

鼠李糖脂高产菌株的亚硝基胍诱变选育研究

黄洁, 浦跃武

(华南理工大学生物科学与工程学院, 广东 广州 510640)

摘要: 采用亚硝基胍辅以鼠李糖对铜绿假单胞菌MIG1.46菌株进行诱变, 结合蓝色凝胶平板、油平板和发酵培养测定的选育方法, 获得了鼠李糖脂产量达21.270 g/L且遗传性质稳定的菌株, 产量比原菌株提高361.0%。

关键词: 亚硝基胍; 诱变; 铜绿假单胞菌 MIG1.46; 鼠李糖脂

中图分类号: Q54; 文献标识码: A; 文章篇号:1673-9078(2007)12-0056-03

Screening of High Rhamnolipid-producing Mutants Induced by NTG

HUANG Jie, PU Yue-wu

(College of Biological Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: A new NTG-induced mutant of *Pseudomonas aeruginosa* sp. MIG1.46 was screened using blue gel FP, oil FP and fermentation methods. The yield of rhamnolipid produced by the mutant reached 21.270 g/L, which was 361.0% higher than that by the original strain.

Key words: NTG; mutageniz; *Pseudomonas aeruginosa* sp. MIG1.46; rhamnolipid

鼠李糖脂由鼠李糖基和脂肪酸中的羟基结合而成, 是一种集亲水基和憎水基于一身, 能显著降低空气-水或油-水界面张力的新型生物表面活性剂^[1]。因为与常规化工合成表面活性剂相比, 它具有配伍性好, 低毒低害, 对人体刺激性小, 易生物降解等优点, 因而被广泛应用于环境保护、医疗制药、食品加工保存、日用化工及石油“三次”开采等领域^[2-4]。但成本较高一直是鼠李糖脂工业化应用中的一个瓶颈。利用诱变方法, 从菌种源头提高产量, 一方面可降低成本, 另一方面, 由于不含外源DNA, 诱变菌种不会像基因工程菌那样受到诸多限制, 可以直接用于食品、医药、环境等方面。

1 实验材料

1.1 出发菌种

铜绿假单胞菌 MIG1.46 (*Pseudomonas aeruginosa* sp. MIG1.46) 购自广东省微生物研究所。

1.2 培养基

斜面保存培养基: 营养琼脂斜面。

种子培养基: 牛肉膏 0.5%, 蛋白胨 1%, NaCl 0.5%, pH 7.0。

发酵培养基: NaNO₃ 1.4%、NaCl 0.11%、KCl 0.11%。

收稿日期: 2007-08-17

作者简介: 黄洁(1982-), 女, 硕士研究生, 研究方向主要为微生物发酵及环境微生物; 通讯作者: 浦跃武

K₂HPO₄ 0.44%, MgSO₄ 0.05%, Ca(NO₃)₂ 0.001%, KH₂PO₄ 0.34%, FeSO₄ 0.0002%, 玉米油 10%, 微量元素浓缩液 0.5%; 其中微量元素浓缩液成分(g/L): ZnSO₄·7H₂O 0.29, CaCl₂·4H₂O 0.24, CoCl₂·6H₂O 0.24, CuSO₄·5H₂O 0.25, Mn₂SO₄·H₂O 0.17^[5]。

诱变后筛选采用油平板和蓝色凝胶平板两种。

油平板: 发酵培养基加 2% 琼脂, 1% 卵磷脂。

蓝色凝胶平板: 十二烷基三甲基溴化铵 0.2%, 亚甲基蓝 0.005%, 营养琼脂 2.5%^[6]。

1.3 试剂

磷酸缓冲溶液: 87.7 mL 0.2 mol/L 的 KH₂PO₄ 与 12.3 mL 0.2 mol/L 的 K₂HPO₄ 混合, pH 6.0。

亚硝基胍(NTG)溶液: 在通风橱中称取 100 mg NTG 于棕色瓶中, 加 1 mL 丙酮使其溶解, 溶解后加磷酸盐缓冲液 19 mL, 配制成 5 mg/mL NTG 溶液。

鼠李糖溶液: 0.1 g 鼠李糖标准品加 100 mL 水, 配制成 1 mg/mL 鼠李糖溶液。

蒽酮-硫酸试剂: 50 mL 去离子水加 160 mL 浓硫酸于棕色瓶中, 冷却后加 100 mg 蒽酮, 现配现用。

生理盐水: 8.5 g NaCl 溶于 1000 mL 去离子水。

1.4 仪器设备

Air Tech 超净工作台, 恒温培养箱 (SPX-250B-Z, 上海博迅), 摇床 (New Brunswick Scientific C25KC, EDISON, NJ USA), 离心机 (CF7D2, Himac), 分光光度计 (722S, 上海精科), 水浴锅 (HHS, 上海博迅), 电子天平 (JA2003N, 上海精科), pH 计 (PB-10,

Sartorius)。

2 实验方法

2.1 诱变操作

铜绿假单胞菌由斜面接种至 50 mL 种子培养基, 37 °C 培养 36 h 后, 6000 r/min 离心 10 min, 收集菌体, 用生理盐水和磷酸缓冲溶液分别冲洗一次, 以磷酸缓冲溶液制成菌悬液(菌液浓度控制在 $10^8 \sim 10^9$ /mL), 分两批, 一批加入 NTG 溶液后 37 °C 处理 0.5 h, 磷酸缓冲溶液离心洗涤 2 次后, 稀释到合适倍数, 涂布于平板上; 另一批加入 NTG 溶液 37 °C 处理 0.5 h 后, 加入磷酸缓冲溶液离心洗涤 2 次, 再加入 1 mg/mL 鼠李糖溶液 1 mL, 稀释到合适倍数, 涂布于平板上。

2.2 平板筛选

按每板约 15 mL 培养基量倒平板, 涂布菌液后, 把油平板和蓝色凝胶平板都放入 30 °C 恒温培养箱培养 120 h。从油平板中挑取出较大的菌落, 蓝色凝胶平板中挑取形成晕圈较大的菌落。

2.3 致死率测定

按诱变处理方法, 用不同浓度 NTG 溶液处理菌悬液, 处理时间 0.5 h, 稀释并涂布于平板上, 37 °C 恒温培养箱培养 120 h 后, 计数、计算致死率并绘制致死曲线。

致死率 = [(对照每 0.1 mL 菌落数 - 处理后每 0.1 mL 菌落数) / 对照每 0.1 mL 菌落数] × 100%

2.4 发酵培养

将挑取出的菌株接至种子培养基, 37 °C, 150 r/min 摇床培养 36 h 后, 接至发酵培养基, 37 °C, 150 r/min 摇床培养 7 d。

2.5 鼠李糖脂产量测定

发酵液 6000 r/min 离心 20 min 除去菌体后, 取 5 mL 发酵液加 10 mL 的 4 mol/L H_2SO_4 , 100 °C 水浴 1.5 h, 冷却过滤后, 蒽酮-浓硫酸法测鼠李糖量^[7]。用鼠李糖产量乘以系数 3^[8], 即得鼠李糖脂产量。

2.6 稳定性测定

对挑选出的菌株传代 5 次, 分别进行发酵培养, 检测鼠李糖脂产量。

3 结果及讨论

3.1 平板初筛效果

油平板和蓝色凝胶平板经恒温培养后, 从两种平板上菌落生长情况(图 1)可以看到, 蓝色凝胶平板上, 菌落形成明显的晕圈, 挑取晕圈直径较大的菌落, 留待下一步筛选; 油平板上的菌斑半径较小, 挑取其中

较大而厚的菌落留待进一步筛选。

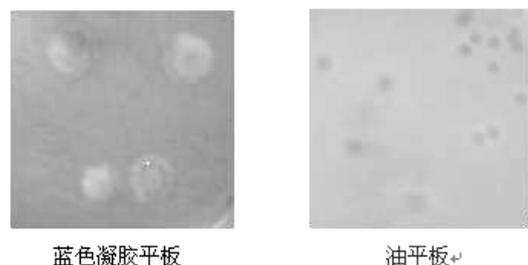


图1 平板上诱变菌株生长图

Fig.1 Mutagenized strains on flat plate

比较两种平板, 油平板上菌落清楚, 生长规律性好, 易计数, 易挑取, 但菌斑较小, 各菌落形态区别不明显; 而蓝色凝胶平板上的菌落产生晕圈较大, 菌落形态区别明显, 便于选取优势菌落, 但菌落生长较为缓慢, 且菌落数规律性差, 不利于计数。所以, 两种平板结合使用进行筛选的方法, 可得到较好的结果。

3.2 致死率测定结果

计算不同诱变剂量的致死率, 对仅使用 NTG 处理组和使用 NTG 及 Rhamnose 处理组分别绘制致死率曲线。

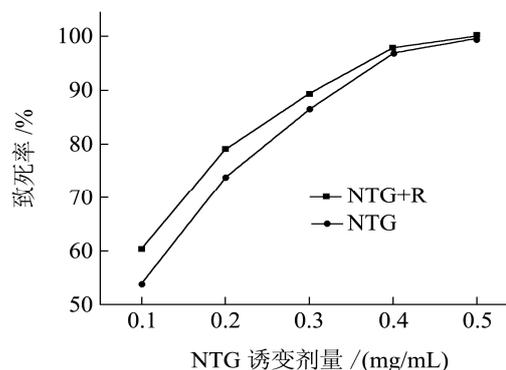


图2 NTG致死曲线

Fig.2 Death ratio plot of NTG

图 2 中显示, 两组菌体的死亡率均呈现随诱变剂量增大而升高的趋势, 曲线斜率逐渐减小, 即诱变剂用量增加对菌体的致死效果逐渐趋缓。当诱变剂量达到 0.5 mg/mL 时, 仅用 NTG 处理的菌株致死率达到 100%。对比两条曲线, 使用 NTG 及 Rhamnose 处理组的致死率普遍降低, 说明添加鼠李糖溶液可以减轻诱变剂对菌体的致死作用。一般来说, NTG 诱变操作中, 诱变剂量使用较大时, 突变株形状改变幅度也会较大, 但容易产生负突变, 使正突变概率相应较小。所以, 在目标形状诱变育种的过程中, 合适的诱变剂量选择和其它诱导物的加入, 是获得高产菌株的关键。对照后续发酵结果, 可以发现鼠李糖脂产量与致死率呈现相同的随诱变剂量增加而增大的趋势, 故致死率

一定程度上可以反映出诱变效果。

3.3 鼠李糖液诱导作用

在高产菌株的选取中, 诱变过程中的致死率和平板上菌落生长状况, 都不能作为诱变效果的最有效验证。为了进一步研究 NTG 诱变剂对铜绿假单胞菌产鼠李糖脂的影响, 需要在摇瓶水平上发酵培养筛选诱变菌株的生产能力。

表1 诱变菌株发酵产量

Table 1 Fermentation yield of mutants

编号	处理剂量(mg/mL)	致死率 /%	鼠李糖脂最大 产量(g/L)	最大正变幅 度/%
1	NTG 0.1mg/mL	60.3	9.000	95.1
2	NTG 0.1mg/mL+R	53.8	5.473	18.6
3	NTG 0.2 mg/mL	79.1	8.511	84.5
4	NTG 0.2 mg/mL+R	73.8	6.846	48.4
5	NTG 0.3 mg/mL	89.3	13.953	202.4
6	NTG 0.3 mg/mL+R	86.4	12.525	171.5
7	NTG 0.4 mg/mL	97.9	16.251	252.2
8	NTG 0.4 mg/mL+R	96.9	20.475	343.8
9	NTG 0.5 mg/mL	100	-	-
10	NTG 0.5 mg/mL+R	99.5	21.261	360.8
0	0	-	4.614	-

表中显示, 在两组处理方法使用 NTG 诱变剂量相同的情况下, NTG 剂量较小时, 加入鼠李糖使药瓶发酵的鼠李糖脂产量及最大正变幅度相对较少; 而 NTG 剂量较大时, 鼠李糖脂的产量及最大正变幅度却随着鼠李糖的加入有所增加。

NTG 的诱变机制在于诱变剂与目标菌 DNA 进行烷化反应后, 在 DNA 复制叉附近引起一个基因突变, 同时诱发临近位置的基因也陆续发生连锁突变, 从而改变菌株表现性状。分析可能在诱变过程中, 添加鼠李糖起到了营养源和诱导突变方向的双重作用, 低诱变剂浓度时, 鼠李糖主要作为营养源, 增强了菌株 DNA 的损伤修复能力, 降低诱变效率, 甚至可能产生负突变; 而高诱变剂量时, 鼠李糖则主要发挥了诱导基因突变向产生 *rhlAB*, *rhlC* 及 *rhlG* 基因^[9]方向发生的作用, 从而合成鼠李糖基转移酶, 催化生成鼠李糖脂, 提高了产量。所以, 高诱变剂量时鼠李糖加入所产生的诱导作用, 有利于高产菌株的获得。

3.4 目标菌株获得及稳定性测试

共从平皿上挑取了 44 株菌, 最高产菌株出现于 NTG 剂量 0.5 mg/mL 并添加鼠李糖诱导后的白色油平板上。鼠李糖脂最高产量达到 21.270 g/L, 正变幅度为 361.0%。

将该菌株进行五次传代后, 分别经发酵培养测定鼠李糖脂产量。数据显示, 各世代突变菌株的鼠李糖脂产量变化不大, 说明其遗传稳定性较好。

表2 各世代菌株鼠李糖脂产量

Table 2 Yield of rhamnolipid for generations

传代数	1	2	3	4	5
鼠李糖脂产量(g/L)	21.261	21.108	21.213	21.270	20.757

4 结论

对铜绿假单胞菌 MIG1.46 进行亚硝基胍诱变, 在添加 NTG0.5 mg/mL 处理 30 min, 并加以鼠李糖液进行诱导, 致死率为 99.5%时, 通过油平板、蓝色凝胶平板初筛及发酵复筛, 获得鼠李糖脂诱变高产菌株, 产量达到 21.270 g/L, 比原菌株提高 361.0%, 该菌株在传代实验中, 遗传性质表现稳定。

参考文献

- [1] 张天胜等编著.生物表面活性剂及其应用[M].北京:化学工业出版社,2005.3
- [2] Harvey S, Elashvili I, Valdes J, et al. Enhanced removal of Exxon Valdez spilled oil from Alaskan gravel by a microbial surfactant[J]. Bio.Technology, 1990, 8: 228 - 230
- [3] Hong K J, Tokunaga S, Kajiuchi T. Evaluation of remediation process with plant-derived biosurfactant for recovery of heavy metals from contaminated soils[J]. Chemosphere, 2002, 49 (4): 379 - 387
- [4] Lang S, Wullbrandt D. Rhamnose lipids-biosynthesis, microbial production and application potential[J]. Applied Microbiology and Biotechnology,1999, 51 (1): 22 - 32
- [5] 浦跃武,张浩嘉,梁世中,等.微生物发酵生产鼠李糖的摇瓶实验研究[J].郑州粮食学院学报,1999,20(2):23-26
- [6] Arino S, Marchal R, Vandecasteele J P. Identification and production of a rhamnolipic biosurfactant by a Pseudomonas species [J]. Appl Microbiol Biotechnol,1996 (45): 162-168
- [7] 袁玉荪.生物化学实验[M].北京:高等教育出版社,1988:13-15
- [8] AbalosA, Maximo F, ManresaM A, et al. Utilization of response surface methodology to optimize the culture media for the production of rhamnolipids by pseudomonas aeruginosa AT10 [J], Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 2002, 77: 777-784
- [9] Siegmund Lang. Biological amphiphiles (microbial biosurfactants) [J]. Current Opinion in Colloid & Interface Science, 2002(7): 12-20