

张龙涛, 李昂, 曹宜, 等. 发酵产生 5-氨基乙酰丙酸的科氏葡萄球菌的筛选 [J]. 福建农业学报, 2012, 27 (9): 1016-1019.

ZHANG L-T, LI A, CAO Y, et al. Screening of *Staphylococcus cohnii* for Bioproduction of 5-aminolevulinic Acid [J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2012, 27 (9): 1016-1019.

发酵产生 5-氨基乙酰丙酸的科氏葡萄球菌的筛选

张龙涛¹, 李 昂², 曹 宜³, 朱育菁³, 缪伏荣¹, 冯玉兰¹, 刘 波³

(1. 福建省农业科学院畜牧兽医研究所, 福建 福州 350013; 2. 中国石油大学化工学院, 山东 青岛 266000; 3. 福建省农业科学院农业生物资源研究所, 福建 福州 350003)

摘要: 以发酵产生 5-氨基乙酰丙酸 (ALA) 为目标, 从自然界进行菌株的随机筛选, 结果得到 4 株可生产 5-氨基乙酰丙酸的细菌 LA-2、LA-4、LA-7、LA-10。摇瓶发酵 LA-10 产量最高, 达 $6.88 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。在常规生理生化特性测定基础上, 结合 16S rDNA 序列分析, LA-10 鉴定为科氏葡萄球菌 (*Staphylococcus cohnii*), 命名为科氏葡萄球菌 LA-10。

关键词: 5-氨基乙酰丙酸; 科氏葡萄球菌; 筛选; 发酵

中图分类号: Q 945

文献标识码: A

Screening of *Staphylococcus cohnii* for Bioproduction of 5-aminolevulinic Acid

ZHANG Long-tao¹, LI Ang², CAO Yi³, ZHU Yu-jing³, MIAO Fu-rong¹,
FENG Yu-lan¹, LIU Bo³

(1. Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou, Fujian 350013, China; 2. School of Chemical Engineering, China University of Petroleum, Qingdao, Shandong 266000, China; 3. Agricultural Bio-resource Research Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou, Fujian 350003, China)

Abstract: Four strains named LA-2, LA-4, LA-7 and LA-10 were distinguished by random screening of strains for bioproduction of 5-aminolevulinic acid. After shaking flask fermentation, the highest yield was $6.88 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ from LA-10. The strain was identified as *Staphylococcus cohnii* based on the morphological, physiological, biochemical characteristics, and 16S rDNA analysis. It was named *Staphylococcus cohnii* LA-10.

Key words: 5-aminolevulinic acid; *Staphylococcus cohnii*; screening; fermentation

5-氨基乙酰丙酸 (5-aminolevulinic acid, 简写 ALA, 下同) 是生物体内合成四吡咯化合物 (卟啉、叶绿素、血红素和维生素 B12) 生物合成的前体物质, 是生物调节合成四吡咯物质的关键中间物, 广泛存在于微生物、植物和动物细胞中^[1]。ALA 主要用于作为一种环境无残留的除草剂^[2]和杀虫剂^[3]、植物生长促进剂^[4]及作为第二代光动力学药物用于治疗癌症和其他疾病^[5-6]。目前 ALA 主要使用化学法合成, 其具有合成步骤繁琐、副产

物毒性大、得率较低等突出问题^[7]。微生物合成 ALA 工艺简单, 产率高, 具有工业化生产的潜力, 因此近年来受到了广泛关注。

用微生物法制备 ALA 的研究已经有 20 余年的历史, 但迄今为止, 仅有为数不多的几种微生物被发现具有生物法制备 ALA 的功能, 野生菌有 *Rhodobacter sphaeroides*^[8]、*Rhodovulum* sp.^[9]、*Rhodopseudomonas palustris*^[10]、*Propionibacterium acidipropionici*^[11]、*Chlorella* sp.^[12]、*Chlorella*

收稿日期: 2012-07-07 初稿; 2012-07-26 修改稿

作者简介: 张龙涛 (1979-), 男, 博士, 副研究员, 主要从事生物活性物质开发研究

通讯作者: 冯玉兰 (1941-), 女, 研究员, 主要从事动物营养与饲料资源开发研究 (E-mail: faasfyl@163.com)

刘波 (1957-), 男, 研究员, 博士, 主要从事生物技术研究 (E-mail: fzliubo@163.com)

基金项目: 福建省科技计划项目——省属公益类科研院所基本科研专项 (2010R1025-4); 福建省自然科学基金项目 (2010J01106; 福

建省科技计划重大专项 (2010NZ0002-3)

regularis^[13], 以及分别从 *Bradyrhizobium japonicum*^[14]、*Rhodobacter sphaeroides*^[15]、*Agrobacterium radiobacter*^[16]、*Rhodoblastus acidophilus*^[17] 中获得ALA合成酶基因 *hemA*, 构建转基因载体, 通过大肠杆菌表达ALA合成酶, 制备ALA。

自然界微生物资源丰富, 本研究尝试筛选可产ALA的细菌, 为进一步研究生物法制备ALA提供新材料。

1 材料与方法

1.1 土壤样品采集

30份土壤样品2008年9~10月采自福州各地池塘淤泥、猪舍垫料等。

1.2 培养基

分离培养基: 酵母浸膏5 g·L⁻¹, 胰蛋白胨10 g·L⁻¹, NaCl 5 g·L⁻¹, 琼脂1.8 g·L⁻¹; 初始pH值6.0; 50 μg·mL⁻¹制霉菌素。

保存培养基: 胰蛋白胨10 g·L⁻¹、酵母浸膏4 g·L⁻¹、葡萄糖2 g·L⁻¹、硫酸镁1 g·L⁻¹、磷酸氢二钠1 g·L⁻¹、琼脂1.8 g·L⁻¹。

发酵培养基: 葡萄糖5 g·L⁻¹、酵母浸膏3 g·L⁻¹、氯化钠1 g·L⁻¹、磷酸氢二钠1 g·L⁻¹、磷酸二氢钠1 g·L⁻¹、硫酸镁1 g·L⁻¹、初始pH值6.0。

1.3 主要试剂

ALA盐酸盐标准品(>97%, sigma公司), 其余试剂均为分析纯。

1.4 菌株分离筛选方法

将取得的各种土样各称取约10 g, 分别悬浮于0.9%NaCl溶液中, 用8层纱布过滤去除较大的杂质颗粒, 接种至分离培养基及平板, 30°C培养24 h, 随机挑选不同菌落形态单菌落, LB平板划线二次培养, 得到单菌落后, 接种发酵培养基进行摇瓶发酵, 发酵液离心取上清, 分光光度法测定ALA含量。

1.5 分光光度法测定ALA含量

1.5.1 ALA标准曲线的制备

(1) 精确配制浓度为1、2、4、5、8、10 mg·L⁻¹的ALA标准溶液。

(2) 在10 mL具盖的离心管中加入2 mL不同浓度的标准ALA溶液、0.5 mL乙酰丙酮和1 mL的乙酸钠缓冲液, 沸水浴15 min, 冷却至室温后, 加Ehrlich's显色剂2 mL显色30 min, 以水为空白测554 nm处的吸光度^[18]。

(3) 以ALA浓度为纵坐标, A_{554} 吸光值为横

坐标, 作标准曲线。

1.5.2 样品的测定 取待测液2 mL, 依次加入1 mL浓度为2 mol·L⁻¹的乙酸钠缓冲液(pH=4.6)和0.5 mL乙酰丙酮, 沸水浴15 min。冷却至室温后, 取2 mL反应液与2 mL Ehrlich's试剂反应, 30 min后使用分光光度计(以水为空白), 测554 nm处的吸光值。根据标准曲线计算浓度, 再乘以稀释倍数, 即可得到样品中ALA的浓度。

1.6 16S rDNA序列的测定

所用的引物(16s1/16s2)由上海博尚生物技术有限公司合成。

16s1: 5'-GAGTTGATCCTGGCTCAG -3'

16s2: 5'-AGAAAGGAGGTGATCCAGCC -3'

反应体系: 取DNA模板5 ng, STR缓冲液2 μL, 引物各100 ng, dNTPs 2 μL, Taq DNA聚合酶0.1 μL, 补无菌水至20 μL。温度循环参数: 94°C预变性2 min, 然后94°C 1 min, 55°C退火1 min, 72°C延伸1 min, 共30个循环, 72°C延伸5 min。用Qiagen胶回收试剂盒纯化PCR扩增产物后0.7% (w/v)琼脂糖凝胶检测, DNA回收试剂盒回收目标片断。16S rDNA测序由大连宝生物工程有限公司完成。

1.7 分离菌株的形态学特征和碳源利用试验

将单菌落接种到LB平板上, 于30°C培养24 h, 记录其菌落形态, 显微镜观察菌体形态及大小。使用API STAPH鉴定系统对菌株进行生理生化特性测定。

2 结果与分析

2.1 筛选结果

从二次划线平板上随机挑取不同菌落形态的菌株50个, 接种发酵培养基, 250 mL三角瓶装液量50 mL, 30°C, 150 r·min⁻¹摇床培养。12 h开始, 每3 h对发酵液取样, 离心上清测定ALA含量。结果如表1所示, 经过初筛, 共分离获得4株能产ALA的细菌。发酵液中ALA含量达到: 1.56~6.88 mg·L⁻¹, 其中LA-10最高, 21 h发酵液中ALA浓度达到6.88 mg·L⁻¹。

2.2 菌株LA-10的生理生化特征

该菌革兰氏染色呈阳性, 在LB平板上为中等大小, 湿润, 乳白色。生理生化特性测定结果(表2)表明, LA-10对D-葡萄糖、D-果糖、麦芽糖、乳糖、D-海藻糖、D-甘露醇、β-萘酚-酸性磷酸盐、VP试验均为阳性, 对D-甘露糖、木醇、D-蜜二糖、棉子糖、木糖、蔗糖、α-甲基-D-葡萄糖甙、

N-乙酰-葡萄糖胺、硝酸钾、精氨酸、尿素均为阴性。LA-10 基本符合科氏葡萄球菌的生理生化特征^[19-20]

表 1 各菌株 ALA 生产能力

Table 1 Bioproduction capacity for ALA of screened strains

菌株编号	ALA 峰值浓度/ (mg · L ⁻¹)	达峰值浓度 时间/h
LA-02	1.56	20
LA-04	3.99	36
LA-07	2.79	30
LA-10	6.88	21

表 2 菌株 LA-10 生理生化特性测定结果

Table 2 Physiological and biochemical characters of LA-10

检测项目	LA-10
D-葡萄糖	+
D-果糖	+
D-甘露糖	-
麦芽糖	+
乳糖	+
D-海藻糖	+
D-甘露醇	+
木醇	-
D-蜜二糖	-
棉子糖	-
木糖	-
蔗糖	-
α-甲基-D-葡萄糖	-
N-乙酰-葡萄糖胺	-
KNO ₃	-
β-奈酚-酸性磷酸盐	+
丙酮酸钠	+
精氨酸	-
脲素	-

注：“+”表示阳性反应，“-”表示阴性反应。

2.3 菌株 LA-10 的 16S rDNA 序列测定

LA-10 的 16S rDNA 测序结果经拼接后提交 GenBank，全长 1 488 bp，登录号 JX455744。序列 BLAST 结果表明，LA-10 与 *Staphylococcus cohnii* 同源性最高，与 *Staphylococcus cohnii* CV38 16S rDNA 序列同源性达 99%。

依据形态学及生理生化特性，并结合 16S rDNA 序列比对结果，可将 LA-10 初步鉴定为科

氏葡萄球菌 (*Staphylococcus cohnii*)，拟命名为 *Staphylococcus cohnii* LA-10。

3 讨论与结论

ALA 作为一种具有强大生物活性的功能性物质，生物法制备将是其实现广泛应用的主要途径。本试验筛选得到可发酵产生 ALA 的科氏葡萄球菌 LA-10，为生物法制备 ALA 提供了新材料。目前未见关于科氏葡萄球菌生产 ALA 的相关报道。

上述菌株中，已有报道的最高产量，野生菌为 *Rhodobacter sphaeroides*^[21] 突变株 CR720，达到 27.5 mmol · L⁻¹，约 3.6 g · L⁻¹；转基因菌为从 *Agrobacterium radiobacter* zju-0121^[16] 获得 *hemA*，构建重组表达菌 Rosetta (DE3) (*hemA*)，ALA 产量达 56 m mol · L⁻¹，约 7.34 g · L⁻¹。本研究所筛选得的 LA-10，最高产量达到 6.88 mg · L⁻¹。作为利用一种新发现细菌——科氏葡萄球菌制备 ALA 的研究，本试验仅是一个开端，对于 LA-10 生产 ALA 的机理、发酵条件优化、基因克隆表达等都有待更进一步的研究。

参考文献：

- [1] 朱章玉, 俞吉安, 林新志, 等. 光合细菌的研究及应用 [M]. 上海: 上海交通大学出版社, 1991: 28-189.
- [2] REBEIZ, CONSTANTIN A. Photodynamic herbicides [P]. US : 5 127938, 1992-07-07.
- [3] SASIKALA C, RAMANA C V, RAO P R. 5-aminolevulinic Acid: A Potential Herbicide Insecticide from Microorganisms [J]. Biotechnology progress, 1994, 10 (5): 451-459.
- [4] HOTTA Y, K W. Plant growth-regulating activities of 5-aminolevulinic acid [J]. Chem Regul Plants, 1999, 34: 85-96.
- [5] FUKUDA H, CASAS A, BATLLE A. Aminolevulinic acid: from its unique biological function to its star role in photodynamic therapy [J]. The international journal of biochemistry & cell biology, 2005, 37 (2): 272-276.
- [6] MOAN J, PENG Q. An outline of the hundred-year history of PDT [J]. Anticancer research, 2003, 23 (5A): 3591.
- [7] 付士凯, 李伟华, 时建刚. 5-氨基乙酰丙酸的应用及合成方法 [J]. 山东化工, 2003, (3): 24-27.
- [8] SASAKI K, IKEDA S, NISHIZAWA Y, et al. Production of 5-aminolevulinic acid by photosynthetic bacteria [J]. Journal of fermentation technology, 1987, 65 (5): 511-515.
- [9] NOPARATNARAPORN N, WATANABE M, SASAKI K. Extracellular formation of 5-aminolevulinic acid by intact cells of the marine photosynthetic bacterium *Rhodovulum* sp. under various pH conditions [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2000, 16 (3): 313-316.
- [10] SAIKEUR A, CHOORIT W, PRASERTSAN P, et al.

- Influence of precursors and inhibitor on the production of extracellular 5-aminolevulinic acid and biomass by *Rhodopseudomonas palustris* KG31 [J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2009, 73 (5): 987—992.
- [11] KIATPAPAN P, PHONGHATSABUN M, YAMASHITA M, et al. Production of 5-aminolevulinic acid by *Propionibacterium acidipropionici* TISTR442 [J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2011, 111 (4): 425—428.
- [12] SASAKI K, WATANABE K, TANAKA T, et al. 5-Aminolevulinic acid production by *Chlorella* sp. during heterotrophic cultivation in the dark [J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 1995, 11 (3): 361—362.
- [13] ANO A, FUNAHASHI H, NAKAO K, et al. Effect of glycine on 5-aminolevulinic acid biosynthesis in heterotrophic culture of *Chlorella regularis* YA-603 [J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 1999, 88 (1): 57—60.
- [14] CHOI C, HONG B S, SUNG H C, et al. Optimization of extracellular 5-aminolevulinic acid production from *Escherichia coli* transformed with ALA synthase gene of *Bradyrhizobium japonicum* [J]. *Biotechnology letters*, 1999, 21 (6): 551—554.
- [15] FU W, LIN J, CEN P. Enhancement of 5-aminolevulinate production with recombinant *Escherichia coli* using batch and fed-batch culture system [J]. *Bioresource Technology*, 2008, 99 (11): 4864—4870.
- [16] LIN J P, FU W Q, CEN P L. Characterization of 5-aminolevulinate synthase from *Agrobacterium radiobacter*, screening new inhibitors for 5-aminolevulinate dehydratase from *Escherichia coli* and their potential use for high 5-aminolevulinate production [J]. *Bioresource Technology*, 2009, 100: 2293 2297.
- [17] 张德咏, 刘勇, 成飞雪, 等. 一种高产5-氨基乙酰丙酸的工程菌 [P]. 中国专利: 200610136870.7, 2007—06—06.
- [18] MAUZERALL D S G. The occurrence and determination of δ -aminolevulinic acid and porphobilinogen in urine [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1956, 219: 435—442.
- [19] BUCHANAN R E, GIBBONE E N. 伯杰氏细菌鉴定手册 [M]. 中国科学院微生物研究所, 译. 第8版. 北京: 科学出版社, 1984: 667—675.
- [20] 东秀珠, 蔡妙英, 等. 常见细菌系统鉴定手册 [M]. 北京: 科学出版社, 2001: 249—250.
- [21] KAMIYAMA H, HOTTA Y, TANAKA T, et al. Production of 5-aminolevulinic acid by a mutant strain of a photosynthetic bacterium [J]. *Journal of Bioscience Bioengineering*, 2000, 78: 48—55.

(责任编辑: 柯文辉)