

# 产 L-丝氨酸菌株 SYPS-062 的鉴定及碳源对发酵的影响

张晓梅<sup>1</sup> 窦文芳<sup>1</sup> 许泓瑜<sup>1</sup> 许正宏<sup>1,2\*</sup>

(1. 江南大学医药学院制药工程研究室 江苏 无锡 214122)

(2. 江南大学工业生物技术教育部重点实验室 江苏 无锡 214122)

**摘要:** 采用形态学、生理生化实验和 16S rDNA 序列分析的方法对从自然界中筛选得到的一株能直接利用糖质原料发酵生产 L-丝氨酸菌株 SYPS-062 的分类地位进行了研究, 确定其为谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)。同时考察了碳源对菌株 SYPS-062 发酵产 L-丝氨酸的影响, 实验结果表明, 当蔗糖浓度为 60 g/L 时, 菌株 SYPS-062 生物量和 L-丝氨酸的积累均达到最大值, 分别为 8.1 g/L 和 6.6 g/L。

**关键词:** L-丝氨酸, 谷氨酸棒杆菌, 鉴定, 糖质原料, 直接发酵

## Identification of L-Serine Producer SYPS-062 and the Effect of Different Carbon Source

ZHANG Xiao-Mei<sup>1</sup> DOU Wen-Fang<sup>1</sup> XU Hong-Yu<sup>1</sup> XU Zheng-Hong<sup>1,2\*</sup>

(1. Laboratory of Pharmaceutical Engineering, School of Medicine and Pharmaceutics,  
Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

(2. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

**Abstract:** SYPS-062 was an L-serine producing strain stored by our lab, which could directly produce L-serine from sugar. According to morphology, physiological and biochemical identification and 16S rDNA sequence, SYPS-062 was identified as *Corynebacterium glutamicum*. And the effect of different carbon source for the SYPS-062 and *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 fermentation were studied. The experiment result showed that the sucrose was 60 g/L, the yield of L-serine and biomass reached the maximal value, 6.6 g/L and 8.1 g/L respectively.

**Keywords:** L-serine, *Corynebacterium glutamicum*, Identification, Sugar, Direct fermentation

L-丝氨酸是一种重要的氨基酸, 参与许多生物物质的合成, 是氨基酸输液的重要成分。

一直以来, L-丝氨酸生产水平较低, 是世界氨

基酸生产行业中工业化生产难度较大的氨基酸, 市场为少数外国企业所垄断, L-丝氨酸的价格居高不下(80 万元/吨)<sup>[1]</sup>。L-丝氨酸的生产方法主要有蛋白

基金项目: 江苏省博士后基金(No. SY20061019); 国家 973 计划项目(No. 2007CB707804); 国家 863 计划项目(No. 2006AA020104); 教育部新世纪优秀人才支持计划(No. NCET-07-0380)

\* 通讯作者: Tel: 86-510-85918206; 信箱: zhenghxyu@163.com

收稿日期: 2008-10-28; 接受日期: 2009-02-16

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

水解法、化学合成法、酶法和发酵法<sup>[2]</sup>。蛋白水解法操作复杂,需处理大量的洗脱液,所得的氨基酸常为混合氨基酸,需进一步精制。化学合成法最大的问题是产物为消旋体,DL-丝氨酸的拆分增加了生产的复杂性及成本。从反应液中分离L-丝氨酸一直是酶法生产L-丝氨酸的难点。与其它氨基酸相比,利用糖质原料直接发酵生产L-丝氨酸十分困难,至今研究的大多是以甘氨酸、甘氨酸三甲内盐或甘油酸为前体的发酵法,而以来源于生物质的己糖或戊糖为原料生产重要发酵产品是工业生物技术的核心研究领域之一。因此研究和开发直接发酵法生产L-丝氨酸成为药用氨基酸工业的研究热点<sup>[3]</sup>。

本研究室从自然界中筛选得到一株能直接利用糖质原料发酵生产L-丝氨酸的菌株SYPS-062<sup>[4]</sup>,L-丝氨酸的产量可达到6.6 g/L。本文首先采用形态学、生理生化性状分析和16S rDNA基因序列分析方法对细菌SYPS-062的分类地位进行了鉴定,然后考察了碳源对菌株SYPS-062发酵产L-丝氨酸的影响,为实现由糖质原料工业化生产L-丝氨酸奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株

菌株SYPS-062:由本实验室保藏,可直接利用糖质原料产L-丝氨酸。

谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*) ATCC13032:购自中国科学院微生物研究所菌种保藏中心。

### 1.2 培养基

保藏培养基(g/L):牛肉膏 10,蛋白胨 10,酵母粉 5,NaCl 3,琼脂 20。 $1 \times 10^5$  Pa灭菌 20 min。

种子培养基(g/L):葡萄糖 30,玉米浆 20,(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 20,KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5,尿素 1.5,pH 7.0~7.2, $1 \times 10^5$  Pa灭菌 10 min。

发酵培养基(g/L):KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.3,MgSO<sub>4</sub> 0.5,MnSO<sub>4</sub> 0.02,FeSO<sub>4</sub> 0.02,CaCO<sub>3</sub> 20,pH 7.0,生物素 150 μg/L,VB<sub>1</sub> 500 μg/L,碳氮源根据实验需要添加。pH 7.0~7.2, $1 \times 10^5$  Pa灭菌 10 min。

### 1.3 培养方法

从新鲜斜面上挑取1环菌株接入250 mL摇瓶(装液量为30 mL)中,于旋转式摇床中30℃、

110 r/min培养24 h得到种子液,按5%接种量将新鲜种子液接入250 mL摇瓶(装液量20 mL)中,在110 r/min旋转式摇床中发酵96 h。

### 1.4 分析方法

生物量的测定:发酵液用0.25 mol/L的盐酸稀释至适当倍数,测定562 nm处的光密度,按照 $1 OD = 0.27$  g/L DCW,换算为菌体干重。

L-丝氨酸和蔗糖浓度的测定:L-丝氨酸浓度采用安捷伦1100液相色谱仪测定。色谱柱:Hyper-sil ODS-C18 4 mm×125 mm;柱温:40℃;体积流量:1.0 mL/min;检测器:荧光检测器;激发波长:340 nm;发射波长:450 nm;流动相:20 mmol/L;醋酸钠:乙醇:乙腈=1:2:2 (V/V/V)。蔗糖浓度用间苯二酚法测定<sup>[5]</sup>。

接种后和发酵结束后分别测定每个摇瓶的重量。分别将菌体生物量、L-丝氨酸和蔗糖浓度换算为原来的浓度(文中出现的均为换算后的浓度)。

### 1.5 菌种鉴定

1.5.1 生理生化实验:按照《伯杰氏细菌鉴定手册》(第九版)方法进行碳源利用、淀粉水解、酪素降解、明胶水解、硫化氢产生、甲基红实验、硝酸盐和亚硝酸盐还原等实验。

1.5.2 16S rDNA序列扩增和序列分析:PCR扩增利用细菌通用引物:P<sub>0</sub>:5'-GAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG-3';P<sub>6</sub>:5'-CTA CGG CTA CCT TGT TAC GA-3'。

反应程序为95℃ 4 min;94℃ 45 s,56℃ 45 s,72℃ 90 s,33个循环;72℃ 10 min。PCR产物测序由上海生工完成,序列提交NCBI数据库进行比对。

## 2 结果和讨论

### 2.1 SYPS-062的鉴定

2.1.1 细菌SYPS-062的菌落表型:细菌SYPS-062为革兰氏阳性菌,无芽孢,无鞭毛;其细胞呈短杆至小棒状,有时微呈弯曲状,两端钝圆,细胞呈单个、成对或V字型排列(图1)。

2.1.2 菌株SYPS-062的生理生化特征:以*C. glutamicum* ATCC13032为对照菌株,对SYPS-062进行的生理生化实验结果表明,该菌仅能较好的利用葡萄糖、麦芽糖、乳糖、甘露糖、果糖、蔗糖及半乳糖,不能利用木糖、阿拉伯糖、鼠李糖、糊精

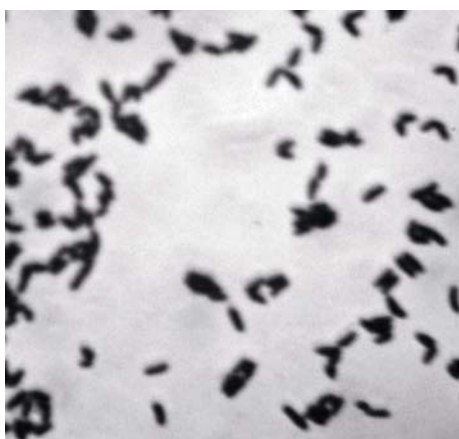


图 1 细菌 SYPS-062 在显微镜下的形态( $\times 100$ )

Fig. 1 The shape of bacterium SYPS-062 under the microscope( $\times 100$ )

及纤维素, 淀粉水解实验、酪蛋白水解实验、明胶液化实验及硫化氢实验呈阴性, 硝酸盐还原、过氧化氢酶实验及甲基红实验呈阳性, 与模式菌株 *C. glutamicum* ATCC13032 完全一致。

**2.1.3 菌株 SYPS-062 的种属确定:** 测序结果表明, 菌株 SYPS-062 16S rDNA 与 GenBank 公布的谷氨酸棒杆菌 *C. glutamicum* 的 16S rDNA 相似性为 99%。

结合菌落表型、细胞形态、细菌生理生化特性以及其 16S rDNA 序列分析, 确定细菌 SYPS-062 在分类学地位上是归属谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)。

**2.2 SYPS-062 与模式菌株 *C. glutamicum* ATCC13032 的发酵过程分析**

**2.2.1 SYPS-062 与模式菌株 *C. glutamicum* ATCC13032 的发酵过程曲线:** 图 2A 为菌株 SYPS-062 的发酵过程曲线, 以 60 g/L 蔗糖为碳源,

30 g/L  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  为氮源, L-丝氨酸和生物量都在 96 h 左右达到最大值, 分别为 6.5 g/L 和 8.0 g/L。模式菌株在同样的培养条件下, 迅速消耗碳源, 生物量快速积累, 但无 L-丝氨酸积累(图 2B)。比较两株菌的发酵曲线可发现以下差异: 1) 菌株 SYPS-062 的延滞期比模式菌株长约 50 h; 2) 菌株 SYPS-062 在对数生长期时的比生长速率比模式菌株低 77%; 3) 菌株 SYPS-062 最大生物量(8.1 g/L)仅为模式菌株 (14.1 g/L) 的 57%。

**2.2.2 以甘氨酸和 L-丝氨酸为唯一碳源时菌株 SYPS-062 和菌株 ATCC13032 的生长比较:** L-丝氨酸是一个重要的中间代谢产物, 其降解途径与产 L-丝氨酸积累之间的关系密切。甘氨酸是 L-丝氨酸的降解产物, 通过丝氨酸羟甲基转移酶(SHMT) 与 L-丝氨酸相互转化<sup>[6]</sup>, 为了探讨菌株 SYPS-062 积累 L-丝氨酸是否与该降解途径有关, 考察了菌株 SYPS-062 和模式菌株 ATCC13032 以甘氨酸和 L-丝氨酸作为唯一碳源的生长情况。

从图 3 可以看出, 菌株 SYPS-062 在以甘氨酸为碳源的培养基中生长明显, 较以 L-丝氨酸为碳源时弱, 最大生物量为其 80%(图 3A), 而模式菌株 ATCC13032 则无明显差别, 说明模式菌株对甘氨酸和 L-丝氨酸的利用程度非常相近, 相互转化较快(图 3B); 菌株 SYPS-062 的甘氨酸与 L-丝氨酸之间的转化较弱, 这极可能是 L-丝氨酸积累的原因之一。

**2.2.3 甲醇对菌株 SYPS-062 和菌株 ATCC13032 发酵的影响:** 一碳单元(C-1)在微生物代谢中有重要地位, 它参与氨基酸代谢, 而且与合成嘌呤、嘧啶有密切联系<sup>[7]</sup>。L-丝氨酸与 C-1 循环关系密切, Simic

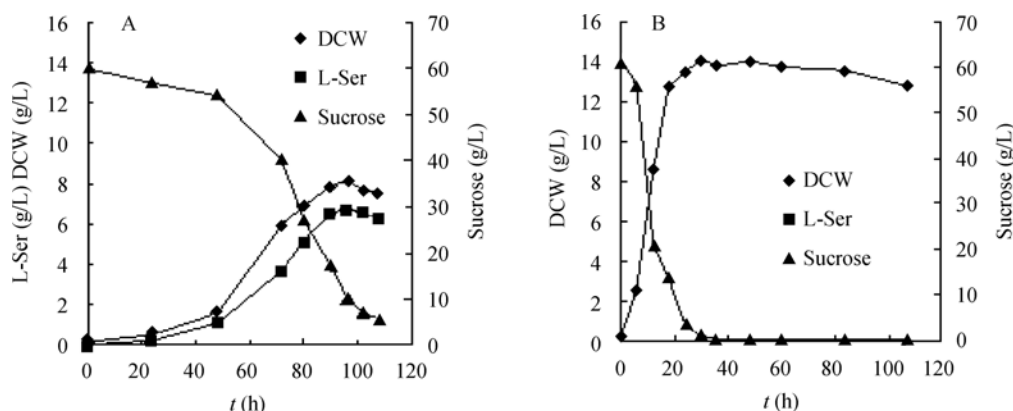


图 2 SYPS-062(A)和 ATCC13032(B)的发酵过程曲线

Fig. 2 The time course of fermentation by SYPS-062 (A) and ATCC13032 (B)

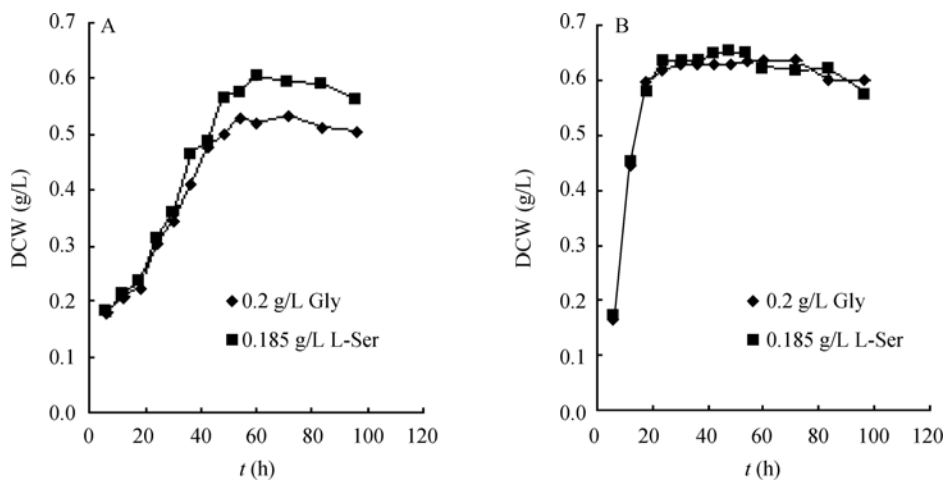


图 3 以甘氨酸和 L-丝氨酸为唯一碳源时菌株 SYPS-062 (A)和 ATCC13032(B)的生长情况  
Fig. 3 Effect of adding glycine and L-serine as sole carbon sources on fermentation by SYPS-062 (A) and ATCC13032 (B)

等<sup>[8]</sup>报道弱化了 *glyA* 基因表达的 *C. glutamicum* 变异株由于 C-1 的缺乏导致生长缓慢。而菌株 SYPS-062 在发酵过程中大量积累 C-1 的前体 L-丝氨酸, 极有可能与 C-1 合成途径不畅有关, 最终表现为生长缓慢, 延滞期长等特点。

甲醇的浓度对菌株 SYPS-062 和菌株 ATCC13032 的影响结果见表 1。从表 1 可以看出, 在培养基中添加 0.01 mg/L 甲醇时, 菌株 SYPS-062 生物量的积累达到最大值 9.5 g/L, 较未添加甲醇时提高了 20%。继续增加甲醇的浓度会导致生物量的积累下降, 但都始终高于未添加甲醇时, 而添加甲醇不利于 L-丝氨酸的合成。从表 1 还可以看出, 甲醇的添加导致 ATCC13032 生物量的显著下降, 并随着添加量的增加下降幅度增大。

表 1 甲醇的浓度对菌株 SYPS-062 和菌株 ATCC13032 发酵的影响 Table 1 Effect of methanol on strain SYPS-062 and ATCC13032			
Carbon source (Methol, mg/L)	<i>C. glutamicum</i> SYPS-062	<i>C. glutamicum</i> ATCC13032	
	DCW (g/L)	L-Ser (g/L)	DCW (g/L)
0	7.9	6.3	15.9
0.01	9.5	5.8	14.5
1	8.8	5.4	14.4
100	8.5	4.9	13.9

甲醇对细胞有一定的毒害作用, 体现在添加甲醇不利于模式菌株 ATCC13032 的生长, 但添加甲醇却对菌株 SYPS-062 的生长有显著的促进作用, 说明菌株 SYPS-062 的确存在 C-1 供给不足的情况, 即从 L-丝氨酸生成 C-1 的途径受阻, 这个结果进一步

说明可能由于 L-丝氨酸降解途径不畅通导致菌株 SYPS-062 中 L-丝氨酸的积累, 并且影响了菌体生长。而由于外加 C-1, 导致细胞通过一定的反馈调节机制, 减少了向 L-丝氨酸合成途径碳架物质的分配, 表现为添加甲醇对 L-丝氨酸合成不利。

2.3 碳源对菌株 SYPS-062 发酵产 L-丝氨酸的影响

碳源对菌株 SYPS-062 生长及 L-丝氨酸产量的影响见表 2, 从表 2 可以看出, 当以麦芽糖、乳糖和可溶性淀粉作为唯一碳源时菌株 SYPS-062 生长较弱, L-丝氨酸积累不显著; 而以葡萄糖、蔗糖、果糖为碳源时菌株 SYPS-062 生长较好, 并且有 L-丝氨酸积累, 其中蔗糖作为碳源时, 生物量的积累和 L-丝氨酸的产量均达到最大, 分别为 7.6 g/L 和 6.2 g/L。虽然蔗糖是一分子的葡萄糖和一分子的果糖缩合而成, 但以等摩尔数的葡萄糖和果糖为混合碳源时, 却没有达到相同的效果。

蔗糖浓度对菌株 SYPS-062 发酵产 L-丝氨酸的

表 2 不同碳源对菌株 SYPS-062 发酵产 L-丝氨酸和生物量的影响 Table 2 Effect of different carbon sources on cell growth and L-serine production		
Carbon source	L-Ser (g/L)	DCW (g/L)
Glucose(70)	5.1	6.1
Fructose (70)	4.4	7.7
Sucrose(70)	6.2	7.6
Glucose(35) +Fructose(35)	4.7	7.0
Maltose(70)	0.7	2.4
Lactose(70)	0.9	2.0
Soluble starch(70)	0.5	2.0

影响见图 4。从图 4 可以看出, 当蔗糖浓度为 60 g/L 时, 生物量和 L-丝氨酸的积累均达到最大值, 分别为 8.1 g/L 和 6.6 g/L。当蔗糖浓度高于 60 g/L 时, 生物量和 L-丝氨酸的积累大幅度下降, 说明高浓度的蔗糖对菌株 SYPS-062 存在明显的抑制作用。

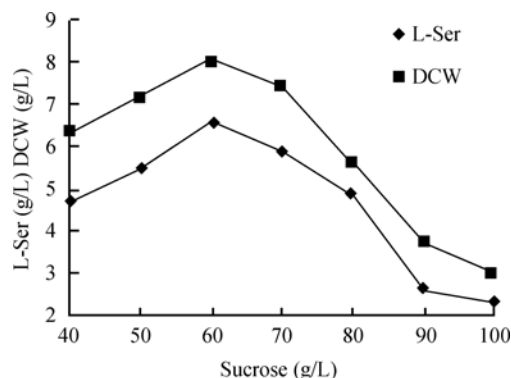


图 4 蔗糖浓度对 SYPS-062 发酵的影响

Fig. 4 The effect of different concentration of sucrose on L-serine fermentation by SYPS-062

### 3 结论

本文首先结合菌株 SYPS-062 的 16S rDNA 序列、菌落表型、细胞形态及其生理生化性状, 确定能够利用糖质基质积累 L-丝氨酸的细菌 SYPS-062 在分类学地位上归属谷氨酸棒杆菌 *Corynebacterium glutamicum*。考察了不同碳源对菌株 SYPS-062 发酵产 L-丝氨酸的影响, 实验结果表明, 当蔗糖浓度为 60 g/L 时, 菌株 SYPS-062 生物量和 L-丝氨酸的积累均达到最大值分别为 8.1 g/L 和 6.6 g/L。目前国内外对利用糖质原料生产 L-丝氨酸的研究还很少, 新疆农科院微生物所付建红等<sup>[9,10]</sup>以黄色短杆菌为出发菌株, 经诱变、发酵条件优化及采用补料发酵工艺, L-丝氨酸的产量达到 6 g/L; 魏东等<sup>[11]</sup>对产丝氨酸重组黄色短杆菌(C-11A)进行诱变改良, L-丝氨酸产量可达 30 g/L, 但同时发现重组菌诱变后存在不稳定的问题。国外 Peters 等<sup>[12-14]</sup>在研究了模式菌株谷氨酸棒杆菌 L-丝氨酸代谢途径基础上构建了叶酸缺陷型的基因工程菌 *C. glutamicum*  $\Delta$ pabABC $\Delta$ sdaA strain (*pserACB*), 该菌株 L-丝氨酸产量为 37 g/L。而关于野生型谷氨酸棒杆菌直接利用糖质原料合成 L-丝氨酸尚未见国内外文献报道。本实验室从自然界筛选得到一株直接利用糖质原料积累 L-丝氨酸的野生型 *Corynebacterium glutamicum* SYPS-062, 经诱变育种 L-丝氨酸产量可达 11.0 g/L<sup>[15]</sup>。通过对其积累 L-丝氨酸的机理进行研究, 为构建高产 L-丝氨酸

基因工程菌奠定基础。

### 参考文献

- [1] 柴多里, 祁秋景, 基木格, 等. 丝氨酸的研究进展. 化工科技市场, 2006, 29(5): 17-19.
- [2] 张克旭. 氨基酸发酵工艺学. 北京: 中国轻工业出版社, 1993, pp.13-25.
- [3] Volker FW, Michael B, Bernhard JE. Metabolic engineering of *Escherichia coli* and *Corynebacterium glutamicum* for biotechnological production of organic acids and amino acids. *Current Opinion in Microbiology*, 2006, 9(38): 268-274.
- [4] 张晓娟, 龚文芳, 许正宏, 等. 维生素对谷氨酸棒杆菌 SYPS-062 直接发酵合成 L-丝氨酸的影响. 中国生物工程杂志, 2007, 27(5): 50-55.
- [5] Han YS. Food Chemistry Laboratory Procedure. Beijing: Beijing Agricultural University Press, 1992, pp.19-23.
- [6] Peters WP, Stolz M, Etterich H, et al. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for L-Serine production. *Appl Environ Microbiol*, 2005, 71(11): 7139-7144.
- [7] Cossins EA, Chan PY, Combepine G. One-carbon metabolism in *neurospora crassa* wild-type and in mutants partially deficient in serine hydroxymethyltransferase. *Biochem J*, 1976, 160: 305-314.
- [8] Simic P, Willuhn J, Sahm H, et al. Identification of *glyA* (encoding serine hydroxymethyltransferase) and its use together with the exporter ThrE to increase L-threonine accumulation by *Corynebacterium glutamicum*. *Appl Environ Microbiol*, 2002, 68 (7): 3321-3327.
- [9] 付建红, 崔春生, 谢玉清, 等. 发酵法生产 L-丝氨酸的研究. 新疆农业科学, 2004, 41(3): 169-172.
- [10] 崔春生, 付建红, 谢玉清, 等. 补糖对丝氨酸摇瓶发酵产率的影响. 新疆农业科学, 2003, 40(4): 204-205.
- [11] 魏东, 谭慧林, 杨海燕, 等. L-丝氨酸高产菌株的选育和摇瓶发酵条件优化. 氨基酸和生物资源, 2006, 28(1): 46-48.
- [12] Peters-Wendisch P, Netzer R, Eggeling L, et al. 3-Phosphoglycerate dehydrogenase from *Corynebacterium glutamicum*: the C-terminal domain is not essential for activity but is required for inhibition by L-serine. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2002, 60(4): 437-441.
- [13] Netzer R, Peters-Wendisch P, Eggeling L, et al. Catabolism of a nongrowth substrate: L-serine utilization by *Corynebacterium glutamicum*. *Appl Environ Microbiol*, 2004, 70(12): 7148-7155.
- [14] Stolz M, Peters-Wendisch P, Etterich H, et al. Reduced folate supply as a key to enhanced L-serine production by *Corynebacterium glutamicum*. *Appl Environ Microbiol*, 2007, 73(3): 750-755.
- [15] 徐国强. L-丝氨酸高产菌株的选育及发酵条件优化. 江南大学硕士论文, 2008.