

低能 N^+ 注入产色氨酸酶大肠杆菌的育种研究

庞敏 姚建铭

(中国科学院等离子体物理研究所 合肥 230031)

摘要 利用了低能 N^+ 注入产色氨酸酶大肠杆菌 *Escherichia coli* 进行诱变选育。首先进行了离子注入条件及参数的探索, 确立了以 15 % 甘油作为保护剂, N^+ 注入能量 10 keV, 剂量 $13 \times 10^{14} \text{ cm}^{-2}$ 的离子注入参数。反复筛选和连续突变后, 获得高产色氨酸酶大肠杆菌, 和出发菌株相比, 其生物量和色氨酸酶活性均有所提高。经过发酵规模逐步扩大和酶促反应体系放大, 菌体生物量可达 $8.2 \text{ g}_{\text{ww}} \cdot \text{L}^{-1}$, 其酶法催化合成 L-色氨酸的产量高达 $110 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。该菌继代培养遗传性能稳定, 可操作性强, 有很好的工业化前景。

关键词 离子注入, L-色氨酸, 大肠杆菌, 育种

中图分类号 Q517, Q939.97, TQ92

作为一种新型的生物诱变手段, 离子注入技术以其独特的诱变机理和显著的生物学效应受到关注, 被广泛地应用于植物、微生物育种和转基因^[1-5]。其中, 低能离子束对微生物有很强的致突变作用, 已被成功应用于微生物诱变育种研究, 取得巨大的经济和社会效益。实践证明, 离子束作用于微生物集能量沉积、动量传递、质量沉积及电荷交换等效应, 同时还具有高传能线密度 (LET) 值、集束性好、射程可控、能量和质量沉积区域集中等特点, 因此在损伤轻的情况下, 突变率高、突变谱广^[6]。

L-色氨酸 (L-Trp) 是芳香族必需氨基酸之一, 广泛应用于医药、食品和饲料等行业, 由于市场需求大, L-Trp 合成方法研究一直是氨基酸行业的一个热点课题, 之前很多学者为了提高菌株的色氨酸合成能力, 采用传统诱变方法, 选用大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、枯草杆菌 (*Bacillus subtilis*)、谷氨酸棒状杆菌 (*Corynebacterium*) 等不同微生物进行研究^[7,8], 但由于色氨酸代谢调控的复杂性, 色氨酸产量达不到工业化生产的要求。当前, 利用色氨酸酶 Tryptophanase (EC4.1.99.1)^[9,10] 的酶促转化法是业内认可的生产 L-Trp 的有效方法^[11,12]。色氨酸酶以磷酸吡哆醛 5-PLP 为辅酶, 正常情况下可催化 L-Trp 的降解 (reaction1, 2)。而在存在一定浓度的吲哚时, 色氨酸酶则可以催化合成 L-Trp 的反应 (reaction 3)。

$\text{L-Tryptophan} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{pyruvate} + \text{NH}_3 + \text{indole}$ (吲哚) (reaction1); L-Serine (L-丝

氨酸) $+ \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{pyruvate} + \text{NH}_3$ (reaction2); $\text{L-Serine} + \text{indole} \rightarrow \text{L-Tryptophan} + \text{H}_2\text{O}$ (reaction 3)。

本研究以吲哚和 L-Ser 为底物合成 L-Trp, 由于出发菌株的色氨酸酶活性比较低, 通过以离子束诱变源对产色氨酸酶大肠杆菌进行诱变改良, 探索离子束注入工艺和注入参数, 以及建立有效的突变体筛选方法, 筛选到一株色氨酸酶高产菌株, 在一定的底物浓度条件下, 其酶法合成色氨酸的产量达到 $110 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

1 材料与方法

1.1 供试菌株及培养基

实验菌株为产色氨酸酶大肠杆菌 *Escherichia coli* B1t7-A, ATCC 27553。采用 LB 培养基: 蛋白胨 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 酵母提取物 $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, NaCl $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 7.0, 37°C 培养 22~48 h。

1.2 N^+ 注入诱变及筛选

1.2.1 样品处理 将生长良好的平板上 *E. coli* 适量菌体收集到 15 % 无菌甘油溶液中, 稀释成不同倍数的菌悬液。取 0.1 mL 均匀涂布于无菌平板上, 无菌风干。取镜检无细胞重叠者进行 N^+ 离子注入。

1.2.2 离子注入 离子注入机: 50 keV 离子注入机, 由中国科学院离子束生物工程学重点实验室自行研制。用 N^+ 注入, 注入能量设置为在 10 keV, 15 keV 能量下, 注入剂量 $(1 \sim 25) \times 10^{14} \text{ cm}^{-2}$, 靶室真空度

第一作者: 庞敏, 女, 1982 年 2 月出生, 2006 年毕业于陕西师范大学获硕士学位, 植物学专业, 现为中国科学院等离子体物理研究所攻读博士研究生

通讯联系人: 姚建铭

收稿日期: 初稿 2008-09-16, 修回 2008-10-12

为 10^{-3} Pa。将平皿置于水冷靶台上,以 5 s 脉冲式注入,间隔 55 s。取出平皿,以 1 mL 无菌水反复冲脱,稀释适当倍数(适合平板计数的稀释度),涂布于 LB 培养基,37 °C 培养 22~48 h,用于单菌落的挑选及存活率、突变率的计算。

1.2.3 离子束诱变后突变体筛选 将上述诱变后的菌悬液以筛选到的适当稀释倍数稀释后,于 37 °C 培养 48 h,待菌落完全长成,根据其生长速度及形态特征等特点,分别挑取不同类型的菌落,纯化后以 LB 培养基 37 °C 摇瓶培养 24 h,检查色氨酸酶活性,计算正负突变率。初步筛选到的发生正突变的菌株进行色氨酸酶活性检查,选取高色氨酸酶活性的突变株进行下一轮的诱变和筛选。

1.2.4 酶法合成 L-色氨酸的反应 将收集到的菌体制成粗酶液,按以下方法固定化:10%聚乙烯醇 PVA (1750±50)(含 1%海藻酸钠):粗酶液(含湿菌 16 g/100 mL)(V:V)=1:1 混匀。将混合物逐滴滴入含 2%氯化钙(以 Na_2CO_3 调至 pH 6.5)的饱和硼酸中制成小球状。固定化 4h 后洗净,再投入固定化酶促反应体系中,包括:吡啶 8%,D,L-丝氨酸 16%,5-PLP 5 mg, pH 7.0, 37 °C 振荡反应 24 h。每次反应结束后将固定化小球回收,冲洗干净后再投入下一批次反应中。固定化酶促反应体系从 100 mL→250 mL→1L 逐级放大,考察该菌株稳定性。L-色氨酸的检测方法为纸层析法结合紫外分光光度法^[13]。

1.3 分析方法

1.3.1 生物量测定 采用菌体湿重法,接种量 5%,37 °C 培养 24 h 后,取培养好的菌体发酵液,4000 r/min 离心 20 min,称取湿重($g_{\text{ww}} \cdot \text{L}^{-1}$)。

1.3.2 色氨酸酶活性检查 按 Wood 等^[14]提出的酶活测定方法改进后进行。酶的一个活力单位(U)定义为:在一定反应条件下,37 °C、10 min 催化形成 0.01 mol 吡啶所需要的酶量。

1.3.3 存活率的计算 存活率是通过 N^+ 注入前后大肠杆菌活菌计数来测定的。在制备注入平皿的同时,同样方法制备对照平皿。对照平皿和样品平皿其他所有步骤同步进行,风干,靶室抽真空,样品平皿接受 N^+ 注入而对照平皿不接受离子注入,离子注入完成后以同等体积无菌水冲洗,稀释同等倍数涂平皿,进行菌落计数,计算存活率。

2 结果与讨论

2.1 注入离子能量和剂量的选择

离子束诱变育种经验表明, N^+ 注入在诱变育种中效果较好。分析 N^+ 作为 DNA 碱基的一种极其重要的组成元素,使得 DNA 复制时碱基错配几率增大^[15]。因此,本实验选用 N^+ 作为注入离子。由于在能量为 15 keV 的离子辐照下,大肠杆菌致死率偏高($\geq 96\%$),选择适合细菌诱变育种的能量 10 keV 下以不同剂量进行离子注入,注入剂量和存活率的关系见图 1。

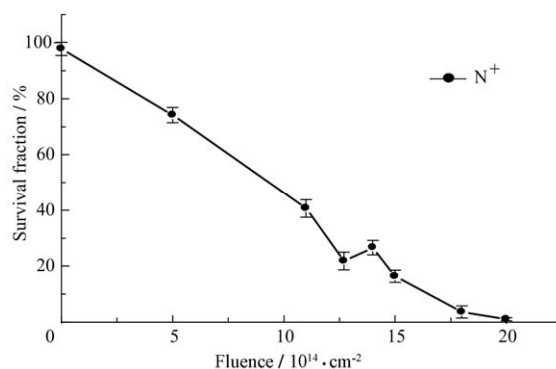


Fig.1 Survival fraction of *E.coli* by N^+ ion implantation

现代育种理论认为^[16],被诱变的微生物存活率在 20%~30%左右时,产量性状的正常突变率比较高,而在更低的存活率时,虽然突变率更高,但负突变率增加,正突变率却降低。图 1 表明,在能量 10 keV,剂量 0~20 $\times 10^{14} \text{ cm}^{-2}$ 的离子注入下,*E.coli* 存活率表现出了先突降后略升再降的变化,不同于紫外线或者其他辐射产生的“直线型”,这个结果与文献[1]、[3]报道结果类似。将存活率为 25%±5% 所对应的离子注入参数 10 keV, 13 $\times 10^{14} \text{ cm}^{-2}$ 作为该菌株后续诱变育种的离子注入参数。

2.2 能量 10 keV, 剂量 13 $\times 10^{14} \text{ cm}^{-2}$ 的离子注入对 *E.coli* 生物量的影响

酶法合成 L-Trp 的色氨酸酶直接来源于菌体,生物量的大小直接决定了酶的生产效率,是整个酶促反应工艺中的关键步骤。为了考察 N^+ 注入对该菌株的生物量的诱变效果,在诱变前后分别随机记录 53 批次发酵菌体生物量($g_{\text{ww}} \cdot \text{L}^{-1}$),从图 2 的菌体生物量分布直方图,我们可以直观看出两组分布均趋向正态分布。

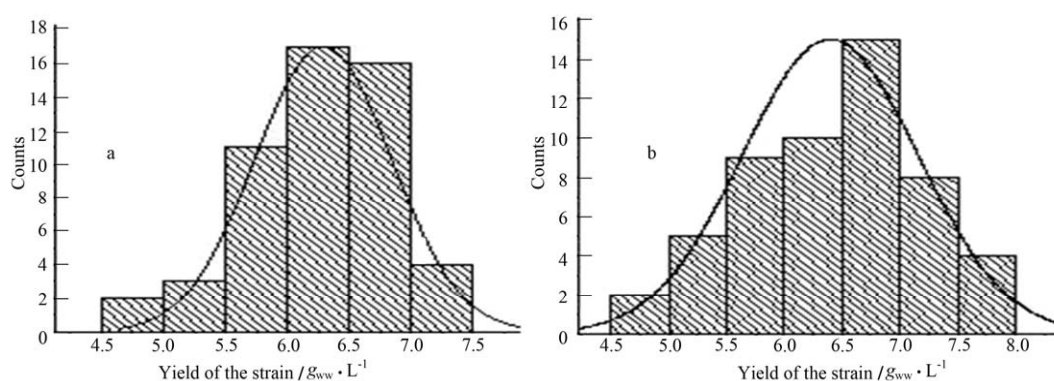


Fig.2 Histogram plot with normal distribution overlay of yield of strains
a: Yield of strains of natural division, b: Yield of strains after N⁺ implanted

进而对两组数据进行正态分布的吻合度检验。
统计量为

$$\chi^2 = \sum \frac{(O - E)^2}{E}$$

式中, O 为各区间的实际观测频数, E 为各区间的理论频数。 $E = n \cdot P$, P 为各区间正态曲线下包含的面积, n 为子样容量。子样容量 n , 平均数 $\bar{x}$, 标准差 s , 自由度 v 均列于表 1, 表 2 基部。将各区间

的 χ_o^2 计算列于表 1, 2。查 χ^2 分布表, $\chi_{0.05}^2(3) = 7.81473$, $\chi_{0.05}^2(4) = 9.48773$, 分别大于表 1 的 $\chi^2 = 2.673$ 和表 2 的 $\chi^2 = 2.579$, 故认为在 0.05 显著水平上实际与正态分布的拟合程度差异不显著, 证明诱变前后菌体的生物量分布均符合正态分布 $N(6.29, 0.551^2)$ 和 $N(6.40, 0.761^2)$, 而不是随机无序分布。

Table 1 χ^2 test of natural division strain

Biomass section	O (Observation frequency)	E ($E = n \cdot P$) (Theoretic frequency)	$\frac{(O - E)^2}{E}$
4.5~5.0	2	5.088	1.874
5.0~5.5	3	3.535	0.081
5.5~6.0	11	11.750	0.048
6.0~6.5	17	18.55	0.130
6.5~7.0	16	13.430	0.492
7.0~7.5	4	4.463	0.048

Note: $n=53$, $\bar{x}=6.29$, $s=0.551$, $v=6-2-1=3$, $\chi^2=2.673$

Table 2 χ^2 test of ion implanted strain

Biomass section	O (observation frequency)	E ($E = n \cdot P$) (theoretic frequency)	$\frac{(O - E)^2}{E}$
4.5~5.0	2	1.104	0.727
5.0~5.5	5	4.564	0.042
5.5~6.0	9	9.674	0.047
6.0~6.5	10	13.260	0.801
6.5~7.0	15	12.377	0.556
7.0~7.5	8	8.534	0.033
7.5~8.0	4	2.951	0.373

Note: $n=53$, $\bar{x}=6.40$, $s=0.761$, $v=7-2-1=4$, $\chi^2=2.579$

2.3 离子注入诱变对酶法合成色氨酸的产色氨酸酶大肠杆菌的影响

色氨酸酶活性的高低决定单位生物量的酶促催化效果,在 2.2 节的基础上,分别进行各个生物量区间的 30 ± 3 株突变体的色氨酸酶活性检测,图 3 反应了在不同生物量区间内色氨酸酶活性的差异,发现在发生生物量性状正突变相对集中的 $7.5\sim 8.2$ ($\text{g}_{\text{ww}}\cdot\text{L}^{-1}$) 的区间内,色氨酸酶活性基本能保持和其他生物量区间同等水平,则确定在后续筛选中着重挑取这一区间的菌落进行复筛。

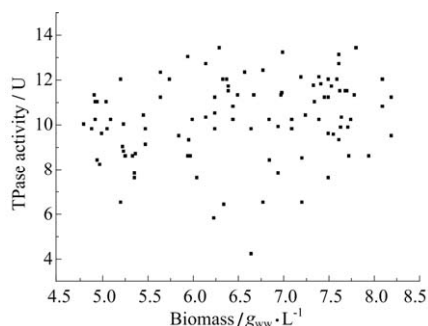


Fig.3 Activity of TPase of strains with N^+ implantation

2.4 高产菌株的选育

从离子注入后产生的大量的突变体中,如何筛选正向突变体,是离子束育种的关键。而产量形状往往是多基因调控的数量形状。根据上述实验结果,设计了如下的选育方案,前几次诱变筛选中,挑取生长较快,较大菌落作为复筛对象,这个步骤首先保证了菌株高的生物量及其良好的生长能力,有利于进一步筛选其中高酶活突变体。然后以添加不同

浓度吡啶的培养基进行两次平板筛选。这样,将可筛突变体的数量大大降低后,再进行酶活检测。经过 3 轮连续诱变和筛选后,最终得到相对高产菌株 W-T₃₂。生物量可达 $8.2 \text{ g}_{\text{ww}}\cdot\text{L}^{-1}$,酶法合成 L-Trp 的产量高达 $110.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,较出发菌株分别提高了 32.3 % 和 69.2 % (见表 3)。

Table 3 Comparison between W-T₃₂ and original strain

Strains	Biomass / $\text{g}_{\text{ww}}\cdot\text{L}^{-1}$	Tryptophanase/U	Production of L-Trp / $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
<i>E.coli</i> B1t7-A	6.2 ± 0.15	9.15 ± 0.06	65.3 ± 0.20
W-T ₃₂	8.2 ± 0.15	13.8 ± 0.05	110.5 ± 0.20

2.5 固定化酶促反应体系放大实验结果

以 W-T₃₂ 为发酵菌株首先进行发酵体积的放大,500mL 三角瓶→5L 发酵罐→50L 发酵罐进行菌体发酵培养,发现随着发酵体积的增大,菌体浓度达到同等 OD 值的发酵时间有所缩短(见图 4),除了接种量的偶然因素外,猜想离子束诱变改变了菌株的好氧性,另外发酵罐发酵可能提高了发酵放大工艺指标容量传质系数 KLa,发酵效率提高,能耗降低,有利于工业化生产。固定化酶促反应体系从 25 mL→250 mL→1L 逐级放大的实验结果同样具有类似现象,随着反应体系的增大,达到同等产物浓度的酶促反应时间缩短(见图 4),推测反应体系各成分的传质系数随着反应体积放大得到提高。菌体的发酵和固定化酶促放大实验均显示了菌株 W-T₃₂ 具有良好的工业化前景。

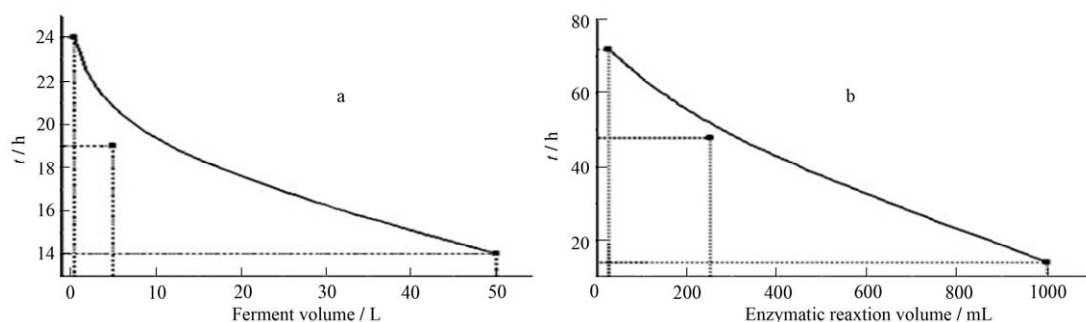


Fig.4 The results of enlarged experiment
a: Enlarged experiment of fermentation, b: Enlarged experiment of enzymatic reaction

以 W-T₃₂ 为发酵菌株首先进行发酵体积的放大, 500 mL 三角瓶→5 L 发酵罐→50 L 发酵罐进行菌体发酵培养, 发现随着发酵体积的增大, 菌体浓度达到同等 OD 值的发酵时间有所缩短 (见图 4), 除了接种量的偶然因素外, 猜想离子束诱变改变了菌株的好氧性, 另外发酵罐发酵可能提高了发酵放大工艺指标容量传质系数 KLa , 发酵效率提高, 能耗降低, 有利于工业化生产。固定化酶促反应体系从 25 mL→250 mL→1L 逐级放大的实验结果同样具有类似现象, 随着反应体系的增大, 达到同等产物浓度的酶促反应时间缩短 (见图 4), 推测反应体系各成分的传质系数随着反应体积放大得到提高。菌体的发酵和固定化酶促放大实验均显示了菌株 W-T₃₂ 具有良好的工业化前景。

3 结论

产色氨酸酶大肠杆菌的氮离子注入中, 随着注入剂量的增加, 菌体的存活率显著降低, 但却存在菌体存活率先降后略升再降的曲线变化, 有别于其他辐照所产生的存活剂量关系, 反映了离子束这种特异的诱变源具有的独特的诱变效果。通过在能量 10 keV, 剂量 $13 \times 10^{14} \text{ cm}^{-2}$ 参数下对产色氨酸酶大肠杆菌进行连续、多级诱变筛选, 得到一株酶法合成 L-Trp 的高产菌。该菌株的生物量对比出发菌株大大提高, 菌体产率可达 $8.2 \text{ g}_{\text{ww}} \cdot \text{L}^{-1}$, 同时其酶法合成色氨酸的量高达 $110 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 比出发菌株分别提高了 32.3 % 和 69.2 %。实验中发现, 离子注入后, 后代菌株生物量离散程度明显高于自然分离, 提示离子注入对微生物具有显著的诱变作用。以该菌株为产业化试验菌株进行了逐级放大实验, 随着菌体发酵体积放大, 生物量有所提高, 发酵时间显著缩短, 并且继代遗传稳定。将逐级放大获得的菌体制成固定化色氨酸酶, 酶促反应体系相应放大, L-Trp 产量均能维持比较高的水平, 表明其催化活性保持稳定。该菌株在产 L-Trp 的生产中体现出了耗能低, 操作简单粗放等特点, 具备了工业微生物的基本条件, 进行中试放大实验后, 有望在国产 L-色氨酸行业中得到应用, 实现其产业化价值。

参考文献

- 1 YU Zengliang. IEE Transaction on plasma science, 2000, **28**(1): 128-132
- 2 YAO Jianming, WANG Ji, WANG Xiangqin. Chin J Biotechnol, 2000, **16**(4): 478-481
- 3 YU Long, XU An. Acta Laser Biology Sinca, 1999, **8**(3): 217-220
- 4 WU Lijun, GERHARD R. Proc Natl Acad Sci, 1999, **96**: 4959-4964
- 5 WU Lifang, YU Zengliang. Radiat Environ Bio phs, 2001, **40**(1): 53-57
- 6 YU Zengliang. Introduction of ion-beam biotechnology. Hefei: Anhui Science and Technology Publishing House, 1998. 241-244
- 7 Hagino Hetal. Agri Biol Chem, 1975, **39**(6): 343-349
- 8 陈宁, 孙涛, 张克旭. 食品与发酵工业, 1997, **23**(5): 10-15
CHEN Ning, SUN Tao, ZHANG Kexu. Food Ferment Ind, 1997, **23**(5): 10-15
- 9 Mateus D M R, Alves S S, Fonseca M M R. J Biosci Bioeng, 2004, **97**(5): 289-293
- 10 Newton W A, Morino Y, Snell E E. J Biol Chem, 1965, **240**: 1211-1218
- 11 Torrey S. Notes Data Corporation, 1983
- 12 Aida K. Appl Microbial, 1986, **24**: 129-142
- 13 韦平和, 吴梧桐, 王敏. 中国现代应用药学杂志, 1999, **16**(6): 37-39
WEI Pinghe, WU Wutong, WANG Min. Chin J Modern Appl Pharm, 1999, **16**(6): 37-39
- 14 Wood W, Gunsalus I, Umbeit W. J Biol Chem, 1947, **170**: 313
- 15 YANG Jianbo, WU Lijun, LI Li. Scie China (Series C), 1997, **40**(1): 107-112
- 16 章明春. 工业微生物诱变育种. 北京: 科学出版社, 1999, 206
ZHANG Mingchun. The induce and breeding of industrial microbo. Beijing: Science Press, 1999, 206

Breeding of tryptophanase-producing *Escherichia coli* by use of N^+ ion beam implantation

PANG Min YAO Jianming

(Institute of Plasma Physics, Chinese Academy of Sciences, Hefei 230031, China)

ABSTRACT In this paper, the mutation breeding on *Escherichia coli* producing tryptophanase was studied after low energy N^+ ion beam implantation. Parameters in the N^+ ion beam implantation were firstly determined. It has been indicated that a high mutation rate of *E.coli* could be obtained by N^+ implantation with 10 keV and $13 \times 10^{14} N^+/cm^2$ when glycerin at 15 % concentration used as protector. After continuous mutagenicity a high-yield tryptophanase-producing strain has been screened out and both of its biomass and enzymatic activity are higher than the previous levels respectively. The results of scale-up production show that the biomass could be reach $8.2 g_{ww} \cdot L^{-1}$ and 110 g L-tryptophan could be formed in the volume of 1L enzymatic reaction system. In addition, the characteristics of its stable descend ability and easy operation make it a promising strain for industrialization.

KEYWORDS Ion implantation, L-tryptophan, *Escherichia coli*, Breeding

CLC Q517, Q939.97, TQ92