

新型常压室温等离子体 (ARTP) 快速诱变 高产苏氨酸的突变株

蔡友华¹, 李文峰¹, 卢伟宁¹, 郑明英¹, 陆最青¹, 张翀², 李和平³, 邢新会²

(1. 广东肇庆星湖生物科技股份有限公司, 广东肇庆 526060)

(2. 清华大学化工系, 北京 100084) (3. 清华大学工物系, 北京 100084)

摘要: 本文采用新型常压室温等离子体 (ARTP) 生物诱变育种技术, 基于 48 孔板高通量筛选获得一株 L-苏氨酸产量明显提高的突变株 (1905#)。相比较与出发菌株, 在相同的发酵培养条件下, 1905# 突变株鲁棒性较好、生长速率加快, 最佳温度 (37℃) 和 pH(7.2) 基本一致, 能耐受更低的 pH 值。孔板初筛结果表明苏氨酸浓度提高了 133.59%, 并且对摇瓶发酵过程进行了研究, 相比较与出发菌株糖代谢速率加快, 产酸强度提高, 苏氨酸浓度提高了 99.6%。经 50 次传代, 1905# 突变株表现出很好的遗传稳定性, 为产业化水平的提高提供了坚实的理论基础和参考。

关键词: 常压室温等离子体; 苏氨酸; 诱变; 高通量筛选

文章编号: 1673-9078(2013)8-1888-1892

A Mutant Strain with High Threonine Yield Obtained by Rapid Mutation Using Novel Atmospheric and Room Temperature Plasmas

CAI You-hua¹, LI Wen-feng¹, LU Wei-ning¹, ZHENG Ming-ying¹, LU Zui-qing¹, ZHANG Chong², LI He-ping³,
XING Xin-hui²

(1. Star Lake Bioscience Co, Inc, Zhaoqing 526060, China) (2. Department of Chemical Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China) (3. Department of Engineering Physics, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract: To obtain mutants with high threonine productivity, atmospheric and room temperature plasmas (ARTP) mutation technique was used and combined with high throughput screening based on 48 well plates. Mutant 1905# was screened with high threonine productivity. Compared with original strain under the same fermentation conditions, the mutant 1905# showed better robustness and faster growth rate. The mutant showed similar optimum temperature (37 °C) and pH (7.2) to the original strain, but it can tolerate lower pH. In the preliminary plate screening, the threonine concentration increased by 133.59%. For the flask fermentation process, the mutant 1905# showed higher glucose consumption and enhanced threonine productivity. The threonine concentration by the mutant was increased by 99.6% compared with that by the original. The 1905# mutant showed high genetic stability after 50 subcultures, offering theoretical reference for further increasing threonine industrialization level.

Key words: atmospheric and room temperature plasmas (ARTP); threonine; mutation; high throughput screening

L-苏氨酸 (简写 L-Thr) 的化学名称为 α -氨基- β -羟基丁酸, 属于脂肪族氨基酸。苏氨酸有 4 种异构体, 天然存在并对机体具有生理活性作用的是 L-苏氨酸^[1]。在人体和动物的 8 种必需氨基酸中, 苏氨酸是仅次于蛋氨酸、赖氨酸和色氨酸的第 4 种氨基酸^[2]。目前, 苏氨酸在人体和动物的生长发育中发挥着较为重要的作用, 已被广泛应用于医疗、食品和饲料等行业

^[3-4]。L-苏氨酸的生产方法主要有蛋白质水解法、化学合成法和生物发酵法。生物发酵法因其生产成本低、节约资源、节能环保等优点成为 L-苏氨酸生产的首选方法。

由清华大学与北京思清源生物科技有限公司联合自主研发的新型常压室温等离子体 (ARTP) 生物诱变育种技术, 由于其具有射流温度低 (25~35 °C), 活性粒子分布均匀, 对人体和环境无危害, 设备简单, 操作简易等优势^[5-6], 已然成为生物诱变育种领域的一个研究热点。SOS/Umu 试验结果表明, ARTP 具有独特的基因损伤机制, 通过降低细胞膜表面电势以增加

收稿日期: 2013-04-14

基金项目: 清华大学自主科研计划项目 (2011Z01019)

作者简介: 李文峰, 工程师, 主要从事发酵工程方面的研究

通讯作者: 邢新会, 教授

通透性, 活性粒子进入细胞对 DNA 产生损伤作用, 其对基因的损伤效果要明显高于 NQO、UV 和 DES 等传统诱变方式^[7]。研究表明, 阿维链霉菌、发孢甲基变菌、酵母菌等微生物通过 ARTP 诱变, 突变速度快、突变库多样性大, 并成功地筛选获得高产突变株^[8-9]。因此, ARTP 为食品发酵工业提供了一种获得安全性高的优良菌种的可靠方法。

目前, 尚未有关于使用常压室温等离子体 (ARTP) 诱变筛选 L-苏氨酸高产菌株的突变菌方法报道。本研究以本公司的 L-苏氨酸生产菌株 -*Escherichia coli* THR6 作为出发菌株, 利用 ARTP 对菌株进行诱变, 筛选得到一株苏氨酸产率高、糖消耗速率快的突变株 (1905#), 为 L-苏氨酸的工业化生产提供了获得优良菌种的方法。

1 材料和方法

1.1 仪器和药品

药品: 苏氨酸标准品 (由广东肇庆星湖生物科技股份有限公司提供), Fmoc-Cl (Sigma 公司), 硼酸、盐酸、醋酸、醋酸钠、氯化钠、碳酸钙, 国药集团化学试剂有限公司; 葡萄糖, 西陇化工股份有限公司; 酵母抽提物 (OXOID, England); 蛋白胨, OXOID, England; 乙腈、甲醇, 天津四友公司, 色谱纯。

仪器: 孔板摇床 (HTS-T008), 上海甘薇生物科技有限公司; 超净台 (HDL 哈东联); 离心机 (KUBOTA5922), 日本制造; pH 计 (520Aplus, Thermo Orion); 可见分光光度计 (722S 型), 上海精密科学仪器有限公司; 自动化工作站 (YT-CJ-2ND, 北京亚泰科隆), 高效液相色谱, LC-20AT, SHIMADZU, 日本; Agilent HC-C18(2) 色谱柱 (安捷伦公司), ARTP 生物育种机, 北京思清源生物科技有限公司, 北京。

1.2 菌种和培养基

菌种: 由广东肇庆星湖生物科技股份有限公司技术中心提供, 产苏氨酸基因工程菌 *Escherichia coli* THR6。

种子培养基 (g/L): 酵母粉 5, 蛋白胨 10, 氯化钠 5, NaOH 调 pH 7.2, 在 37 °C、180 r/min 条件下培养 8h。固体培养基: 在种子培养基基础上加入 20 g/L 琼脂粉。以上培养基均在 121 °C 灭菌 15 min。

发酵培养基 (g/L): 葡萄糖 100, 硫酸铵 25, 磷酸二氢钾 2, 硫酸镁 0.4, 硫酸锰 0.01, 桔水 1, 玉米浆膏 3, 碳酸钙 40, NaOH 调 pH=7.2。葡萄糖单独分

消, 均为 118 °C 灭菌 15 min。在 37 °C、250 r/min 条件下培养 60 h。

1.3 ARTP 诱变操作

本研究利用 ARTP 对产苏氨酸基因工程菌进行诱变, 以 99.99% 氦气作为工作气体, 在电源功率为 115 W、工作气流量为 10 L/min、等离子体发射源与样品之间距离为 2 mm、样品量为 10 μL (培养 3~4 h 的菌液), 操作温度在 23.0~35.0 °C 的条件下进行诱变的突变效率最高。为了寻找最佳的诱变处理时间, 首先分别考察了照射时间为 0.5 min、1 min、1.5 min、2 min、2.5 min、3 min 时的细菌致死率。对处理过的样品在适当的稀释度下涂板, 通过 CFU 来计算其致死率 (下式), 并获得致死曲线^[9]。

致死率按如下公式计算:

$$\text{Lethality}(\%) = \frac{U-T}{U} \times 100\%$$

注: 其中 U 为不经过诱变处理对照菌的总菌落数, T 为诱变处理后对应的总菌落数。

1.4 高通量筛选方法

培养细菌 3~4 h (OD~0.4~0.6) 到达对数生长期, 取 10 μL 菌液点在载片上 ARTP 诱变处理 1.5 min, 将载片放入已装 1 mL 新鲜培养基的离心管进行复苏, 混匀, 稀释到一定倍数, 取 100 μL 稀释菌液涂布平板, 37 °C 培养 12~24 h, 平板长出 20~40 个单菌落。按照上述诱变操作程序, 平行诱变 10 块载片并涂板。根据菌落生长的大小、圆整和丰度, 随机挑选单菌落进行高通量筛选, 本研究的高通量筛选模型除结合使用了自动化工作站, 其它筛选过程同郑明英等^[9], 提高了筛选效率与获得高产率突变菌的概率。

1.5 分析检测方法

1.5.1 pH 值的测定

使用 pH 计精密测定。

1.5.2 细胞生长的测定

用盐酸除去发酵培养液中的碳酸钙, 稀释到一定倍数, 用 722S 型可见分光光度计在 562 nm 波长处测定吸光度。

1.5.3 L-苏氨酸的测定

高通量筛选采用茚三酮显色法检测^[10], 摇瓶复筛时则用 Fmoc-Cl 柱前衍生高效液相检测方法^[11]。还原糖的测定: 采用 3,5-二硝基水杨酸法^[12]。

1.6 数据统计

本实验除致死率和孔板培养实验外均做 3 个平行, 采用 Minitab 软件进行数据统计, 计算标准偏差。

2 结果与分析

2.1 ARTP 致死率曲线测定

按照方法 1.3 对产苏氨酸工程菌的 ARTP 致死率曲线进行了测定, 如图 1 所示。

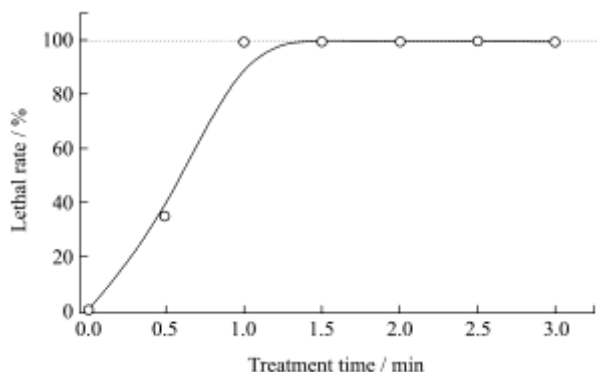


图 1 苏氨酸生产菌的 ARTP 致死率曲线

Fig.1 The lethal rate of threonine-producing bacterium by ARTP

由图 1 可知, ARTP 对苏氨酸生产菌具有很强的致死效应, 按方法 1.5.3 对菌体的致死率进行了计算, ARTP 处理 1 min 时, 其致死率达到了 99.3%。把致死率控制在 99% 以上, 可能有利于提高获得生存能力和产苏氨酸能力增强突变菌株的概率, 由此本研究将诱变处理时间定为 1.5 min。

2.2 突变菌株的筛选

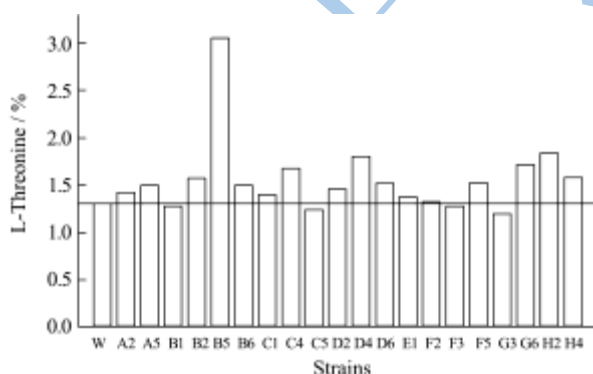


图 2 出发菌株和 20 个突变菌培养 48h 的苏氨酸产量

Fig.2 The threonine production by the 20 mutants and original strain after 48h fermentation

在长出单菌落的平板上, 根据菌落生长的大小、圆整和丰度, 随机共挑取了 200 个单菌落进行培养和发酵筛选。筛选结果表明, 有 127 个菌株与出发菌株相比, 产酸水平具有较大差异, 选取其中 20 株孔板产酸有明显差异的与出发菌株进行比较, 如图 2 所示。

在这些突变菌株中, 发现一株在相同的发酵培养条件下产酸能力特别好的突变菌, 在孔板培养中, 苏氨酸产量达到 30.6 g/L, 相比较与出发菌株, 其苏氨酸产量提高了 133.59%。对从 B5 孔筛选得到的该突变株命名为 1905#菌。

2.3 突变菌生物学特性研究

对获得的这株 1905#突变株进行生物学特性研究实验, 通过与出发菌株比较菌体形态、生长曲线、pH 和温度范围, 结果如图 3 所示。

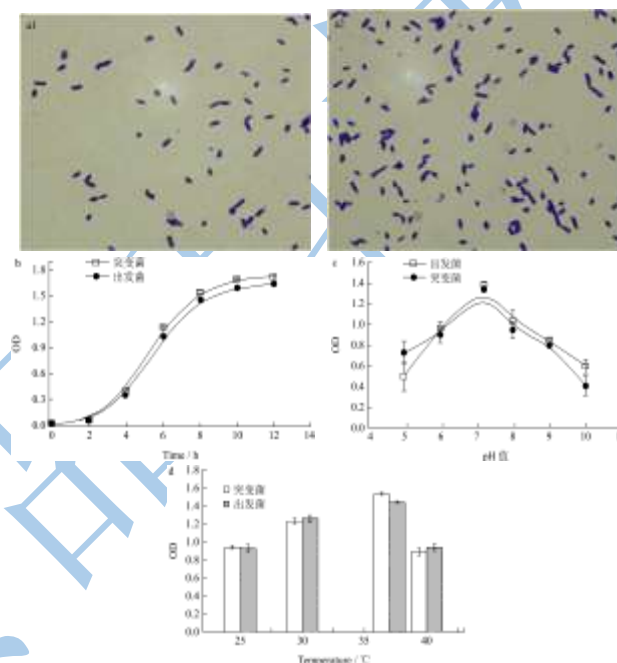


图 3 (a) 出发菌株与 1905#突变菌菌体形态、(b) 生长曲线、(c) 不同 pH 条件下的的生长情况及 (d) 生长温度范围的比较

Fig.3 (a) The morphology, (b) typical growth curves, (c) growth performance at different pH and (d) growth performance at different temperatures of the original strain and the mutant 1905#

注: a1: 24h 左为出发菌株; a2: 右为 1905#突变菌株。

由图 3a 可以看出, 突变菌的显微形态具有微小差异, 相比较与出发菌株, 形态较长且粗, 着色较深。图 3b 中出发菌与突变菌的生长趋势基本一致, 都能快速进入对数生长期, 只是突变菌比出发菌要长得稍快。通过研究两株菌的生长 pH 范围, 发现突变菌和出发菌在 pH 5~10 下均能生长, 两者最适生长 pH 一样, 但突变菌对酸的耐受性更强些。由图 3d 可知, 突变菌与出发菌的最适生长温度是 37 °C。

2.4 突变菌的发酵特性研究

为了研究突变菌株 1905#在摇瓶发酵中的培养特性, 以出发菌作为对照, 在相同的条件下培养 60 h。

在整个发酵过程,在不同时间点检测菌体生长情况。从30 h开始,每隔6 h检测突变菌与出发菌的产苏氨酸及消耗葡萄糖的情况,结果如图4所示。

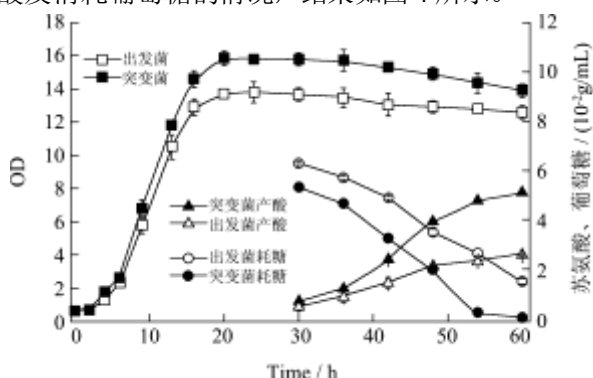


图4 突变菌1905#及出发菌的摇瓶发酵过程

Fig.4 The time course fermentation of mutant and original strain

由图4可知,突变株1905#与出发菌株在整个摇瓶发酵过程的生长趋势基本一致,都表现出很短的停滞期,可迅速进入对数生长期,约在20 h到达稳定期。但突变菌的生长速率明显比出发菌要快,且菌体的最高生长OD比出发菌要高出2.1左右,约提高了15.77%。从葡萄糖消耗及产苏氨酸的情况来看,在相同的培养条件下,突变菌的葡萄糖消耗速率明显比出发菌要快,苏氨酸产量和产率比出发菌要高。摇瓶发酵经过60 h,突变菌可积累苏氨酸50.9 g/L (5.09%),比原始菌提高了99.6%。

2.5 突变菌遗传稳定性研究

为了研究突变株1905#的遗传稳定性,首先在固体培养基平板上活化细菌,再转移到液体培养基进行一级培养,连续传代培养50次,分析比较突变菌生产苏氨酸能力的遗传稳定性,结果如图5所示。

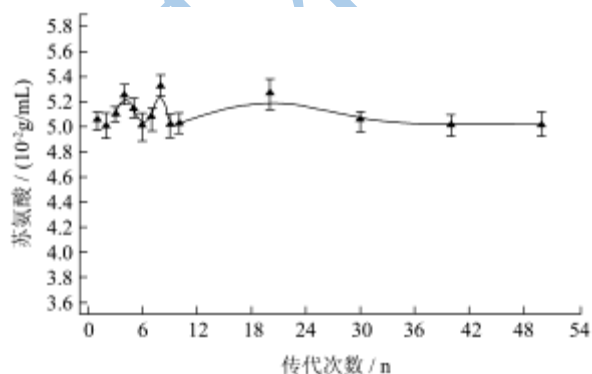


图5 1905#突变株遗传稳定性

Fig.5 The inherit stability of 1905# mutant

由图5所示,1905#突变株的遗传稳定性很好,苏氨酸产量稳定。

3 结论

3.1 本研究采用ARTP快速诱变和高通量筛选苏氨酸生产菌突变株的育种新技术,获得了一株苏氨酸产量明显提高的突变菌株,摇瓶产酸达到50.6 g/L,与出发菌相比,提高了99.6%。在摇瓶发酵相同的培养条件下,发现该突变菌株比出发菌能够更加快速地消耗培养基中的葡萄糖,在相同的发酵周期内生产更多的苏氨酸。通过传代培养,苏氨酸产量能稳定维持在高水平,表明经ARTP诱变获得的这株突变菌的遗传稳定性高。

3.2 对于获得的这株突变菌,还要进一步开展以下工作:1) 本文的实验结果均是在摇瓶条件下得到的,由于摇瓶培养过程中营养、溶氧和pH等条件不能调控,接下来需要通过发酵罐培养对突变菌生产苏氨酸的过程和发酵特性进行分析,并进一步优化其发酵条件,为中试和生产提供基础;2) 对突变菌进行基因测序,与出发菌进行比对分析,研究突变菌的突变机理及苏氨酸产量提高的原因。

参考文献

- [1] 蒋滢.氨基酸的应用[M].上海:世界图书出版公司,1999
Jiang Ying. The Application of Amino Acids[M]. Shanghai: World Book Inc, 1999
- [2] 黄金,徐庆阳,陈宁.L-苏氨酸的生产方法及研究进展[J].河南工业大学学报(自然科学版),2007,28(5):88-92
Huang Jin, Xu Qing-yang, Chen Ning. The methods and study evolution of L-Threonine production[J]. Journal of Henan University of Technology (Natural Science Edition), 2007, 28(5): 88-92
- [3] 常尊学,李福德.L-苏氨酸产生菌选育的研究[J].沈阳药学院学报,1990,7(3):185-188
Chuang Zun-xue, Li Fu-de. A study on the breeding of L-Threonine producers [J]. Journal of Shenyang College of Pharmacy, 1990, 7, 3: 185-188
- [4] Ning Chen, Jin Huang, Zhi-bin Feng, et al. Optimization of Fermentation Conditions for the Biosynthesis of L-Threonine by Escherichia coli [J]. Appl Biochem Biotechnol, 2009, 158: 595-604
- [5] Pei-Xia Jiang, Li-Yan Wang, Zi-Liang Huang, et al. Studies on the mutation breeding mechanism of Streptomyces avermitilis by a novel atmospheric-pressure, low-temperature discharge plasma [J]. Journal of Biotechnology, 2008, 136S, S22-S71

- [6] Yuan Lu, Liyan Wang, Kun Ma, et al. Characteristics of hydrogen production of an *Enterobacter aerogenes* mutant generated by a new atmospheric and room temperature plasma(ARTP) [J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2011, 55: 17-22
- [7] 王立言.常压室温等离子体对微生物的作用机理及其基础研究[D].北京:清华大学,2010
Wang Li-yan. Studies of the Mechanisms and Applications of the Atmospheric Room Temperature Plasmas Acting on the Microbes [D]. Beijing: Tsinghua University, 2010
- [8] L Y Wang, Z L Huang, G Li, et al. Novel mutation breeding method for *Streptomyces avermitilis* using an atmospheric pressure glow discharge plasma [J]. *Appl. Microbiol.* 2009, 108: 851-858
- [9] 郑明英,蔡友华,陆最青,等.常压室温等离子体快速诱变筛选高脯氨酸产率突变株[J].*食品与发酵工业*,2013,39(1):37-41
Zheng Ming-ying, Cai You-hua, Lu Zui-qing, et al. Screening of high proline yield mutants by rapid mutation using atmospheric and room temperature plasmas[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2013, 39(1):37-41
- [10] 张鉴棠,汤秀玉,韩红.不同 pH 对氨基酸与茚三酮呈色反应的影响[J].*南京铁道医学院学报*,1992,11(2):126-128
Zhang Jian-tang, Tang Xiu-yu, Han Hong. Influence of pH on the reaction of amino acids with ninhydrin [J]. *Journal of Nanjing Railway Medical College*, 1992, 11(2):126-128
- [11] 仲岳桐,何彩,陈春晓.高效液相色谱法检测食品中氨基酸的方法研究[J].*中国热带医学*,2008,8(1):132-134
Zhong Yue-tong, He Cai, Chen Chun-xiao. Determination of amino acids in foods by high performance liquid chromatography [J]. *China Tropical Medicine*, 2008, 8(1): 132-134
- [12] 赵凯,许鹏举,谷广焯.3,5-二硝基水杨酸比色法测定还原糖含量的研究[J].*食品科学*,2008,29(8):534-536
Zhao Kai, Xu Peng-ju, Gu Guang-ye. Study of Determination of Reducing Sugar Content Using 3,5-Dinitrosalicylic Acid Method [J]. *Journal of Food Sciences*, 2008, 29(8):534-536