

巨大芽孢杆菌原生质的产生和紫外线诱变

宁波市医学科学研究所 刘 奎

宁 波 制 药 厂 章佩珍

提要 本文报道了巨大芽孢杆菌原生质体的制备和再生。并用紫外线对原生质体进行了诱变处理,从中筛选出几株产酸率高于亲代的菌株。本文还研究了芽孢形成和古龙酸产量的关系;所有的高产菌株或能形成耐热的芽孢,或不耐热的内孢子,而所有低产菌株均不能形成芽孢或内孢子。可能巨大芽孢杆菌在形成芽孢的过程中,产生出某些物质,促进了2-酮基古龙酸的生成。

关键词 原生质体 巨大芽孢杆菌 芽孢 2-酮基古龙酸

维生素丙二步发酵是我国首创的维生素丙生产新工艺。它采用混菌发酵的方法将山梨糖氧化成2-酮基古龙酸^[1]。生产菌株2980中,其一为巨大芽孢杆菌,另一种为氧化葡萄糖酸杆菌。初步研究表明:氧化葡萄糖酸杆菌是产酸的主要菌,但必须和巨大芽孢杆菌一起进行发酵,才能产酸。为了了解这二种细菌之间的相互关系,提高2-酮基古龙酸的产酸率,我们进行了维生素丙生产菌株2980中的巨大芽孢杆菌原生质体的产生和再生,并用紫外线对其进行了诱变,探索菌种选育的新途径。

材料和方法

一、材 料

1. 菌株

2-酮基古龙酸生产菌株2980,由宁波制药厂提供。

2. 培养基

A、菌体培养基

山梨糖 1% 尿素 0.1%

蛋白胨 1% 磷酸二氢钾 0.1%

酵母膏 0.3% 硫酸镁 0.02%

玉米浆 0.3% pH 7.2—7.4

B、原生质体制备或稀释的培养液(SMM)

蔗糖 0.5M 顺丁烯二酸 0.02M

氯化镁 0.02M pH 6.5

C、原生质再生培养基(DM₃)

丁二酸钠 0.5% 酪蛋白水解物 0.5%

酵母浸膏 0.5% 磷酸氢二钾 0.35%

葡萄糖 0.5% 磷酸二氢钾 0.15%

氯化镁 0.02M 牛血清白蛋白 0.02%
pH 7.2—7.4

注:牛血清白蛋白无菌过滤后,加入灭菌培养基

D、发酵摇瓶培养基

山梨糖 8% 磷酸二氢钾 0.1%

蛋白胨 1% 硫酸镁 0.02%

玉米浆 0.3% 尿 素 0.5%

碳酸钙 0.5% pH 6.7

二、方 法

1. 原生质体的制备

在菌体培养基中接种巨大芽孢杆菌，30℃培养过夜。吸取 10 ml 上述种液接种到 100 ml 新鲜菌种培养基中，30℃培养 4 小时。于 4℃，4000 g 离心收集菌体。以 SMM 培养液洗涤后，将菌体分散在 10 ml，SMM 培养液中。加入 1 mg 溶菌酶，30℃培养并定时取样镜检，直至长杆状的菌体细胞全部转变成球状的原生质体。在 4000 g 离心并以 SMM 培养液洗涤二次。将离心后的原生质体重新分散在 SMM 培养液中，并取少量用无菌水适当稀释后涂皿培养检查菌落数 B，并与酶处理前用无菌水稀释的菌液在涂皿培养检查的菌落数 A 相比较，按公式 $\frac{A-B}{A}$ 计算原生质体形成率。

2. 原生质体的再生

将上述制备的原生质体用 SMM 稀释后涂布于含 0.8% 琼脂的 DM₃ 平皿，在 30℃培养 3—4 天。检查菌落数 C。按公式 $\frac{C-B}{A-B}$ 计算原生质体的再生率。

3. 原生质体的紫外线诱变

将装有 5 ml 左右的原生质体悬液的平皿置于磁力搅拌器上，用 15W 紫外灯直接进行照射，使致死率为 70—80%。适当稀释后，涂布于 DM₃ 琼脂平皿，30℃培养 3—4 天。

4. 芽孢形成的检定

A、镜检 将菌体细胞内出现明显空泡认作是芽孢形成前期，而透光芽孢的出现被认作是芽孢形成后期。

B、100℃加热 15 分钟，涂皿检查存活率。

5. 2-酮基古龙酸产量的测定

以淀粉作指示剂，用转化碘滴定法进行测定。

结果和讨论

1. 原生质体的形成和再生

菌体细胞在对数生长期对原生质体的形成是有利的，菌体老化则原生质体形成数减少。为获得对数生长的巨大芽孢杆菌菌体，采用 10% 接种量，30℃培养 4 小时，菌体细胞浓度可达 10⁷ 个/ml，在本实验中，对原生质体的形成较为理想。

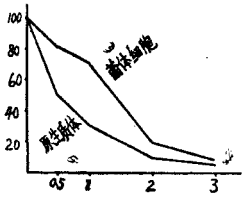
延长溶菌酶作用时间，可增加原生质体的形成率，但同时也会降低原生质体的再生率。因此，很有必要选择一个合适的酶作用时间，使在原生质体形成率高的情况下，尽量提高原生质体的再生率。表 1 示酶作用时间对原生质体的形成和再生的影响。结果指出，在 30℃溶菌酶作用 1 小时可使 100% 巨大芽孢杆菌的菌体细胞变成原生质体。此条件下，原生质体的再生率为 10%。因此选用此条件进行菌体细胞的脱壁。

表 1 酶作用时间对原生质体形成和再生的影响

时 间 (小时)	原生质体形成率 (%)	平均再生频率 (%)
0.25	60	—
0.5	95	17
1	100	10
1.5	100	2

2. 紫外线对原生质体的诱变

原生质体已失去细胞壁，对紫外线比菌体细胞更为敏感。在 15W 紫外灯下，距离 28 cm 时，不同时间照射处理的结果如图 1：



巨大芽孢杆菌原生质体经紫外线照射 1 分钟死亡率达 70%。我们任意挑选经此剂量诱变后在 DM₃ 琼脂平皿上长出的 100 个菌落，经发酵摇瓶 30℃培养 72 小时测定 2-酮基古龙酸的产量，结果如图 2，并以死亡率与此

接近,照射 2 分钟的菌体细胞长出的 100 个菌落进行 2-酮基古龙酸产量的测试结果如图 3。虽然,直接用菌体细胞进行诱变处理后,高于对照菌株最高产酸量 (70 mg/ml) 的正突变为 10%,比用原生质体诱变的正突变 (8%) 为高。但原生质体经 UV 处理后分布幅度更广,而且高于 76 mg/ml 的菌株都出现在原生质体经 UV 处理后的变异菌株内。

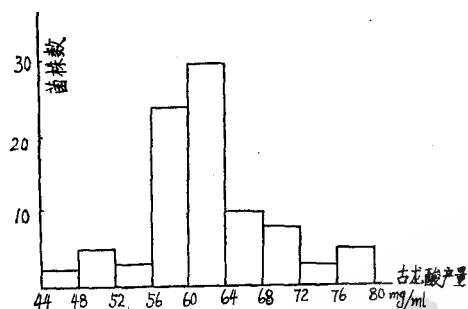


图 2 2980 菌株原生质体 UV 诱变后产量分布

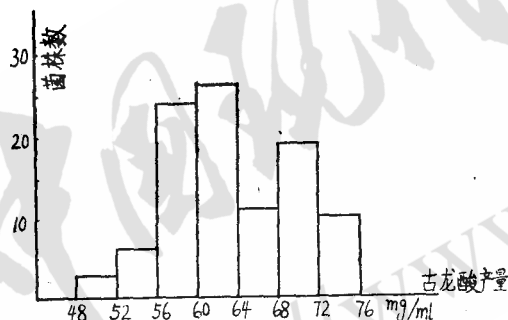


图 3 2980 菌株菌体细胞 UV 诱变后产量分布

3. 古龙酸产量和芽孢形成的关系

Preparation of Protoplasts of *Bacillus Megaterium* and its Induction by UV

Liu Kui et al

(Ning Bo Institute of Medical Science)

In vitamin c production, 2-ketogulononic acid is Produced by mixed culture with two different bacterial strains including *Bacillus megaterium*. In this paper, the preparation of protoplasts of *Bacillus megaterium* and its reversion are reported. These protoplasts are induced by UV, and some strains with high output of 2-ketogulononic acid are selected. The relationship between germ formation and output of 2-ketogulononic acid is studied. Those strains with higher output can form germ resisting heat or form previous endospore which cannot resist heat. Those strains with lower output all cannot form germ or endospore. It is suggested that *Bacillus megaterium* produces some materials which stimulate the output of 2-ketogulononic acid, when these bacteria form germ.

Key words: Protoplast *Bacillus megaterium* Germ 2-Ketogulononic acid

从原生质体经 UV 处理后所长出的菌落中,挑选出摇瓶发酵产古龙酸最高和最低的菌株各 5 株,与氧化葡萄糖酸杆菌搭配后,接种于摇瓶发酵培养基,30℃培养并定时取样镜检。观察到 5 株高产菌株均能到达芽孢形成前期,其中有 3 株可到达芽孢形成后期。同时氧化葡萄糖酸杆菌生长良好。而在 5 株低产的巨大芽孢杆菌中,有 4 株不能形成芽孢,另一株虽然在菌体细胞中观察到空泡的形成,但是生长缓慢,产酸的主流菌——氧化葡萄糖酸杆菌也生长不良。

对培养 72 小时后上述 10 株菌株的摇瓶发酵液在 100℃加热 15 分钟,经适当稀释后,涂皿培养,仅 3 株菌株长出巨大芽孢杆菌菌落。而这 3 株均为高产古龙酸的菌株。

这些结果似乎表明:芽孢的形成与古龙酸的产量密切相关。特别是芽孢形成的前期对古龙酸的产量至关重要。不少作者对枯草杆菌芽孢的研究中已注意到淀粉酶和胞外蛋白酶的产量与芽孢的形成有关^[2,3]。在巨大芽孢杆菌中也可能存在着类似的情形。有可能巨大芽孢杆菌在芽孢形成的前期也会分泌某些胞外酶,这些胞外酶促进了产古龙酸的主流菌——氧化葡萄糖酸的生长并把山梨糖氧化成 2-酮基古龙酸。

参 考 文 献

- [1] 尹光琳等:微生物学报,1980,20(3),246—251。
- [2] 盛祖嘉:微生物遗传学,1981,510—511,科学出版社。
- [3] Fergus, G. P., Bacterial. Rev., 1977, 41, 711—741