

谷氨酸发酵细菌菌种的分离和筛选

錢存柔 黃儀秀 林雅蘭 陈德元*

(北京大学生物学系微生物学实验室)

L-谷氨酸是重要的調味品和医药原料,过去生产主要用蛋白质水解法,尤其是用面筋或豆餅水解法最为常用。我国一向为世界上大量生产谷氨酸的国家之一。1957年起,日本朝井勇宣^[1]及木下祝郎^[2]等氏从各种来源分离出产谷氨酸能力較高的細菌菌株,开始用微生物发酵法进行生产,在节约粮食、化学原料及劳动力等方面起了很大的作用,因而迅速引起各国普遍的重視,为氨基酸生产开辟了一条重要的途径,在工业微生物学上已成为一重要的部門。我們鉴于此項工作,無論在生产上及理論上均有重大的意义,所以于1958年底至1959年初开始进行了菌种筛选工作,从624个样品中,选出了3003-3号及2990-6号等产谷氨酸活性較高的菌株,当时产量均較低,其中2990-6号菌株曾被上海科学院生物化学研究所进行了前培养基与发酵影响的研究,使产量提高很多。例如在研究磷酸盐对发酵影响时,谷氨酸产量曾达3.6克%^[3],說明此菌种有可能提供工业生产之用。本文系对此項筛选的方法及分离和筛选的結果作一报告。

一、实验的方法和結果

(一) 菌种的分离

分离菌种用的样品系取自北京四郊及全国各地的下水道、污泥、菜园土、大田土及动物粪便等各种来源。分离系采用一般的平板稀释法。

分离用的含有机氮培养基的成分如下:葡萄糖2%;蛋白胨1%;牛肉膏0.5%;酵母提取物0.2%;NaCl 0.25%;CaCO₃(另行灭菌)0.5%;洋菜1.5%;pH 7.0。

(二) 选择产生氨基酸菌株的定性試驗

一般筛选均系将分离出的菌株进行搖瓶发酵,直接測定发酵液中谷氨酸的含量,但若进行大量样品的筛选时,搖床数量有限,必将带来困难。为此,我們在筛选时,首先利用长出的菌落連同培养基的一部分一同貼在滤紙上进行扩散,作氨基酸生产的定性試驗后,再作谷氨酸生产的定性試驗,进行粗筛。在粗筛的基础上,再进行搖瓶发酵,进行发酵液中谷氨酸含量的定量測定。

为避免培养基中有机氮成分引起鉴定的困难,故改用无机氮作为培养基的氮源:葡萄糖2%;NH₄Cl 0.3%;MgSO₄·7H₂O 0.05%;KH₂PO₄ 0.1%;CaCO₃(另行灭菌)0.5%;洋菜1.5%;pH 7.0。

将分离出的細菌,从斜面取菌点植在上述培养基做成的平板上,在30°C的条件下培养3天,用无菌打孔器将长好的菌落連同培养基一同取下,貼在普通滤紙上,使其渗透的

本文1962年8月29日收到。

* 参加此項工作的还有北大生物学系微生物学专业1956級的全体同学。

圓点直径約为 1.5—2 厘米时再将培养基块取下,俟滤紙干后,噴以茚三酮显色,另以空白培养基作对照。凡显色較空白为深者,則认为是可以产氨基酸的菌株,并进一步肯定其中是否有谷氨酸产生。

表 1 各种来源分离出的能产谷氨酸的細菌菌株

样品来源及数目	分出菌株数 (株数)	产谷氨酸的菌株数 (株)	百分率 (%)
北京四郊共 471 种	1427	298	20
北京动物园动物粪便共 23 种	207	51	24
全国各地共 130 种	527	33	6
总计样品共 624 种	2161	382	17.6

从各种来源分离出細菌菌株共 2,161 株,其中具有产谷氨酸能力者 382 株,占总菌株数的 17.6%。

(三) 选择产生谷氨酸菌株的定性試驗

将产生氨基酸的菌株,用上述同样方法,在 Whatman 1 号滤紙上进行渗透,并以标准谷氨酸作对照,用电泳的方法进行定性試驗,所得結果如表 2。

表 2 各菌株产生不同氨基酸的百分率

总菌株数	产 谷 氨 酸		产 天 門 冬 氨 酸		产 丙 氨 酸	
	菌 株 数	%	菌 株 数	%	菌 株 数	%
1427	298	20	130	9	159	11

由此可見,自然界中分离出的菌株很多具有产生氨基酸的能力,而以产谷氨酸者最多,产丙氨酸者次之,产天門冬氨酸者又次之。

(四) 选择高产量的谷氨酸产生菌株的定量試驗

經过谷氨酸产生的定性試驗后,将肯定有谷氨酸产生的菌株进行搖瓶发酵,取发酵

表 3 各个不同来源的菌株对谷氨酸產量的比較

(第一次)

菌 株 号	来 源	发酵液中的含量(克/100 毫升)
2530	北京市区下水道污泥	0.012
26025	北京朝阳門外田間土壤	0.020
2990-6	北京体育学院外水沟污泥	0.015

(第二次)

菌 株 号	来 源	发酵液中的含量(克/100 毫升)
3055-2	徐州河底污泥	0.17
3003-5	南京菜园土	0.10
3005-1	青島路面表土	0.08
3003-3	南京菜园土	0.08
5005	陝西馬粪	0.06
5001-21	西安渗井污泥	0.05

液做定量試驗,选择产生谷氨酸高度活性的菌株。发酵用的培养基与定性試驗的成分相同,但不加洋菜,做成液体培养基。一般在容量为 250 毫升的錐形瓶內装 40 毫升培养液, 30°C 振荡培养 4—5 天,在一定時間內取出发酵液进行电泳試驗,以 15% 的丙酮溶液脫色,然后在光电比色計中进行比色測定,从标准曲綫上求出谷氨酸的实际含量。

定量試驗分三批进行。第一批自北京四郊采样,在分出的菌株中选出产量較高者有 26025, 2990-6 及 2530 等三株;第二批自北京动物园取得的粪便中虽然分出产谷氨酸菌株的百分率較大,但产量却很低;第三批自全国各地取来的样品分出的菌株中选出 3055-2, 3003-5 及 3003-3 等 6 株。

从上表 3 結果看来,污泥及肥沃的田园土壤中分离出的菌株具有較高的产谷氨酸的能力。

(五) 各个菌株在不同培养基中产谷氨酸的比較

为了統一各个菌株在发酵时的条件,并进一步研究不同成分的培养基对产生谷氨酸的影响,将前面选出的产量較高的菌株分别在四种不同成分的培养基中进行发酵,并将上海生化所贈送的一管“二联”菌株,一同进行比較。

表 4 篩选用不同成分培养基的組成

培养基代号 成分(克/ 100毫升)	V ₁	CSL	合 ₃	合 ₅
葡萄糖	3	3	3	5
NH ₄ Cl	0.5	0.5	0.5	0.5
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.05	0.05	0.05	0.05
K ₂ HPO ₄	0.015	—	0.1	0.1
硫胺素	200微克	—	—	—
花生油	12滴	—	—	—
玉米浆	—	0.1	—	—
CaCO ₃	1	1	0.5	0.5
pH	7.2	7.2	7.2	7.2

第一次篩选結果,发现在多数情况下, 3003-3 及 2990-6 号菌株的产量均較高,其中以在合₃号培养基中的产量最高(表 5)。

为了进一步确定高产菌株起見,又进行了第二次的篩选試驗,并分別于 69 小时及 100 小时各测发酵液一次,所得結果見表 6。

上列結果可以看出,上海“二联”菌株在 V₁ 及 CSL 等含維生素及玉米浆的培养基中产量較高,但形成的谷氨酸在后期有被消耗的趋势。3003-3 号及 2990-6 号菌株在合成培养基中产量最高,但形成的谷氨酸积累在发酵液中比較稳定,后期沒有被消耗的趋势(表 6)。

表 5 各菌株在不同培养基中產谷氨酸能力的比較 (第一次)

菌 号	培养基代号 消光系数	V ₁		CSL		合 ₃		合 ₅	
二 联		0.005		0.040		0.082		0.014	
3003-3		0.013		0.010		0.135		0.035	
2990-6		0.007		0.036		0.041		0.006	
26025-1		0.005		0.010		0.002		0	
2530-3		0.005		0		0		0.025	
3003-5		0.011		0.005		0.028		0.030	
5001-21		0.004		0.006		0.010		0.004	
5005		0.013		0.008		0.015		0.010	
3055-2		0.005		0		0.041		0.055	
空 白		0.005							

表 6 各菌株在不同培养基中產谷氨酸能力的比較 (第二次)

菌 号	培养基 谷氨酸 (克/100毫升)	培养基 培养时间 (小时)	V ₁		CSL		合 ₃		合 ₅	
			69	100	69	100	69	100	69	100
			二 联	0.020	0.010	0.085	0.080	0.074	0.175	0.020
3003-3	0.010	0.026	0.010	0.020	0.260	0.305	0.010	0.070		
2990-6	0.010	0.014	—	0.062	0.130	0.082	0.056	—		

二、結 論

(一) 从北京四郊及全国各地采集的样品 624 种, 分出細菌菌株 2161 株, 其中具有产谷氨酸能力者約占 17.6%。

(二) 样品来源以污泥及肥沃的田园土壤中分离出的菌株具有产谷氨酸較高的活性。

(三) 篩选結果以 3003-3 号及 2990-6 号菌株在合成培养基合₃号中产生的谷氨酸最多, 并且在发酵后期沒有被菌本身消耗的趋势。

参 考 文 献

- [1] 朝井勇宣等: *レーグルタミン酸发酵に関する研究*, 发酵协会志, 15:371—379, 1957.
- [2] 木下祝郎等: *グルタミン酸发酵に関する研究*, 发酵协会志, 16:1—11, 1958.
- [3] 周光宇等: *前培养基与谷氨酸发酵*, 生物化学与生物物理学报, 1:124—135, 1961.

THE ISOLATION AND SCREENING OF BACTERIA FOR *L*-GLUTAMIC ACID FERMENTATION

CHIEN TSWEN-ROU, HUANG YI-SHIU, LIN ZE-LAN AND CHEN DEH-YUAN

(Laboratory of Microbiology, Department of Biology, Peking University)

The present work was carried out in our laboratory from the end of 1958 to the Spring of 1959. 580 samples of different kinds of sewage disposal, polluted water, sludge, fertile soils and animal faeces were collected from different parts of our country, particularly from the suburbs of Peking. From these 2,161 strains of bacteria were isolated, among which 382 strains, corresponding to about 17.6% of the total strains, could produce *L*-glutamic acid by the fermentation process. By means of a series of qualitative and quantitative tests, it was found that strains No. 3003—3 and 2990—6 produced the largest amount of glutamic acid.