

从土壤中分离 L-色氨酸生产菌株及其高产诱变选育的研究

陈俊峰^{1,2}, 苏丽娜², 王璋², 王卫卫¹

1(西北大学生命科学学院, 陕西西安, 710069) 2(中国食品发酵工业研究院, 北京, 100027)

摘要 根据微生物菌株生物合成 L-色氨酸代谢途径的特性, 设计了产色氨酸的细菌选择性分离筛选培养基, 对从土壤中分离得到的 832 株细菌通过初筛和复筛, 筛选到 6 株 L-色氨酸产生菌株, 并对其进行了初步分类鉴定, 确定了这 6 株菌株均为谷氨酸棒杆菌 (*Corynebacterium glutanicum*)。其中 1 株可产 L-色氨酸 0.85 g/L, 进一步通过 NTG 以及紫外线照射多重诱变育种得到苯丙氨酸和酪氨酸双重营养缺陷型与多种色氨酸结构类似物抗性突变株, 遗传性状稳定, 产酸量达到 10.82 g/L。

关键词 L-色氨酸, 发酵生产, 土壤分离, 菌种筛选, 诱变育种

目前在工业上国内外主要利用酶法、前提转化法生产 L-色氨酸^[1,2]。利用糖质原料直接发酵生产 L-色氨酸国内外报道的不多^[3,4], 主要是因为 L-色氨酸在微生物体内的代谢途径较长且存在着多种严格的调节机制, 致使 L-色氨酸的生产菌株产酸较低, 达不到工业化生产的要求。L-色氨酸的生产菌株主要有谷氨酸棒杆菌 (*Corynebacterium glutanicum*)、黄色短杆菌 (*Brevibacterium flavum*)、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)、大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 和产阮假丝酵母 (*Candida utilis*) 等, 但绝大多数为细菌。目前, 还没有关于从土壤中直接分离筛选实用性 L-色氨酸生产菌株的研究报告。笔者利用细菌生物合成 L-色氨酸代谢途径的特点, 设定了分离筛选产酸菌株的细菌选择性培养基, 并通过初筛和复筛, 从土壤中筛选到几株产色氨酸的谷氨酸棒杆菌的野生菌株; 再通过进一步的诱变, 明显提高产酸水平, 有望达到工业化生产的要求。

1 材料与方法

1.1 土壤、活性污泥样品来源

参照土样采集标准方法^[5], 9 个土壤样品采自北京城郊区, 草坪下或树林中的土样采样时先除去表层 5 cm 表土, 取 5~15 cm 深的土壤, 活性污泥取自北京市排水集团公司的 2 个污水处理厂, 每份样品重约 500g, 采集时间均为 2006 年 1 月 15 日至 2 月 10 日。

1.2 培养基

1.2.1 活化培养基(%)

葡萄糖 1, 蛋白胨 1, 牛肉膏 0.7, 酵母膏 0.5, NaCl 0.3, 琼脂 1.6, pH7.2, 1.0 kg/cm² 灭菌 20 min。

1.2.2 保藏培养基(%)

蛋白胨 1, 牛肉膏 0.7, 酵母膏 0.5, NaCl 0.3, 琼脂 1.6, pH7.2, 1.0 kg/cm² 灭菌 20 min。

1.2.3 细菌选择性培养基(%)

牛肉膏 1.0, 蛋白胨 1, 酵母膏 0.5, NaCl 0.3, 制霉菌素 (nystatin) 30 μg/mL, 放线菌酮 (cycloheximide) 30 μg/mL, 琼脂粉 1.6, pH7.2, 1 kg/cm² 灭菌 20 min 后添加色氨酸结构类似物 1~3 种。

1.2.4 种子培养基(%)

葡萄糖 4.0, (NH₄)₂SO₄ 0.4, 玉米浆 3.0, 酵母膏 0.5, K₂HPO₄ · 3H₂O 0.1, KH₂PO₄ · 3H₂O 0.1, MgSO₄ · 7H₂O 0.025, Fe₂SO₄ · 7H₂O 10 mg/L, MnSO₄ · H₂O 10 mg/L, pH 7.2, 0.75 kg/cm² 灭菌 15 min。

1.2.5 筛选发酵培养基(%)

蔗糖 10, (NH₄)₂SO₄ 2, K₂HPO₄ 0.05, KH₂PO₄ 0.05, MgSO₄ · 7H₂O 0.025, 玉米浆 2, FeSO₄ 10 mg/L, MnSO₄ 10 mg/L, CaCO₃ 2 (分别灭菌), pH7.2, 0.75 kg/cm² 灭菌 15 min。

1.3 主要溶液

1.3.1 色氨酸标准溶液

准确称取 L-色氨酸 0.100 g (105 °C 烘 1 h), 溶解后以蒸馏水定容 100 mL。

1.3.2 对二甲氨基苯甲醛溶液

称取 3g 对二甲氨基苯甲醛溶于 100 mL 的 1 mol/L H₂SO₄ 溶液中。

1.3.3 NaNO₂ 溶液

准确称取 0.050g NaNO₂, 溶解后以蒸馏水定容

第一作者: 硕士研究生(王璋教授为通讯作者)。

收稿日期: 2006-11-23, 改回日期: 2007-06-08

100 mL。

1.4 土壤菌种的分离纯化

取 1g 土样溶于 20 mL 无菌生理盐水,然后按照 10 倍稀释法适当稀释,各取稀释梯度为 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 的稀释液 0.2 mL 分别涂布于细菌选择性培养基中,其中 5-氟-*DL*-色氨酸(5FT)、6-氟-*DL*-色氨酸(6FT)和 5-甲基-*DL*-色氨酸(5MT)的浓度梯度分别为 0.25 mg/mL、0.5 mg/mL 和 1.0 mg/mL,每个浓度至少 3 个平板,30℃ 培养 5~7d,观察菌落形态,从平板上挑取细菌菌落,进行平板菌落纯化后转入斜面保藏和进行初筛分析用。

1.5 筛选方法

1.5.1 产色氨酸菌株的初筛

将所得的菌株斜面取 1 环接种到装有 5 mL 发酵培养基的大试管中,在 30℃、180 r/min 的往复式摇床上振荡培养 4d,取发酵液,离心,上清液用对二甲氨基苯甲醛法^[3]显色,以目测法选出呈深蓝色者,作为产色氨酸菌株,留作复筛用。

1.5.2 产色氨酸菌株的复筛

将初筛获得的产色氨酸菌株的斜面取 1 环接种到装有 20 mL 种子培养基的 250 mL 三角瓶中,30℃,180r/min 培养 24 h。然后吸取 5mL 种子液接种于装有 50 mL 发酵培养基的 500 mL 三角瓶中,30℃、转速为 180r/min 振荡培养 4d,每菌株至少平行 5 瓶。发酵液离心后取上清液用对二甲氨基苯甲醛方法显色后,用 722S 分光光度计于 600nm 下测定吸光度,并与标准色氨酸溶液的吸光度比较计算出色氨酸的含量。

1.6 分析方法

1.6.1 菌体生长量的测定

摇管初筛时取 1 mL 发酵液,加入 4 mL 2mol/L HCl 溶解 CaCO_3 后,用水稀释到 10 mL,在 620 nm 波长下测定吸光度(OD),表示菌体生长量。

摇瓶复筛时取发酵液 5 mL,2.0 mol/L HCl 溶解 CaCO_3 后,4 000 r/min 离心 10 min,蒸馏水洗 3 次,105℃ 干燥至衡重后称重。

1.6.2 色氨酸的测定^[3]

根据文献的方法进行部分改进。取干净试管,加入 $V_{(\text{H}_2\text{SO}_4)}:V_{\text{水}}=2.5:2$ 的 H_2SO_4 溶液 4.5 mL,再加入蒸馏水 2 mL,然后加入 3% 的对二甲氨基苯甲醛溶液 0.5 mL,摇匀后加入经过适当稀释的发酵液 0.5 mL,摇匀,放暗处反应 30 min 后加入 0.1 mL 0.05% NaNO_2 溶液,摇匀,暗处静置 30 min 后在

722S 型分光光度计上,波长 600nm 下,光程 1 cm 进行比色,按照标准色氨酸溶液分析测定出的标准曲线计算出发酵液中色氨酸的含量。

1.7 显微镜检分析

根据《伯杰氏细菌分类手册》(第八版)^[6],镜检分类鉴定所筛菌株。

1.8 诱变方法^[5]

将复筛所得的较高产色氨酸菌株培养至对数生长期,用生理盐水洗涤 2 次后,转入含 100 $\mu\text{g/mL}$ 的 NTG 的 pH6.0 磷酸盐缓冲液中,控制菌体浓度约为 10^8 个/mL。30℃ 处理 30 min 后,用生理盐水离心洗涤 3 次。经适当稀释涂布细菌选择性培养基培养后,用上述初筛和复筛的方法分离筛选 *L*-色氨酸高产菌株。

2 结果与讨论

2.1 菌种的分离纯化

由于目前色氨酸生产用菌株多为细菌,因此,试验中从筛选生产色氨酸的细菌类微生物的角度出发,有针对性地设计了筛选色氨酸生产菌株的细菌选择性培养基,在普通牛肉膏蛋白胨培养基中加入了抗菌素抑制酵母和丝状真菌的生长,并加入了色氨酸结构类似物 5FT、6FT、5MT,有利于直接分离筛选出具备了在细菌生物合成 *L*-色氨酸代谢途径中部分或者完全性地解除了特异性限制、反馈抑制或者阻遏作用等种种影响 *L*-色氨酸合成的内在因素、有可能过量积累 *L*-色氨酸的细菌菌株,有助于 *L*-色氨酸的大量生成。表 1 列出了不同来源土壤样品经过适当稀释后在含有不同浓度的 5FT、6FT 和 5MT 的细菌选择性培养基平板上的生长情况以及挑出的菌落数。

首先,从以往经验总结了解到,分离土样时采用有机质丰富的中性或微碱性沃土,这种土样中目的性细菌比例较大,从而更易于筛选到阳性菌株;本研究从菜园地,堆肥等有机质丰富的土壤以及污泥样品中筛选得到了大量目的菌株,有利于产酸菌株的高通量筛选分析比较。实验过程中观察到,虽然细菌选择性培养基中加入了抗菌素以抑制酵母、霉菌等真菌的生长,但是在个别选择平板中仍然有少数霉菌等丝状真菌类微生物的生长,但不影响产酸细菌的计数和分离筛选。由于在该细菌选择性培养基中加入了色氨酸结构类似物,使得细菌的生长较慢,而且浓度越高,细菌生长越慢,生长的菌落数也越少。但色氨酸结构类似物对放线菌生长的抑制作用不大明显,土样的稀释

表 1 各浓度 5-氟色氨酸,6-甲基色氨酸平板菌落生长情况

编号	采集地点	样品类型	土样中所含菌类	合适的土壤稀释梯度	各浓度平板的细菌生长情况	挑出菌落编号
1	酒仙桥污水厂	活性污泥	细菌、放线菌、霉菌	10 ⁻⁵ ,10 ⁻⁶	浓度 1+++ 浓度 2+ 浓度 3+	JXQ1-01~ JXQ3-30, 75 株
2	南四环大红门	菜园地	细菌、放线菌	10 ⁻⁴ ,10 ⁻⁵	浓度 1+++ 浓度 2++ 浓度 3+	DHM1-01~ DHM3-30, 90 株
3	和平里护城河	下水道淤泥	细菌、放线菌、霉菌	10 ⁻⁵	浓度 1+++ 浓度 2+ 浓度 3-	HPL1-01~ HPL3-20, 60 株
4	三元立交桥南	草下土	细菌、放线菌	10 ⁻⁴	浓度 1+ 浓度 2- 浓度 3-	SYC1-01~ SYC3-11, 33 株
5	三元立交桥南	树下土	细菌、放线菌	10 ⁻³	浓度 1++++ 浓度 2++ 浓度 3+	SYS1-01~ SYS3-40, 120 株
6	北化大校园	树下土	细菌、放线菌	10 ⁻³	浓度 1+ 浓度 2- 浓度 3-	BHS1-01~ BHS3-32, 123 株
7	农大西校区	果园	细菌、放线菌、真菌	10 ⁻³ ,10 ⁻⁴	浓度 1+++ 浓度 2+ 浓度 3-	NDX1-01~ NDX3-35, 124 株
8	南四环大红门	草下土	细菌、放线菌	10 ⁻³	浓度 1++++ 浓度 2+ 浓度 3-	HMC1-S01~ HMC3-40, 105 株
9	南四环小红门	堆肥	细菌、放线菌、霉菌	10 ⁻⁴	浓度 1+++ 浓度 2+ 浓度 3-	XHM1-01~ XHM3-24, 102 株

注:浓度 1、2、3 分别表示色氨酸结构类似物的浓度为 0.25 mg/mL、0.5 mg/mL 和 1.0 mg/mL。“+++”、“++”、“+”和“-”分别表示平板菌落数在 300 以上、100~300 之间、100 以下和无菌落生长。

梯度较低时,土样中放线菌的绝对数量较多,放线菌的生长不利于细菌单菌落的挑取。因此,在制备细菌选择平板时注意适当稀释合适的土样梯度和色氨酸结构类似物浓度,根据细菌典型菌落特征,优先挑取药物浓度较高平板上挑取细菌菌落。从以上各土样的选择性细菌平板上共分离得到菌种 832 株,其中从浓度 3 的平板上挑取 287 株,浓度 2 和浓度 1 各挑取 412 株和 133 株,初步确定这些菌株具有过量积累色氨酸的能力,转入斜面保藏和进行初筛分析用。

2.2 色氨酸菌株的初筛和复筛

采用摇管培养方法对分离的 832 株细菌进行产酸能力初筛,表 2 结果表明,用对二甲氨基苯甲醛对摇管发酵液进行显色后,其中有 17 株菌株出现了蓝色变化,将这 17 株作为复筛试验用菌株。

其中,蓝色较深的菌株有 6 株,分别为 JXQ3-09、JXQ3-28、DHM3-3、DHM1-20、SYS3-17 和 XHM2-23,表明可能产生大量的色氨酸。

表 3 中列出了对 17 株复筛菌株进行摇瓶复筛试

验后,上述 6 株菌株的 L-色氨酸发酵生产结果。

表 2 主要初筛菌株的色氨酸产生结果

序号	菌种编号	生物量 (OD)	色氨酸反应显色程度
1	JXQ1-02	1.012	++
2	JXQ2-16	0.908	++
3	JXQ3-09	1.025	+++
4	JXQ3-28	1.091	+++
5	DHM1-20	1.112	+++
6	DHM2-11	1.015	++
7	DHM3-3	0.678	+++
8	DHM3-29	0.650	++
9	SYS3-17	0.804	+++
10	HPL2-30	1.114	++
11	HPL3-17	0.711	++
12	HPL3-19	1.046	+
13	NDX3-30	0.894	++
14	NDX2-10	0.659	++
15	XHM2-11	1.110	++
16	XHM2-23	0.691	+++
17	XHM3-5	0.880	++

注:“+++”、“++”和“+”分别表示反应显色的颜色深度:蓝色一级(深蓝色)、二级(藏蓝色)和三级(蓝色)。

表 3 复筛各菌株的色氨酸产量

序号	菌株编号	生物量/g·L ⁻¹	色氨酸产量/g·L ⁻¹
1	JXQ3-09	8.1	0.55
2	JXQ3-28	8.3	0.8
3	DHM3-3	6.5	0.5
4	DHM1-20	8.4	0.75
5	SYS3-17	7.1	0.85
6	XHM2-23	6.7	0.45

由表 3 可知,这些复筛菌株都能在一定程度上产生 L-色氨酸,说明本研究提出的利用细菌选择性培养基从土壤中筛选 L-色氨酸生产菌株的试验方案切实可行,这些复筛菌株具有在实际工业生产中继续开发的潜在价值。

表 4 复筛分离菌株的生理生化性质

序号	性质	JXQ3-09	JXQ3-28	DHM3-3	DHM1-20	SYS3-17	XHM2-23
1	硝酸盐还原	+	+	+	+	+	+
2	脲酶	+	+	+	+	+	-
3	淀粉水解	+	+	+	+	+	+
4	胨化石蕊	+	+	+	+	+	+
5	葡萄糖利用	+	+	+	+	+	+
6	蔗糖利用	+	+	+	-	-	+
7	木糖利用	-	-	-	-	-	-
8	乳糖利用	+	+	+	-	+	+
9	果糖利用	+	+	+	+	+	+
10	阿拉伯糖利用	-	-	-	-	-	-
11	鼠李糖利用	+	+	+	+	+	+
12	淀粉利用	+	+	+	+	+	+
13	甘露醇利用	-	+	-	+	-	-
14	山梨醇利用	+	+	-	+	+	+
15	土豆培养基	+	+	+	+	+	+
16	生长需求物	b	b	b	b	b	b

注:b:生物素;“+”:阳性,“-”:阴性。

表 4 结果显示这 6 菌株的结果与谷氨酸棒杆菌所显示的特征几乎完全相同,因此,初步确定这 6 菌株都属于谷氨酸棒杆菌 (*Corynebacterium glutanicum*),与目前谷氨酸钠(味精)工业化生产所使用的菌种一样,是安全性高的微生物菌株。

2.4 色氨酸菌株的诱变选育

为进一步了解产酸菌株的产酸潜力,利用 NTG 对其中产酸最高的菌株 SYS3-17 进行诱变,按照常规营养缺陷型的筛选方法^[5]得到 1 株苯丙氨酸和酪氨酸双重营养缺陷型突变株 SYS3-17-PT2(Phe⁻, Tyr⁻),切断苯丙氨酸和酪氨酸的代谢支流,以增加色氨酸合成的前体, L-色氨酸产量达到 2.25 g/L。接着,继续采用 NTG 诱变方法获得 1 株对色氨酸结构类似物 5FT 具有显著抗性能力的 L-色氨酸高产菌株 SYS3-17-5FT-1-36 (Phe⁻ + Tyr⁻ + 5FT^r 3

2.3 复筛菌株分类鉴定的性能分析

为了进一步了解各复筛菌株 JXQ3-09、JXQ3-28、DHM3-3、DHM1-20、SYS3-17 和 XHM2-23 的微生物学性质,实验对这些菌株进行了形态观察,结果显示这些菌株的无运动能力,不形成芽孢,革兰氏染色显阳性。在显微镜下观察,菌株呈短棒状,两端稍钝圆,微弯。细胞呈单个、成对或八字形排列。在完全培养基平板上形成的菌落为圆形,淡黄色,直径 1~2 mm,菌落中央隆起,表面光滑、湿润,边缘整齐,不产生水溶性色素。并参照根据《伯杰氏细菌分类手册》(第八版),采用鉴定培养基对这 6 株菌进行了多项有关分类鉴定方面的性能分析试验,结果如表 4。

mg/mL),可以积累 4.2 g/L 的 L-色氨酸。当以高浓度的 5FT(6.0 mg/mL)对该菌株进行高抗性能力驯化培养后,得到 5FT 高抗性菌株 5FT-2-25 (Phe⁻ + Tyr⁻ + 5-FT^r 6 mg/mL),产酸水平为 5.40 g/L。并对该菌株采用紫外线照射诱变后在含 5-甲基色氨酸(5MT)的高抗性选择平板进行育种的方法,获得双缺双抗突变菌株 5MT-28(Phe⁻ + Tyr⁻ + 5-FT^r 6 mg/mL + 5-MT^r 3 mg/mL), L-色氨酸的产量提高到 6.05 g/L。随后,采用 NTG 诱变方法,在含 4-氟-DL-苯丙氨酸(4FP)的高抗性选择平板上分离得到双缺多抗高产突变菌株 4FP-62(Phe⁻ + Tyr⁻ + 5-FT^r 6 mg/mL + 5-MT^r 3 mg/mL + 4-FP^r 3 mg/mL),该菌株可以积累 7.83 g/L 的 L-色氨酸。最后,采用 NTG 和紫外线照射的复合诱变方法,在含磺胺胍(SG)的高抗性选择平板进行筛选和驯化育种

之后,得到了高性能 *L*-色氨酸生产菌株 SG-116 (Phe⁻ + Tyr⁻ + 5-FT^r 6 mg/mL + 5-MT^r 3 mg/mL + 4-FP^r 3 mg/mL + SGr 2 mg/mL)。该菌株经多次传代培养和特性验证试验的结果表明,其遗传性状稳定,而且在未经优化的摇瓶发酵条件下培养 96 小时,最高产酸率达 10.82 g/L,多次摇瓶发酵的产酸水平平均稳定在 10.50 g/L 以上。陈宁等^[7]以谷氨酸棒杆菌 AS1542 作为出发菌株,诱变得到苯丙氨酸和酪氨酸双重营养缺陷型突变株的产酸量为 1.2 g/L,而 Hagino 和 Nakayama^[8]以谷氨酸棒杆菌 ATCC13032 作为出发菌株得到的 KY9456 菌株产酸量为 0.15 g/L。可见,分离筛选和诱变选育得到的 *L*-色氨酸生产菌株产酸水平得到了有效提高,明显地具备了今后进一步进行工业化生产开发和实际应用的研究价值。

3 结 论

(1)根据微生物菌株色氨酸的代谢途径设计的细菌选择性培养基,大大增加了菌种筛选的定向性,直接、高效、迅速地筛选 *L*-色氨酸生产菌株。

(2)从土壤分离的 832 株细菌经过初筛和复筛试验,得到了 6 株 *L*-色氨酸生产菌株。经过菌落形态观察和分类鉴定试验,初步确定为谷氨酸棒杆菌 (*Corynebacterium glutanicum*)。

(3)其中 1 复筛菌株 SYS3-17,在经过 NTG 以及

紫外线照射多重的单独和复合诱变育种后,筛选得到了苯丙氨酸和酪氨酸双重营养缺陷型与多种色氨酸结构类似物抗性突变株 (Phe⁻ + Tyr⁻ + 5FT^r + 5MT^r + 4FP^r + SG^r),产酸量达到 10.82 g/L,比诱变处理前提高了 1 272% 以上,而且遗传形状稳定,具有很高的实际工业化开发应用潜力。

参 考 文 献

- 1 张炳荣编译. 氨基酸工业大全(技术与市场)[M]. 北京:中国轻工业出版社,1991. 84~91
- 2 张克旭. 氨基酸发酵工艺学[M]. 北京:中国轻工业出版社,1991. 718~722
- 3 张素珍. 产 *L*-色氨酸菌株的诱变选育[J]. 微生物学报, 1984, 24(3): 235~242
- 4 刘晓婷,黄耀辉. 黄色短杆菌 *L*-色氨酸产生菌的选育[J]. 工业微生物, 1989, 19(6): 6~11
- 5 诸葛健,王正祥. 工业微生物实验技术手册 [M]. 北京:中国轻工业出版社,1994. 335~364, 383~405
- 6 伯杰氏细菌分类手册(第八版)[M]. 北京:科学出版社, 1985. 830~855
- 7 陈 宁,孙 涛,张克旭. *L*-色氨酸高产菌的选育及其发酵条件的研究[J]. 食品与发酵工业, 1997, 23(5): 10~15
- 8 Hagino H, Nakayama K. *L*-Tryptophan production by analog-resistant mutants derived from a phenylalanine and tyrosine double auxotroph of *Corynebacterium glutamicum* [J]. Agric Biol Chem, 1975, 39(2): 343~349

Isolation of *L*-tryptophan-producing Soil Bacterial Strains and Genetic Mutation Breeding

Chen Junfeng^{1,2}, Su Lina², Wang Zhang², Wang Weiwei¹

1 (College of Life Science, Northwest University, Xian 710069, China)

2 (China National Institute of Food and Fermentation Industries, Beijing 100027, China)

ABSTRACT Based on the properties of metabolic pathway of *L*-tryptophan in microorganisms, a bacterial selective culture medium to isolate *L*-tryptophan-producing bacterial strains from soil samples was designed and used to isolate out 832 strains. Through the primary isolation and the secondary screening, six potential strains were selected and they were generally identified as *Corynebacterium glutanicum*. One of the most productive strain, SYS3-17 could produce *L*-tryptophan 0.85 g/L at first, and used for genetic mutation breeding with simple or combined NTG treatment and UV irradiation. Finally, a high effective strain with the stable genetic phenotypes of double auxotrophes of phenylalanine and tyrosine and multiple high resistances to *L*-tryptophan structural analogues was obtained, which could stably produce 10.82 g/L *L*-tryptophan.

Key words *L*-tryptophan, fermentation, soil sample, screening, mutation breeding