

紫外诱变原生质体选育溶菌酶高产菌株的研究

冯学珍^{1,2,3} 郑媛¹ 王跃军¹ 孙谧^{1*} 于建生² 程江峰²

(¹中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛 266071)

(²青岛科技大学化工学院, 266042)

(³柳州医学高等专科学校药理学教研室, 545006)

摘要 以1株产海洋溶菌酶活性较高的菌株(S-12-86)为原始菌株, 对其原生质体的制备、再生及紫外诱变育种进行了研究。实验所确定的原生质体的最佳制备条件为: 菌株 S-12-86 培养 18 h, 溶菌酶浓度为 1.0 mg/ml, 在 35 °C 下, 酶解 30 min, 原生质体形成率为 97.6%, 再生率为 23.6%。同时实验所确定的原生质体诱变的适宜条件为: 30 W 紫外灯下 80 cm 照射 120 s。对大量再生突变株进行筛选, 最终获得了 1 株遗传性能稳定的菌株 R-J-101, 其产酶活力达到 1 808 U/mg, 比原始菌株 (1 290 U/mg) 提高了 40%。

关键词 海洋溶菌酶 原生质体的制备和再生 芽孢杆菌 诱变

中图分类号 Q557 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2009)04-0090-06

Breeding of a high lysozyme producing *Bacillus* strain by mutagenesis of protoplasts

FENG Xue-zhen^{1,2} ZHENG Yuan¹ WANG Yue-jun¹ SUN Mi^{1*}
YU Jian-sheng² CHENG Jiang-feng²

(¹Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

(²College of Chemical Engineering Qingdao University of Science and Technology, 266042)

(³Pharmic Department Liuzhou Medical College, 545006)

ABSTRACT The preparation, regeneration and UV-mutagenesis of protoplasts of strain S-12-86, which had high lysozyme-producing activity, were studied. The results showed that the optimal conditions of the preparation and regeneration of protoplast were as follows: incubation time of the strain S-12-86 was 18 h, concentrations of lysozyme was 1.0 mg/ml, and time of enzymolysis was 30 min at 35 °C. The rates of formation and regeneration of protoplast under the optimal conditions were 97.6% and 23.6%, respectively. The optimal condition for mutagenesis of protoplasts was achieved when the protoplasts of strain S-12-86 were irradiated by a 30 w UV lamp at an 80 cm distance for 120 s. After being selected from a large amount of the regenerative mutants, a genetically stable mutant strain R-J-101, of which enzyme activity was 40% higher than that of the original strain S-12-86, was obtained under specific mutation conditions.

国家自然科学基金项目(30571429)、国家十一五“863”计划项目(2006AA10Z349)、海洋生物酶制剂规模化生产的关键技术研究(2007AA091602)和青岛市科技计划项目(05-2-JC-81)共同资助

* 通讯作者。E-mail: sunmi@ysfri.ac.cn; Tel: (0532)85819525

收稿日期: 2008-02-28; 接受日期: 2008-10-12

作者简介: 冯学珍(1981-), 女, 硕士, 主要从事海洋微生物研究。E-mail: fengxuezhennbest@163.com, Tel: 13557727819

KEY WORDS Marine lysozyme Protoplast preparation and regeneration
Bacillus sp. Mutagenesis

溶菌酶(lysozyme)是一种专门作用于微生物细胞壁的水解酶,具有分解细菌细胞壁中的肽聚糖的特殊作用,具有防腐和杀菌作用,可以广泛应用到医疗行业和科学研究领域(李敏 2006)。溶菌酶广泛存在于各种生命体中,小到细菌噬菌体、细菌和真菌,大到植物、动物,均有该种物质的分布。其中鸡蛋清里含量较高,为3.5%。目前的商品溶菌酶多由蛋清中提取,其应用范围窄,仅对革兰氏阳性菌有作用。近几年来国内外对多种来源的溶菌酶进行了广泛的研究(Yu *et al.* 2002; Spencer *et al.* 1999; Gao *et al.* 2005),但关于海洋微生物溶菌酶的研究报道较少。海洋独特的环境,包括高盐、高压、低营养和低温等,使海洋微生物产生的溶菌酶具有许多不同于其他来源溶菌酶的特殊性质(王跃军等 2002)。本实验对筛选到的1株产海洋溶菌酶活性较高的菌株 S-12-86 进行了原生质体的制备、再生及紫外诱变育种的研究,获得了1株产海洋溶菌酶活性比原始菌株提高40%且遗传性能稳定的突变菌株 R-J-101,为海洋溶菌酶的工业生产积累了资料。

去除了细胞壁的原生质体对外界环境非常敏感,经物理、化学处理后极易发生突变,利用原生质体作为出发材料进行诱变育种,是一种行之有效的育种技术(施巧琴等 2003),其已在抗生素、酶制剂、有机酸及维生素等高产菌株的选育中得到日益广泛的应用。据文献报道(王跃军等 2000)和作者的研究结果证明,对原生质体直接进行诱变处理,方法简便,效果好,能在较短的时间内提高菌种的生产能力,是选育菌种行之有效的办法。目前尚无采用原生质体选育溶菌酶高产菌株的报道。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 菌种

芽孢杆菌(S-12-86)由中国水产科学研究院黄海水产研究所酶工程实验室分离保存。

1.1.2 培养基及试剂

(1)液体培养基:蛋白胨1%,牛肉膏0.3%,NaCl 0.5%,pH 7.2~7.4;121℃灭菌20 min。

(2)固体培养基:组成同上述液体培养基,加琼脂2%。

(3)高渗缓冲液(SMM液):在0.5 mol/L的蔗糖溶液中加入0.02 mol/L的顺丁烯二酸,调整pH为6.5,再加入0.02 mol/L的MgCl₂;105℃灭菌20 min。

(4)再生培养基:用高渗缓冲液代替蒸馏水按照上述培养基组分配制。

(5)溶菌酶液:用高渗缓冲液配制终浓度为4 mg/ml的溶菌酶(酶活力30 000 U/mg,Fluka)液,用0.22 μm的微孔滤膜过滤除菌。

(6)筛选培养基:由上述固体培养基添加适量溶壁微球菌(*Micrococcus lysodeikticus*)组成(张锈等 2007)。

1.2 方 法

1.2.1 菌体生长曲线的绘制

取活化菌液2 ml接种于25 ml液体培养基中,于30℃,200 r/min振荡培养40 h,分别测定其不同时间在600 nm处的菌液OD值。

1.2.2 原生质体的制备和再生(Lo *et al.* 1996)

将已培养好的菌液,4 000 r/min离心去上清,用SMM液洗涤3次,将菌体悬浮于SMM液中。取不同体积的菌悬液,分别加入对应量的溶菌酶液,混匀后于适宜温度下水浴保温处理不同时间,镜检观察原生质体的形成情况。

当95%以上的细胞变为原生质体时,终止酶的作用,离心收集原生质体。用SMM液洗涤,悬浮,分别涂布于平板固体培养基上和再生培养基上培养,计算原生质体制备率和再生率。

$$\text{原生质体制备率(\%)} = \frac{\text{酶处理前的总活菌数} - \text{酶处理后未脱壁的活菌数}}{\text{酶处理前的总活菌数}} \times 100\%$$

$$\text{原生质体再生率(\%)} = \frac{\text{再生平板总菌数} - \text{酶处理后未脱壁的活菌数}}{\text{原生质体数}} \times 100\%$$

影响原生质体的制备率和再生率的参数主要有菌龄、酶解时间、酶解温度及溶菌酶液浓度等。因此采用不同的菌龄,不同的酶解温度和时间,不同的溶菌酶液浓度进行试验,每次试验设置两个平行,以确定原生质体的最佳制备及再生条件。

1.2.3 原生质体紫外诱变处理(王慕华等 2005)

取浓度为 2.0×10^8 个/ml 的原生质体液 5 ml 于直径为 90 mm 平板(已灭菌)中,置于磁力搅拌器上搅拌,于 30 W 紫外灯下(距离 80 cm)照射,取不同照射时间的处理液适当稀释后,涂布于平板再生培养基上培养,计数再生菌落(B),同时做不经紫外线处理的再生菌落计数(A),计算诱变致死率。

$$\text{致死率} = \frac{A-B}{A} \times 100\%$$

1.2.4 溶菌酶测活方法(比浊法)(邹艳丽等 2005)

用 60 mmol/L、pH6.2 的磷酸缓冲液配制一定浊度($A_{450} = 0.6 \sim 0.7$)的溶壁微球菌为底物,取 0.5 ml 酶液加入 2.5 ml 底物(20 °C)中,迅速混合,在波长 450 nm 处读取反应体系 5 min 内每隔 15 s 的吸光度。以 $\Delta A_{450}/\text{min}$ 变化 0.001 个吸光度值为 1 个活性单位。

1.2.5 高产菌株的筛选

初筛:将原生质体的再生菌落,原生质体紫外诱变后的再生菌落接种于筛选培养基上,30 °C 培养 20 h,选取在筛选培养基上透明圈直径比原始菌株(S-12-86)大的菌株进一步复筛。

复筛:将初筛后的菌株进行摇瓶发酵试验,30 °C,200 r/min 培养 20 h,用酶标仪筛选,采用溶壁微球菌为底物(Bezemer *et al.* 2000),选取吸光度值降低较快的菌株保存。

1.2.6 高产菌株的稳定性研究

复筛后的菌株在液体培养基中连续转接 7 代,液体培养基发酵培养,重复发酵 3 次,测定其发酵液活力,计算其平均值,确定诱变菌株产酶性能是否稳定。

2 结果与分析

2.1 菌株 S-12-86 在液体完全培养基中的生长过程

为获取对数生长期的菌体进行原生质体的制备及诱变,考察了原始菌株(S-12-86)在液体培养基中的生长过程。结果(图 1)表明,菌株 S-12-86 从 10 h 进入对数生长期,20 h 后进入稳定期。因此,选择 10~20 h 的菌体细胞作为制备原生质体的材料。

2.2 原生质体的制备与再生

2.2.1 菌龄对原生质体形成与再生的影响

分别取对数生长期 3 个阶段:前期(10~14 h),中期(14~18 h)和后期(18~20 h)的菌液制备原生质体,溶菌酶液浓度为 2 mg/ml,酶解时间为 30 min,温度 30 °C。由图 2 可以看出,对数生长期中 3 个阶段的菌体细胞壁对溶菌酶的敏感程度不一致,前期菌体对溶菌酶的敏感程度大于中后期,使其胞壁被消化得更彻底而不利于再生,后期的菌体接近老化,胞壁相对变厚,难于原生质体化,且由于菌体本身活性差也难于再生。因此选取对数生长期中后期 18 h 的菌体进行原生质体的制备。

2.2.2 酶解温度与时间对原生质体形成与再生的影响

选取菌龄为 18 h 的菌液,其他条件同上,不同温度保温处理菌液不同时间(图 3)。在 25~40 °C 温度范围内,97% 原生质体形成率的时间随温度的上升而缩短,表明温度提高,酶解速度加快,这符合酶反应动力学原理。但是温度过高(>35 °C),虽能在较短的时间内获得很高的原生质体形成率,其再生率($R_r/\%$)却很低,这

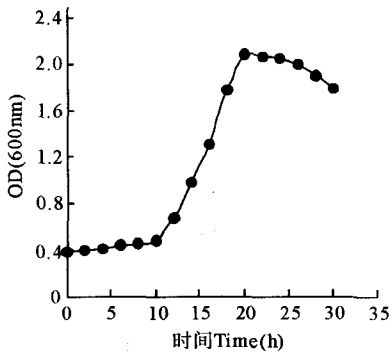


图 1 菌株 S-12-86 的生长曲线

Fig. 1 Growth curve of S-12-86

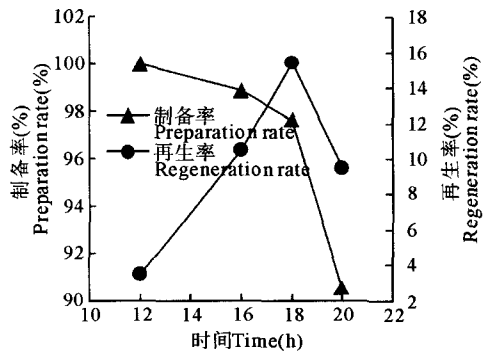


图 2 菌体培养时间对原生质体形成和再生的影响

Fig. 2 The effects of incubation time on protoplast preparation and regeneration

与文献所报道的相同(曾献春等 2006)。

2.2.3 溶菌酶浓度对原生质体形成与再生的影响

选取温度 35℃, 酶解时间 30 min, 其他条件同上, 使用不同浓度的溶菌酶作用于菌液(图 4)。原生质体的形成率随酶浓度的增加而提高, 在一定浓度(≤1.0 mg/ml)下, 再生率随酶浓度的增加呈明显的上升趋势, 超过这一范围原生质体的再生率则会下降。当溶菌酶浓度为 1.0 mg/ml, 温度 35℃, 原生质形成率(R_f / %)为 97.6%, 再生率(R_r / %)为 22.6%。这表明, 温和的处理条件有利于该菌株原生质体的再生(张 锈等 2006)。

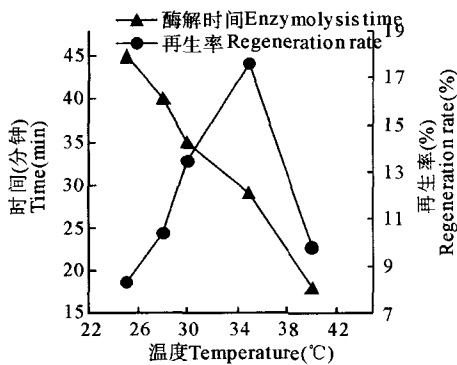


图 3 温度与时间对原生质体形成和再生的影响

Fig. 3 The effects of temperature and time on protoplast preparation and regeneration

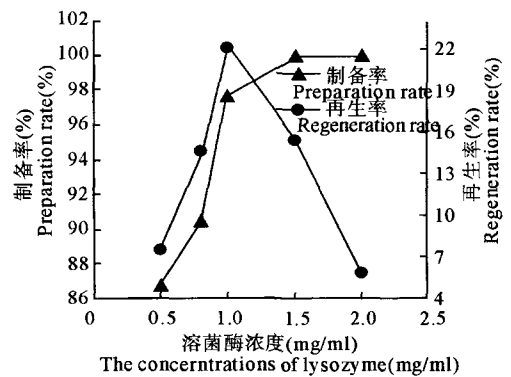


图 4 溶菌酶浓度对原生质体形成和再生的影响

Fig. 4 The effects of concentrations of lysozyme on protoplast preparation and regeneration

本实验所确定的原生质体最佳制备条件为: 以菌株 S-12-86 培养至 18 h, 溶菌酶浓度为 1.0 mg/ml, 在 35℃下, 酶解 30 min, 原生质体形成率为 97.6%, 再生率为 23.6%。

2.3 紫外诱变原生质体再生株致死率曲线

利用紫外线对芽孢杆菌(S-12-86)的原生质体液进行诱变处理, 其致死率见图 5。从图 5 可见, 紫外线的处理时间与溶菌酶原生质体的致死率之间存在明显的正效应关系, 随着紫外线处理时间的延长, 致死率逐渐升高。紫外线分别处理 60 和 90 s 时, 致死率分别为 47% 和 72%, 处理 120 s 时, 致死率为 94%。因此, 紫外线处理的时间控制在 120 s 左右可达到预期的致死率。

2.4 高产菌株的筛选

初筛: 将原生质体的再生菌落(S-J-X)200 株, 原生质体紫外诱变(致死率在 90% 左右)后的再生菌落(R-J-

X)200 株接种于筛选培养基上,30 ℃培养 20 h,选取在筛选培养基上透明圈直径比原始菌株(S-12-86)大的菌株共 7 株进入复筛。(X 代表菌株号)(平板筛选法图片见图 6)。

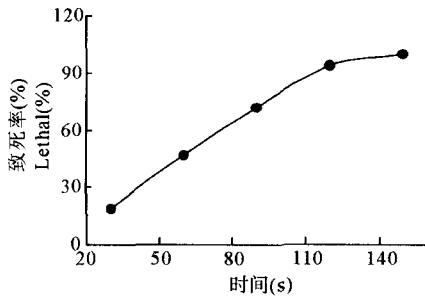


图 5 原生质体紫外诱变的致死曲线

Fig. 5 Lethal curve of ultraviolet radiation for protoplast

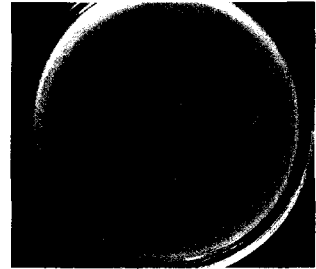


图 6 平板筛选

Fig. 6 Isolation of transparent halo

复筛:将初筛后的 8 株菌株发酵培养,30 ℃,200 r/min 培养 20 h,用酶标仪测活结果(表 1)。

表 1 突变株 H/C 值与酶活

Table 1 H/C value of mutant strains and enzyme activity

菌株 Strains	H/C 值 H/C	酶活(U/mg) Enzyme activity	菌株 Strains	H/C 值* H/C	酶活(U/mg) Enzyme activity
S-12-86	3.6	1 291	R-J-186	6.0	1 324
S-J-125	4.8	1 200	R-J-208	5.5	1 005
R-J-18	5.1	1 788	R-J-227	6.1	2 012
R-J-101	5.4	1 816	R-J-296	5.8	1 984
R-J-145	5.6	987	R-J-346	4.8	1 117

* 菌落透明圈直径大小与菌落直径大小的比值

从表 1 可以看出,菌株溶菌酶活力与 H/C 值大小不成正相关,有的菌株溶菌酶活力并不高,但 H/C 值却比较高,如 S-J-125,R-J-208 等。所以 H/C 值只能作为一个初筛指标,真正确定产酶能力只能通过发酵培养采用比浊法测活。经过发酵培养发现有 4 株菌株(R-J-18,R-J-101,R-J-227 和 R-J-296)产酶活性均比原始菌株产酶活显著提高。

2.5 遗传稳定性实验

为了检测 4 株菌株性状是否稳定,将上述 4 株菌株与原始菌株一起接入液体培养基中,连续转接 7 代,比浊法测活,重复发酵 3 次,酶活测定结果取平均值(表 2)。

由表 2 可知,R-J-18,R-J-227 与 R-J-296 在连续培养后发酵液活力不稳定,而 R-J-101 的遗传性能是稳定的,可以用于生产。

3 讨论

在原生质体化过程中,许多因素影响着原生质体的形成和再生,作者比较了菌龄,酶解温度与时间,溶菌酶浓度对原生质体形成和再生的影响。研究结果显示,菌龄、酶解温度和时间与原生质体形成率呈负相关,与原生质体再生率呈拟正态分布,这符合酶反应动力学原理。溶菌酶浓度与原生质体形成率呈正相关,与再生率呈拟正态分布。在菌株 S-12-86 原生质体化的过程中,溶菌酶浓度的选择至关重要,酶浓度过高(>1.0 mg/ml)原生质体再生率就降低,其原因可能是脱壁太彻底或高的酶浓度影响了原生质体的活力。多数学者在制备芽孢杆菌属的原生质体时,都采用 0.1~0.2 mg/ml 的溶菌酶,本实验的结果与此并不一致,经分析认为可能有

以下几个原因:(1)菌株不同;(2)菌量不一样,许多研究者采用 1.0×10^6 个/ml 的菌液制备原生质体;(3)与酶产品的批次和质量有关,作者所用的溶菌酶(Biochemical)是 Fluka 的,源于鸡卵蛋白,酶活力为:30 000 U/mg。

表2 遗传稳定性试验

Table 2 Study on the genetic stability

菌株 Strains	酶活 Enzyme activity						
	第1代(U/mg) First batch	第2代(U/mg) Secend batch	第3代(U/mg) Third batch	第4代(U/mg) Fourth batch	第5代(U/mg) Fifth batch	第6代(U/mg) Sixth batch	第7代(U/mg) Seventh batch
S-12-86	1 29	1 288	1 282	1 280	1 280	1 280	1 280
R-J-18	1 788	1 780	1 782	1 762	1 758	1 746	1 588
R-J-101	1 816	1 812	1 812	1 808	1 808	1 808	1 808
R-J-227	2 012	1 886	1 642	1 568	1 568	1 568	1 568
R-J-296	1 984	1 984	1 984	1 878	1 662	1 468	1 276

本实验为筛选出溶菌酶高产菌株,初筛时将原生质体的再生菌落,原生质体紫外诱变后的再生菌落均接种于筛选培养基上筛选,发现初筛后的7株菌中,直接再生的仅占1株,这说明原生质体直接再生的菌株大部分为非变异菌株,仅少数发生了正变,表明直接再生虽可产生变异,但变异幅度较经紫外诱变的要小。因此,原生质体由于无细胞壁屏障直接用于诱变处理能使诱变效应增加,进而使获得正突变株的几率增加;同时原生质体形成和再生过程可以作为菌种分离纯化及自身突变育种的方法,以获得高产菌株(Yang *et al.* 2001)。

常规诱变方法与原生质体再生相结合进行菌株的育种工作,目前已取得了一些成果(施巧琴等 2003)。本实验采用紫外诱变处理原生质体液获得了较好的效果,若结合其他诱变方法的使用,菌株产酶活性有待于进一步提高,尚需进一步研究。

参 考 文 献

- 王慕华,孙文敬,郭金权. 2005. 紫外诱变原生质体选育D-核糖生产菌株. 工业微生物, 35(1):24~27
- 王跃军,孙 谡,张云波,洪义国,阎晓玲,王春波,刘晓萍. 2002. 海洋低温溶菌酶的制备及酶学性质. 海洋水产研究, 21(4):54~63
- 王跃军,孙 谡,张云波,洪义国,阎晓玲,王春波,刘晓萍. 2000. 产低温碱性蛋白酶黄海水杆菌 YS-9412-130 的复合诱变原生质体选育. 海洋水产研究, 21(4):20~25
- 李 敏. 2006. 溶菌酶及其应用. 生物学教学, 31(4):2~7
- 邹艳丽,孙 谡,王跃军. 2005. 海洋微生物溶菌酶的纯化与性质研究. 生物工程学报, 21(3):420~424
- 张 锈,王跃军,孙 谡. 2007. 海洋细菌 S-12-86 的产溶菌酶条件. 中国水产科学, 14(3):425~429
- 张 锈,孙 谡,王清印,刘均忠. 2006. 海洋低温蛋白酶生产菌 YS. 9412. 130 原生质体的制备与再生. 中国水产科学, 13(1):106~110
- 施巧琴,吴松刚. 2003. 工业微生物育种学(第2版). 北京:科学出版社, 289~341
- 曾献春,孟冬丽. 2006. 乳酸菌原生质体制备与再生研究. 食品科学, 27(10):269~272
- Bezemer, J. M., and Radersma, R. 2000. Zero-order release of lysozyme from poly (Ethylene glycol)/poly (Butylenes terephthalate) matrices. Journal of Controlled Release, 64:179~192
- Gao, X. Y., Yuan, S. Q., and Mu, H. 2005. Primary studies on the bacteriostasis and fungistasis of lysozyme from *Raphanus sativus*. Journal of South China Agricultural University, 18(2):72~75
- Lo, C. F., Ho, C. H., and Peng, S. E. 1996. White spot syndrome baculovirus (WSBV) detected in cultured and captured shrimp, crabs and other arthropods. J. Dis. Aquat. Org. 27:215~226
- Spencer, A., Ludmilla, A., and Morozov-Roche. 1999. Expression, purification and characterization of the recombinant calciumbinding equine lysozyme secreted by the filamentous fungus *Aspergillus niger*: Comparison with the production of hen and human lysozymes. Protein Expression and Purification, 16:171~180
- Yang, F., He, J., and Lin, X. 2001. Complete genome sequence of the shrimp white spot bacilliform virus. J. Virol. 75:11 811~11 820
- Yu, K. H., Kim, K. H., and Lee, J. H. 2002. Comparative study on characteristics of lysozymes from the hemolymph of three lepidopteran larvae *Galleria mellonella*, *Bombyx mori*, *Agriu sconvolvuli*. Developmental and Comparative Immunology, 26:707~713