

过量无机盐及谷氨酸抑制重组菌核黄素发酵

司马迎春 班 睿*

(天津大学化工学院生物工程系 天津 300072)

摘要:在重组枯草芽孢杆菌 24/pMX45 核黄素发酵中,酵母粉促进核黄素合成,酵母抽提物抑制核黄素合成。分析显示,酵母抽提物的无机离子和游离氨基酸含量均高于酵母粉。在酵母粉基础发酵培养基中,添加各种无机离子和游离氨基酸,使其含量与酵母抽提物相同。摇瓶发酵结果表明:过量的无机离子和谷氨酸对核黄素合成有显著的抑制作用。酵母抽提物含有较高浓度的谷氨酸,是其抑制核黄素合成的主要原因。

关键词:酵母粉,酵母抽提物,发酵,核黄素,重组枯草芽孢杆菌

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2006) 02-0086-04

Excess Inorganic Salt and Glutamine Repress Riboflavin Fermentation of Recombinant *Bacillus subtilis*

SIMA Ying-Chun BAN Rui*

(Department of Biochemical Engineering, School of Chemical Engineering & Technology, Tianjin University, Tianjin 300072)

Abstract: In the riboflavin fermentation by recombinant *Bacillus subtilis* 24/pMX45, The yeast powder facilitate riboflavin biosynthesis and the yeast extract have negative effect. It was found that the concentrations of inorganic ions and the amino acids in yeast extract were much higher than that of the yeast powder. The inorganic ions and the amino acids were respectively added to the medium while yeast powder was used as base nitrogen source. The fermentation results show that excess inorganic ions and glutamine have negative effect on riboflavin biosynthesis. The yeast extract restrained riboflavin biosynthesis for it contains much glutamic acid.

Key words: Yeast powder, Yeast extract, Fermentation, Riboflavin, Recombinant *Bacillus subtilis*

近年来,运用基因工程技术构建的过量合成核黄素的重组枯草芽孢杆菌^[1],在核黄素工业发酵生产中已被广泛采用,以替代传统的化学半合成法和真菌发酵法,成为一种很有前景的核黄素发酵技术^[2]。过量合成核黄素的重组枯草杆菌通常是多重缺陷菌株,需补充若干种维生素和氨基酸作为生长因子,才能维持正常生长和核黄素过量合成^[3]。酵母粉和酵母抽提物都是天然物质,富含各种维生素、氨基酸和无机盐,是发酵的理想氮源和生长因子。但是,天然产物的组成不恒定,随来源或批次而变化。在工业发酵中,需要对天然产物进行质量控制。了解天然物质中影响发酵过程的关键成分,是对发酵原料进行质量控制的依据。

酵母粉和酵母抽提物的制备工艺不同^[4],造成它们组成成分的差异,进而对核黄素发酵产生不同影响^[5]。本文在分析比较酵母粉和酵母抽提物主要成分差异的基础上,采用组分添加方法研究了各种无机盐和氨基酸对核黄素发酵的影响。

* 通讯作者 Tel: 022-27409493, E-mail: banrui@eyou.com

收稿日期: 2005-07-04, 修回日期: 2005-08-24

1 材料与方法

1.1 菌种

重组枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 24/pMX45, 天津河北制药厂提供。

1.2 培养基及发酵条件

菌种保藏和活化培养基均为 LB 培养基; 基础发酵培养基为 10% 蔗糖, 2.5% 酵母粉 (酵母抽提物), 0.05% 硫酸镁; 摇瓶装量为 100mL/500mL, 转速 240r/min, 在 41℃ 下发酵 65h^[6]。酵母抽提物为英国 Oxoid 公司产品, 酵母粉为广东遂溪制药厂药用级产品, 其余为市购生化或分析纯试剂。

1.3 分析方法

核黄素的定量分析采用分光光度法^[7]; 氨基酸分析采用日立 835-50 型氨基酸自动分析仪, 由中国人民解放军卫生监测中心测定^[8]; 无机离子采用日本岛津 VF-320X-射线荧光光谱仪和离子色谱, 由南开大学中心实验室测定^[6]。

2 结果与讨论

2.1 酵母抽提物与酵母粉无机盐和游离氨基酸的含量

酵母粉是酵母菌的液体培养物, 直接经过滤、干燥和粉碎后形成的粉状物。含有酵母细胞、细胞碎片和大分子不溶物, 其中粗蛋白含量约为 300~400mg/g; 也含有一定量的单糖、氨基酸、维生素及无机盐等可溶性成分。酵母抽提物是酵母细胞自裂解后, 经过滤除渣, 浓缩形成的膏状物, 或干燥形成的粉状物。主要成分为可溶性糖类、氨基酸、维生素及无机盐等。所用酵母抽提物和酵母粉的无机离子和游离氨基酸含量比较如表 1、表 2 所示。

表 1 酵母抽提物和酵母粉中无机离子含量比较

无机离子	酵母抽提物含量 (mg/g)	酵母粉含量 (mg/g)	酵母抽提物/酵母粉含量比
NH ₄ ⁺	未检出	未检出	-
Na ⁺	3.40	1.42	2.39
K ⁺	51.00	9.38	5.44
Mg ²⁺	0.10	0.37	0.27
Ca ²⁺	0.40	0.28	1.43
PO ₄ ³⁻	8.60	1.28	6.72
Zn ²⁺	0.04	0.02	2.00
Fe ²⁺	0.03	0.06	0.50

表 2 酵母抽提物与酵母粉游离氨基酸含量比较

氨基酸	酵母抽提物 (mg/g)	酵母粉 (mg/g)	含量比	氨基酸	酵母抽提物 (mg/g)	酵母粉 (mg/g)	含量比
Asp	16.50	1.48	11.15	Ile	22.20	0.21	105.71
Thr	20.40	1.51	13.50	Leu	38.20	0.31	123.23
Ser	21.80	1.24	17.58	Tyr	14.30	0.48	29.79
Glu	72.70	30.49	2.38	Phe	27.20	0.28	97.14
Gly	12.90	1.22	10.57	Lys	18.00	1.13	15.93
Ala	37.20	9.63	3.86	His	6.40	0.45	14.22

续表 2

Cys	1. 50	0. 35	4. 29	Arg	13. 70	2. 58	5. 31
Val	25. 20	0. 88	28. 64	Pro	7. 80	0. 33	23. 64
Met	8. 70	0. 16	54. 38	总量	364. 70	52. 73	6. 92

酵母粉的 Mg^{2+} 和 Fe^{2+} 含量高于酵母抽提物 2~3 倍, 其余无机离子和氨基酸含量都是酵母抽提物大大高于酵母粉。谷氨酸在两种物质中都是含量最高的氨基酸, 色氨酸均未检出。酵母抽提物中游离氨基酸总量和谷氨酸含量分别高于酵母粉 6.90 倍和 2.38 倍。

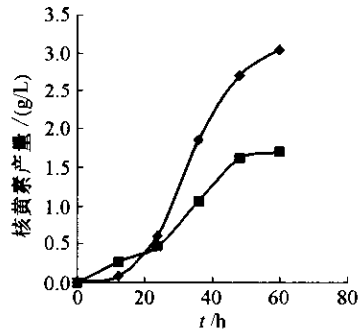


图 1 核黄素发酵曲线
—◆— 酵母粉, —■— 酵母抽提物

2.2 酵母粉和酵母抽提物对核黄素发酵的影响

分别以 2.5% 酵母粉和 2.5% 酵母抽提物作为基础发酵培养基的氮源, 进行重组枯草芽孢杆菌的核黄素发酵, 发酵 (图 1)。酵母抽提物抑制核黄素发酵, 最终核黄素产量为 1.7g/L 左右。酵母粉作为氮源, 能够维持一个较高的核黄素合成速率, 核黄素的产量可达到 3g/L 以上。核黄素合成对 Fe^{2+} 不敏感, Mg^{2+} 有利于核黄素合成^[9], 且 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 的最适用量高达 0.05%, 因此, Mg^{2+} 和 Fe^{2+} 的含量差异, 不会对核黄素发酵产生显著影响。

2.3 无机离子对核黄素发酵的影响

在 2.5% 酵母粉的基础发酵培养基中补加无机盐, 使每种离子的最终含量与 2.5% 酵母抽提物的含量相同, 具体添加量以及摇瓶发酵结果见表 3。结果显示, 实验量的各种无机离子的单独存在, 对核黄素发酵没有显著影响。几种无机盐共同存在, 形成的较高无机盐浓度对核黄素合成有轻微抑制作用。

表 3 添加无机离子对核黄素发酵的影响

无机盐	对照	NaCl	KCl	CaCl ₂	NaH ₂ PO ₄	ZnSO ₄	混合无机盐
添加量 (mg/100mL)	0	1.35	198.76	1.13	23.11	0.12	224.47
核黄素产量 (g/L)	3.27	3.17	3.15	3.07	3.21	3.11	2.96

2.4 氨基酸对核黄素发酵的影响

在 2.5% 酵母粉的基础发酵培养基中, 分别添加各种氨基酸, 添加量根据表 2 有所加减, 具体加量及发酵结果见表 4。结果显示, 除加入 0.7% 的苏氨酸对核黄素产量略有提高外, 0.7% 的谷氨酸、异亮氨酸、半胱氨酸、赖氨酸、天冬氨酸、亮氨酸和甘氨酸明显抑制核黄素合成。其中谷氨酸的抑制作用最为强烈, 0.1% 的谷氨酸使核黄素产量下降 11.4%, 0.7% 的谷氨酸使核黄素产量减少 41%。

表 4 氨基酸对核黄素发酵的影响

氨基酸	添加量 (mg/100mL)	核黄素产量 (g/L)	氨基酸	添加量 (mg/100mL)	核黄素单位 (mg/L)
对照组	0	3.28	Gly	700	2.87
Thr	700	3.45	Leu	700	2.71
Ala	700	3.11	Asp	700	2.64

续表 4

Met	700	3.12	Lys	700	2.61
Pro	700	3.09		400	2.94
His	700	3.02	Cys	700	2.27
Tyr	700	3.02	Ile	700	2.05
Phe	700	3.01		700	1.87
Arg	700	3.00	Glu	400	2.12
Ser	700	3.00		200	2.52
Val	700	2.99		100	2.82

2.5 谷氨酸的效应

在含有 2.5% 酵母粉和 0.2% 谷氨酸的基础发酵培养基中，分别添加 0.4% 的苏氨酸、丝氨酸和缬氨酸，与不加谷氨酸，只单独加入 0.4% 的苏氨酸、丝氨酸和缬氨酸的含有 2.5% 酵母粉的基础发酵培养基进行对照发酵。发酵结果如图 2 所示。0.4% 的苏氨酸、丝氨酸和缬氨酸单独使用，对核黄素发酵没有抑制作用。但是与谷氨酸共同加入时，明显降低核黄素产量。

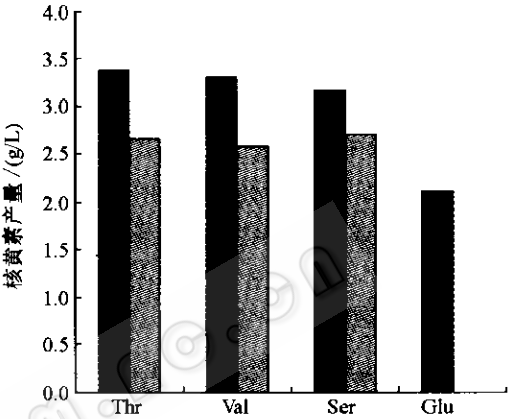


图 2 谷氨酸的效应

■ 0.4% 单一氨基酸，▨ 0.2% 单一氨基酸 + 0.2% Glu

3 讨论

过量合成核黄素的重组枯草芽孢杆菌是转酮酶缺陷菌株，其核糖醇型磷壁酸合成受阻，细胞壁存在缺陷，因此对离子浓度比较敏感。酵母抽提物中过高的无机离子可能抑制细胞生长，造成核黄素产量下降。

在枯草芽孢杆菌中，葡萄糖与谷氨酸的存在，对糖酵解途径有协同激活作用，对三羧酸循环有协同抑制作用^[10]。当谷氨酸过量存在时，与葡萄糖的共同作用，增大了糖酵解途径的代谢通量，引起代谢流由磷酸戊糖途径迁移到糖酵解途径，导致核黄素合成代谢速率和产量显著降低。酵母抽提物中无机盐和谷氨酸含量较高于酵母粉，所以显著抑制核黄素合成。在选择核黄素发酵氮源，以及优化核黄素发酵培养基组成时，无机盐的总浓度和谷氨酸含量是需要控制的一个关键指标。

参考文献

[1] Perkins J B, Sloma A, Hermann T, *et al.* Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 1999, 22: 8 ~ 18.

[2] Stahmann K P, Revuelta J L, Seulberger H. Appl Microbiol Biotechnol, 2000, 53: 509 ~ 516.

[3] Heefner D, Weaver C A, Yarus M J, *et al.* Patent, WO 09822. 1988-06.

[4] Akin, Cavit, Murphy, *et al.* United States Patent, 1981, 4, 285, 976.

[5] 李建国, 班 睿, 司马迎春. 河北大学学报 (自然科学版), 2003, 23 (2): 180 ~ 183.

[6] 何振宇, 方祥玉, 许风华, 等. 理化检验 - 化学分册, 2002, 4 (38): 176 ~ 178.

[7] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国药典 (第二部). 北京: 化学工业出版社, 1995. 818.

[8] 王宝珍, 丁长江, 留 磊. 人参研究, 2000, 12 (3): 35 ~ 36.

[9] 曹 琳, 唐寅杰, 赵学明, 等. 无锡轻工大学学报, 1999, 18 (6): 28 ~ 31.

[10] Ingrid W, Holger L, Irene R, *et al.* Microbiology, 2003, 149: 3001 ~ 3009.