

## 诱变法筛选高转化率谷氨酸棒杆菌

胡炎华 黄南 张祖栋 李岩

(梅花生物科技集团股份有限公司 河北廊坊 065001)

**摘 要:**以谷氨酸棒杆菌 MH021 为出发菌株,经硫酸二乙酯(DES)三次诱变处理,磺胺胍和丙二酸抗性平板筛选,得到一株高转化率谷氨酸菌株。在含有 80g/L 葡萄糖的发酵培养基中进行摇瓶发酵 28h,糖酸转化率较原始菌株提高了 22.1%。

**关键词:**谷氨酸棒杆菌 谷氨酸 诱变 筛选

利用微生物发酵法生产谷氨酸已有 50 多年的历史<sup>[1]</sup>,目前我国多采用生物素亚适量型菌株进行发酵生产。2008 年报道的平均产酸约为 105g/L 左右,糖酸转化率约为 55%,与国外进行的谷氨酸强制发酵平均产酸为 120g/L~160g/L,糖酸转化率高 于 60%的水平有 不小差距<sup>[2]</sup>。在现有条件和设备一定的情况下,通过不同方法定向选育高产和高效谷氨酸生产菌株,是提高产酸水平、降低生产成本的有效手段之一。相对于构建基因工程菌株而言,利用传统物理或化学诱变方法进行处理,进而获得特异性的突变菌株的方法在操作上更具有简便易行的优点,国内在这方面已有很多报道<sup>[3-7]</sup>。获得的菌株也为后续的原生质体融合或通过其他手段筛选高产谷氨酸菌株打下了良好的基础<sup>[4,6]</sup>。本研究在传统诱变的基础上,采用丙二酸和磺胺胍作为平板筛选条件,经摇瓶发酵复筛,得到具有这两种物质抗性的菌株,该菌株的糖酸转化率较出发菌株有明显提高,对继续进行诱变或通过其他方式筛选谷氨酸优良菌具有重要意义。

### 1 试验材料与方法

#### 1.1 试验材料

##### 1.1.1 菌株

出发菌株:谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)MH021,本公司研发部保藏菌株。

##### 1.1.2 培养基(g/L)

完全培养基:葡萄糖 5,牛肉膏 10,蛋白胍

10,NaCl 5,琼脂 15,pH 7.0~7.2。

基本培养基:葡萄糖 5,硫酸铵 2,K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>5,MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O0.5,琼脂 15,pH 7.0~7.2。

筛选培养基:在基本培养基中加入一定浓度的抗性物质。

种子培养基主要成分为:葡萄糖 25,玉米浆 33,K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>2.0,尿素 2.5,豆粕水解液 22,pH 7.0。

发酵培养基:葡萄糖 80,玉米浆 5.0,糖蜜 1.0, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.0,MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O2.0,苯酚红 2.0 mg,微量营养物质,pH 7.0~7.2。

#### 1.1.3 仪器与试剂

脉动真空灭菌柜,张家港神农药机有限公司;双人超净工作台,苏州净化设备厂;DHZ-CA 型回转式摇床,DHZ-DA 型往复式摇床,太仓实验设备厂;SBA-40C 生物传感分析仪,山东省科学院微生物研究所。

硫酸二乙酯(DES)、丙二酸,天津市光复精细化工研究所,分析纯;硫代硫酸钠,北京化工厂,分析纯;磺胺胍,sigma 分装,分析纯。其它均为国产分析纯或生化试剂。

#### 1.2 试验方法

##### 1.2.1 硫酸二乙酯(DES)诱变

DES 是一种单功能基团烷化剂,主要是通过烷化基团使 DNA 分子上的碱基及磷酸部分烷化,DNA 复制时导致碱基配对错误而引起突变。采用文献<sup>[8]</sup>所述方法进行硫酸二乙酯诱变,然后取适当稀释倍数进行涂布。

1.2.2 平板筛选

抗性菌株的获得：将第一次诱变的菌液涂布于含抗性物质(丙二酸、磺胺胍)的筛选平板上，培养得到的菌株用 0.85%生理盐水洗下，富集培养并进行第二次 DES 诱变，共诱变三次，抗性物质浓度随诱变的进行逐渐提高。第三次诱变后，于筛选平板上培养 3d~4d，挑取单菌落即得到抗性突变菌株。

1.2.3 种子培养

取活化好的斜面种子一环，接种于装有 30ml 种子培养基的 200ml 三角瓶中，用回转摇床于 33℃, 220r·p·m 振荡培养 6h~8 h 至 OD<sub>620</sub>0.6~0.8。

1.2.4 摇瓶发酵

按照 10%接种量接种于装有 30ml 发酵培养基的 500ml 三角瓶中，于 33℃, 150r·p·m 往复摇床上振荡培养 28h，培养期间视发酵液颜色变化补加 40%尿素溶液，补加量视颜色变化明显程度略有变化。

1.2.5 发酵产物测定

发酵产物中谷氨酸、残糖和乳酸含量均采用山东省科学院微生物研究所生产 SBA-40C 生物传感分析仪进行测定。

2 结果

2.1 出发菌株诱变致死率曲线

对微生物进行诱变育种，选择合适的致死率有助于得到较高的正向突变率<sup>[9]</sup>。本研究选择 70%~80%致死率。DES 对出发菌株的处理结果如图 1 所示。

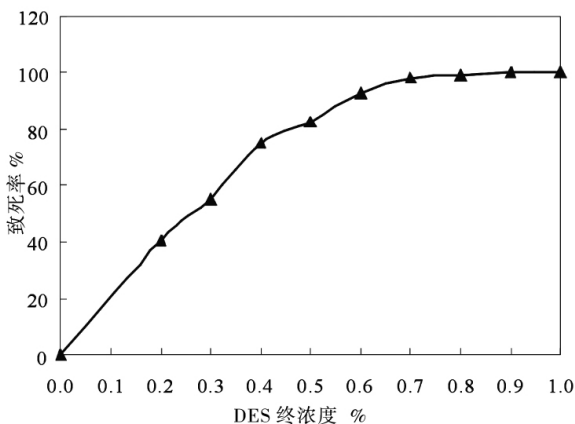


图 1 DES 诱变致死曲线

2.2 L-谷氨酸产生菌抗性突变株的选育

对出发菌株进行诱变处理后共得到 61 个抗性突变菌株单菌落，然后将其重新活化培养，用于

进一步摇瓶发酵检测。

2.3 L-谷氨酸高产菌株的摇瓶发酵试验

对上述 61 株菌株与出发菌株一起，进行摇瓶发酵试验。为便于发酵产酸及糖酸转化率的确定，在发酵过程选择葡萄糖初始含量一定 (80g/L)，流加尿素的方法进行。28h 发酵结束后，初步得到产量最高的突变菌株 19 株，其中 0 号为出发菌株 MH021，如图 2 所示。

继续对这 19 株菌株进行第二次摇瓶发酵，虽然 44 号菌产酸量较高，但 5 号菌的糖酸转化率高 于 44 号菌，因此选择 5 号菌作为后续研究菌株。对其进行分离纯化，最后得到一株编号为 5k9 的菌株。与出发菌株相比，5k9 产酸较出发菌株有所提高，糖酸转化率较出发菌株提高 22.1%。菌株发酵过程中各参数如图 3 所示。

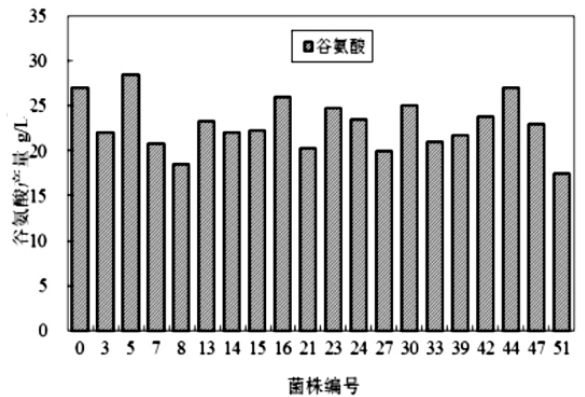


图 2 摇瓶试验较优菌株发酵结果

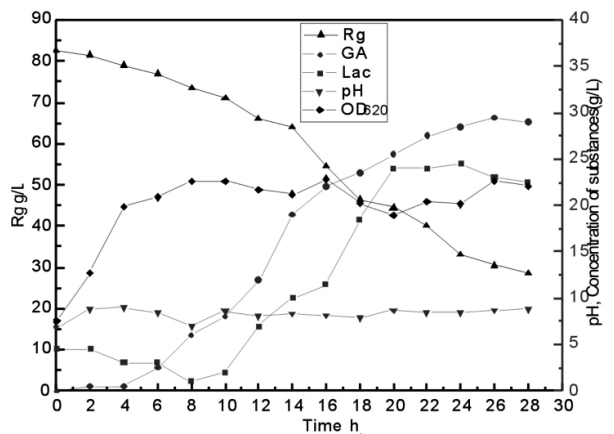


图 3 菌株摇瓶发酵过程曲线

2.4 5k9 对筛选物质的抗性鉴定

经 DES 诱变并经平板筛选和摇瓶发酵所得到的高产菌株，较出发菌株在对丙二酸和磺胺胍的抗性方面均有所提高，诱变前后菌株的丙二酸抗性比较如表 1 所示。

表 1 诱变前后菌株对丙二酸(PA)抗性比较

丙二酸浓度 g/L	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55
MH021 生长情况	++	++	++	++	--	--	--	--	--	--
5k9 生长情况	++	++	++	++	++	++	++	++	+-	--

注：“++”表示可以生长，“+-”表示生长微弱，“--”表示不能生长  
诱变前后菌株对磺胺胍(SG)的抗性比较如表 2 所示。

表 2 诱变前后菌株对磺胺胍(SG)抗性比较

磺胺胍浓度 mg/L	0	10	20	30	40	50	60	70
MH021 生长情况	++							
5k9 生长情况	++	++	++	++	+-	--	--	--

注：“++”表示可以生长，“+-”表示生长微弱，“--”表示不能生长。

### 2.5 菌株稳定性检测

对筛选得到的 5k9 菌株进行了 5 次传代和摇瓶发酵, 所得结果表明, 菌株产酸和糖酸转化率稳定, 可以用于继续诱变筛选, 具有较大的进一步优化提高价值。

## 3 讨论

本研究发现, 在摇瓶发酵过程中, 乳酸含量随发酵时间的延长不断增加 (如图 3 所示)。我们认为这是由于摇瓶发酵过程中溶氧不足, 使得 EMP 途径产生的丙酮酸大量转化为乳酸, 降低了葡萄糖的利用效率。因此, 菌株的最佳发酵条件还有待进一步优化确定。

丙二酸作为抗呼吸链抑制剂, 具有强化能量代谢的作用, 可以加强 TCA 循环前段代谢, 即增加 TCA 循环中柠檬酸的合成到生成  $\alpha$ -酮戊二酸的代谢。也可以补救由于  $\alpha$ -酮戊二酸继续向下氧化能力的缺失和乙醛酸循环减弱引起的能量代谢受阻现象<sup>[3,10]</sup>。对谷氨酸菌株赋予一定的丙二酸抗性, 非常有助于提高谷氨酸菌株的产酸能力。

谷氨酸合成过程中消耗葡萄糖产生丙酮酸, 主要通过 EMP 和 HMP 两条途径。由于 HMP 途径在消耗葡萄糖的同时产生叶酸和辅酶 Q 等物质, 使得菌株产生谷氨酸量减少, 从而导致糖酸转化率的降低。磺胺胍作为对氨基苯甲酸的结构类似物, 能够阻止叶酸的合成, 从而减少 HMP 途径对葡萄糖的消耗, 间接加强 EMP 途径, 达到提高谷氨酸产量的目的<sup>[10]</sup>。另外, 也有报道称具有磺胺

胍抗性突变菌株的细胞膜通透性会增大, 从而增加谷氨酸向生产菌株胞外的分泌<sup>[3]</sup>。

本研究中, 出发菌株对丙二酸具有一定浓度的抗性, 而对磺胺胍的抗性很弱。诱变后, 菌株对两种物质的抗性均有所提高。经筛选得到的菌株, 谷氨酸产量和转化率均高于出发菌株。同时, 由于突变菌株对磺胺胍临界抗性浓度远远低于其他文献报道<sup>[3,7]</sup>, 仍有较大的提高空间。因此, 对该菌株的进一步筛选仍具有重要的研究意义。

### 参考文献:

- [1]陈宁, 张克旭, 王东洋, 等. L-谷氨酸生产菌的选育及其发酵条件的研究[J]. 发酵科技通讯, 2002, 1: 11-13.
- [2]杜军, 徐庆阳, 谢希贤, 等. 谷氨酸高产菌 GDK-9 的定向选育及其发酵过程研究[J]. 食品与发酵工业, 2008, 7: 17-19.
- [3]秦海斌. L-谷氨酸产生菌选育、发酵条件研究及其代谢流分析[D]. 江南大学, 2009.
- [4]陈宁, 赵丽丽, 张克旭. L-谷氨酸温度敏感突变株的选育[J]. 生物技术通讯, 2002, 2: 152-154.
- [5]周盛, 李家洲. 谷氨酸生产菌的诱变育种[J]. 玉林师范学院学报, 2006, 3: 129-130, 149.
- [6]刘苗, 郑璞, 杜巧燕, 等. 耐温性 L-谷氨酸发酵菌种的选育[J]. 生物加工过程, 2009, 6: 74-78.
- [7]王帅. L-谷氨酸发酵高产菌选育及其发酵优化的研究[D]. 江南大学, 2008.
- [8]施巧琴, 吴松刚. 工业微生物育种学[M]. 北京: 科学出版社, 2009.
- [9]诸葛健, 沈威. 工业微生物育种学[M]. 北京: 化学工业出版社, 2006.
- [10]张克旭. 氨基酸发酵工艺学[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1991.