

# L-精氨酸产生菌诱变育种的研究

钱 和\* 郝 刚

(江南大学食品学院国家教育部功能食品工程研究中心 无锡 214036)

**摘要:** 以谷氨酸棒杆菌 (*Corynebacterium glutamicum*) ATCC138761 为诱变出发菌株, 经紫外线 (UV) 和亚硝基胍 (NTG) 逐级诱变处理和选育, 获得一株能够积累 L-精氨酸的菌株 UN100-12 (SG<sup>+</sup>, AE<sup>+</sup>)。在以葡萄糖为碳源、以硫酸铵为氮源的培养基中直接发酵 4d, 产酸可达 16.6 g/L, 并具有较好的遗传稳定性。

**关键词:** L-精氨酸, 谷氨酸棒杆菌, 发酵, 诱变育种

**中图分类号:** Q933 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2005) 03-0046-05

## Study on the Breeding of L-Arginine-producing Strain

QIAN He HAO Gang

(School of Food Science, Southern Yangtze University, Wuxi 214036)

**Abstract:** A L-arginine-producing mutant UN100-12 (SG<sup>+</sup>, AE<sup>+</sup>) was derived from *Corynebacterium glutamicum* ATCC138761 by combination treatment with ultraviolet (UV) and N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG). It could accumulate 16.6 g/L L-arginine in the medium containing glucose as carbon source and ammonium sulfate as nitrogen source, when it was cultured at 30°C for 4 days. And also this mutant has good stability of descendibility of L-arginine.

**Key words:** L-arginine, *Corynebacterium glutamicum*, Fermentation, Breeding

L-精氨酸是合成蛋白质和肌酸的重要原料, 是人和动物体内的半必需氨基酸, 在医药和食品工业上具有广泛用途。L-精氨酸是生物体尿素循环中的一种重要中间代谢产物, 临床上作为复方氨基酸输液的主要组份之一。L-精氨酸及其盐类广泛地作为氨中毒性肝昏迷的解毒剂和肝功能促进剂, 对病毒性肝炎疗效显著, 对肠道溃疡、血栓形成、神经衰弱和男性无精病等病症都有治疗效果<sup>[1]</sup>。因此早在 20 世纪 70 年代国外就开始研究发酵法生产 L-精氨酸<sup>[2-4]</sup>。日本在这方面的研究处于领先水平, 他们对黄色棒杆菌进行诱变, 突变株产酸可达 40 g/L。在 80 年代, 中国科学院微生物研究所龚建华等以钝齿棒杆菌 AS1.542 为出发菌株, 经 NTG 多次逐级诱变, 获得一株能积累大量精氨酸的菌株 971.1 (SG<sup>+</sup>, His<sup>+</sup>)<sup>[5]</sup>。该菌产酸达 24.2 g/L, 但由于该菌株产酸水平不稳定等原因, 该菌种未能应用于工业化生产<sup>[6,7]</sup>。本文报道了以谷氨酸棒杆菌 (*Corynebacterium glutamicum*) ATCC138761 为诱变出发菌株, 经紫外线 (UV) 和亚硝基胍 (NTG) 逐级诱变处理和选育, 获得一株能够积累 L-精氨酸的菌株 UN100-12 (SG<sup>+</sup>, AE<sup>+</sup>)。在以葡萄糖为碳源、以硫酸铵为氮源的培养基中直接发酵 4d, 平均产酸可达 16.6 g/L。

\* 通讯作者 Tel: 0510-5869451, E-mail: qiandahe@sina.vip.com

收稿日期: 2004-08-09, 修回日期: 2004-09-22

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株

谷氨酸棒杆菌 (*Corynebacterium glutamicum*) ATCC138761。

### 1.2 培养基

**1.2.1 完全培养基:** 葡萄糖 10g, 蛋白胨 10g, 酵母膏 10g, NaCl 5g, 琼脂 20g, 用水定容至 1 L, pH 7.0,  $1.1 \times 10^5$  Pa 灭菌 20 min。

**1.2.2 基础培养基:** 葡萄糖 20g,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1.5g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  3g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5g,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.02 g,  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0.02g, 生物素  $5 \times 10^{-5}$  g, 硫胺素  $2 \times 10^{-4}$  g, 尿素 1.5g, 琼脂粉 20g, 用水定容至 1 L, pH 7.0,  $1.1 \times 10^5$  Pa 灭菌 20 min。

**1.2.3 种子培养基:** 葡萄糖 25g, 玉米浆 40g,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  5g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5g,  $\text{CaCO}_3$  10g, 用水定容至 1 L, pH 7.0,  $1.1 \times 10^5$  Pa 灭菌 20min, 装液量 30mL/250mL。

**1.2.4 发酵培养基:** 葡萄糖 125g, 玉米浆 15g,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  20g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5g,  $\text{CaCO}_3$  40g, 用水定容至 1 L, pH 7.0,  $0.7 \times 10^5$  Pa 灭菌 10 min, 装液量 15mL/250mL。

**1.2.5 鉴定用培养基:** 基础培养基中分别补加磺胺胍、精氨酸甲基酯。

### 1.3 培养条件

**1.3.1 种子培养条件:** 接种后的种子发酵液置于往复式摇床, 转速 96r/min, 30℃ 培养 24h。

**1.3.2 摇瓶发酵培养条件:** 接种后的摇瓶置于往复式摇床, 转速 96r/min, 30℃ 培养 96h。

### 1.4 主要试剂

亚硝基胍 (NTG): Fluka 公司产品; 磺胺胍 (SG): Sigma 公司产品; 精氨酸甲基酯 (AE): Sigma 公司产品。

### 1.5 诱变方法及突变株的筛选方法

**1.5.1 紫外线诱变方法:** 种子培养 24h 后, 再以 50% 的接种量转接到种子培养基中, 培养 5h 使细胞达到同步培养。将培养液无菌离心, 收集菌体, 用生理盐水洗涤 2~3 次, 转入到带玻璃珠的三角瓶中打散, 得菌悬液, 细胞浓度控制在  $10^8$  个/mL 左右。在 15W 紫外灯下 30cm 处照射一定时间后转接入种子培养基中避光培养约 12h。取出后培养液按梯度稀释并涂布筛选平板, 30℃ 恒温培养。

**1.5.2 亚硝基胍诱变方法:** 种子培养 24h 后, 再以 50% 的接种量转接到种子培养基中, 培养 5h 使细胞达到同步培养。取培养液 10 mL 无菌离心, 菌体用 0.1 mol/L, pH 6.0 的磷酸缓冲液洗涤 2~3 次, 转入带玻璃珠的三角烧瓶中打散, 得菌悬液, 细胞浓度控制在  $10^8$  个/mL 左右。取菌悬液, 加入亚硝基胍溶液, 使其终浓度为 0.5mg/mL。30℃ 下振荡反应一定时间, 诱变结束后快速离心终止反应, 用无菌生理盐水洗涤 2~3 次后, 接入到种子培养基中后培养 8h。取后培养液按梯度稀释并涂布筛选平板, 30℃ 恒温培养。

**1.5.3 SG<sup>+</sup>、AE<sup>+</sup>突变株的筛选:** 配制基本培养基, 灭菌后加入适量的药物 (SG) 和结构类似物 (AE), 制成不同浓度梯度的筛选平板。涂布上述经诱变处理过的菌液, 置

30℃ 恒温箱中培养 3 ~ 5d, 挑取长出的菌落, 即为 SG'、AE' 突变株。

1.6 分析方法

1.6.1 菌体生长测定: 取 0.2mL 待测液, 加入 5mL 0.25mol/L 盐酸以溶解溶液中的碳酸钙, 摇匀, 以空白培养液为参比, 用 UV-2000 型分光光度计在波长 562nm 下测菌体光密度值。

1.6.2 pH 值测定: 用梅特勒-托利多 DELTA 型 pH 计进行测定。

1.6.3 L-精氨酸定性测定: 采用纸层析法, 展开剂用 77% 乙醇: 二乙胺 = 100: 1, 层析后用坂口试剂显色。

1.6.4 L-精氨酸含量测定: 采用坂口改良法<sup>[8]</sup>。

2 结果与讨论

2.1 L-精氨酸产生菌 UN100-12 的诱变谱系

以谷氨酸棒杆菌 ATCC138761 为诱变出发菌株, 经紫外线 (UV) 诱变和磺胺胍 (SG) 平板筛选, 获得一株能产 L-精氨酸的菌株 U97-32, 对该菌株又进行亚硝基胍 (NTG) 诱变和精氨酸甲基酯 (AE) 平板筛选, 获得一株产 L-精氨酸能力有较大提高的突变株 UN100-12, 它是对药物磺胺胍和结构类似物精氨酸甲基酯具有显著抗性的突变株。UN100-12 菌株的诱变谱系如图 1 所示。



图 1 UN100-12 菌株的诱变谱系图

2.2 紫外线诱变及结果

2.2.1 紫外线照射时间与致死率的关系: 为了选择合适的诱变处理时间, 对紫外线照射时间与致死率的关系作了试验, 测定结果见表 1。

表 1 紫外诱变致死率的测定结果

照射时间 (min)	1	2	5	10	20
致死率 (%)	74.5	89.4	94.7	99.1	99.9

由表 1 可知, 致死率与诱变剂量成正相关。采用致死率为 99.1% 的照射时间 10min 的诱变剂量对出发菌株进行诱变。

2.2.2 突变株 U97-32 与出发菌株 ATCC138761 的磺胺胍抗性的比较: 分别将 U97-32 菌株和 ATCC138761 菌株的菌悬液涂布在含不同浓度 SG 的基本培养基上, 30℃ 培养 3 ~ 5d, 观察菌株的生长情况, 结果如表 2 所示。这一特征反映出经过诱变后突变株获得了新的遗传性状, 精氨酸生物合成的代谢调控机制得以不同程度的变化, 从而使突变株积累精氨酸的能力不断提高。

表 2 U97-32 菌株和 ATCC138761 菌株对 SG 抗性的比较

SG 浓度 (mg/mL)	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
菌株 ATCC138761 的生长情况	++	+-	--	--	--	--
菌株 U97-32 的生长情况	++	++	++	+-	--	--

++ 表示生长良好, +- 表示微弱生长, -- 表示没有生长, 以下同

2.3 亚硝基胍诱变及结果

2.3.1 亚硝基胍诱变致死率结果: 在进行亚硝基胍诱变时, 首先考察了不同诱变剂量的致死率。诱变剂量与致死率的关系如表 3 所示。

表 3 亚硝基胍处理 U97-32 致死率的结果

处理时间 (min)	10	20	30	40	50
致死率 (%)	90.6	97.1	97.8	99.1	99.9

2.3.2 菌株 U97-32 和 UN100-12 对精氨酸甲基酯耐受程度的比较: L-精氨酸的生物合成受其自身的反馈抑制和反馈阻遏, 选育结构类似物抗性突变株以解除 L-精氨酸自身的反馈调节使 L-精氨酸得以积累。AE 的结构与 L-精氨酸结构基本一致, 因此 AE 可以作为 L-精氨酸的结构类似物, 选育已经解除代谢途径中精氨酸的反馈调节的突变株。在不同 AE 浓度平板上涂布适当稀释的菌株 U97-32 和 UN100-12 的菌悬液, 30℃ 培养 3~5d, 观察菌株对 AE 的抗性, 结果如表 4 所示。

表 4 菌株 U97-32 和 UN100-12 对 AE 抗性比较

AE 浓度 (mg/mL)	0	2	4	6	8	10
菌株 U97-32 的生长情况	++	+-	--	--	--	--
菌株 UN100-12 的生长情况	++	++	++	+-	--	--

2.3.3 亚硝基胍不同处理时间突变情况的比较: 上述五种不同处理时间诱变后的 AE 抗性平板中各随机挑取 100 株进行实验。以 L-精氨酸产量为检测指标, 产量提高 10% 以上计为正突变株, 减低 10% 以上计为负突变株, 产量改变在 10% 以内的计为稳定株, 比较不同诱变剂量下正突变率和负突变率的情况, 结果见图 2 所示。

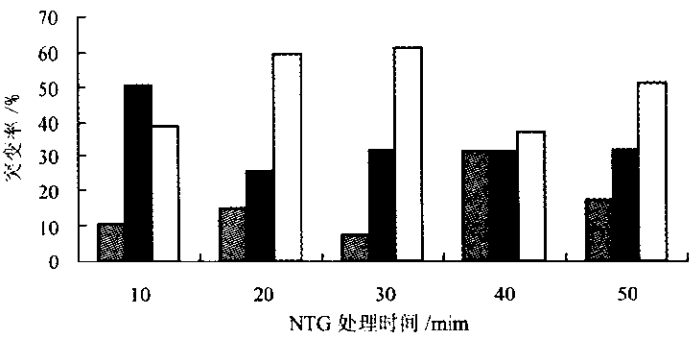


图 2 NTG 不同处理时间突变情况的比较

■ 正突变率, ■ 负突变率, □ 稳定率

用 NTG 对菌株进行诱变, 不定向的改变所获得菌株的遗传特性, 导致菌体代谢控制机制的变化, 这种变化反映在精氨酸积累能力上则有正变和负变。从实验结果可

知, 正突变率与诱变剂量之间并没有特别的关系。

#### 2.4 菌株 UN100-12 的遗传稳定性

将菌株 UN100-12 在斜面上划线分纯, 进行传代稳定性试验, 连续传种五代, 涂平皿分离单菌落。每一代中与亲株相比产量改变在 10% 以内的计为稳定株, 测定 L-精氨酸产量及稳定率, 以及对 SG (0.6 mg/mL)、AE (6 mg/mL) 的抗性, 结果见表 5。该突变株的遗传稳定性较好, 连续传种 5 次, 其产酸未见明显变化, 抗性标记遗传较好。

表 5 菌株 UN100-12 的遗传稳定性

传代次数	1	2	3	4	5
L-精氨酸产量 (g/L)	16.6	16.1	17.0	16.8	16.4
稳定率 (%)	89.5	90.1	91.7	92.2	92.4
SG 抗性	++	++	++	++	++
AE 抗性	++	++	++	++	++

### 3 结论

以谷氨酸棒杆菌 ATCC138761 为诱变出发菌株, 经紫外线诱变和磺胺胍平板筛选, 再进行亚硝基胍诱变和精氨酸甲基酯平板筛选, 获得一株产 L-精氨酸能力有较大提高的突变株 UN100-12 (SG', AE'), 产酸可达 16.6 g/L, 并具有较好的遗传稳定性。

### 参考文献

- [1] Adrian B. 氨基酸杂志, 1987, 2 (1): 39~43.
- [2] Kiyoshi N, Hajime Y. Agric Biol Chem, 1972, 36 (10): 1675~1684.
- [3] Hajime Y, Kazumi A, Kiyoshi N. Agric Biol Chem, 1979, 43 (1): 105~111.
- [4] Hajime Y, Kazumi A, Kiyoshi N. Agric Biol Chem, 1981, 45 (4): 959~963.
- [5] 路志强, 龚建华, 丁久元. 微生物学报, 1988, 28 (2): 131~135.
- [6] 龚建华, 丁久元, 路志强. 微生物学报, 1988, 28 (3): 257~264.
- [7] 龚建华, 丁久元, 陈琦. 微生物学报, 1991, 31 (6): 460~465.
- [8] 蒙绮芳, 赖碧清, 周锡梁. 氨基酸和生物资源, 1998, 20 (3): 1~4.