

L-丝氨酸生产菌的选育及不同碳源对发酵的影响

高伟 张伟国*

(江南大学生物工程学院工业生物技术教育部重点实验室 无锡 214036)

摘要: 以一株黄假单胞属 (*Pseudomonas flava*) 菌株 A3 为出发菌株, 经过紫外 (UV) 诱变和硫酸二乙酯 (DES) 逐级诱变处理和选育, 选育出一株能够以甲醇为唯一碳源的兼性甲基营养型菌 JW-01 (Mth^R 、 Gly^R)。在含甘氨酸 30g/L、甲醇 1% 的发酵培养基中发酵 3d 后 L-丝氨酸产量为 6.2g/L, 较出发菌株提高了 67.6%。该菌具有较好的传代稳定性。

关键词: L-丝氨酸, 黄假单胞属, 发酵, 诱变育种

中图分类号: TQ920.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2007) 01-0061-04

Study on the Breeding of L-serine-producing Mutant and the Effect of Different Carbon Source

GAO Wei ZHANG Wei-Guo*

(The Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, School of Biotechnology,
Southern Yangtze University, Wuxi 214036)

Abstract: A L-serine producing facultative methylotroph mutant (Mth^R 、 Gly^R) was derived from *Pseudomonas flava* A3 by combination treatment with ultraviolet (UV) and diethylsulfate (DES). It could accumulate 6.2g/L L-serine in the medium containing 30g/L glycine and 1% methanol as carbon source when it was cultured for 3 days, and it has an improvement about 67.6% compared with the origin. The mutant also has a good stability of descendibility of L-serine producing.

Key words: L-serine, *Pseudomonas flava*, Fermentation, Breeding

L-丝氨酸属非必需氨基酸, 但其作为一种生化试剂, 在食品、饲料、医药、农业以及化妆品工业中应用广泛。L-丝氨酸处于氨基酸代谢的中间位置, 参与许多生物物质 (如甘氨酸、蛋氨酸、嘌呤等) 的合成, 代谢运转速度极快。因此, 与其它类氨基酸相比, L-丝氨酸的直接发酵法生产十分困难。L-丝氨酸发酵法生产的研究报告主要集中于利用添加前体物发酵生产 L-丝氨酸, 而甘氨酸被认为是合成 L-丝氨酸最有前景的前体物之一^[1]。

研究发现甲基营养型菌株, 尤其是通过丝氨酸途径来吸收甲醇的甲基营养型菌株能生产 L-丝氨酸^[2-4]。在此途径中, 甲醇在甲醇脱氢酶的作用下被氧化为甲醛, 甲醛再同四氢叶酸反应生成甲叉四氢叶酸, 在丝氨酸羟甲基转移酶 (SHMT) 催化下, 甲叉四氢叶酸与甘氨酸反应生产 L-丝氨酸^[1]。

本文以实验室保藏的黄假单胞属菌 A3 为出发

菌株, 该菌不能利用甲醇。经过紫外 (UV) 诱变和硫酸二乙酯 (DES) 逐级诱变处理和选育, 选育出一株带有 Mth^R 、 Gly^R 的兼性甲基营养型菌株。对该菌的发酵条件进行初步优化, L-丝氨酸的产量达到 6.2g/L, 比出发菌提高了 67.6%。

1 材料与方法

1.1 菌株

黄假单胞属 (*Pseudomonas flava*) 菌 A3, 实验室筛选保藏。

1.2 培养基

1.2.1 基本培养基: $(NH_4)_2SO_4$ 2 g, KH_2PO_4 2 g, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 8 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.6 g, $MnSO_4 \cdot H_2O$ 0.002 g, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.002 g, 生物素 50 μg , 硫胺素 $\cdot HCl$ 100 μg , 制霉菌素 0.05 μg , 琼脂 20 g 定容至 1 L。

* 通讯作者 Tel: 0510-85862242, E-mail: zhangwg168@126.com

收稿日期: 2006-03-27, 修回日期: 2006-04-24

1.2.2 完全培养基: 蛋白胨 10 g, NaCl 5 g, 甘氨酸 3 g, 酵母膏 5 g, 琼脂条 20 g, 定容至 1L。

1.2.3 种子培养基: 甘氨酸 10 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 15 g, KH_2PO_4 0.5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3 g, 玉米浆 15 g, 定容至 1L。

1.2.4 发酵培养基: 甘氨酸 0 ~ 30 g, 甲醇 0 ~ 30 mL, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 15 g, KH_2PO_4 2 g, MgSO_4 0.4 g, 玉米浆 15 g, CaCO_3 20 g, 定容至 1L。

基本培养基、完全培养基和种子培养基均以 20% NaOH 调 pH7.0 ~ 7.2, 0.1 Mpa 压力下灭菌 20min。发酵培养基以 20% NaOH 调 pH8.0, 0.07 Mpa 压力下灭菌 10min。

1.3 培养方法

1.3.1 斜面、平板培养方法: 恒温箱温度 $30^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$, 培养 24h。

1.3.2 摇瓶培养方法: 往复式摇床, 振次 100 ± 2 次/min, 振幅 8cm, 温度 $30^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$, 种子装液量 30mL/250mL 三角瓶, 种子培养时间 10h; 发酵装液量 15mL/250mL 三角瓶, 发酵培养 72h。

1.4 诱变方法

1.4.1 UV、DES 诱变: (1) UV 诱变方法^[3]: 种子培养 10h 后以 50% 的接种量转接到种子培养基中, 培养 5h 使细胞达到同步培养。将培养液无菌离心, 收集菌体, 用生理盐水洗涤 2~3 次, 转入到带玻璃珠的三角瓶中打散, 得菌悬液, 细胞浓度控制在 10^8 个/mL 左右。在 15W 紫外灯下 30cm 处照射一定时间后转接入种子培养基中避光培养约 12h。取出后培养液按梯度稀释并涂布筛选平板, 30°C 恒温培养。(2) DES 诱变方法^[6]: 种子培养 10h 后以 50% 的接种量转接到种子培养基中, 培养 5h 使细胞达到同步培养。将培养液无菌离心, 收集菌体, 用 0.1mol/L pH7.0 磷酸盐缓冲液洗涤 2~3 次, 转入到带玻璃珠的三角瓶中打散, 得菌悬液, 细胞浓度控制在 10^9 个/mL 左右。加入一定浓度 DES 30°C 处理 30 min。

1.4.2 Mth^R、Gly^R 菌株的筛选: 配制基本培养基, 灭菌后加入适量的药物 (Mth, Gly), 制成不同浓度梯度的筛选平板。涂布经诱变处理过的菌液, 置 30°C 恒温箱中培养 3~7d, 挑取长出的菌落, 即为 Mth^R、Gly^R 突变株。

1.5 分析方法

1.5.1 pH: 用精密 pH 试纸和酸度计测定。

1.5.2 菌浓测定: 吸取 0.2mL 菌液至 5mL 0.25mol/L HCl 溶液中, 摇匀, 采用 721 分光光度计, 1cm 光程 562nm 下测定 OD 值。

1.5.3 L-丝氨酸定性、定量分析: 采用纸层析方法^[7], 层析溶剂为正丁醇: 丙酮: 二乙胺: 水 = 10: 10: 2: 5 (体积比)。定量测定利用比色定量法^[7]及氨基酸自动分析仪。

2 结果与讨论

2.1 L-丝氨酸高产菌的选育

2.1.1 L-丝氨酸产生菌的诱变谱系: 见图 1。

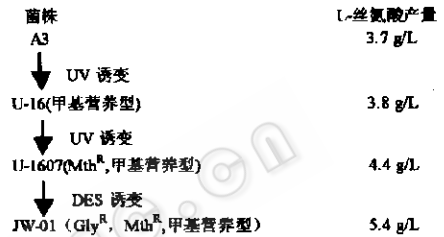


图 1 JW-01 的诱变谱系图

2.1.2 紫外诱变结果: (1) 紫外诱变致死率曲线: 为了选择合适的诱变处理时间, 对紫外照射时间和致死率关系进行实验。结果如图 2 所示。选择致死率为 70% ~ 80% 为最佳照射时间, 根据图 2 可选择 30s 作为紫外诱变照射时间, 此时的致死率为 76.45%。

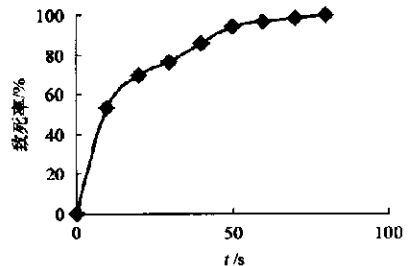


图 2 菌株 A3 紫外诱变致死率曲线

(2) 甲基营养型菌株的选育: 据国外的报道^[2-4], 甲基营养型且具有丝氨酸途径的微生物, 可以将一分子的甲醇和一分子的甘氨酸合成一分子的丝氨酸, 从而提高甘氨酸的转化率。而由于甲醇的价格比甘氨酸的价格便宜很多, 如果能够筛选出甲基营养型菌株, 可以有较好的经济价值。

以菌株 A3 为诱变出发菌株进行紫外诱变, 诱变时间为 30s。诱变后的菌液涂布于以甲醇为唯一

碳源的平板上, 甲醇浓度分别为 1%、2%、3%。经过 30℃ 恒温箱恒温培养 4d, 挑选出菌株 U-16。结果如表 1 所示。

表 1 菌株 U-16 和菌株 A3 对甲醇利用的比较

甲醇浓度 (%)	1	2	3
菌株 A3 的生长情况	-	-	-
菌株 U-16 的生长情况	+-	+-	-

注: + 表示生长良好, +- 表示微弱生长, - 表示没有生长

由表 1 可以看出, 经过紫外诱变后的菌株 U-16 获得了利用甲醇的能力。菌株在含有甘氨酸 30g/L 的发酵液中发酵 3d 后 L-丝氨酸产量为 3.8g/L。由此可以得出菌株 U-16 是具有丝氨酸途径的兼性甲基营养型菌。但是当在发酵液中添加 1% 的甲醇时菌株的生长很差, 发酵液几乎澄清, L-丝氨酸的产量只有 1.5g/L, 和国外文献^[2-4]中报道的结论相差很大。初步分析可能是由于甲醇对菌体的生长有抑制作用。

(3) 高浓度甲醇抗性选育: 针对上述情况, 如果能够筛选出一株能够在高浓度的甲醇中生长的菌, 就可以在一定程度上解除低浓度下甲醇对菌株生长的抑制作用。

以菌株 U-16 为出发菌, 再次进行紫外诱变, 诱变时间为 30s。诱变后的菌液分别涂布于甲醇浓度为 3%、4%、5%、6% 的平板上。30℃ 恒温箱恒温培养 4d。诱变后菌 U-1607 发酵结果如表 2 所示。

表 2 菌株 U-1607 在不同发酵液中发酵结果

甘氨酸浓度 (g/L)	甲醇浓度 (%)	OD	L-丝氨酸产量 (g/L)
30	1	0.951	4.4
30	0	0.841	3.8

由表 2 可以看出在诱变之后菌株在添加了甲醇的发酵液中生长情况比不添加甲醇时好, 同时 L-丝氨酸的产量提高了 15.7%, 说明诱变后菌株 U-1607 已经基本解除了 1% 浓度甲醇对菌体生长以及产酸的抑制作用。

2.1.3 硫酸二乙酯 (DES) 诱变结果: (1) DES 诱变剂量的选择: 一定剂量的 DES 对细菌有致死性。目前倾向于认为较低的杀菌率下, 正向突变率更高。一般采用致死率为 70% ~ 80%。本实验采用不同浓度的 DES 进行处理 20min。诱变剂浓度与致死率之间的关系如表 3。从表 3 可知, 选择 DES 浓度为 2% 较为合适, 此时致死率为 76.2%。

表 3 硫酸二乙酯处理 A3 致死率的测定结果

硫酸二乙酯浓度 (%)	1	2	3
致死率 (%)	64.9	76.2	91.4

(2) 高浓度甘氨酸抗性选育: 为了增加 L-丝氨酸的积累量, 提高作为 L-丝氨酸合成的前体物——甘氨酸添加浓度将是非常有必要的。但是从以往的发 酵液层析后的结果可以看出发酵液中存在 13g/L 左右的甘氨酸没有被菌体所吸收利用, 如图 3 所示。如果能够诱变出一株能够耐受高浓度甘氨酸的诱变株, 就有可能增强菌株对甘氨酸的吸收, 提高细胞内甘氨酸浓度, 从而达到提高甘氨酸的利用率、促进丝氨酸合成的目的。

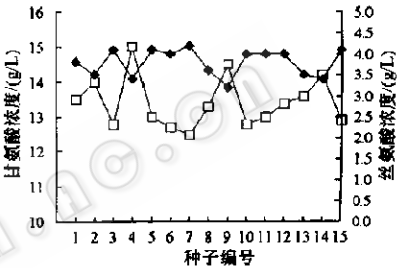


图 3 发酵液中甘氨酸、丝氨酸浓度曲线
—□— 甘氨酸, —●— 丝氨酸

菌株 U-1607 经过 2% 浓度的 DES 处理, 诱变后的菌液涂布于甘氨酸浓度为 50g/L、60g/L、70g/L 的抗性平板上, 经过 30℃ 恒温箱恒温培养 6d 后在甘氨酸浓度 50g/L 的平板上挑选出 120 个单菌落, 复筛后选出一株产量最高的菌 JW-01。该菌在甘氨酸浓度为 30g/L、甲醇浓度为 1% 的发酵液中发酵 3d 后 L-丝氨酸的产量达到了 5.4g/L, 发酵液中甘氨酸残留为 10g/L。

2.1.4 菌株 JW-01 传代稳定性: 将菌株 JW-01 在斜面上划线分纯, 进行传代稳定性实验, 连续传种 5 代, 分离单菌落。每一代中与亲株相比产量改变在 10% 以内的计为稳定株, 测定 L-丝氨酸的产量和稳定率, 以及对 Mth、Gly 的抗性, 结果如表 4 所示。

表 4 菌株 JW-01 传代稳定性

传代次数	1	2	3	4	5
L-丝氨酸产量 (g/L)	5.4	5.3	5.4	5.5	5.4
稳定率 (%)	92.3	91.6	91.3	92.4	91.5
Mth 抗性	++	++	++	++	++
Gly 抗性	++	++	++	++	++

由表 4 可以看出 JW-01 的传代稳定性好, 连续传代 5 次, 产酸没有明显变化, 抗性标记没有丢失。

2.2 菌株 JW-01 发酵条件研究

2.2.1 不同碳源对种子生长曲线的影响: 分别测定菌株 A3、菌株 JW-01 在碳源为 10g/L 葡萄糖、10g/L 甘氨酸、1% 甲醇的种子液中的生长曲线, 如图 4、图 5 所示。

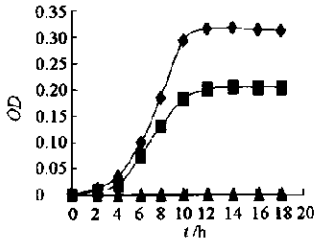


图 4 A3 生长曲线

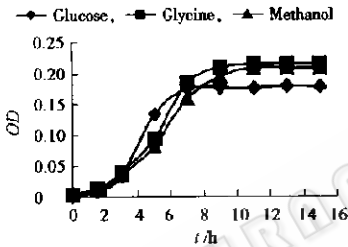


图 5 JW-01 生长曲线

由图 4、图 5 可以看出菌株 A3 和菌株 JW-01 的种子生长曲线在不同碳源中均有明显的改变, 菌株 JW-01 在 1% 甲醇为碳源时生长情况良好, 在利用甘氨酸为碳源时种子生长最好。选择 10g/L 甘氨酸作为菌株 JW-01 的种子碳源。

2.2.2 不同浓度甘氨酸对产酸的影响: 作为 L-丝氨酸转化的前体物, 甘氨酸添加浓度必然对 L-丝氨酸的生产产生较大的影响。当发酵液中甘氨酸浓度为 30g/L 时 L-丝氨酸产量最高, 为 5.8g/L。在低浓度时甘氨酸需要作为碳源提供菌体生长, 而高浓度时甘氨酸会抑制菌体生长, 影响菌体产酸, 故发酵液中丝氨酸量均很少。

2.2.3 不同浓度甲醇对产酸的影响: 分别考察在添加和不添加甘氨酸下不同浓度甲醇对产酸的影响, 结果见表 5。

表 5 不同甲醇添加浓度对 L-丝氨酸产量的影响

甲醇 (%)	甘氨酸 (g/L)	pH	OD ₅₆₂	L-丝氨酸 (g/L)
0	30	8.15	0.841	5.8
0.5	30	8.12	0.913	6
1	30	8.26	0.951	6.2
1.5	30	8.07	0.939	5.68
3	30	8.02	0.865	2.55
0.5	0	7.64	0.753	-
1	0	7.31	0.815	-
2	0	7.22	0.792	-

注: “-”表示没有或产量太低无法测定

由表 5 可以看出, 在含有甘氨酸下添加低浓度的甲醇有利于菌体生长, 促进 L-丝氨酸的合成, 但是当甲醇的添加浓度大于 1.5% 时抑制菌体的生长, 抑制 L-丝氨酸的合成。在以甲醇为唯一碳源进行发酵时菌株不产 L-丝氨酸, 但是在低浓度下菌体生长良好。

3 结论

以黄假单胞属 (*Pseudomonas flava*) 菌株 A3 为诱变出发菌, 经过紫外 (UV) 诱变和甲醇平板筛选, 再经过硫酸二乙酯 (DES) 诱变和高浓度甘氨酸抗性平板筛选, 获得一株 L-丝氨酸产量有较大提高的兼性甲基营养型菌株 JW-01 (Mth^R、Gly^R)。对 JW-01 的摇瓶条件进行初步优化, 在以 10g/L 甘氨酸作为种子液碳源, 发酵液中甘氨酸浓度为 30g/L、甲醇浓度为 1% 时 30℃ 发酵 3d L-丝氨酸产量为 6.2g/L, 比出发菌株提高了 67.6%。

参考文献

- [1] 张炳荣. 中国调味品, 1986, 22 (10): 28~32.
- [2] Yamada H, Susana S. Agric Biol Chem, 1986, 50 (1): 17~21.
- [3] Yasushi M, Shigeru Y, Koichi T. Agric Biol Chem, 1981, 45 (6): 1419~1424.
- [4] Yoshiki T, Takahiro K, Ogata K, et al. Agric Biol Chem, 1978, 42 (12): 2275~2278.
- [5] 钱和, 郝刚. 微生物学通报, 2005, 32 (3): 46~50.
- [6] 诸葛健, 王正祥. 工业微生物实验技术手册, 北京: 中国轻工业出版社, 1994.
- [7] 潘家秀. 蛋白质化学研究技术. 北京: 科学出版社, 1962.