

# 谷氨酸温度敏感菌的筛选及发酵条件研究

王静波 张祖栋 宫卫波 李岩

(梅花生物科技集团股份有限公司 河北廊坊 065001)

**摘要:**出发菌株经硫酸二乙酯(DES)诱变,生长出来的菌落分别在 33℃、38℃下培养,挑选在 33℃下生长良好、38℃下不能生长的菌落进行摇瓶发酵并测定谷氨酸产量。产酸最高的一株温敏菌谷氨酸产量为 34g/L,较出发菌株提高 41.67%;转化率为 42.5%,较出发菌提高 40%。通过对发酵条件的优化,确定摇床的最佳转速为 220 r·p·m,最佳变温程序为 35℃~42℃~43℃。

**关键词:**温度敏感菌 诱变 谷氨酸

迄今为止工业生产谷氨酸大多采用谷氨酸棒杆菌通过发酵方法来获得,棒杆菌的生长需要生物素,但如果培养基中存在过量的生物素,则不会积累谷氨酸。因此生产中通常采用生物素亚适量的方法,限制培养基中生物素的浓度<sup>[1]</sup>。但是该工艺对生物素浓度非常敏感,生产企业对于原料以及工艺控制必须非常严格。采用高生物素原料生产时,经验成份占相当比重,易引起产量波动。为了提高生产控制水平,保证工艺及产率稳定,我集团从几年前就对温度敏感性菌种替代传统的谷氨酸生产菌种开展了研究工作。

谷氨酸温度敏感突变株的突变位点发生在决定与谷氨酸分泌有密切关系的细胞膜结构基因上<sup>[2]</sup>,常发生顺反子中碱基的转换或颠换,即一个碱基为另一个碱基所置换。由发生突变后的顺反子所控制的酶对温度变化非常敏感,高温下极易失活,而在低温下保持正常的酶催化活性<sup>[3]</sup>。因此,菌体在低温时大量生长,正常代谢,而在高温时菌体则生长微弱<sup>[4]</sup>。由于高温使突变菌的相关酶失去活性从而导致细胞膜结构变化,转变成有利于谷氨酸渗透的结构,从而使目的产物谷氨酸能够不断转移到细胞体外,避免或减弱细胞内谷氨酸浓度不断积累引起的负反馈调节抑制,达到谷氨酸在细胞内不断被合成,而在培养基中大量积累谷氨酸的目的。优良谷氨酸温度敏感菌的产酸可达 17%以上<sup>[5]</sup>。

根据温度敏感菌的这一特性,我们可以利用改变温度调节谷氨酸棒杆菌细胞膜的渗透性,将菌体生长与产酸分为两个相对独立的阶段,摆脱因原料中生物素含量变化所引起的产量波动,使发酵工艺趋于简单,易于控制,同时可以显著节约冷却用水<sup>[6]</sup>。

本研究通过对出发菌进行硫酸二乙酯诱变,筛选出温度敏感型突变株,并对发酵条件进行优化。与出发菌株相比,产酸量提高 41.67%,转化率提高 40%。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 菌种

本实验所采用菌株 MH021 为本公司实验室保藏菌株。

#### 1.1.2 培养基

保藏培养基(g/L):NaCl 2.5,进口酵母粉 5,牛肉膏 10,蛋白胨 10,琼脂 15,pH 7.0。

活化培养基(g/L):葡萄糖 1,NaCl 2.5,进口酵母粉 5,牛肉膏 10,蛋白胨 10,琼脂 18,pH 7.0。

一级种子培养基(g/L):葡萄糖 25,玉米浆 33,尿素 2.5,豆粕水解液 22,NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2.0,MgSO<sub>4</sub> 0.5,pH 7.0。

发酵培养基(g/L):葡萄糖 80,玉米浆 5.0,糖蜜 1.0,KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.0,MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 2.0,苯酚红

2.0 mg, 生物素 300 $\mu$ g, 微量营养物质, pH 7.0~7.2

### 1.1.3 仪器与试剂

脉动真空灭菌柜, 张家港神农药机有限公司; 双人超净工作台, 苏州净化设备厂; DHZ-CA 型回转式摇床, 太仓实验设备厂; SBA-40C 生物传感分析仪, 山东省科学院微生物研究所。所用试剂均为分析纯。

## 1.2 方法

### 1.2.1 出发菌 MH021 的 DES 诱变

从斜面培养基上刮取一环菌体接入种子培养基中, 培养至对数中后期, 加入不同浓度的 DES 诱变 30min, 用 2%  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  终止反应, 计算致死率。并使用 Origin 7.5 对实验数据进行分析并绘图。使用 Quantity One 软件进行菌落计数。

### 1.2.2 温度筛选突变株

经 DES 诱变的菌液, 涂完全平板于 33 $^{\circ}\text{C}$  培养, 并用灭菌牙签挑取单菌落于 38 $^{\circ}\text{C}$  培养。挑选在 33 $^{\circ}\text{C}$  生长正常、38 $^{\circ}\text{C}$  不能生长的突变株, 保藏待用。

### 1.2.3 种子培养

刮取斜面菌种一环接至种子培养基中, 33 $^{\circ}\text{C}$  培养至对数中后期。

### 1.2.4 谷氨酸温度敏感菌发酵

按 1% 接种量将培养至对数中后期的种子液转接至发酵培养基中, 设定转速分别为 180、200、220、240 r·p·m。突变菌株先于生长温度培养, 至对数中后期升温, 待稳定后升温至发酵温度, 升温程序分别设定为 33 $^{\circ}\text{C}$ ~37 $^{\circ}\text{C}$ ~38 $^{\circ}\text{C}$ 、35 $^{\circ}\text{C}$ ~39 $^{\circ}\text{C}$ ~40 $^{\circ}\text{C}$ 、35 $^{\circ}\text{C}$ ~40 $^{\circ}\text{C}$ ~42 $^{\circ}\text{C}$ 、35 $^{\circ}\text{C}$ ~41 $^{\circ}\text{C}$ ~42 $^{\circ}\text{C}$ 、35 $^{\circ}\text{C}$ ~42 $^{\circ}\text{C}$ ~43 $^{\circ}\text{C}$ 、35 $^{\circ}\text{C}$ ~43 $^{\circ}\text{C}$ ~44 $^{\circ}\text{C}$ , 发酵时间 24 h。

### 1.2.5 谷氨酸及残糖测定

使用 SBA 生物传感仪进行测定。

## 2 结果与讨论

### 2.1 DES 致死率

当处理度达到 80% 致死率时, 谷氨酸菌正向突变率最大, 使用 Origin 7.5 对数据进行分析并实现曲线拟合, 拟合曲线如图 1 所示。当致死率达到 80% 时, DES 的添加量为 0.46%, 因此后续实验采用该条件对出发菌株进行诱变。

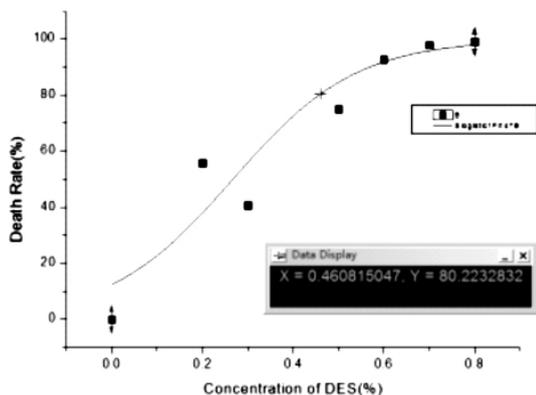


图 1 DES 致死拟合曲线

### 2.2 温度筛选突变株

菌体在 33 $^{\circ}\text{C}$  下培养一段时间后, 加入青霉素于 38 $^{\circ}\text{C}$  培养, 将在 38 $^{\circ}\text{C}$  下生长的菌体杀死。

经过青霉素富集后的菌液梯度稀释后涂布于平板, 33 $^{\circ}\text{C}$  培养, 待长出单菌落后用

灭菌牙签挑取菌落于 38 $^{\circ}\text{C}$  培养, 并将不生长的菌落做好标记, 然后将平板置于 33 $^{\circ}\text{C}$  继续培养, 待菌落长出后保藏待用。平板挑选结果如图 2 所示。其中打“√”为温敏型突变株。

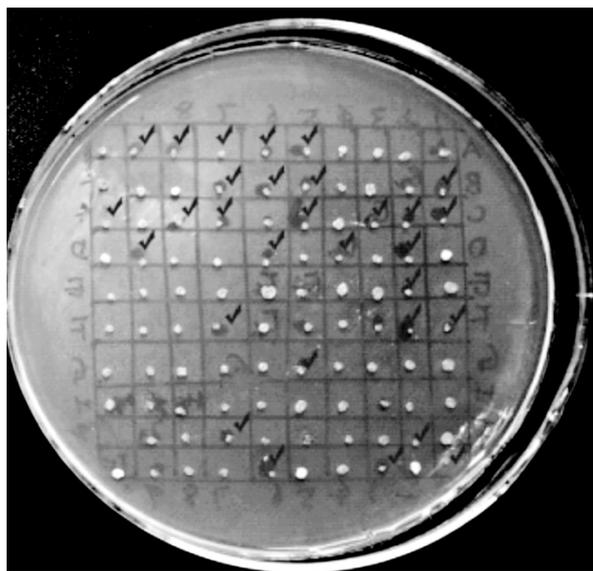


图 2 温敏菌落平板筛选

### 2.3 谷氨酸温度敏感菌发酵条件优化

#### 2.3.1 溶氧条件的控制

在摇瓶发酵过程中, 溶氧量主要通过摇床的转速控制, 在发酵温度一定的条件下, 设定转速为 180r·p·m、200r·p·m、220r·p·m、240r·p·m, 发酵 24h 测定产酸量。结果如图 3 所示。

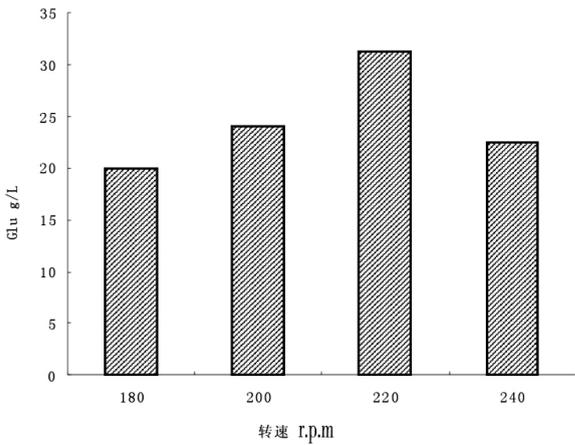


图 3 不同转速条件下菌种的谷氨酸产量

在图 3 中,谷氨酸产量在 220r·p·m 最高,当转速达到 240 r·p·m 后反而降低,所以在发酵过程中,并不是溶氧越高越好,溶氧高反而会导致产酸量的降低。后续实验采用转速 220r·p·m 进行发酵。

### 2.3.2 发酵温度的控制

在转速一定的条件下,设定不同的温度,其中初始温度使菌体大量生长,达到一定值后提高温度抑制菌体生长,经剩余生长后将温度转换至发酵温度。本实验设定以上 3 个温度梯度分别为 33℃~37℃~38℃、35℃~39℃~40℃、35℃~40℃~42℃、35℃~41℃~42℃、35℃~42℃~43℃、35℃~43℃~44℃,发酵 24 小时测定产酸量。结果如图 4 所示。

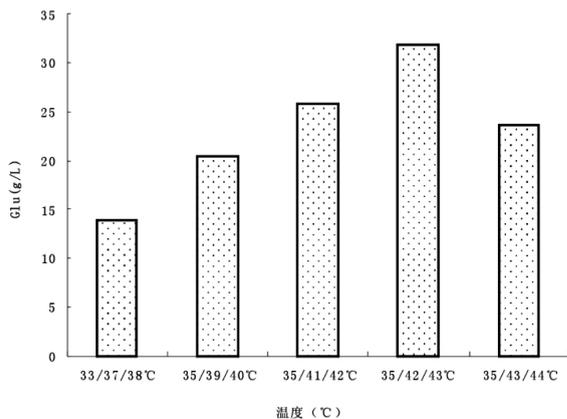


图 4 不同发酵温度下谷氨酸温度敏感菌谷氨酸产量

从图 4 中可以看出,在一定范围内,谷氨酸产量随着发酵温度的升高而升高,达到一定值后随着温度的升高而降低,因此,最佳发酵温度确定为 35℃~42℃~43℃。

## 3 结论

通过 DES 对出发菌株进行诱变,通过温度筛选和青霉素富集得到温度敏感型突变株,通过摇瓶发酵,其中产酸最高的一株产量为 34g/L,较出发菌株提高 41.67%;转化率为 42.5%,较出发菌提高 40%。通过对发酵条件的研究,确定摇床的最佳转速为 220r·p·m,发酵最佳温度为 35℃~42℃~43℃。本研究下一步可通过原生质体融合等基因组改组技术对该菌株进行改造,提高其谷氨酸生产能力,以满足工业化生产的需要。

### 参考文献:

- [1] 张克旭等.氨基酸发酵工艺学[M].北京:中国轻工出版社,1991
- [2] 邓毛程.氨基酸发酵生产技术[M].北京:中国轻工出版社,2007
- [3] 邓毛程,吴亚丽等.高生物素谷氨酸发酵中溶氧水平与生物素用量的研究[J].食品与机械,2008,24:3
- [4] 张顺堂.温敏型谷氨酸菌种发酵工艺研究[J].发酵科技通讯,2006,35:2
- [5] 张克旭.比较温度敏感突变株与生物素亚适量法的异同[J].发酵科技通讯,2006,35:1
- [6] 吕志伟.温度敏感性谷氨酸菌发酵生产的研究[J].发酵科技通讯,2003,32:2

