

谷氨酸高产菌 GDK-9 的定向选育及其发酵过程研究*

杜军,徐庆阳,谢希贤,刘淑云,陈宁

(天津科技大学生物工程学院,天津,300457)

摘要 以天津短杆菌 GDK6 为出发菌株,通过原生质体紫外诱变、紫外诱变和硫酸二乙酯(DES)诱变定向选育 L-谷氨酸生产菌。经摇管初筛、摇瓶复筛、遗传标记验证、单菌落分离和连续传代,最终筛选出 1 株 L-谷氨酸高产菌 GDK-9。该菌株在未优化条件下摇瓶发酵 42h 产 L-谷氨酸 79.2g/L。另外,试验结果证实 GDK-9 菌株的遗传标记和产酸能力十分稳定。在优化条件下,通过 7L 罐发酵 32h,谷氨酸产量达 131.5g/L,糖酸转化率到达 62.2%。

关键词 L-谷氨酸,原生质体,诱变,发酵

利用微生物发酵法生产谷氨酸,迄今已有 50 多年的历史。国外采用添加青霉素等方法进行谷氨酸的强制发酵,产酸水平在 120~160g/L 左右,糖酸转化率 60% 以上。我国多采用生物素亚适量法发酵生产谷氨酸,平均产酸水平在 105 g/L,平均糖酸转化率为 55%,产酸水平和糖酸转化率与国际同行业尚有较大差距^[1~3]。对氨基酸发酵工业来说,通过生产菌种的定向选育并进行发酵过程优化以提高产酸水平是弥补国内外差距的最有效手段。利用物理、化学诱变剂单独或复合处理菌体是选育高产菌株的经典方法。而对原生质体直接进行诱变处理,不但简便易行,还可使诱变效果大为提高。原生质体诱变技术已被成功地运用于发酵法生产麦考酚酸、植酸酶、纤维素酶、葡萄糖氧化酶等菌种选育研究^[4~7],取得了很好的效果。本文依据代谢工程理论,运用原生质体诱变技术,结合紫外诱变及化学诱变手段,以天津短杆菌 GDK6 为出发菌株,定向筛选出 1 株 L-谷氨酸高产菌 GDK-9,并对该菌株的发酵过程进行了研究。

1 材料与方 法

1.1 菌 种

天津短杆菌(*Brevibacterium tianjinense*)GDK6,为天津科技大学代谢控制发酵研究室保藏菌种。

1.2 培养基和主要溶液

活化斜面、原生质体再生等培养基以及青霉素溶液、高渗液、蛋清溶菌酶等溶液配制:见参考文献[8]。

种子培养基(g/L):葡萄糖 25,玉米浆 30 mL,尿素 5

(分消), K_2HPO_4 2.0, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.6,pH7.0。

发酵培养基(g/L):葡萄糖 60,玉米浆 8 mL, KH_2PO_4 3, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.6,尿素 6 (分消),pH7.0。

1.3 试验方法

原生质体紫外诱变、紫外诱变和 DES 诱变:见参考文献[8,9]。

种子培养:将 1 支生长良好的新鲜活化斜面菌种,用适量无菌水洗下,吸取 1/4 菌液转入装有 20 mL 种子培养基的 500 mL 三角瓶中,8 层纱布封口,置于迴转式摇床上,200 r/min,33℃ 振荡培养至对数生长中后期。

摇瓶发酵:按 10% 接种量将种子液接入装有 20 mL 发酵培养基的 500 mL 三角瓶中,8 层纱布封口,置于迴转式摇床上 200~250r/min,33~38℃,振荡培养,视 pH、残糖情况及时流加尿素及 700 g/L 葡萄糖溶液,当 pH 降至 7.0 以下时,补加 200 g/L 尿素溶液 0.1~0.2 mL/瓶,发酵 42 h。

7L 罐发酵:按 10% 接种量将种子液接入 7 L 自动控制发酵罐中,装液量 5L,通风量 1~1.3 L/min,搅拌转速 450~600 r/min,培养温度 33~38℃,通过自动流加氨水控制 pH(7.1±0.1)。

1.4 分析方法

菌体浓度采用 752 分光光度计测定;葡萄糖及谷氨酸采用 SBA-40C 生物传感仪测定。

2 结果与讨论

2.1 天津短杆菌 GDK-9 的定向选育谱图

天津短杆菌 GDK6 经原生质体紫外诱变、紫外诱变以及硫酸二乙酯(DES)化学诱变,依次被赋予酮基丙二酸、氟乙酸、磺胺胍、谷氨酰胺抗性(KM⁺

第一作者:博士研究生(陈宁为本文通讯作者)。

* 国家“863”计划项目(2006AA020301)

收稿日期:2008-04-02,改回日期:2008-04-17

FA⁺+SG⁺+GL⁺)遗传标记,再经分离纯化获得1株L-谷氨酸高产菌GDK-9,其定向选育谱系见图1。



图1 天津短杆菌GDK-9的定向选育谱系

2.2 遗传稳定性试验

将目的突变株GDK-9进行单菌落分离,连续摇瓶传代10代,并进行遗传标记验证和摇瓶发酵产酸试验,结果见表1。

表1 GDK-9遗传稳定性试验

传代数	2	4	6	8	10
遗传标记	+	+	+	+	+
谷氨酸/g · L ⁻¹	79.34	79.26	79.17	79.21	79.39

注:“+”表示具有“FA⁺+KM⁺+GL⁺+SG⁺”遗传标记。

从表1结果可知,目的菌株GDK-9通过液体摇瓶连续转接10代,菌株的遗传标记和产酸率稳定,表明其遗传性状稳定,可用于进一步研究。

2.3 摇瓶分批发酵条件研究

2.3.1 最适初糖浓度的选择

研究了不同初糖浓度对目的突变株GDK-9补料分批发酵的影响,随时补加700g/L葡萄糖溶液,使发酵培养基中的葡萄糖浓度维持在20g/L,结果如图2所示。

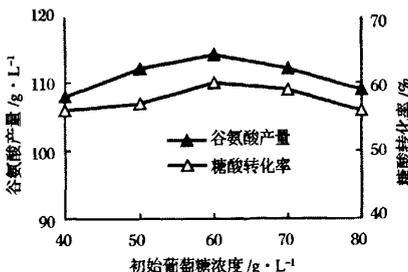


图2 初始葡萄糖浓度对谷氨酸发酵的影响

由图2可知,随着培养基中初糖浓度的逐步提高,谷氨酸产量和糖酸转化率也随之逐步提高,当初糖浓度为60g/L,并在发酵过程中随时补加700g/L

葡萄糖溶液,使发酵培养基中的葡萄糖浓度维持在20g/L时,谷氨酸产量、糖酸转化率均达到最高;初糖浓度再增加,则谷氨酸产量、糖酸转化率反而下降。因此,确定发酵培养基中最佳初始葡萄糖浓度为60g/L。

2.3.2 最适残糖维持浓度的确定

采用低糖流加工工艺进行谷氨酸发酵时,残糖维持浓度对目的产物的积累至关重要。残糖维持浓度对谷氨酸补料分批发酵的影响见图3所示。

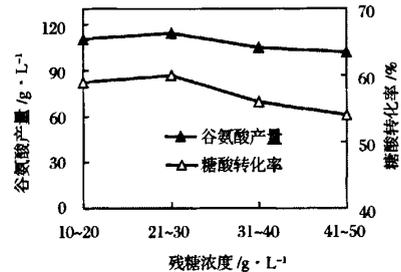


图3 残糖浓度对谷氨酸发酵的影响

由图3可知,在发酵过程中通过随时补加700g/L葡萄糖溶液,使发酵培养基中的葡萄糖浓度维持在21~30g/L时,谷氨酸产量、糖酸转化率达到最高。因此,确定发酵培养基中最佳维持糖浓度为21~30g/L。

2.3.3 摇瓶发酵过程曲线绘制

定时取样测定发酵液的pH、吸光度、残糖和L-谷氨酸产量。取3瓶测定结果的平均值,绘制GDK-9菌株的L-谷氨酸发酵过程曲线,结果如图4所示。

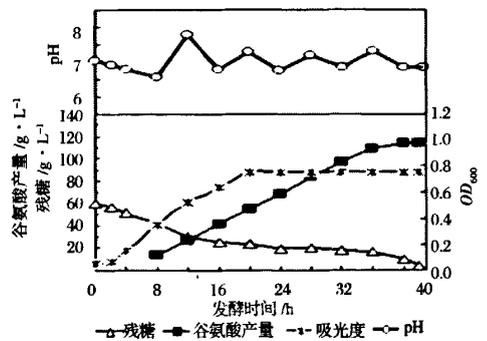


图4 菌株GDK-9摇瓶分批发酵过程曲线

由图4结果可知,0~2h为菌体生长的适应期,此时菌体耗糖速率较慢,主要用于菌体生长;4~16h为菌体对数生长期,此时单位细胞的生长速率达到并保持最大值,耗糖速率明显加快并不断积累谷氨酸;16~36h菌体进入稳定期,在此阶段,菌体耗糖速率较快,

谷氨酸大量合成;36~42 h为菌体衰退期,此时菌体耗糖速率减慢,产酸速率亦减慢,直到发酵结束。

2.4 7 L 自控发酵罐分批发酵

在摇瓶分批发酵的基础上,进行了7 L全自动控制发酵罐分批发酵试验。其发酵过程曲线如图5所示。

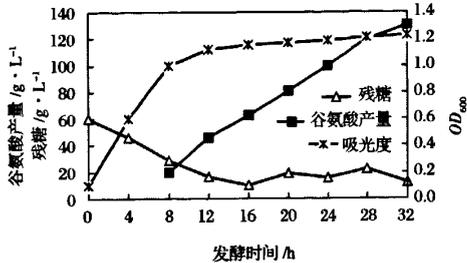


图5 7 L 罐分批发酵过程曲线

由图5可知,在菌体生长方面,0~8 h菌体生长较快,几乎没有延滞期,说明种子很快适应发酵培养基中的环境,8 h后菌体由于进入产酸期,完成从长菌型细胞到产酸型细胞的转变,其生长速率降低,12 h后菌体生长进入稳定期,直至发酵结束,菌体衰退不明显;在葡萄糖消耗方面,发酵前期耗糖明显,8~12 h由于产酸急速增加,耗糖速率随之增加以满足产酸和菌体生长需要;产物合成方面,0~6 h基本不产酸,8 h后急速产酸。在发酵过程中保持低浓度的残糖浓度,获得了较低的渗透压,有利于产物谷氨酸向胞外分泌。32 h发酵结束,产酸达到131.5 g/L,糖酸转化率达到62.2%,达到国内L-谷氨酸发酵领先水平。

3 结论

以天津短杆菌GDK6为出发菌株,根据代谢工

Rational Breeding of Glutamic Acid-overproducing Strain and Study of Fermentation Process

Du Jun, Xu Qingyang, Xie Xixian, Liu Shuyun, Chen Ning

(College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

ABSTRACT *Brevibacterium tianjinense* GDK6 as the parent strain was rationally engineered to produce L-glutamic acid by methods of protoplast ultraviolet, ultraviolet and diethyl sulfate mutagenesis. The glutamic acid-overproducing strain GDK-9 was screened through shake-tube primary screening, baffle flask second screening, genetic marker test, single clone isolation and continuous passage. This strain could produce 72.9 g/L L-glutamic acid after 42h in baffle flask under an un-optimized condition. In addition, results showed that the genetic characteristics and productivity of GDK-9 were very stable. Under the optimized fermentation conditions, a final L-glutamic acid concentration of 131.5 g/L was obtained after 32h in 7 liter fermentor with the conversion rate of 62.2%.

Key words L-glutamic acid, protoplast, mutagenesis, fermentation

程原理,通过原生质体紫外诱变、紫外诱变和硫酸二乙酯诱变定向选育出1株遗传标记和产酸能力均十分稳定的L-谷氨酸高产菌GDK-9(FA^r+KM^r+GL^r+SG^r),该菌株在未优化条件下摇瓶发酵42 h产L-谷氨酸79.2 g/L。7L罐补料分批发酵32 h,谷氨酸产量达131.5 g/L,糖酸转化率达到62.2%,谷氨酸产量和糖酸转化率均达到国内同类研究的领先水平。

参考文献

- 1 陈宁. 氨基酸工艺学[M]. 北京:中国轻工业出版社, 2007
- 2 Yoshioka T. Method for producing L-glutamic acid by continuous fermentation [P]. US Patents 5869300, 1999
- 3 Kinoshita S, Udaka S, Shimono M. Studies on the amino acid fermentation. Part 1. Production of L-glutamic acid by various microorganisms [J]. J Gen Appl Microbiol, 2004, 50(6):331~343
- 4 杨亚勇,李长洪,孟文伟. 麦考酚酸产生菌原生质体诱变育种的研究[J]. 中国抗生素杂志, 2006, 31(10):587~590
- 5 李秀珍,薄泉,杨平平,等. 利用原生质体诱变筛选植酸酶高产菌株[J]. 饲料工业, 2007, 28(8):27~29
- 6 Chen W, Ohmiya K, Shimizu S. *Escherichia coli* spheroplast-mediated transfer of pBR3221 carrying the cloned *ruminococcus albus* cellulase gene into anaerobic mutant strain FEM29 by protoplast fusion [J]. Appl Environ Microbiol, 1988, 54(9):2 300~2 304
- 7 Khattab A, Bazaraa W. Screening, mutagenesis and protoplast fusion of *Aspergillus niger* for the enhancement of extracellular glucose oxidase production [J]. J Ind Microbiol Biotechnol, 2005, 32(7):289~294
- 8 陈宁,张克旭. 谷氨酸温度型敏感株CN1021的原生质体融合育种[J]. 发酵科技通讯, 2003, 32(3):11~13
- 9 陈宁,张克旭. L-谷氨酸生产菌的选育及其发酵条件的研究[J]. 发酵科技通讯, 2002, 31(1):11~13