

# 茂原链霉菌原生质体制备条件的优化

包莹玲, 潘力

(华南理工大学生物科学与工程学院, 广东 广州 510640)

**摘要:** 对茂原链霉菌 (*Streptovorticillium mobaraense*) 的原生质体制备进行了研究。研究表明在培养基中加入 4% 的甘氨酸有利于原生质体的释放。茂原链霉菌孢子悬液在 41 °C 下用 2.5 mg/mL 溶菌酶作用 4 h 的效果最好, 原生质体形成率与再生率的乘积可达 24%。

**关键字:** 茂原链霉菌; 原生质体; 响应面法

中图分类号: Q939.9; 文献标识码: A; 文章篇号: 1673-9078(2008)02-0138-05

## Optimization of Protoplast Preparation from Spores of *Streptovorticillium mobaraense*

BAO Ying-ling, PAN Li

(College of Bioscience and Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

**Abstract:** The preparations of protoplast of *Streptovorticillium mobaraense* were studied. Results showed that 4% glycine contained in culture medium were propitious to release of protoplast. The optimal preparation conditions were as follows: enzymatic temperature 41 °C, lysozyme 2.5 mg/mL, enzymatic time 4 h. Under those conditions, the product of the generation rate and regeneration rate reached 24%.

**Key words:** *Streptovorticillium mobaraense*; Protoplast; Response surface methodology (RSM)

茂原链霉菌 (茂原链霉菌 *Streptomyces mobaraensis*) 是生产转谷氨酰胺酶的常用菌种之一, 对其菌株的优化对转谷氨酰胺酶产量及酶活性的提高有着极其重要的作用。茂原链霉菌属于放线菌中的链霉菌属, 为严格好气菌、营养菌丝大量分枝, 气丝形成 3 至多个孢子的链, (G+C) mol% 为 69%~78%。其孢子成链、不游动、外包薄层纤维鞘, 每条孢子链中有 3 到多个孢子, 孢子质地光滑<sup>[2]</sup>。

高产菌的选育是微生物发酵的核心, 常用手段有物理化学诱变及原生质体融合等传统选育方法。随着分子生物学发展出现许多新的分子育种方法, 如以原生质体技术为基础, 基因改组为指导思想, 形成的新的微生物基因组改组的分子育种技术<sup>[1]</sup>。

本研究预计采用基因组改组的方法进行茂原链霉菌 (茂原链霉菌 *Streptomyces mobaraensis*) 的转谷氨酰胺酶高产菌选育。其中原生质体制备好坏直接影响基因组改组的效率。本文旨在研究影响茂原链霉菌原生质体制备过程中的主要因素, 并采用响应面方

收稿日期: 2007-10-15

基金项目: 广东省科技攻关项目 (2006B13001006)

作者简介: 包莹玲 (1983-), 女, 在读硕士, 主要从事工业微生物、食品微生物方面的研究

法优化茂原链霉菌原生质体制备条件。

### 1 材料和方法

#### 1.1 菌株、酶、渗透压稳定剂 (P 液) 和培养基

菌株: 茂原链霉菌 (*Streptovorticillium mobaraense*), 本实验室提供; 溶菌酶 (lysozyme): 购于鼎国公司; P 液: 按文献<sup>[4]</sup>; 茂原链霉菌培养基: 按文献<sup>[6]</sup>。

#### 1.2 菌株的培养

将于 -20 °C 冻干保存的菌种在斜面培养基中活化后, 转接至含一定甘氨酸浓度的斜面培养基中培养 40 h。

#### 1.3 原生质体的制备

收集经 40 h 培养后的菌丝, 用玻璃珠打碎, 4 层纱布过滤, P 液离心洗涤, 用溶菌酶水浴酶解, 每隔 10 min 振荡一次, 滤液离心, 收集原生质体悬浮于 P 液。

#### 1.4 原生质体的形成率和再生率的计算

将酶解前的孢子涂布于发酵培养基上, 30 °C 培养 1 d 后计菌落数 (以 A 表示)。

将制备成的原生质体悬液按以下两个步骤进行:  
(a). 经 P 液稀释后涂布于再生平板上, 30 °C 培养 1 d

后计菌落数 (以 B 表示); (b).用无菌水稀释后涂布于再生平板上, 30 °C 培养 1 d 后计菌落数 (以 C 表示), 此为未形成原生质体的菌落数。

$$\text{原生质体形成率}/\% = 100\% \times (B-C)/B$$

$$\text{原生质体再生率}/\% = 100\% \times (B-C)/(A-C)$$

## 2 结果与分析

### 2.1 原生质体制备和再生条件试验

#### 2.1.1 甘氨酸浓度对原生质体制备的影响

茂原链霉菌在染色分类法上属于革兰氏阳性菌, 细胞壁由含胞壁酸的肽聚糖外层 (20~80 nm) 和含有长链脂肪酸类脂膜的细胞质膜构成。在化学分类上, 茂原链霉菌所属的轮枝链霉菌属 (后归为链霉菌属) 其细胞壁型为 I 型, 即细菌壁肽聚糖分子中肽链第 3 位氨基酸的为 LL-DAP (L,L-二氨基庚二酸) 和甘氨酸, 与邻近肽链以 3-4 交联<sup>[1]</sup>。

培养时加入甘氨酸有利于原生质体的释放, 其作用是在细胞壁合成过程中, 甘氨酸错误地替代与分子结构相似的丙氨酸而干扰细胞壁网状结构合成, 细胞壁表面结构松散, 有助于溶菌酶瓦解细胞壁, 提高原生质体的形成率。

有资料表明培养基中甘氨酸含量在 0.2%~4% 为宜, 其孢子破碎后的 OD<sub>600</sub> 吸光度减小到大约为无甘氨酸的一半时为最适浓度<sup>[4]</sup>。为考察甘氨酸浓度对原生质体形成的影响, 在 30 °C 下用含 0%~5.0% (梯度为 0.5%) 甘氨酸的培养基培养 40 h, 3 s 超声破碎后在 OD<sub>600</sub> 下测菌液的吸光值, 结果见图 1。

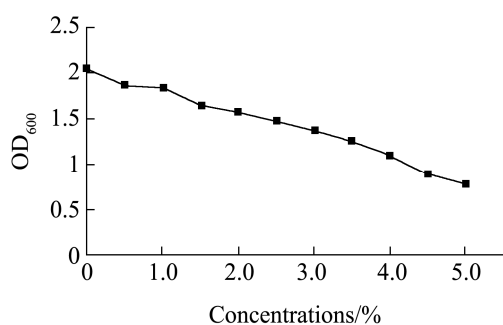


图 1 不同甘氨酸浓度对 OD<sub>600</sub> 值的影响

Fig.1 The effect of glycine concentration on OD<sub>600</sub> of mycelium

由图 1 可看出, 甘氨酸的添加对茂原链霉菌的生长有一定的抑制作用。但并不如上述文献介绍的那么明显。茂原链霉菌无甘氨酸对照培养时 OD<sub>600</sub> 为 2.052, 随着甘氨酸浓度的增加, OD<sub>600</sub> 值不断地降低。当添加甘氨酸浓度至 4.0% 时, 吸光度降低至约为对照的一半, 即 OD<sub>600</sub> 为 1.082, 则采用甘氨酸为 4% 的添加量进行后续实验。氨基酸添加量比较大可能与茂原

链霉菌的细胞壁较厚有关。此外, 茂原链霉菌细菌壁肽聚糖分子中肽链第 3 位氨基酸的为 LL-DAP 和甘氨酸, 也会对甘氨酸对丙氨酸的干扰作用起到部分缓冲, 使得添加量较一般放线菌大。

#### 2.1.2 溶菌酶浓度对原生质体形成和再生的影响

溶菌酶能水解放线菌细胞壁的主要成份肽聚糖。肽聚糖的双糖单位由一个 N-乙酰葡萄糖胺通过 β-1,4 糖苷键与另一个 N-乙酰胞壁酸相连。溶菌酶能水解其中的 β-1,4 糖苷键, 从而导致肽聚糖的“散架”破化细胞壁的结构, 释放出原生质体。但酶的浓度应该适当, 过高或过低都不利于原生质体的形成和再生。为考察溶菌酶浓度对原生质体形成和再生的影响, 采用 1、1.5、2、2.5、3 mg/mL 五个质量浓度, 30 °C 酶解 90 min 进行比较试验。

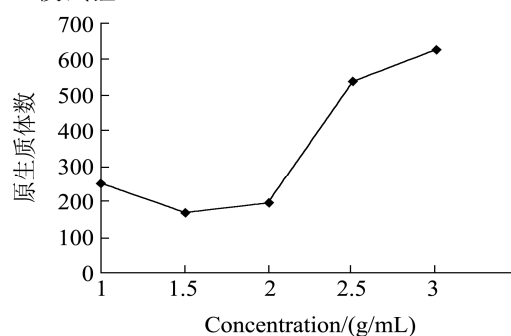


图 2 溶菌酶浓度对原生质体形成的影响

Fig.2 The effect of lysozyme concentration on preparation of protoplast

从图 2 可以看出, 随着溶菌酶的浓度增加, 原生质体的生成数先保持在一个变化较小的范围内, 在超过某一浓度后, 原生质体的生成急剧增大。这是因为酶量过低使酶解不充分, 所以原生质体形成就少, 对原生质体的生成影响不大。此外, 发酵液中的杂蛋白、次级代谢产物也会对影响到酶的活性。当酶量到达一定浓度后, 消除了部分影响因素, 原生质体生成随着酶的添加量大幅增长。

按照 1.4 方法, 统计在 36 °C、90 min 条件下溶菌酶添加量为 2.5、3 mg/mL 时原生质体的形成率和再生率, 如表 1。

表 1 溶菌酶浓度对原生质体形成率和再生率的影响

Table 1 The effects of lysozyme concentration on preparation of protoplast

| 浓度        | 原生质体形成率/% | 原生质体再生率/% | 原生质体形成率*原生质体再生率/% |
|-----------|-----------|-----------|-------------------|
| 2.5 mg/mL | 12.8      | 17.5      | 2.24              |
| 3.0 mg/mL | 14.3      | 10.3      | 1.47              |

从表 1 知, 随着溶菌酶浓度的不断升高, 原生质

体的形成率的升幅不断降低；而原生质体的再生率却大幅下降。根据原生质体形成率和原生质体形成率的乘积得出，酶浓度为 2.5 mg/mL 时，原生质体的生成率和再生率之积最大。因此在制备茂原链霉菌原生质体采用 2.5 mg/mL 溶菌酶进行酶解。

2.1.3 酶解时间对原生质体形成和再生的影响

酶解时间的长短能影响茂原链霉菌细胞壁的脱壁程度，进而影响原生质体的形成和再生。在酶浓度为 2.5 mg/mL，酶解温度为 30 °C 的条件下，按酶解时间(1~5 h) 进行形成原生质体梯度实验，测定原生质体的形成率和再生率。结果如图 3。

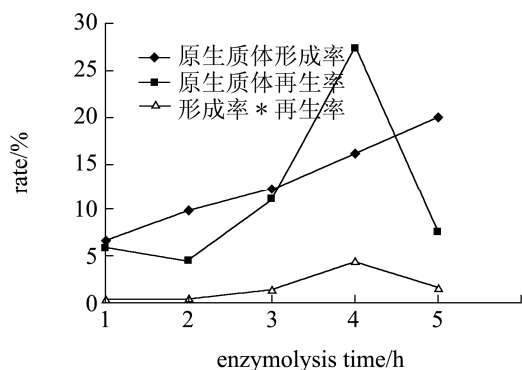


图 3 酶解时间对原生质体形成率和再生率的影响

Fig.3 The effect of enzymolysis time on preparation of protoplast

从图 3 可以看出，随着酶解时间的增加，原生质体的形成率呈幅度较大的增加，而再生率却先增后降，原因可能是超过酶解某一临界值后，细胞壁酶解过于充分，失去再生引物，而溶菌酶对细菌的毒害作用也更为明显，从而导致再生率的降低。综合考虑原生质体的形成量和再生率，在制备茂原链霉菌原生质体时，酶解时间以 4 h 为宜。

2.1.4 酶解温度对原生质体形成和再生的影响

酶的催化作用与温度有密切的关系，当酶浓度及底物浓度固定时，在一定限度内酶所催化的反应常随着温度的升高而加快，超过一定的温度界限，活力下降。不同的酶具有不同的作用温度，菌株的生长也需要最适温度。温度过高或者过低不但对酶的活性有影响，也将导致原生质体活性降低，甚至被破坏。酶浓度为 2.5 mg/mL、酶解时间为 4 h 时不同酶解温度

(36 °C、39 °C、42 °C、45 °C) 对原生质体形成和再生的影响如图 4 所示，在所设定的温度范围内原生质体的形成率和再生率都随温度的变化有显著的变化，可见温度在茂原链霉菌原生质体制备过程中起着极其重要的作用，为原生质体形成率和再生率提高的关键因素。原生质体的形成量和再生率的乘积在 42 °C 时达到最大，所以选择制备茂原链霉菌原生质体的最适温度为 42 °C。

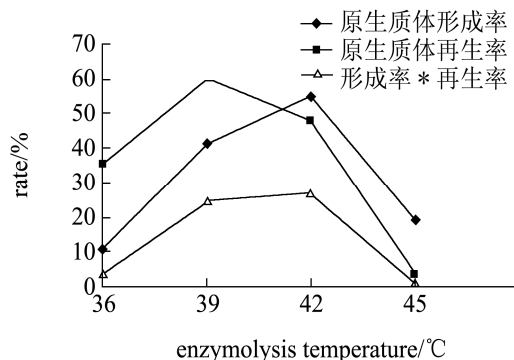


图 4 酶解温度对原生质体形成率和再生率的影响

Fig.4 The effect of enzymolysis temperature on preparation of protoplast

2.2 最佳原生质体制备工艺条件的确定

在单因素实验基础上，对影响原生质体制备工艺的三个主要因素：酶添加量 (X<sub>1</sub>)、酶解时间 (X<sub>2</sub>) 和酶解温度 (X<sub>3</sub>)，进行二次回归正交实验分析<sup>[7]</sup>，以确定最佳原生质体制备工艺。因素与水平取值，实验方案和结果见表 2。

表 3 为应用 SPSS 13.0 软件对表 2 中的数据进行回归方程方差分析和显著性检验。

选择对响应值显著的各项，将实验结果用 MATLAB7.0 软件进行分析，拟合方程。可得溶菌酶浓度(X<sub>1</sub>)、酶解时间(X<sub>2</sub>)和酶解温度(X<sub>3</sub>)与茂原链霉菌原生质体形成率之间的二次多项回归方程：  

$$Y = -1496.17 + 122.91X_1 + 42.92X_2 + 62.93X_3 - 22.12X_1^2 - 4.72X_2^2 - 0.77X_3^2 - 1.54X_1X_2 - 0.13X_1X_3 - 0.48X_2X_3$$
 由表 3 可知，该模型回归显著(Sig.<0.005)，方程 X<sub>3</sub> 一次项是显著的，该模型的 R<sup>2</sup>=0.986、R<sup>2</sup>=0.943，说明该模型与实验值拟合较好，可用于茂原链霉菌原生质体制备的理论预测。

表2 响应面实验安排与实验安排及结果

Table 2 Box-Behnken experimental design matrix with experimental and predicted values

| 实验号 | 酶添加量/(mg/mL) | 酶解时间/h | 酶解温度/°C | 原生质体形成率/% | 原生质体再生率/% | 形成率*形成率 | 预测值%  |
|-----|--------------|--------|---------|-----------|-----------|---------|-------|
| 1   | -1(2)        | -1(3)  | 0(42)   | 46.15     | 27.42     | 12.65   | 12.14 |
| 2   | 1(3)         | -1(3)  | 0(42)   | 50.76     | 29.51     | 14.98   | 14.39 |
| 3   | -1(2)        | 1(5)   | 0(42)   | 52.31     | 22.38     | 11.70   | 12.29 |
| 4   | 1(3)         | 1(5)   | 0(42)   | 55.38     | 19.80     | 10.96   | 11.47 |
| 5   | -1(2)        | 0(4)   | -1(39)  | 34.27     | 45.89     | 15.73   | 15.78 |
| 6   | 1(3)         | 0(4)   | -1(39)  | 31.96     | 52.44     | 16.76   | 16.86 |
| 7   | -1(2)        | 0(4)   | 1(45)   | 22.54     | 19.61     | 4.42    | 4.29  |
| 8   | 1(3)         | 0(4)   | 1(45)   | 23.33     | 20.00     | 4.67    | 4.62  |
| 9   | 0(2.5)       | -1(3)  | -1(39)  | 36.53     | 47.14     | 17.22   | 17.69 |
| 10  | 0(2.5)       | 1(5)   | -1(39)  | 38.07     | 45.27     | 17.23   | 16.60 |
| 11  | 0(2.5)       | -1(3)  | 1(45)   | 28.00     | 19.50     | 5.46    | 6.09  |
| 12  | 0(2.5)       | 1(5)   | 1(45)   | 25.00     | 17.52     | 4.90    | 4.43  |
| 13  | 0(2.5)       | 0(4)   | 0(42)   | 52.50     | 45.65     | 23.96   | 22.82 |
| 14  | 0(2.5)       | 0(4)   | 0(42)   | 48.71     | 41.30     | 20.12   | 22.82 |
| 15  | 0(2.5)       | 0(4)   | 0(42)   | 51.28     | 43.47     | 22.29   | 22.82 |
| 16  | 0(2.5)       | 0(4)   | 0(42)   | 51.21     | 46.67     | 23.89   | 22.82 |
| 17  | 0(2.5)       | 0(4)   | 0(42)   | 50.00     | 47.72     | 23.86   | 22.82 |

表3 各回归方程中系数显著性检验

Table 3 Tests of Between-Subjects Effects

| Source                          | Sum of Squares | df | Mean Square | F       | Sig   |
|---------------------------------|----------------|----|-------------|---------|-------|
| Model                           | 762.970        | 12 | 63.581      | 22.918  | 0.004 |
| Intercept                       | 2085.371       | 1  | 2085.371    | 751.694 | 0.000 |
| X <sub>1</sub>                  | 1.030          | 1  | 1.030       | .371    | 0.575 |
| X <sub>2</sub>                  | 3.809          | 1  | 3.809       | 1.373   | 0.306 |
| X <sub>3</sub>                  | 281.913        | 1  | 281.913     | 101.618 | 0.001 |
| X <sub>1</sub> * X <sub>2</sub> | 2.356          | 1  | 2.356       | 0.849   | 0.409 |
| X <sub>1</sub> * X <sub>3</sub> | 0.152          | 1  | 0.152       | 0.055   | 0.826 |
| X <sub>2</sub> * X <sub>3</sub> | 0.081          | 1  | 0.081       | 0.029   | 0.872 |
| Error                           | 11.097         | 4  | 2.774       |         |       |
| Total                           | 4474.105       | 17 |             |         |       |

R Squared = 0.986 (Adjusted R Squared = 0.943)

R Squared = 0.986 (Adjusted R Squared = 0.943)

2.3 响应因素水平的优化

由回归方程作响应曲面图及其等高线图，见图5~7。通过该组图即可对任何两因素交互影响茂原链霉菌原生质体形成效率进行分析与评价。对回归方程求导数，得到茂原链霉菌原生质体制备最佳条件为：溶菌酶浓度 2.5 mol/L、酶解时间为 4 h 和酶解温度 41 °C，并用在该条件下制备的原生质体形成率\*再生率为 24%。

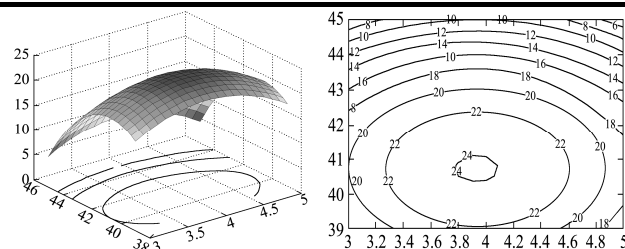


图5  $f = (X_2, X_3)$

Fig.5 Effect of enzymolysis time(h) (X<sub>2</sub>) and enzymolysis temperature(°C) (X<sub>3</sub>) on protoplast production at 2.5 g/mL lysozyme concentration (X<sub>1</sub>)

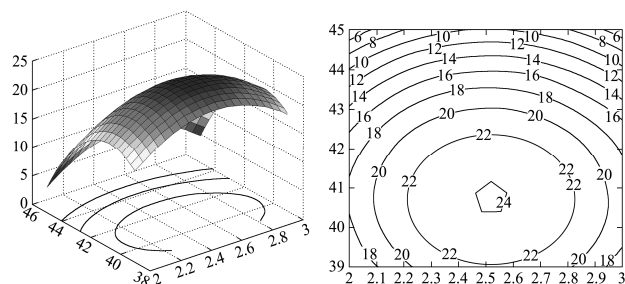


图6  $f = (X_1, X_3)$

Fig.6 Effect of lysozyme concentration(g/ml) (X<sub>1</sub>) and enzymolysis temperature(°C) (X<sub>3</sub>) on protoplast production at 4h enzymolysis time (X<sub>2</sub>)

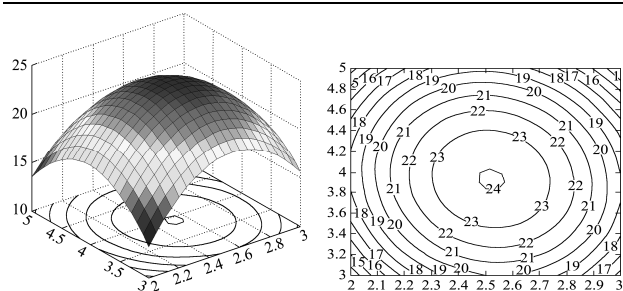
图7  $f = f(X_1, X_2)$ 

Fig.7 Effect of lysozyme concentration(g/ml) ( $X_1$ ) and enzymolysis time(h) ( $X_2$ ) on protoplast production at 41 °C enzymolysis temperature ( $X_3$ )

### 3 结论

3.1 实验中以茂原链霉菌原生质体形成率和再生率为指标，对茂原链霉菌原生质体制备条件进行了初步研究，结果表明，酶作用温度与溶菌酶浓度对茂原链霉菌的制备有显著影响，而茂原链霉菌的酶解时间对其原生质体制备特性影响较小。

3.2 将响应面分析法应用于茂原链霉菌原生质体制备上，通过对试验结果的分析比较，确定了最佳条件

为：溶菌酶浓度为 2.5 mol/L、酶解时间为 4 h，温度为 41 °C，在该条件下制备的茂原链霉菌原生质体，可使原生质体形成率和原生质体再生率的乘积达到 24%。采用响应面分析法可对茂原链霉菌原生质体制备条件进行优化。

### 参考文献

- [1] Krautwig, B., Lörz, H., 1995. Cereal protoplasts. *Plant Sci.* 111, 1-10
- [2] 刘志恒,姜成林.放线菌现代生物学与生物技术[M].北京:科学出版社,2004.296-299
- [3] Pesacreta TC, Carlson LC, Triplett BA (1997) Atomic force microscopy of cotton fiber cell wall surfaces in air and water: quantitative and qualitative aspects. *Planta* 202:435-442
- [4] 工业微生物实验技术手册
- [5] 周德庆.微生物学教程[M].高等教育出版社,2002.32-33
- [6] 燕国梁,堵国成,陈坚.谷氨酰胺转氨酶发酵条件的优化研究[J].工业微生物,2003,3:1
- [7] 吴有炜.试验设计与数据处理[M].苏州:苏州大学出版社, 2002.135-142

### Labthink兰光包装安全与检测技术全球巡回讲座拉开帷幕

为了推动包装安全与检测技术的发展与进步，Labthink 兰光将于 2008 年 3 月~11 月期间，在全球 31 个城市举办“2008Labthink 兰光包装安全与检测技术全球巡回讲座”，邀请包装质量检测机构，科研院校，行业协会，包装、彩印企业以及食品、药品、化妆品生产企业等，共同探讨包装检测控制技术的应用与发展。

作为中国包装检测行业的引领者，Labthink 兰光以完备的研究设施、完整的核心技术、完善的解决方案著称业界，拥有涵盖全球检测标准最全的高分子聚合物阻隔性实验室。凭借专业严谨的创新精神、及时周到的技术服务、遍布全球的营销网络以及敬业高效的人才精英团队，Labthink 兰光已为全球 3000 多家客户提供数万套检测设备及多层次技术服务。

近年来，Labthink 兰光在软包装检测技术研究领域不断推陈出新，许多新产品、新技术在业内引起巨大反响。本次巡回讲座期间，Labthink 兰光将就与食品、药品、化妆品直接接触的包装材料对产品货架期的影响与控制；商品包装从深冷到高温宽泛应用环境下的阻隔性检测技术；中国法定检验机构食品、药品包装材料试验方法与数据体系的共性与特点；全球化的软包装产品质量检测控制解决方案等问题与参会者进行面对面的交流，并将与参会者分享一系列代表 Labthink 兰光最新发展成果的新产品、新技术：比如在全球处于领先地位的测试准确度高达  $0.01 \text{ cm}^3/\text{m}^2 \cdot 24 \text{ h} \cdot 0.1 \text{ MPa}$  的气体渗透仪；为分析薄膜材料非常温下的透气性能分析攻克一大难关并入选国家科技项目的“软包装材料阻隔性数据拟合分析应用技术”；为实现不同实验室数据集中管理、实时监控提供可能的 LDS-01 实验室数据共享系统等。

巡回讲座将在中国的厦门、福州、长沙、武汉、成都、重庆、温州、宁波、杭州、青岛、上海、南京、无锡、郑州、漯河、合肥、桐城、天津、北京、沈阳、大连、广州等 22 个城市以及比利时布鲁塞尔、美国芝加哥、日本东京、德国杜塞尔多夫、俄罗斯莫斯科、荷兰乌得勒、韩国首尔、泰国曼谷、印度钦奈等地举办。