文章编号:1673-1689(2005)02-0046-04

L-丝氨酸产生菌的分离筛选及发酵条件

卢 发, 张伟国
(江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214036)

摘 要: 在含 50 mL/L 的甲醇、5 g/L 的甘氨酸的基本培养基平板上,从土壤中分离出 130 多株细菌,测定了它们利用甘氨酸生产 L-丝氨酸的能力. 获得了一株产 L-丝氨酸较好的菌株 A3,L-丝氨酸产量最高为 1.4 g/L,分类学鉴定为微球菌科(Micrococcaceae),对菌株 A3 利用甘氨酸发酵生产 L-丝氨酸的发酵条件进行了初步研究,包括甘氨酸和甲醇添加量,不同碳源、氮源,初始 pH 值以及发酵时间对产酸的影响. 结果表明,菌株 A3 在不添加甲醇、只以甘氨酸为惟一碳源的发酵培养基中也能产 L-丝氨酸,培养基中较高质量浓度的甘氨酸存在对 L-丝氨酸生产是必需的. 添加葡萄糖、甘油等外源碳源对菌体生长有利但不利于 L-丝氨酸的生产.

关键词: L-丝氨酸;甘氨酸;甲醇;筛选;微球菌科
中图分类号:TQ 920.6 **文献标识码**: A

Screening of L-Serine Producer and the Fermentation Conditions in Shake-Flask Culture

LU Fa, ZHANG Wei-guo
(The Key Laboratory of Industrial Biotechnology under Ministry of Education, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: About 130 microorganisms isolated from soil on the minimal medium containing 50 mL/L methanol and 5 g/L glycine were examined for L-serine accumulation. Strain A3, a bacterium, was identified as *Micrococcaceae*. The strain produced 1.4 g/L L-serine when glycine was added in the growth medium. The cultural conditions of converting glycine to L-serine were investigated, including initial methanol and glycine concentration, carbon sources, nitrogen sources, initial pH of medium and time course of L-serine production. The results showed that the strain A3 could produce L-serine in shake culture at 31 ℃ in the medium containing glycine, the sole carbon source. The high concentration of glycine was necessary for L-serine accumulation during the fermentation. The addition of glucose, glycerol, etc. In the glycine containing medium was beneicial to the cell growth but not favorable for the production of L-serine.

Key words: L-serine;glycine;methanol;screening;micrococcaceae

---

L-丝氨酸(L-Serine),化学名为 2-氨基-3-羟基 丙酸,是一种生糖氨基酸,在体内可由 D-甘油酸作

收稿日期:2004-06-01; **修回日期**:2004-09-03.
作者简介: 卢发(1978-),男,安徽潜山人,生物化学硕士研究生.

万方数据

前体生物合成,苏氨酸、甘氨酸也可转化为丝氨酸[1]. 虽然 L-丝氨酸属非必需氨基酸,但作为一种生化试剂,在食品、饲料、医药、农业以及化妆品工业中广泛应用. 但由于种种技术条件的限制,其供应量远远小于市场需求,价格一直居高不下[2].

丝氨酸的合成途径主要有蛋白质水解提取法、传统发酵法、酶法和化学合成法[2],传统发酵法又包括直接发酵法和添加前体物发酵法. 由于 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在利用添加前体物发酵生产 L-丝氨酸. 甘油酸盐(或酯)、甘油酸三甲内盐、甘氨酸被认为是合成 L-丝氨酸最有前景的前体物[3].

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[4~6]. 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,在丝氨酸羟甲基转化酶(STHM)作用下,甲叉四氢叶酸与甘氨酸反应生产 L-丝氨酸[3].

作者研究了产 L-丝氨酸菌株的分离、筛选及初步鉴定,并对菌株利用甘氨酸发酵生产 L-丝氨酸的发酵条件进行了初步研究.

1　材料与方法

1.1　培养基

1.1.1　基本培养基　组分(g/L):$(NH_4)_2SO_4$ 5, KH_2PO_4 1, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 3, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2, $MnSO_4 \cdot H_2O$ 0.002, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.002, 琼脂条 20. 生物素 50 μg/L, 硫胺素 · HCl 100 μg /L.

1.1.2　筛选培养基Ⅰ　50 mL 无菌甲醇,其它成分同基本培养基.

1.1.3　筛选培养基Ⅱ　50 mL 无菌甲醇,甘氨酸 5,10,20 g,其它成分同基本培养基.

1.1.4　完全培养基　组分(g/L):蛋白胨 10, NaCl 5,甘氨酸 3,酵母膏 5. 甲醇 10 mL.

1.1.5　种子培养基　组分(g/L):葡萄糖 25, $(NH_4)_2SO_4$ 5, KH_2PO_4 1, 玉米浆 40, $CaCO_3$ 10, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 g.

1.1.6　发酵培养基　组分(g/L): 甘氨酸 0～30, $(NH_4)_2SO_4$ 20, KH_2PO_4 1, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2, 玉米浆 20, $CaCO_3$ 20. 甲醇 0～40 mL.

基本培养基、筛选培养基、完全培养基和种子培养基均以 20% NaOH 调至 pH 7.0～7.2,0.1 MPa 压力下灭菌 20 min. 发酵培养基以 20% NaOH 调至 pH 7.0～7.2,0.07 MPa 压力下灭菌 10 min.

1.2　方法

1.2.1　菌种的分离及纯化　称取 5 g 土样(湿重),加入到 0.85% 无菌生理盐水中,取适当稀释度涂到筛选培养基Ⅰ,于 30 ℃恒温箱中培养 5～7 d;把生长快的单菌落转接到筛选培养基Ⅱ上,继续培养 3～5 d,挑取生长快的菌株于完全培养基上,30 ℃培养 24 h 后,接种 1 mL 到含有 15 mL 无菌发酵培养基的 250 mL 三角瓶中,置于 100 r/min、31 ℃的摇床上振荡培养 72 h,测定发酵液中的 L-丝氨酸含量,初筛出产 L-丝氨酸的菌株.

1.2.2　L-丝氨酸发酵　把筛出的菌株接种到含有 40 mL 无菌种子培养基的 250 mL 三角瓶中,置于 100 r/min、31 ℃的摇床上振荡培养 12 h 后,取 1 mL 接种到 15 mL 无菌发酵培养基的 250 mL 三角瓶中,继续培养,培养条件同初筛.

1.2.3　菌株鉴定方法　显微镜镜检(菌体形态)→革兰氏染色→生化特征试验[7,8]

1.2.4　菌浓测定　吸取 0.2 mL 样品菌液到 5 mL 0.25 mol/L HCl 溶液中,摇匀,采用 721 分光光度计,1 cm 光程 562 nm 下测定 OD 值.

1.2.5　pH 值测定　用精密 pH 试纸和酸度计测定.

1.2.6　L-丝氨酸定性、定量分析　采用纸层析方法[9],层析溶剂为 V(正丁醇) : V(丙酮) : V(二乙胺) : V(水) = 10 : 10 : 2 : 5. 定量测定利用比色定量法[9]及氨基酸自动分析仪.

2　结果与分析

2.1　L-丝氨酸产生菌的分离

利用筛选培养基Ⅰ,从土壤中分离出 260 多株能利用甲醇的菌株,它们全部是细菌,经筛选培养基Ⅱ,获得了 130 多株能抗甘氨酸的菌株,它们均能在甘氨酸质量浓度为 5 g/L、甲醇体积分数为 50 ml/L 的培养基上生长,而在甘氨酸质量浓度为 10 g/L、甲醇体积分数为 50 mL/L 的培养基上无菌株生长. 经摇瓶初筛测定,62 株明显产 L-丝氨酸. 经复筛发现,8 株产 L-丝氨酸较高,分别编号为 A1—A8,它们大部分形态是球形或杆状,其中 A3 产 L-丝氨酸最好,以下均利用该菌实验.

2.2　菌株 A3 的鉴定结果

菌株 A3 的分类学特性概括见表 1,根据以上鉴定结果,对照伯杰斯分类学手册,初步鉴定该菌为

万方数据

微球菌科(Micrococcaceae).

表1 A3的分类学特性

Tab.1 Determination of strain A3

形态特征	培养特征	生理特性											
		葡萄糖试验	还原硝酸盐	甲基红试验	V.P.试验	硫化氢	水解淀粉	水解明胶	柠檬酸盐的利用	无机氮源的利用	生长温度	生长pH值	需氧情况
球形,1.0～1.5 μm,单个或成对,革兰氏阳性,不形成芽孢.	完全培养基上能平板生长,圆形,淡黄色,边缘光,凸起,光滑.	产气,产酸	阳	阳	阳	阴	阴	阳	稍利用	能利用铵盐,不能利用硝酸盐	10～38 ℃;最适温度:28～35 ℃	5～9;最适pH值6.5～7.5.	好氧

2.3 菌株A3 L-丝氨酸发酵条件

2.3.1 不同质量浓度的甘氨酸对产酸的影响 当发酵培养基不添加甲醇时,测定不同质量浓度甘氨酸对L-丝氨酸发酵的影响.从图1可以看出,当培养基中不添加或少量添加甘氨酸(质量浓度小于5 g/L)时,发酵液中无L-丝氨酸积累,随着甘氨酸添加质量浓度的增加,发酵液中L-丝氨酸的质量浓度也相应增加,在甘氨酸添加质量浓度达到30 g/L时,L-丝氨酸质量浓度达到最高值,为1.4 g/L.这说明要想获得高产量的L-丝氨酸,发酵培养基中必需要维持较高质量浓度的甘氨酸.从图1也发现,较高质量浓度的甘氨酸在一定程度上抑制菌体生长,而低质量浓度的菌体浓度不利于L-丝氨酸的生产[6],这是L-丝氨酸发酵需要解决的问题.

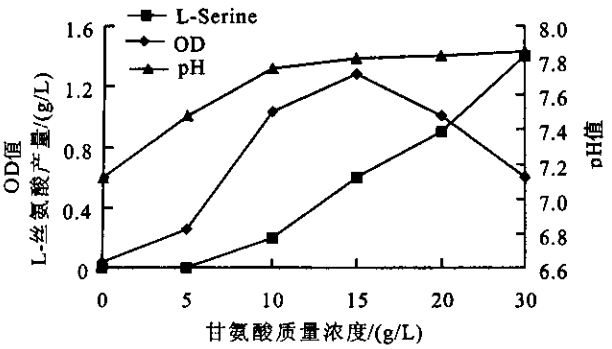


图1 不同甘氨酸质量浓度对L-丝氨酸生产的影响

Fig.1 Effect of the concentration of glycine on L-serine production

2.3.2 不同体积分数的甲醇对产酸的影响 从表2可知,在较高质量浓度的甘氨酸下,不添加甲醇有利于L-丝氨酸的生产,增加甲醇不利于L-丝氨酸的积累.低体积分数甲醇对菌体生长有促进作用,但影响不是很明显.高体积分数甲醇的添加不仅不利于菌体生长而且还不利于L-丝氨酸的生产.当不添加甘氨酸时,不管添加多少甲醇,菌体都无法合成L-丝氨酸.这说明甘氨酸的添加是合成L-丝氨酸必不可少的物质.

表2 不同体积分数的甲醇对L-丝氨酸生产的影响

Tab.2 Effect of methanol on L-serine production

甲醇体积分数/(mL/L)	甘氨酸质量浓度/(g/L)	pH值	OD_{562}	L-丝氨酸产量/(g/L)
0		8.08	0.478	0.61
5		7.89	0.470	0.23
10	20	7.86	0.492	—
20		7.86	0.470	—
40		7.95	0.380	—
5		7.04	0.083	—
10	0	7.14	0.112	—
20		7.16	0.142	—

2.3.3 初始pH值对产酸的影响 研究发现,初始pH值设定为5.0,6.0,7.0,8.0,9.0时对L-丝氨酸的产量没有多大影响,这与一些资料报道的相同[6].但较低或较高pH值对菌体生长有抑制,生长最佳pH值为7.0～7.5.

2.3.4 添加不同碳源对产酸的影响 当发酵培养基无甲醇、甘氨酸质量浓度为20 g/L时,向培养基中分别添加不同碳源.碳源对L-丝氨酸生产的影响见表3.

可以看出,添加葡萄糖、甘油、蔗糖、富马酸、乳糖、D-甘露糖有利于菌体生长,12种碳源的添加对L-丝氨酸的生产都不利.因此想通过添加外源碳源来提高菌体生长,同时提高L-丝氨酸的产量在实验中并没有得到实现.

万方数据

表 3　添加不同碳源对 L-丝氨酸生产的影响

Tab. 3　Effect of carbon sources on L-serine production

碳 源	添加量/(g/L)	pH 值	OD_{562}	L-丝氨酸产量/(g/L)
对照	0	0.432	8.18	0.67
葡萄糖	5	0.487	8.28	—
	10	0.571	8.30	—
	20	0.863	7.09	—
	40	0.950	5.93	—
山梨糖	5	0.170	7.83	—
蔗糖	5	0.526	8.26	—
棉子糖	5	0.418	8.20	—
D-甘露糖	5	0.528	8.23	0.32
可溶性淀粉	5	0.415	8.26	0.24
甘油	5	0.492	8.35	—
富马酸	5	0.508	8.41	—
柠檬酸	5	0.416	8.35	0.21
顺丁烯二酸	5	0.490	8.19	0.18
丙二酸	5	0.392	8.23	0.10
乳糖	5	0.468	8.08	—

注:"—"表示没有或产量太低无法测定.

2.3.5　不同氮源对产酸的影响　当发酵培养基无甲醇、甘氨酸质量浓度为 20 g/L 时,研究了 8 种不同氮源对产酸的影响,结果见表 4. 可以看出,产酸最佳氮源为$(NH_4)_2SO_4$,其次为 NH_4Cl,其它 6 种氮源均不利于 L-丝氨酸的积累.

表 4　不同氮源(质量浓度为 0.1 g/L)对 L-丝氨酸生产的影响

Tab. 4　Effect of nitrogen sources on L-serine production

碳 源	添加质量浓度/(g/L)	OD_{562}	pH 值	L-丝氨酸产量/(g/L)
$(NH_4)_2SO_4$	30	0.339	7.59	0.78
KNO_3	48	0.319	9.16	—
NH_4Cl	25	0.332	7.06	0.45
$(NH_4)_3PO_4$	32	0.363	7.86	0.32
$(NH_4)_2HPO_4$	31	0.362	7.95	0.28
尿素	14	0.285	8.25	—
CH_3COONH_4	36	0.141	7.10	—
$(COONH_4)_2 \cdot H_2O$	34	0.267	9.18	—

注:"—"表示没有或产量太低无法测定.

2.3.6　不同发酵时间对产酸的影响　当发酵培养基不添加甲醇且甘氨酸质量浓度为 20 g/L 时,不同发酵时间对 L-丝氨酸发酵的影响见图 2. 可以看出,在对数生长期末期,发酵液中 L-丝氨酸质量浓度达到最大值,然后会迅速降低. 摇瓶最佳产酸时间为 72 h,当 L-丝氨酸产量较高时,发酵液中最终 pH 值在 8.0～8.5 之间.

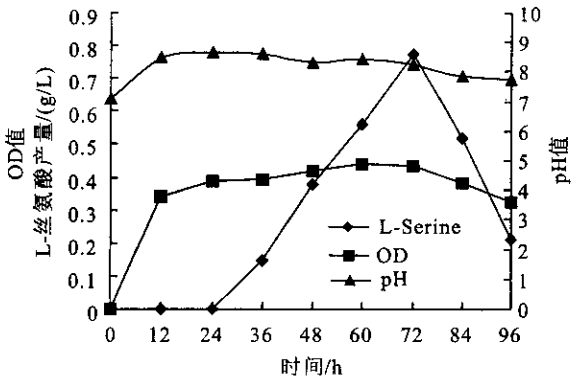


图 2　不同发酵时间对 L-丝氨酸发酵的影响

Fig. 2　Effect of time on L-serine production

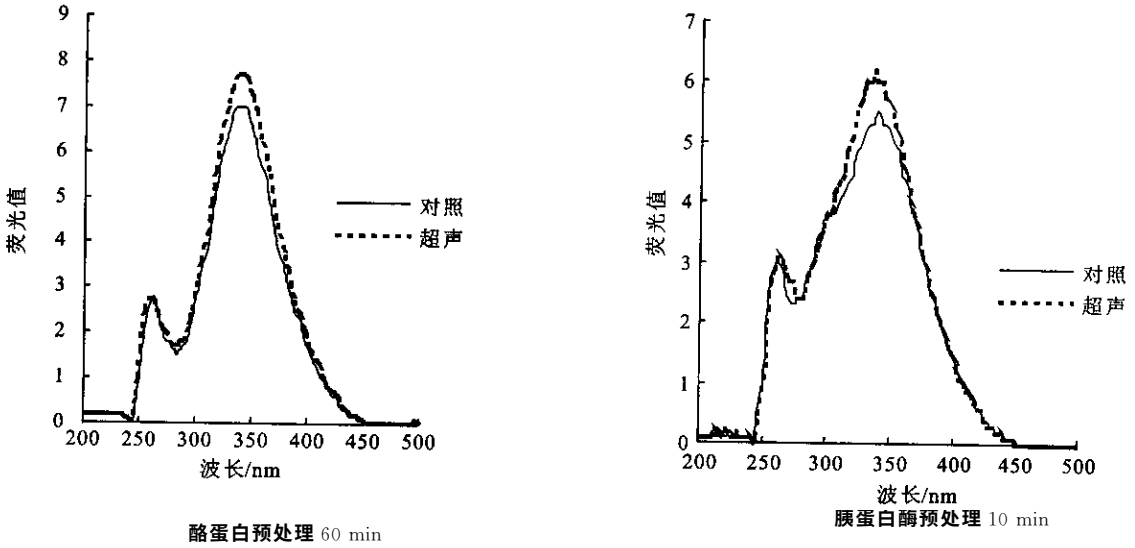
3　讨　论

利用含 L-丝氨酸途径的甲基营养型菌株发酵生产 L-丝氨酸国外曾有许多报道[4～6]. 作者以甲醇为惟一碳源从土壤中分离出了 260 多株甲基营养型菌株,但只有 130 多株能在甘氨酸浓度为 5 g/L 的平板上生长,提高甘氨酸质量浓度到 10 g/L 时,它们均不长,说明甘氨酸对菌株的生长有很大的抑制作用. 对产 L 丝氨酸较高的 8 株菌株进行 L-丝氨酸发酵实验,发现它们产酸最高达到 1.4 g/L,产量较低.

对产酸较好的菌株 A3 进行发酵条件初步研究发现,它可以在只以甘氨酸为惟一碳源的发酵培养基中积累 L-丝氨酸,添加低浓度的甲醇对菌体生长有促进作用,但影响并不是太大,提高甲醇的添加量不仅不利于菌体生长,而且也不利于 L-丝氨酸的生产. 这说明该菌株可能不是利用 L-丝氨酸途径来生产 L-丝氨酸的. L-丝氨酸合成所需要的甲叉四氢叶酸可能来自于甘氨酸的分解[3],同时甘氨酸分解会产生大量的 NH_3,这也是为什么利用甘氨酸发酵生产 L-丝氨酸发酵培养基 pH 普遍较高的原因. 本实验中,培养基中维持较高浓度的甘氨酸对 L-丝氨酸生产是有利的,这同国外报道的结果相同[10]. 但这会带来两个方面的问题,即 L-丝氨酸对甘氨酸的转化率低和菌体生长不利.

L-丝氨酸在微生物体内代谢速率很快,菌体产生的 L-丝氨酸可能会立刻被菌体利用,因此如何降低 L-丝氨酸的降解将有待研究. (下转第 54 页)

万方数据



酪蛋白预处理 60 min　　胰蛋白酶预处理 10 min

图 6　超声对酪蛋白与胰蛋白酶的荧光发射光谱的影响

Fig. 6　Spectrum of fluorescence emission of trypsin

参考文献:

[1] Yusuf Chisti. Sonobioreactors:using ultrasound for enhanced microbial productivity[J]. **TRENDS in Biotechnology**,2003,21(2):89－93.

[2] Mason T J,L PaniwnykJ. P. Lorimer. The uses of ultrasound in food technology[J]. **Ultrasound Sonochemistry**,1996,3:253－260.

[3] **朱国辉,黄卓烈. 功率超声对酶促反应的影响[J]. 应用声学**,2001,20(4):45－48.

[4] **周慧,鲁治斌,齐杰,等. 蛋白质水解酶活力测定新方法[J]. 生物化学杂志**,1994,10(5):630.

[5] **黄卓烈,林茹,何平,等. 超声波对酵母过氧化氢酶及多酚氧化酶活性的影响[J]. 中国生物工程杂志**,2003,23(4):89－93.

[6] Sakaklbara M, Wang D, Takahashi R, *et al*. Influence of ultrasound irriadiation on hydrolysis of sucrose catalyzed by invertase[J]. **Enzyme Microb Technol**,1996,18:444－448.

[7] **高大维,陈满香. 超声波催化糖化酶水解淀粉的初步研究[J]. 华南理工大学学报(自然科学版)**,1994,22(1):70－74.

[8] Masanao Imai,Kohei Ikari,Isao Suzuki. High-performance hydrolysis of cellulose using mixed cellulase species and ultrasounication pretreatment[J]. **Biochemical Engineering Journal**,2004,17: 79－83.

[9] **丘泰球,刘石生. 声场对蛋白酶催化活力及分子构象的影响[J]. 声学技术**,2000,4:233－235.　**(责任编辑:杨 萌)**

(上接第 49 页)

参考文献:

[1] **冯美卿,曹秀格,卢永辉**. L-丝氨酸制备方法评述[J]. **氨基酸和生物资源**,2000, 22(3): 42－44.

[2] **傅莉,刘信洪,徐春艳,等**. HPLC 法监测 DL-丝氨酸的合成研究[J]. **北京化工大学学报(自然科学版)**,2003, 30(4): 105－108.

[3] **张炳荣. 氨基酸生产技术讲座[J]. 中国调味品**, 1986, (10)22: 28－32.

[4] Hideaki Yamada, Silvia Susana Miyazaki. L-Serine production by a glycine-resistant mutant of methylotrophic *Hyphomicrobium metylovorum*[J]. **Agric Biol Chem**, 1986, 50(1): 17－21.

[5] Yasushi Morinaga, Shigeru Yamada, Koichi Takinami. L-Serine Production by methanol-utilizing bacterium *Pseudomonas* MS31[J]. **Agric Biol Chem**,1981,45(6): 1419－1424.

[6] Yoshiki Tani,Takahiro Kanagawa. Production of L-Serine by a methanol-utilizing bacterium,*Arthrobacter globiformis* SK-200[J]. **Agric Biol Chem**, 1978, 42(12): 2275－2278.

[7] **范秀容,沈萍. 微生物学实验**[M]. **北京:人民教育出版**,1980.

[8] R. E. **布坎南**, N. E. **吉本斯. 伯杰细菌鉴定手册**[M]. **北京:科学出版社**,1984.

[9] **潘家秀,任梅轩,徐俊杰,等. 蛋白质化学研究技术**[M]. **北京:科学出版社**,1962.

[10] Behrendt U, Bang W G, Wagner F, *et al*. The production of L-serine with a methylotrophic microorganism using the L-serine pathway and coupling with an L-trytophan-producing process[J]. **Biotechnology and Bioengineering**, 1984, 26: 308－314.

万方数据

(责任编辑:李春丽)