

## 研究报告

## 常压室温等离子体诱变选育 L-精氨酸生产菌及发酵条件优化

程功 徐建中 郭燕凤 徐凯 张伟国\*

(江南大学生物工程学院 工业生物技术教育部重点实验室 江苏 无锡 214122)

**摘要:**【目的】通过常压室温等离子体诱变技术选育 L-精氨酸高产菌株, 利用响应面设计探索突变菌株生产 L-精氨酸的最佳发酵条件。【方法】采用常压室温等离子体生物诱变系统对实验室保藏的 *Corynebacterium glutamicum* GUI089 进行系列诱变, 选育 L-高精氨酸和 8-氮鸟嘌呤抗性菌株。在单因子实验的基础上, 应用 Plackett-Burman 设计从 7 个因素中筛选出对 L-精氨酸合成具有显著效应的  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、葡萄糖和尿素 3 个因素。基于上述结果, 进一步采用响应面设计优化出主要影响因素的最佳参数水平。【结果】经过一系列的诱变和筛选, 选育出一株 L-高精氨酸 (15 g/L) 和 8-氮鸟嘌呤 (0.7 g/L) 抗性菌株, 并将此菌株命名为 *C. glutamicum* ARG 3-16。此菌株的 L-精氨酸产量比出发菌株提高了 49.79%, 且发酵液中杂酸的浓度明显降低, 特别是 L-脯氨酸、L-谷氨酸和 L-缬氨酸。在经响应面优化后的最佳发酵条件下, L-精氨酸的产量达到  $39.72 \pm 0.75$  g/L, 比优化前提高了 10.49%。【结论】通过常压室温等离子体诱变技术成功选育出一株 L-精氨酸高产菌株, 利用响应面法有效地优化了发酵条件, 实验结果表明突变株 ARG 3-16 具有潜在的生产应用价值。

**关键词:** L-精氨酸, 常压室温等离子体, 选育, 谷氨酸棒状杆菌, 响应面设计

## Breeding and fermentation optimization of L-arginine producing strains

CHENG Gong XU Jian-Zhong GUO Yan-Feng XU Kai ZHANG Wei-Guo\*

(The Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

**Abstract:** [Objective] To breed L-arginine high-yielding strains by atmospheric and room temperature plasma (ARTP), and to explore the optimal fermentation conditions of mutants by response surface method. [Methods] The L-homoarginine and 8-azaguanine resistant strain was obtained from the strain *Corynebacterium glutamicum* GUI089 ( $\text{SG}^+$ ,  $\text{L-His}^-$ ) that was treated by ARTP. Based on the results of single factor experiments, ammonium sulfate, glucose and urea were selected as independent variables to optimize fermentation conditions for L-arginine production from 7 factors by Plackett-Burman design. Subsequently, the levels of the three variables were further optimized by response surface

**Foundation item:** National High Technology Research and Development Program of China (No. 2008AA02Z212)

\*Corresponding author: Tel: 86-510-85129312; E-mail: zhangwg168@126.com

Received: May 14, 2015; Accepted: June 26, 2015; Published online (www.cnki.net): July 10, 2015

基金项目: 国家 863 计划项目(No. 2008AA02Z212)

\*通讯作者: Tel: 86-510-85129312; E-mail: zhangwg168@126.com

收稿日期: 2015-05-14; 接受日期: 2015-06-26; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2015-07-10

methodology. **[Results]** After several rounds of screening, a strain was selected resistant to 15 g/L L-homoarginine and 0.7 g/L 8-azaguaine, and designated as *C. glutamicum* ARG 3-16 (L-HA<sup>r</sup>, 8-AZ<sup>r</sup>, SG<sup>r</sup>, L-His<sup>-</sup>). L-arginine production of ARG 3-16 was 49.79% higher than that of the original strain. Beyond the higher production of L-arginine production, ARG 3-16 accumulated fewer by-products than the original strain, especially the accumulations of L-proline, L-glutamate and L-valine. Under the optimal conditions, the yield of L-arginine reached 39.72±0.75 g/L, 10.49% higher than before optimization. **[Conclusion]** We successfully bred a high-yielding L-arginine producing strain by ARTP breeding system, and optimized fermentation conditions by response surface methodology, the results suggested that ARG 3-16 was a promising L-arginine producing strain.

**Keywords:** L-arginine, Atmospheric and room temperature plasma (ARTP), Breeding, *C. glutamicum*, Response surface methodology

L-精氨酸是含胍基的半必需碱性氨基酸。L-精氨酸作为功能性氨基酸在心血管、神经、内分泌和免疫系统等疾病的治疗中具有重要的药用价值<sup>[1]</sup>。目前 L-精氨酸主要应用于饲料、化妆品、医药工业<sup>[2-4]</sup>。自从 Kinoshita 等<sup>[5]</sup>首次报道利用 *Corynebacterium glutamicum* 生产 L-谷氨酸,微生物发酵法生产氨基酸促进了氨基酸工业的发展壮大。但是在国内微生物发酵法生产的氨基酸主要应用于饲料工业,医药级的氨基酸还是主要依赖进口。特别是具有多功能的 L-精氨酸,目前国内工厂使用 L-精氨酸生产菌均是国外引进的菌株,所以选育一株具有自主知识产权的 L-精氨酸高产菌具有重要的实际应用意义。

传统的物理、化学诱变育种不可避免地或多或少对人的健康有一定的伤害作用。但是新兴的常压室温等离子体生物诱变系统具有更加安全和较高的可控性,例如较低的可控气体温度、丰富的化学活性离子、快速的突变、较高的灵活性等<sup>[6-7]</sup>。有报道称从常压室温等离子体生物诱变系统释放的等离子体包含温度、紫外线、带电粒子、电磁场、活性氧(例如氧原子和 O<sub>3</sub>)、活性氮(例如 NO 和 NO<sub>2</sub>)和其他活性物质(例如氮原子和氢氧基)等诱变因素<sup>[7-9]</sup>。因此这些复合的诱变因素能更有效地提高菌体的突变率,从而更方便地选育高产菌株。此外,ARTP 在工作过程中无论用何种气体放电,其放电过程中没有核的聚变和裂变等反应,存在的仅是从几十纳米波长,到紫外线,到可见光甚至更强的光

线产生,这种长波的光线与辐射射线不同,其对身体损伤较小。另外,响应面设计是一种优化反应条件和加工工艺参数的有效方法<sup>[10]</sup>。在很多方面都取得较好的效果,因此本试验选用响应面法对发酵培养基进行优化。

本文对实验室保藏的 *C. glutamicum* GUI089 (SG<sup>r</sup>, L-His<sup>-</sup>)进行系列等离子体诱变处理,通过 L-高精氨酸和 8-氮鸟嘌呤抗性平板的筛选选育出一株 L-精氨酸产量为 35.95±0.48 g/L 的菌株,并命名为 *C. glutamicum* ARG 3-16,而且发酵液中杂酸的含量明显降低,特别是 L-脯氨酸、L-谷氨酸和 L-缬氨酸。然后通过响应面法优化突变菌株 ARG 3-16 的发酵培养基,使得 L-精氨酸的产量达到 39.72±0.75 g/L,比优化前提高了 10.49%。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种

L-精氨酸产生菌 *Corynebacterium glutamicum* GUI089 (SG<sup>r</sup>, L-His<sup>-</sup>),由本实验室-80 °C 冷冻保藏。

### 1.2 培养基和培养方法

选择培养基(g/L): 葡萄糖 5, 牛肉膏 10, 酵母膏 5, 胰蛋白胨 10, NaCl 5, 添加不同浓度的 8-氮鸟嘌呤和(或) L-高精氨酸, 琼脂 20, pH 7.0-7.2, 0.1 MPa 灭菌 20 min。

种子培养基(g/L): 葡萄糖(食品级) 30, 硫酸铵(工业级) 10, 玉米浆 20, 尿素 1.5, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (工业级) 1, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5, L-组氨酸 1.0×10<sup>-4</sup>, 碳酸

钙 30, pH 7.0–7.2, 0.1 MPa 灭菌 20 min。30 mL 种子培养基装于 250 mL 三角瓶中, 接种摇瓶培养, 30 °C、90 r/min 培养 16–18 h。

发酵培养基(g/L): 葡萄糖(食品级) 150, 硫酸铵(工业级) 60, 玉米浆 20, 尿素 2,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (工业级) 1,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5, L-组氨酸  $5.0 \times 10^{-4}$ , 生物素  $8.0 \times 10^{-5}$ , 碳酸钙 40, pH 7.0–7.2, 90 kPa 灭菌 10 min。3 mL 种子液转接到装有 30 mL 发酵培养基的 500 mL 的摇瓶中, 30 °C、100 r/min 发酵 96 h。

### 1.3 常压室温等离子体诱变方法

用到的常压室温等离子体生物诱变系统(ARTP)为北京思清源生物科技有限公司与清华大学联合研发的新型微生物基因组快速诱变仪器。ARTP 的诱变步骤如图 1 所示<sup>[11]</sup>: 首先将菌体培养到指数生长期, 然后用无菌生理盐水将菌体的  $OD_{562}$  稀释到 0.5–0.6。取 10–20  $\mu\text{L}$  稀释菌液均匀涂到无菌不锈钢载片上, 然后用常压室温等离子体生物诱变系统处理适当时间; 处理过的载片经 1 mL 无菌生理盐

水洗下菌体, 然后稀释到适当倍数, 最后均匀涂布到选择性平板上, 30 °C 培养 48 h。ARTP 诱变条件: 射频功率 100 W, 处理距离 2 mm, 载气流量 10 SLM (Standard liters per minute), 处理温度为室温(15–45 °C), 处理时间 20–140 s。

### 1.4 分析方法

**1.4.1 菌体浓度测定:** 将发酵液稀释 26 倍, 测定 562 nm 处的吸光值。

**1.4.2 致死率计算:** 致死率(%)=100×(对照组活菌数–诱变组活菌数)/对照组活菌数。

**1.4.3 葡萄糖测定:** 将发酵液离心(9 000×g, 2 min)除去碳酸钙及菌体, 然后稀释 100 倍, 经生物传感分析仪 SBA-40E (山东省科学院生物研究所)测定。

**1.4.4 L-精氨酸的测定:** (1) 纸层析法<sup>[12]</sup>: 定性测定 L-精氨酸的含量, 展开剂用 77%乙醇:二乙胺=100:1, 层析后用坂口试剂显色。在初筛的过程可以根据 L-精氨酸产量高, 杂酸浓度低来初步筛选 L-精氨酸高产菌株。

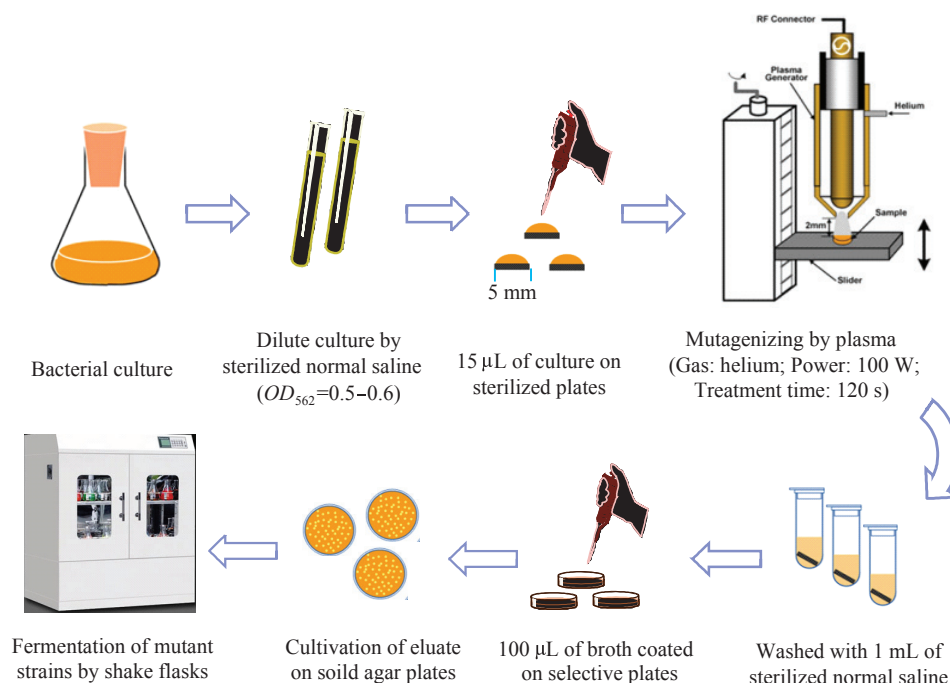


图 1 谷氨酸棒状杆菌常压室温等离子体生物诱变过程

Figure 1 Protocols of the ARTP platform for the mutation of *C. glutamicum*

(2) 坂口改良法<sup>[13-14]</sup>: 半定量测定 L-精氨酸的含量。

(3) 氨基酸自动分析仪<sup>[15]</sup>: 发酵液经离心、过滤和稀释后由高效液相色谱 Agilent 1100 分析测定氨基酸含量。分析条件: 色谱柱: Hypersil ODS-C<sub>18</sub>, 45 mm×125 mm; 温度: 40 °C; 进样体积: 1 μL; 流速: 1.0 mL/min; 检测器: 荧光检测器 Ex 340 nm, Em 450 nm; 洗脱液 A: 20 mmol/L 乙酸钠, 洗脱液 B: 20 mmol/L 乙酸钠:甲醇:乙腈=1:2:2 (体积比)。

2 结果与分析

2.1 ARTP 诱变致死曲线的测定

已有报道称等离子体具有较高的 DNA 损伤和更有效的正突变效率, 目前常压室温等离子体诱变已经广泛应用于细菌<sup>[16]</sup>、真菌<sup>[17]</sup>和微藻<sup>[18]</sup>等各种微生物的育种。

按照方法 1.3 对 *C. glutamicum* GUI089 (SG<sup>r</sup>, L-His<sup>-</sup>) 进行 ARTP 诱变, 以时间为变量, 测定 L-精氨酸产生菌的致死率曲线。根据之前的报道<sup>[19-20]</sup>, 当菌体的致死率大约为 90% 时菌体的正突变率最高。如图 2 所示, 当照射时间为 120 s 时, *C. glutamicum* 的致死率达到 92.80%。当照射时间超过 140 s 时, 几乎没有菌体存活下来。因此确定 *C. glutamicum* 最佳的诱变时间为 120 s。

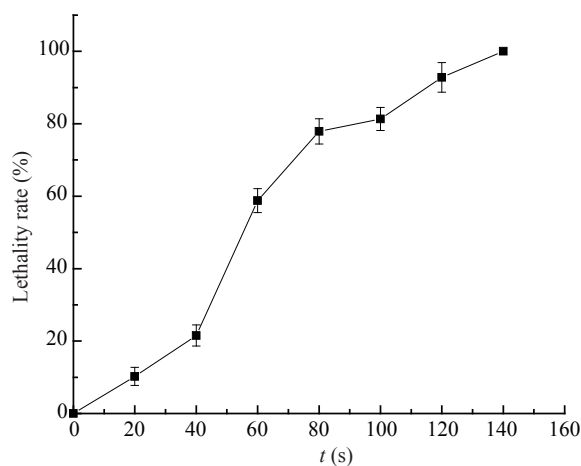


图 2 谷氨酸棒状杆菌的 ARTP 致死率曲线  
Figure 2 Lethality rate of *C. glutamicum* by ARTP

2.2 突变菌株 *C. glutamicum* ARG 3-16 发酵试验及遗传稳定性试验

经过一系列诱变及筛选, 最终得到一株 L-精氨酸高产菌 *C. glutamicum* ARG 3-16, ARG 3-16 定向选育谱系如图 3 所示。8-氮鸟嘌呤是鸟嘌呤的碱基类似物, 在选择性培养基中加入 8-氮鸟嘌呤可以提高菌体的突变率; L-高精氨酸是 L-精氨酸的结构类似物, 选育 L-高精氨酸抗性菌株可以提高菌体对终产物的耐受性, 解除终产物对关键酶基因的反馈抑制作用, 进而提高 L-精氨酸的产量。如表 1 所示, *C. glutamicum* ARG 3-16 的 L-精氨酸的产量达到 35.95±0.48 g/L, 比出发菌株提高了 49.79%, L-精氨酸对葡萄糖的得率达到 0.24 g/g。另外, 发酵液中的杂酸含量明显减少, 特别是 L-谷氨酸、L-脯氨酸和 L-缬氨酸。此外, *C. glutamicum* ARG 3-16 的菌体生长率和葡萄糖利用率比出发菌株均有所提高(表 1)。

文献[21-22]指出诱变选育的突变体在连续传代过程中可能会出现遗传不稳定的现象。为了考察 *C. glutamicum* ARG 3-16 的遗传稳定性, 对菌株进行 7 代传代发酵试验, 结果如图 4 所示。结果表明 *C. glutamicum* ARG 3-16 具有较高的遗传稳定性。

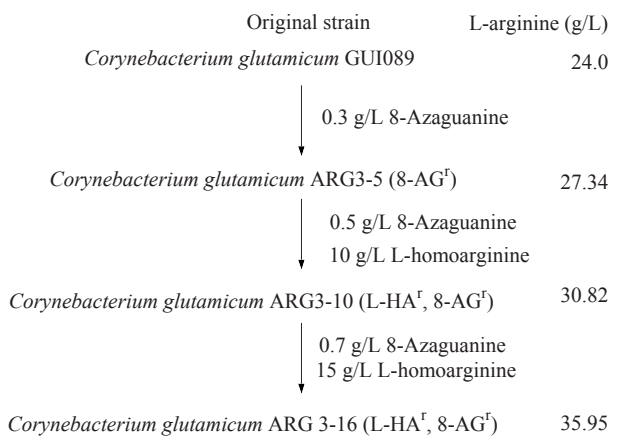


图 3 *C. glutamicum* ARG 3-16 定向选育谱系  
Figure 3 The directional breeding pedigree of *C. glutamicum* ARG 3-16

表 1 *Corynebacterium glutamicum* 的遗传标记和发酵参数  
Table 1 Genetic marker and fermentation parameter of *Corynebacterium glutamicum* strains

菌株 Strains	遗传标记 Genetic marker	氨基酸 Amino acids						Dry cell weight (g/L)	Residual sugar (g/L)
		Arg	Glu	Pro	Lys	Ala	Val		
Original strain	SG <sup>r</sup> , L-His <sup>-</sup>	24.00	0.96	1.88	1.79	4.08	4.13	10.53	18
ARG 3-16	L-HA <sup>r</sup> , 8-AG <sup>r</sup> , SG <sup>r</sup> , L-His <sup>-</sup>	35.95	0.25	0.75	1.24	2.21	2.18	12.32	0

Note: L-HA: L-homoarginine; L-AG: 8-Azaganine; SG: Sulfaguanidine; <sup>r</sup>: Resistance strain; <sup>-</sup>: Auxotrophic strain.

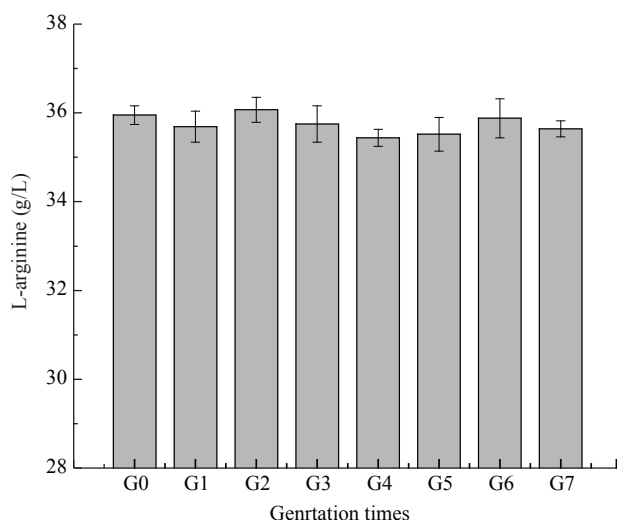


图 4 突变株 ARG 3-16 的遗传稳定性

Figure 4 L-arginine producing stability of the mutant ARG 3-16 during generations

## 2.3 响应面法优化 L-精氨酸发酵培养基

**2.3.1 Plackett-Burman 设计及关键影响因素的确定:** 响应面法优化发酵工艺是目前优化反应条件和加工工艺参数最常用的方法,而且在很多试验中取得了显著地效果。在单因素实验的基础上,选用  $N=12$  的 Plackett-Burman 设计对 L-精氨酸发酵培养基中的 7 个因素对 L-精氨酸生产的显著性进行考察,实验设计及结果分别见表 2 和表 3。

用 Design Expert 软件对试验数据进行处理,并进行方差分析,分析结果见表 4。由表 4 可知主效应  $P$  值为 0.019 7,表明 Plackett-Burman 试验设计因素在所选取的水平范围内对 L-精氨酸产量的影响显著,同时决定系数  $R^2$  为 0.947 7,说明回归有效,试验设计可靠。另外,试验结果表明硫酸铵、

表 2 试验因素水平的选择  
Table 2 The choice of experimental factor level

编码 Code	因素 Factor	水平 Levels	
		-1	1
$X_1$	葡萄糖	120	180
$X_2$	硫酸铵	40	80
$X_3$	玉米浆	10	30
$X_4$	尿素	1	3
$X_5$	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0	1.5
$X_6$	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.2	0.8
$X_7$	生物素	$4.0 \times 10^{-5}$	$1.2 \times 10^{-4}$

葡萄糖和尿素 3 个因素为主要影响因素(表 4),所以在下一步的响应面分析中,重点考察这 3 个因素的最优水平范围。其他条件采用单因素试验的最佳条件:玉米浆 20 g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.75 g/L,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5 g/L, 生物素  $8.0 \times 10^{-5}$  g/L。

**2.3.2 最陡爬坡试验:** 最陡爬坡试验是为了确定显著影响因素的取值逼近中心点以及提高 L-精氨酸的产量,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、葡萄糖和尿素这 3 个因素的变化方向和步长的试验设计及结果见表 5。由表 5 可以看出,3 个显著影响因素的中心点在第 4 组试验附近,因此确定以第 4 组的水平作为响应面试验的中心点,即葡萄糖 145 g/L,硫酸铵 55 g/L,尿素 2 g/L。

**2.3.3 响应面分析试验:** 利用软件 Design Expert,基于 Box-Behnken 的中心组合设计的原理,对  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、葡萄糖和尿素这 3 个显著影响因素作出 3 因素 3 水平的响应面试验。试验设计及结果见

表 3 N=12 的 Plackett-Burman 试验设计及响应值  
Table 3 Design matrix and response results of Plackett-Burman design as N=12

运行序 Run	$X_1$	$X_2$	$X_3$	$X_4$	$X_5$	$X_6$	$X_7$	L-精氨酸 L-arginine (g/L)
1	1	-1	1	1	1	-1	-1	31.15
2	1	1	-1	1	1	1	-1	34.85
3	1	1	-1	-1	-1	1	-1	30.45
4	-1	-1	-1	1	-1	1	1	24.35
5	-1	1	-1	1	1	-1	1	30.93
6	1	-1	-1	-1	1	-1	1	27.22
7	1	-1	1	1	-1	1	1	30.06
8	-1	-1	1	-1	1	1	-1	23.86
9	-1	1	1	1	-1	-1	-1	32.26
10	1	1	1	-1	-1	-1	1	36.05
11	-1	1	1	-1	1	1	1	29.88
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	14.76

表 4 回归模型的方差分析  
Table 4 ANOVA for selected factorial model and analysis of experimental variables

因素 Factor	平方和 Sum of squares	自由度 Degrees of freedom	均方差 Mean square	F 值 F value	P 值 P value	显著 Significant
模型 Model	341.63	7	48.800	10.350	0.019 7	
葡萄糖 Glucose	94.87	1	94.870	20.120	0.010 9	2
硫酸铵 Ammonium sulfate	154.23	1	154.230	32.710	0.004 6	1
玉米浆 Corn steep liquor	35.71	1	35.710	7.570	0.051 3	
尿素 Urea	38.09	1	38.090	8.080	0.046 7	3
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	8.27	1	8.270	1.750	0.256 0	
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.097	1	0.097	0.021	0.892 8	
生物素 Biotin	10.38	1	10.380	2.200	0.212 0	
残差 Residual	18.86	4	4.710			
总值 Cor total	360.49	11				
$R^2=0.947\ 7$ , Adj $R^2$ (调整)=0.856 1, 信噪比=7.53%						



表 5 最陡爬坡试验设计和结果  
Table 5 Design and results of the steepest ascent experiments

运行序 Run	葡萄糖 Glucose (g/L)	硫酸铵 Ammonium sulfate (g/L)	尿素 Urea (g/L)	L-精氨酸 L-arginine (g/L)
1	130	40	0.5	28.96
2	135	45	1.0	36.54
3	140	50	1.5	38.12
4	145	55	2.0	39.47
5	150	60	2.5	38.44
6	155	65	3.0	36.88
7	160	70	3.5	30.08
8	165	75	4.0	21.28

表 6 和表 7, 试验设计了 17 组试验, 包括 5 组中心点重复试验。

利用 Design Expert 软件对表 7 试验数据进行多元回归拟合, 得到 L-精氨酸产量对葡萄糖、硫酸铵和尿素 3 个因素的二次多项回归方程:

$$Y=39.58+0.75A+2.01B+0.94C+0.21AB+0.22AC+0.40BC-2.11A^2-2.91B^2-3.25C^2。$$

回归方程的方差分析及模型的显著性分析结果见表 8。从表 8 的数据可以看出, 试验所选用的二次多项模型显著( $P<0.0001$ ), 说明试验方法是可靠的; 同时模型失拟项不显著( $P=0.0610>0.05$ ), 说明未知因素对试验的结果干扰较小; 其决定系数  $R^2=0.9980$ , 调整决定系数  $R^2=0.9725$ , 说明二次多项模型的拟合程度较好, 误差较小, 可信度高, 该模型可以对 L-精氨酸的发酵培养基进行优化。

表 6 Box-Behnke 试验因素水平  
Table 6 Levels of Box-Behnke experiments

因素 Factor	编码 Code	水平 Levels		
		-1	0	1
葡萄糖 Glucose	A	135	145	155
硫酸铵 Ammonium sulfate	B	45	55	65
尿素 Urea	C	1	2	3

表 7 Box-Behnke 试验设计及结果  
Table 7 Box-Behnke design and results

运行序 Run	A	B	C	L-精氨酸 L-arginine (g/L)	预测值 Predicted (g/L)
1	-1	-1	0	32.05	32.01
2	0	1	-1	31.76	31.95
3	1	0	-1	33.65	33.81
4	1	-1	0	33.68	33.09
5	0	-1	-1	30.44	30.88
6	-1	0	-1	33.16	32.76
7	0	1	1	37.21	36.77
8	1	0	1	35.73	36.13
9	-1	1	0	35.02	35.61
10	0	-1	1	31.76	31.95
11	-1	0	1	34.35	34.19
12	1	1	0	37.48	37.52
13	0	0	0	39.48	39.58
14	0	0	0	39.92	39.58
15	0	0	0	39.78	39.58
16	0	0	0	39.16	39.58
17	0	0	0	39.56	39.58

表 8 回归方程的方差分析及系数显著性检验  
Table 8 ANOVA analysis and coefficients significant test for regression equation

来源 Source	平方和 Sum of squares	自由度 Degrees of freedom	均方差 Mean square	F 值 F value	P 值 P value
模型 Model	154.66	9	17.18	63.96	<0.0001
A	4.44	1	4.44	16.53	0.004 8
B	32.24	1	32.24	119.99	<0.000 1
C	7.07	1	7.07	26.31	0.001 4
AB	0.17	1	0.17	0.64	0.449 7
AC	0.20	1	0.20	0.74	0.419 0
BC	0.65	1	0.65	2.41	0.164 4
A <sup>2</sup>	18.75	1	18.75	69.79	<0.000 1
B <sup>2</sup>	35.66	1	35.66	132.73	<0.000 1
C <sup>2</sup>	44.34	1	44.34	165.04	<0.000 1
残差 Residual	1.88	7	0.27		
失拟项 Lack of fit	1.53	3	0.51	5.81	0.061 0
纯误差 Pure error	0.35	4	0.088		
总值 Cor total	156.54	16			

$R^2=0.988\ 0$ , Adj  $R^2$  (调整)=0.972 5, 信噪比=1.45%

回归方程的一次项 *B* 对 L-精氨酸的产量有极显著影响。另外, 二次项  $A^2$ 、 $B^2$  和  $C^2$  对 L-精氨酸的产量也有极显著影响。这说明试验因子对响应值的变化相对复杂, 不是简单的线性关系。*A*、*B* 和 *C* 这 3 个因素对 L-精氨酸产量的影响顺序依次是  $B>C>A$ , 这是因为合成 L-精氨酸需要更多的 N 原子。这些因素之间的响应面图以及对应的等高线图如图 5 所示。对二次回归方程进行求解, 优化后的发酵培养基为: 葡萄糖 155 g/L, 硫酸铵 58.94 g/L, 尿素 2.20 g/L, L-精氨酸 38.77 g/L。

**2.3.4 验证试验:** 经 Design Exper 软件分析得到最佳发酵培养基为: 葡萄糖 155 g/L, 硫酸铵 58.94 g/L, 尿素 2.20 g/L。为了验证模型的准确性, 按照最佳发酵培养基配方进行试验, 试验结果显示 L-精氨酸的产量为  $39.72\pm0.75$  g/L, 与理论预测值接近。此外发酵液中残糖含量为 0, L-精氨酸对葡萄糖的得率达到 0.26 g/g。而且 L-精氨酸的产量比优化前提高

了 10.49%, 从而证明响应面设计优化 L-精氨酸发酵培养基的有效性。

3 讨论

本试验研究证明常压室温等离子体生物诱变系统能够有效地诱变 *C. glutamicum*, 获得一株 L-精氨酸高产菌株 *C. glutamicum* ARG 3-16 (L-HA<sup>r</sup>, 8-AZ<sup>r</sup>, SG<sup>r</sup>, L-His<sup>-</sup>), L-精氨酸的产量达到  $35.95\pm0.48$  g/L, 比诱变前提高了 49.79%。此外, 经过有效筛选的突变菌株杂酸的积累量明显地降低, 特别是 L-脯氨酸、L-谷氨酸和 L-缬氨酸。遗传稳定性试验表明, 经诱变后获得的 L-精氨酸高产菌株 *C. glutamicum* ARG 3-16 保持较高的遗传稳定性。通过响应面设计优化 L-精氨酸发酵培养基, 得到最佳发酵培养基配方为: 葡萄糖 155 g/L, 硫酸铵 58.94 g/L, 尿素 2.20 g/L。经试验验证后, L-精氨酸的产量为  $39.72\pm0.75$  g/L, 比优化前提高了 10.49%。



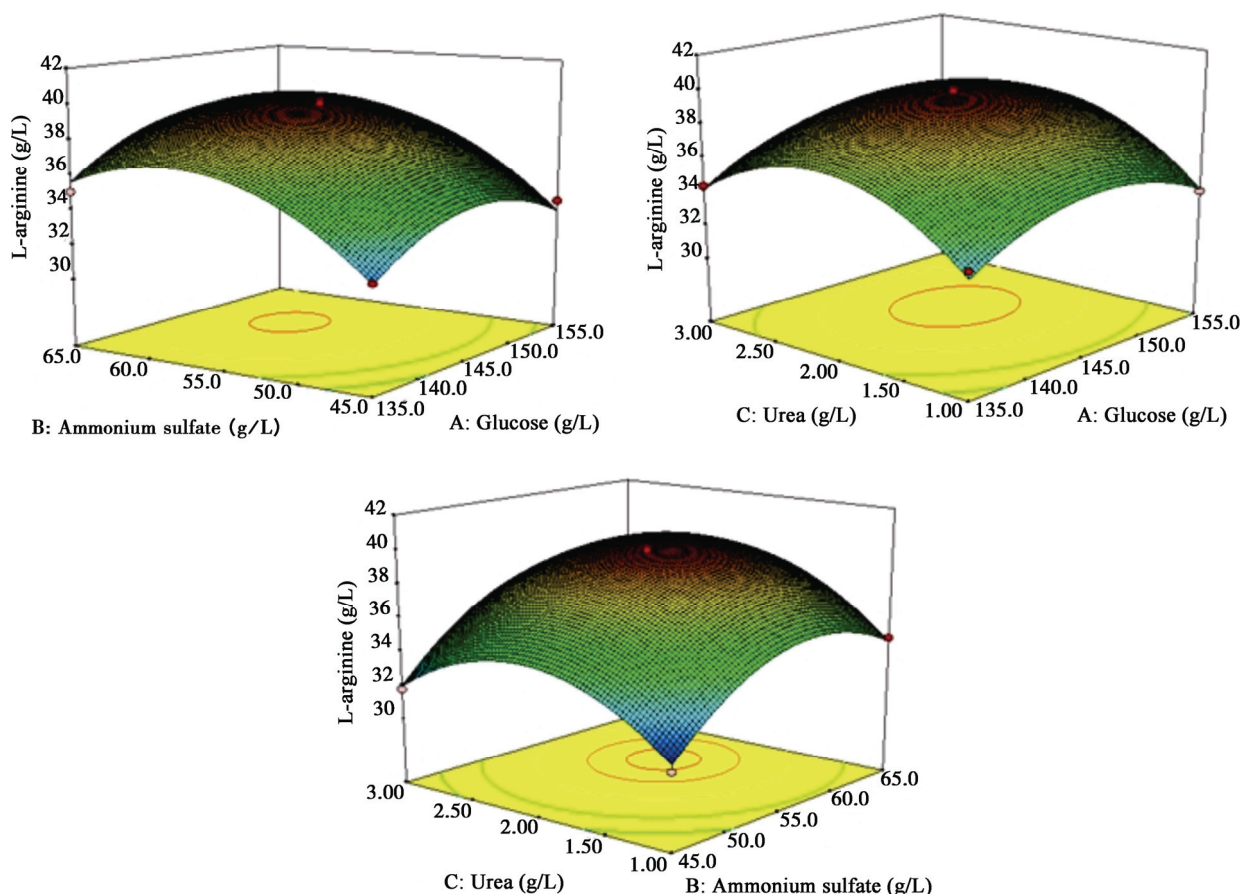


图5 葡萄糖、硫酸铵和尿素交互影响 L-精氨酸产量的响应面图

Figure 5 Response surface plots for the interactive effects of glucose, ammonium sulfate and urea on the L-arginine production

Note: A: Glucose; B: Ammonium sulfate; C: Urea.

目前工厂 L-精氨酸的产量在 60 g/L 左右,且菌株均是国外引进的,没有自主知识产权,因此选育一株拥有自主知识产权高产 L-精氨酸生产菌株具有重要的实用价值。虽然韩国学者 Park 等<sup>[23]</sup>利用代谢工程的手段改造经理化随机诱变的 *C. glutamicum* ATCC 21831 (产量为 17.0 g/L),通过过量表达 L-精氨酸生物合成途径中的基因和精氨酸输出基因、敲除调节 L-精氨酸合成的阻遏蛋白基因 *argR*,最终在 1 500 L 发酵罐分批发酵试验 L-精氨酸的产量达到 92.5 g/L, L-精氨酸对葡萄糖的得率为 0.35 g/g。国内学者徐美娟等<sup>[15,24-25]</sup>同样利用代谢工程的手段改造 *Corynebacterium crenatum* SYPA

5-5,最终 5 L 发酵罐分批发酵试验 L-精氨酸的产量达到 45.9 g/L, L-精氨酸对葡萄糖的得率达到 0.31 g/g。但是利用分子手段改造的菌株具有自身的局限性,如携带的质粒容易丢失而导致遗传不稳定,而且使用抗生素选择压力,需添加抗生素来维持菌体产酸的稳定性,容易造成抗生素污染和成本增加等。

本试验利用 ARTP 生物诱变系统选育得到的 *C. glutamicum* ARG 3-16,利用廉价的原料(葡萄糖为食品级、硫酸铵和磷酸二氢钾为工业级),摇瓶发酵 96 h 后 L-精氨酸的产量达到  $39.72 \pm 0.75$  g/L, L-精氨酸对葡萄糖的得率为 0.26 g/g,且菌株的稳定性较高,具有工业化生产的潜力。

需要指出的是, 突变株 *C. glutamicum* ARG 3-16 L-精氨酸提高的原因尚不清楚, 因此有必要对关键酶基因 *argB* 和阻遏蛋白基因 *argR* 进行进一步分析。由于本试验全部是在摇瓶条件下得到的结果, 在发酵过程中的溶氧、pH、补糖等条件很难实现, 为了进一步了解 L-精氨酸的生产过程及发酵特性, 进一步控制发酵工艺, 提高 L-精氨酸的产量, 后期试验将在分批发酵过程中进行发酵工艺控制。

## 参考文献

- [1] Wu GY, Bazer FW, Davis TA, et al. Arginine metabolism and nutrition in growth, health and disease[J]. Amino Acids, 2009, 37(1): 153-168
- [2] Álvares TS, Meirelles CM, Bhambhani YN, et al. L-arginine as a potential ergogenic aid in healthy subjects[J]. Sports Medicine, 2011, 41(3): 233-248
- [3] Fouad AM, El-Senousey HK, Yang XJ, et al. Role of dietary L-arginine in poultry production[J]. International Journal of Poultry Science, 2012, 11(11): 718-729
- [4] Böger RH. The pharmacodynamics of L-arginine[J]. Alternative Therapies in Health and Medicine, 2014, 20(3): 48-54
- [5] Kinoshita S, Nakayama K, Akita S. Taxonomical study of glutamic acid accumulating bacteria, *Micrococcus glutamicus* nov. sp.[J]. Bulletin of the Agricultural Chemical Society of Japan, 1958, 22(3): 176-185
- [6] Zhang X, Zhang XF, Wang LY, et al. Recent progress on atmospheric and room temperature plasma mutation breeding technology and its applications[J]. CIESC Journal, 2014, 65(7): 2676-2684 (in Chinese)  
张雪, 张晓菲, 王立言, 等. 常压室温等离子体生物诱变育种及其应用研究进展[J]. 化工学报, 2014, 65(7): 2676-2684
- [7] Zhang X, Zhang XF, Li HP, et al. Atmospheric and room temperature plasma (ARTP) as a new powerful mutagenesis tool[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2014, 98(12): 5387-5396
- [8] Laroussi M, Leipold F. Evaluation of the roles of reactive species, heat, and UV radiation in the inactivation of bacterial cells by air plasmas at atmospheric pressure[J]. International Journal of Mass Spectrometry, 2004, 233(1/3): 81-86
- [9] Li G, Li HP, Wang LY, et al. Genetic effects of radio-frequency, atmospheric-pressure glow discharges with helium[J]. Applied Physics Letters, 2008, 92(22): 221504
- [10] Zhang GC, Lei H, He X, et al. Modern mathematical statistical methods in optimization of fermentation medium[J]. Food and Fermentation Industries, 2010, 36(5): 111-113 (in Chinese)  
张广臣, 雷虹, 何欣, 等. 微生物发酵培养基优化中的现代数学统计学方法[J]. 食品与发酵工业, 2010, 36(5): 111-113
- [11] Lu Y, Wang LY, Ma K, et al. Characteristics of hydrogen production of an *Enterobacter aerogenes* mutant generated by a new atmospheric and room temperature plasma (ARTP)[J]. Biochemical Engineering Journal, 2011, 55(1): 17-22
- [12] Hamilton PB. Amino acid handbook. Methods and results of protein analysis[J]. Journal of the American Chemical Society, 1957, 79(23): 6345-6346
- [13] He XX, Sun Y, Chen H. Study on determination method of L-arginine in fermentation broth[J]. Food and Drug, 2007, 9(1): 21-24 (in Chinese)  
贺小贤, 孙莹, 陈合. 发酵液中 L-精氨酸的检测方法[J]. 食品与药品, 2007, 9(1): 21-24
- [14] Hao G, Qian H. Study on the method of L-arginine quantification in fermentation broth[J]. Science and Technology of Food Industry, 2005, 26(2): 184-186 (in Chinese)  
郝刚, 钱和. 发酵液中 L-精氨酸定量检测方法的研究[J]. 食品工业科技, 2005, 26(2): 184-186
- [15] Xu MJ, Rao ZM, Dou WF, et al. Site-directed mutagenesis and feedback-resistant N-acetyl-L-glutamate kinase (NAGK) increase *Corynebacterium crenatum* L-arginine production[J]. Amino Acids, 2012, 43(1): 255-266
- [16] Wang LY, Huang ZL, Li G, et al. Novel mutation breeding method for *Streptomyces avermitilis* using an atmospheric pressure glow discharge plasma[J]. Journal of Applied Microbiology, 2010, 108(3): 851-858
- [17] Qi F, Kitahara YK, Wang ZT, et al. Novel mutant strains of *Rhodospiridium toruloides* by plasma mutagenesis approach and their tolerance for inhibitors in lignocellulosic hydrolyzate[J]. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 2013, 89(5): 735-742
- [18] Fang MY, Jin LH, Zhang C, et al. Rapid mutation of *Spirulina platensis* by a new mutagenesis system of atmospheric and room temperature plasmas (ARTP) and generation of a mutant library with diverse phenotypes[J]. PLoS One, 2013, 8(10): e77046
- [19] Jiang M, Wan Q, Liu RM, et al. Succinic acid production from corn stalk hydrolysate in an *E. coli* mutant generated by atmospheric and room-temperature plasmas and metabolic evolution strategies[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2014, 41(1): 115-123
- [20] Hua XF, Wang J, Wu ZJ, et al. A salt tolerant *Enterobacter cloacae* mutant for bioaugmentation of petroleum- and salt-contaminated soil[J]. Biochemical Engineering Journal, 2010, 49(2): 201-206
- [21] Yang LP, Li XG, Wei AY, et al. A mutant strain with high L-tryptophan productivity obtained by atmospheric and room temperature plasma[J]. Bulletin of Fermentation Science and Technology, 2015, 44(1): 28-32 (in Chinese)  
杨立鹏, 李小刚, 魏爱英, 等. 基于常压室温等离子体诱变技术选育高产色氨酸突变株的研究[J]. 发酵科技通讯, 2015, 44(1): 28-32
- [22] Li HG, Luo W, Wang Q, et al. Direct fermentation of gelatinized cassava starch to acetone, butanol, and ethanol using *Clostridium acetobutylicum* mutant obtained by atmospheric and room temperature plasma[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2014, 172(7): 3330-3341
- [23] Park SH, Kim HU, Kim TY, et al. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for L-arginine production[J]. Nature Communications, 2014, 5: 4618
- [24] Xu MJ. Metabolic engineering of *Corynebacterium crenatum* SYPA 5-5 for L-arginine production[D]. Wuxi: Doctoral Dissertation of Jiangnan University, 2012 (in Chinese)  
徐美娟. 钝齿棒杆菌 SYPA 5-5 发酵产 L-精氨酸的代谢工程改造[D]. 无锡: 江南大学博士学位论文, 2012
- [25] Xu MJ, Rao ZM, Yang J, et al. Heterologous and homologous expression of the arginine biosynthetic argC~H cluster from *Corynebacterium crenatum* for improvement of L-arginine production[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2012, 39(3): 495-502