

文章编号 :1009-038X(2002)05-0533-03

L-组氨酸产生菌的选育

顾正华, 张伟国*

(江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214036)

摘要:以谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*) ATCC-13761 为出发菌株,经硫酸二乙酯(DES)和亚硝基胍(NTG)诱变处理, D-组氨酸(D-His) 6-氮鸟嘌呤(6-AU)等结构类似物平板和以 L-组氨酸(L-His)为惟一氮源平板定向筛选,获得一株 L-组氨酸产生菌 H-24(D-His^r 6-AU^r Hisase⁻).在加有 150 g/L 葡萄糖、35 g/L 硫酸铵以及 10 mL/L 玉米浆的发酵培养基中发酵 72 h, 产 L-组氨酸 1.6 g/L.

关键词:谷氨酸棒杆菌;化学诱变;育种;发酵;L-组氨酸

中图分类号:Q 933

文献标识码:A

Breeding of L-Histidine Producing Mutant

GU Zheng-hua, ZHANG Wei-guo

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

Abstract: L-Histidine producing mutants were derived from *Corynebacterium glutamicum* ATCC-13761, by means of mutagenesis with N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG) and diethyl sulfate (DES). The mutants were selected on the agar plates containing D-histidine, 6-Azauracil and L-histidine medium plate. A L-histidine producing mutant H-24 (D-His^r 6-AU^r Hisase⁻) obtained can accumulate about 1.6 g/L L-histidine in a medium containing 150 g/L glucose, 35 g/L ammonium sulfate and 10 mL/L corn steep liquor.

Key words: *Corynebacterium glutamicum*; chemical mutagenesis; breeding; fermentation; L-histidine

L-组氨酸属于半必需氨基酸,对于婴幼儿及动物的成长尤其重要.成人及已成长动物的膳食或饲料中无组氨酸亦能维持其氮平衡.目前 L-组氨酸主要应用于医药、食品和饲料等方面,国内仅有提取法少量生产,尚无研究发酵法.

本实验以一株谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*) ATCC-13761 为出发菌株,经硫酸二乙酯(DES)和亚硝基胍(NTG)多次诱变处理,获得产

L-组氨酸的产生菌 H-24(D-His^r6-AU^rHisase⁻).

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种 以谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*) ATCC-13761 为出发菌株.

1.1.2 培养基(g/L) 完全培养基:葡萄糖 10,牛肉膏 10,蛋白胨 10, NaCl 5,琼脂 20, pH 7.0.

收稿日期 2002-03-20; 修订日期 2002-07-01.

作者简介:顾正华(1974-)男,江苏江阴人,助理工程师,学士;*责任作者.

万方数据

种子培养基:葡萄糖 25 (NH₄)₂SO₄ 5,玉米浆 40, KH₂PO₄ 1, MgSO₄·7H₂O 0.5, CaCO₃ 10, pH 7.0.

发酵培养基:葡萄糖 150 (NH₄)₂SO₄ 35,玉米浆 10, KH₂PO₄ 1.0, MgSO₄·7H₂O 0.5, CaCO₃ 30, pH 7.0.

1.1.3 主要试剂 亚硝基胍(NTG)、D-组氨酸(D-His)、6-氨基鸟嘧啶(6-AU)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 平板筛选

结构类似物变异株的获得:将诱变处理后的菌液涂布于加有结构类似物的基本培养基上,培养 2~3 d,挑出单菌落,即得结构类似物抗性变异株.

组氨酸酶缺陷型变异株的筛选:将诱变处理后的菌液涂布于完全培养基上,培养 2 d,挑出单菌落后,对照移接于以 L-组氨酸为唯一氮源的基本培养基上,挑出不能在组氨酸平板上生长的菌株,即得组氨酸酶缺陷型变异株.

1.2.3 种子培养 接一环斜面种子于装有 40 mL 种子培养基的 250 mL 三角瓶中,于往复式摇床上 30 ℃ 振荡培养 11 h,频率 85 次/min,振幅 90 mm.

1.2.4 摇瓶发酵 接 1 mL 种子液于装有 25 mL 发酵培养基的 500 mL 三角瓶中,于往复式摇床上 30 ℃ 振荡培养 72 h,频率 100 次/min,振幅 90 mm.

1.2.5 分析方法

葡萄糖:菲林试剂法^[2].

L-组氨酸:纸层析测定,用 Pauly 试剂显色^[3],氨基酸自动分析仪测定.

2 结果与讨论

2.1 L-组氨酸产生菌 H-24 的选育

从一株谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*) ATCC-13761 为出发菌株,采用 NTG 和 DES 诱变处理,使之具有 D-His^r 6-AU^r Hisase⁻ 等遗传特性,得到一株 L-组氨酸产生菌 H-24,在适当的发酵条件下,产酸达 1.6 g/L. 选育谱系如图 1.

2.2 L-组氨酸摇瓶发酵试验

对 H-24 进行摇瓶发酵试验,结果发现,碳源和氮源不足影响产酸,在添加了足够的葡萄糖 150 g/L 和硫酸铵 35 g/L 时,主要影响产酸的因素是玉米浆和生物素.

从图 2 可看出,当玉米浆添加量为 10 mL/L 时,产酸最高,多于或少于此量时,产酸均下降.从

图 3 的生物素试验可看出,由于培养基中已添加玉米浆,因此没有必要再添加生物素;当生物素添加质量浓度达 100 μg/L 时,几乎不积累组氨酸,其原因可能与组氨酸酶有关;当培养基中生物素质量浓度较大时,组氨酸酶活增大,生成的组氨酸便被分解.

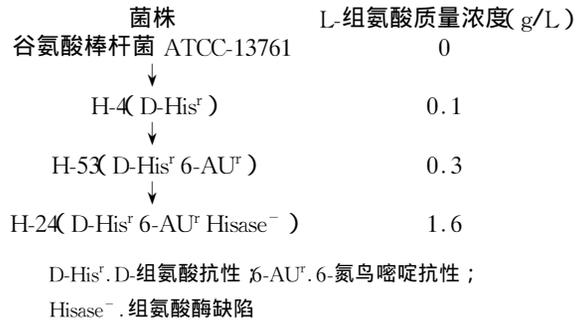


图 1 L-组氨酸产生菌 H-24 的选育谱系

Fig. 1 The pedigree of the strain H-24

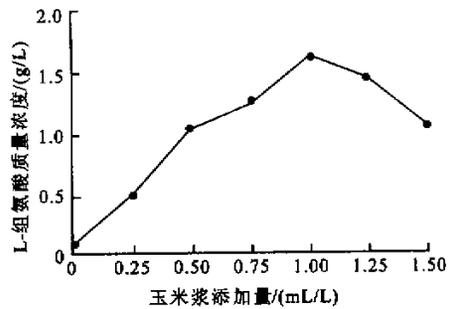


图 2 添加玉米浆对产酸的影响

Fig. 2 The effect of corn steep liquor on histidine production

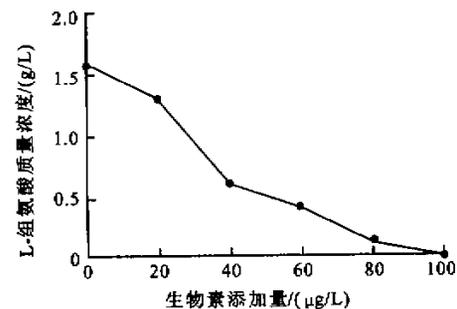


图 3 添加生物素对产酸的影响

Fig. 3 The effect of biotin on histidine production

在此基础上,对发酵培养基进行调整,效果均不明显,这可能是因为菌种产组氨酸水平还不高,而所选配比也接近最佳配培养基.所以通过实验,L-组氨酸发酵比较合适的培养基(g/L)如下:葡萄糖 150 (NH₄)₂SO₄ 35,玉米浆 10, KH₂PO₄ 1.0, MgSO₄·7H₂O 0.5, CaCO₃ 30, pH 7.0. 发酵 72 h,产组氨酸 1.6 g/L.

2.3 讨论

2.3.1 解除反馈抑制和反馈阻遏

L-组氨酸的生物合成途径^[4]如下图所示.由PRPP和ATP生物合成组氨酸共11步反应,有2个酶是双功能酶,共有9个酶催化.组氨酸操纵子的9个酶的基因表达由同一个操纵基因控制.L-组氨酸合成途径中的第一步反应是由磷酸核糖-ATP焦磷酸化酶催化的限速反应(由PRPP与ATP合成磷酸核糖-ATP的反应),关键酶磷酸核糖-ATP焦磷酸化酶受L-组氨酸的反馈抑制.当组氨酸量超过微生物生理需要时,终产物组氨酸还会反馈阻遏参与组氨酸生物合成的所有酶的生成,这种阻遏属于协调阻遏.

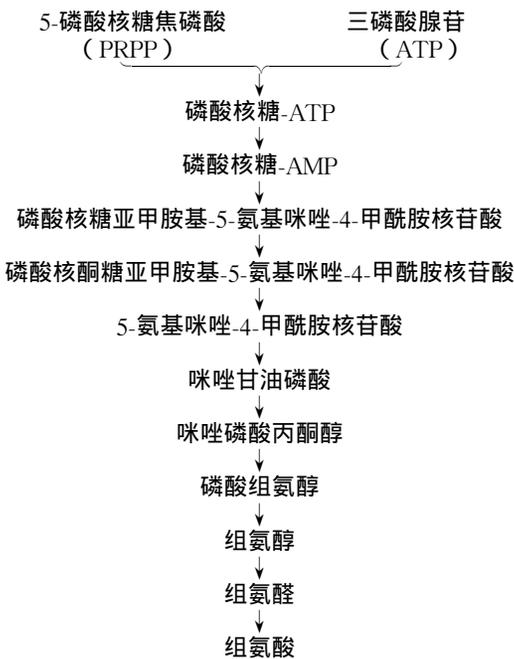


图4 L-组氨酸的生物合成途径

Fig.4 The pathway of histidine biosynthesis

L-组氨酸的结构类似物D-组氨酸的作用是替代L-组氨酸,对磷酸核糖-ATP焦磷酸化酶起反馈抑制作用并参与组氨酸生物合成所有酶的反馈阻遏,使得在加了D-组氨酸的基本培养基上L-组氨酸反馈抑制和反馈阻遏的菌株不能生长.只有解除反馈菌株方能生长,从而得到解除L-组氨酸反馈抑制和反馈阻遏的菌株,这个菌株才能积累L-组氨酸.

2.3.2 增加前体的合成 5-磷酸核糖焦磷酸(PRPP)和三磷酸腺苷(ATP)是L-组氨酸合成的前体,PRPP的合成受到鸟嘌呤的抑制^[5].选育鸟嘌呤结构类似物6-氨基鸟嘌呤(6-AU)抗性菌株,PRPP合成量增加,从而使L-组氨酸合成增加.

2.3.3 切断产物的代谢途径

微生物中组氨酸的代谢主要通过组氨酸酶进行脱羧和脱氨^[6],生成组胺和咪唑乳酸.利用以L-组氨酸为唯一氮源的平板筛选不能分解L-组氨酸的Hisase⁻突变菌株H-24,结果产酸得到较大幅度提高.

在实验过程中,发现组氨酸的代谢对组氨酸积累影响极大.这与其他氨基酸产生菌的选育不同.在解除组氨酸合成途径的反馈抑制和反馈阻遏后,所合成产物基本被分解,而切断产物的代谢途径后,组氨酸才有较多积累. Kazumi Araki 等人的实验中均未提及L-组氨酸代谢对积累组氨酸的影响,仅解除反馈抑制和反馈阻遏,便积累至8 g/L,可能其所用菌种与作者所用者在代谢上有所不同.

为此,作者将作进一步工作,根据此菌株的生理特性,继续提高菌种水平,以达到应用水平.

参考文献:

- [1] 章名春. 工业微生物诱变育种[M]. 北京: 科学出版社, 1984. 77-96.
- [2] 无锡轻工业学院, 天津轻工业学院, 大连轻工业学院等. 工业发酵分析[M]. 北京: 轻工业出版社, 1980.
- [3] 华家桢. 实用蛋白质化学技术[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1982. 180-187.
- [4] KAZUMI ARAKI, KIYOWA HAKKO. A biochemical characterization of histidine auxotrophs of *Corynebacterium glutamicum* [J]. *Agri Biol Chem*, 1974, 38(11): 2219-2225.
- [5] KAZUMI ARAKI, SETSUKO SHIMOJO, KIYOSHI NAKAYAMA. Histidine production by *Corynebacterium glutamicum* Mutants, multiresistant to analogs of histidine, tryptophan, purine and pyrimidine [J]. *Agri Biol Chem*, 1974, 38(4): 837-846.
- [6] 沈仁权. 基础生物化学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1980. 602.