

产 L-谷氨酸细菌 AS 1.542 菌株的研究

I. AS 1.542 菌株的鉴定

陈 琦 李 玲 阁

(中国科学院微生物研究所, 北京)

从广州某酿酒厂的土壤中分离出一株革兰氏阳性、无芽孢的产 L-谷氨酸细菌。培养在普通肉汁琼脂平板上, 菌落圆形、扁平、近草黄色、表面湿润、浑暗细粒状、无光泽、边缘半透明、钝齿状。生物素是必需生长因素。除由葡萄糖、果糖、甘露糖、麦芽糖、蔗糖、水杨苷、七叶灵及海藻糖产酸外, 还能由糊精、肌醇及纤维二糖产酸, 但均不产气。通气培养在含葡萄糖或醋酸和尿素或铵盐的适宜培养基中能积累大量 L-谷氨酸。经鉴定认为是一个新种, 定名为钝齿棒状杆菌 AS 1.542 (*Corynebacterium crenatum* n. sp. AS 1.542)。

我国广大工人和科学工作者在毛主席革命路线指引下, 贯彻执行**独立自主, 自力更生**的方针, 使我国谷氨酸发酵的研究和工业生产取得了很大成绩, 不断有所创新, 蓬勃向前发展。

我们分离筛选到的 AS 1.542 号菌株, 于 1966 年已在生产上推广应用。它既不同于我国谷氨酸发酵工业中应用的北京棒状杆菌 (*Corynebacterium pekinense*)^[1], 又不同于国外已发表的谷氨酸菌^[2-5]。经鉴定认为属于棒杆菌属 (*Corynebacterium*) 的一个新种。本文报道它的分类鉴定结果。

试验和结果

AS 1.542 菌分离自广州某酒厂土壤。菌株是在普通肉汁琼脂斜面培养基上, 30℃ 下培养 24 小时后, 于 4℃ 冰箱中保存备用。试验菌株, 是在 30℃ 于上述培养基上培养 24 小时的新鲜培养物。

鉴定系按照《微生物学方法手册》^[6] 和《细菌属的鉴定指南》^[7] 两书中所述方法, 并依据伯吉 (Bergey) 氏^[8]《细菌学鉴定手

册》(第七版)。

一、形态特征

在普通牛肉汁琼脂斜面上培养不同时间的培养物, 分别用光学显微镜和电子显微镜观察。24 和 48 小时或延长培养时间, 细菌细胞通常为短杆至棒状, 有的微呈弯曲状、两端钝圆、未见分枝; 细胞排列为单个、成对及“V”字形; 折断分裂; 细胞大小为 (0.7—0.9) × (1.0—3.4) 微米。培养 5 小时的细胞较长, 微呈弯曲状, 并有“原始”分枝细胞, 延长培养并不同时断裂(见图)。

革兰氏染色细胞呈阳性反应, 培养过程中不发生革兰氏染色反应变化。异染颗粒染色法 (Albert's 法和美蓝法) 显示细胞内次极端有明显的异染颗粒。用胞壁染色法观察到细胞内有明显的横隔 1—3 个或更多。穿刺培养和显微镜下悬滴检查均未发现有运动能力。不形成芽孢。抗酸性染色为负反应。

本文 1974 年 12 月 9 日收到。

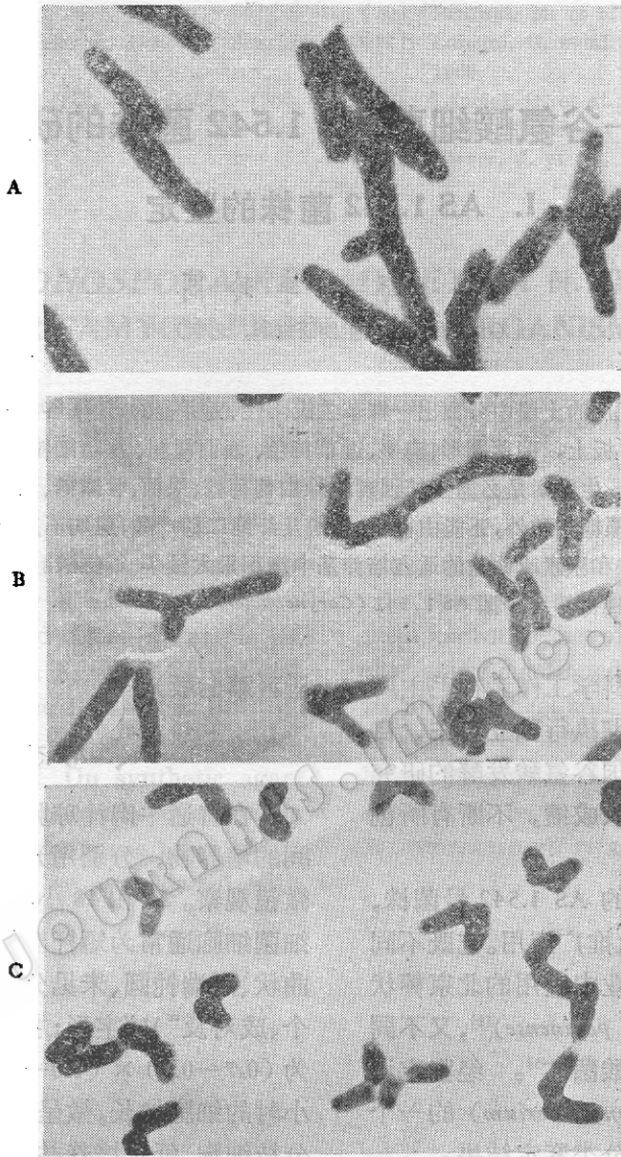


图1 钝齿棒状杆菌 AS 1.542(*Corynebacterium crenatum* n. sp. AS 1.542)的细胞形态

培养基: 普通牛肉汁琼脂斜面 培养时间: A. 培养3小时($\times 5000$)
B. 培养5小时($\times 3000$) C. 培养24小时($\times 3500$)

二、培养特征

1. 普通牛肉汁琼脂斜面: 中间划直线培养呈中度生长, 菌苔线状、近草黄色(1a55')*、表面湿润、浑暗细粒状、无光泽、边缘较薄、半透明、钝齿状、无粘性、不产生水溶性色素。

2. 普通牛肉汁琼脂平板: 菌落圆形、近草黄色(1a55')*。培养48小时, 其直径约为3—5毫米, 扁平、表面湿润、浑暗细粒状、无光泽, 边缘钝齿状、较薄。呈半透明, 无粘性, 不产生水溶性色素。

* 中国科学院编译出版委员会(名词室): 《色谱》, 第4—5页, 科学出版社, 1957。

3. 普通牛肉汁液体培养: 混浊, 表面有薄菌膜, 管底有较多的沉渣。

4. 普通牛肉汁琼脂柱穿刺: 表面及沿穿刺线生长, 无扩展现象。

5. 明胶柱穿刺培养: 表面及沿穿刺线生长, 不液化明胶。

6. 马铃薯块: 培养至 3 周末见生长。

三、生理特性

1. 对氧的要求: 穿刺接种 0.4% 琼脂蛋白胨葡萄糖半固体培养基中, 并加入无菌凡士林隔绝空气, 30℃ 培养 24 小时, 强烈发酵产酸。

2. 生长温度: 在 20—37℃ 下生长良好, 以 30℃ 生长最好, 39℃ 时生长极弱, 42℃ 未见生长。菌株在 46、50、54、55 及 60℃ 下处理 10 分钟, 迅速冷却后, 置于 30℃ 保温箱中培养 72 小时, 结果表明, 该菌在 54℃ 以上处理 10 分钟已全部死亡。在脱脂牛奶中 72℃ 热处理 15 分钟, 也不能生长。

3. pH 对生长的影响: 用普通肉汁培养基分别调节酸碱值至 pH 4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0 及 10.0, 接种培养物后, 30℃ 下培养 3—5 天。pH 6.0—9.0 生长良好, pH 10.0 生长稍弱, pH 5—4 已不能生长。

4. 还原硝酸盐: 反应强烈。

5. 石蕊牛奶培养: 七天后产碱。

6. 改良的弗氏 (Frazier's) 明胶平板培养: 不水解明胶。

7. 不水解酪蛋白。

8. 不产生胨基质。

9. 产生 H₂S。

10. 不水解油脂。

11. 不利用液体石蜡作碳源。

12. 淀粉水解: 在含 0.2% 可溶性淀粉的普通牛肉汁培养基中 (固体平板法和液体法) 培养 2 周, 能微弱水解淀粉。

13. 不分解纤维素。

14. V. P 试验: 阴性反应。

15. M. R. 试验: 阳性反应。

16. 生长因素试验: 在含有生物素的 Kuser's 培养基上生长良好。要求生物素作为必需生长因素。

17. 过氧化氢酶试验: 强阳性反应。

18. 脲酶试验: 强阳性反应。

19. 还原美蓝染料的能力强烈。

20. 耐盐试验: 在含 7.5% 氯化钠的普通牛肉汁琼脂培养基上, 生长良好, 如氯化钠增至 10% 时则生长较弱。

21. 产酸物质的测定: 由葡萄糖、果糖、甘露糖、麦芽糖、蔗糖、水杨苷及七叶灵迅速产酸, 而海藻糖、糊精及肌醇培养至 2 天后显著产酸, 纤维二糖弱产酸, 但均不产气。阿拉伯糖、木糖、乳糖、半乳糖、赤藓糖、棉子糖、山梨糖、鼠李糖、蜜二糖、松三糖、菊糖、肝糖、淀粉、山梨醇、甘露醇、卫矛醇、阿东糖醇、甘油及甲基葡萄糖苷均不产酸。

22. 糖同化试验: 在合成培养基中分别加入 1% 的上述各种糖、醇及苷类。基础培养基组成是: (NH₄)₂SO₄ 0.2%, K₂HPO₄ 0.1%, MgSO₄·7H₂O 0.04%, FeSO₄·7H₂O 0.002%, MnSO₄·4H₂O 0.002%, 硫胺素 300 微克/升, 生物素 30 微克/升, 水洗洋菜 2.0%。用平板划线法及生长图形法, 试验了该菌对上述各种糖类的同化能力。30℃ 下培养 2 周的结果表明: 除上述产酸的各种糖类能被同化外, 在不能产酸的糖类中, 也能同化甘露醇、甘油和半乳糖, 但能力较弱。

23. 有机酸的利用: 基础培养基同上 (不加糖类), 分别加入不同有机酸 0.3—0.4%, 以平板划线法接种, 30℃ 下培养至 10 天, 结果见表 1。

24. 对尿素的耐力: 在含 2.5% 尿素的

表1 AS 1.542号菌株利用有机酸作碳源生长情况

有机酸种类	葡萄糖酸	乳酸	醋酸	酒石酸	柠檬酸	顺乌头酸	延胡索酸	苹果酸	丙戊二酸	琥珀酸
生长情况	+++	++	++	+	+++	+	++	+	+	±

++, +++生长良好; +, 生长较弱;
±, 生长极弱。

普通牛肉汁琼脂培养基上生长良好, 含3.0%尿素时生长稍弱。含尿素3.5—4.0%时显著抑制生长。

25. 噬菌体侵染试验: 分别采用北京棒状杆菌 AS 1.299 (*Corynebacterium pekinense* AS 1.299), 噬菌体 A₁, A₂, A₃ 和 AS 1.542 菌株的噬菌体 B₂₇₋₁, B₂₇₋₂, B₂₃₆ 及 B₂₇₁, 在半固体营养琼脂平板上检查对表2中产L-谷氨酸菌株的侵染力, 试验表明, AS 1.542 与 AS 1.299 的噬菌体相互不能侵染。

表2 噬菌体对不同产L-谷氨酸菌株的侵染性

噬菌体	A ₁	A ₂	A ₃	B ₂₇₋₁	B ₂₇₋₂	B ₂₃₆	B ₂₇₁
AS 1.299	+	+	+	-	-	-	-
A ₁₋₁₂	+	+	+	-	-	-	-
A _{1-12.5}	+	+	+	-	-	-	-
AS 1.542	-	-	-	+	+	+	+

+: 出现溶菌斑; -: 未出现溶菌斑。

讨 论

AS 1.542 菌株细胞形态为短杆至棒状, 稍弯曲, “折断”分裂, 单个、成对及“V”形排列。在培养过程中细胞形态有变化, 幼龄时出现“原始”分枝现象, 革兰氏染色阳性; 美蓝染色细胞内有异染颗粒; 胞壁染色细胞内呈明显的横隔, 无抗酸性, 不产生芽孢, 过氧化氢酶强阳性反应, 在普通肉汁琼脂培养基上培养时明显生长, 细胞不出。现同时断裂现象根据这些性状, 对照伯吉

氏细菌学鉴定手册中的描述^[8], AS 1.542 菌株应列入棒状杆菌科(Corynebacteriaceae)。

棒状杆菌科中记载了6个属, 其中李氏杆菌属(*Listeria*)及丹毒丝菌属(*Erysipelothrix*)是一些动物致病菌; 纤维单孢杆菌属(*Cellulomonas*)具有分解纤维素的特性; 微杆菌属(*Microbacterium*)为耐热腐生菌; 节杆菌属(*Arthrobacter*)在幼龄时细胞呈多形态, 革兰氏染色呈阴性反应, 但延缓培养至1天或几天后变为球形细胞, 革兰氏染色阳性反应。AS 1.542 菌株显然与以上5个属不符, 而与棒状杆菌属(*Corynebacterium*)的性状比较一致, 故归入棒状杆菌属。

在伯吉氏细菌学鉴定手册中, 棒状杆菌属内记载的各个种分为两大类: 一类是多为动植物致病菌; 另一类为厌气至微嗜氧类型的细菌。将 AS 1.542 菌株与上述两类细菌中的各个种的诸特性逐一比较, 均不同于这些种。

在近些年报的棒状杆菌属产L-谷氨酸活性高的一些种中, AS 1.542 菌株显然不同于专性利用醋酸^[9,10]和正构烷烃^[11-13]发酵产生L-谷氨酸的一些种; 在利用糖类生产L-谷氨酸的棒状杆菌属中只有木下等报导的谷氨酸棒状杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)的某菌株^[2,14]和 Lee 等报导的 *Corynebacterium callumace*^[3] 与 AS 1.542 菌株比较接近。但 AS 1.542 菌株具有由糊精、肌醇和纤维二糖产酸的能力, 这在产L-谷氨酸细菌的分类上应是值得注意的问题, 故 AS 1.542 菌株不同于上述两菌。同时, AS 1.542 菌株具有由水杨苷和七叶灵强的产酸能力和幼龄细胞出现“原始”分枝现象, 亦不同于北京棒状杆菌 AS 1.299。

此外, 噬菌体侵染试验证明, AS 1.542 菌株与 AS 1.299 菌株各自的噬菌体相互不

能侵染,进一步判断它们并不相近。

结 论

从以上的鉴定结果看, AS 1.542 产 L-谷氨酸菌株不同于伯吉氏细菌学鉴定手册中棒状杆菌属内所描述的各个种,也区别于近些年报告的产 L-谷氨酸的棒状杆菌。因在普通肉汁琼脂平板上的菌落形态为圆形、近草黄色、表面湿润、浑暗细粒状、无光泽、边缘钝齿状,具有由糊精、肌醇、水杨苷、七叶灵和纤维二糖产酸的特性,故认为是一个新种,定名为钝齿棒状杆菌 AS 1.542 (*Corynebacterium crenatum* n. sp. AS 1.542)。

参 考 资 料

- [1] 陈 琦、张震元、李玲阁: 微生物学报 13: 1—6, 1973。
- [2] Kinoshita, S. et al., *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan*, 22: 176—185, 1958.
- [3] Lee, W. H. & Good, R. C.: U. S. patent, 3087863, 1963.
- [4] Distillers Co. Ltd.: British patent, 996906, 1965.
- [5] 高桥秀臣ら: *Amino Acid and Nucleic Acid*, 15: 64—75, 1967.
- [6] Conn, H. J. Ed.: *Manual of Microbiological Methods*, The Society of American Bacteriologists Committee on Bacteriological Technic, New York, McGraw-Hill, p. 140—166, 1957.
- [7] Skerman, V. B. D.: *A Guide to the Identification of the Genera of Bacteria*, Baltimore, Williams and Wilkins, p. 111—112, 167—206, 1957.
- [8] Breed, R. S.: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 7th ed., London, Bailliere, Tindall Cox, Ltd., p. 578—612, 1957.
- [9] Kyowa Hakko Kogyo Co. Ltd.: Brevet D'invention, No. 1424809, 1966.
- [10] Harada, T. et al.: *J. Ferment. Technol.*, 46: 169—176, 1968.
- [11] Yamada, K. et al.: *Agr. Biol. Chem.*, 27: 773—783, 1963.
- [12] 井口喬ウ: 日农化, 40: 26—33, 1966.
- [13] 中尾义雄ら: *Amino Acid and Nucleic Acid*, 25: 1—7, 1972.
- [14] Abe, S. et al.: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 13: 279—301, 1967.

STUDIES ON L-GLUTAMIC ACID PRODUCING BACTERIA AS 1.542

I. IDENTIFICATION OF STRAIN AS 1.542

CHEN QI LI LING-GE

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Peking)

A L-glutamic acid producing bacterium, AS 1.542, was isolated from a soil sample from a brewery in Kwangchow, and designated as *Corynebacterium crenatum* n. sp. The description is presented as follows.

Rods, 0.7—0.9 × 1.0—3.4 microns, unbranched, with round ends, clubshaped, straight or slightly curved, in "V" shape arrangement. Non-motile. Non-sporulating. Gram-positive, not acid-fast, with metachromatic granules and septa. Young cells of a few hours' incubation are elongated and with some rudimentary branches. No fragmentation.

Nutrient agar slant: Growth moderate, filiform, dull, non-glistening, pale yellow, no soluble pigment produced.

Nutrient agar colonies: Circular, flat, dull, non-glistening, margin thin, translucent with *crenated* edge, not sticky.

Nutrient broth: Turbid, with thin pellicle and sediments.

Gelatin: No liquefaction.

Casein not hydrolyzed.

Litmus milk: Alkaline within 7 days gradually.

Potato: No growth.

Starch hydrolyzed weakly.

Cellulose not decomposed.

Acid but no gas from glucose, fructose, mannose, maltose, sucrose, trehalose, salicin, aesculin, dextrin, and inositol;

slight acid from cellobiose. Neither acid nor gas is formed from arabinose, xylose, galactose, lactose, erythritol, rhamnose, raffinose, sorbose, melibiose, melizitose, sorbitol, mannitol, dulcitol, adonitol, glycerol, inulin, glycogen, starch and α -methyl-glycoside, but mannitol, galactose and glycerol are assimilated without acid production. Succinate is weakly utilized among the organic acids tested.

n-Paraffin not utilized.

Fats not hydrolyzed.

Voges-Proskauer reaction negative.

Methyl red test positive.

Hydrogen sulphide produced.

Indol not produced.

Catalase and urease positive.

Abundant growth on the nutrient agar containing 2.5% urea or 7.5% sodium chloride.

Biotin is essential for growth.

Inorganic nitrogen utilized.

Methylene blue reduced.

Facultative anaerobic.

Range of pH for growth: pH 6—9.

Grows well at 20°—37°C. Optimum temperature 30°C. Scant growth at 39°C.

Thermal death point 54°C. for 10 minutes. Non-resistant at 72°C. for 15 minutes in skim milk.

Phage typing: No infection with the phage of *Corynebacterium pekinense* AS 1.299.