

# L-谷酰胺高产菌株 X4-23 的诱变选育

徐建华 马柯 岳峡 龚建华

(江西省科学院微生物研究所,南昌)

**摘要** 采用钝齿棒状杆菌 Hu7251 为出发菌株,经亚硝基胍和硫酸二乙酯处理,用磺胺胍药物平皿进行定向筛选,获得 L-谷酰胺 (L-Gln) 高产菌株 X4-23。该菌株具有稳定的遗传性能,在适宜的培养条件下可积累 33—35 mg/ml L-谷酰胺。

**关键词** L-谷酰胺;钝齿棒状杆菌;诱变育种

L-谷酰胺是构成蛋白质的一种氨基酸,在生物代谢中占有重要位置,在医药上也是一种有较高价值的氨基酸<sup>[1]</sup>,由于它在脑代谢及参与消化道粘膜粘蛋白组成成分的生物合成中具有重要意义,因而作为药物可用来治疗神经衰弱,酒精中毒,胃和十二指肠溃疡等疾病,还可用来改善脑功能。国外对此药应用相当普遍,尤其是日本,产量逐年增加,1978 年为 256 吨,1979 年为 444 吨,1980 年为 596 吨,1982 年为 828 吨,发展相当迅速。

L-谷酰胺的生产有发酵法、合成法、酶法三种生产方法。国内曾有报道,以黄色短杆菌 ATCC 14067 为出发菌株,经亚硝基胍诱变获得一株磺胺胍抗性株,此株在发酵液中能积累 27 mg/ml 的 L-谷酰胺<sup>[2]</sup>。利用钝齿棒状杆菌 Hu7251 进行诱变选育 L-谷酰胺高产菌在国内尚未见报道。本研究以 Hu7251 为出发菌株,经诱变处理,得到抗磺胺胍变异株 X4-23,该菌株除遗传稳定性及产酸量较出发株有大幅度的提高外,发酵液中副产物的含量,发酵液的粘度及残糖都比出发株低,有利于分离提取和工业化生产。

## 材 料 和 方 法

### (一) 出发菌株

钝齿棒状杆菌 (*Corynebacterium crena-*

*tum*) Hu7251。

### (二) 主要试剂和仪器

亚硝基胍 (NTG) 为美国进口产品,硫酸二乙酯 (DES) 为上海试剂一厂产品,磺胺胍 (SG) 为东风制药厂产品, L-谷酰胺,层析纯,为上海生化制药厂产品。其它试剂均为化学纯。

PHS-2 型酸度计,测发酵液 pH。

721 分光光度计,测菌体光密度。

### (三) 培养基组成(%)

1. 完全培养基: 葡萄糖 0.1, 蛋白胍 1, 牛肉膏 1, NaCl 0.5, 琼脂 2.0 pH 7.0—7.2。

2. 合成培养基: 葡萄糖 2, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.15, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.1, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.01, MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O 0.001, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.001, 生物素 3 μg, 维生素 B<sub>1</sub> 10 μg, 琼脂粉 2g, pH7.2。

3. 液体种子培养基: 葡萄糖 2, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.1, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.04, MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O 0.2mg, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.2mg, 玉米浆 2 ml, 尿素 0.5, pH 7.0—7.2。

4. 发酵培养基: 葡萄糖 16, NH<sub>4</sub>Cl 2, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.05, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.05, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.1, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1mg, MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O 2mg, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1.5 mg, NiCl<sub>2</sub> 0.1 mg, K<sub>2</sub>CrO<sub>4</sub> 1mg, 维生素 B<sub>1</sub> 0.1 mg, 玉米浆 1.2 ml, 泡敌 0.02, 尿素 0.8, CaCO<sub>3</sub> 5, pH 7.2—7.4。

#### (四) 诱变方法

参照文献<sup>[1]</sup>进行。

#### (五) 筛选方法

1. 初筛: 将诱变处理后的菌液涂布于含一定量的磺胺胍的合成培养基上, 同时做未处理菌液的对照试验, 30℃ 培养 2—4 天, 挑出生长的菌落即为抗磺胺胍变异株。将变异株移接完全培养基斜面上, 培养 20 小时后接一环于装有 5 ml 发酵培养基的试管中 (25 × 200mm), 于往复摇床 (频率 106 r/min, 振幅 7.6 cm) 31℃ 培养 72 小时。

2. 复筛: 将初筛获得的变异株活化后, 接一环于装有 50 ml 种子培养液的 500ml 三角瓶中, 于往复摇床 (频率 96r/min, 振幅 7.6 cm) 30℃ 培养 12 小时后, 按 5% 种量接入装有 30 ml 发酵液的 500 ml 三角瓶中, 培养条件同初筛。

#### (六) 分析方法

1. L-谷酰胺的定量分析: 采用纸层析法。以苯酚: 磷酸缓冲液 (4:1V/V) 为溶剂系统, 展层后用 0.5% 茚三酮丙酮溶液显色, 剪下斑点, 置于 5 ml 硫酸铜-乙醇洗脱液中, 于 520nm 测定 OD 值<sup>[4]</sup>。

2. pH 的测定: 用精密 pH 试纸或酸度计。

3. 残糖的测定: 采用斐林试剂热滴定法<sup>[5]</sup>。

4. 菌体生长的测定: 吸取 0.1 ml 菌液, 并加入 0.5 ml 6% HCl 中和 CaCO<sub>3</sub>, 稀释 80 倍后测 OD<sub>610nm</sub> 光密度。

## 结 果

#### (一) X4-23 菌种的诱变育种

以钝齿棒状杆菌 Hu7251 为出发菌株, 经 NTG 诱变处理后获得 174 株抗磺胺胍变异株, 产胺水平如图 1 所示, 其中正向突变率为 17.2%, 负向突变率为 62.6%, 其中 4-165 菌株能抗 0.15% 的磺胺胍, 产胺量为 22mg/ml。将 4-165 菌株分纯后得到 4-165-11 菌株, 产胺量为 27 mg/ml。对 4-165-11 菌株用 DES 进行诱变, 获得了抗 0.2% 磺胺胍的变异株 390 株,

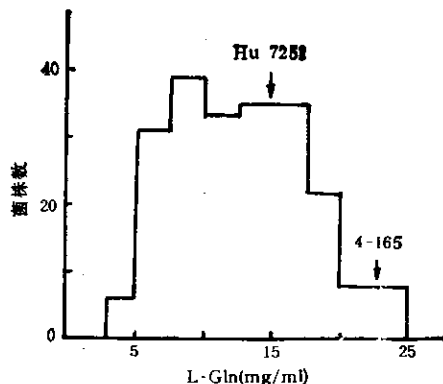


图 1 Hu7251 的抗磺胺胍变异株的 L-谷酰胺产量分布

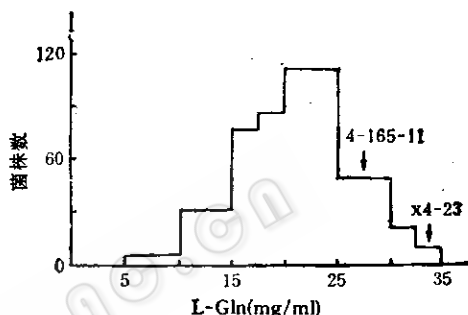


图 2 4-165-11 的抗磺胺胍变异株的 L-谷酰胺产量分布

菌株	L-谷酰胺产量 (mg/ml)
Hu7251	15
↓ NTG	
4-165 (SG <sup>r</sup> )	22
↓ 自然分离	
4-165-11 (SG <sup>r</sup> )	27
↓ DES	
X4-23 (SG <sup>r</sup> )	35

图 3 X4-23 菌株的诱变谱系

其产胺水平如图 2 所示, 从中所获得的 X4-23 菌株能在发酵液中累积 33—35 mg/ml 的 L-谷酰胺。由 Hu7251 诱变得得到产 L-谷酰胺高产菌的诱变谱系如图 3。

#### (二) 磺胺胍对菌体生长的影响

将出发菌株 Hu7251 与变异株 4-165、X4-23 置于完全培养基中于 30℃ 培养 12 小时后, 用生理盐水制成菌悬液, 涂布一定的量在含不同浓度的磺胺胍的合成培养基上培养 48 小时, 观察生长情况。其结果见表 1, 从表 1 可以看出, 随着诱变次数的增加, 菌体增加了对磺胺胍的抗性, 产胺量也有大幅度地提高。

表 1 不同浓度的磺胺胍对菌体生长的影响

生长情况 菌株	磺胺胍浓度 (%)				
	0	0.5	1	1.5	2.0
Hu7251	++	(+)	-	-	-
4-165	++	+	+	(+)	-
X4-23	++	++	++	+	+

注: ++ 生长良好 + 生长 (+) 略有生长 - 不生长

### (三) X4-23 菌株的遗传稳定性试验

为考察菌株产胍稳定性,我们将变异株 4-165, X4-23 进行连续 10 次传代试验,摇瓶产胍结果见表 2 (三次试验的平均值),表 2 表明,4-165 菌株产胍量在 22 mg/ml 左右,而 X4-23 菌株产胍量能稳定在 33—35 mg/ml,这说明 X4-23 菌株除具有稳定的遗传性能外,产胍量也有大幅度地提高。

表 2 变异株传代试验

菌株	Gln 含量 (mg/ml)	代数				
		P2	P4	P6	P8	P10
4-165		26.5	18.35	20.0	24.6	22.7
X4-23		33.56	33.85	34.3	35.1	31.0

### (四) X4-23 菌株发酵条件的确定及发酵过程曲线

应用正交试验和单因子试验综合考察了培

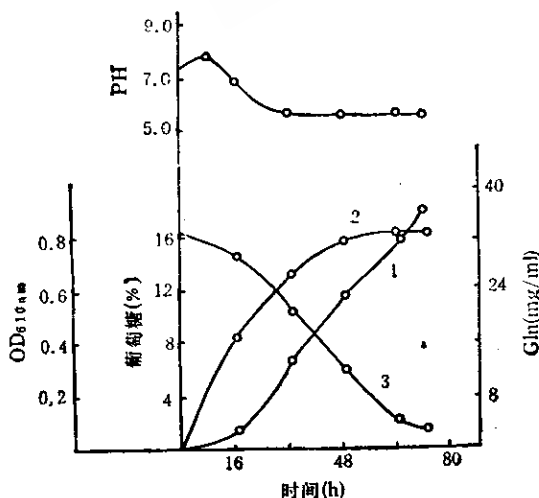


图 4 变异株 X4-23 发酵过程曲线  
1. L-谷酰胺 2. 生长曲线 3. 糖耗

培养基成分中葡萄糖、尿素、 $\text{NH}_4\text{Cl}$ 、玉米浆等成分对 X4-23 菌株产胍的影响,初步得到的最佳培养基为 (%): 葡萄糖 16,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  2,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.05,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.05,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1mg,  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  2mg,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1.5mg,  $\text{NiCl}_2$  0.1 mg,  $\text{K}_2\text{CrO}_7$  1mg, 维生素  $\text{B}_1$  0.1mg, 玉米浆 1.2 ml, 泡敌 0.02,  $\text{CaCO}_3$  5, 尿素 0.8。此培养基除一些无机元素与我们以前所报道的不一致外<sup>[4]</sup>,更主要是降低了糖耗,其残糖量也低于出发株 Hu7251。使用该培养基所得变异株 X4-23 的发酵过程曲线见图 4。

## 讨 论

1. 我们使用钝齿棒状杆菌 Hu7251 进行诱变,最终获得了抗磺胺胍变异株。该株使用的出发菌及营养要求与国内学者报道的不一致<sup>[2]</sup>。已报道的 L-谷酰胺产生菌累积 L-谷酰胺的量与菌株抗磺胺胍的能力不成正比关系,而我们对菌株进行两次诱变后,随着菌株抗磺胺胍能力的提高,产胍量也随之有所增加,这表明,诱变使菌株获得一些新的遗传特性,菌体的一些特征及谷酰胺生物合成的代谢调控机制也相应地起了一定的变化。如 4-165 菌株细胞形态较 Hu7251 菌株大,而 X4-23 菌株的细胞形态与 Hu7251 接近。

通过选择抗磺胺胍变异株,可改善菌株的产胍能力,但对于抗磺胺胍变异株累积 L-谷酰胺的机制尚不太明了。一般认为,磺胺胍为对氨基苯甲酸的结构类似物,能阻止细菌中叶酸的合成从而抑制细菌的生长,抗磺胺胍变异株可能是产生了新的叶酸合成酶,并且改变了 L-谷酰胺生物合成的调控机制,使 L-谷酰胺的积累得以实现。Takayasu 等的实验证明<sup>[6]</sup>,磺胺胍抗性菌株内的谷氨酸激酶活性和胞内 ATP 含量均高于出发株,而谷氨酸激酶和 ATP 能激活 L-谷酰胺合成中的关键酶 L-谷酰胺合成酶,从而导致高产。

2. X4-23 菌株除产量有所提高外,其副产物 L-谷氨酸、L-缬氨酸、L-脯氨酸的含量有

所下降。此外，变异株的残糖量及发酵液的粘度也比出发株低，这无疑为日后 L-谷酰胺的分离与提取提供了方便条件。

3. 如对 X4-23 菌株再进一步进行诱变育种，采用适宜的 L-谷酰胺结构类似物，选育抗 8-氮鸟嘌呤 (8-AG) 及甲硫氨酸亚砷 (MSO) 双抗株<sup>[7]</sup>，并深入进行发酵条件的研究，则产胺量还会有所提高。

### 参 考 文 献

[1] 华东化工学院：药品集，第七分册，第 43 页，上海科学

技术出版社，上海，1983 年。

[2] 王妙虎等：《微生物学杂志》，6(3)：35—37，1985 年。

[3] 章名春：《工业微生物诱变育种》，第 127—130 页，科学出版社，北京，1984 年。

[4] 岳映等：《江西科学》，5(3)：20—24，1987 年。

[5] 无锡轻工业学院等：《工业发酵分析》，第 16—17 页，轻工业出版社，北京，1979 年。

[6] Takayasu Tsuchida et al.: *Agric. Biol. Chem.*, 51(8)：2089—2094，1987 年。

[7] 土田隆康：公開特許公報，昭 61-202694。