文章编号: 1673-1689(2011)03-0394-04

L-缬氨酸高产菌诱变育种的研究

张伟国[1,2], 钱 和[3]
(1. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122; 3. 江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214122)

摘 要: 以黄色短杆菌(*Brevibacterium flavum*) L-缬氨酸产生菌 XQ-2 为出发菌株, 经硫酸二乙酯(DES)和亚硝基胍(NTG)逐级诱变处理, 氨基酸结构类似物 α-氨基丁酸(α-AB)、2-噻唑丙氨酸(2-TA) 和 α-氨基-β-羟基戊酸(AHV)定向筛选, 获得一株 L-缬氨酸高产菌 XQ-8($Leu^{-}AB^{hr}2\text{-}TA^{hr}AHV^{hr}$)。在以 135 g/L 葡萄糖为碳源和 50 g/L 硫酸铵为氮源的培养基中摇瓶发酵 72 h, 产酸达 64~66 g/L。

关键词: L-缬氨酸; 诱变育种; 黄色短杆菌
中图分类号: TQ 922 文献标识码: A

Studies on the Breeding of L-Valine Hyper-Producing Mutant

ZHANG Wei-guo[1,2], QIAN He[3]
(1. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 3. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Using *Brevibacterium flavum* XQ-2 ($Leu^{-}AB^{r}AHV^{r}2\text{-}TA^{r}$) as a starting strain for stepwise mutagenesis by diethylsulfate (DES), N-methyl-N′-nitro-soguanidine (NTG) treatment, a L-valine hyper-producing mutant XQ-8 ($Leu^{-}AB^{hr}2\text{-}TA^{hr}AHV^{hr}$) was obtained, which could be resistant to high concentration α-amino-butyric acid (α-AB), 2-thiazole-DL-alanaine (2-TA) and α-amino-β-hydroxy-valeric acid (AHV). As a result, high L-valine concentration (64~66g/L) was obtained with shaking at 31±1℃ for 72h in the medium containing 135g/L glucose and 50g/L $(NH_4)_2SO_4$.

Key words: L-valine, breeding, *brevibacterium flavum*

L-缬氨酸是人体 8 种必需氨基酸之一, 同时又是 3 种支链氨基酸之一, 因其特殊的结构和功能在人类生命代谢中占有特别重要的地位, 可广泛应用于食品和医药等方面, 但由于其生产成本较高, 价格较贵, 目前主要用于配制复合氨基酸制剂, 特别是应用于高支链氨基酸输液(如 3H 输液等)和口服液(肝安干糖浆等)。最近, 人们发现 L-缬氨酸是合成一种治疗高血压的特效药——缬沙坦的重要中间体, 其年消耗量猛增到数千吨。

目前, 国际上生产 L-缬氨酸均采用发酵法。日

收稿日期: 2010-05-25
基金项目: 国家 863 计划项目(2008AA02Z212)。
作者简介: 张伟国(1963-), 男, 江苏张家港人, 工学博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事氨基酸生产菌选育和发酵工艺控制研究。Email: zhangwg168@126.com

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

本的松琦氏选育的厌气杆菌在 100 g/L 的葡萄糖培养基中产酸达 15 g/L[1]; Tsuchicla 等选育的乳糖发酵短杆菌摇瓶产酸达 31g/L[2]; 日本协和公司的 L-缬氨酸产酸水平达 40~ 50 g/L[3]。中国科学院微生物研究所于 1975 年在国内首次报道了 L-缬氨酸产生菌北京棒杆菌突变株 AS1.586 的选育, 产酸为 26 g/L[4]。"七五"期间中国科学院微生物研究所进行了第二代缬氨酸高产菌的选育, 摇瓶产酸提高到 30g/L[5]。张伟国选育的黄色短杆菌 XQ-2 摇瓶产酸达 42~ 45g/L[6]; 浦军平等选育 L-缬氨酸产生菌种摇瓶产酸达 45g/L[7]。张伟国等选育的黄色短杆菌 XQ-6 摇瓶产酸达 58~ 62g/L[8]。赵丽丽等选育的缬氨酸高产菌 TV2564, 5 L 罐补料分批发酵, 产酸达 50 g/L[9]。徐庆阳等选育的 L-缬氨酸高产菌, 10 L 发酵罐补料分批发酵 72 h, 产酸可达 53.4 g/L[10]。本试验对以前选育的 L-缬氨酸产生菌 XQ-6 定向育种, 产酸进一步提高, 摇瓶产酸 64~ 66 g/L, 50 L 发酵罐补料分批发酵 68 h 产酸高达 68.7 g/L。

1　材料与方法

1.1　菌种

出发菌株为 L-缬氨酸产生菌 XQ-2 (Leu^{l}(-AB^{r} AHV^{r}2-TA^{r})。

1.2　培养基

1.2.1　完全培养基(g/L)　葡萄糖 5、牛肉膏 10、蛋白胨 10、NaCl 5、琼脂条 25。

1.2.2　基础培养基(g/L)　葡萄糖 20、$(NH_4)_2SO_4$ 1.5、KH_2PO_4 1、K_2HPO_4 3、$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5、$MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 0.01、$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01、VH 30 μg/L、$VB_1 \cdot HCl$ 100 μg/L、尿素 1.5、琼脂粉 20。

1.2.3　种子培养基(g/L)　葡萄糖 25、$(NH_4)_2SO_4$ 5、KH_2PO_4 1、$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5、玉米浆 35~ 40、尿素 2.5、$CaCO_3$ 10。

1.2.4　发酵培养基(g/L)　葡萄糖 120~ 150、$(NH_4)_2SO_4$ 35~ 50、KH_2PO_4 1、$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5、$MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 0.01、$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01、VH 25~ 100 μg/L、$VB_1 \cdot HCl$ 50 μg/L、玉米浆 5~ 10、$CaCO_3$ 40。

完全、基础和种子培养基均以 20 g/dL NaOH 调 pH 至 7.5~ 7.6, 0.1 MPa 压力下灭菌 20 min。发酵培养基以 20 g/dL NaOH 调 pH 值为 7.5~ 7.6, 0.07 MPa 压力下灭菌 8 min。

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; (-氨基丁酸((-AB)、α-氨基-β-羟基戊酸(AHV)和 2-噻唑丙氨酸(2-TA)为美国 Sigma 公司产品。

1.4　诱变方法

常规化学诱变法[11]。

1.5　氨基酸结构类似物抗性株检出方法

将氨基酸结构类似物按一定浓度混合于基础培养基中, 制成平板后, 涂布上述经诱变处理过的菌体, 置 30 ℃恒温箱中培养 3~ 5 d 后长出的大菌落, 即是氨基酸结构类似物抗性变异株。

1.6　分析方法

1.6.1　pH 值测定　用酸度计测定法。

1.6.2　菌体生长　吸取样品菌液 0.2 mL 加到 5 mL 浓度为 0.25 mol/L HCl 溶液中, 摇匀后测定 A_{562nm} 值。

1.6.3　葡萄糖　采用 SBA-4 多功能谷氨酸-葡萄糖分析仪测定。

1.6.4　L-缬氨酸　纸上层析法、比色定量法[12]和氨基酸分析仪测定。

2　结果与讨论

2.1　L-缬氨酸高产菌 XQ-6 的选育谱系

2.1.1　α-AB^{hr} 变异株的获得　从 XQ-2 出发, 经 DES 诱变, 高浓度 α-AB 平板筛选, 获得 α-AB^{hr} 变异株 215 株, 经摇瓶筛选获得一株 L-缬氨酸高产菌 V5-128, 产酸质量浓度为 45~ 47g/L。

2.1.2　2-TA^{hr} 变异株的获得　在获得 V5-128 的基础上, 经 NTG 诱变, 高浓度 2-TA 平板筛选, 获得 2-TA^{hr} 变异株 163 株, 其中有几株 L-缬氨酸积累有不同程度的增加, 代表性株 V6-56 的产酸达 55~ 56 g/L。

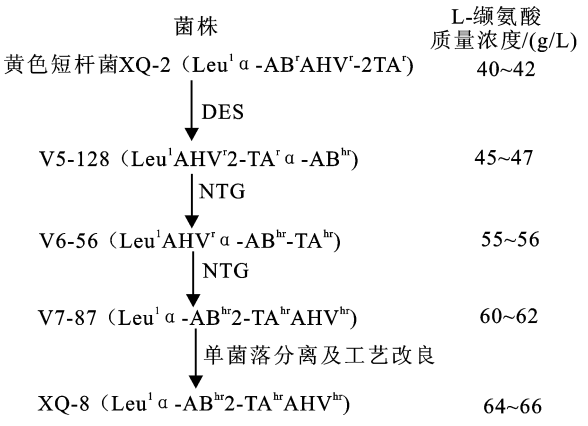
2.1.3　AHV^{hr} 变异株的获得　继续由 NTG 诱变, 高浓度 AHV 平板筛选, 获得 AHV^{hr} 变异株 98 株, 其中有几株 L-缬氨酸积累有不同程度的增加, 代表性株 V7-87 的产酸达 60~ 62 g/L, 经单菌落分离发酵条件优化, 产酸稳定在 64~ 66 g/L。

2.1.4　L-缬氨酸高产菌 XQ-8 的选育谱系　从选育的 L-缬氨酸产生 XQ-2 出发, 经 DES 和 NTG 诱变处理, L-缬氨酸结构类似物定向选育, 得到 L-缬氨酸高产菌 XQ-8, 具体选育谱系见图 1。

2.2　L-缬氨酸高产菌 XQ-8 发酵条件的研究

2.2.1　各种营养物质对产酸的影响　考察了生物素对 XQ-8 菌株 L-缬氨酸发酵的影响。结果表明, 生物素为 XQ-8 菌株生长和产酸的唯一必需因子, 缺之, 菌体不能生长和产酸 (见图 2)。当生物素添

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net



上标 -—渗漏型；r—抗性 hr—高抗

图 1 L-缬氨酸高产菌 XQ-8 的选育谱系

Fig. 1 Schematic chart of mutagensis procedure for L-valine producer XQ-08 Superscript - leaky mutant r resistance hr high resistance

加质量浓度为 40~ 50 μg/ L 时, 可获得较高的 L-缬氨酸积累。由于只添加纯生物素时前期菌体生长较慢, 故进行添加生物素同时添加少量玉米浆发酵试验, 结果表明, 当添加 40~ 50 μg/ L 生物素和 0. 5 g/ dL 玉米浆时, L-缬氨酸积累最高, 达 64~ 66 g/ L (见图 3)。

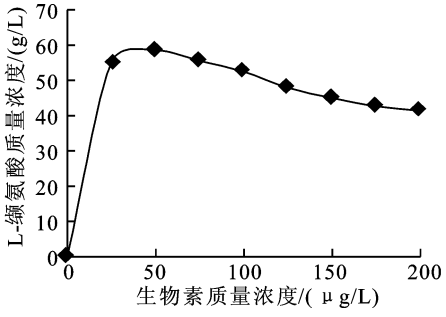


图 2 生物素对 L-缬氨酸发酵的影响

Fig. 2 Effect of biotin on L-valine production

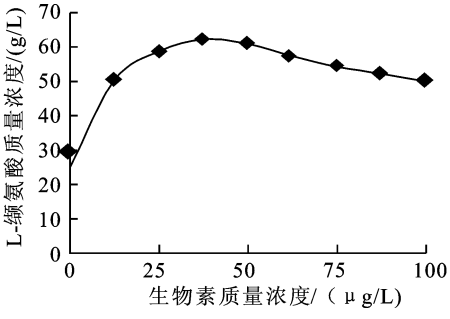


图 3 添加玉米浆时生物素对 L-缬氨酸发酵的影响

Fig. 3 Effect of the additional corn steep liquor and biotin on L-valine production at one time

添加支链氨基酸(L-亮氨酸和 L-异亮氨酸), 当浓度较低(≤2 g/ L) 时, 对 L-缬氨酸发酵的影响不大(如图 4 所示); 只有当支链氨基酸的浓度较高(≥6 g/ L) 时, 则影响较大(如图 5 所示)。

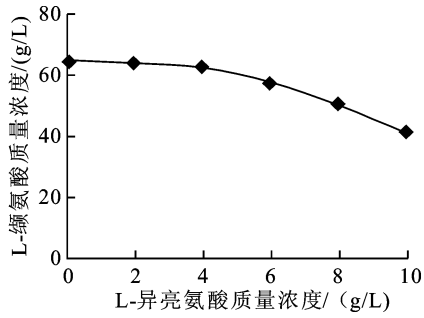


图 4 L-亮氨酸对 L-缬氨酸发酵的影响

Fig. 4 Effect of L-leucine on L-valine production

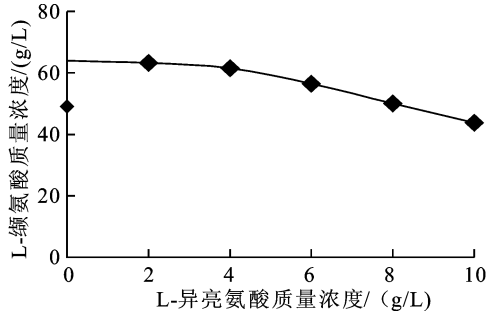


图 5 L-异亮氨酸对 L-缬氨酸发酵的影响

Fig. 5 Effect of L-isoleucine on L-valine production

2. 2. 2 XQ-8 菌株 L-缬氨酸最佳发酵条件 应用正交试验法综合考察了培养基成分、种龄、接种量等多种因素对菌株产酸的影响, 得到的最佳发酵条件列于表 1。

表 1 L-缬氨酸摇瓶发酵的最佳条件

Tab. 1 Optimal fermentation condition for L-valine production

培养基	种子培养基	发酵培养基
葡萄糖 /(g/ L)	25	135
$(NH_4)_2SO_4$/(g• L)	5	50
玉米浆/ (g/L)	40	5
KH_2PO_4/(g/ L)	1	1
$MgSO_4$/(g/ L)	0.5	0.5
VH /(μg/ L)	/	40
VB_1/ (μg/L)	/	50
尿素 / (g/L)	2.5	/
$CaCO_3$/(g/ L)	10	40
pH	7.2	7.2
装液量 / mL	100	40
接种量 / %	/	8
温度 / ℃	31	31
培养时间 /h	14	72

2. 2. 3 XQ-8 菌株 L-缬氨酸发酵进程曲线 图 6 为 L-缬氨酸高产菌 XQ-8 的典型发酵过程曲线。图 6 中, 0~ 12 h 为菌体生长延滞期, 此时菌体耗糖速率较慢, 主要用于长菌, 基本不产酸; 13~ 36 h 为菌体生长对数期, 此时生长速率达到并保持最大, 耗糖

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

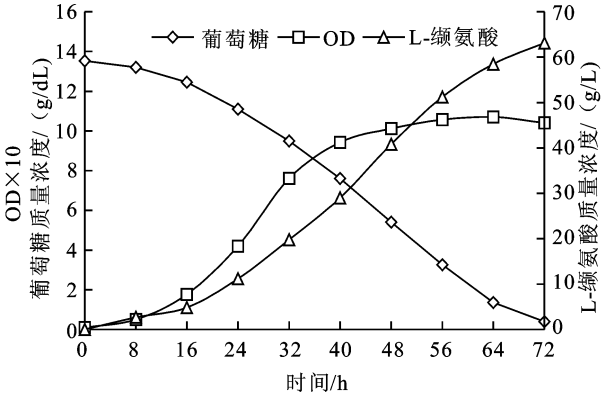


图 6　L-缬氨酸发酵过程曲线

Fig. 6　Time course of L-valine production

速率明显加快, 并开始产酸; 37~ 64 h 进入菌体稳态生长期, 此间耗糖速率较快, L-缬氨酸大量合成; 65~ 72 h 为衰亡期, 此间耗糖速率减慢, 直到发酵结束。

3　结　语

L-缬氨酸与 L-亮氨酸和 L-异亮氨酸的生物合成途径是相关的, 这 3 种氨基酸的生物合成, 存在着共同的酶, 因此代谢调节机制较为复杂。在合成途径中存在: (1) 缬氨酸对 α-乙酰羟基酸合成酶 (AS) 有抑制作用; (2) 缬氨酸、异亮氨酸和亮氨酸对 α-乙酰羟基酸合成酶 (AS) 有多价阻遏作用。

L-缬氨酸生物合成的限速酶为 α-乙酰羟基酸合成酶 (AS)。因此, 如果要在培养基中积累大量 L-缬氨酸, 就必须解除正常的反馈调节, 即解除 L-缬氨酸对 α-乙酰羟基酸合成酶 (AS) 的反馈抑制及 L-异亮氨酸、L-缬氨酸和 L-亮氨酸对 α-乙酰羟基酸合成酶 (AS) 的多价阻遏。α-AB 为 L-缬氨酸的结构类似物, 其高浓度抗性突变株可解除了 L-缬氨酸对 α-乙酰羟基酸合成酶 (AS) 的反馈抑制; 2-TA 为 L-缬氨酸和 L-亮氨酸的结构类似物, 其高浓度抗性突变株也同样可解除了 L-缬氨酸和 L-亮氨酸对 α-乙酰羟基酸合成酶 (AS) 的多价阻遏, 使得 AS 的酶活极大幅度地提高, 其结果在培养基中积累大量 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 的多价反馈调节, 这一点值得进一步探讨。

参考文献(References):

[1] 木下祝郎. L-缬氨酸菌种的选育[M]. 新版发酵工业, 1974, (1): 5.

[2] 张克旭. 氨基酸发酵工艺学[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1992, 678.

[3] 冯容保. 氨基酸的工业生产[J]. 发酵科技通讯, 2000, 29: 1.
FENG Rong-bao. Industry production of amino acid [J]. **Fa Jiao Keji Tongxun,** 2000, 29: 1. (in Chinese)

[4] 中国科学院微生物研究所氨基酸组. L-缬氨酸产生菌 AS1.586 的选育. 微生物学报, 1975, 15(4): 325~ 330.
Institute of Microbiology of CAS. Breeding of L-valine producer AS1.586[J]. **Acta Microbiol Sin.** 1975, 15(4): 325~ 330. (in Chinese)

[5] 王秀岭, 屈明波, 黄和容. 多重抗性突变株 L-缬氨酸发酵[J]. 微生物学通报, 1990, 17(5): 276~ 279.
WANG Xiu-ling, QU Ming-bo, HUANG He-rong. A multi- resistances mutant for L-valine producer[J]. **Microbiology.** 1990, 17(5): 276~ 279. (in Chinese)

[6] 张伟国, 钱和. L-缬氨酸菌种的选育[J]. 无锡轻工业大学学报, 1995, (3): 221- 224.
ZHANG Wei-guo, QIAN He. Breeding of L-valine producer[J]. **Journal of Wuxi University of Light Industry,** 1995, (3): 221- 224. (in Chinese)

[7] 浦军平, 肖泉, 林学军. 一次性高搪发酵 L-缬氨酸菌种选育及发酵条件[J]. 大连轻工业学院学报, 2001, 20(4): 264- 267.
PU Jun-ping, XIAO Quan, LIN Xue-jun. Selective breeding process and fermenting condition of L-valine in highglucoside [J]. **Journal of Dalian Institute of Light Industry,** 2001, 20(4): 264- 267. (in Chinese)

[8] 张伟国, 钱和. L-缬氨酸高产菌选育及营养需求研究[J]. 沈阳药科大学学报, 2001, 18(6): 443- 446.
ZHANG Wei-guo, QIAN He. Study on the breeding of L-valine hyper-producer and its requirement for nutrients[J]. **Journal of Shenyang Pharmaceutical University.** 2001, 18(6): 443- 446. (in Chinese)

[9] 赵丽丽, 张蓓, 陈宁等. L-缬氨酸补料分批发酵的研究[J]. 南开大学学报: 自然科学, 2002, 35(4): 106- 110.
ZHAO Li-li, ZHANG Pei, CHEN Ning. Studies on the feed batch fermentation of L-valine[J]. **Acta Scientiarum Naturalium University Nankaiensis.** 2002, 35(4): 106- 110. (in Chinese)

[10] 徐庆阳, 刘树海, 陈宁. L-缬氨酸的发酵工艺研究[J]. 生物技术通讯, 2006, 17(3): 381- 386.
XU Qing-yang, LIU Shu-li, CHEN Ning. Study on the fermentation process of L-valine produced by brevibacterium flavum[J]. **Letters in Biotechnology.** 2006, 17(3): 381- 386. (in Chinese)

[11] 章名春. 工业微生物诱变育种[M], 北京: 科学出版社, 1984

[12] 潘家秀. 蛋白质化学研究技术[M], 北京: 科学出版社, 1962

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net