

L-精氨酸产生菌诱变育种的研究

路志强* 龚建华 丁久元 陈琦

(中国科学院微生物研究所, 北京)

本文报道了 L-精氨酸产生菌诱变育种的研究结果。以谷氨酸产生菌钝齿棒状杆菌 AS 1.542 为出发菌株, 经亚硝基胍多次逐级诱变, 获得了一株能够积累大量 L-精氨酸的菌株 971.1。该菌属于组氨酸缺陷型, 并具有对磺胺胍的抗药性。在以葡萄糖为碳源、硫酸铵为氮源的培养基中直接发酵四天, 产酸最高可达 25.2 mg/ml, 并具有较高的产酸稳定性。

关键词 L-精氨酸; 钝齿棒状杆菌; 诱变育种

L-精氨酸是合成蛋白质和肌酸的重要原料, 是人体和动物体中的半必需氨基酸, 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的中间代谢物, 临床上除作为复方氨基酸输液的主要组份之一外, L-精氨酸及其盐类广泛地用作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^[1], 对肠道溃疡、血栓形成、神经衰弱和男性无精病等症都有治疗效果。它也是配制营养支持用或特殊治疗用“要素膳”(Elemental Diet) 的重要原料^[2]。因此, L-精氨酸的发酵生产很早就受到人们的重视。国外近十年来已发表了不少研究报告和专刊^[3-9]。国内目前仅用天然蛋白水解法生产少量 L-精氨酸^[10-12], 该法操作费时、收率低、不适合大规模生产; 而用发酵法生产 L-精氨酸, 国内还未见报道。我们以谷氨酸产生菌钝齿棒状杆菌 AS1.542^[13] 为出发菌株, 经亚硝基胍 (NTG) 多次诱变及有效筛选, 获得了能够积累大量 L-精氨酸的突变株 971.1 (SG⁻, His⁻), 它不同于国外已报道的菌株。现将研究结果报道如下。

材料和方法

(一) 菌株

1. 钝齿棒状杆菌 (*Corynebacterium crenatum*) AS 1.542 作为诱变出发菌株。

2. 北京棒状杆菌 (*Corynebacterium pekinense*) No. 2.33 是由北京棒状杆菌 (*Corynebacterium pekinense*) AS 1.299 诱变得到的—株精氨酸缺陷型, 用作精氨酸生物测定的指示菌。

(二) 培养基

1. 液体完全培养基(%): 葡萄糖 1.0, 牛肉膏 1.0, 蛋白胨 1.0, 酵母膏 0.5, NaCl 0.5, pH 7.0—7.2, 自来水定容。

2. 固体完全培养基(%): 加琼脂 2.0, 其余均同液体完全培养基。

3. 固体基础培养基(%): 葡萄糖 1.0, (NH₄)₂SO₄ 0.3, KH₂PO₄ 0.1, MgSO₄·7H₂O 0.05, FeSO₄·7H₂O 0.002, MnSO₄·H₂O 0.002, 水洗琼脂 2.0, 生物素 30μg/L, 硫胺素 200 μg/L, pH 6.8—7.0, 蒸馏水定容。

4. 筛选发酵培养基 A(%): 葡萄糖 10.0, 玉米浆 1.0, 豆饼水解物 0.5, (NH₄)₂SO₄ 2.0, MgSO₄·7H₂O 0.025, K₂HPO₄·3H₂O 0.1, CaCO₃ 2.0, pH 7.0, 自来水定容。

本文于 1986 年 11 月 5 日收到。

* 现在工作地址: 中国科技大学生物学系, 合肥。

5. 筛选发酵培养基 B(%)：葡萄糖 12.0，玉米浆 1.5，豆饼水解物 0.8， KH_2PO_4 0.05， $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0.1， $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.04， CaCO_3 3.0，pH 7.0，自来水定容。

(三) 诱变方法

取供试菌斜面培养物一环，接入装有 10 ml 液体完全培养基的 250 ml 三角瓶中，于 30°C 振荡培养 16 小时，离心收集菌体，洗涤三次，用 pH7 的磷酸缓冲液调至浓度为 1×10^9 个菌/ml 的菌悬液，加入新配制的亚硝基胍 (NTG) 溶液，使混和处理液中亚硝基胍的终浓度为 1 mg/ml 左右。于 30°C 振荡处理 20 分钟后，离心，洗涤三次，制成不同稀释倍数的菌悬液，涂平板，置温箱内 30°C 培养。

(四) 药物抗性株检出方法

将药物按一定浓度混于完全培养基中，制成平板后，涂布上述经诱变处理过的菌液，置 30°C 温箱中培养 3—5 天后观察长出的大菌落(与对照比较)，即是药物抗性变异株。

(五) 培养条件

在试管 (14 × 150 mm) 中进行筛选时每管装 2 ml 筛选发酵培养基 A，接种后置摇床 30°C 培养，倾角 45°。在摇瓶 (250 ml) 中进行时，每瓶装 10 ml 筛选发酵培养基 B，接种后置摇床(回旋式摇床，转速 200 r/min，偏心距 2.5 cm) 30°C 培养 96 小时。

(六) 分析方法

1. pH 测定：国产精密 pH 试纸。

2. 菌体生长测定：取 1 ml 待测液，加 2 ml 2 mol/L 盐酸溶液以溶解其中的 CaCO_3 ，用蒸馏水定容至 10 ml，摇匀，以蒸馏水为空白，用 721 型分光光度计测定光密度 (波长 620 nm，光程 0.5 cm)。若待测液中不含有 CaCO_3 ，则略去加盐酸步骤。

3 还原糖测定：3,5-二硝基水杨酸法^[12]。

4. 生物测定法：在装有 1 ml 生理盐水的管中，混入一环指示菌斜面培养物，混匀，倒入平板后再倾入冷至 50°C 左右的已熔化的固体基础培养基，混匀，待凝固后在其表面点加试样数微升，30°C 培养过夜后观察指示菌生长情况。此法亦可根据生长圈的大小和透明度作粗略定量。

5. 纸层析法：使用新华 1 号滤纸。层析溶剂

系统为正丁醇：冰醋酸：水 = 5:2:2 (V/V)。层析纸烘干后，用茚三酮-丙酮试剂显色。

6. 精氨酸分析法：(1) 定性：以北京棒状杆菌 (*Corynebacterium pekinense*) No. 2.33 为指示菌作生物测定，结合纸层析谱确认之。(2) 定量：用蒸馏水把发酵液定容至原体积后，用坂口改良法^[13]测定精氨酸含量。

(七) 试剂

氨基酸标准品为日本味の素公司产品。磺胺胍 (SG) 为北京第二制药厂产品。N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍 (NTG) 为西安化学试剂厂产品。

结 果

(一) 由 AS 1.542 菌株诱变获得 L-精氨酸产生菌株 971.1 的诱变谱系

用 NTG 对钝齿棒状杆菌 AS 1.542 菌株进行诱变，处理后的菌悬液涂布在含磺胺胍的完全培养基平板上分离，经筛选获得了磺胺胍抗性株 AR 149，具有产 L-精氨酸的能力。对该菌株又进行了连续诱变处理与筛选，获得了一系列产 L-精氨酸的磺胺胍抗性株。这一系列突变株中，除抗性株 AR 149 为原养型外，其它各株都

菌株 Strain	L-精氨酸产量 Yield of L-Arg (mg/ml)
AS 1.542(SG ^r)*	0
↓ NTG	
AR 149 (SG ^r)	1.2
↓ NTG	
BR 58(SG ^r , His ⁻)	2.6
↓ NTG	
CR 171(SG ^r , His ⁻)	12.0
↓ NTG	
DR 532 (SG ^r , His ⁻)	18.0
↓ NTG	
971.1 (SG ^r , His ⁻)	21.7

(25.2 最高值 max. value)

图 1 精氨酸产生菌诱变谱系

Fig. 1 Genealogy of L-Arginine-producing mutants

* 诱变最终获得菌株 971.1 较出发菌株 AS 1.542 的抗磺胺胍药物能力有明显提高。

* The 971.1 strain has stronger resistance to SG than AS 1.542 strain.

表 1 突变株与 AS 1.542 菌株的磺胺胍药物抗性比较

Table 1 Comparison of SG-resistance between mutants and AS 1.542 strain

生长 Growth 菌株 Strains	磺胺胍浓度 Conc. of SG (mg/ml)				
	0	2	4	6	8
AS 1.542	++	++	+	-	-
AR 149	++	++	+	±	-
BR 188	++	++	+	+	-
CR 171	++	++	++	+	-
DR 532	++	++	++	+	±
971.1	++	++	++	+	+

于 30°C 培养 1—2 天后的生长结果 After incubation at 30°C for 1 to 2 days - 不生长 no growth; ± 微弱生长 meagre growth; + 生长 growth; ++ 生长良好 good growth

是 L-组氨酸缺陷型。对具有较高产酸能力的突变株进一步进行了产酸能力及产酸稳定性的比较,最终获得一株产 L-精氨酸的高产菌株 971.1,它是对磺胺胍药物有显著抗性 (SG^r) 及组氨酸缺陷型 (His⁻) 的双重突变株。诱变谱系见图 1。

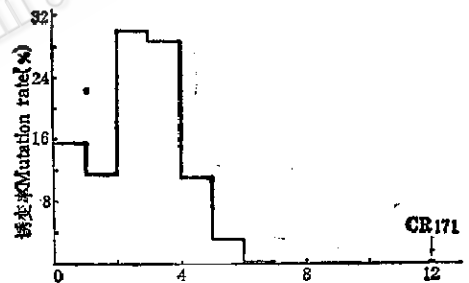
(二) 变异菌株的磺胺胍抗性与出发菌株 AS 1.542 的磺胺胍抗性比较

对 AS 1.542 菌株进行五次连续诱变后所筛选得到的一系列突变株与出发菌株 AS 1.542 相比较,它们不仅大部分都是组氨酸缺陷型,而且随着诱变次数的增加,对磺胺胍的抗性也逐步增加,产酸能力随之也相应提高。抗药性比较试验的结果见表 1。这一特征反映出经过每次诱变后突变株不同程度地获得了新的遗传特性,精氨酸生物合成的代谢调控机制得以不同程度地变化,从而使突变株积累精氨酸的能力不断提高。

(三) 变异株产 L-精氨酸能力的正变和负变的分布

用 NTG 对菌株逐级诱变,不定向地改变了所获得菌株的遗传特性,导致菌体代谢调控机制的变化,这种变化若反映在

精氨酸积累能力上则有正变和负变,并符合一定的概率分布规律。因此,通过逐级



L-精氨酸的产量
Yield of L-arg (mg/ml)

图 2 BR 188 菌株 NTG 诱变产酸分布
Fig. 2 Distribution of mutants derived from BR 188 strain with respect to their L-arginine production

诱变,有效地捕获正变菌株,则可使菌株的产酸能力不断提高。图 2 表明从 BR 188 经诱变获得 CR 171 的过程中,所获得 695 株菌产酸能力的分布情况。诱变率较高的区域是在靠近原产酸附近 2.6 mg/ml 处。而产酸愈高则得到的菌株愈少,产酸最高的菌株即是 CR 171。

表 2 部分 971 纯化菌株的产酸能力比较

Table 2 Comparison of ability of L-Arg production among a part of isolated colonies of the 971 strain

纯化菌株号 Strain No.	发酵试验重复 次数 Time repeated	产酸值 Yield of L-Arg (mg/ml)			产酸值统计量 Statistics of variable		产酸值的 “变异系数” Variation coefficient (%)
		最高值 Max. value	最低值 Min. value	平均值 Average value	样本方差 S^2 (10^{-2} g/ 100 ml)	标准差 SD (g/ 100 ml)	
700-1	8	21.7	17.3	19.8	188	0.1175	5.93
740-1	8	24.7	17.5	20.1	500	0.2236	11.12
971.1	8	25.2	18.7	21.7	552	0.2307	10.63
780-1	-	25.4	16.7	19.8	878	0.2953	14.95
80-2	8	24.7	18.8	20.3	310	0.1761	8.45

试验在 250 ml 三角瓶中, 培养基配方用筛选培养基 B。

The experiments were carried out by using the screen fermentation-medium (4B) in 250ml flask

(四) 971.1 菌株产 L-精氨酸的能力及其稳定性

对 AS 1.542 菌株进行五次逐级诱变处理后获得的 971 菌株, 其产酸能力可达 21.7 mg/ml。为了获得产酸能力较高的纯化菌株, 我们对 971 菌株在含磺胺胍的完全培养基平板上进行了大量的单胞分离工作, 对纯化菌株进行多次重复的发酵培养, 并测定纯化菌株的产酸能力及产酸稳定性。综合比较了它们的产酸最高值、最低值、平均值, 以及表征产酸稳定性的统计量“变异系数”值。最终获得菌株 971.1。它在多次重复发酵试验中, 最高产酸 25.2 mg/ml, 平均产酸为 21.7 mg/ml, 并具有较高的产酸稳定性, 即较低的“变异系数”值 (10.63%)。在表 2 中列出了具有代表性的部分纯化菌株产酸能力的测定值与表示产酸稳定性的“变异系数”值。

讨 论

1. 我们对谷氨酸产生菌钝齿棒状杆菌 AS 1.542 连续进行 NTG 诱变, 最终获得一株双重突变株 971.1, 在以葡萄糖为碳源的培养基中积累大量 L-精氨酸。该菌在营养要求和药物抗性方面与国外报道的不同。已报道的 L-精氨酸产生菌多具有

L-精氨酸结构类似物的多重抗性, 以解除精氨酸对其合成途径中关键酶的反馈调节, 致使精氨酸过量积累。而 971.1 菌是组氨酸缺陷型并具有磺胺胍抗性。对此突变株积累 L-精氨酸的机制, 我们作如下探讨。精氨酸与组氨酸分属不同族的氨基酸, 在生物体内的代谢途径上无明显联系, 但是它们的合成过程都需要谷氨酸参与, 因而存在着谷氨酸的流向分配。组氨酸合成途径的阻断, 可能有助于谷氨酸更多地参与精氨酸的合成。但这种推测尚有待于实验证实。另一方面, 971.1 菌株较出发菌株 AS 1.542 具有更强的磺胺胍抗性, 这种性能赋予该菌株积累精氨酸的能力。但是, 磺胺胍、磺胺甲基嘧啶和硫代异噻唑等类药物的抗性株的产酸机制尚不明了。推测此种作用可能是由于抗性株的胞膜渗透性发生变化, 导致胞内氨基酸的外渗或代谢途径的改变影响到氨基酸的合成。一般认为, 磺胺类药物是对氨基苯甲酸竞争性地结合于四氢叶酸合成酶上, 从而阻断了叶酸的合成, 造成菌体死亡。抗药株可能是绕过了这一途径, 另行合成叶酸, 而这一变化可能导致了氨基酸的积累。

2. 从上述实验结果看, 971.1 菌具有较高的产酸能力和产酸稳定性。可以预

期,如果对该菌再进一步进行诱变育种,获得 L-精氨酸结构类似物的抗性突变株,并深入进行发酵条件的研究,产 L-精氨酸的能力会有大幅度的提高。

参 考 文 献

- [1] 武汉医学院第二附属医院: 氨基酸通讯, **5**: 5, 1978。
 [2] 邵继智: 氨基酸杂志, **1**: 22, 1984。
 [3] Kisumi, M. et al.: *Appl. Microbil.*, **22**(6): 987, 1971。
 [4] Nakayama, K. et al.: *Amino Acid and Nu-
cleic Acid*, **25**: 141, 1972。
 [5] Kubato, K. et al.: *J. Gen. Appl. Microbil.*
19(5): 339, 1973。
 [6] Kato, J. et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*,

- 34**(6): 689, 1977。
 [7] 久保田浩二等: 特许公报, 37235, 1979。
 [8] Yoshida, H. et al.: *Agr. Biol. Chem.*, **43**(1): 105, 1979。
 [9] Akas, K. et al.: *J. Ferment. Technol.*, **57**(4): 321, 1979。
 [10] 孙梦萍等: 氨基酸杂志, **1**: 45, 1984。
 [11] 杨得本: 氨基酸杂志, **1**: 47, 1984。
 [12] 李恩光: 氨基酸杂志 **2**: 1, 1982。
 [13] 陈琦等: 微生物学报, **15**: 119—124, 1975。
 [14] 陈琦等: 微生物学报, **13**: 1—6, 1973。
 [15] 张龙翔等: 生化实验方法和技术, 人民教育出版社, 北京, 第 9—11 页, 1981 年。
 [16] Rosenberg, H. et al.: *Biochem. J.*, **63**: 153, 1956。
 [17] 中国科学院微生物研究所微生物诱变育种编写组: 微生物诱变育种, 科学出版社, 北京, 第 69 页, 1973 年。

STUDIES ON THE BREEDING OF L-ARGININE-PRODUCING STRAIN

Lu Zhiqiang* Gong Jianhua Ding Jiuyuan Chen Qi

(*Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing*)

A L-arginine-producing strain 971.1 was derived from *Corynebacterium crenatum* AS 1.542 by stepwise mutagenic treatment with N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine.

The L-arginine-producer requires histidine as an essential growth factor and has resistance to sulfaguanidine. It produced 25.2 mg/ml of L-arginine in a medium containing (%): glucose 12, corn steep liquor 1.5, soybean cake hydrolysate 0.8, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 6.5, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0.1, KH_2PO_4 0.05, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.04, CaCO_3 3.0, pH 7.0, on

a rotatory shaker at 30°C for 4 days. And also this mutant has good stability of production of L-arginine.

Key words

L-arginine; *Corynebacterium crenatum*;
Mutation-breeding

* Present address: Department of Biology, University of Science and Technology of China, Hefei.