

氧化葡萄糖酸杆菌原生质体的形成和再生研究

陈建华 盛勤 冯瑞山 丁敏 吴梧桐

(中国药科大学生物制药学院, 南京 210009)

摘要 报道氧化葡萄糖酸杆菌原生质体的形成和再生的方法。将最佳生长条件下对数生长后期的培养物以溶菌酶处理, YE培养基上再生原生质体、原生质体形成率约99%, 再生率2.93%。

关键词 氧化葡萄糖酸杆菌; 原生质体; 形成; 再生

氧化葡萄糖酸杆菌 *Gluconobacter oxydans* 是维生素C二步发酵中第二步从L-山梨糖到2-酮基-L-古龙酸的主体产酸菌, 但该菌单独发酵时, 繁殖及产酸能力极差, 需与某些伴生菌如软化芽孢杆菌 *Bacillus macerans* 等组成混合发酵体系。而混合菌种在生产上涉及两种菌的分离、纯化、配比等问题, 极为不便。如将此两菌融合, 不仅可解决上述问题, 还可能在一定程度上提高产酸量。本文对氧化葡萄糖酸杆菌进行了一系列性状研究, 诸如生长条件、原生质体形成和再生以及菌体细胞和原生质体对紫外线敏感性等, 为下一步与软化芽孢杆菌原生质体融合提供基础依据。

1 材料

1.1 菌株

氧化葡萄糖酸杆菌 G10

1.2 培养基

山梨糖培养基(%): 山梨糖 0.5, 酵母膏 0.5, 牛肉膏 0.5, 蛋白胨 1.0, 硫酸镁 0.2, 碳酸钙 0.5, pH 6.7。山梨糖固体培养基: 山梨糖培养基加琼脂 1.6。甘露醇培养基^[1](%): 酵母粉 0.5, 蛋白胨 0.3, D-甘露醇 2.5, 碳酸钙 1.5, pH 6.7。YE高渗再生培养基(%): 酵母粉 1.5, 硫酸镁 0.25, 甘油 0.05, 山梨糖 1.0, 甘露醇 9.0, 聚乙烯吡酮烷酮 1.5, pH 6.7。

1.3 试剂

裂解液^[1]: 0.1 mol/L Tris-HCl (pH 8.0), 0.5 mol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 0.02 mol/L MgCl₂ · 6H₂O, 0.02 mol/L CaCl₂ · 2H₂O。

溶菌酶液: 用裂解液配制。

2 方法

2.1 平板培养

氧化葡萄糖酸杆菌在山梨糖固体培养基上自然分离。

2.2 生长曲线测定

测定甘露醇液体培养基中, 不同生长时间培养物在波长 570 nm 处的 OD 值。

2.3 原生质体的形成和再生^[1]

2.3.1 原生质体的形成 将新鲜活化的培养物, 按 10% 接种量接种于甘露醇液体培养基中。29℃, 180 r/min 振摇至对数生长期, 约 12 h。经 4000 r/min 离心 15 min, 收集菌体, 用裂解液洗二次, 制成一定浓度菌悬液。加入溶菌酶, 使作用终浓度为 5 mg/ml, 37℃ 恒温水浴轻微振荡 2.5 h。6000 r/min 离心 20 min, 沉淀物重新悬浮在 YE 高渗再生培养基, 即得原生质体悬液。

2.3.2 原生质体再生 将上述原生质体悬液, 分别作渗透稳定处理和渗透休克处理。经适当稀释, 分离在山梨糖固体培养基和 YE

高渗再生培养基双层平板上,其中 YE 高渗再生培养基双层平板上层为软琼脂,于 29℃ 培养 3~4 d,计数,并计算原生质体形成率和再生率^[2]。

形成率=(A-B)/A×100%,再生率=(C-B)/(A-B)×100%,A:酶作用前 CFU/ml,B:为渗透休克处理(水稀释)后 CFU/ml,C:为高渗透稳定处理(YE 高渗再生培养基稀释)后 CFU/ml。

2.4 紫外线处理菌体和原生质体

对数生长中期菌液,离心,沉淀加生理盐水稀释 10 倍制成菌悬液,取菌液 5 ml 加入直径 6 cm 小平皿中,15 瓦紫外灯下,距离 30 cm,电磁搅拌下累积处理 30 s 和 60 s。然后避

光 1 h。经适当稀释,分离在甘露醇双层培养基上,上层为软琼脂。于 29℃ 培养。将“2.3.1”所述的原生质体悬液,取 5 ml 于平皿中,紫外灯下照射 2,4,10,20,30 min,避光。经适当稀释,分离在 YE 高渗再生培养基双层平板上。29℃ 培养 4 d,计数,计算成活率。

3 结果与讨论

3.1 G10-3 菌的分离纯化及生长情况

1) 混合菌株经平板划线,分离获得葡萄糖酸杆菌 G-10,将此菌制成悬液,分别分离和移种在山梨糖培养基、甘露醇培养基和土豆培养基^[1]的平板和斜面上。生长情况见表 1。

Tab 1. Growth of G10-3 on Different Media

Time, h	Sorbse		Patato Extract		Manitol	
	Slant	Plate	Slant	Plate	Slant	Plate
24	no growth	no colony	poor growth	needle-point-like colony	poor growth	needle-point-like colony
48	very poor growth	needle-point-like colony	rich growth	colony diameter is 0.5~1.5 mm	rich growth	colony diameter is 0.5~1.5 mm
72	poor growth	colony diameter is 0.5~1.5 mm				
CFU/ml	1.0×10 ⁷		1.5×10 ⁷		5.0×10 ⁸	

表 1 表明 G-10 在甘露醇及土豆汁培养基上,生长快,菌苔丰满。但前者菌浓度比后者明显高一个数量级。山梨糖培养基不适合其单独生长。

2) 该菌在甘露醇培养基上,4℃ 冰箱存放 3 个月,再传至相同培养基斜面上,仍存活。但分离的其余 9 种菌均死亡。将 G-10 连续二次自然分离,获得 G10-3,它不仅生长快,活力强,且与软化芽孢杆菌组成混合菌,经发酵测定,对山梨糖转化率高于对照混合菌种。

3) G-10 在甘露醇液体培养基中的生长曲线较平坦,对数生长期约为 12 h。此菌在生长 40 h 后,OD 值下降。镜检菌数减少,有的菌体模糊,可能自溶之故。也有文献^[3]报道其后期自溶现象。

3.2 原生质体的形成及再生

影响原生质体的形成和再生的因素很多,菌龄、溶菌酶浓度、作用时间和温度等极为重要^[1,4]。本实验选用菌龄 12 h 菌,在高渗裂解液下,经溶菌酶(5 mg/ml)在 37℃ 水浴作用 2.5 h。用 YE 高渗再生培养基制得原生质悬液,分离在 YE 高渗再生培养基双层平板上,原生质体形成率近于 99%,再生率 2.93%。实验结果见表 2。

Tab 2. The rate of protoplast formation and regeneration of G10-3

Process	Results
Before treatment of lysozyme (A)	8.24×10 ⁹
Treatment of osmotic shock (B)	1×10 ⁷
Treatment of osmotic stability (C)	2.51×10 ⁸
Protoplast formation rate	99%
Protoplast regeneration rate	2.93%

从结果看,原生质体形成率很高,但再生

率低。Gotz 等报道^[5],再生平板上覆盖软琼脂培养基,对提高再生率有效。本实验也表明,双层 YE 高渗再生培养基比原生质体直接涂布在 YE 高渗再生培养基上所得再生数明显高一个数量级。我们在实验中曾按照文献^[1]采用 Himcp 高渗再生培养基,但经多次实验,菌体及原生质体在此培养基上均不能生长,是否与菌株来源和种、株间的差异有关,至使生长状态不同。文献报道^[5]原生质体再生需一定营养,如氨基酸等。Himcp 中唯一有机氮源酶蛋白水解物仅 0.001%,可能影响菌体生长。我们尝试在该培养基基础上增加 1%酵母粉,0.3%多肽。菌体虽能生长,但菌苔极薄,平板上形成针尖状菌落,不再生。实验中,曾试用 DM 再生培养基,但也失败。综合考虑再生培养基的各组分及渗透稳定剂如山梨醇、山梨糖、甘露醇及蔗糖的选择及其浓度对菌生长影响,最终确定了 YE 高渗再生培养基。在此培养基上,菌体和原生质体能生长及再生,且菌落数与甘露醇培养基相近。

3.3 G10-3 菌体及其原生质体对紫外线的耐受能力

紫外线对菌体及原生质体的诱变处理见方法“2.4”,未经任何处理的菌体对紫外线极敏感,照射 0.5,1 min 存活率分别为 2.12×10^{-2} , 10×10^{-4} 。而原生质对紫外线的敏感程度与未经处理的菌差异很大,经紫外线照射 2,4,10,20,30 min 存活率分别为 9.9×10^{-1} , 9.9×10^{-1} , 1×10^{-1} , 8.2×10^{-5} , 4.87

$\times 10^{-6}$ 。由此可见,原生质经紫外线照射 4 min,几乎无影响,照射 30 min 才接近全部灭活。可能 YE 高渗再生培养基对原生质体有一定保护作用。但二者差异如此大,原因还有待进一步探讨。

3 小 结

1) 确定了氧化葡萄糖酸杆菌生长及其原生质体再生的合适培养基。

2) 以菌龄 12 h G10-3,在高渗裂解液下,经 5 mg/ml 溶菌酶于 37℃水浴作用 2.5 h,其原生质体形成率 99%,再生率 2.93%。

3) 原生质体经紫外线处理 30 min,存活率为 4.87×10^{-6} ,接近灭活。

致 谢 本文工作得到了陈小英教授的支持和指导。

参 考 文 献

- 1 Teruhide S, Tatsuo H, Setsuko M, et al. Microbial Production of 2-Keto-L-Gulonic Acid from L-Sorbose and D-Sorbitol by *Gluconobacter melanogenus*. *Agric Biol Chem*, 1990; 54: 1201
- 2 王岳王,陈月华,陈 宁等.球形芽孢杆菌 TS-1 与苏云金芽孢杆菌 H4 细胞融合的研究. *生物工程学报*, 1988;4(3):230
- 3 李 强,刁劲羽,向波涛等.山梨糖发酵产生 2-酮基-L-古龙酸氮源代谢规律. *微生物学报*, 1996;36(1):19
- 4 吕群燕,王书锦,周东坡等.用原生质体融合技术选育 2-酮基-L-古龙酸高产菌株的研究. *微生物学杂志*, 1994;15(1):1
- 5 Gotz F, Kteutz B, Schleifer KH. Protoplast Transformation of *Staphylococcus carnosus* by Plasmid DNA. *Mol. Gene*, 1983; 189: 340

Protoplast Formation and Regeneration of *Gluconobacter Oxydans*

Chen Jianhua, Sheng Qin, Feng Ruishan, Din Min, Wu Wutong

College of Biopharmaceutics, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009

Abstract Protoplast formation and regeneration of *Gluconobacter oxydans* G10-3 were reported. The late exponential stage culture under optimum growing conditions was treated with lysozyme in hypertonic buffer. Protoplast was regenerated successfully on YE medium, and the formation and regeneration rates were 99%, and 2.93% respectively.

Key words *Gluconobacter oxydans*; Protoplast; Formation; Regeneration