

L-缬氨酸菌种选育

张伟国 钱和

(中央研究所) (食品资源科学与工程系)

摘要 以硫酸二乙酯(DES)诱变处理黄色短杆菌(*Brevibacterium flavum*) XQ5122,得到突变株 V3-36(Leu^+ 、 α - AB^+ 、 AHV^+),在10%葡萄糖培养基中可积累2.3%L-缬氨酸。以亚硝基胍(NTG)诱变 V4-153,得到一株突变株(Leu^+ 、 α - AB^+ 、 AHV^+ 、2- TA^+),再进行单菌落分离,得到突变株 ZQ-2,能在培养基中积累 L-缬氨酸4.2%~4.5%,最高达5.57%。

主题词 缬氨酸;育种;黄色短杆菌

中图分类号 TS201.57

0 前言

L-缬氨酸是人体必需氨基酸之一,具有多种生理功能,可广泛应用于食品、饲料和医药等方面,但由于其生产成本高,价格昂贵,目前主要用于配制复合氨基酸输液。L-缬氨酸的世界年产量已达500t左右,主要由日本味之素、协和发酵和田边制药等公司生产。据报道^[1,2]日本L-缬氨酸摇瓶产酸率为3.1%。国内中国科学院微生物研究所王秀岭等报道^[3]了北京棒杆菌L-缬氨酸产生菌的选育,其摇瓶产酸率3.0%。

本研究以黄色短杆菌(*Brevibacterium flavum*)XQ5122为出发菌株,经化学诱变处理和 α - AB 、 AHV 、2- TA 等药物平板定向选育,成功地选育到一株L-缬氨酸高产菌ZQ-2(Leu^+ 、 α - AB^+ 、 AHV^+ 、2- TA^+),摇瓶产酸率达4.2%~4.5%,最高达5.57%。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 出发菌株 黄色短杆菌 XQ 5122

1.2 培养基(%)

1.2.1 完全培养基 葡萄糖0.5,牛肉膏1.0,蛋白胨1.0,NaCl0.5,琼脂2.0。

1.2.2 基础培养基 葡萄糖2.0,(NH_4) $_2$ SO $_4$ 0.15,KH $_2$ PO $_4$ 0.1,K $_2$ HPO $_4$ 0.3,MgSO $_4$ ·

收稿日期:1994-12-06

7H₂O 0.01, MnSO₄ · 4H₂O 0.001, FeSO₄ · 7H₂O 0.001, VH 30μg/L, VB1 · HCl 100μg/L, 尿素 0.15, 琼脂 2.0.

1.2.3 种子培养基 葡萄糖 2.5, (NH₄)₂SO₄ 0.2, KH₂PO₄ 0.1, MgSO₄ · 7H₂O 0.05, 玉米浆 3.5, 尿素 0.3, CaCO₃ 1.0.

1.2.4 发酵培养基 葡萄糖 12~15, (NH₄)₂SO₄ 3.5~5.0, KH₂PO₄ 0.1, MgSO₄ · 7H₂O 0.05, VH 50μg/L, VB1 · HCl 100μg/L, 玉米浆 0.5~1.0, CaCO₃ 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.

1.3 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 Fulka 公司产品;α-氨基-β-羟基戊酸(AHV), 2-噻唑丙氨酸(2-TA)和 α-氨基丁酸(α-AB)均为美国 Sigma 公司产品.

1.4 方法

1.4.1 诱变方法 常规化学诱变法^[4].

1.4.2 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.

将上述变异株菌落移接到完全培养基平板上, 供进一步筛选用.

2) 液体筛选 将平板筛选获得的变异株接一环于装有 5ml 发酵培养基的摇管(25×250mm)中, 30℃ 振荡培养 72h, 用纸层析法定性鉴别发酵液中的 L-缬氨酸.

将摇管初筛获得的 L-缬氨酸产生菌接一环于装有 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, 比色定量法测定发酵液中的 L-缬氨酸.

1.4.3 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 A₅₆₂ nm 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.

4) L-缬氨酸 纸上层析法、比色定量法^[5]及氨基酸自动分析仪测定.

2 结果与讨论

2.1 L-缬氨酸产生菌选育谱系

从野生谷氨酸产生菌-黄色短杆菌 XQ5122 出发, 采用 DES 和 NTG 诱变处理, 依次赋予 Leu⁺、α-AB⁺、AHV⁺、2-TA⁺ 遗传标记, 最后获得一株 L-缬氨酸高产菌 ZQ-2(图 1). 在最佳发酵工艺条件下(表 2), 摇瓶产酸 4.2%~4.5%, 最高 5.57%.

Leu⁺ L-Leu 缺陷型; Leu⁺ L-Leu 渗漏型; α-AB⁺ α-AB 抗性; AHV⁺ AHV 抗性; 2-TA⁺ 2-TA 抗性.

2.2 L-缬氨酸摇瓶发酵试验

按 L₉(3⁴) 正交试验考察各种营养因素对 L-缬氨酸发酵影响, 结果列于表 1.

表 1 正交试验考察营养因素对 L-缬氨酸发酵影响

因素	玉米浆 (%)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (%)	VH(μg/L)	VB1(μg/L)
水平	0.3	3.5	10	50
	0.5	4.0	30	100
	1.0	4.5	50	200
1	4.10	3.85	3.82	3.95
2	4.33	4.14	4.06	4.00
3	4.03	4.51	4.28	3.81
R	0.33	0.66	0.46	0.19
因素主次	3	1	2	4
好水平	0.5	4.5	50	100

综合考察培养基、装液量、种龄和接种量等对 ZQ-2 菌株 L-缬氨酸发酵的影响,所得到的摇瓶发酵最佳条件列于表 2。

表 2 L-缬氨酸摇瓶发酵最佳条件

菌株	L-缬氨酸(%)	成分		
		种子培养基	发酵培养基	
黄色短杆菌 XQ5122	0	葡萄糖 (%)	2.5	13.5
↓ DES		(NH ₄) ₂ SO ₄ (%)	0.5	4.5
V1-109(Leu ⁻)	0.4	玉米浆 (%)	4.0	0.5
↓ DES		KH ₂ PO ₄ (%)	0.1	0.1
V2-121(Leu ⁻ , α-AB ^r)	1.2	MgSO ₄ (%)	0.05	0.05
↓ DES		VH(μg/L)	/	50
V3-36(Leu ⁺ , α-AB ^r , AHV ^r)	2.3	VB1(μg/L)	/	100
↓ NTG		CaCO ₃ (%)	1.0	4.0
V4-153(Leu ⁺ , α-AB ^r , AHV ^r , 2-TA ^r)	4.0	pH	7.0	7.0
↓ 单菌落分离及工艺改良		装液量 * (ml)	50	15
ZQ-2(Leu ⁺ , α-AB ^r , AHV ^r , 2-TA ^r)	4.2~4.5	接种量 (%)	/	4
		温度 °C	30	30
		培养时间 (h)	14	72

图 1 黄色短杆菌 L-缬氨酸高产菌 ZQ-2 选育谱系

* 250ml 三角瓶

2.3 ZQ-2 菌株 L-缬氨酸发酵过程曲线

典型的 L-缬氨酸摇瓶发酵过程曲线如图 2 所示。

2.4 末端产物氨基酸对 ZQ-2 菌株积累 L-缬氨酸的影响

设计末端产物氨基酸对 ZQ-2 菌株积累 L-缬氨酸的影响,实验结果列于表 3。

试验结果表明,培养基中末端产物氨基酸的存在并不影响 ZQ-2 菌株积累 L-缬氨酸的能力,说明具有 2-TA 等多重抗性突变株 ZQ-2 其生物合成 L-缬氨酸的关键酶——乙酰羟乙酸合成酶(AS)对此三种末端产物氨基酸的反馈调节已不敏感,因而突变株 ZQ-2 能积累大量 L-缬氨酸。

表3 末端产物氨基酸对L-缬氨酸发酵的影响

氨基酸 (1mg/ml)	OD	pH	L-缬氨酸 (%)
L-缬氨酸	1.10	6.7	4.48
L-异亮氨酸	1.08	6.9	4.45
L-亮氨酸	1.09	6.5	4.35
对照	1.06	6.8	4.53

2.5 讨论

L-缬氨酸生物合成的第一限速酶为乙酰羟氨基酸合成酶(AS),第二限速酶为分支链氨基酸转移酶(TR).在黄色短杆菌中AS有二种同功酶AS-Ⅱ和AS-Ⅰ或AS-Ⅲ. AS-Ⅰ或AS-Ⅲ受Val+Leu的阻遏,同时受到Val的反馈抑制;AS-Ⅱ受到Val+Leu+Ile的阻遏(图3).

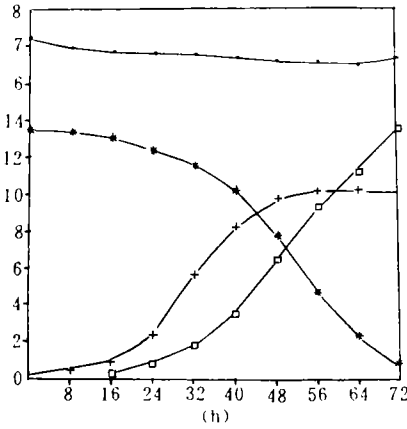


图2 ZQ-2菌株L-缬氨酸发酵过程曲线

—•— pH —+— OD562 · 10
 —*— Rg (%) —□— L-Val (%) · 3

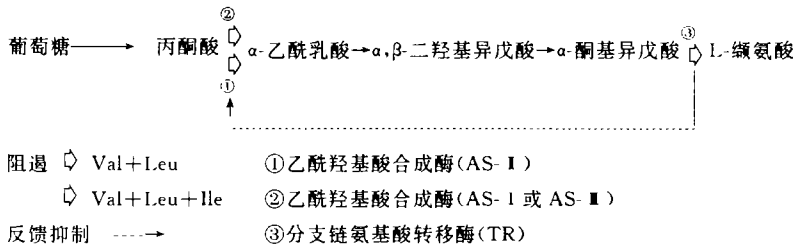


图3 黄色短杆菌L-缬氨酸生物合成的反馈调节

因此,如果在培养基中积累L-缬氨酸,必须解除正常的反馈调节机制,即解除三种分支链氨基酸对AS的反馈抑制和阻遏及对TR的阻遏.据报道^[6~10].选育结构类似物抗性突变株可从遗传上改变原来受反馈调节酶的结构,使得突变株的AS和TR不再受三种分支链氨基酸的反馈抑制和阻遏,从而可大量积累L-缬氨酸.

α-AB为缬氨酸的结构类似物,其抗性突变株可解除AS的阻遏,从而使得突变株可积累1.2%L-缬氨酸. AHV为苏氨酸的结构类似物,其抗性突变株为何能提高L-缬氨酸的积累?其机制尚没有解明,是否存在AHV抗性可解除异亮氨酸对AS的反馈调节,这一点值得进一步探讨. 2-TA为分支链氨基酸的结构类似物,其抗性突变株的产酸水平大幅度提高,可积累4.2%~4.5%L-缬氨酸.在培养基中添加缬氨酸、异亮氨酸、亮氨酸等氨基酸都不影响L-缬氨酸积累.说明该突变株的L-缬氨酸生物合成酶对这些氨基酸来说已不敏感,从遗传上已完全解除对AS和TR的反馈抑制和阻遏.

参 考 文 献

- 1 张克旭等. 氨基酸发酵工艺学. 中国轻工业出版社, 1992
- 2 シ-エムシ-株式会社. アミノ酸工業の全容, 1988
- 3 王秀岭等. 微生物通报, 1990, 17(5): 276~279
- 4 章名春. 工业微生物诱变育种. 科学出版社, 1984
- 5 潘家秀等. 蛋白质化学研究技术. 科学出版社, 1962
- 6 Takayasu T et al. Agr. Biol. Chem. 1975, 39(11): 2193~2198
- 7 Takayasu T et al. Agr. Biol. Chem. 1975, 39(6): 1319~1322
- 8 Kuniyiko A et al. J. Ferment. Technol. 1977, 55(4): 364~368
- 9 唐任天等. 氨基酸杂志, 1986, 1: 12~17
- 10 屈明波等. 生物工程学报, 1992, 18(2): 1184~1191

Breeding of L-Valine Producing Mutant

Zhang Weiguo

Qian He

(Centre Research and Design Institute) (Dept. Food Resources Sci. & Eng.)

Abstract A valine producer strain V3-36 (Leu^- , α -AB^r, AHV^r) was obtained from *Brevibacterium flavum* XQ 5122. Through diethyl sulfate (DES) treatment, which produces 2.3% L-valine in 10% glucose medium. Subsequently, Mutant ZQ-2 was isolated from NTG mutagenesis on strain V4-153, accumulating 4.2%~4.5% of L-valine on average, and 5.57% of L-valine as highest.

Subject-words L-valine; Mutagenesis; *Brevibacterium flavum*