

文章编号:1009-038X(2003)02-0010-04

L-精氨酸高产菌的诱变育种及其摇瓶产酸条件

熊筱晶, 奚文芳, 许正宏, 陶文沂

(江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214036)

摘要:以亚硝基胍(NTG)逐级处理钝齿棒杆菌(*Corynebacterium crenatum*)JDN28, 分别选用D-精氨酸、甲基半胱氨酸为结构类似物进行抗性选育, 获得一株L-精氨酸的高产菌株YDM403(His^r, SG^r, D-Arg^r, methyl-Cys^r). 在含葡萄糖120 g/L的优化培养基中, 摇瓶发酵96 h, L-精氨酸达28~32 g/L, 较出发菌株提高了113%.

关键词: L-精氨酸; 诱变育种; 钝齿棒杆菌

中图分类号: Q 933

文献标识码: A

L-Arginine Production by Arginine Analog-Resistant Mutant of Microorganisms

XIONG Xiao-jing, DOU Wen-fang, XU Zheng-hong, TAO Wen-yi

(School of Biotechnology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: A L-Arginine producer strain YDM403(His^r, SG^r, D-Arg^r, methyl-Cys^r) was selected out by using D-Arginine and Methy-Cysteineas resistants after stepwise mutagenic treatment with N-methyl-N'-nitrosoguanidine(NTG) from *Corynebacterium crenatum* JND28(His^r, SG^r, D-Arg^r). 28~32 g/L of L-Arginine was accumulated in an optimal medium, which has an improvement more than 113% compared with the origin.

Key words: L-Arginine; mutagenesis; *Corynebacterium crenatum*

L-精氨酸是一种重要的半必需氨基酸, 肌体能自身合成, 但在处于生长阶段和应激状态下时肌体需要补充外源L-精氨酸. L-精氨酸具有重要的生理意义, 它是合成蛋白质和肌酸的重要原料, 也是生物体尿素循环中的重要代谢产物. 近年来, 随着人们对一氧化氮途径研究的不断深入, 作为一氧化氮合成前体的L-精氨酸在心血管疾病的防治中日益受到重视^[1]. L-精氨酸在医药和食品工业中有着广泛的应用, 除了传统上应用于复方氨基酸输液以及氮中毒性肝昏迷的解毒剂以外, L-精氨酸在提高人体免疫力、促进伤口愈合、防治肿瘤等方面也有一

定的作用^[2]. 由于L-精氨酸不仅具有抗动脉粥样硬化的作用, 还有防治高血压和心力衰竭等作用, 因而在临床上有望代替治疗心血管病的药物^[3]. L-精氨酸同时也是配制营养支持用和特殊支持用要素膳的重要原料, L-精氨酸-L-谷氨酸盐还被用作忌钠患者的调味品等.

国外只有日本实现了发酵法大规模生产L-精氨酸. 目前国内有少量采用毛发水解等方法生产的L-精氨酸. 国内对发酵法生产L-精氨酸的研究仅限于实验室水平, 是我国药用氨基酸生产的“瓶颈”品种之一. 我国医药用L-精氨酸主要依赖进口, 因

收稿日期:2002-08-23; 修回日期:2002-09-30.

基金项目:江苏省科技厅“十五”科技工业攻关重点项目(No. BE2001041)资助课题.

作者简介:熊筱晶(1979-), 女, 江西景德镇人, 发酵工程硕士研究生.

此选育 L-精氨酸的高产菌株并研究其发酵法生产有着重要的意义。本文报道了一株高产 L-精氨酸菌株诱变育种及其摇瓶发酵条件的初步研究结果。

1 材料与方法

1.1 菌种

出发菌株是由本实验室选育并保藏的 L-精氨酸产生菌钝齿棒杆菌 SA01(His⁻, SG⁻, D-Arg⁺)。

1.2 培养基

1.2.1 琼脂完全培养基 组分(g/L):葡萄糖 20, 牛肉膏 10, 蛋白胨 10, 酵母膏 5, NaCl 5, 琼脂 20, pH 7.0~7.2。

1.2.2 琼脂基础培养基 组分(g/L):葡萄糖 10, (NH₄)₂SO₄ 3, KH₂PO₄ 1, MgSO₄·7H₂O 0.5, FeSO₄·7H₂O 0.02, MnSO₄·H₂O 0.02, 琼脂 20, 生物素 30 μg/L, 硫胺素 200 μg/L, 组氨酸 500 μg/L, pH 7.0~7.2。

1.2.3 摇瓶种子培养基 组分(g/L):葡萄糖 30, 玉米浆 20, (NH₄)₂SO₄ 20, KH₂PO₄ 1, MgSO₄·7H₂O 0.5, 尿素 1.5, pH 7.0~7.2, 250 mL 三角瓶装液量 30 mL。

1.2.4 摇瓶发酵培养基 组分(g/L):葡萄糖 120, 玉米浆 10, (NH₄)₂SO₄ 50, KH₂PO₄ 1.5, MgSO₄·7H₂O 0.5, FeSO₄·7H₂O 0.02, MnSO₄·H₂O 0.02, 生物素 80 μg/L, L-组氨酸 500 μg/L, pH 7.0~7.2, 121 °C 灭菌 10 min, 250 mL 三角瓶装液量 15 mL。

1.3 培养方法

1.3.1 种子培养 从培养 24 h 的斜面菌种上挑取一环菌体接入液体种子培养基, 31 °C, 96 r/min, 培养 12 h。

1.3.2 发酵培养 种子培养后, 以体积分数 10% 的接种量接入发酵培养基中, 31 °C, 96 r/min, 培养 96 h。

1.4 诱变筛选方法

实验选用亚硝基胍(NTG)为诱变剂, 采用 D-精氨酸^[4]和甲基半胱氨酸^[5]适当质量浓度的平板作为筛选平板。

1.5 分析方法

1.5.1 发酵液 pH 的测定 精密 pH 试纸。

1.5.2 菌体生长的测定 吸取 0.2 mL 待测液, 加入 0.25 mol/L HCl 溶液 5 mL, 在 562 nm 处测吸光值。

1.5.3 发酵液中还原糖的测定 3,5-二硝基水杨酸法。

1.5.4 L-精氨酸的定量测定 改良坂口试剂法^[6]。

1.6 主要试剂

亚硝基胍为瑞士 Fulka 公司产品, D-精氨酸和甲基半胱氨酸均为美国 Sigma 公司产品, 其余均为国产分析纯试剂。

2 结果与讨论

2.1 L-精氨酸产生菌诱变谱系

用亚硝基胍对出发菌株 JDN28 进行多次逐级诱变, 使其 D-精氨酸抗性增加, 并获得了甲基半胱氨酸抗性标记, 最后经分离纯化获得一株 L-精氨酸高产菌 YDM 403。在最优工艺条件下, 摇瓶产酸达 28~32 g/L, 最高可达 34.5 g/L, 产酸最高值比出发菌株提高了 130%。具体诱变谱系见图 1。

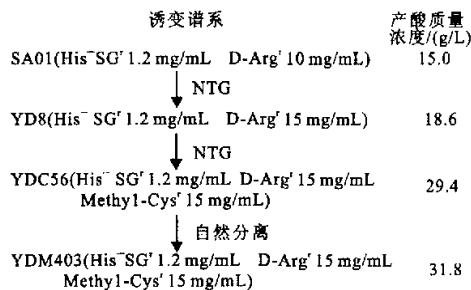


图1 精氨酸产生菌诱变谱系

Fig.1 Genealogy of L-arginine producing mutants

2.2 YDM403 摇瓶发酵条件

2.2.1 不同碳氮比对 YDM403 产 L-精氨酸的影响 分别选取 (NH₄)₂SO₄ 质量浓度为 30, 40, 50, 60 g/L, 考察不同碳氮比对 L-精氨酸产量的影响, 结果见图 2。

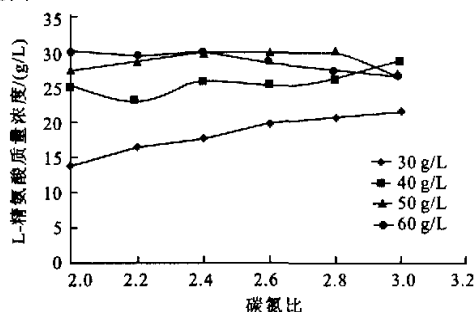


图2 不同碳氮比对 L-精氨酸产量的影响

Fig.2 Effect of ratio of carbon and nitrogen on the fermentation of L-arginine

由图 2 可知, 当 (NH₄)₂SO₄ 质量浓度较低时, 补充充足的碳源对产酸有利, 随着葡萄糖质量浓度的升高, 产酸水平有明显的提高; 但当 (NH₄)₂SO₄ 质量浓度提高到 40 g/L 以后, 增加碳氮比对产酸影

响不大,且过量的葡萄糖还使产酸水平有所下降,可能与过高的葡萄糖抑制菌体生长进而影响产酸有关.

2.2.2 玉米浆对产酸的影响 玉米浆中富含B族维生素、生物素、嘌呤、嘧啶等微量有机物质,这些物质对前期菌体生长和中后期产酸都是很重要的.考察玉米浆质量浓度对产酸的影响,结果为玉米浆质量浓度 10 g/L 时,产酸最高,而超过 10 g/L 时产酸下降.

2.2.3 磷酸二氢钾对产酸的影响 考察磷酸二氢钾对产酸的影响,结果(见图 3)表明,磷酸二氢钾质量浓度在 0.5 g/L 时,产酸最高;随着质量浓度的增加,产酸下降.

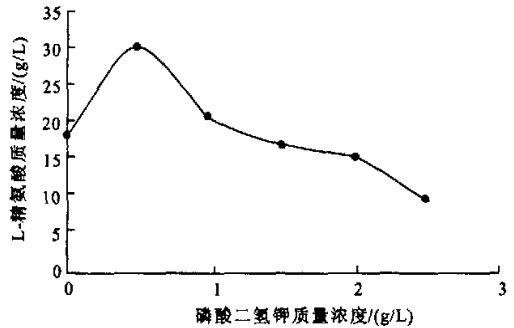


图 3 磷酸二氢钾质量浓度对产酸的影响

Fig.3 Effect of concentration of KH_2PO_4 on the fermentation of L-arginine

表 1 二次回归正交旋转组合设计试验

Tab.1 The results of quadratic regression orthogonal design experiment

试验号	Z_0	Z_1	Z_2	Z_3	Z_1Z_2	Z_1Z_3	Z_2Z_3	Z'_1	Z'_2	Z'_3	y
1	1	1	1	1	1	1	1	0.406	0.406	0.406	23.0
2	1	1	1	-1	1	-1	-1	0.406	0.406	0.406	24.8
3	1	1	-1	1	-1	1	-1	0.406	0.406	0.406	21.6
4	1	1	-1	-1	-1	-1	1	0.406	0.406	0.406	22.9
5	1	-1	1	1	-1	-1	1	0.406	0.406	0.406	24.0
6	1	-1	1	-1	-1	1	-1	0.406	0.406	0.406	20.7
7	1	-1	-1	1	1	-1	-1	0.406	0.406	0.406	23.8
8	1	-1	-1	-1	1	1	1	0.406	0.406	0.406	18.4
9	1	1.682	0	0	0	0	0	2.234	-0.594	-0.594	22.0
10	1	-1.682	0	0	0	0	0	2.234	-0.594	-0.594	21.0
11	1	0	1.628	0	0	0	0	-0.594	2.234	-0.594	23.0
12	1	0	-1.628	0	0	0	0	-0.594	2.234	-0.594	20.4
13	1	0	0	1.628	0	0	0	-0.594	-0.594	2.234	24.8
14	1	0	0	-1.628	0	0	0	-0.594	-0.594	2.234	23.8
15	1	0	0	0	0	0	0	-0.594	-0.594	-0.594	24.4
16	1	0	0	0	0	0	0	-0.594	-0.594	-0.594	25.1
17	1	0	0	0	0	0	0	-0.594	-0.594	-0.594	24.5

2.2.4 硫酸镁对产酸的影响 考察硫酸镁用量与L-精氨酸产量之间的关系,结果(见图 4)表明,随着硫酸镁质量浓度的增加,L-精氨酸质量浓度随之提高,当硫酸镁质量浓度达到一定水平(0.8 g/L)后,产酸不再提高.

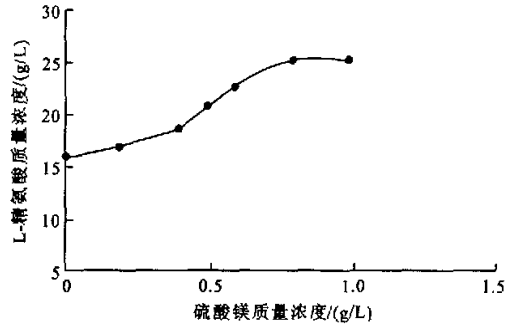


图 4 硫酸镁质量浓度对产酸的影响

Fig.4 Effect of concentration of $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ on the fermentation of L-arginine

2.2.5 二次回归正交旋转组合试验 结合单因子实验,选取对 L-精氨酸产量影响较大的 3 个因素:玉米浆、磷酸二氢钾、硫酸镁,根据二次回归正交旋转组合设计试验,综合考察培养基中的营养因素对 L-精氨酸产量发酵的影响,结果见表 1.

续表 1

试验号	Z_0	Z_1	Z_2	Z_3	Z_1Z_2	Z_1Z_3	Z_2Z_3	Z'_1	Z'_2	Z'_3	y
18	1	0	0	0	0	0	0	-0.594	-0.594	-0.594	23.2
19	1	0	0	0	0	0	0	-0.594	-0.594	-0.594	24.4
20	1	0	0	0	0	0	0	-0.594	-0.594	-0.594	23.5
21	1	0	0	0	0	0	0	-0.594	-0.594	-0.594	24.0
22	1	0	0	0	0	0	0	-0.594	-0.594	-0.594	24.7
23	1	0	0	0	0	0	0	-0.594	-0.594	-0.594	24.5

注:表中 Z_1, Z_2, Z_3 分别表示玉米浆质量浓度(5, 10, 15 g/L), KH_2PO_4 质量浓度(0.5, 1.0, 1.5 g/L), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 质量浓度(0.4, 0.6, 0.8 g/L)。

用 MATLAB 软件对表 1 数据进行分析处理, 得回归方程

$$y = 23.1517 + 0.5185Z_1 + 0.7448Z_2 + 0.533Z_3 - 1.4750Z_1Z_3 - 0.9731Z'_1 - 0.9024Z'_2$$

其中: $Z'_1 = Z_1^2 - 0.594$; $Z'_2 = Z_2^2 - 0.594$ 。

代入得

$$y = 24.266 + 0.5185Z_1 + 0.7448Z_2 + 0.5332Z_3 - 1.475Z_1Z_3 - 0.9731Z_1^2 - 0.9024Z_2^2$$

最终求得极值点: $y_{\max}$ 对应 Z_1, Z_2, Z_3 的坐标为 (0.3615, 0.4127, -0.1254)。因为 $Z_1 = (X_1 - 10)/5, Z_2 = (X_2 - 1)/0.5, Z_3 = (X_3 - 0.6)/0.2$, 所以对应的原始变量的方程为

$$y = 3.7878 + 1.767X_1 + 8.709X_2 + 17.416X_3 - 1.475X_1X_3 - 0.03892X_1^2 - 3.6096X_2^2$$

极值点为(11.8075, 1.2064, 0.5749)。所以, 考察的三因素最优组合为: 玉米浆 11.808 g/L, KH_2PO_4 1.2065 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.575 g/L。考虑到实验中便于配制培养基, 将以上数据归整为: 玉米浆 12 g/L, KH_2PO_4 1.2 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.6 g/L。

综合研究结果, 确定了该菌的发酵最优培养基组成: 葡萄糖 120 g/L, 硫酸铵 50 g/L, 玉米浆 12 g/L, KH_2PO_4 1.2 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.6 g/L, L-组氨酸 500 $\mu\text{g/L}$, 生物素 80 $\mu\text{g/L}$, CaCO_3 30 g/L, 初始 pH 7.0~7.2, 种龄 15 h, 接种量体积分数 10%,

250 mL 三角瓶装液量为 15 mL, 往复式摇床 (30 $\pm$ 1) $^\circ\text{C}$, 96 r/min, 培养 96 h。

2.3 YDM403 产酸稳定性

对菌株 YDM403 进行多次重复发酵实验, 结合产酸水平及统计量“变异系数”值, 分析该菌株的产酸稳定性, 结果见表 2。表 2 表明, 该菌具有良好的产酸稳定性, 即较低的“变异系数”值。

表 2 YDM403 产酸稳定性

Tab.2 Stability study of YDM403 on the fermentation of L-arginine

实验次数	产酸值/(g/L)			产酸值统计量		产酸值变异系数/%
	最高	最低	平均	标本方差	标准差	
6	30.4	28.1	29.3	0.803	0.645	2.20

3 结 论

精氨酸是非支路代谢的终产物, 其中合成途径中第一、第二步酶, 即乙酰谷氨酸合成酶和乙酰谷氨酸激酶受到精氨酸的反馈抑制。因此, 需要大量积累 L-精氨酸, 必须解除正常的反馈抑制。传统的方法是选育结构类似物抗性突变株, 本实验选用的结构类似物中的甲基半胱氨酸在国内尚未见到同类报道, 结果使 L-精氨酸的产量提高 113%, 且产酸稳定性好, 在工业上有一定的应用前景。

参考文献:

- [1] 尹时华. L-精氨酸与心血管病研究进展[J]. 心血管病学研究, 2000, 21(4): 234 - 236.
- [2] 罗旭松, 岑瑛. 精氨酸对创伤后机体影响的研究进展[J]. 中国修复重建外科杂志, 1997, 11(2): 124 - 126.
- [3] 张金盈. L-精氨酸/一氧化氮抗动脉粥样硬化的研究进展[J]. 河南医学研究, 1996, 5(3): 279 - 282.
- [4] 王霞, 陶文沂, 孙志浩. L-精氨酸发酵研究进展[J]. 工业微生物, 2000, 30(4): 50 - 54.
- [5] Azuma Tomoki, Aoyagi Seiji, Nakanishi Toshihide. Process for producing L-arginine[P]. 日本专利: JP 5 034 319, 1991.
- [6] 路志强, 龚建华, 丁久元. L-精氨酸产生菌诱变育种的研究[J]. 微生物学报, 1988, 28(2): 131 - 135.

(责任编辑: 杨 勇)