

2-酮基-D-葡萄糖酸产生菌球状节杆菌 K1022 抗噬菌体菌株的选育

孙文敬 赵峰梅 郭金权 杨庆文 贾哲君 蒋明珠

(山西省生物研究所 太原, 030006)

摘 要 从2-酮基-D-葡萄糖酸产生菌球状节杆菌 K1022 的异常发酵液中分离到3种噬菌体,分别将其命名为KS211、KS212和KS213。采用紫外诱变或自然选育的方法,获得了6株具有抗噬菌体能力的2-酮基-D-葡萄糖酸高产菌株。研究了抗株C224和K232的遗传稳定性,并在50kL的发酵罐上进行了发酵生产试验。结果表明,经多次传代,菌株C224和K232对噬菌体的抗性及其发酵产酸能力没有改变,可以应用于工业生产中。

关键词 2-酮基-D-葡萄糖酸,球状节杆菌,抗噬菌体菌株,发酵

10多年来,球状节杆菌(*Arthrobacter globiformis* K1022^[1])一直是国内间接发酵法生产食品抗氧化剂——D-异抗坏血酸钠的主要工业用菌,其发酵产物为2-酮基-D-葡萄糖酸(以下简称2KG)。近年来,采用该菌进行的发酵生产中经常出现异常现象如产酸率下降、发酵周期延长、发酵产物提取困难等。经双层平板法检测证实,导致这些异常现象发生的主要原因是噬菌体污染。

为克服噬菌体污染,我们从球状节杆菌的异常发酵液中分离纯化了噬菌体,并开展了抗噬菌体菌株的选育工作。

1 材料与方法

1.1 菌株和噬菌体

出发菌株:球状节杆菌 K1022,由山西省生物研究所工业微生物室筛选保藏。

噬菌体:噬菌体 KS211、KS212 和 KS213,从某工厂球状节杆菌 K1022 的异常发酵液中分离获得,由山西省生物研究所工业微生物室保藏。

1.2 培养基

肉汤培养基:牛肉膏 0.3%,蛋白胨 1.0%,NaCl 0.5%,琼脂 2.0%,pH6.7~7.0。

该培养基用于细菌和噬菌体的保藏、扩增及活化等。

双层琼脂培养基:牛肉膏 0.3%,蛋白胨 1.0%,NaCl 0.5%,底层琼脂 1.8%,上层琼脂 0.6%,pH6.7~7.0。用于噬菌体的分离纯化及菌株对噬菌体的抗性检查。

种子培养基:葡萄糖 2.0%,玉米浆 1.0%,尿素 0.2%,KH₂PO₄ 0.2%,MgSO₄·7H₂O 0.05%,pH7.0。该培养基用于菌种的扩大培养及噬菌体原液的制备,在250 mL三角瓶中的装量为25 mL。

发酵培养基:葡萄糖 18.0%,玉米浆 2.0%,CaCO₃ 4.5%,pH6.7。用于摇瓶发酵培养,在250 mL三角瓶的装量为20 mL。

蛋白胨液:蛋白胨 1.0%,pH7.0。该液用于稀释噬菌体或敏感菌。

1.3 培养方法

敏感菌株、抗性菌株及噬菌体在肉汤培养基或双层琼脂培养基上的培养温度为31℃,培养时间为16~24 h;摇瓶种子培养及发酵均在旋转式摇床(转速265 r/min,偏心距25 mm)上进行,培养温度31℃,培养周期分别为24 h和72 h。

1.4 噬菌体的分离、纯化及原液制备

取异常发酵液离心(4000 r/min, 10 min), 上清液经微孔滤膜除菌, 然后在双层琼脂平板上进行噬菌体分离, 再以单斑穿刺法对噬菌体进行 4 次纯化。纯化后的各种噬菌体分别加入已接菌的种子培养基中进行增殖培养, 然后等体积混合即成噬菌体原液。

1.5 噬菌体的电镜观察

用附有碳膜的铜网沾取噬菌斑, 然后用 1% 醋酸双氧铀水溶液染色 5 min, 再用 JEM-100CX2 型透射电镜观察并摄影(由中国辐射防护研究院电镜室拍摄)。

1.6 抗噬菌体菌株的选育方法

将紫外线照射诱变过的菌液或未经诱变的对数生长期的种子液 1 mL 接入种子培养基中, 同时加入噬菌体液 2 mL (10^8 pfu/mL), 摇床振荡培养 24 h。适当稀释培养液并将其涂布于肉汤培养基平板上培养, 挑单菌落并用划线点滴法^[2]初步测定其对噬菌体的抗性。把具有抗性的菌分别接入种子培养基中, 再加入噬菌体液混合培养, 挑选出生长正常的菌株。在噬菌体存在的条件下, 比较这些菌株在摇瓶中的产酸能力, 最后选出既具抗性又具高产酸能力的菌株作为目的菌株。

1.7 测定方法

种液中菌体生长量(OD 值)的测定: 用新制蒸馏水稀释种液 20 倍, 以水作空白, 用 721 型分光光度计测定种液在 650 nm 处的光密度, 比色杯的光程为 1 cm。

发酵液中菌体生长量(OD 值)的测定: 用 0.2 mol/L 的 HCl 稀释发酵液 20 倍, 以水作空白, 用 721 型分光光度计测定发酵液在 650 nm 处的光密度, 比色杯的光程为 1 cm。

2KG 含量的测定 旋光法。

噬菌体效价的测定 双层琼脂平板法。

pH 值的测定 用国产精密 pH 试纸。

2 结果与讨论

2.1 噬菌体的分离和纯化

经多次分离、纯化, 从球状节杆菌 K1022 的异常发酵液中获得了 3 种噬菌体, 分别将其命名为 KS211、KS212 和 KS213, 它们可产生 3 种形态不同的噬菌斑。KS211 的噬菌斑为透明的边缘清晰的圆形噬菌斑, 直径约 1 mm(图 1); KS212 的噬菌斑为半透明的边缘不清的圆形噬菌斑, 直径约 1 mm(图 2); KS213 的噬菌斑为中间透明、边缘不清且有晕圈的圆形噬菌斑, 直径 > 1 mm(图 3)。

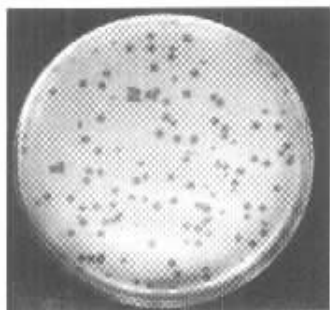


图 1 KS211 的噬菌斑

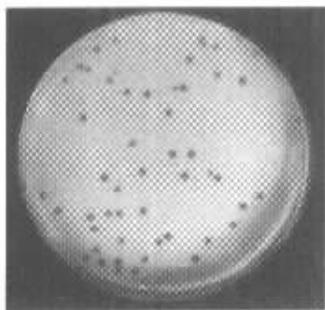


图 2 KS212 的噬菌斑

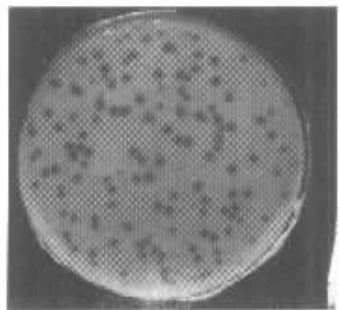


图 3 KS213 的噬菌斑

2.2 噬菌体的电镜观察

电镜观察, 噬菌体 KS211 为近球形, 直径 60 nm(图 4); KS212 为蝌蚪形, 具有直径 58.8 nm 的六角形头部及 75.5 nm 长的尾部(图 5); KS213 也呈蝌蚪形, 具有直径 73 nm 的六角形头部及 80 nm 长的尾部(图 6)。与以前

报道的 2KG 产生菌荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*) K1005 的噬菌体^[3]相比, KS211 和 KS502 在形状及大小上均十分相似, KS212、KS213 和 KS503 具有相似的形状, 头部直径及尾部长度上差异较大。

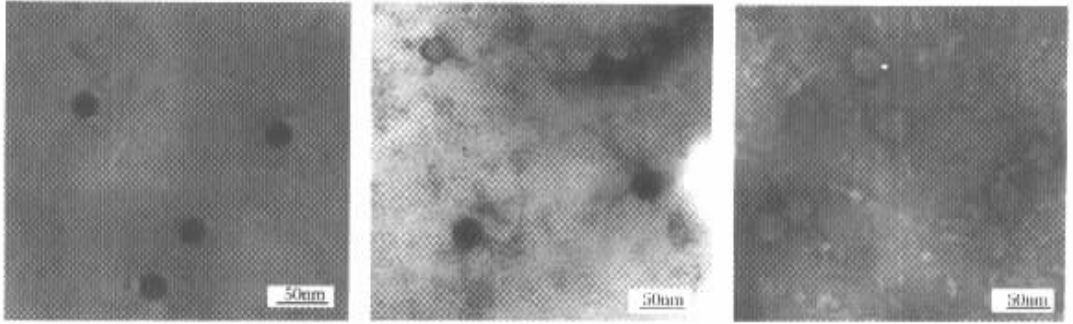


图4 噬菌体 KS21($\times 120000$) 图5 噬菌体 KS21($\times 120000$) 图6 噬菌体 KS21($\times 120000$)

2.3 抗噬菌体菌株的选育

经多次筛选,获得了6株抗噬菌体的2KG高产菌株。其中,K232和K233为自然选育获得的菌株,A231、A234和A235为紫外线诱变20s获得的菌株,C224为紫外线诱变30s获得的菌株。在噬菌体存在的条件下,这些菌株的产酸水平达到或超过了对照敏感株K1022的正常产酸水平(表1)。我们选用C224和K232做进一步的试验。

表1 抗噬菌体菌株的选育结果

菌株	种液 OD 值	产 2KG/g \cdot L $^{-1}$	发酵转化率/%
K1022	0.700	159.1	90.21
K1022 + p	0.165	125.8	71.34
K232	0.685	161.4	91.49
K232 + p	0.690	163.6	92.76
K233	0.720	162.5	92.14
K233 + p	0.740	163.0	92.42
A231	0.710	159.1	90.21
A231 + p	0.680	158.3	89.76
A234	0.690	159.1	90.21
A234 + p	0.700	161.6	91.63
A235	0.675	156.8	88.91
A235 + p	0.670	159.1	90.21
C224	0.710	161.4	91.49
C224 + p	0.700	159.1	90.20

注: + p 表示培养基中添加噬菌体。

2.4 菌株 C224 和 K232 抗噬菌体能力检查

在种子培养基中分别接种 K1022、C224 和 K232,同时分别加入 1 mL 浓度为 10^8 pfu/mL 的混合噬菌体液,进行摇瓶种子培养并定时测定培养液的 OD 值及噬菌体效价(以球状节杆菌 K1022 作为敏感菌)。结果(图7)表明,菌株 C224 和 K232 对试验浓度下的混

合噬菌体具有明显的抗性,在整个培养过程中表现正常;在噬菌体存在的条件下,菌株 K1022 的生长受到明显抑制,并产生大量的噬菌体,培养液中噬菌体的最高浓度可达 10^{12} pfu/mL 以上。

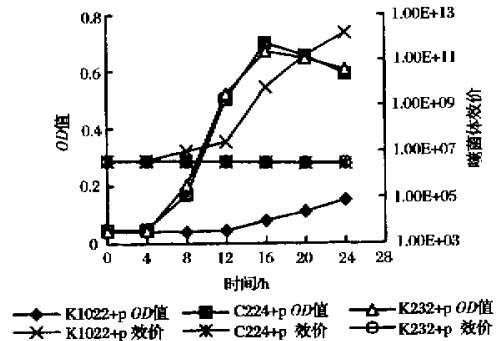


图7 噬菌体存在条件下 C224、K232 和 K1022 的种子生长曲线

2.5 抗株 C224 和 K232 的遗传稳定性

通过摇床种子培养和发酵试验,考察了多次传代后抗株 C224 和 K232 的种液 OD 值及发酵产酸能力。结果(表2)表明,经多次传代,抗株在种子培养及发酵中均未出现异常现象。

2.6 抗株 C224 和 K232 的发酵生产性试验

在生产环境中噬菌体大量存在的情况下,使用抗株 C224、K232 及敏感株 K1022,按以前报道^[4]的发酵条件,在 50kL 的发酵罐上各进行了连续 5 批次的发酵试验(表3)。从发酵过程来看,根据生产中的观察,抗

表 2 抗株 C224 和 K232 的遗传稳定性

菌 株	传代次数/次	种液 OD 值	种液 pH 值	产 2KG/g·L ⁻¹	发酵转化率/%
C224	3	0.670	7.2	160.1	90.78
	5	0.640	7.5	165.2	93.67
	7	0.670	6.7	162.3	92.03
	9	0.650	7.5	170.8	96.85
C224 + p	3	0.670	7.2	168.1	95.31
	5	0.640	6.7	159.1	90.21
	7	0.670	7.0	167.3	94.86
	9	0.640	7.2	167.3	94.86
K232	3	0.680	7.0	169.7	96.22
	5	0.640	7.5	159.4	90.38
	7	0.660	7.5	161.0	91.29
	9	0.640	7.2	167.6	95.03
K232 + p	3	0.630	7.5	160.2	90.84
	5	0.600	7.2	159.8	90.61
	7	0.670	7.0	161.3	91.46
	9	0.630	7.2	168.5	95.54
K1022	3	0.690	6.4	161.2	91.40
		0.092			
K1022 + p	3	0.129	5.0	118.4	67.13
	3		5.0	132.6	75.19

株 C224、K232 与敏感株 K1022 的正常发酵大致相同,未发现受噬菌体污染的迹象,而 K1022 的发酵有 3 批次出现异常,发酵周期明显延长,经检测为受噬菌体污染所致;从产酸能力上看,抗株 C224、K232 与未受噬菌体污染的敏感株 K1022 基本相当,而受噬菌体污染的 K1022 的发酵转化率通常要降低

表 3 抗株 C224 和 K232 的生产性发酵试验结果

菌 株 批 次	传代次数 /次	2KG 产量 /kg	发酵转化率 /%	发酵周期 /h	
C224	1	3	4845.32	87.08	36.0
	2	7	4950.71	88.98	32.0
	3	11	4912.03	88.28	39.5
	4	15	4863.55	87.41	36.0
	5	19	4890.17	87.89	33.0
K232	1	4	4902.30	88.11	35.0
	2	8	4823.26	86.69	32.5
	3	12	4854.74	87.25	37.0
	4	16	4790.03	86.09	34.5
	5	20	4850.82	87.18	38.0
K1022	1	5	4876.91	87.65	37.5
	2 *	5	4382.36	78.76	56.0
	3	5	4862.24	87.39	40.0
	4 *	5	4573.09	82.19	52.0
	5 *	5	3980.52	71.54	95.5

注: * 表示噬菌体污染

10% 以上;从遗传稳定性上来看,经多次传代的菌株 C224 和 K232 在对噬菌体的抗性及其产酸能力上没有变化。

参 考 文 献

- 1 蒋明珠,白照熙,张俊贤等. 工业微生物, 1989, 19 (1) 3~7
- 2 余茂效,那淑敏,董扣洪等. 微生物学报, 1986, 26 (3) 232~237
- 3 赵峰梅,孙文敬,王慕华等. 工业微生物, 2000, 30 (4) 45~49
- 4 孙文敬,赵峰梅,黄惠英等. 食品与发酵工业, 2001, 27 (7) 8~11

Selection of Phage-resistant Mutants from 2-Keto-D-gluconic Acid Producing Strain *Arthrobacter globiformis* K1022

Sun Wenjing Zhao Fengmei Guo Jinqun Yang Qingwen
Jia Zhejun Jiang Mingzhu

(Shanxi Institute of Biology, Taiyuan, 030006)

ABSTRACT Three different phages, named KS211, KS212 and KS213 respectively, were isolated from the abnormal fermentation broth of *Arthrobacter globiformis* K1022 which producing 2-keto-D-gluconic acid. Six phage-resistant mutants were obtained by using U.V. light as mutagen or phage-treatment with three different phages. The mutants gave 2-keto-D-gluconic acid yield as high as that of the parent strain K1022. Studied the stability of hereditary feature of strain C224 and K232 and also did the fermentation experiment in 50kL fermentor. The results showed that resistance of the mutants against phages and 2-keto-D-gluconic acid producing ability had not changed over 10 generations, and the mutants could be used in industrial production.

Key words 2-keto-D-gluconic acid, *Arthrobacter globiformis*, phage-resistant strain, fermentation