文章编号:1673-1689(2007)06-0086-04

前体物质和碳氮源补加策略对钝齿棒杆菌发酵生产 L-精氨酸的影响

薛 峰, 陶文沂
(江南大学 工业生物技术教育部重点实验室,江苏 无锡 214122)

摘 要: 研究了前体物质和碳氮源补加策略对钝齿棒杆菌 *Corynebacterium crenatum* SYAN7 发酵生产 L-精氨酸的影响。结果表明,发酵 24 h 后添加前体物质谷氨酸,以初始硫酸铵质量浓度 20 g/L,分别于 24、48 h 补加 20 g/L 硫酸铵的补氮方式,和以初始葡萄糖质量浓度 100 g/L,分别于 24、48、72 h 均匀添加葡萄糖,使总糖质量浓度达 175 g/L 的补碳方式,摇瓶发酵 96 h 后,L-精氨酸产量最高达 37.8 g/L。

关键词: L-精氨酸;钝齿棒杆菌;前体物质;碳源;氮源
中图分类号:TQ 922.9 **文献标识码**: A

The Effect of Precursor and C & N Source Feeding Tactics on L-Arginine Production by *Corynebacterium crenatum* Fermentation

XUE Feng, TAO Wen-yi
(Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: The effect of precursor and C & N source feeding strategy on L-Arginine production by *Corynebacterium crenatum* SYAN7 was studied. The results showed that the yield of L-Arginine was increased to 37.8 g/L by the combination of the feeding glutamic acid after 24 h, the feeding $(NH_4)_2SO_4$ in 24 h (20 g/L) and 48 h (20 g/L) with the initial $(NH_4)_2SO_4$ concentration 20 g/L, the feeding glucose in 24 h, 48 h and 72 h till the total glucose 175 g/L with the initial glucose concentration 100 g/L.

Key words: L-Arginine; *Corynebacterium crenatum*; precursor; carbon source; nitrogen source

L-精氨酸(L-Arginine)是一种碱性氨基酸,是生物体尿素循环的重要中间代谢产物,是机体合成细胞浆蛋白和核蛋白的重要物质[1],也是体内一氧化氮(NO)合成的前体物质。通过 L-精氨酸——氧化氮通路所产生的一氧化氮与许多生理功能有关,能够介导一系列免疫过程[2]。L-精氨酸在医药和食品工业中有着广泛的应用,它是临床上复方氨基酸输液的主要组成成分之一,在促进伤口愈合、治

收稿日期:2006-08-31.
基金项目:国家"十五"科技攻关重点项目(BE20001041).
作者简介: 薛峰(1981-),男,江苏东台人,生物工程硕士研究生.
通讯作者: 陶文沂(1946-),男,江苏无锡人,工学博士,教授,博导,主要从事发酵工程和生物制药方面的研究.
Email: wytao1946@163.com

万方数据

疗病毒性肝炎、解除氨中毒性肝昏迷、抗粥样动脉硬化和延缓衰老等方面具有一定的作用。同时 L-精氨酸也是配制营养支持用和特殊治疗用要素膳的重要原料[3]。目前世界上仅日本实现了该酸的发酵法生产[4],我国发酵法生产 L-精氨酸尚处于研究开发阶段,医药用 L-精氨酸主要依赖进口,因而是我国氨基酸生产的"瓶颈"。作者就前体物质和碳氮源补加策略对钝齿棒杆菌生产 L-精氨酸的影响进行了研究。

1　材料与方法

1.1　菌种、试剂与仪器

作者所在实验室选育并保藏的钝齿棒杆菌 *Corynebacterium crenatum* SYAN7 (His^-, SG^r, $D\text{-}Arg^r$, $H\text{-}Arg^r$, $ArgHX^r$)。主要试剂均为国产分析纯或化学纯试剂。往复式摇床由无锡查桥机械厂生产。

1.2　培养基

1.2.1　琼脂完全培养基(g/L)　葡萄糖 20,牛肉膏 10,蛋白胨 10,酵母膏 5,NaCl 5,琼脂 20。pH 7.0～7.2,121 ℃灭菌 20 min。

1.2.2　摇瓶种子培养基(g/L)　葡萄糖 30,玉米浆 20,$(NH_4)_2SO_4$ 20,KH_2PO_4 1,$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5,尿素 1.5。pH 7.0～7.2,121 ℃灭菌 20 min,250 mL 的三角瓶装液量 30 mL。

1.2.3　摇瓶发酵培养基(g/L)　葡萄糖 120,玉米浆 30,$(NH_4)_2SO_4$ 50,KH_2PO_4 1.5,$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5,$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.02,$MnSO_4 \cdot H_2O$ 0.02,生物素 8×10^{-5},L-组氨酸 5×10^{-4},$CaCO_3$ 30。pH 7.0～7.2,121 ℃灭菌 7 min,250 mL 的三角瓶装液量15 mL。

1.3　培养方法

1.3.1　种子培养　从培养 18 h 的斜面上挑取一环菌体接入液体种子培养基,31 ℃、110 r/min 培养 12～13 h。

1.3.2　发酵培养　种子培养后,以体积分数 5%的接种量接入发酵培养基中,31 ℃、110 r/min 培养 96 h。

1.4　分析方法

1.4.1　菌体生长状况的测定　562 nm 波长下光密度值表示[5]。

1.4.2　发酵液中还原糖的测定　3,5-二硝基水杨酸法[6]。

1.4.3　L-精氨酸的定量测定　改良坂口试剂法[5]。

1.4.4　氨离子的浓度测定　纳氏试剂法[7]。

2　结果与讨论

2.1　前体物质对 SYAN7 菌株 L-精氨酸发酵的影响

谷氨酸是 L-精氨酸生物合成的前体物质,外加谷氨酸对于 L-精氨酸的生物合成途径必然会产生某种影响。作者首先考察了在发酵培养开始 0 h 时添加谷氨酸对产 L-精氨酸的影响,结果见图 1。由图 1 可知,随着谷氨酸添加量的增加,L-精氨酸的产量迅速下降。这说明初始添加谷氨酸不能够提高产酸,微生物在前期生长阶段尚缺乏转化和利用谷氨酸的酶。在培养 24 h 时细胞完成对数生长期,发酵液中开始积累 L-精氨酸,细胞中转化谷氨酸形成 L-精氨酸的酶已具备,考察这时加入一定质量浓度的谷氨酸的结果,见图 2。由图 2 可知,24 h 后添加谷氨酸可以促进 SYAN7 发酵产酸,在谷氨酸质量浓度为 30 g/L 时,L-精氨酸产量达到最大。

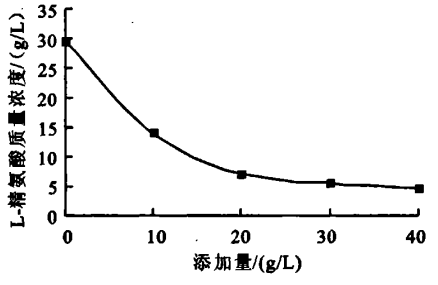


图 1　发酵起始时添加谷氨酸对产 L-精氨酸的影响

Fig. 1　The effect of the glutamic acid addition at initial time on the L-Arginine production

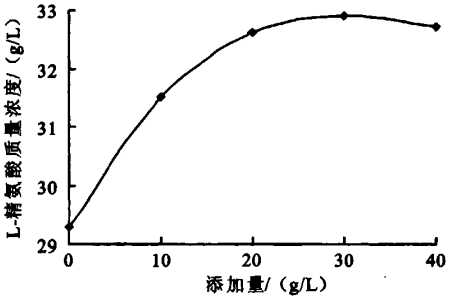


图 2　发酵 24 h 后添加谷氨酸对产 L-精氨酸的影响

Fig. 2　The effect of the glutamic acid addition at 24 h on the L-Arginine production

初始添加谷氨酸不能够提高产酸而发酵培养 24 h 后添加谷氨酸却可以提高产酸。这是因为在发酵初始时,细胞中涉及 L-精氨酸生物合成代谢途径的酶还未形成,谷氨酸添加不仅不能提高产酸,反而有可能抑制这些酶的形成,造成产酸下降。而

万方数据

发酵培养 24 h 后，这些酶已经形成，此时再添加一定质量浓度的前体物质谷氨酸有利于转化，促进 L-精氨酸生物合成反应的进行，提高 L-精氨酸的产量。

2.2 氮源补加策略探索

L-精氨酸分子中氮元素的质量分数高达 32.15%，因此发酵培养基中必须提供较高质量浓度的氮源，以满足合成 L-精氨酸的需要。作为 L-精氨酸生产菌，无机氮源主要为硫酸铵。考察不同质量浓度的硫酸铵对 SYAN7 发酵产酸的影响，结果见图 3。由图 3 可见，初始硫酸铵质量浓度为 20 g/L 时，发酵前期产酸较快，后期持平，产酸水平较低；而初始硫酸铵质量浓度为 40 g/L 和 60 g/L 时，在整个发酵过程中 L-精氨酸产量呈持续上升趋势，发酵结束时，初始硫酸铵质量浓度为 60 g/L 的 L-精氨酸产量略高于初始硫酸铵质量浓度为 40 g/L 的产量。

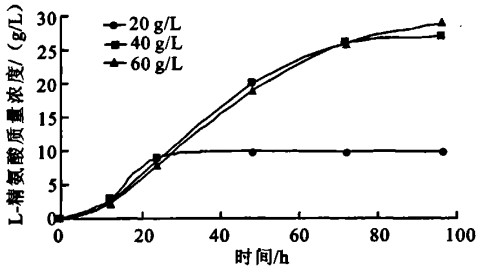


图 3 不同硫酸铵质量浓度对产 L-精氨酸的影响

Fig. 3 The effect of the $(NH_4)_2SO_4$ concentration on the L-Arginine production

由图 3 可知，前期较低质量浓度硫酸铵有利于菌体生长和促进 L-精氨酸产生，而 L-精氨酸高产需要足够量的硫酸铵，因而考虑分次添加硫酸铵。采取 3 种补加硫酸铵的方案：方案 1 为对照组，初始硫酸铵质量浓度为 60 g/L，发酵过程中不补加硫酸铵；方案 2 初始硫酸铵质量浓度 20 g/L，24 h 后补加 40 g/L 的硫酸铵；方案 3 初始硫酸铵质量浓度 20 g/L，分别于 24、48 h 各补加 20 g/L 硫酸铵，结果见图 4。从整个发酵过程看，从发酵开始到菌体达到平衡期，此时 3 种补氮方式的 L-精氨酸合成量基本一致，随着发酵的进行，上述 3 种补氮方式的 L-精氨酸合成量有明显的差异，方案 3 的 L-精氨酸产量最高，方案 2 的其次，方案 1 的最低。

当初始硫酸铵质量浓度为 20 g/L 时，由于发酵液中既有足够的硫酸铵同时硫酸铵质量浓度对菌体生长也没有抑制作用，因而 L-精氨酸合成速率最快；但到发酵后期，由于没有足够的氮源，尽管此时菌体中精氨酸合成酶系具有较高的活力，也无法合成精氨酸。而初始硫酸铵质量浓度为 60 g/L 时，由于过高质量浓度硫酸铵对菌体生长有一定的抑制作用，进而造成发酵产酸的降低。但高质量浓度的硫酸铵又是 L-精氨酸合成所必需的。硫酸铵的分次添加可以使发酵液中硫酸铵质量浓度维持在一个稳定的水平，可以降低高质量浓度硫酸铵对菌体生长的抑制作用，又能在发酵过程中维持较高的硫酸铵质量浓度来提供菌体的产酸需要，对发酵产酸最为有利，因而可以提高产酸。通过多次添加硫酸铵，此时产酸水平最高，一次或者少次添加则产酸偏低。

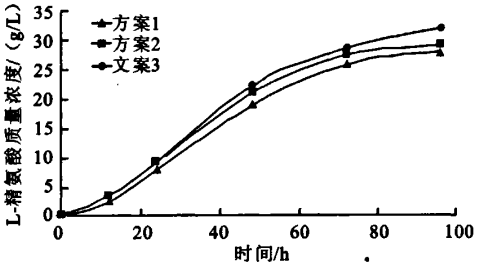


图 4 不同硫酸铵补加方式对产 L-精氨酸的影响

Fig. 4 Effect of the different $(NH_4)_2SO_4$ addition model on the L-Arginine production

2.3 碳源补加策略探索

碳源是构成菌体和合成 L-精氨酸碳架及能量的来源，L-精氨酸生产菌主要以葡萄糖作为碳源。考察不同初始葡萄糖质量浓度对 SYAN7 发酵的影响，结果见图 5。由图 5 可见，初始葡萄糖质量浓度为 50 g/L 时，发酵前期精氨酸的合成速率较快；当发酵结束时，初始葡萄糖质量浓度为 150 g/L 的 L-精氨酸产量略高于初始葡萄糖质量浓度为 100 g/L 的产量。

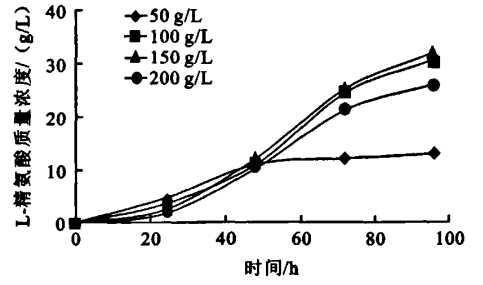


图 5 不同的初始葡萄糖质量浓度对产精氨酸的影响

Fig. 5 The effect of the initial glucose concentration on the L-Arginine production

考虑葡萄糖的分次添加，初步确定以下 3 种补加葡萄糖的方案：以初始葡萄糖质量浓度 100 g/L，分别于 24、48 h 和 72 h 3 次均匀添加葡萄糖，使总糖质量浓度达到方案 1 为 150 g/L，方案 2 为 175

万方数据

g/L,方案 3 为 200 g/L,结果见图 6。由图 6 可知,在整个发酵过程中,补糖方式为方案 1 和方案 2 时的 L-精氨酸产量较高,且方案 2 略高,方案 3 L-精氨酸产量受到一定的抑制。

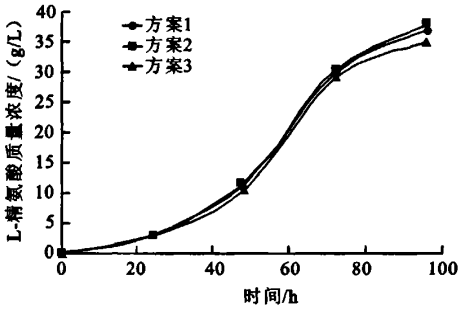


图 6 不同的葡萄糖补加方式对产精氨酸的影响

Fig. 6 Effect of the different glucose addition model on the L-Arginine production

初始葡萄糖质量浓度为 50 g/L 时,由于发酵液中既有足够的葡萄糖量同时葡萄糖质量浓度对菌体生长也没有抑制作用,因而 L-精氨酸合成速率最快,但到发酵后期,尽管此时菌体中精氨酸合成酶系具有较高的活力,但由于没有碳源,因而无法合成精氨酸。初始葡萄糖质量浓度为 200 g/L 时,高质量浓度葡萄糖由于对菌体生长有一定的抑制作用,进而造成发酵产酸的降低,但高质量浓度的葡萄糖又是 L-精氨酸合成所必需的。葡萄糖的分次添加既可以降低高质量浓度葡萄糖对菌体生长的抑制作用,又能在发酵过程中维持较高的葡萄糖质量浓度来提供菌体的产酸需要,因而可以提高产酸。当补加的葡萄糖量和发酵过程中消耗的葡萄糖量相当时,可以使发酵液中葡萄糖质量浓度维持在一个稳定的水平,对发酵产酸最为有利,此时产酸水平最高。当补加的葡萄糖量多于或者少于发酵过程中消耗的葡萄糖量时会对发酵产酸有一定的抑制作用。

3 结 语

通过添加前体物质和碳氮源补加策略的探索,可使 SYAN7 的 L-精氨酸最高产量达到 37.8 g/L,进一步分析研究补加策略,使之更适应发酵内在规律,有望使 L-精氨酸产量进一步提高。

参考文献(References):

[1] 张伟国,钱和. 氨基酸生产技术及其应用[M]. 北京:中国轻工业出版社,1998.

[2] Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway[J]. **N Engl J Med**, 1993, 329: 2002.

[3] 单永红,刘炳成. 精氨酸——一种多功能的生化药物[J]. 中国生化药物杂志,2001,22(5):265—267.
SHAN Yong-hong, LIU Bing-cheng. Arginine hydrochloride——a kind of biochemical pharmaceuticals having more functions[J]. **Chinese Journal of Biochemical Pharmaceutics**, 2001, 22(5): 265—267. (in Chinese)

[4] AzumaT, Aoyagi S, Toshigide A. Process for producting L-Arginine [J]. **Agric Boil Chem**, 1972, 36: 1675—1677.

[5] 路志强,龚建华,丁久元,等. L-精氨酸生产菌诱变育种的研究[J]. 微生物学报,1988,28(2):131—135.
LU Zhi-qiang, GONG Jian-hua, DING-Jiu-yuan, et al. Study on the breeding of L-Arginine-producing strain[J]. **Acta Microbiologica Sinica**, 1988, 28(2): 131—135. (in Chinese)

[6] 张龙翔. 生物化学实验技术[M]. 北京:高等教育出版社,1989.

[7] 黄祥飞. 湖泊生态调查观测与分析[M]. 北京:中国标准出版社,1999.

(责任编辑:李春丽)

万方数据