

文章编号:2095-7386(2019)06-0008-04

DOI:10.3969/j.issn.2095-7386.2019.06.002

谷氨酸棒杆菌突变株 L-精氨酸发酵培养基优化研究

江贤君¹, 余汉超²

(1. 武汉轻工大学 生物与制药工程学院, 湖北 武汉 430023; 2. 湖北工业大学 生物工程与食品学院, 湖北 武汉 430068)

摘 要:笔者以谷氨酸棒杆菌突变株 HGS1715(D-Arg^r)为研究对象,在5 L全自动发酵罐中进行发酵培养基优化研究,研究结果显示:该菌产L-精氨酸合适发酵培养基组成为:淀粉水解糖13.5%、玉米浆1.5%、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5.0%、 KH_2PO_4 0.4 g/L、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.4 g/L, L-精氨酸最高产率为48.46 g/L。

关键词:L-精氨酸;谷氨酸棒杆菌突变株;发酵培养基;优化

中图分类号:Q 939.97

文献标识码:A

Optimization of culture medium for L-arginine fermentation of mutant *corynebacterium glutamate*

JIANG Xian-jun¹, YU Han-chao²

(1. School of Biology and Pharmaceutical Engineering, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430023, China;

2. School of Food and Biological Engineering, Hubei University of Technology, Wuhan 430068, China)

Abstract: In this paper, the culture medium of the mutant strain HGS1715 (D-Arg^r) were studied in a 5 L full-automatic fermentation tank. The results showed that the bacteria produce L-arginine suitable fermentation medium composition as follows: starch hydrolysis sugar 13.5%, corn starch 1.5%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5.0%, KH_2PO_4 0.4 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.4 g/L, L-arginine's most productive rate is 48.46 g/L.

Key words: L-arginine; *corynebacterium glutamate*; culture medium; optimization

1 引言

L-精氨酸是一种含有胍基的人体半必需碱性氨基酸,广泛应用于食品及医药工业中^[1]。它是复方氨基酸输液的主要成分之一,常用于氨中毒昏迷的解毒剂和肝功能的促进剂,对病毒性肝炎疗效显著,同时对肠道溃疡、血栓形成、神经衰弱和男性无精等症状,都有一定的治疗效果。它能够调节一系列免疫过程,对多种疾病均有较好的疗效^[2~5],因此L-精氨酸市场需求很大。最初精氨酸生产从动植物中提取,成本高且产量有限,满足不了市场需求,日本通

过微生物育种技术采用突变株发酵法生产L-精氨酸,突变株产酸达到40 g/L以上^[6]。近来国内外许多研究人员致力于生产菌的选育,无论如何优化发酵工艺始终是提高精氨酸产量的有效措施。在优化发酵工艺上,一方面是优化培养基配方,另一方面是优化发酵工艺参数。笔者以诱变获得的突变株HGS1715(D-Arg^r)为研究对象,用5 L全自动发酵罐进行培养基优化研究。在优化培养基条件下发酵,谷氨酸棒杆菌突变株HGS1715(D-Arg^r) L-精氨酸产率达到48.46 g/L,为进一步研究提供较好技术支持。

收稿日期:2019-10-20.

作者简介:江贤君(1964-),男,副教授, E-mail:1098377885@qq.com.

2 材料与方法

2.1 材料

2.1.1 菌种

谷氨酸棒杆菌突变株 HGS1715 (D-Arg^r), 湖北工业大学微生物室诱变育种获得。

2.1.2 培养基

斜面菌种培养基:牛肉膏 1.0%、蛋白胨 1.0%、NaCl 0.5%、琼脂 2.0%、葡萄糖 1.0%, pH 7.0。种子培养基:葡萄糖 2.5%、玉米浆 4.0%、(NH₄)₂SO₄ 0.5%、KH₂PO₄ 0.1%、MgSO₄ · 7H₂O 0.05%, pH 7.0。L-Arg 基础发酵培养基:葡萄糖 10%、玉米浆 1.0%、(NH₄)₂SO₄ 5.5%、KH₂PO₄ 0.1%、MgSO₄ · 7H₂O 0.05%, pH 7.0。灭菌条件均为:121 ℃, 20 min。

2.2 主要仪器设备

5 L 全自动发酵罐(德国贝朗公司), 721 分光光度计(上海第三分析仪器厂)

2.3 方法

2.3.1 培养方法

种子培养:斜面培养 24 h 后接种 300 ml 三角瓶,

装液量 30 ml, 在往复式摇床上 30 ℃ 培养, 种令 24 h。

扩大种子:用 1 L 三角瓶装液 300 ml 灭菌后在火焰下接种上述种子 30 ml, 按上述种子培养条件培养。

5 L 全自动发酵罐发酵:发酵罐装入基础发酵培养基 3 L 后灭菌, 接种上述扩大种子 300 ml 进行发酵培养基优化研究。通过单因素试验和正交试验, 以 L-精氨酸产率为考量指标优化发酵培养基。

2.3.2 分析方法

L-精氨酸含量测定^[7]:坂口改良法。还原糖的测定^[8]:3,5-二硝基水杨酸法。数据处理及绘图软件^[9]:R 语言。

3 结果与讨论

3.1 合适碳源选择

碳源设计是培养基设计的核心。以玉米淀粉为原料, 用双酶法水解得到淀粉水解糖 (DE > 98%)^[10], 用淀粉水解糖、蔗糖及葡萄糖按基础发酵培养基糖浓度进行了 5 批单因素对比试验, 得发酵终了时精氨酸产率水平如表 1。

表 1 不同碳源精氨酸发酵产率

	精氨酸产率(g/L)					平均产率(g/L)
	1	2	3	4	5	
淀粉水解糖	48.8	48.2	48.9	48.5	48.4	48.56
葡萄糖	48.4	48.8	48.0	48.3	48.5	48.60
蔗糖	48.1	48.4	48.0	48.8	48.9	48.44

由表 1 得知三种碳源精氨酸发酵产率基本相同, 因为这三种碳源都是细菌较易利用的碳源。但是, 淀粉水解糖较葡萄糖和蔗糖廉价得多, 考虑成本问题选择淀粉水解糖为优选碳源。

3.2 合适氮源选择

(NH₄)₂SO₄ 和 Urea 是原核生物容易利用且经

济价廉的两种氮源, 按基础发酵培养基氮素相同质量进行了 5 批单因素对比试验, 得发酵终了时精氨酸产率水平如表 1。

表 2 不同氮源精氨酸发酵产率

	精氨酸产率(g/L)					平均产率(g/L)
	1	2	3	4	5	
(NH ₄) ₂ SO ₄	47.8	47.2	47.9	47.5	46.8	47.44
Urea	43.4	43.8	43.0	42.3	43.5	43.20

由表 2 可知在两种经济的氮源培养基上, (NH₄)₂SO₄ 可以得到更高的精氨酸产率, 因此试验选择以硫酸铵为优选氮源。

3.3 碳氮比对精氨酸产率的影响

精氨酸分子骨架来源于碳源和氮源, 碳源和氮源单因素研究会有失偏颇, 因此碳氮比 (C/N) 是培

培养基设计的一个关键,试验研究了 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 浓度分别为4.0%、4.5%、5.0%、5.5%、6.0%下不同碳氮比对精氨酸产率的影响,结果如图1。

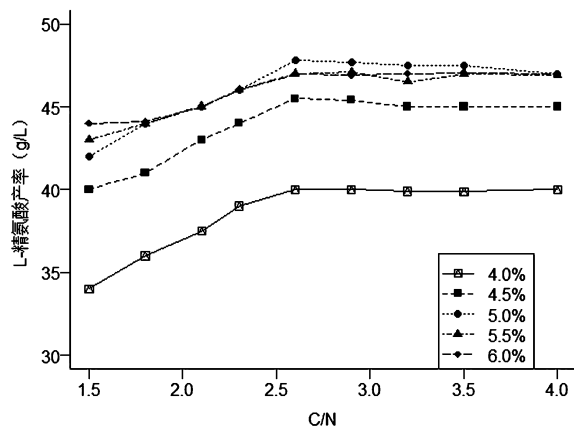


图1 C/N对精氨酸产率的影响

从图1可以看出不管 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的浓度在何种水平,C/N在2.7精氨酸产率达到最大值;另外随着 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 浓度的增加,精氨酸产率也随着增加,但是呈递减规律, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 浓度超过5.0%时精氨酸产率反而下降。所以,合适的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 浓度为5.0%,C/N为2.7。

3.4 玉米浆对精氨酸产率影响

玉米浆营养丰富,含有维生素、生物素等生长因子,这些成分对菌体的生长和精氨酸的合成非常重要。试验考察了玉米浆对精氨酸产率的影响,试验结果如图2。

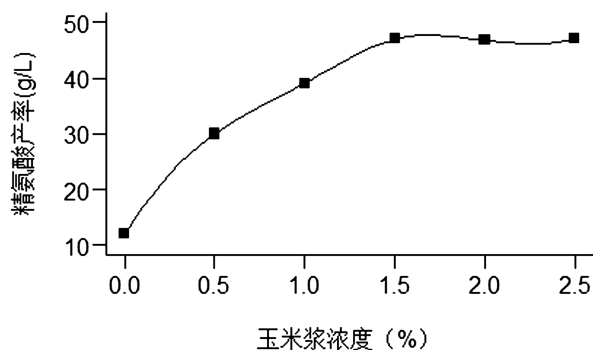


图2 玉米浆浓度对精氨酸产率的影响

从图2可以看出,精氨酸产率随着玉米浆浓度的增加而增加。当玉米浆的浓度达到1.5%之后,精氨酸的产率不再随玉米浆浓度的增加而增加,因此合适的玉米浆浓度为1.5%。

3.5 磷酸二氢钾对精氨酸产率的影响

微生物生长过程中对磷素的需求较高,试验以磷酸二氢钾为磷素来源考察了磷酸二氢钾对精氨酸产率的影响,结果如图3。

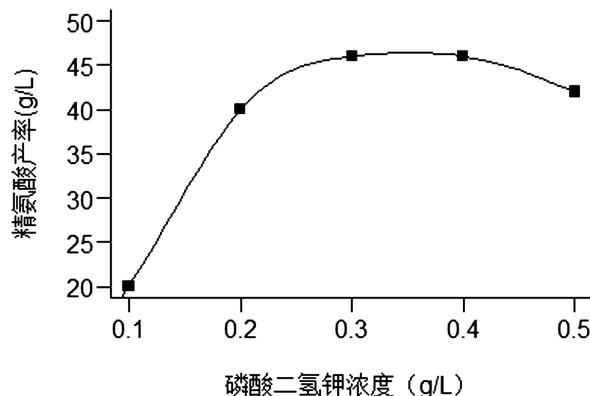


图3 磷酸二氢钾对精氨酸合成的影响

从图3可以看出,精氨酸产率随磷酸二氢钾浓度的增加而增加,当磷酸二氢钾浓度达到0.3 g/L时精氨酸产率最高,选择磷酸二氢钾浓度为0.3 g/L作进一步研究。

3.6 硫酸镁对精氨酸产率的影响

镁离子是许多酶催化的激活剂,是微生物生长中需求较大的金属元素,试验考察了硫酸镁对精氨酸产率的影响,结果如图4:

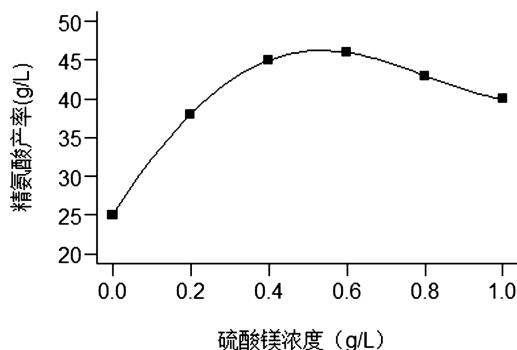


图4 硫酸镁对精氨酸产率的影响

从图4可以看出,精氨酸产率随硫酸镁浓度的增加而增加,当硫酸镁浓度达到0.5 g/L时精氨酸产率最高,选择硫酸镁浓度为0.5 g/L作进一步研究。

3.7 正交试验

前述试验基本为单因素试验,作为配方产品需要考量各因素间的交互作用,现以C/N比、玉米浆、磷酸二氢钾及硫酸镁四因素作三水平的正交试验,其正交因素水平表见表3。

表3 正交因素水平表

	A	B	C	D
水平	(C/N)	玉米浆 (%)	磷酸二氢钾 (g/L)	硫酸镁 (g/L)
1	2.4	1.2	0.2	0.4
2	2.7	1.5	0.3	0.5
3	3.0	1.8	0.4	0.6

正交试验结果见表 4:

表 4 正交试验直观分析计算表

试验号	A	B	C	D	Y
	(C/N)	玉米浆(%)	磷酸二氢钾(g/L)	硫酸镁(g/L)	精氨酸产率(g/L)
1	1	1	1	1	47.51
2	1	2	2	2	48.02
3	1	3	3	3	48.22
4	2	1	2	3	47.60
5	2	2	3	1	48.46
6	2	3	1	2	48.35
7	3	1	3	2	47.32
8	3	2	1	3	47.95
9	3	3	2	1	48.10
K1	143.75	142.43	143.81	144.07	
K2	144.42	144.43	143.72	143.69	
K3	143.37	144.67	144.00	143.77	
k ₁	47.91	47.48	47.94	48.02	
k ₂	48.14	48.14	47.91	47.90	
k ₃	47.79	48.22	48.00	47.92	
极差	1.05	2.24	0.28	0.38	
主次因素	B A D C				
优方案	A ₂ B ₃ C ₃ D ₁				

由表 4 得出,优方案为 A₂ B₃ C₃ D₁,即:C/N 2.7、玉米浆 1.8%、KH₂PO₄ 0.4 g/L 及 MgSO₄ · 7H₂O 0.4 g/L 为最佳培养基配比。对精氨酸产率影响因素大小为:玉米浆>C/N>硫酸镁>磷酸二氢钾。

以优方案作验证试验,发酵培养基组成为:淀粉水解糖 13.5%,玉米浆 1.8%、(NH₄)₂SO₄ 5.0%、KH₂PO₄ 0.4 g/L、MgSO₄ · 7H₂O 0.4 g/L,得精氨酸合成曲线如图 5。

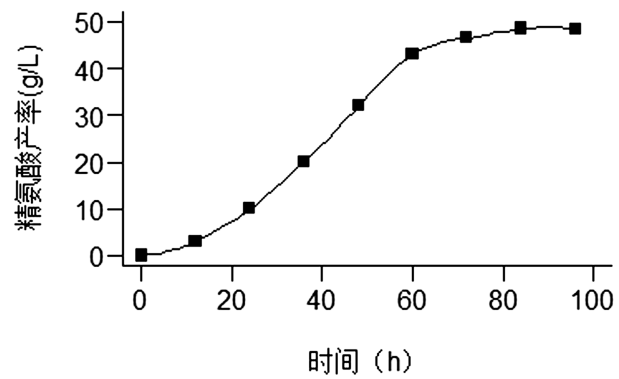


图 5 精氨酸发酵曲线

由图 5 看出在优方案发酵培养基上,精氨酸产率在发酵 90 h 达到峰值,精氨酸的产率为 48.45 g/L,与正交试验号 5 的精氨酸产率几无差别,但正交试验号 5 配方组合玉米浆为 1.5%,因此最优发酵培养基配比组成应该采用正交试验号 5,即:淀粉水解糖 13.5%,玉米浆 1.5%、(NH₄)₂SO₄ 5.0%、KH₂PO₄ 0.4 g/L、MgSO₄ · 7H₂O 0.4 g/L。

4 结论

谷氨酸棒杆菌突变株 HGS1715(D - Argr)发酵合适培养基组成为:淀粉水解糖 13.5%,玉米浆 1.5%、(NH₄)₂SO₄ 5.0%、KH₂PO₄ 0.4 g/L、MgSO₄ · 7H₂O 0.4 g/L。对精氨酸产率影响因素大小为:玉米浆>C/N>硫酸镁>磷酸二氢钾。在优化发酵培养基上 L-精氨酸的最高产率为 48.46 g/L,达到较高水平,为进一步研究打下良好基础。

(下转第 26 页)

- [14] Ooki K, Amuro N, Shimizu Y, et al. High level expression of rat gamma - D - crystallin in *Escherichia coli*. [J]. *Biochimie*, 1994, 76 (5):398-403.
- [15] Pascale G, Livstone M S, Lewis S E, et al. Phylogenetic - based propagation of functional annotations within the Gene Ontology consortium[J]. *Briefings in Bioinformatics*, 2011, 12 (5):449-462.

(上接第 11 页)

参考文献:

- [1] Utagawa T. Production of arginine by fermentation[J]. *J Nutr*, 2004, 134:2854S-2857S.
- [2] Seifer E, Rettura G, Levenson S M et al. Arginine; an essential amino acid for injured rats [J]. *Surgery*, 1978, 84(1):224.
- [3] Saito H, Trocki O, Wang S L et al. Metabolic and immune effects of dietary arginine supplementation after burn[J]. *Arch Surg*, 1987, 122 (7):784-789.
- [4] Moncada S, Higgs A. The L - arginine - nitric oxide pathway[J]. *N Engl J Med*, 1993, 329(27):2002-2012.
- [5] Richard MJ P, Daryl D R, David SA, et al. L - arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation[J]. *Biochem Biophys Res Comm*, 1988, 153(3):1251-1256.
- [6] Toshihiko Hirao et al. L - Amino Acids Production in Continuous Culture. *Fermentation Technologies: Industrial Applications*. 1990.
- [7] Yamasaki R B, Shimer D A, Feeney R E, Colorimetric determination of arginine residues in proteins by p - nitrophenylglyoxal[J]. *Analytical Biochemistry*, 1981, 111:20 ~ 226.
- [8] 张龙翔等, 生化实验方法和技术[M], 人民教育出版社, 1981.
- [9] 王小宁等译, R 语言实战[M], 人民邮电出版社, 2016.
- [10] 姚汝华, 微生物工程工艺原理[M], 华南理工大学出版社, 2005.

(上接第 19 页)

- [15] 张丹丹, 黄森, 查学强, 等. 霍山石斛多糖对人胃癌细胞生长的抑制作用[J]. *食品与生物技术学报*, 2014, 33(5):542-547.
- [16] 陈况况, 章宏慧, 陈健初. 芹菜素对癌细胞作用机理的研究进展[J]. *食品工业科技*, 2013, 34(3):392-395.
- [17] 石雪萍, 李静, 冉建华, 等. 人参皂苷 Rh2 调控 PI3K/AKT/GSK - 3 β 信号通路诱导人结肠癌细胞凋亡[J]. *中国药理学通报*, 2017, 33(1):114-119.