌呤的基本培养基平板上挑取 23 株单菌落进行活化发酵, 挑出 L-组氨酸产量 (mg/L) 比出发菌株 S₆ 高的菌株 3 株如表 3 所示。

表3 紫外线诱变结果

Table 3 Result of UV mutation

菌株	S ₆	U ₁	U ₂	U ₃
产量/(mg/L)	221	228	226	242

将这 3 株高产菌株行传代发酵, 传代 2 代后, 有 2 株菌的产量 (mg/L), 稳定且产量比出发菌株高, 见表 4。

表4 紫外线诱变后的传代稳定性结果

Table 4 Stability of L-histidine productivity after UV mutation

菌株	S ₆	U ₁	U ₃
第 1 代/(mg/L)	230	261	245
第 2 代/(mg/L)	243	253	262
平均值/(mg/L)	236	256	248

菌株 U₁ 较出发菌 S₆ 所提高程度 = [(25.6-23.6)/23.6]

×100%=8.5%

2.5 紫外线-氯化锂复合诱变结果

将初筛所得的14株菌种分别发酵,有7株的产量比出发菌株高。这7株菌的产L-组氨酸量(mg/L)分别列于表5。

表5 紫外线与氯化锂符合诱变后的传代稳定性结果

Table 5 Stability of L-histidine productivity after UV-LiCl composite mutation

菌株	S ₆	N ₁	N ₂	N ₃
第1代/(mg/L)	247	255	249	248
第2代/(mg/L)	241	247	243	248
平均值/(mg/L)	244	251	246	248
菌株	N ₄	N ₅	N ₆	N ₇
第1代/(mg/L)	256	242	246	257
第2代/(mg/L)	240	236	244	243
平均值/(mg/L)	248	239	245	250

从表5可以看出,经过6-巯基嘌呤初筛及复筛之后,经过此次筛选后,获得的最高的菌株N₁的L-组氨酸的产量比出发菌株提高。

菌株 N₁ 较出发菌 S₆ 所提高程度 = $[(243-220)/220] \times 100\% = 13.6\%$

3 结论

3.1 通过氯化锂对谷氨酸棒杆菌S₆的诱变致死率曲线,证明在氯化锂浓度为1.2%的剂量平板上,致死率可达80%以上;在诱变剂量为1.2%氯化锂的平板上随机挑取了23株单菌落,经发酵检测并经传代稳定后,其中最高的一株菌产量达到了256 mg/L,与出发菌株S₆相比,产量提高了10.5%。

3.2 通过紫外线(UV)对谷氨酸棒杆菌S₆诱变致死率曲线,证明紫外线诱变的照射时间为30 s,距离30

cm时,致死率可达80%以上;在照射时间为30 s的平板上随机挑取23株菌落,经发酵检测并经传代稳定后,其中最高的一株菌U1L-组氨酸的产量达到了256 mg/L,与出发菌株S₆比,产量提高了8.5%。

3.3 通过二种诱变因子的复合后,在所对应的平板上随机挑取单菌落进行发酵,检测其L-组氨酸的产量,挑选出产量比出发菌株高的菌株共7株,将其传代2次后产量较高且稳定的菌株有4株,其中最高的一株菌N₁的产量达到了251 mg/L,产量提高了13.6%。

4 讨论

4.1 本试验诱变方法有待多样化,如紫外线与亚硝基胍的复合诱变,毒力较弱的紫外线会对毒力很强的亚硝基胍诱变应该会有较好的助诱变作用。

4.2 本试验菌株初筛时所赋予的抗性可同时添加1,2,4-三唑丙氨酸、2-噻唑丙氨酸、6-氮鸟嘌呤、6-氮尿嘧啶、6-巯基嘌呤等的抗性,使菌株产L-组氨酸更加通畅并能大量积累。

参考文献

- [1] 林妙佳,蒙绮芳,周锡梁.组氨酸生产中间控制方法的研究[J].氨基酸和生物资源,2001,23(4):28-31.
- [2] 邱雁临,刘德超,王伟平等.L-组氨酸产生菌株的选育[J].生物技术,2005,15(5):18-20
- [3] 宋超先,许芙蓉,谢玉峰等.L-亮氨酸产生菌 TK0303 的选育研究[J].化学与生物工程,2004,3:32-34
- [4] 陈江源,代江红,刘志国等.麦角酰胺产生菌原生质体的紫外诱变育种[J].化学与生物工程,2005,7:33-35
- [5] 潘涛,周剑,虞龙.紫外诱变柠檬酸产生菌黑曲霉的选育[J].化学与生物工程,2007,24(1):50-52

(上接第 209 页)

- [43] Yaylayan V. A., and Lachambre, S. Pirylium betaines as reactive intermediates in Maillard reaction. J.Food Sci., 1990, 55: 1124-1126
- [44] McWeeny D.J. and Burton, H.S. Some possible glucose/glycine browning intermediates and their reactions with sulphite. J.Sci.Food Agric., 1963,14: 291-302

- [45] Van Boekel, M.A.J.S., Statistical aspects of kinetic modeling for food science problems. J.Food Sci. 1996. 61: 477-485, 489