

文章编号 :1009-038X(2002)02-0130-05

营养因子对乳酸发酵短杆菌合成赖氨酸的影响

潘军华, 潘中明, 曾嵘涓, 张星元
(江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214036)

摘 要 :通过正交试验探讨了碳源、氮源及豆饼水解液对赖氨酸产量的影响,确定了最佳工艺条件. 添加醋酸盐、生物素、泛酸盐等对 FP094 菌株中由磷酸烯醇式丙酮酸、丙酮酸和草酰乙酸构成的“三角区”进行扰动,定性分析了此扰动对赖氨酸合成所需前体物代谢流量的调节机制. 添加 2.0% 的醋酸钙可使赖氨酸的产量及葡萄糖的转化率均得到显著提高,生物素的添加量在 200~500 $\mu\text{g/L}$ 时可明显提高赖氨酸的产量和转化率. 泛酸钙的限量添加可弱化泛酸缺陷突变株中丙酮酸向乙酰辅酶 A 的转化,并提高天冬氨酸- β -半醛流量向赖氨酸合成分支的分配.

关键词 :赖氨酸;乳酸发酵短杆菌;碳架代谢流;醋酸;泛酸

中图分类号 :TQ 92

文献标识码 :A

Effects of Nutrition Factors on the Biosynthesis of Lysine in a Lysine Producer *Brevibacterium lactofermentum* FP094

PAN Jun-hua, PAN Zhong-ming, ZENG Mei-juan, ZHANG Xing-yuan
(School of Biotechnology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract : In this paper, the effects of carbon sources, nitrogen sources and soybean hydrolysates on the overproduction of lysine were studied, and the nutrition composition was optimized at the meantime. Acetic acid, biotin and pantothenate were introduced into the medium as sources of perturbation to redirect the carbon flux of the triangular-area consisting of pyruvate, phosphoenolpyruvate and oxaloacetic acid. After the addition of appropriate amount of nutrient cofactors, both the lysine production and the transferring rate of glucose were greatly enhanced due to the increase of flux of aspartic acid, the precursor of lysine. In a pantothenate auxotrophic strain, limited supply of pantothenate delayed the conversion of pyruvate to acetyl-CoA, and increased the distribution rate of aspartate- β -semi-aldehyde leading to lysine biosynthesis pathway. The possible mechanism of the effects of all those factors on the metabolic regulation was discussed as well.

Key words : lysine; *Brevibacterium lactofermentum*; carbon flux; acetic acid; pantothenate

20 世纪 50 年代以后,赖氨酸的微生物合成途径逐步被阐明,在此基础上的代谢控制发酵的研究非常活跃^[1],选育营养缺陷型及多重结构类似物抗

性突变株的常规育种技术,奠定了赖氨酸发酵工业的基础.

作者采用具有 AEC^r、Leu^r、FP^s 等 3 种遗传标记

收稿日期 2001-10-12; 修订日期 2001-12-24.

作者简介:潘军华(1976-),男,湖北武汉人,发酵工程硕士研究生.

万方数据

的乳酸发酵短杆菌突变株,在摇瓶条件下,考察各主要营养因子及发酵条件对微生物代谢的影响,选择出合适的培养基组成,并进一步研究乳酸发酵短杆菌赖氨酸发酵的代谢调节机制,重点探讨磷酸烯醇式丙酮酸、丙酮酸和草酰乙酸构成的“三角区”涉及的酶的性质及对碳架流的影响。

1 材料与方法

1.1 菌株

乳酸发酵短杆菌(*Brevibacterium lactofermentum*)具有 AEC^r、Leu^r、FP^s 等 3 种遗传标记的突变株 FP094。

1.2 培养基

1.2.1 完全培养基(CM) 牛肉膏 0.3%,蛋白胨 1%,NaCl 0.5%;固体培养基另加 2%的琼脂;pH 7.2~7.4 0.1 MPa 灭菌 30 min。

1.2.2 种子培养基(SM) 葡萄糖 2%,K₂HPO₄ 0.1%,(NH₄)₂SO₄ 1%,MgSO₄·7H₂O 0.04%,FeSO₄·7H₂O 1 mg/dL,MnSO₄·H₂O 0.8 mg/dL,生物素 5 μg/dL,VB₁ 20 μg/dL,豆饼水解液 5%;pH 7.0 0.1 MPa 灭菌 15 min。

1.2.3 发酵培养基(FM) 葡萄糖 14%,K₂HPO₄ 0.1%,(NH₄)₂SO₄ 4%;MgSO₄·7H₂O 0.04%;FeSO₄·7H₂O 1 mg/dL,MnSO₄·H₂O 0.8 mg/dL,生物素 5 μg/dL,VB₁ 20 μg/dL,豆饼水解液 5%,CaCO₃ 2% pH 7.0 0.07 MPa 灭菌 7 min。

1.3 培养条件

1.3.1 斜面菌种 30℃下培养 36 h,冰箱冷藏,每两个月移接一次。

1.3.2 种子活化 往复式摇床,90 r/min,30℃培养 8~12 h,装液量 50 mL(500 mL 的三角瓶中)。

1.3.3 摇瓶发酵 往复式摇床,110 r/min,30℃培养 72 h,接种量 5%,装液量 30 mL(500 mL 的三角瓶中)。

1.4 实验仪器

PHS-3 精密数显酸度计,上海天达仪器厂产品;无菌操作台,苏州净化设备厂产品;H-1 微型混合器,上海彭氏实业有限公司产品;800 型离心沉淀器,上海手术器械十厂产品;U-3000 Spectrophotometer,日本日立公司产品;7500 紫外/可见分光光度计,上海天美科学仪器公司产品。

1.5 分析方法

1.5.1 还原糖的测定 3,5-二硝基水杨酸(DNS)比色法^[2],待测液适当稀释后加 DNS 于 520 nm 比色。万方数据

1.5.2 赖氨酸的定性分析 0.5 μL 样液点于三号滤纸,纸层析,展开剂展开后,干燥箱中 100℃干燥 3 min,喷显色剂,100℃干燥 5 min 显色,根据标准样斑点进行判断,展开剂为 V(正丙醇):V(浓氨水)=5:2 的混合液,显色剂为 0.5%茚三酮的丙酮溶液。

1.5.3 赖氨酸的定量分析 茚三酮法^[3]。

1.5.4 菌浓的测定 取 0.5 mL 样液加入到 10 mL 0.25 mol/L 的盐酸中,620 nm 条件下比色。

1.5.5 pH 的测定 发酵液直接用酸度计测定。

1.6 培养方法

1.6.1 一级种子培养法 接 2 环斜面种子于装有 30 mL 种子培养基的 500 mL 的三角瓶中,于往复式摇床上振荡培养,振荡频率为 110 r/min,振幅 80 mm,培养温度为 30℃,培养时间 12 h。

1.6.2 二级种子培养法 吸取 2 mL 一级种子液于装有 30 mL 种子培养基的 500 mL 的三角瓶中,于往复式摇床上振荡培养,振荡频率为 110 r/min,振幅 80 mm,培养温度为 30℃,培养时间 10~12 h。

1.6.3 摇瓶发酵法 吸取 1 mL 二级种子液于装有 20 mL 的发酵培养基的 500 mL 的三角瓶中,于往复式摇床上振荡培养,振荡频率为 110 r/min,振幅 80 mm,培养温度为 30℃,培养时间 72 h。

2 结果与分析

2.1 碳源、氮源对发酵产酸的影响

菌株 FP094 的发酵培养基成分包括碳源、氮源、无机盐等。碳源主要由葡萄糖提供,豆饼水解液提供部分碳源,氮源包括无机氮源和有机氮源,无机氮源由硫酸铵提供,有机氮源由豆饼水解液提供。硫酸铵不但可以作氮源,而且 NH₄⁺ 与 SO₄²⁻ 可激活赖氨酸合成关键酶之一 AK,有利于赖氨酸的合成^[4],但硫酸铵浓度不宜过高,否则将影响菌的生长,使耗糖速率下降,发酵周期延长^[5]。无机盐包括 K₂HPO₄、MgSO₄·7H₂O、FeSO₄·7H₂O、MnSO₄·H₂O 和 CaCO₃,各种无机盐作为代谢过程中许多酶的激活剂发挥作用^[14]。其中由磷酸烯醇式丙酮酸经丙酮酸激酶催化形成丙酮酸的反应需 K⁺、Mg²⁺ 或 Mn²⁺ 参加,由葡萄糖经己糖激酶催化形成 6-磷酸葡萄糖需 Mg²⁺ 激活,Fe²⁺ 是电子传递呼吸链的重要成员之一。由磷酸烯醇式丙酮酸经磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶催化形成草酰乙酸时需要 Mn²⁺ 的激活。由于在乳酸发酵短杆菌中存在着磷酸烯醇式丙酮酸、丙酮酸、草酰乙酸的“三角区”结构,其中由丙酮酸经丙酮酸羧化酶催化形成草酰乙酸的过程中

需要二价离子 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 等参加。 Ca^{2+} 主要起 pH 缓冲作用,使得发酵过程中 pH 值不致过低.实验取 KH_2PO_4 0.1% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.04% $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 1 mg/dL, $MnSO_4 \cdot H_2O$ 0.8 mg/dL,生物素 5 $\mu g/dL$ NB_1 20 $\mu g/dL$ $CaCO_3$ 2%.考察了葡萄糖、硫酸铵和豆饼水解液对发酵的影响,选用 $L_{16}(4^5)$ 正交表^[6]安排实验,结果见表 1.

表 1 正交试验结果

Tab.1 Results of orthogonal experiments				
试验号	葡萄糖	硫酸铵	豆饼水解液	产酸率 Y/%
1	1(10%)	1(3%)	1(3%)	3.88
2	1	2(4%)	2(4%)	4.00
3	1	3(5%)	3(5%)	3.92
4	1	4(6%)	4(6%)	3.70
5	2(12%)	1	2	4.22
6	2	2	1	4.50
7	2	3	4	4.46
8	2	4	3	4.37
9	3(14%)	1	3	4.55
10	3	2	4	4.62
11	3	3	1	4.52
12	3	4	2	3.88
13	4(16%)	1	4	4.15
14	4	2	3	4.32
15	4	3	2	4.10
16	4	4	1	3.99
K_1	15.50	16.80	16.89	$\Sigma = 67.18$
K_2	17.55	17.44	16.20	
K_3	17.57	17.00	17.16	
K_4	16.56	15.94	16.93	
k_1	3.88	4.20	4.22	
k_2	4.39	4.36	4.05	
k_3	4.39	4.25	4.29	
k_4	4.14	3.98	4.23	
R	0.51	0.38	0.24	

表 2 方差分析表^[6,7]

Tab.2 Variance analysis					
方差来源	偏差平方和	自由度	均方	F 值	显著性
葡萄糖	0.725	3	0.242	18.2	* *
硫酸铵	0.300	3	0.100	7.52	*
豆饼水解液	0.130	3	0.043	3.23	*
误差	0.080	6	0.133		
总和	1.235	15			
$F_{0.05}(3,6)=8.85$ $F_{0.25}(3,6)=2.42$					

从正交试验可以看出,葡萄糖、硫酸铵和豆饼水解液质量分数的变化对发酵都有显著的影响.从实验结果来看,此菌种耐高糖性能不好,葡萄糖质量分数到 16% 时产酸明显下降.对于赖氨酸发酵,硫酸铵是最好的无机氮源,提高硫酸铵的质量分数有利于菌体的生长.本实验结果表明:对于 FP094 的赖氨酸发酵,硫酸铵质量分数的最佳值为 4%,硫酸铵质量分数进一步提高对产酸影响不大.

实验菌株 FP094 发酵培养基碳源、氮源的最适组成为:葡萄糖 14% ,硫酸铵 4% ,豆饼水解液 5% .用该组成配制的培养基发酵 72 h,产酸为 49.7 g/L,比正交实验中各次试验的产酸率要高,确定为最优工艺条件.

2.2 醋酸对赖氨酸合成的影响

赖氨酸代谢中间产物形成见图 1,形成的天冬氨酸经数步反应生成赖氨酸.据报道,乙酰 CoA 有促进磷酸烯醇式丙酮酸羧化作用,而添加醋酸可以增加乙酰 CoA 的生成^[8,9].另外,醋酸还可以诱导乙醛酸支路,从而补充天冬氨酸的前体物 OAA 及 TCA 途径的其他中间产物.两个方面的结果都提高了通往赖氨酸合成途径的碳架物质的流量并促进菌体生长^[10].采用醋酸和糖混合发酵,赖氨酸产量会比单独糖质原料时高得多.

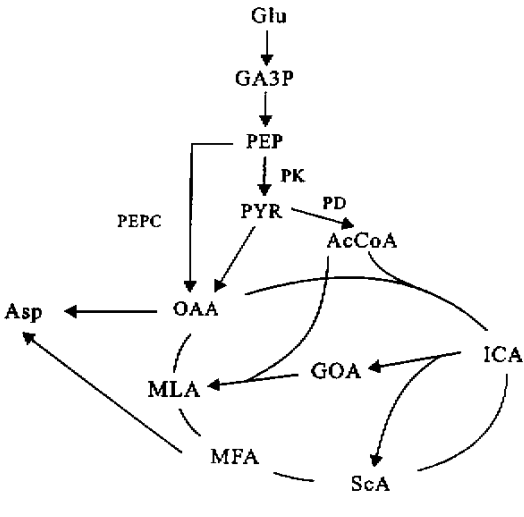


图 1 中间代谢产物形成图

Fig.1 Formation of intermediate products

由表 3 可见,当醋酸钙添加量在 0.5%~2.0% 之间时,赖氨酸产量和转化率均有一定的提高,添加 2.0% 的醋酸钙时,产量较未添加醋酸钙时有所提高,并且转化率为 45.1%,远远高于其它几组的转化率.而醋酸钙添加量超过 4.0% 时,菌浓急剧下降.从综合效果看,醋酸钙加量在 2.0% 左右对赖氨酸发酵最为理想.

表 3 醋酸钙的添加量对赖氨酸合成的影响
Tab.3 Effect of calcium acetate on the biosynthesis of lysine

醋酸钙 质量分数/%	菌浓 OD _{620nm}	残糖质量 分数/%	赖氨酸 产量/(g/L)	耗糖转化 率/%
0	1.36	2.64	48.02	42.3
0.5	2.60	2.19	50.17	42.5
2.0	2.69	2.38	52.46	45.1
4.0	1.42	3.57	38.65	37.0
6.0	0.54	6.56	14.18	19.0

2.3 生物素对赖氨酸合成的影响

据报道,添加过量生物素能明显地提高乳酸发酵短杆菌的赖氨酸产量.这主要是因为乳酸发酵短杆菌的二氧化碳固定酶是 PEPC(该酶受天冬氨酸调节)和丙酮酸羧化酶(该酶需生物素作为辅基).因此,过量生物素可以促进 CO₂ 固定反应^[11,12],从而提高赖氨酸合成途径的前体物 OAA.另一方面添加过量生物素会导致生物细胞膜中更多的磷脂分子合成,限制了谷氨酸和天冬氨酸向胞外的分泌^[13],从而使细胞内的谷氨酸对谷氨酸脱氢酶等产生顺序反馈抑制,迫使代谢流导向合成天冬氨酸的方向,天冬氨酸进而合成赖氨酸.但同时添加醋酸钙和生物素是否能完全解除天冬氨酸对 PEPC 的抑制,需用实验来证实.因此作者分别在添加 2.0% 醋酸钙和不添加醋酸钙两种条件下进行生物素添加量的试验,结果见表 4.

表 4 生物素添加量对赖氨酸合成的影响
Tab.4 Effect of biotin on the biosynthesis of lysine

生物素 添加量/(μg/L)	菌浓 OD _{620nm}	残糖质 量分数/%	赖氨酸产 量/(g/L)	耗糖转 化率/%
500(加 2.0% 醋酸钙)	3.01	2.62	48.33	42.47
300	2.94	2.74	50.84	45.15
200	2.86	2.8	51.28	45.78
50	2.57	2.56	51.38	44.91
500(不加醋酸钙)	2.91	1.57	52.71	42.4
300	2.69	1.63	53.44	43.2
200	2.45	1.74	54.62	44.55
50	1.46	2.82	48.86	43.7

从表 4 可以看出:当生物素的添加量在 200~500 μg/L 时可以明显地提高赖氨酸的产量和转化率,其中不加醋酸钙,生物素添加量为 200 μg/L 时赖氨酸产量最高.同时对添加醋酸钙和未添加醋酸钙的两种情况的比较可以看出,在生物素加量大于 100 μg/L 时,未添加醋酸钙的赖氨酸产量反而略高

于添加醋酸钙的产量,看来天冬氨酸对 PEPC 的抑制程度随天冬氨酸的浓度增大而增大.实验结果也表明,高浓度的生物素对乳酸发酵短杆菌高产赖氨酸是有利的.

2.4 泛酸钙对赖氨酸合成途径的影响

在赖氨酸的合成途径上,由天冬氨酸-β-半醛(ASA)转化为 2,3-二氢吡啶-2,6-二羧酸(DDP)需要丙酮酸的参与(图 2).如果丙酮酸的供应不足,则 ASA 必倾向于流向高丝氨酸(Hse),那么赖氨酸的形成同样会降低.泛酸是合成 CoA 的前体物,而 CoA 在葡萄糖代谢中首先是参与将丙酮酸转化为乙酰 CoA 的反应.根据 Gil-Hwan An 等^[15]的研究,抑制这一过程可提高丙酮酸的水平.对一株泛酸缺陷的突变株限量供应 300~30 μg/L 的泛酸钙,结果随着泛酸钙添加量的降低,赖氨酸产量升高,而异亮氨酸与缬氨酸等仅有小幅度增加.原因是丙酮酸到乙酰 CoA 的反应被弱化,从而丙酮酸得到积累,ASA 便倾向于流向赖氨酸合成分支.另外,预计异亮氨酸(此外还有缬氨酸等)途径上的乙酰羟酸合酶(AHAS)对丙酮酸的竞争力也不如赖氨酸途径上的 2,3-二吡啶二羧酸合酶(DHDPS)^[15],以上两个酶的酶学性质正在深入研究中.

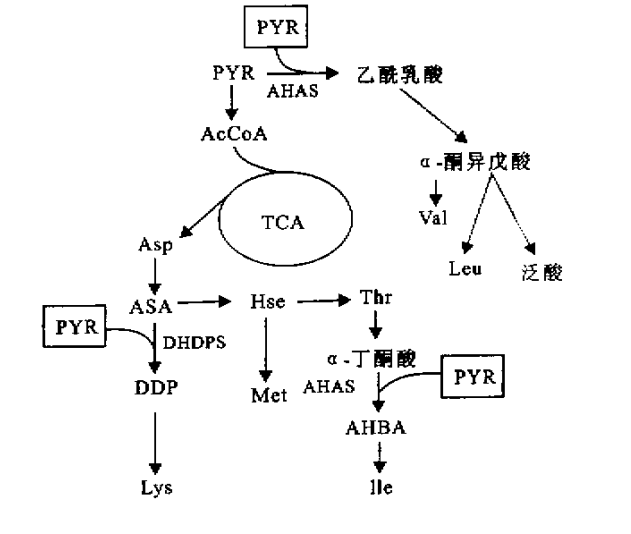


图 2 天冬族氨基酸的合成与丙酮酸的利用
Fig.2 Biosynthesis of amino acids of aspartate family and the relation with the pyruvate utilizing

为提高赖氨酸的合成,将代谢流导向通往目的产物的途径,需要从代谢控制的角度出发,有针对性地调整工艺条件,包括营养因子及辅因子、通风量、pH 值、温度等.分析关键步骤的酶的性质以及其调节部位对不同营养因子或辅助因子的响应情况,选用可提高代谢前体物流量、降低分支途径活性的碳源、氮源或辅助酶/辅基物质并优化组合,可

达到事半功倍的效果.

对于赖氨酸的生物合成,磷酸烯醇式丙酮酸、丙酮酸、草酰乙酸所构成的“三角区”是研究的重点.草酰乙酸是天门冬氨酸族的共同前体物,通向苏氨酸、异亮氨酸、甲硫氨酸等的合成支路与赖氨酸竞争前体物.故而从工艺上提高赖氨酸合成的基本思路就是强化碳架、能量、还原力等导向赖氨酸合成的分支,而弱化与其竞争的分支.而优化工艺条件的依据主要是目的分支及相关途径上关键酶的酶学性质差异.

参考文献：

[1] 张克旭 陈宁 张蓓等.代谢控制发酵[M].北京 :中国轻工业出版社 ,1998.

[2] EGDELING L , SAHM H. Quantifying and Directing Metabolite Flux : Application to Amino Acid Overproduction[J]. Advances in biochemical Engineering/Biotechnology ,1990 , 54 :1.

[3] BUDAVARI S. The Merck Index :an Encyclopedia of Chemicals , Drugs and Biologicals[Z]. New Jersey :Merck & Co Inc. USA ,1989.

[4] SHIHO I , UJIGAWA-TAKEDA K. Regulation of Phosphoenolpyruvate Carboxylase by Synergistic Action of Aspartate and 2-Oxoglutarate[J]. Agric Biol Chem ,1979 ,43 (12) :2480.

[5] 王磊 ,李宗林 沈洁等. L-赖氨酸快速发酵新菌种及工艺研究[J]. 氨基酸和生物资源 ,1995 ,17 (3) :1.

[6] 中科院数学研究所统计组编. 常用数理统计方法[M]. 北京 :科学出版社 ,1973.

[7] 费业泰主编. 误差理论和数据处理[M]. 北京 :机械工业出版社 ,1983.

[8] FUKUMURA T. Bacterial Racemization of α -Amino- ϵ -caprolactam[J]. Agric Biol Chem , 1977 , 41 :1321.

[9] FUKUMURA T. Partial Purification and some properties of α -Amino- ϵ -caprolactam-racemizing Enzyme from *Achromobacter obae*[J]. Agric Biol Chem , 1977 , 41 :1509.

[10] TOSAKA O , TAKINAMI K , HIROSE Y. L-Lysine Production by S(2-Aminoethyl)L-Cysteine and α -Amino- β -hydroxy-varelic Acid Resistant Mutants of *Brevibacterium lactofermentum*[J]. Agric Biol Chem , 1978 , 42 (4) :745.

[11] TOSAKA O , YOSHIHARA Y , IKEDA S , et al . Production of L-Lysine by Fluoropyruvate-sensitive Mutants of *Brevibacterium lactofermentum*[J]. Agric Biol Chem ,1985 , 50 (5) :1305.

[12] 化学工业出版社组织编写. 中国化工产品大全[M]. 北京 :化学工业出版社 ,1994.

[13] 喻致祥. L-赖氨酸的发酵生产[J]. 氨基酸杂志 ,1985 ,22 (2) :28.

[14] 大连轻工业学院编. 生物化学[M]. 北京 :中国轻工业出版社 ,1980.

[15] AN GIL-HWAN , SONG KYUNG BIN , SINSKEY A J. Redirection of Carbon Flux to Lysine in a Recombinant of *Corynebacterium lactofermentum* ATCC21799 by limited Supply of Pantothenate[J]. J Biosci Bioeng , 1999 , 88 (2) :168 - 172.

(责任编辑 朱 明)