

# 谷氨酸棒杆菌 *L*-色氨酸营养缺陷型突变 及其高产菌株的选育

张新武<sup>1\*</sup>, 侯钢北<sup>2</sup>, 杨晓明<sup>3</sup>, 廉娜娜<sup>3</sup>

(1. 河南省食品工业科学研究所有限公司, 郑州 450053; 2. 郑州市嵩山食品有限公司, 郑州 450041;  
3. 孟州市华兴生物化工有限责任公司, 孟州 454750)

**摘要:** **目的** 以谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)HX-22 为出发菌株, 研究了目标发酵产物 *L*-色氨酸合成途径交叉反馈抑制途径代谢突变与色氨酸分解代谢类似物抗性的营养缺陷型突变诱导过程及 *L*-色氨酸高产复合突变菌株的筛选。**方法** 采用硫酸二乙酯、紫外线、钴 60  $\gamma$ -射线等诱变方法交叉处理起始与突变菌株, 通过营养缺陷型和自杀代谢底物抗性的筛选方法, 定向突变和选育 *L*-色氨酸合成与分解代谢突变的色氨酸高产菌株。**结果** 通过多次连续营养缺陷型诱变选育, 筛选出一株具有分支酸-Trp/Phe/Tyr 代谢途径 *L*-Phe 和 *L*-Tyr 合成缺陷型和 *L*-Trp 分解代谢自杀代谢底物抗性的 *L*-色氨酸高产菌 HX22-118( $\Delta Phe^- \Delta Tyr^- 5FT^r 4FP^r SG^r$ ); 通过连续传代 10 次发酵, 色氨酸产酸最高达到 28.4 g/L, 平均 27.1 g/L, 较出发菌株 HX22 产酸水平提高 81.8%。**结论** 选育出的高产菌株具有多重代谢途径突变( $\Delta Phe^- \Delta Tyr^- 5FT^r 4FP^r SG^r$ ), 突变体具有良好的遗传稳定性, 具有后续工业化生产应用潜力。

**关键词:** *L*-色氨酸; 营养缺陷型; 菌株选育; 产酸率; 交叉反馈抑制

## Study on breeding of *Corynebacterium glutamicum L*-tryptophan auxotrophic strains with high yield

ZHANG Xin-Wu<sup>1\*</sup>, HOU Gang-Bei<sup>2</sup>, YANG Xiao-Ming<sup>3</sup>, LIAN Na-Na<sup>3</sup>

(1. Henan Province Food Industry Research Institute Co., Ltd., Zhengzhou 450053, China; 2. Zhengzhou City Songshan Food Co., Ltd., Zhengzhou 450041, China; 3. Mengzhou Huaxing Biological Chemical Co., Ltd., Mengzhou 454750, China)

**ABSTRACT: Objective** To research the breeding of high *L*-tryptophan yield with multiple synthetic and metabolic pathway mutation strain by using *Corynebacterium glutamicum* HX-22 as the starting strain. **Methods** Diethyl sulfate (DES), UV, and cobalt-60 gamma-ray mutagenesis method were performed cross processing starting on *C. glutamicum* HX-22 and mutant strain. The auxotrophic phenotype and metabolic suicide substrate resistance screening methods were used, and targeted mutagenesis and breeding of *L*-tryptophan acid synthesis and catabolism mutation of lubricious ammonia acid producing strain. **Results** Through continuous type defect mutagenesis breeding for many times, the strains with auxotroph and resistance marker of *L*-tryptophan high yield bacteria HX22-118 ( $\Delta Phe^- \Delta Tyr^- 5FT^r 4FP^r SG^r$ ) was screened, then extend

基金项目: 河南省重点科技攻关计划项目(102102310027)

**Fund:** Supported by the Key Scientific Research Project of Henan Province (102102310027)

\*通讯作者: 张新武, 高级工程师, 主要研究方向为食品与工业发酵。E-mail: Smxzxw@163.com

\*Corresponding author: ZHANG Xin-Wu, Senior Engineer, Henan Province Food Industry Research Institute Co., Ltd., Zhengzhou 450053, China. E-mail: Smxzxw@163.com

the 10 times in succeeding transfer culture, the *L*-trp fermentation yield reached to 27.1 g/L, which was increased by 81.8% comparing to the wild start strain. **Conclusion** The selected multiple mutated strain HX22-118 ( $\Delta Phe^- \Delta Tyr^- 5FT^- 4FP^- SG^-$ ) with high *L*-trp yielding strain has a good genetic stability, which can be applied in industrial application.

**KEY WORDS:** *L*-tryptophan, auxotroph; strains selected breeding; acid production rate; cross-feedback inhibition

## 1 引言

*L*-色氨酸是一种重要的氨基酸,在极其复杂的人体代谢活动中,*L*-色氨酸发挥着重要的生理功能,对人和动物的生长发育、新陈代谢具有重要的生理作用<sup>[1,2]</sup>。*L*-色氨酸的工业化生产方法主要有化学合成法、蛋白质水解法、微生物发酵法以及酶合成法<sup>[3-5]</sup>。截至现在,微生物发酵法生产*L*-色氨酸仍占主导地位<sup>[6,7]</sup>。目前*L*-色氨酸微生物发酵法所选用的生产菌主要有大肠杆菌、谷氨酸棒杆菌,以及黄色短杆菌、枯草杆菌、酵母等<sup>[8,9]</sup>。从自然界中找到大量积累*L*-色氨酸的生产菌株几乎不可能,通过调节微生物的发酵的合成机制及合成途径,选育出*L*-色氨酸优良生产菌株是发酵法的关键所在<sup>[10-12]</sup>。在*L*-色氨酸菌种选育方面,Shiio等<sup>[13]</sup>以黄色短杆菌抗性变异株为出发菌株,选育出具有邻氨基苯甲酸结构类似和磺胺胍(SG)抗性变异株,其产酸率提高到19 g/L。张素珍等<sup>[14]</sup>用亚硝基胍作诱变剂处理北京棒杆菌AS1.299,在含12%葡萄糖的培养基中,30℃振荡培养5 d。可积累*L*-色氨酸8 g/L。陈俊峰<sup>[15]</sup>从土壤中分离得到一株谷氨酸棒杆菌,经多次诱变获得了双缺陷型菌株,摇瓶发酵90 h,产色氨酸10.15 g/L。本研究以谷氨酸棒杆菌HX-22为出发菌株,开展了*L*-色氨酸营养缺陷型抗性优良菌株选育的技术研究,以满足*L*-色氨酸工业化发酵需求。

## 2 材料与方法

### 2.1 材料、试剂与仪器设备

出发菌株:谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*) HX22 菌株由河南省孟州市华兴生物化工有限责任公司保存。

主要化学试剂:牛肉膏,蛋白胨,琼脂粉,硫酸铵,硫酸二乙醋,*L*-色氨酸,*L*-苯丙氨酸,*L*-酪氨酸,5-氟-*DL*-色氨酸,磺胺胍,4-氟-*DL*-苯丙氨酸,其他试剂均从当地采购。

主要仪器与设备:751G 分光光度计,苏州市莱顿科学仪器有限公司;PHS-3c型酸度计,上海仪电科学仪器股份有限公司;OLYMPUS生物显微镜,日本OLYMPUS会社;往复式摇床(振幅10.0 cm),上海机电仪器有限公司;谷氨酸-葡萄糖分析仪,山东科学院生物研究所有限公司。

### 2.2 培养基(g/L)

#### 2.2.1 活化斜面培养基

葡萄糖 1.0 g/L,蛋白胨 12.0 g/L,牛肉膏 11 g/L,酵母膏 5.0 g/L,NaCl 3.0 g/L,琼脂条 22. g/L, pH 7.0~7.2。

#### 2.2.2 斜面保藏培养基

蛋白胨 12.0 g/L,牛肉膏 11.0 g/L,酵母膏 5.0 g/L,NaCl 3.0 g/L,琼脂条 20.0 g/L, pH 7.0~7.2。

#### 2.2.3 液体完全培养基

葡萄糖 5.0 g/L,蛋白胨 10.0 g/L,牛肉膏 10.0 g/L,酵母膏 5.0 g/L,NaCl 2.50 g/L, pH 7.0~7.2。

#### 2.2.4 固体完全培养基

葡萄糖 5.0 g/L,蛋白胨 10.0 g/L,牛肉膏 10.0 g/L,酵母膏 5.0 g/L,NaCl 2.50 g/L,琼脂条 20.0 g/L, pH 7.0~7.2。

#### 2.2.5 基本培养基

葡萄糖 24.0 g/L,硫酸铵 15.0 g/L,磷酸二氢钾 1.2 g/L, MgSO<sub>4</sub> 0.4 g/L, FeSO<sub>4</sub> 0.01 g/L, MnSO<sub>4</sub> 0.01 g/L,生物素 100 μg/L, V<sub>B1100</sub> μg/L,琼脂粉 20.0 g/L, pH 7.0~7.2。

#### 2.2.6 抗药性筛选培养基

200 mL 液体基本培养基中添加*L*-苯丙氨酸、*L*-酪氨酸各 12 mg/L,琼脂 2.0 g/L, pH 7.0~7.2。

#### 2.2.7 筛选种子培养基

玉米淀粉 40.0 g/L,硫酸铵 3.50 g/L 玉米浆 40 mL/L,酵母膏 5.0 g/L,磷酸氢二钾 1.2 g/L,磷酸二氢钾 0.75 g/L MgSO<sub>4</sub> 0.35 g/L, FeSO<sub>4</sub> 0.01 g/L, MnSO<sub>4</sub> 0.01 g/L, pH 7.0~7.2。

#### 2.2.8 筛选发酵培养基

玉米淀粉 100.0 g/L,硫酸铵 40.0 g/L,磷酸氢二

钾 1.0 g/L, 磷酸二氢钾 1.0 g/L, 玉米浆 20 mL/L, MgSO<sub>4</sub> 0.4 g/L, FeSO<sub>4</sub> 0.01 g/L, MnSO<sub>4</sub> 0.01 g/L, pH 7.0~7.2。

## 2.3 诱变筛选方法

### 2.3.1 诱变方法

#### (1) 紫外线诱变

用活化培养基将菌种培养至对数生长中后期, 用 pH 6.0 缓冲液离心洗涤 2 次, 吸取 5 mL 菌悬液于直径 9 cm 培养皿中, 采用功率为 15 W 的紫外线灯管, 照射距离为 30 cm 的条件下进行诱变处理, 测定不同时间的杀菌率绘制致死曲线。

#### (2) 硫酸二乙酯诱变

在 100 mL 三角瓶中, 先准确吸取 0.2 mL 硫酸二乙酯乙醇溶液(50%, V:V), 然后分别加入 10 mL 0.2 mol/L 的磷酸缓冲液和供试菌悬液, 控制温度 32 °C, 摇床转速 100 r/min, 振荡培养 40~80 min 后, 加入 1 mL 25% 的硫代硫酸钠溶液终止反应, 测定不同诱变时间的杀菌率, 绘制致死率曲线。

(3) 钴 60 $\gamma$ -射线诱变(委托河南省科学院同位素研究所辐射中心辐照)

取 10 mL 供试液于无菌试管中, 以 25 Gy 辐照剂量进行钴 60 $\gamma$ -射线照射处理。

### 2.3.2 营养缺陷型菌株的筛选

吸取 10 mL 经反复诱变处理过的菌液, 离心, 洗涤, 使其呈悬浮状态, 然后将菌液按梯度稀释法涂布于限制培养基平板上, 32 °C 下恒温培养 24~48 h, 待长出小菌落则可能为缺陷型菌株。然后无菌牙签挑取菌落接种于基本培养基和完全培养基上进行缺陷型的检出验证。

### 2.3.3 抗性菌株的筛选

首先在药物平板上 30 °C 培养 4~6 d, 确定药物抑制菌体生长的临界浓度。然后将经过各种诱变处理后的菌悬液直接涂布于含有药物浓度为临界浓度的平板培养基上, 30 °C 培养挑取优良突变菌株做保藏处理。

### 2.3.4 筛选方法

(1) 初筛: 将上述所得的突变株进行培养初筛, 产色氨酸高者作为初筛菌株, 留作复筛用。

(2) 复筛: 将初筛获得的产色氨酸菌的菌株斜面, 接种到液体发酵培养基中, 每株菌做 5 瓶, 发酵液离心后取上清液测定色氨酸的含量。

## 2.4 分析方法

### 2.4.1 L-色氨酸的测定方法<sup>[16]</sup>

将发酵液 3000 r/min 离心 10 min, 上清液稀释适当倍数, 准确取 1 mL 稀释后的发酵液与对二甲氨基苯甲醛储备溶液 9 mL 混合, 移入试管中 60 °C 水浴加热 15 min, 加入 0.5% 亚硝酸钠溶液 0.05 mL, 混匀后再继续水浴加热 5 min, 取出冷却, 静置 10 min, 以不含对二甲氨基苯甲醛显色剂的硫酸溶液做样品空白(以便消除样品自身颜色的干扰), 用 1 cm 比色皿在 593 nm 处测定吸光值。以 L-色氨酸标准溶液配制标准系列溶液, 同法制备标准曲线, 以标准曲线法定量求出 L-色氨酸的产量。

### 2.4.2 pH 的测定

采用 pH5.5~9.0 精密 pH 试纸测定和 pH-25 型酸度计。

### 2.4.3 葡萄糖的测定

采用 SBA~40A 谷氨酸-葡萄糖分析仪测定<sup>[17]</sup>。

### 2.4.4 突变体定义

L-苯丙氨酸(L-Phe) 合成缺失突变体表示为  $\Delta Phe^r$ , L-酪氨酸(L-Tyr) 合成缺失突变体表示为  $\Delta Tyr^r$ , 5-氟-DL-色氨酸抗性表示为  $5FT^r$ , 磺胺胍, 4-氟-DL-苯丙氨酸抗性表示为  $4FP^r$ , 色氨酸磺胺胍抗性表示为  $SG^r$ 。

## 3 结果与分析

### 3.1 L-色氨酸高产菌株的诱变选育

#### 3.1.1 诱变条件的选择

诱变处理一般选择对数生长中后期的细菌细胞进行, 此时由于细胞处于生理状态同步阶段, 对理化因素也较敏感, 有利于诱变剂的诱变作用, 容易获得高突变率, 重现性好的菌株<sup>[18]</sup>。紫外线(UV)是一种使用方便且诱变效果较好的物理诱变剂, 其生物学效应主要是由于 DNA 分子结构能够强烈吸收紫外线, 引起 DNA 链的断裂, 形成嘧啶二聚体, 胸腺嘧啶二聚体的形成是紫外线改变 DNA 分子结构及生物活性的主要途径。通过测定不同照射时间对 L-色氨酸出发菌株致死率的影响, 其结果如下图 1 所示。

图 1 结果所示, 当紫外线照射时间为 60 s 时出发菌株的致死率为 80% 左右, 因此选择诱变照射时间为 60 s。

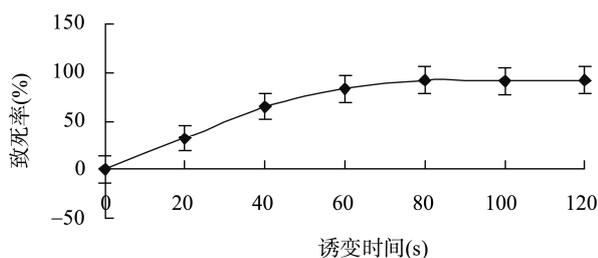


图1 谷氨酸棒杆菌 HX22 菌株的紫外辐射诱变处理致死率曲线( $n=3$ )

Fig. 1 Fatality rate curve of *C. glutamicum* HX22 strain by UV radiation-induced mutation treatments ( $n=3$ )

在烷化剂中最常用的是硫酸二乙酯和亚硝基胍。硫酸二乙酯作为一种诱变谱较为广泛的烷化剂,能与 DNA 分子的许多部位发生烷化作用,结果使 DNA 分子增加了烷基侧链,从而改变了 DNA 的分子结构,达到发生突变的目的。本实验采用终浓度为 2%(V:V)的硫酸二乙酯进行诱变处理。其诱变时间与致死率的关系如图 2 所示。

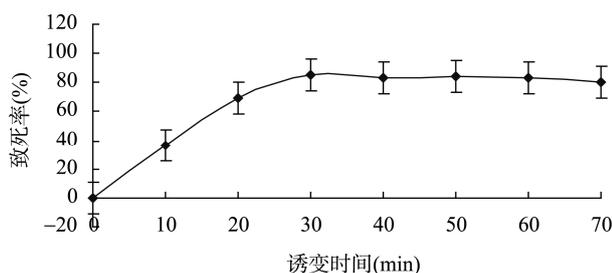


图2 谷氨酸棒杆菌 HX22 菌株的 DES 诱变处理致死率曲线( $n=3$ )

Fig. 2 Fatality rate curve of *C. glutamicum* HX22 strain by DES-mutation treatments ( $n=3$ )

从图 2 可知,硫酸二乙酯诱变处理的最佳时间为 20~30 min。用钴  $60\gamma$ -射线对其进行诱变,考察诱变时间与菌株致死率关系,结果见图 3。图 3 可以看出,在辐照计量为 25 Gy 时,随着钴  $60\gamma$ -射线辐照时间的延长,致死率逐渐增大,然后减缓。据报道,出发菌株为经过诱变所得到的菌株,其致死率在 75%~85% 时,较易获得稳定的高产诱变菌。所以,本试验确定的诱变时间为 30~40 min。

### 3.1.2 营养缺陷型菌株的筛选

色氨酸的生物合成途径中以分支酸为前体物质时不仅可以生成 *L*-色氨酸(*L*-Trp),还可生成 *L*-苯丙氨酸(*L*-Phe)和 *L*-酪氨酸(*L*-Tyr)等物质。筛选 *L*-苯丙

氨酸和 *L*-酪氨酸合成缺陷型突变株,可以切断其的合成代谢支路对分支酸为前体物质的分流,以增加 *L*-色氨酸前体物质的浓度,解除 *L*-Phe 与 *L*-Tyr 合成产物对分支酸代谢上游途径的交叉反馈抑制,有利于 *L*-色氨酸合成的底物供应,促进产物积累<sup>[19]</sup>。将谷氨酸棒杆菌(*Cornobaeterium gluramicum*)HX-22 经诱变限制培养基培养后,挑取小菌落接种于基本培养基与完全培养基平板,筛选出营养缺陷型菌株 30 株,进一步在基本培养基上划线培养,其中有 16 株不能生长,基本可以确定为营养缺陷型菌株。将这 6 株菌株进行缺陷型验证,缺陷型标记及复筛菌株编号如下表 1。

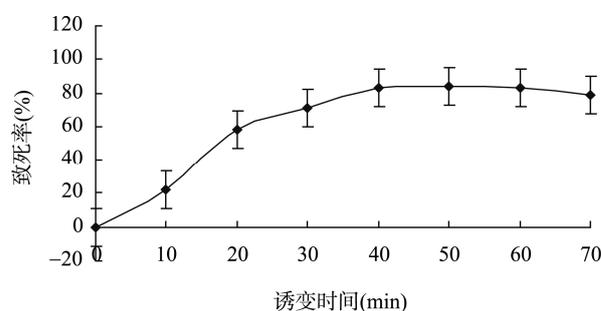


图3 谷氨酸棒杆菌 HX22 菌株 Co-60-辐射诱变处理致死率曲线( $n=3$ )

Fig. 3 Fatality rate curve of *C. glutamicum* HX22 strain by Co-60 irradiation-mutation treatments ( $n=3$ )

表 1 野生型与缺陷性菌株的 *L*-Trp 产酸量( $n=3$ )

Table 1 The yield of tryptophan of wild type and double auxotrophic mutant strains ( $n=3$ )

菌株编号	缺陷性编号	色氨酸产量(g/L)
HX22-8	<i>Phe</i> <sup>-</sup> <i>Tyr</i> <sup>-</sup>	16.1
HX22-10	<i>Phe</i> <sup>-</sup>	15.2
HX22-13	<i>Phe</i> <sup>-</sup> <i>Tyr</i> <sup>-</sup>	16.4
HX22-14	<i>Phe</i> <sup>-</sup> <i>Tyr</i> <sup>-</sup>	15.7
HX22	(野生型)	14.9

从上表结果可知,筛选出的 4 株缺陷型菌株的产酸量较原始菌株的产酸量(14.9 g/L)都有不同程度的提高。结果也进一步说明通过切断 *L*-苯丙氨酸、*L*-酪氨酸的代谢支路途径,可提高色氨酸的产酸量。但是,色氨酸的合成途径中还存在着非常严格的调节机制,例如目的产物色氨酸对合成途径的反馈抑制和阻遏等。因此,需要进一步选育色氨酸结构类似物

的高抗性菌株, 解除反馈抑制和阻遏作用的影响。

### 3.1.3 5-氟-*DL*-色氨酸的抗性菌株的筛选

5-氟-*DL*-色氨酸是色氨酸的一种衍生物, 属于其结构类似物之一, 主要用于选育色氨酸抗性突变株, 从而获得抗类似物高产菌株。以 HX22-13 菌株为测试对象, 确定其抗性物质临界浓度。HX22-13 在 5-氟-*DL*-色氨酸的各浓度平板上的生长情况如表 2。

表 2 5-氟-*DL*-色氨酸抗性(5-FT<sup>r</sup>)临界浓度的确定  
Table 2 The determination critical concentration of 5-FT resistant (5-FT<sup>r</sup>)

5-氟- <i>DL</i> -色氨酸(mg/mL)	0	0.3	0.5	1.0
菌体生长情况	++	++	+-	-

注: ++: 生长良好; +: 生长一般; +/-: 只有几个菌落; -: 不生长。

从上表 2 可知, 其临界浓度为 0.5 mg/mL。按筛选确定的照临界浓度标准对 HX22-13 进行连续钴 60 $\gamma$  射线等诱变处理, 诱变后的菌悬液继续在 0.5~1.5 mg/mL 高浓度 5-氟-*DL*-色氨酸培养基上生长培养, 挑出生长良好的突变菌进行初复筛和营养缺陷型验证。经反复筛选验证共筛得到三株突变菌, 其结果如表 3。

表 3 5-氟-*DL*-色氨酸抗性复筛突变株的色氨酸产率(g/L)  
Table 3 The *L*-Trp yield of compound screening 5-FT resistant mutant strains (g/L)

		<i>L</i> -Trp 发酵产率 (yield), g/L		
菌株		HX22-36	HX22-40	HX22-61
发酵批次	A	18.6	18.0	17.3
	B	17.6	18.5	16.7
	C	16.9	19.2	17.4
	平均	17.7 $\pm$ 0.85	18.5 $\pm$ 0.60	17.1 $\pm$ 0.36

其中 HX22-40 产酸最高达到 19.2(g/L), 平均 18.5(g/L), 产酸稳定。将 HX22-40 菌株扩大培养后, 接种在含有 1.5 mg/mL 的 5-氟-*DL*-色氨酸的平板上, 结果发现对 1.5 mg/mL 的 5-氟-*DL*-色氨酸仍然敏感。

### 3.1.4 4-氟-*DL*-苯丙氨酸抗性菌株筛选

通过以上的诱变选育使得突变株的 *L*-色氨酸的产酸量有一定量积累。选育苯丙氨酸的结构类似物抗性突变株可以增强芳香族氨基酸的合成代谢流, 从遗传上解除反馈抑制, 进一步提高菌株产酸量。实验中采用 4-氟-*DL*-苯丙氨酸作为抗性菌株的筛选物质,

4-氟-*DL*-苯丙氨酸是 *L*-Phe 结构类似物。以 HX22-40 突变株作为进一步诱变的出发菌株, 确定了 HX22-40 突变株对 4-氟-*DL*-苯丙氨酸的临界浓度为 0.7 mg/mL。按确定的照临界浓度标准对 HX22-40 进行连续紫外线、DES 等诱变处理, 诱变后的菌悬液继续在 0.7~2 mg/mL 高浓度 4-氟-*DL*-苯丙氨酸培养基上生长培养, 挑出生长良好的突变菌进行初复筛和营养缺陷型验证。结果有 5 株较出发株 HX22-40 的产酸量有明显提高。进一步复筛验证, 这 5 株的遗传标记均为  $\Delta Phe^- \Delta Tyr^- 5FT^r 4FP^r$ , 各菌株的产酸结果如下表 4。

表 4 4-氟-*DL*-苯丙氨酸突变株 *L*-Trp 发酵产率复筛结果  
Table 4 The *L*-Trp yield of compound screening 4-FP mutant strains

摇瓶号	HX22-66	HX22-70	HX22-78
A	20.6	19.0	17.2
B	20.0	19.5	20.7
C	19.7	20.1	19.4
平均	20.1	19.5	19.1

其中 HX22-66 突变株产酸最高达 20.6 g/L, 平均 20.1 g/L, 较出发菌株提高 34.8%。

### 3.1.5 磺胺胍抗性菌株的筛选

通过选育色氨酸磺胺胍抗性, 可以有效解除其对芳香族氨基酸代谢途径的抑制作用, 使得色氨酸大量积累。我们以 HX22-66 突变株作为进一步诱变的出发菌株, 确定了 HX22-66 突变株对色氨酸磺胺胍的临界浓度为 0.5 mg/mL。按确定的照临界浓度点对 HX22-66 进行连续 DES 等诱变处理, 诱变后的菌悬液继续在 0.5~3 mg/mL 高浓度培养基上生长培养, 挑出生长良好的突变菌进行初复筛和营养缺陷型验证。结果有 4 株较出发菌株 HX22-66 的产酸量有明显提高。进一步复筛验证, 这 4 株的遗传标记均为  $Phe^+ Tyr^+ 5-FT^r 4-FP^r SG^r$ 。摇瓶复筛结果如表 5。

其中 HX22-118 突变株产酸量稳定, 平均 27.1 g/L, 最高达到 28.4 g/L, 较出发菌株产酸提高 81.8%。

### 3.1.6 目标突变菌株的稳定性试验

将筛选出的 HX22-118 突变株进行多次传代培养, 记录每一次每一代君主的标记及产酸水平, 共转接 10 代, 其结果如下表 6 所示。

表5 色氨酸磺胺胍抗性SG<sup>r</sup>突变株复筛后色氨酸发酵产率Table 5 The L-Trp yields of SG<sup>r</sup> mutant strains

摇瓶号	HX22-098	HX22-117	HX22-108	HX22-118
A	26.6	26.7	26.4	27.2
B	25.9	25.5	25.2	26.7
C	27.7	26.1	24.4	28.4
平均	26.5	26.1	25.5	27.1

表6 HX22-118 遗传稳定性的测试

Table 6 Identification result of genetic stability of HX22-118

传代数	2	4	6	8	10
遗传标记	+	+	+	+	+
产酸量(g/L)	27.0	27.8	27.4	28.1	28.0

注：“+”表示遗传标记为 Phe<sup>+</sup>Tyr<sup>+</sup>+5-FT<sup>r</sup>+4-FP<sup>r</sup>+SG<sup>r</sup>

结果表明：该突变株产酸量稳定，具有良好的遗传稳定性，可以用于工业化生产。

谷氨酸棒杆菌(*C. glutamicum*)HX22-118 菌株诱变谱系(图4)。

出发菌株	产酸量(g/L)
谷氨酸棒杆菌HX22	14.9
↓连续紫外线、DES、 <sup>60</sup> Co-γ射线诱变	
HX22-13 ( $\Delta Phe^- \Delta Tyr^-$ )	16.4
↓连续紫外线、DES、 <sup>60</sup> Co-γ射线诱变	
HX22-40 ( $\Delta Phe^- \Delta Tyr^- 5FT^r$ )	18.5
↓连续紫外线、DES、 <sup>60</sup> Co-γ射线诱变	
HX22-66 ( $\Delta Phe^- \Delta Tyr^- 5FT^r 4FP^r$ )	20.1
↓连续紫外线、DES、 <sup>60</sup> Co-γ射线诱变	
HX22-118 ( $\Delta Phe^- \Delta Tyr^- 5FT^r 4FP^r SG^r$ )	27.1

图4 谷氨酸棒杆菌(*C. glutamicum*)HX22-118 菌株的诱变谱系Fig. 4 The breeding Process of *C. glutamicum* HX22-118 strain

## 4 结论

在 L-色氨酸的生物合成途径及其调节机制的基础上，依据遗传育种理论，对谷氨酸棒杆菌 HX-22 进行了 L-色氨酸代谢途径 L-Phe 和 L-Tyr 合成缺陷型

( $\Delta Phe^- \Delta Tyr^-$ )与 L-色氨酸合成反馈调节、色氨酸分解代谢类似物抗性( $5FT^r 4FP^r SG^r$ )菌株的复合突变菌株选育。以谷氨酸棒杆菌 HX-22 为出发菌株，采用连续多次 DES、紫外线、钴 60 $\gamma$ -射线诱变处理和相关代谢抗性物的筛选，以解除了色氨酸合成途径的反馈抑制和阻遏作用影响为过程目标，选育出一株具有多重营养缺陷型和抗性标记的 L-色氨酸高产菌 HX22-118( $\Delta Phe^- \Delta Tyr^- 5FT^r 4FP^r SG^r$ )。连续传代 10 次，L-色氨酸发酵产率最高达到 28.4 g/L，平均 27.1 g/L，较出发菌株产酸水平(14.9 g/L)提高 81.8%，选育出的高产菌株具有良好的遗传稳定性，具有一定的工业化生产潜力。

## 参考文献

- 李剑欣, 张绪梅, 徐填寿. 色氨酸的生理生化作用及其应用[J]. 氨基酸和生物资源, 2005, 27: 58-62.  
Li JX, Zhang XM, Xu TS. Physiological and biochemical effects of tryptophan and its application [J]. J Amino Acids Biological Resour, 2005, 27: 58-62.
- 蒋婕, 陈福旺, 孟秀, 等. L-色氨酸的研究进展 [J]. 畜牧与兽医, 2012, 44: 66-69.  
Jiang J, Chen FW, Meng X, et al. The research progress of L-tryptophan [J]. Anim Husbandry Vet Med, 2012, 44: 66-69.
- Yanofsky C. Using studies on tryptophan metabolism to answer basic biological questions [J]. J Biol Chem, 2003, 13: 10858-10878.
- 张瑞霜, 苗晓微, 王红梅. 色氨酸在家禽营养中的研究进展[J]. 饲料博览, 2011, 5: 26-28.  
Zhang RL, Miao XW, Wang HM. The research development of tryptophan in poultry nutrition [J]. J Feed Expo, 2011, 5: 26-28.
- 桑丽花, 王玉梅, 潘成文, 等. L-色氨酸的应用[J]. 河北化工, 2009, 32(10): 14-16.  
Sang LH, Wang YM, Pan CHW, et al. The application of L-tryptophan [J]. J Hebei Chem Ind, 2009, (10): 14-16.
- 钱伯章. 氨基酸饲料添加剂的生产现状与市场分析[J]. 兽药与饲料添加剂, 2005, 10: 1-3.  
Qian BZ. Amino acid feed additives production status and market analysis [J]. J Vet Drugs Feed Addit, 2005, 10:1-3.
- 陈俊峰, 苏丽娜, 王璋, 等. 从土壤中分离 L-色氨酸生产菌株及其高产诱变选育的研究 [J]. 食品与发酵工业, 2007, 33(7): 37-41.  
Chen JF, Su LN, Wang Z, et al. L tryptophan production strain was isolated from soil and its high yield mutagenic breeding research [J]. J Food Ferment Ind, 2007, 33(7): 37-41.
- 赵志军, 陈晟, 吴丹, 等. 微生物发酵法生产 L-色氨酸的代谢工程研究[J]. 中国生物工程杂志, 2011, 31(6): 135-141.

- Zhao ZJ, Chen S, Wu D, *et al*. Metabolic engineering of *L*-tryptophan via microbiological fermentation [J]. *China Biotechnol*, 2011, 31(6): 135–141.
- [9] 王宏龄, 富春江. 国内外主要发酵类氨基酸产品发展现状 [J]. *精细与专用化学品*, 2007, 15(24): 1–5.
- Wang HL, Fu CJ. The domestic and foreign current situation of the development of the main amino acid fermentation products [J]. *J Fine Specialty Chem*, 2007, 15(24): 1–5.
- [10] Bandyopadhyay P, Saha K. Surfactant-induced fluorescent sensor activity enhancement of tryptophan at various pH [J]. *Chem Phys Lett*, 2008, 457(1): 227–231.
- [11] Ikeda M. Amino acid production processes [M]. *Microbial Production of L-Amino Acids*. Springer Berlin Heidelberg, 2003: 1–35.
- [12] 庞敏, 王海磊, 姚建铭, 等. 以吲哚和 DL-丝氨酸为底物固定化酶法合成 *L*-色氨酸[J]. *食品与发酵工业*, 2009, 34(10): 6–9.
- Pang M, Wang HL, Yao JM, *et al*. With indole and DL-serine as substrate immobilized enzymatic synthesis of *L*-tryptophan [J]. *J Food Ferment Ind*, 2009, 34(10): 6–9.
- [13] Shiio I, Sugimoto SI, Kawamura K. Production of *L*-tryptophan by sulfonamide resistant mutants [J]. *Agric Biol Chem*, 1984, 48(8): 2073–2080.
- [14] 张素珍, 官家发, 陈琦. 产 *L*-色氨酸菌株的诱变选育[J]. *微生物学报*, 1984, 24(3): 235–242.
- Zhang SZ, Guan JF, Chen Q. Breeding of producing *L*-tryptophan strains [J]. *Acta Microbiol Sinica*, 1984, 24 (3): 235–242.
- [15] 陈俊峰. *L*-色氨酸高产菌的选育及其发酵条件的优化[D]. 西安: 西北大学, 2007.
- Chen JF. Breeding of *L*-tryptophan producing strains and studies on its fermentation conditions [D]. Xi'an: Northwestern University, 2007
- [16] 张新武, 杨晓明, 廉娜娜, 等. *L*-色氨酸营养缺陷型高产菌株的发酵工艺研究[J]. *食品质量安全检测学报*, 2014, 5(12): 4056–4062
- Zhang XW, Yang XM, Lian NN, *et al*. Research on fermentation process with *L*-tryptophan auxotrophic strains of high-yield [J]. *J Food Saf Qual*, 2014, 5(12): 4056–4062.
- [17] 俞建瑛, 蒋宇, 王善利. 生物化学实验技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 128–131.
- Yu JY, Jiang Y, Wang SL. *Biochemistry experiment technology* [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2005: 128–131.
- [18] 左爱莲. *L*-丝氨酸产生菌的选育及其发酵条件的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2008.
- Zuo AL. Study of bacteria breeding and fermentation conditions of *L*-serine produced [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2008.
- [19] 谭青乔. *L*-色氨酸产生菌选育及其发酵动力学研究[D]. 天津: 天津科技大学, 2001.
- Tan QQ. Study on breeding and fermentation kinetics of bacteria producing *L*-tryptophan [D]. Tianjin: Tianjin University of Science and Technology, 2001.

(责任编辑: 白洪健)

## 作者简介



张新武, 高级工程师, 主要研究方向为食品与工业发酵。

E-mail: smzxw@163.com