

重离子束诱变选育谷氨酸高产菌株

缪建顺^{1,2,3} 曹国珍^{2,3} 张苗苗^{2,3} 张文德⁴ 杨建设¹ 李文建^{2,3} 陆 栋^{2,3}

¹ (西北师范大学生命科学学院 兰州 730070)

² (中国科学院近代物理研究所 兰州 730000)

³ (甘肃省微生物资源开发利用重点实验室 兰州 730000)

⁴ (甘肃荣华实业(集团)股份有限公司 武威 733000)

摘要 采用中能¹²C⁶⁺离子束辐照诱变谷氨酸生产菌谷氨酸棒杆菌,结合3种选择性培养基初筛突变菌株,通过摇瓶复筛谷氨酸高产菌株,并进行批次发酵实验。结果表明,经80 MeV/u 碳离子束辐照后,受照菌存活率发生显著变化,通过选择性平板初筛、摇瓶复筛选育出1株高产菌株GM006,菌体生长和发酵有较大改进,其发酵最高产酸达121.10 g/L,比出发菌株提高了10.09%,糖酸转化率达60.55%,比原始菌株提高10.09%。该GM006突变株是很有前景的谷氨酸工业生产菌,同时证明重离子束是一种高效的辐射诱变源。

关键词 谷氨酸,重离子束,诱变育种,辐照

中图分类号 Q691.5, TL99

DOI: 10.11889/j.1000-3436.2015.rj.33.050401

谷氨酸 (Glutamate acid, GA) 是世界上第一氨基酸产品,被广泛应用于食品、医药及化工等行业,市场需求量大。我国是谷氨酸生产大国,以微生物发酵生产为主,2013年产量达到270万吨,占世界产量的70%左右。然而,单从产酸水平和糖酸转化率两项指标来评价,我国还落后于国际水平。目前,国内谷氨酸产业主要以微生物亚适量控制发酵为主,存在着谷氨酸产率低、原料利用率低、能耗高、污染严重等问题,严重制约了我国谷氨酸工业的发展^[1-2]。造成这种局面的内在原因主要是菌种产酸率相对较低及遗传稳定性差等^[3]。因此,谷氨酸高产菌的选育与开发是较为迫切的课题。对谷氨酸生产菌种进行改良是提高谷氨酸产率重要途径^[4]。利用物理(紫外线、 γ -射线和X-射线等)、化学(碱基类、5-氟尿嘧啶和烷化剂等)方法单独、复合或重复诱变处理是微生物遗传育种的经典方法,但传统诱变育种技术缺乏定向性,筛选工作量大,辐照技术还存在安全问题,而化学诱变剂多为有毒试剂,对人体毒害大。另外,尽管基因工程技术已用于从基因水平改造与选育高产菌的研究,但因其基因表达产物产量不高,稳定性差,重组质粒易丢失等缺点还很难实现工业化。谷氨酸菌种选育工作从20世纪80年代开始一直在不断进行并取得

不少成果。如吴新世等^[5]利用硫酸二乙酯(DES)和紫外线(UV)对谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)复合诱变,选育得到一株高产突变株LG-01,发酵48 h,谷氨酸产量达到106.10 g/L,比原始菌株提高了25.74%。甄卫军等^[6]采用低能N⁺离子注入技术,诱变选育高产谷氨酸菌种,初筛到2株高产菌株,产酸效率比出发菌产酸分别提高35.48%和25%,且突变体生长速度加快,对数期提前,对缩短发酵周期有促进作用。

中、高能离子束有其特殊的物理性质,如高激发性、传能线密度(Linear energy transfer, LET)高、相对生物学效应(Relative biological effectiveness, RBE)大、尖锐的能量损失峰(Bragg峰)及氧效应增强比(Oxygen enhancement ratio, OER)较小等^[7],所以,重离子束在生物辐照育种方面表现出损伤轻、突变谱广和突变率高等优势。加之辐照离子的质量可以选择,离子入射深度和部位可精确控制^[8],使诱变更具有方向性。因此,通过重离子辐照诱变获得微生物新基因、新性状,最终得到高产、稳定、低耗、抗菌的理想工业菌种显示出极大的优势和先进性^[9],在改良微生物方面表现出很好的应用效果。例如中国科学院近代物理研究所研究人员用重离子辐照酿酒酵母、黑曲霉、阿维菌素生产菌^[10-12]等微

基金项目:中国科学院西部之光人才培养计划项目(Y306010XB0)和甘肃省自然科学基金项目(1308RJZA316)资助

第一作者:缪建顺,男,1990年1月出生,2015年于西北师范大学获硕士学位,主要从事重离子辐照生物机理研究

通讯作者:陆栋,男,博士,副研究员,硕士生导师, E-mail: ld@impcas.ac.cn

收稿日期:初稿 2015-04-24;修回 2014-05-19

生物已筛选获得高产稳定菌株。目前,将重离子束应用于谷氨酸选育高产菌株的研究尚未见报道,本研究尝试采用中能 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束诱变选育谷氨酸高产菌株,初步试验表明,突变体生长状况得到较大改进,初筛菌株产酸率也得到提高。

1 材料与方法

1.1 试剂

谷氨酸棒杆菌,由某企业提供。该菌株是生物素亚适量型菌株。玉米浆(Corn extract liquid)购自天津市利发隆化工科技有限公司,实验所用其他试剂均为国产分析纯。

1.2 培养基及培养方法

完全培养基(g/L):葡萄糖 10.0,酵母粉 10.0,蛋白胨 10.0, NaCl 5.0。

平板培养基(g/L):葡萄糖 20.0, KH_2PO_4 4.5, K_2HPO_4 1.5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.02, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02, 生物素 5×10^{-5} , 硫氨酸 1×10^{-4} , 琼脂 20.0, pH = 7.0–7.2。

种子培养基(g/L):葡萄糖 25.0, 玉米浆 30.0, K_2HPO_4 1.7, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.6, 尿素 6.0, pH = 7.0。

发酵培养基(g/L):葡萄糖 200.0, 玉米浆 6.0, K_2HPO_4 1.7, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.9, 尿素 6.0 (分装灭菌), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2×10^{-3} , $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2×10^{-3} , pH = 7.0–7.2。

筛选培养基:琥珀酸唯一碳源培养基——以 30.0 g/L 的琥珀酸代替平板培养基中的葡萄糖;谷氨酰胺培养基——平板培养基中加入 5.0 g/L 的谷氨酰胺;高糖培养基——平板培养基中另加入 180.0 g/L 的葡萄糖。

1.3 试验方法

1.3.1 辐照前菌悬液的制备

取在完全培养基中生长 20 h 的稳定期菌液 1 mL, 转接到完全培养基中继续活化培养至 8 h (对数生长期) 为待辐照菌液。在无菌条件下将菌悬液 1.5 mL 置于辐照专用皿中, 用封口膜封好。

1.3.2 辐照诱变及辐照参数

将小皿放入中科院近代物理所重离子辐照育种实验平台的辐照盘中, 利用兰州重离子加速器国家重点实验室提供的 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束进行辐照处理。 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束能量为 80 MeV/u, 剂量率为 30 Gy/min, 经

过 50 μm 的不锈钢窗, 20 μm 的 mylar 膜和 1.3 m 空气后能量为 76.37 MeV/u, 预计水中射程 16 mm, 峰位 15.5 mm。实验设计受照剂量为 0 Gy、80 Gy、100 Gy、200 Gy、300 Gy、400 Gy、500 Gy、600 Gy 和 700 Gy。

1.3.3 存活率测定

将不同剂量辐照后的菌悬液梯度稀释后, 取 10^{-6} 稀释梯度菌悬液 100 μL 涂布在平板培养基上, 培养箱中 30 $^{\circ}\text{C}$ 条件下倒置培养 48 h, 统计单菌落数, 计算存活率(%), 每组实验设 3 组重复。其计算公式如下:

$$\text{存活率} = \frac{\text{辐照组长出的菌落数}}{\text{对照组长出的菌落数}} \times 100\%$$

1.3.4 平板法初筛原理和方法

将诱变处理后的菌液, 稀释后涂布在选择培养基平板上, 30 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱培养 2–3 d, 挑出长势较好的菌落, 纯培养后保存。

1.3.5 摇瓶发酵初筛及复筛

将初筛高产菌株在完全培养基中活化后, 再经种子培养基 30 $^{\circ}\text{C}$ 活化培养 8–9 h, 后转入含 20 mL 发酵培养基的摇瓶中, 发酵 38 h (动态控制: 摇床转速 120–180 r/min, 温度 34–38 $^{\circ}\text{C}$, 发酵过程中分段采样检测发酵液 pH 值, 并用微量注射器无菌条件下向瓶中注射 40% 无菌尿素溶液, 控制发酵液 pH 值在合适的范围), 检测谷氨酸含量。

1.3.6 突变菌株稳定性测试

将需要检测的突变菌株进行平板划线培养, 平板培养 5 代后进行发酵实验, 重复共计五批次。

1.4 分析检测

采用 SBA-40D 生物传感器测定谷氨酸含量。

采用分光光度法测定菌体浓度: 将样品用蒸馏水稀释 25 倍, 用分光光度计检测 660 nm 处吸光值, 平行测定 3 次。

种子活力测定时选取一级种子菌液 5 mL, 加入 0.1% 的亚甲基蓝溶液 1 mL, 然后将其置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中, 测定混合液退色的时间, 平行测定 3 次。

活性菌体呼吸速率较快, 易于亚甲基蓝发生氧化还原反应, 亚甲基蓝原成无色的还原态亚甲蓝。

残糖测定采用斐林滴定法^[13], 平行操作 3 次。

pH 值的测定采用 PHS-3C 型精密酸度计。

2 结果与分析

2.1 受照菌种存活率与受照剂量的关系

将不同受照剂量的菌液稀释后涂布在平板培养基上作存活率比较，得存活率曲线见图 1。

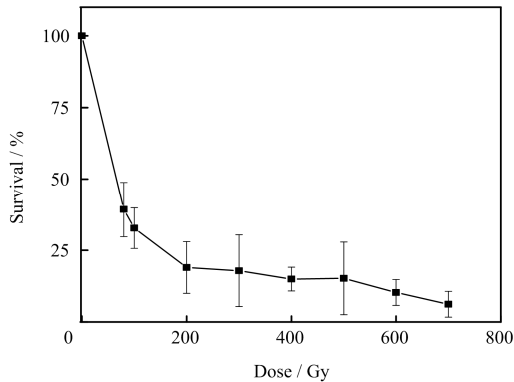


图 1 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束辐照谷氨酸棒杆菌存活曲线
Fig.1 Survival curve of *Corynebacterium glutamicum* after irradiation with $^{12}\text{C}^{6+}$

由图 1 可见，受照剂量小于 200 Gy 时，菌体存活率急剧下降，说明该菌株辐射敏感性较强。受照剂量在 200–500 Gy 时，受照菌体存活率继续下降，但下降速率缓慢，表现出一定程度的抗辐射性，这可能是辐射损伤达到了细胞修复阈值，启动了损伤修复途径降低了细胞死亡率^[14]；电离辐射对 DNA 的损伤包括碱基损伤、单链断裂(Single strand break, SSB)、双链断裂 (Double strand break, DSB)等，不同剂量的辐照导致 DNA 结构的变化不同，一定条件下造成的损伤更有利于损伤修复^[15]，这样降低了 DNA 损伤率，一定程度降低了细胞死亡率。当辐照剂量大于 500 Gy 时，菌体存活率继续下降，700 Gy

剂量时，致死率达 93.81%，这是辐射能量的持续积累严重损伤菌体活性生物大分子并产生大量自由基和软射线等引起的。

2.2 突变菌株选择性平板初筛

谷氨酸生物合成途径及代谢调节机制受多种因素的影响，内在原因主要是谷氨酸生物合成代谢途径分支较多，葡萄糖难有更多的能量流向谷氨酸生成，且谷氨酸合成受其自身的反馈抑制和反馈阻遏，合成的谷氨酸还有可能发生分解代谢，导致谷氨酸生物合成一直未达到理想水平。

本实验通过选择性平板定向初筛特殊抗性突变体，目的明确，大大减少了筛选工作量。例如，要使菌种能高产谷氨酸，首先菌种要具备在高糖和高谷氨酸的培养基中仍能正常生长代谢的能力，因此实验中还选用高糖平板培养基筛选生长良好的高渗透压突变株，保证其在高渗透压培养基中菌体生长和谷氨酸合成不受影响，以适应工业生产；通过谷氨酰胺选择性培养基选育谷氨酸的结构类似物抗性突变株和营养缺陷型的回复突变株，可以解除自身的反馈抑制和反馈阻遏，增大谷氨酸积累量；通过选育以琥珀酸为唯一碳源生长良好的菌株，以强化 CO_2 固定（增加谷氨酸的前体物的合成量），使谷氨酸大量积累。

运用选择性平板法对辐照后菌悬液进行初筛，利用高葡萄糖平板培养基、谷氨酰胺平板培养基和琥珀酸唯一碳源培养基筛选出了 146 株特殊抗性菌株，统计结果见表 1。编号为 G001-G146，纯培养后保存。

表 1 突变体筛选结果统计表
Table 1 The results of mutant

突变体筛选条件 Screening conditions of mutant	受照剂量 Absorbed dose / Gy							
	80	100	200	300	400	500	600	700
高葡萄糖平板 High concentration of glucose plate	0	1	3	13	7	2	0	0
谷氨酰胺平板 Glutamine plate	4	3	7	11	6	8	1	2
琥珀酸平板* Succinic acid plate	9	17	13	12	16	7	4	1

注：*，所示琥珀酸平板是以琥珀酸为唯一碳源的平板培养基。Note: *, plate medium of succinic acid as the sole carbon source.

2.3 突变菌株摇瓶初筛

将平板筛选获得的突变菌株活化、一级种子培养、摇瓶发酵后做产酸测定，得突变体（部分）产酸量见图 2。由图 2 可知，产酸率有高于对照的正突变，也有产酸率低于出发菌的负突变现象。

2.4 突变体摇瓶复筛

将初筛高于对照的菌株经纯化、复壮，复筛高产突变体产酸量见图 3。由图 3 可见，GM006 号菌株产酸最高，高于出发菌株约 10.40%。

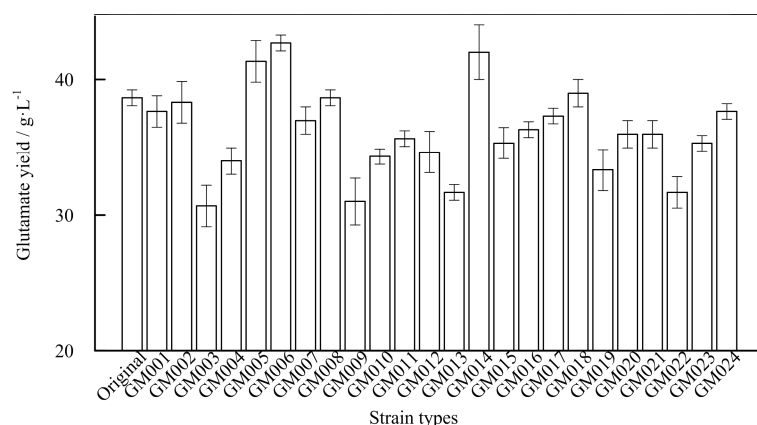


图2 突变菌株摇瓶初筛产酸
Fig.2 The glutamate yield of mutant

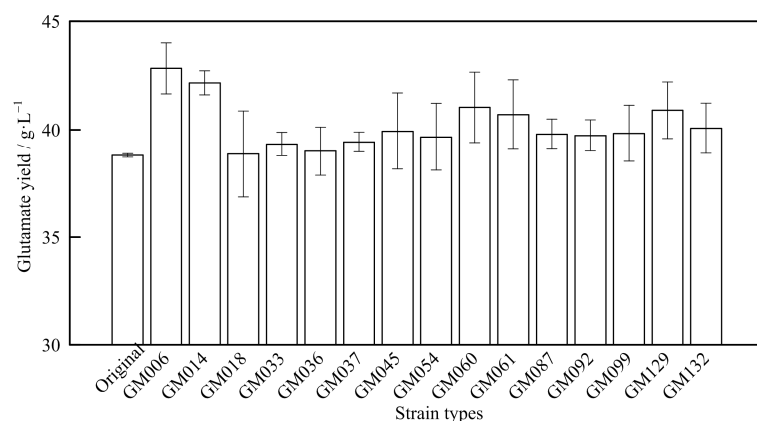


图3 突变菌株摇瓶复筛产酸
Fig.3 Glutamate yield of mutant

2.5 突变体 GM006 发酵参数研究

2.5.1 GM006 菌株生长曲线分析

图4为原始菌株、突变菌株GM006的生长曲线。从图4可知,在4h后,2株菌株都开始进入对数期生长,此时菌体的生长繁殖比较旺盛,活力最佳,在10h左右 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子辐照后突变菌株GM006

进入平稳期,原始菌株稍晚。从整体分析,2株菌株的生长曲线较为相似,差异仅表现为突变菌株对数期生长较快。

由菌株活力曲线(图5)可知,GM006菌株活力在5~7h迅速升高,最高点在7h,7h以后逐渐降低;而原始菌株活力在9h时出现峰值,9h后活力下降。

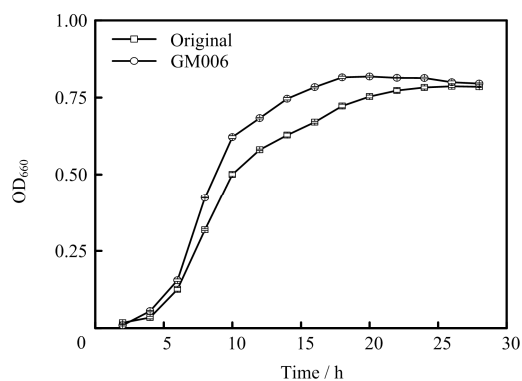


图4 突变菌株 GM006 与原始菌株生长曲线
Fig.4 Growth curves of GM006 and original strain

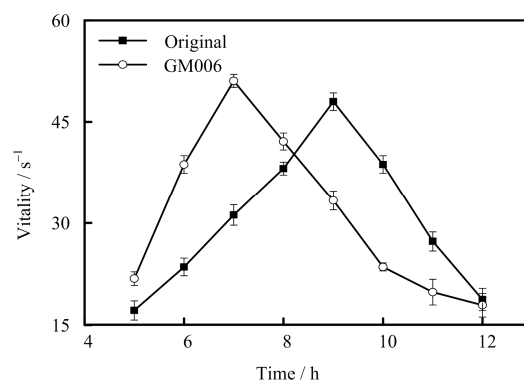


图5 GM006 和原始菌株种子活力曲线
Fig.5 Seed-vitality curves of GM006 and original strain

菌体生长曲线对谷氨酸一级种子发酵过程有着重要意义，谷氨酸一级种子发酵过程经历调整期、对数期、稳定期三个过程，最佳接种时机在对数期后期^[16]。实验结果显示 GM006 突变株生长对数期快于原始菌株，菌株活力最高点在 7 h 左右，此时 GM006 菌株种子密度符合接种要求，在这个时间段接种可达到最佳的发酵效率，可缩短生产周期。

2.5.2 突变体发酵曲线分析

GM006 与原始菌株发酵效率的比较见图 6。在 38 h 发酵周期中，两种菌在 8 h 前产酸微弱（几乎不产酸），8 h 后产酸效率迅速增加，并保持稳定，但突变体 GM006 的谷氨酸产量始终高于原始菌株。

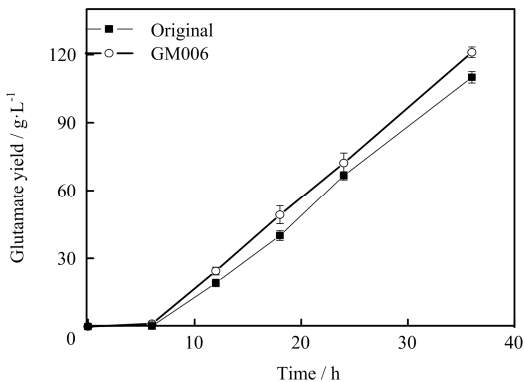


图 6 GM006 和原始菌株发酵效率比较
Fig.6 Fermentation-efficiency comparison between GM006 and original

由图 7 可知，发酵结束时，GM006 产酸明显高于原始菌株，残糖百分含量低于原始菌株，糖酸转化率提高 10.09%。由此说明，突变菌株 GM006 代谢能力强，活力高。

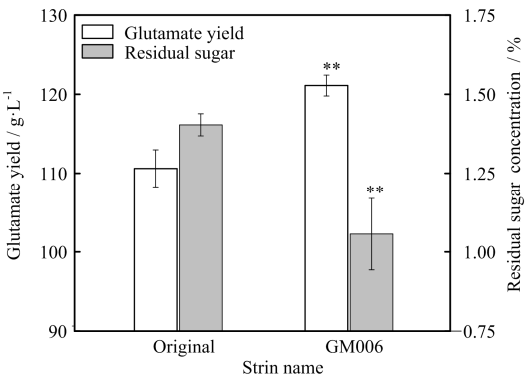


图 7 发酵实验谷氨酸产量和残糖量对比, **, $p<0.01$
Fig.7 Comparison between glutamate yield and residue reducing glucose, **, $p<0.01$

2.5.3 菌株 GM006 的摇瓶发酵稳定性试验

选择菌株 GM006 进行遗传稳定性试验。发酵周期 38 h，摇床转速 120–180 r/min，温度 34–38 ℃，并通过流加尿素控制 pH 值 6.5–8.5。连续 5 批次的摇瓶发酵如表 2 所示，结果表明，菌株 GM006 具有较好的产酸稳定性，且酸度保持在 120 g/L 左右。

表 2 菌株 GM006 及原始菌株摇瓶发酵稳定性试验
Table 2 The results of fermentation stability about GM006 strain and original strain

批次 Fermentation batch	酸度 / g·L ⁻¹ Glutamate content		残糖 / g·L ⁻¹ Residual glucose content		糖酸转化率 / % Conversion rate of glucose	
	GM006	Original	GM006	Original	GM006	Original
1	120.3±3.61	110.3±2.48	0.952±0.08	1.373±0.23	60.15	55.15
2	119.8±3.14	110.6±1.72	1.062±0.13	1.432±0.17	59.90	55.30
3	121.1±2.56	109.5±1.34	0.829±0.15	1.517±0.09	60.55	54.75
4	119.9±3.61	111.3±2.81	1.096±0.10	1.327±0.15	59.95	55.65
5	120.8±3.49	109.7±1.92	0.924±0.13	1.427±0.14	60.40	54.85

3 结果及讨论

重离子束是粒子辐射的一种，具有能量沉积和动量传递双重作用特征，因而具有特殊的诱变特性。该技术应用于生物育种，突破了传统的理化诱变方法，在生物诱变育种方面具有独特的优势，表现出了很好的应用效果。高效稳定的生产菌种是影响发酵行业发展的内在因素，本试验初次用 ¹²C⁶⁺离子束

对谷氨酸棒杆菌进行诱变处理取得了较好的结果，定向筛选选育出一株高产谷氨酸突变菌株 GM006，生长曲线得到很大改进，发酵对数期提前，对缩短发酵周期有积极的作用。以葡萄糖浓度为 200 g/L 的高初糖进行一次性发酵，发酵 38 h 后，谷氨酸的产率达到 121.1 g/L，与出发菌株酸度值相比提高了 10.09%，原料利用率也有所提高。GM006 连续发酵 5 次，最后产酸稳定在 119.8–121.1 g/L，可以看出 GM006 菌株合成谷氨酸的能力增强，是

一株很有前景的工业生产菌株。这与 N^+ 离子束注入谷氨酸生产菌高产菌株选育结果相似, 如甄卫军^[17]等尝试用低能 N^+ 离子注入谷氨酸生产菌, 诱变选育谷氨酸高产菌株, 初筛得到两株突变菌平均产酸分别达到 8.4% 和 7.5%, 比出发菌分别提高 35.48% 和 25%。

突变菌株的高产特性不仅由其遗传性状决定, 也受其生长环境条件影响。只有为菌株创造了产物合成的最佳培养条件, 才能使高产基因得以充分表达^[18-19], 产酸量更进一步的提高, 因此适合该菌株产酸的培养基、发酵条件等因素还有待于优化研究。

随着分子生物学和分子遗传学等学科的发展, 新的生物技术正不断地和传统的育种方法相结合, 使重离子辐照诱变技术的研究与应用焕发了新的生机。加之微生物种类繁多、代谢多样、可塑性强, 将在发掘新型能源、开发保健食品、进行环境治理等方面开创崭新的局面^[20]。

参考文献

- 于信令. 味精工业手册: 第二版 [M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2009: 99-101.
YU Xinling. Handbook of MSG Industry: Second Edition [M]. Beijing: China Light Industry Press, 2009: 99-101.
- Kumar R, Vikramachakravarthi D, Pal P. Production and purification of glutamic acid: A critical review towards process intensification [J]. Chemical Engineering and Processing: Process Intensification, 2014, **81**: 59-71.
- Ali N M. Study on bacterial isolates for amino acid production: improvement in production of amino acids of commercial importance [D]. Govt. College University, Lahore, 2010.
- Vikramachakravarthi D, Kumar R, Pal P. Production of L (+) glutamic acid in a fully membrane-integrated hybrid reactor system: direct and continuous production under non-neutralizing conditions [J]. Industrial & Engineering Chemistry Research, 2014, **53**(49): 19019-19027.
- 吴新世, 王楠, 彭媛, 等. 一株产谷氨酸菌株的复合诱变选育及突变株的生物学特性 [J]. 天津理工大学学报, 2012, **28**(1): 83-88.
WU Xinshi, WANG Nan, PENG Yuan, *et al.* Compound mutation of a glutamic acid-producing strain and biological qualities of the mutant [J]. Journal of Tianjin University of Technology, 2012, **28**(1): 83-88.
- 甄卫军, 李茜, 张石峰, 等. 低能 N^+ 离子注入谷氨酸产生菌诱变选育初步研究 [J]. 食品与发酵工业, 2002, **28**(3): 20-24.
- ZHEN Weijun, LI Qian, ZHANG Shifeng, *et al.* Preliminary study on mutation breeding of glutamic acid producing strains with low energy N^+ ion beam implantation [J]. Food and Fermentation Industries, 2002, **28**(3): 20-24.
- 李仁民, 王菊芳, 李文建. 重离子束在微生物诱变育种及生物能源开发中的应用 [J]. 原子核物理评论, 2007, **24**(3): 234-237.
LI Renmin, WANG Jufang, LI Wenjian. Application of heavy ion beams to microbial mutation breeding and exploitation of biological energy [J]. Nuclear Physics Review, 2007, **24**(3): 234-237.
- 夏佳文, 詹文龙, 魏宝文, 等. 兰州重离子加速器冷却储存环 [J]. 强激光与粒子束, 2008, **20**(11): 1987-1794.
XIA Jiawen, ZHAN Wenlong, WEI Baowen, *et al.* Heavy ion cooler-storage-ring synchrotron in Lanzhou [J]. High Power Laser and Particle Beams, 2008, **20**(11): 1987-1794.
- YU Zengliang, YU Liangdeng. Introduction to ion beam biotechnology [M]. Springer, 2006: 178-181.
- 陆栋, 王颖, 刘青芳, 等. ^{12}C 离子束辐照对酵母发酵能力的影响 [J]. 核技术, 2010, **33**(5): 350-353.
LU Dong, WANG Ying, LIU Qingfang, *et al.* Improved ethanol fermentation of a yeast mutant by C-12 ion beam irradiation [J]. Nuclear Techniques, 2010, **33**(5): 350-353.
- 胡伟, 陈积红, 张珍, 等. 重离子辐照柠檬酸菌株的诱变选育 [J]. 辐射研究与辐射工艺学报, 2012, **30**(1): 53-57.
HU Wei, CHEN Jihong, ZHANG Zhen, *et al.* Mutation breeding of *Aspergillus niger* for producing citric acid by heavy ion beam [J]. Journal of Radiation Research and Radiation Processing, 2012, **30**(1): 53-57.
- 王曙阳, 薄永恒, 王丽华, 等. $^{12}C^{6+}$ 离子辐照对阿维链霉菌代谢效应研究 [J]. 原子核物理评论, 2013, **30**(2): 195-200.
WANG Shuyang, BO Yongheng, WANG Lihua, *et al.* Metabolic effect of streptomyces avermitilis irradiated by ion beam of $^{12}C^{6+}$ [J]. Nuclear Physics Review, 2013, **30**(2): 195-200.
- 叶世柏. 食品理化检验方法指南 [M]. 北京: 北京大学出版社, 1991.
YE Shibo. Guide food physical and chemical testing method [M]. Beijing: Peking University Press, 1991.
- Chandna S, Dwarakanath B S, Khaitan D, *et al.* Low-dose radiation hypersensitivity in human tumor cell lines: effects of cell-cell contact and nutritional deprivation [J].

- Radiation Research, 2002, **157**(5): 516-525.
- 15 Joiner M C, Marples B, Lambin P, *et al.* Low-dose hypersensitivity: current status and possible mechanisms [J]. International Journal of Radiation, 2001, **49**(2): 379-389.
- 16 Nakamura T, Kuratani T, Morita Y. Fuzzy control application to glutamic acid fermentation [C] // Modelling and Control of Biotechnological Processes: Proceedings of the 1st IFAC Symposium, Noordwijkerhout, The Netherlands, 11–13 December 1985. Elsevier, 2014: 231.
- 17 甄卫军, 李茜, 张石峰, 等. 低能 N^+ 离子注入谷氨酸产生菌诱变选育初步研究[J]. 食品与发酵工业, 2002, **28**(3): 20-24.
ZHEN Weijun, LI Qian, ZHANG Shifeng, *et al.* Preliminary study on mutation breeding of glutamic acid producing strains with low energy n^+ ion beam implantation [J]. Food and Fermentation Industries, 2002, **28**(3): 20-24.
- 18 Lesniak W, Pietkiewicz J, Podgorski W, *et al.* Citric acid fermentation from starch and dextrose syrups by a trace metal resistant mutant of *Aspergillus-niger* [J]. Biotechnology Letters (in China), 2002: 1065-1067.
- 19 周万里, 张金玲, 朱思荣, 等. 基于生物参数在线检测的谷氨酸发酵动力学研究[J]. 食品与机械, 2014, 6: 007.
ZHOU Wanli, ZHANG Jinling, ZHU Sirong, *et al.* Research on fermentation dynamics of by biological parameters on-line detection [J]. Food and Machinery, 2014, 6: 007.
- 20 缪建顺, 杨建设, 张苗苗, 等. 重离子辐照微生物效应及诱变育种进展[J]. 辐射研究与辐射工艺学报, 2014, **32**(2): 020101.
MIAO Jianshun, YANG Jianshe, ZHANG Miaomiao, *et al.* Microbial mutagenic effects and mutation breeding advances induced by heavy ion beams [J]. Journal of Radiation Research and Radiation Processing, 2014, **32**(2): 020101.

High-yield glutamic acid strain screened by heavy ion irradiation

MIAO Jianshun^{1,2,3} CAO Guozhen^{2,3} ZHANG Miaomiao^{2,3} ZHANG Wende⁴
YANG Jianshe¹ LI Wenjian^{2,3} LU Dong^{2,3}

¹(College of Life Science, Northwest Normal University, Lanzhou 730070, China)

²(Institute of Modern Physics, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China)

³(Key Laboratory of Microbial Resources Exploitation and Application, Lanzhou 730000, China)

⁴(Gansu Ronghua Industry Group Co., Ltd., Wuwei 733000, China)

ABSTRACT $^{12}C^{6+}$ ion beam was used to irradiate glutamic acid-producing strains, and the strains producing higher glutamate were screened by three selective breeding mediums, and then the mutants were fermented by shake flask experiments. Finally the mutants were measured by several fermentation experiments. The results showed that the survival rate of *corynebacterium glutamicum* changed significantly after irradiation with 80 MeV/u $^{12}C^{6+}$ ion beam, and a high-yield strain GM006 was finally obtained through the two screening steps of selecting plate and shaking flask fermentation. The growth rate and glutamic acid yielding of GM006 were remarkably improved. The conversion rate of glucose was 60.55%, which increased by 10.09% compared with the original strain. The highest content of glutamic acid reached 121.10 g/L, and increased by 10.09 % compared with the original strain. This mutant will have broad application prospect as a glutamic acid producing strain, and it is also proved that the heavy ions beam is an efficient radiation resource for microorganism breeding.

KEYWORDS Glutamic acid, Heavy ion beam, Mutation breeding, Irradiation

CLC Q691.5, TL99