

文章编号:1009-038X(2004)02-0082-04

L-谷氨酰胺高产菌株的选育和发酵条件优化

杨梅, 张伟国

(江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 生物工程学院, 江苏 无锡 214036)

摘要: 采用嗜乙酰乙酸棒杆菌(*Corynebacterium acetoacidophilum*) ATCC13870 为出发菌株, 经亚硝基胍、硫酸二乙脂和⁶⁰Co 诱变处理, 定向选育出一株 L-谷氨酰胺产生菌 G21-8. 在适宜的条件下积累 L-谷氨酰胺, 平均质量浓度为 32.5 g/L, 最大时可达 36.7 g/L, 谷氨酸产量较少.

关键词: 谷氨酰胺; 诱变; 育种; 发酵

中图分类号: Q 933

文献标识码: A

Breeding of L-Glutamine Hyper-Producer and Optimization of Its Fermentation

YANG Mei, ZHANG Wei-guo

(The Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, School of Biotechnology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: Original strain *Corynebacterium acetoacidophilum* ATCC13870 was mutated by NET, DES and ⁶⁰Co. As a result of a strain named G21-8, producing Glutamine was obtained. Under optimum condition, G21-8 was able to accumulate an average of 32.5 g/L, and the highest of 36.7g/L of L-Glutamine.

Key words: L- glutamine; mutation; breeding; fermentation

L-谷氨酰胺 (L-Glutamine, L-Gln) 是 L-谷氨酸的 γ -羧基酰胺化的一种氨基酸, 其结构式为 $\text{NH}_2\text{OC}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$, 相对分子质量 146.15, 分解温度 185℃, 等电点 5.65, 属中性氨基酸. 作为 20 种构成蛋白质的基本氨基酸之一, L-谷氨酰胺占人体全身游离氨基酸一半以上, 是机体含量最丰富的氨基酸, 在生物体代谢中起着举足轻重的作用, 是一种“条件性必需”氨基酸. 自 1952 年用 X 光衍射确定了其分子结构后, 对它的应用日益引起人们的关注, 被认为是目前所知道的最重要

的氨基酸之一, 也是一种极有发展前途的新药^[1].

谷氨酰胺的广泛用途促使其生产得以迅速发展. 目前主要的生产方法有化学酰化法和直接发酵法, 我国多采用发酵法制得的 L-谷氨酸来酰化制取, 此法成本较高, 从而限制了 L-谷氨酰胺的使用, 因此直接发酵法是 L-谷氨酰胺生产的发展趋势^[2,3]. 直接发酵法最关键的问题是要有优良的生产菌株, 选育高产的 L-谷氨酰胺生产菌非常重要, 本实验就此问题作了初步的探讨.

收稿日期: 2003-06-05; 修回日期: 2003-08-15.

作者简介: 杨梅 (1979-), 女, 安徽铜陵人, 发酵工程硕士研究生.
万方数据

1 材料与方 法

1.1 菌种

嗜乙酰乙酸棒杆菌 (*Corynebacterium acetoacidophilum*) ATCC13870, 本实验室保藏。

1.2 培养基

1.2.1 基本培养基 组分 (g/L): 葡萄糖 20, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.5, KH_2PO_4 1, K_2HPO_4 3, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.01, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01, 尿素 1.5, 琼脂粉 20, 生物素 30 $\mu\text{g/L}$, 硫酸素 $\cdot \text{HCl}$ 100 $\mu\text{g/L}$, pH 7.0。

1.2.2 完全培养基 组分 (g/L): 葡萄糖 5, 蛋白胨 10, 牛肉膏 10, NaCl 5, 琼脂 25, pH 7.0。

1.2.3 摇瓶种子培养基 组分 (g/L): 葡萄糖 25, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5, 玉米浆 40, KH_2PO_4 1, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, CaCO_3 10, pH 7.0。

1.2.4 摇瓶发酵培养基 组分 (g/L): 葡萄糖 120, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 50, 玉米浆 4, KH_2PO_4 1, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.01, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01, 碳酸钙 30, pH 7.5。

1.3 培养方法

1.3.1 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 $^\circ\text{C}$ 振荡培养 10 h, 频率 85 次/min, 振幅 90 mm。

1.3.2 发酵培养 接 0.5 mL 种子液于装有 15 mL 发酵培养基的 250 mL 三角瓶中, 于往复式摇床上 30 $^\circ\text{C}$ 振荡培养 72 h, 频率 100 次/min, 振幅 90 mm。

1.4 诱变筛选方法

采用常规化学诱变^[4]。亚硝基胍 (NTG) 诱变质量浓度为 500 $\mu\text{g/mL}$, 用琥珀酸平板筛选; 硫酸二乙酯 (DES) 的诱变体积分数为 0.02%, 用磺胺胍 (SG) 平板筛选; 两者诱变处理时间均为 20 min。 γ 射线的照射源为 ^{60}Co , 诱变剂量为 1 000 Gy, 处理时间为 30 min, 用磺胺胍 (SG) 平板筛选。30 $^\circ\text{C}$ 恒温培养 3~6 d, 挑选出单菌落于完全培养基上, 待用。

1.5 分析方法

1.5.1 pH 值测定 国产精密 pH 试纸。

1.5.2 菌体生长测定 取 0.2 mL 待测液, 加入 5 mL 0.25 mol/L 盐酸溶液中, 摇匀, 用 721 型分光光度计, 1 cm 光程 562 nm 测 OD 值。

1.5.3 发酵液中还原糖的测定 菲林试剂滴定法^[5]。

1.5.4 谷氨酰胺测定 采用新华 3 号滤纸在室温

下用不饱和法展开, 展开剂用 $V(\text{正丙醇}) : V(\text{浓氨水}) = 5 : 2$ 上行法展开。称取一定量的谷氨酰胺标准样品, 配成 1%, 1.5%, 2%, 2.5%, 3% 等几种不同质量浓度的溶液, 每种溶液点样 1 μL 。发酵液经离心后, 取其上清液点样 1 μL 。展析完毕用热风吹干滤纸, 用 0.5 g/dL 茚三酮丙酮溶液显色, 105 $^\circ\text{C}$ 烘干 5 min, 滤纸上立即出现紫红色的氨基酸斑点。剪下氨基酸斑点, 用洗脱液为 $V(0.1 \text{ g/dL } \text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}) : V(\text{体积分数 } 75\% \text{ 乙醇}) = 2 : 38$, 洗脱 30 min, 然后在 520 nm 处测定光密度, 从标准曲线上可求得发酵液中 L-谷氨酰胺的含量。

1.6 主要试剂

亚硝基胍 (NTG): 瑞士 Fluka 公司产品; 磺胺胍 (SG): 美国 Sigma 公司产品; 硫酸二乙酯 (DES) 和琥珀酸 (Succinic acid, Suc): 上海试剂厂产品。

2 结果与讨论

2.1 L-谷氨酰胺诱变过程

从一株嗜乙酰乙酸棒杆菌 (*Corynebacterium acetoacidophilum*) ATCC13870 为出发菌株, 采用 NTG、DES 和 γ 射线诱变处理, 使之获得 $\text{Suc}^{\text{S}}\text{SG}^{\text{R}}$ 等遗传特性, 得到一株 L-Gln 产生菌 G21-8, 在适宜工艺条件下发酵液中可积累 Gln 32.5 g/L, 最大时可达 36.7 g/L。选育过程见图 1。

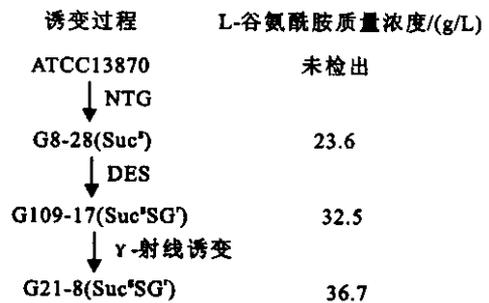


图 1 L-谷氨酰胺产生菌诱变过程

Fig. 1 Process of L-Gln producing mutants

2.2 G21-8 摇瓶发酵

2.2.1 硫酸铵和氯化铵对产酸的影响 实验中选用不同质量浓度 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 和 NH_4Cl 做氮源, 结果表明, 用 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 发酵周期为 72 h, NH_4Cl 发酵周期为 84 h, 当 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 质量浓度在 50 g/L 时产酸最高 (见图 2)。

2.2.2 玉米浆对产酸的影响 玉米浆是影响谷氨酰胺发酵的一个重要因素^[6], 考虑玉米浆质量浓度对产酸的影响, 结果为玉米浆质量浓度在 3 g/L 时产酸最高, 多于或少于此量时产酸均下降 (见图 3)。

2.2.3 不同起始 pH 值对产酸的影响 pH 值对

菌体生长和产物形成具有特殊意义. 本实验研究了不同的起始 pH 值对产酸的影响, 结果见图 4. 当 pH 值在酸性时, 谷氨酰胺和谷氨酸的比例相对小, 随着 pH 值的增大, 谷氨酰胺的产量下降. 实验结果表明, 谷氨酰胺适合在中性偏碱性的环境中积累, 最适起始 pH 值为 7.5.

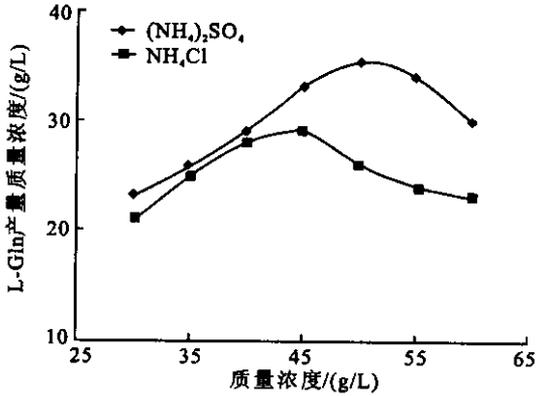


图 2 (NH₄)₂SO₄ 和 NH₄Cl 对 L-Gln 发酵的影响

Fig. 2 Effect of (NH₄)₂SO₄ and NH₄Cl on the fermentation of L-Gln

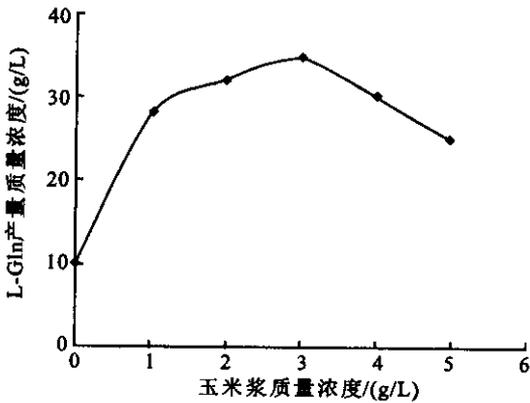


图 3 玉米浆对发酵的影响

Fig. 3 Effect of corn steep liquor on the fermentation of L-Gln

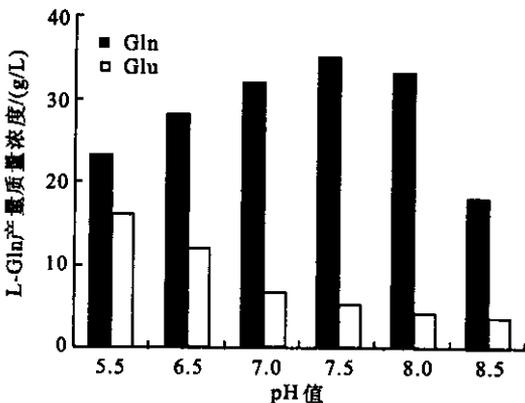


图 4 不同起始 pH 值对产酸的影响

Fig. 4 Effect of Initial pH on L-Gln production

2.2.4 正交试验 玉米浆对产酸影响很大, 所以考虑到接种时带入的玉米浆, 同时选取葡萄糖和硫酸铵作为 4 个影响因素, 取 3 个水平, 采用 L₉(3⁴) 正交表进行试验, 结果见表 1.

表 1 谷氨酰胺发酵培养基 L₉(3⁴) 正交试验

Tab. 1 The result of orthogonal test

实验号	A 葡萄糖质量浓度/(g/L)	B (NH ₄) ₂ SO ₄ 质量浓度/(g/L)	C 玉米浆质量浓度/(g/L)	D 接种量体积分数/%	L-Gln 产量质量浓度/(g/L)
1	100	40	2	2	21.6
2	100	50	3	3	34.1
3	100	60	4	4	22.6
4	110	40	3	4	30.6
5	110	50	4	2	23.5
6	110	60	2	3	25.1
7	120	40	4	3	28.2
8	120	50	2	4	27.3
9	120	60	3	2	30.8
K1	78.3	80.4	74	75.9	
K2	79.2	84.9	95.5	87.4	
K3	86.3	78.5	74.3	80.5	
R	8.0	6.4	21.5	11.5	

注: 其他成分同摇瓶发酵培养基.

根据正交实验结果, 各因素对产物的影响顺序依次为玉米浆(C)、接种量(D)、葡萄糖(A)、(NH₄)₂SO₄(B), 最佳配方为 A₃B₂C₂D₂.

2.2.5 发酵过程曲线 应用正交试验和单因素试验综合考察了培养基成分, 采用最适条件, 得到发酵过程曲线(见图 5). 发酵 72 h, L-Gln 的产量达到了 36.7 g/L, Glu 不超过 5 g/L.

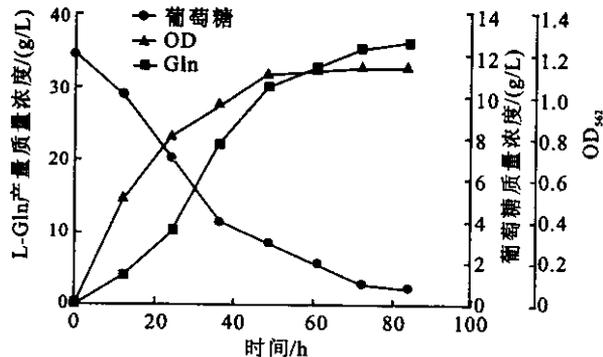


图 5 发酵过程曲线

Fig. 5 The fermentation time course

2.3 遗传稳定性

为检验 G21-8 菌种产 L-Gln 的稳定性,将变异株进行连续 10 次传代实验,摇瓶产 L-Gln(见表 2)。结果表明,变异株具有良好的产酸稳定性。

表 2 变异株传代结果

Tab. 2 Stability study on L-Gln reproduction

菌株	代 数				
	P ₂	P ₄	P ₆	P ₈	P ₁₀
	L-Gln 质量浓度/(g/L)				
G21-8	36.2	35.8	36.1	36.2	36
G21-45	34	33.4	33	34.2	33.8
G21-113	33	32.4	33.1	32.2	32.5

3 结 论

通过 NTG、DES 和⁶⁰Co 诱变选育出的 G21-8 菌株最高产酸达 36.7 g/L,产量稳定,且 Glu 产量较少,是一株优良的 Gln 产生菌。

应用正交实验和单因子实验综合考察了培养基成分中葡萄糖、玉米浆、(NH₄)₂SO₄ 等成分对 G21-8 菌株产酸的影响,初步得到的最佳培养基(g/L)为:葡萄糖 120,(NH₄)₂SO₄ 50,玉米浆 3, KH₂PO₄ 1, MgSO₄ · 7H₂O 0.5, MnSO₄ · 4H₂O 0.01, FeSO₄ · 7H₂O 0.02, ZnSO₄ · 7H₂O 0.01, 碳酸钙 30, pH 7.5。

参考文献:

- [1] 汪世华,康旭,吴思方,等. NH₄⁺ 和 Cl⁻ ——对谷氨酰胺发酵影响的研究[J]. 发酵科技通讯, 2001, 30(3): 11-14.
- [2] 蒋立锐. 谷氨酰胺在代谢中的作用[J]. 氨基酸杂志, 1988, (4): 17-22.
- [3] Isao Kusumoto. Industrial production of L-glutamine[J]. *American Society for Nutritional Sciences*, 2001, 131: 2552s-2555s.
- [4] 章名春. 工业微生物诱变育种[M]. 北京: 科学出版社, 1984.
- [5] 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: 中国轻工业出版社, 1992.
- [6] 梁新梅, 孙吉臻, 张跃庆, 等. d-生物素代替玉米浆发酵生产 Glu 的研究[J]. 生物技术, 1996, (2): 30-34.

(责任编辑: 杨 勇)