

L-脯氨酸产生菌的选育

张伟国

(中央研究所)

摘要 以嗜乙酰乙酸棒杆菌 ATCC13870 为出发菌株,经硫酸二乙酯(DES)和亚硝基胍(NTG)逐级诱变处理,结构类似物定向选育,获得一株 L-脯氨酸高产菌 ZQ-3(SG^r,Suc^r,DHP^r)。在含 16% 葡萄糖的培养基中,摇瓶发酵 72h,产酸率为 5.3%~5.5%。

主题词 脯氨酸; 育种; 嗜乙酰乙酸棒杆菌

中图分类号 TS201.57

0 前言

L-脯氨酸在医药、农业、化工及食品等方面有着广泛的用途。在医药工业上,L-脯氨酸用于配制复合氨基酸输液,是治疗高血压和心肌衰竭药物甲硫丙脯酸、治疗帕金森氏综合症的多肽类药物的原料。在农业上,L-脯氨酸可作为农作物的增产剂。在化学工业上,可用于不对称合成和作为氢化、聚合、水解等反应的催化剂。本研究以嗜乙酰乙酸棒杆菌(*Corynebacterium acetoacidophilum*)ATCC13870 为出发菌株,经化学诱变处理和 SG、Suc、DHP 等药物平板定向选育,成功地选育到一株 L-脯氨酸高产菌 ZQ-3(SG^r,Suc^r,DHP^r),摇瓶产酸率达 5.3%~5.5%。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 出发菌株 嗜乙酰乙酸棒杆菌(*Corynebacterium acetoacidophilum*)ATCC13870。

1.1.2 培养基(%)

1) 完全培养基 葡萄糖 0.5,牛肉膏 1.0,蛋白胨 1.0,NaCl 0.5,琼脂 2.0。

2) 基础培养基 葡萄糖 2.0,(NH₄)₂SO₄ 0.15,KH₂PO₄ 0.1,K₂HPO₄ 0.3,MgSO₄·7H₂O 0.01,MnSO₄·4H₂O 0.001,FeSO₄·7H₂O 0.001,VH₃₀μg/L,VB₁·HCl 100μg/L,尿素 0.15,琼脂 2.0。

3) 种子培养基 葡萄糖 2.5,(NH₄)₂SO₄ 0.2,KH₂PO₄ 0.1,MgSO₄·7H₂O 0.05,玉米

收稿日期:1995-06-01

浆 3.5, 尿素 0.3, CaCO_3 1.0.

4) 发酵培养基 葡萄糖 12~15, NH_4Cl 6.0, KH_2PO_4 0.1, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05, VH50 ~100 $\mu\text{g/L}$, 玉米浆 0.5~1.0, 谷氨酸钠 1.5~3.0, CaCO_3 4.0.

完全、基础和种子培养基均以 20%NaOH 调 pH6.8~7.0, 0.1MPa 压力下灭菌 20min.

发酵培养基以 20%NaOH 调 pH7.0, 0.07MPa 压力下灭菌 10min.

1.1.3 主要试剂 硫酸二乙酯(DES)为上海试剂厂产品;亚硝基胍(NTG)为瑞士 Fluka 公司产品;磺胺胍(SG)和 3,4-脱氢脯氨酸(DHP)均为美国 Sigma 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 诱变方法 常规化学诱变法^[1]。

1.2.2 筛选方法

1) 平板筛选 将诱变处理菌液涂布于含有一定量的结构类似物的基础培养基上, 30℃培养 2~4d, 挑出生长的菌落, 即为结构类似物抗性变异株。将基础培养基中葡萄糖更换为 5%琥珀酸, 即得琥珀酸培养基(Succinic acid medium, Suc)。将诱变处理菌液涂布于 Suc 平板上, 30℃培养 2~4d, 挑出生长迅速的菌落, 即为 Suc⁺ 变异株。

2) 摇瓶筛选 将平板筛选获得的变异株接一环于装有 15ml 发酵培养基的 250ml 三角瓶中, 30℃振荡培养 72h, 用纸层析法分离, 比色法测定发酵液中的 L-脯氨酸。

1.2.3 分析方法

1) 菌体生长 吸取 0.2ml 样品菌液到 5ml 0.25mol/L HCl 溶液中, 摇匀后测定 OD_{562nm} 值。

2) pH 用精密 pH 试纸和酸度计测定。

3) 葡萄糖 菲林试剂滴定法^[2]。

4) L-脯氨酸 纸层析定性测定, 用吡啶显色法^[3]; 定量测定, 用 Chinard 比色法^[4] 及氨基酸自动分析仪测定。

5) L-谷氨酸 Warburg 氏微量呼吸仪测定^[2]。

2 结果与讨论

2.1 结果

2.1.1 L-脯氨酸产生菌选育谱系 从野生型谷氨酸产生菌——嗜乙酰乙酸棒杆菌 ATCC13870 出发, 采用 DES 和 NTG 诱变处理, 依次赋予 SG⁺、Suc⁺、DHP⁺ 遗传标记, 最后获得一株 L-脯氨酸高产菌 ZQ-3(图 1)。在最佳发酵工艺条件下(表 1), 摇瓶产酸 5.3%~5.5%。

SG⁺ 磺胺胍抗性; Suc⁺ 在琥珀酸培养基上生长迅速; DHP⁺ 3,4-脱氢脯氨酸抗性。

2.1.2 几种培养基成分对 L-脯氨酸积累的影响

1) 生物素的影响 生物素添加量对脯氨酸积累的影响如图 2 所示。结果表明当生物

菌株	L-脯氨酸(%)
嗜乙酰乙酸棒杆菌 ATCC13870	0
↓ DES	
P1-154(SG ⁺)	1.3
↓ DES	
P2-212(SG ⁺ , Suc ⁺)	2.2
↓ NTG	
P3-97(SG ⁺ , Suc ⁺ , DHP ⁺)	4.6
↓ 单菌落分离及工艺改良	
ZQ-3(SG ⁺ , Suc ⁺ , DHP ⁺)	5.3~5.5

图 1 L-脯氨酸高产菌 ZQ-3 选育谱系

素添加量为 50 $\mu\text{g/L}$ 时,脯氨酸积累最多,为 4.7%。

2) NH_4Cl 的影响 如图 3。从图 3 可知,当 NH_4Cl 添加量为 6% 时,脯氨酸积累最多,为 5.2%。

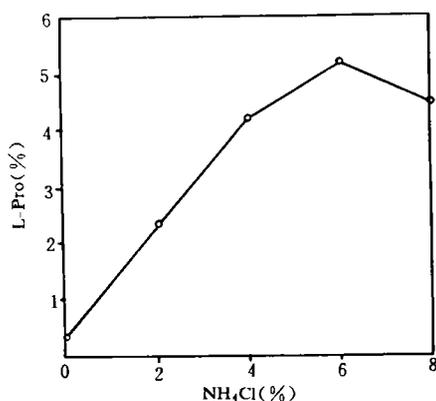


图 2 生物素对脯氨酸积累的影响

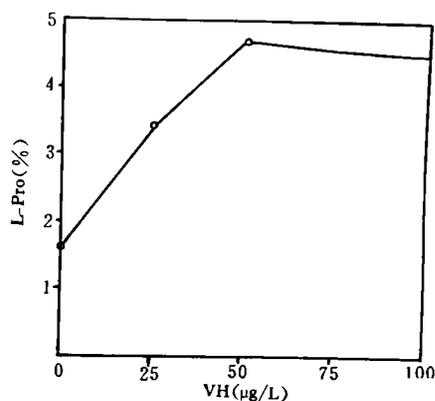


图 3 NH_4Cl 对脯氨酸积累的影响

表 1 L-脯氨酸摇瓶发酵最佳条件

成分	种子培养基	发酵培养基
葡萄糖 (%)	2.5	16.0
NH_4Cl (%)		6.0
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (%)	0.5	
玉米浆 (%)	4.0	0.5
KH_2PO_4 (%)	0.1	0.1
MgSO_4 (%)	0.05	0.05
谷氨酸钠 (%)		2.5
VH ($\mu\text{g/L}$)		50
CaCO_3 (%)	1.0	4.0
pH	7.0	7.0
装液量* (ml)	50	12.5
接种量 (%)	/	4
温度 ($^\circ\text{C}$)	30	30
培养时间 (h)	11	72

* 250ml 三角瓶

3) 谷氨酸的影响 如图 4。结果表明当谷氨酸钠为 2.5% 时,脯氨酸积累达到最大,为 5.1%。

2.1.3 最佳培养基和最佳培养条件的确定 采用正交试验方法试验各种营养因素以及综合考虑装液量、种龄和接种量等对 ZQ-3 株 L-脯氨酸发酵的影响,所得到的摇瓶发酵最佳条件列于表 1。

2.1.4 ZQ-3 菌株 L-脯氨酸发酵过程曲线 典型的 L-脯氨酸摇瓶发酵过程曲线如图 5 所示。

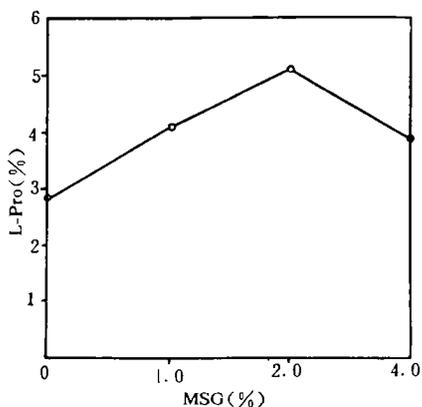


图 4 谷氨酸对脯氨酸积累的影响

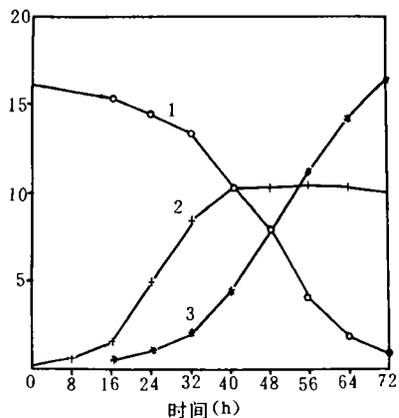


图 5 ZQ-3 菌株 L-脯氨酸发酵过程曲线

1 Rg (%) 2 OD × 10 3 L-Pro × 3

2.2 讨论

2.2.1 培养基中添加生物素、NH₄Cl 和谷氨酸的作用 谷氨酸发酵向脯氨酸发酵转换过程中,生物素是一个关键因素。当生物素添加量为 50μg/L,脯氨酸的产量最高。显然,生物素最适添加量远远大于谷氨酸发酵时所需量。生物素的作用有二个^[5],一是影响细胞膜透性,使谷氨酸不向膜外渗漏而停留在细胞内,结果导致细胞为了解毒而将谷氨酸转化为脯氨酸;二是促进脯氨酸的合成,但其详细作用机制尚不明。

在最适培养条件下,NH₄Cl 添加量为 6%。NH₄Cl 的作用可分为两个方面加以解释:其一是供给 NH₄⁺,为氨基酸生物合成提供氮源;其二是 Cl⁻ 的作用,当高浓度 Cl⁻ 存在时,可影响细胞形态的变化^[6],生长的细胞为非谷氨酸积累型细胞,不伸长膨胀,类似于生物素丰富条件下生长的细胞形态^[7],同时 Cl⁻ 作为生物代谢酶的激活剂^[8]也起着重要作用。

谷氨酸作为生物合成脯氨酸的前体,参与了脯氨酸发酵,因此添加谷氨酸可较大幅度地提高脯氨酸的产量。

2.2.2 SG^r、Suc^s 和 DHP^r 的作用 磷酸烯醇式丙酮酸经磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶催化生成草酰乙酸,草酰乙酸与乙酰 CoA 缩合生成柠檬酸,柠檬酸经异构裂解生成 α-酮戊二酸,α-酮戊二酸还原氨基化生成谷氨酸,谷氨酸进一步生成脯氨酸。细胞内过量的谷氨酸和脯氨酸会反馈抑制磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶。选育 SG^r 变异株^[9],就能遗传性地解除产物对磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶的反馈抑制,提高 CO₂ 固定能力。

以琥珀酸为唯一碳源,如果菌体生长,碳代谢只能走四碳二羧酸脱羧反应。生长越快,四碳二羧酸脱羧酶系越强。而四碳二羧酸脱羧反应与 CO₂ 固定反应所用的酶是一个酶,所以以琥珀酸为唯一碳源菌体生长快,CO₂ 固定反应就强^[10]。如果四碳二酸完全通过 CO₂ 固定反应供给,理论上 1mol 葡萄糖可以生成 1mol 脯氨酸,其最高理论收率 64.0%;倘若 CO₂ 固定反应完全不起作用,通过乙醛酸循环供给四碳二羧酸,理论上 1.5mol 葡萄糖可以生成 1.0mol 脯氨酸,其最高理论收率仅为 42.7%。因此 Suc^s 变异株能提高脯氨酸的产酸率和转化率。

L-脯氨酸对脯氨酸生物合成的第一个酶——L-谷氨酸激酶存在反馈抑制。选育脯氨酸结构类似物变异株能遗传地解除脯氨酸对谷氨酸激酶的反馈抑制。DHP 为脯氨酸结构类似物,因此 DHP^r 变异株能遗传地解除脯氨酸对谷氨酸激酶的反馈抑制^[9~11]。

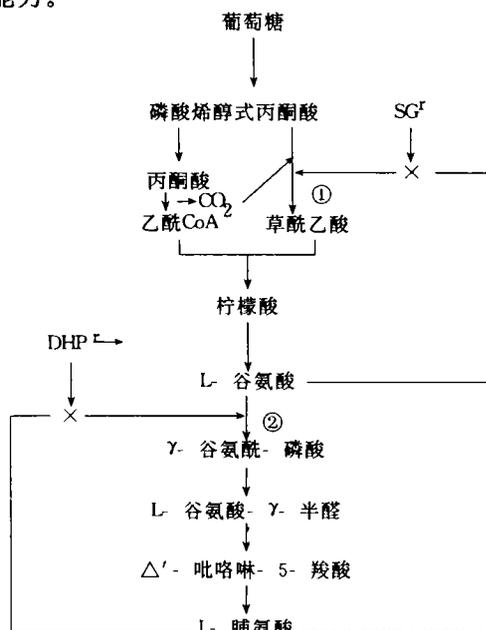


图 6 L-脯氨酸生物合成途径及反馈调节机制

① 磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶 ② L-谷氨酸激酶

→ 反馈抑制 X 解除反馈抑制

参 考 文 献

- 1 章名春. 工业微生物诱变育种. 科学出版社, 1984
- 2 无锡轻院, 等. 工业发酵分析. 轻工业出版社, 1980
- 3 Chinard F P J. Biol. Chem. 1952, 199: 91~95
- 4 潘家秀等. 蛋白质化学研究技术. 科学出版社, 1973
- 5 天津轻院等. 氨基酸发酵工艺学. 轻工业出版社, 1981
- 6 Nakanishi T J. Ferment Technol. 1977, 54(2): 224~232
- 7 Kinoshita S et al. Institute Appl. Microbiol. (Tokyo), 1959, 1: 146
- 8 沈仁权等. 基础生物化学. 上海科学出版社, 1980
- 9 Sugiura M et al. Appl. Environ. Microbiol., 1985, 49(4): 782~786
- 10 郭杰炎等译. Dolle, H.M. 细菌的新陈代谢. 科学出版社, 1983. 437~438
- 11 Nakamori S et al. Agric. Biol. Chem. 1982, 46(2): 487~491

Breeding of L-Proline Producing Mutant

Zhang Weiguo

(Central Research Institute)

Abstract Using *Corynebacterium acetoacidophilum* ATCC13870 as a starting strain for stepwise induction by diethyl sulfate (DES) and N-methyl-N'-nitrosoguanidine (NTG) treatment, a proline over-producing mutant ZQ-3(SG^r, Suc^r, DHP^r) was obtained. 5.3%~5.5% of L-proline was accumulated in a medium containing 16% glucose.

Subject-words Proline; Mutagenesis; *Corynebacterium acetoacidophilum*