

文章编号 :1009 - 038X(2003)03 - 0032 - 04

## 微生物发酵法生产乳清酸

张一平, 柏建新, 朱晓宏, 杜郭君, 邓崇亮  
(江苏省微生物研究所, 江苏 无锡 214063)

**摘要:**以谷氨酸棒杆菌 JSIM-201 为出发菌株,通过紫外线和甲基磺酸乙酯诱变处理,得到了一株尿嘧啶营养缺陷型突变体 U-12 菌株,它能以葡萄糖为碳源,硫酸铵为氮源,在发酵液中积累一种紫外吸收物质.该紫外吸收物质经物理、化学分析鉴定,证明是乳清酸.对 U-12 菌株进行了发酵条件优化研究,在最佳发酵工艺条件下,积累乳清酸最高达到 8.6 g/L.

**关键词:**乳清酸;谷氨酸棒杆菌;尿嘧啶营养缺陷型;突变株

中图分类号: TQ 924

文献标识码: A

### Studies on the Orotic Acid Production by Fermentation

ZHANG Yi-ping, BAI Jian-xin, Zhu Xiao-hong, DU Guo-jun, DENG Cong-liang  
(Jiangsu Institute of Microbiology, Wuxi 214063, China)

**Abstract:** The corynebacterium glutamicum strain JSIM-201 was selected as the starting strain. By treatment of UV ray and EMS, an uracil auxotrophy mutant strain U-12 was obtained. Using glucose and ammonium sulfate as the carbon source and nitrogen source, the mutant could accumulate an ultraviolet absorption substance in its cultural broth. This substance isolated from its cultural broth was identified as orotic acid by physical and chemical analysis. The fermentation studies on strain U-12 was conducted under the optimal fermentation conditions, and the largest orotic acid yield was 8.6 g/L.

**Key words:** orotic acid; *Corynebacterium glutamicum*; uracil auxotrophy; mutant

乳清酸(尿嘧啶-6-羧酸),又称为 VB<sub>13</sub>,自然界中主要存在于反刍类动物的奶汁中.乳清酸是生物体嘧啶核苷酸生物合成途径中的重要前体,是一种与遗传物质有关的重要化合物,在生理上具有十分重要的作用<sup>[1]</sup>.它在肝细胞增殖、蛋白质合成以及糖类、脂类物质的代谢中都起着非常关键的作用.在医药工业上,乳清酸可作为预防和治疗肝病、高血脂、脂肪肝和心脑血管系统疾病的药物.乳清酸是合成嘧啶碱基(尿嘧啶、胞嘧啶和胸腺嘧啶)和嘧啶碱基结构类似物(例如 5-氟尿嘧啶)的起始原料,而这些化合物是合成一些抗肿瘤、抗病毒药物的中

间体<sup>[2]</sup>.在食品和饲料工业上,乳清酸主要用作食品和饲料添加剂.在化妆品工业上,乳清酸主要用作增白剂中间体.

许多微生物的嘧啶缺陷型或渗漏型都具有积累乳清酸的能力,如链孢霉<sup>[3]</sup>、产气气杆菌<sup>[4]</sup>和石蜡节杆菌<sup>[5]</sup>,但它们的乳清酸产量均很低.发酵法生产乳清酸的最理想微生物是谷氨酸棒杆菌的尿嘧啶营养缺陷型突变株.日本自田中等人发现谷氨酸棒杆菌尿嘧啶营养缺陷型突变株能以葡萄糖为碳源,积累 8~9.2 g/L 乳清酸,并已实现了工业化生产<sup>[6]</sup>.

收稿日期 2002-12-25; 修回日期 2003-02-19.

基金项目 江苏省社会发展基金项目(编号 BS2000094)资助课题.

作者简介 张一平(1967-)男,江苏无锡人,助理研究员,工学学士.

乳清酸化学合成法有天门冬氨酸法<sup>[7]</sup>、草酰乙酸单乙酯与尿素缩合法<sup>[8]</sup>、马来酐与尿素等摩尔反应法、海因与乙内酰脲反应法<sup>[9]</sup>,但这些方法都存在着成本高、污染环境等缺点。

微生物发酵法生产乳清酸具有产量大、成本低、污染小的优点。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种

江苏省微生物研究所保藏的谷氨酸棒杆菌 *Corynebacterium glutamicum* JSIM-201 菌株,作为诱变的出发菌株。

### 1.2 培养基

1.2.1 完全培养基 组分(g/L):葡萄糖 10,酵母膏 5,蛋白胨 10,牛肉膏 7,NaCl 3,NaOH 调 pH 7.2. 用作斜面培养基时,加 10 g 琼脂。

1.2.2 基本培养基(MM 培养基) 组分(g/L):葡萄糖 10,(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 8,尿素 8,K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,MgSO<sub>4</sub> 0.4,NaCl 0.2,FeSO<sub>4</sub> 0.01,MnSO<sub>4</sub> 0.01,琼脂 20. 生物素 50 μg/L,硫铵素 200 μg/L,NaOH 调 pH 7.2.

补充培养基(SM 培养基):1 L MM 培养基加尿嘧啶 50 mg,NaOH 调 pH 7.2.

1.2.3 种子培养基 组分(g/L):葡萄糖 50,蛋白胨 10,酵母膏 10,(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 15,尿素 8,NaCl 2.5. 生物素 50 mg/L,尿嘧啶 250 mg/L,NaOH 调 pH 7.2.

1.2.4 发酵培养基 组分(g/L):葡萄糖 80,KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.5,K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5,MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5,MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O 0.01,FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.01,(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 27,尿素 18,酵母膏 1.5,CaCO<sub>3</sub> 20. 生物素 20 mg/L,NaOH 调 pH 7.2.

### 1.3 菌种诱变及选育方法

JSIM-201 菌株在斜面培养基上于 32 ℃ 活化 2 d 后,接种至装有 30 mL 液体培养基的 500 mL 三角瓶中,38 ℃ 摇瓶振荡培养 8~10 h;离心收集细胞,洗涤 3 次,用 0.3 g/dL LiCl 液振荡分散细胞后,取 10~20 mL 菌悬液用紫外线照射 1.5 min 或 2 min 不等,或者用磷酸缓冲液分散细胞后,加入 0.1 mol/L 甲基磺酸乙酯 1 mL,冰浴处理 0.5~1 h. 在处理方法上可连续、间断或紫外线与甲基磺酸乙酯交替处理。

经诱变处理过的菌悬液,适当稀释后,涂布于 SM 培养基上,32 ℃ 培养 3 d. 长出的单菌落用牙签点种于 MM 培养基和 SM 培养基上,32 ℃ 培养 3 d 后,检出在 MM 培养基上不生长,而在 SM 培养基

上能生长的菌株,即为所需要的尿嘧啶营养缺陷型突变株。

### 1.4 种子与发酵培养方法

活化 2 d 的斜面细胞,接种于装有 30 mL 种子培养基的 500 mL 三角瓶中,于 38 ℃ 往复式摇床振荡 108 次/min,摇瓶振荡培养 18 h 后,取 2 mL 种子培养液接入装有 20 mL 发酵培养基的 500 mL 三角瓶中,于 38 ℃,往复式摇床振荡 108 次/min,摇瓶振荡培养 72 h.

### 1.5 培养液中乳清酸的测定

培养结束后的培养液,定容至 20 mL,以补足蒸发的水分.沸水浴 5 min 后离心,取 5 μL 上清液点样至新华 3 号滤纸上,用 0.02 mol/L 柠檬酸—柠檬酸钠缓冲液(pH 3.5)作电泳液,电泳 1 h,电压 500 V.取出,烘干,紫外光下显色,画出乳清酸吸收斑点.用 5 mL 蒸馏水浸泡 5 h,每隔 0.5 h 摇一次.用 751-G 型紫外分光光度计在 280 nm 波长下测量紫外吸光值。

## 2 结果与讨论

### 2.1 尿嘧啶营养缺陷型突变株的选育

在核酸代谢途径中,谷氨酸棒杆菌积累乳清酸最重要的条件是遗传性缺失乳清酸磷酸核糖基转移酶活性,即获得尿嘧啶营养缺陷型突变株,切断从乳清酸到乳清苷酸(OMP)的代谢途径.又因该酶的缺失,微生物无法通过从头合成途径得到生长所必须的尿嘧啶物质,必须通过外源加入才能生长,从而可以利用尿嘧啶的量来解除微生物尿嘧啶核苷酸代谢途径中的反馈抑制作用和反馈阻遏作用,积累过量的乳清酸<sup>[10]</sup>。

以作者所在实验室保藏的谷氨酸棒杆菌 *Corynebacterium glutamicum* JSIM-201 为亲株,经诱变处理,从 12 000 多个诱变菌落中,挑出一株在基本培养基上不能生长,只能在 SM 培养基上生长的突变株.该突变株经稀释分离、纯化、遗传标记鉴定,确认为是尿嘧啶营养缺陷型突变株,编号 JSIM-U-12.

突变株 JSIM-U-12 经摇瓶振荡培养 72 h 后,经培养液纸层析分析,在紫外灯(254 nm)下出现很深的紫外荧光斑点.突变株的选育过程见图 1.

### 2.2 尿嘧啶营养缺陷型突变株积累产物的鉴定

根据尿嘧啶核苷酸代谢调控理论,缺失乳清酸磷酸核糖基转移酶活性,即尿嘧啶缺陷型切断了乳清苷酸(OMP)的代谢途径,积累的代谢产物是乳清酸.为了查明突变株 JSIM-U-12 发酵液中的紫外吸

收物质,对发酵液进行分离提取和结晶,并进行物理、化学鉴定.

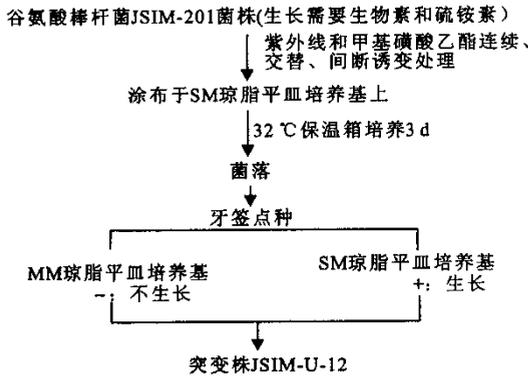


图 1 尿嘧啶营养缺陷型突变株 JSIM-U-12 的选育过程

Fig.1 The breeding process of uracil auxotrophy mutant strain JSIM-U-12

2.2.1 3 种不同溶剂系统纸层析  $R_f$  值

纸层析溶剂系统 I :

$V(\text{正丁醇}) : V(\text{乙酸}) : V(\text{甲醇}) : V(\text{水}) = 5 : 3 : 2 : 1$

纸层析溶剂系统 II :

$V(\text{正丁醇}) : V(\text{乙酸}) : V(\text{水}) = 4 : 1 : 1$

纸层析溶剂系统 III :

$V(\text{饱和硫酸铵}) : V(\text{异丙醇}) : V(1 \text{ mol/L 醋酸钠}) = 40 : 1 : 9$

3 批发酵液提取物在 3 种不同溶剂系统中的  $R_f$  值与标准乳清酸样品一致,见表 1.

表 1 突变株 JSIM-U-12 发酵提取物纸层析  $R_f$  值

Tab.1 The paper chromatogram  $R_f$  Values of the isolated crystalline from U-12 broth culture

溶剂系统	$R_f$ 值	
	发酵提取物	乳清酸标准样品
溶剂系统 I	0.42	0.41
溶剂系统 II	0.22	0.22
溶剂系统 III	0.24	0.24

2.2.2 两种不同 pH 缓冲液电泳泳动距离

缓冲液 I :0.02 mol/L 柠檬酸-柠檬酸钠(pH 3.5);

缓冲液 II :10 g/dL 冰醋酸(pH 2).

发酵液提取产物在两种不同 pH 值的缓冲液中电泳 1 h,电压 500 V,其电泳泳动距离与标准乳清酸样品一致,见表 2.

2.2.3 发酵提取物的熔点和紫外、红外吸收光谱

从尿嘧啶营养缺陷型突变株 JSIM-U-12 的发酵液中提取结晶,熔点测定为 344~345℃,标准乳清酸样品熔点测定为 345~346℃.

发酵液提取物和乳清酸标准样品的紫外吸收光谱、红外吸收光谱分别见图 2,3.

尿嘧啶营养缺陷型突变株 JSIM-U-12 发酵液提取物经物理、化学鉴定,确认是乳清酸.

表 2 JSIM-U-12 发酵液提取物电泳紫外吸收斑点泳动距离

Tab.2 The electrophoresis move distance of the isolated crystalline from U-12 broth culture

电泳缓冲液	泳动距离/cm	
	发酵提取物	乳清酸标准样品
0.02 mol/L 柠檬酸-柠檬酸钠(pH 3.5)	10.7	10.8
10 g/dL 冰醋酸(pH 2.0)	5.5	5.4

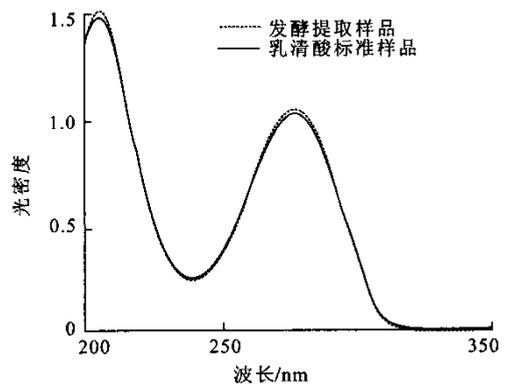


图 2 发酵提取样品与标准乳清酸样品的紫外吸收光谱图

Fig.2 The ultraviolet-absorption spectra of isolated crystalline and authentic orotic acid

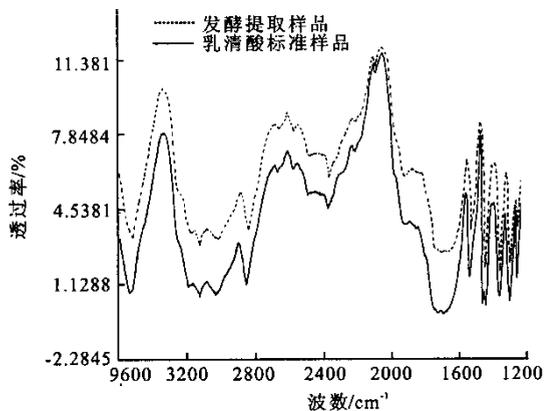


图 3 发酵提取样品与标准乳清酸样品的红外吸收光谱图

Fig.3 The infrared-absorption spectra of isolated crystalline and authentic orotic acid

2.3 积累乳清酸的最佳工艺条件

采用 JSIM-U-12 菌株试验了积累乳清酸的最佳工艺条件.

2.3.1 碳源对产酸的影响 在发酵培养基中分别加入不同质量浓度的葡萄糖,产乳清酸情况见图4。

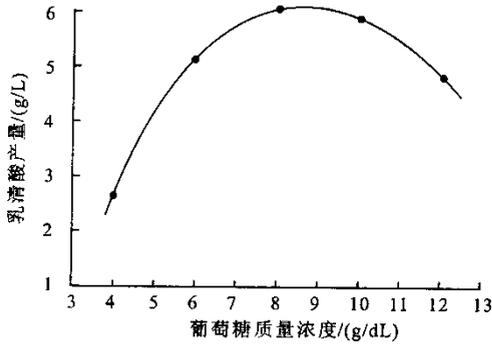


图4 葡萄糖对 U-12 菌株发酵产乳清酸的影响

Fig.4 Effect of glucose concentration on orotic acid production of strain U-12

从图4可以看出,葡萄糖质量浓度为8 g/dL时,乳清酸产量最高,达到5.91 g/L。

2.3.2 氮源对产酸的影响 在无氮源的发酵培养基中分别加入不同质量浓度的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,产乳清酸情况见图5。

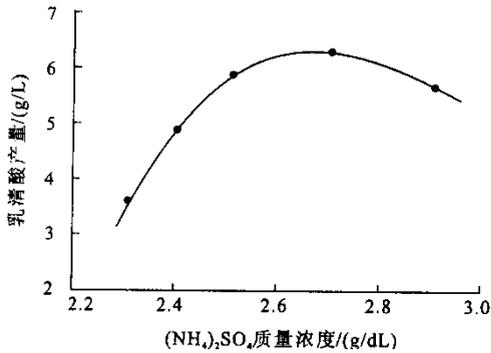


图5  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 对 U-12 菌株发酵产乳清酸的影响

Fig.5 Effect of ammonium sulfate concentration on orotic acid production of strain U-12

图5的结果表明,当 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的质量浓度为2.7 g/dL时,产酸量最高,达到6.31 g/L。

2.3.3 酵母膏对产酸的影响 图6表明乳清酸的积累明显受培养基中加入的酵母膏质量浓度的影响。酵母膏的最适质量浓度在0.15 g/dL左右。过量的酵母膏质量浓度趋向于抑制乳清酸的积累。随着酵母膏质量浓度的下降,乳清酸的积累量迅速下降,

在0.15 g/dL时,乳清酸的产量达到了8.6 g/L。

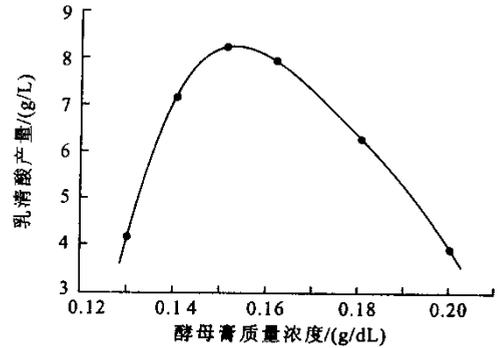


图6 酵母膏对 U-12 菌株发酵产乳清酸的影响

Fig.6 Effect of yeast extract concentration on orotic acid production of strain U-12

### 3 结论

依据微生物嘧啶核苷酸生物合成的代谢调控理论,以一株谷氨酸棒杆菌为出发菌株,以尿嘧啶营养缺陷型为选育筛子,采用遗传诱变育种手段,选育到一株尿嘧啶营养缺陷型突变株 JSIM-U-12 菌株,能以葡萄糖为碳源,硫酸铵为氮源发酵积累乳清酸。

U-12 菌株的发酵产物经纸层析、纸电泳、紫外吸收光谱和红外吸收光谱鉴定,确认为是乳清酸物质。

碳源和氮源是影响 U-12 菌株生产乳清酸的两个重要因素。

酵母膏质量浓度是影响 U-12 菌株生产乳清酸的最关键因素。培养基中酵母膏的质量浓度必须亚适量控制。过低的酵母膏质量浓度不能为菌株的生长提供充足的尿嘧啶类物质,细胞生物量太低,乳清酸的产量就不会高;过高的酵母膏质量浓度使得培养基中含有过量的尿嘧啶类物质,这反过来对细胞的嘧啶核苷酸代谢途径增加了反馈抑制作用和反馈阻遏作用,抑制乳清酸的积累。

培养基中亚适量酵母膏质量浓度仍旧对代谢途径存在一定的调控机制,如果要遗传性地彻底解除这种反馈调控机制,可以从 U-12 菌株进一步选育出嘧啶结构类似物抗性突变株,并进一步优化培养条件,乳清酸的发酵产量还可进一步提高。

### 参考文献:

- [1] 陈陶声. 近代工业微生物学(上册) [M]. 上海: 科学技术出版社, 1979. 120-125.
- [2] 袁开基, 夏鹏. 有机杂环化学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1984. 237-272.
- [3] Herschel K Mitchell, Mary B Houlahan. The accumulation of orotic acid by a pyrimidine-less mutant of neurospora [J]. *J Biol Chem*, 1948, 172: 525-529.

其膜的有序性. 所以, 对于在实验中所存在的膜的有序结构的变化, 不仅是非平衡的产物, 同时也是

非理想性的产物. 这可能是耗散结构有序原理和 Boltzmann 有序原理两者同时起作用的结果.

## 参考文献:

- [ 1 ] Rout D K , Barman S P , Pulpura S K , *et al.* Cholesteric mesophases formed by the modified biological macromolecule 3,6-O-( Butyl Carbamate )-N-phthaloyl Chitosan[ J ]. **Macromolecules** , 1994 , 27 ( 11 ) : 2945 - 2949 .
- [ 2 ] Dong Yanming , Zhang Jing . Studies on liquid crystalline behavior of chitosan[ J ]. **Chem J Chin Uni** , 1996 , 17 ( 6 ) : 973 - 977 .
- [ 3 ] Dong Yanming , Li Zhiqiang . Structure studies on solution casting film of chitosan and its derivatives[ J ]. **Guangzhou Chemistry** , 1997 , 4 ( 1 ) : 24 - 29 .
- [ 4 ] Dong Yanming , Li Zhiqiang . Synthesis and characterization of a new chitosan derivatives with liquid crystalline behavior-O-Cynaoethylchitosan[ J ]. **Chem J Chin Uni** , 1998 , 19 ( 8 ) : 1343 - 1345 .
- [ 5 ] Dong Yanming , Wang Jianwei , Mei Xuefeng , *et al.* Studies on chitin-based liquid crystalline polymers II . influence of side chain length and substitution degree on the liquid crystalline behavior of acylated chitosans[ J ]. **Acta Polymerica Sinica** , 1999 , 12 ( 6 ) : 668 - 673 .
- [ 6 ] Bellamy L J . The Infra-red Spectra of Complex Molecules[ M ]. New York : John Wiley , 1958 . 473 .
- [ 7 ] Sun Runguang , Yang Fushe , Zhang Jing , *et al.* Liquid crystal state and dissipative structure[ J ]. **Journal of Xi 'an Highway University** , 1999 , 19 ( 3 ) : 133 - 137 .

( 责任编辑 杨 勇 )

( 上接第 35 页 )

- [ 4 ] Marcus S Brooke , Daizo Ushiba . Some factors affecting the excretion of orotic acid by mutants of aerobacter aerogenes[ J ]. **J Bacteriol** , 1954 , 68 : 534 .
- [ 5 ] Isao Kawamoto , Takashi Nara . Fermentative production of orotic acid and orotidine from hydrocarbor[ J ]. **Agr Biol Chem** , 1970 . 34 , 8 : 1142 - 1149 .
- [ 6 ] Kiyoshi Nakayama , Zenroku Sato . Production of nucleic acid related substances by fermentative process[ J ]. **Nippon Nogei Kagaku Kaishi** , 1965 , 39 ( 3 ) : 118 - 122 .
- [ 7 ] Nye Mitchell . Prepn by condensation of urea with monoethyl ester of oxalacetic acid in methano[ J ]. **J Am Chem Soc** , 1947 , 69 : 1382 .
- [ 8 ] Muller . Older syntheses from urea with oxalacetic ester[ J ]. **J Prakt Chem** , 1897 , 56 : 488 .
- [ 9 ] 张克旭 , 杜连祥 . 核酸发酵[ M ]. 北京 : 轻工业出版社 , 1980 .

( 责任编辑 李春丽 )