

结合缺陷型菌株显色法采用离子束诱变 筛选高产 L-精氨酸突变株

杨娟¹ 饶志明^{1*} 徐美娟¹ 夏海锋¹ 窦文芳² 许正宏^{2*}

(1. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室 应用微生物与代谢工程研究室 江苏 无锡 214122)

(2. 江南大学 医药学院 江苏 无锡 214122)

摘要: 为快速高效筛选 L-精氨酸高产突变株, 建立一种缺陷菌株平板显色法并采用低能 N⁺ 离子束对 L-精氨酸生产菌株钝齿棒杆菌 SYPA5-5 进行诱变处理, 通过上述平板显色法筛选获得高产突变株。对突变株进行摇瓶发酵实验, 最终选育出一株 L-精氨酸产量较高且产酸性能比较稳定的突变菌株钝齿棒杆菌 SYPA5-5-36。该菌株摇瓶发酵 L-精氨酸产量可达 35.85 g/L, 比出发菌株提高了 19.5%。因此, 缺陷型菌株平板显色法可以用于快速、高效筛选高产 L-精氨酸突变株。

关键词: L-精氨酸, 离子束注入, 钝齿棒杆菌, 营养缺陷型, 筛选

Mutated by iron implantation for screening high L-arginine production strains using a plate coloration method by auxotroph strain

YANG Juan¹ RAO Zhi-Ming^{1*} XU Mei-Juan¹ XIA Hai-Feng¹
DOU Wen-Fang² XU Zheng-Hong^{2*}

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

(2. Laboratory of Pharmaceutical Engineering, School of Medicine and Pharmaceutics, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

Abstract: A plate coloration method by auxotroph strain for screening high L-arginine production mutants quickly and efficiently was established. *Coynebacterium crenatum* SYPA5-5 which is an L-arginine producer was mutated by N⁺ ion implantation with an energy level of 10 keV. Combined with the directed screening method and fermentation in flasks, a mutant *C. crenatum* SYPA5-5-36 with a higher

基金项目: 教育部新世纪优秀人才计划项目(No. NCET-10-0459); 国家 973 计划项目(No. 2007CB707804); 国家 863 计划项目(No. 2007AA02Z207); 国家自然科学基金项目(No. 30970056); 中央高校基本科研业务费专项资金项目(No. JUSR31001); 教育部 111 引智计划项目(No. 111-2-06); 江苏省优势学科工程项目

* 通讯作者: 饶志明: Tel: 86-510-85916881; ✉: raozm@yahoo.com.cn

许正宏: Tel: 86-510-85918206; ✉: zhenghxu@163.com

收稿日期: 2011-06-10; 接受日期: 2011-07-27

L-arginine production and stability was selected. The yield of L-arginine produced by this mutant could reach 35.85 g/L which was 19.5% higher than that of the original strain. Therefore, the plate coloration method by auxotroph strain could be applied to screening high L-arginine production mutants quickly and efficiently.

Keywords: L-arginine, Ion implantation, *Corynebacterium crenatum*, Auxotroph, Screening

L-精氨酸是一种碱性氨基酸,在医药和食品工业中具有广泛用途^[1]。L-精氨酸的生产主要采用发酵法,而发酵法生产的关键之一就是选育高产 L-精氨酸的生产菌。L-精氨酸生产菌株的诱变育种主要是传统的化学诱变方法(亚硝基胍、硫酸二乙酯和甲基磺酸乙酯等)和物理诱变方法(紫外线和 X-射线等)。低能离子束注入是 20 世纪 80 年代初兴起的一种新技术,1986 年开始被用于农作物育种,现在在微生物育种中得到广泛应用。该方法较传统的诱变育种手段具备低破坏率、高突变率且突变范围更广的优点,因而在微生物育种方面取得了较好的效果^[2-6]。

微生物中从 L-谷氨酸合成 L-精氨酸有 3 条途径:线性途径、循环途径及后发现的利用氨甲酰基转移酶进行 L-精氨酸生物合成的新途径^[7]。大肠杆菌及古细菌主要以线性途径合成 L-精氨酸,而酿酒酵母、谷氨酸棒杆菌、假单胞菌等微生物则以循环途径合成 L-精氨酸。课题组前期结合紫外诱变和亚硝基胍诱变获得一株高产 L-精氨酸钝齿棒杆菌 SYPA5-5,其摇瓶发酵产量可达 30 g/L^[8-9]。实验旨在先建立一种利用营养缺陷型筛选 L-精氨酸高产突变株的方法,拟通过敲除 *argH* 基因(编码精氨酸琥珀酸酶,催化鸟氨酸琥珀酸到精氨酸),获得 L-精氨酸缺陷型大肠杆菌,以 *E. coli* BL21 基因组 DNA 为模板 PCR 获得 *argBH* 基因片段,在 *argH* 基因内部插入卡那霉素抗性基因(*Kan*),通过双交换替代原有的 *argBH* 实现对 *argH* 的敲除从而获得该酶缺失的 L-精氨酸缺陷型大肠杆菌。TTC (2,3,5-氯化三苯基四氮唑)是一种活细胞指示剂,它能被活细胞产生的还原氢还原成红色^[10-11]。将上述 L-精氨酸缺陷型菌株作为 L-精氨酸分泌的指示菌通过交互共养^[12]以 TTC 为显色剂实现钝齿棒杆菌胞外精氨酸浓度高低的定性筛选,在平板上初筛出合成 L-精氨酸能力高

或分泌性能较优型菌株,进而再通过摇瓶发酵复筛,该方法大大提高了菌种选育中的筛选效率而且节约了成本。最终采用该平板显色筛选法筛选出一株经离子束诱变的高产 L-精氨酸钝齿棒杆菌突变株。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种及质粒: 详见表 1。

1.1.2 培养基: (1) LB 培养基(g/L): 蛋白胨 10, 酵母提取物 5, NaCl 10, 琼脂 15。

(2) 完全培养基(g/L): 葡萄糖 20, 牛肉膏 10, 蛋白胨 10, 酵母膏 5, NaCl 5, 琼脂 20。pH 7.0-7.2, 1×10^5 Pa 灭菌 20 min。

(3) 基本培养基(g/L): 葡萄糖 10, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3, KH_2PO_4 1, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.02, 琼脂 20, 生物素 8×10^{-5} , 硫胺素 2×10^{-4} , L-组氨酸 5×10^{-4} 。pH 7.0-7.2, 1×10^5 Pa 灭菌 20 min。

(4) 补充培养基(g/L): 基本培养基中以 20 mg/L 添加 L-精氨酸, pH 7.0-7.2, 1×10^5 Pa 灭菌 20 min。

(5) 摇瓶种子培养基(g/L): 葡萄糖 30, 玉米浆 20, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 20, KH_2PO_4 1, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, 尿素 1.5。pH 7.0-7.2, 1×10^5 Pa 灭菌 20 min, 装液量 30 mL/250 mL。

(6) 摇瓶发酵培养基(g/L): 葡萄糖 120 (分消), 玉米浆 30, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 50, KH_2PO_4 1.5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.02, 生物素 8×10^{-5} , L-组氨酸 5×10^{-4} , CaCO_3 30。pH 7.0-7.2, 1×10^5 Pa 灭菌 20 min, 装液量 20 mL/250 mL。

(7) 筛选培养基: 基本培养基灭菌结束冷却至约 45 °C 后, 以 10^5 个/mL 细胞浓度加入 *E. coli* BL21 L-精氨酸缺陷型菌株轻轻摇匀(不产生气泡), 制成筛选平板。

表 1 实验所用菌株、质粒及引物
Table 1 The strains, plasmids and primers used in this study

菌株、质粒、引物 Strains, Plasmids, Primers	特征 Characteristics	来源 Source
Strains		
<i>E. coli</i> JM109	endA1 glnV44 thi-1 relA1 gyrA96 recA1 mcrB ⁺ Δ (lac-proAB) e14- [F ⁺ traD36 proAB ⁺ lacI ^q lacZΔM15] hsdR17 (r _K ⁻ m _K ⁺)	Invitrogen
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	F ⁻ ompT gal dcm lon hsdS _B (r _B ⁻ m _B ⁻) λ (DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5])	Promega
<i>Corynebacterium crenatum</i> SYPA5-5	L-arginine producer, His ⁻ , SG ^f , D-arg ^f , H-arg ^f	Our labs
Plasmids		
pMD-18T	<i>E. coli</i> clone plasmid Amp ^r , Col E origin	TaKaRa
T-Kan	A derivative of pMD18-T, Amp ^r , Km ^r , harboring <i>Kan</i> gene	Our labs
T- <i>EcargBH</i>	A derivative of pMD18-T, Amp ^r , harboring <i>argBH</i> gene	This study
T- <i>EcargBH</i> ::Kan	A derivative of pMD18-T, Amp ^r , harboring <i>argBH</i> gene and Kan, Amp ^r Km ^r	This study
Primers		
P1	5'-CGCGAATTCATGAATCCATTAATTATCAAACCTGG-3' (<i>EcoR</i> I)	
P2	5'-CGCGTCGACTTACCCTAACCCGAGCCTGC-3' (<i>Sal</i> I)	

注: Amp^r: 氨苄霉素; Km^r: 卡那霉素

Notes: Amp^r: Ampicillin-resistant phenotype; Km^r: kanamycin-resistant phenotype.

1.1.3 主要仪器设备及试剂: (1) 质粒小量抽提试剂盒、胶回收试剂盒购自北京博大泰克生物基因技术有限公司; 工具酶购自 TaKaRa 公司; 引物由上海赛百盛基因技术有限公司合成; TTC (2,3,5-氯化三苯基四氮唑)上海生工进口分装。

(2) LZD-900 多功能离子束注入机(俄罗斯产, 南京工业大学离子束工程中心提供), 恒温往复式摇床(太仓市实验设备厂), 超净工作台(苏州净化设备有限公司), 722 型可见分光光度计。

1.2 方法

1.2.1 *E. coli* BL21 L-精氨酸缺陷型菌株的构建: (1) *E. coli* BL21 基因组 DNA 的提取方法参见文献[13]。

(2) *argBH* 的扩增: 在大肠杆菌中, 精氨酸合成途径中的 N-乙酰谷氨酸激酶 *argB* 恰好位于精氨酸琥珀酸酶 *argH* 的上游, 本文中简称 *argBH*。以 *E. coli* BL21 基因组 DNA 为模板, 用引物 P1、P2 扩增 *argBH* 基因, 扩增循环条件: 94 °C 5 min; 94 °C 40 s, 56 °C 90 s, 72 °C 90 s, 35 个循环; 72 °C min。扩增产物通过 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测。

(3) 质粒 pMD-18T-*argBH*::*Kan* 的构建: 如图 1 所示, 将 PCR 获得的 *argBH* 基因片段电泳回收后与 pMD-18T 载体 16 °C 过夜连接, 转化 *E. coli* JM109, 得到 *E. coli* JM109 (pMD-18T-*argBH*)。重组

质粒 pMD-18T-*argBH* 用 *EcoRV* 酶切, 线性化后胶回收 4.7 kb 的 T-*argBH* 片段, 将 T-*Kan* 用 *EcoRV* 酶切后胶回收其中大小约为 1.4 kb 的包含 *Kan* 抗性基因的片段, 并将其与同样用 *EcoRV* 酶切后的 T-*argBH* (*EcoRV* 位点位于 *argH* 内部)进行连接, 得到 T-*argBH*::*Kan*。

(4) *E. coli* BL21 精氨酸缺陷型菌株的获得: 将质粒 T-*argBH*::*Kan* 以 *EcoR* I、*Xho* I 酶切, 胶回收得到 *argBH*::*Kan* 片段。热击转化 *E. coli* BL21, 卡那霉素抗性平板上筛选阳性转化子。将得到的阳性转化子分别点种于基本培养基(MM)平板和补充培养基(SM)平板对比培养, 在 MM 平板上无法生长, 在添加了 L-精氨酸的 SM 平板上正常生长的初步认为是 L-精氨酸缺陷菌株。提取转化子的染色体 DNA, 用 *argBH* 基因的引物扩增 *argBH*::*Kan*, 验证阳性转化子。

1.2.2 快速筛选高产 L-精氨酸菌株平板显色法的建立: 平板显色法基于交互共养实现, 交互共养是指筛选平板中 *E. coli* BL21 L-精氨酸缺陷型菌株的生长依赖于钝齿棒杆菌分泌的 L-精氨酸, 分泌 L-精氨酸越多缺陷型菌株生长越好, 具体步骤如下: 将本实验室保藏 L-精氨酸产量不等的 4 株钝齿棒杆菌以相同量点种至筛选平板, 30 °C 培养 5-7 d, 于超净工作台中均匀喷洒无菌 1 mg/L TTC 溶液(膜过滤除菌), 37 °C 放置 1-2 h, 观察平板上显色情况。

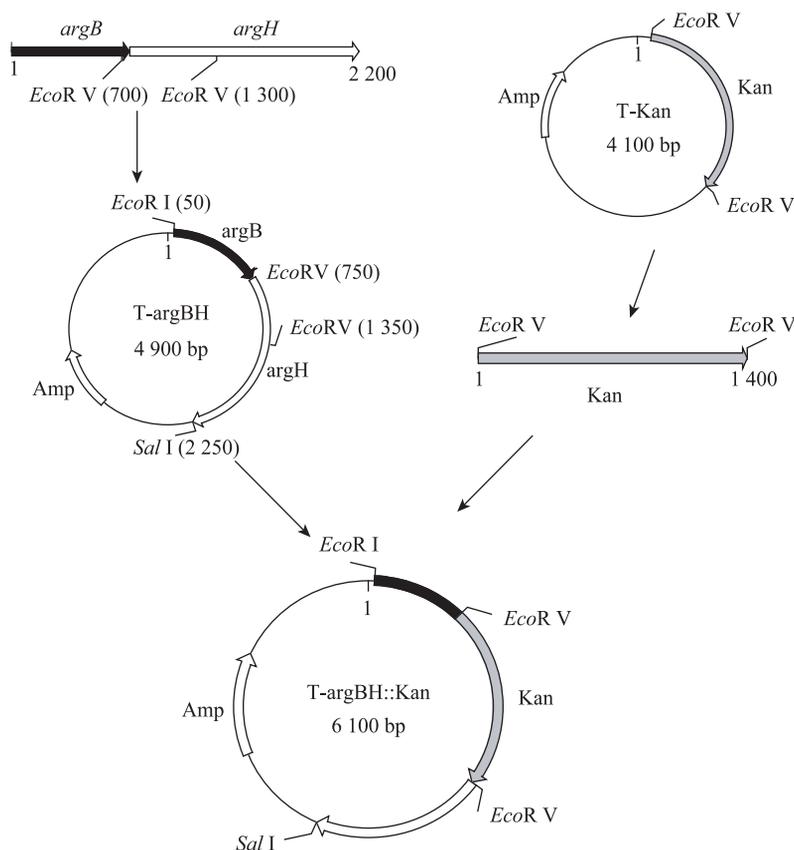


图 1 质粒 pMD-18T-argBH::Kan 的构建

Fig. 1 Construction of plasmid pMD-18T-argBH::Kan

1.2.3 钝齿棒杆菌的诱变及筛选: (1) 钝齿棒杆菌培养方法: 1) 种子培养: 从培养 24 h 的斜面上挑取一环菌体接入液体种子培养基, 30 °C、200 r/min 培养 14–16 h。2) 发酵培养: 种子培养后, 以 5%–6% 的接种量接入发酵培养基中, 30 °C、200 r/min 培养 96 h。

(2) 诱变方法: 将培养 18–20 h (对数生长中后期) 的钝齿棒杆菌菌液离心洗涤 3 次, 制成单细胞悬液, 使细胞浓度在 10^8 个/mL。取 0.1 mL 菌悬液均匀涂布到无菌培养皿中, 置于超净工作台风干制成菌膜。在 N^+ 注入机中进行离子注入, 能量 10 KeV。每个菌株做 6 个梯度剂量, 每个剂量两个平板。 N^+ 注入剂量分别为 2.0×10^{14} 、 4.0×10^{14} 、 6.0×10^{14} 、 8.0×10^{14} 、 1.0×10^{15} 、 1.2×10^{15} ion/cm², 并做真空对照平板。诱变后, 加入 1 mL 无菌水洗涤菌体制成菌悬液。将菌悬液稀释 10^4 倍分别涂布于完全培养基和筛选培养基上, 30 °C 培养 3–5 d, 观察平板菌落数, 计算不同离子注入剂量的致死率[(真空对照平板菌落数–诱变

处理平板菌落数)/真空对照平板菌落数 $\times 100\%$]^[14–15]。

(3) 平板显色法快速筛选高产 L-精氨酸突变株: 选择合适离子束剂量诱变处理后的菌悬液按不同稀释倍数涂布于筛选平板上, 30 °C 培养 5–7 d 后在平板上喷洒一层无菌 1 mg/L 的 TTC 溶液(膜过滤除菌), 再置于 37 °C 培养 1–2 h, 观察平板上的显色情况。挑选筛选平板上红色圈较大的菌落编号分离纯化摇瓶复筛待用。

(4) 摇瓶复筛: 挑选平板上红色圈较大的菌株于 250 mL 摇瓶, 30 °C、200 r/min 发酵 96 h 产 L-精氨酸性能检测(其中每株菌进行 3 组平行发酵实验)。

(5) 产 L-精氨酸遗传稳定性的检测: 挑选产酸量较高的菌株, 在斜面培养基上传代 5 次, 并分别进行发酵实验, 通过每一代产酸结果的比较, 选出产酸量最高和产酸能力比较稳定的菌株。

1.2.4 分析方法: (1) 钝齿棒杆菌菌体细胞量的测定: 发酵液用 0.25 mol/L 的盐酸稀释至适当倍数,

测定 562 nm 处的光密度, 按照 $1 OD=0.375 \text{ g-DCW/L}$, 换算为菌体干重。

(2) L-精氨酸的测定: 采用氨基酸自动分析仪测定发酵液中 L-精氨酸的含量。

2 结果分析

2.1 *E. coli* BL21 L-精氨酸缺陷型菌株的构建

2.1.1 *argBH* 基因的克隆及重组质粒 T-*argBH*::*Kan* 的构建及鉴定: 图 2A 是以 *E. coli* BL21 的染色体为模板, 以 *argBH* 基因引物 PCR 的电泳结果, 从图上可以看出在 2.2 kb 处有一明亮条带, 这与 *argBH* 基因预期大小一致。克隆至 pMD-18T 上并测序。在经测序后的 T-*Ecar*gBH 中引入卡那霉素抗性基因, 即 T-*Ecar*gBH::*Kan* 的构建。从图 2B 可以看出, 第 3 泳道质粒 T-*Ecar*gBH 以 *EcoR* V 酶切得到 4.7 kb 大小的片段, 表明 T-*Ecar*gBH 构建成功; 第 2 泳道质粒 T-*Ecar*gBH::*Kan* 以 *EcoR* I、*Sal* I 双切得到 3.4 kb 和 2.7 kb 大小的片段; 第 4 泳道 T-*Ecar*gBH::*Kan* 以 *EcoR* V 酶切得到 4.7 kb 和 1.4 kb 大小的片段, 表明 T-*Ecar*gBH::*Kan* 构建成功。

2.1.2 *E. coli* BL21 转化子的获得及阳性转化子的验证: 以含有 100 mg/L 卡那霉素抗性平板上筛选到的转化子分别点种于基本培养基(MM)平板和补充

基本培养基(SM)平板对比培养, 在 MM 平板上无法生长, 在添加了 L-精氨酸的 SM 平板上正常生长的菌株初步确认为 L-精氨酸缺陷菌株。提取阳性转化子和对照菌株的基因组 DNA 为模板进行 PCR 验证。如图 3 所示, 阳性转化子的原 *argBH* 基因被含有 *Kan* 片段长度大约为 3.4 kb 的 *argBH*::*Kan* 替换, 而原始对照菌株 *argBH* 基因长度约 2.2 kb, 两者相差约 1.2 kb。说明阳性转化子已经成功的用 *argBH*::*Kan* 片段替换了原 *argBH* 基因, 成功敲除了 *argH* 基因。

2.2 快速筛选高产 L-精氨酸菌株平板显色法的建立
筛选平板上 L-精氨酸产量不等的 4 株钝齿棒杆菌产生的红色圈如图 4 所示, 其精氨酸产量与红色圈直径比较如表 2 所示, 实验结果表明红色圈直径大小与菌株 L-精氨酸产量呈正比, 表明此方法用于筛选高产 L-精氨酸突变株有效可行。

2.3 离子束诱变处理及精氨酸高产突变株的筛选

2.3.1 不同离子束剂量的致死率: 将不同剂量 N^+ 离子束诱变后的菌液稀释 10^4 倍, 涂布到完全平板上, 并用同样稀释度但未诱变过的菌悬液涂布于完全平板作空白对照, 30°C 培养 3-5 d 观察菌落生长情况, 得出不同剂量致死率 η (表 3)。由表 3 可知, 离子束剂量为 $8 \times 10^{14} - 1 \times 10^{15} \text{ ion/cm}^2$ 的致死率接近 70%, 所以选择此范围内的剂量为最适诱变剂量^[16]。

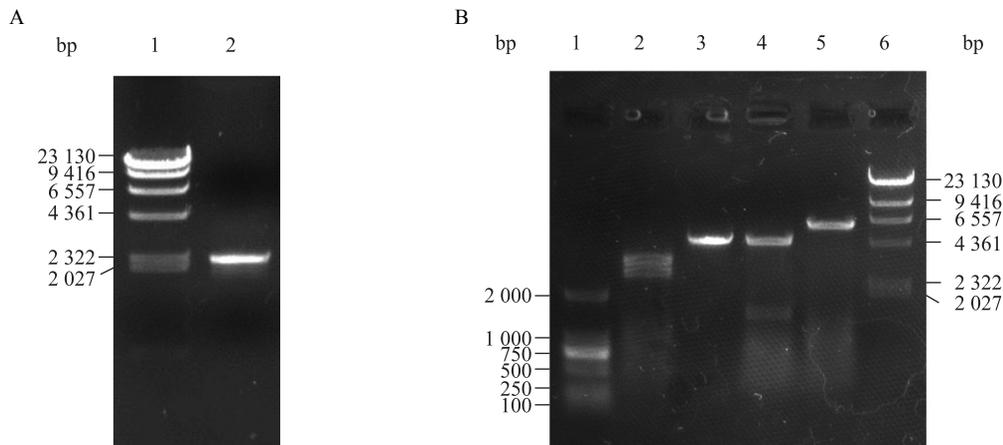


图 2 *argBH* 基因的扩增及 T-*Ecar*gBH::*Kan* 酶切验证

Fig. 2 Amplification of *argBH* gene and Electrophoresis of T-*Ecar*gBH::*Kan* digested

注: A: *argBH* 基因的 PCR 扩增; 1: λ DNA/*Hind* III; 2: *argBH* 基因. B: 质粒 T-*Ecar*gBH::*Kan* 酶切鉴定 1: DL2000; 2: T-*Ecar*gBH::*Kan*/*EcoR* I 和 *Sal* I 酶切; 3: T-*Ecar*gBH/*EcoR* V; 酶切; 4: T-*Ecar*gBH::*Kan*/*EcoR* V 酶切; 5: T-*Ecar*gBH::*Kan*/*EcoR* I 酶切; 6: λ DNA/*Hind* III marker.

Note: A: Amplification of *argBH* gene; 1: λ DNA/*Hind* III; 2: *argBH* gene. B: Electrophoresis of T-*Ecar*gBH::*Kan* digested; 1: DL2000; 2: T-*Ecar*gBH::*Kan*/*EcoR* I+*Sal* I; 3: T-*Ecar*gBH/*EcoR* V; 4: T-*Ecar*gBH::*Kan*/*EcoR* V; 5: T-*Ecar*gBH::*Kan*/*EcoR* I; 6: λ DNA/*Hind* III marker.

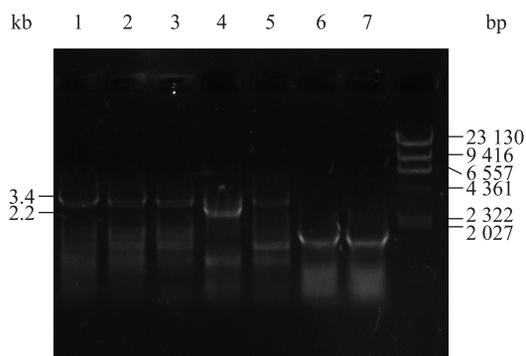


图3 *argBH* 基因敲除转化子的 PCR 鉴定
Fig. 3 PCR determination results of the *argBH*-disrupted transformants

注: 1-5: 1-5 转化子 *argBH* PCR 产物; 6-7: Kan 1-2 做 Kan PCR 产物; 8: λ DNA/*Hind* III marker.

Note: 1-5: *argBH* PCR of 1-5 transformants; 6-7: Kan PCR of 1-2 transformants; 8: λ DNA/*Hind* III marker.

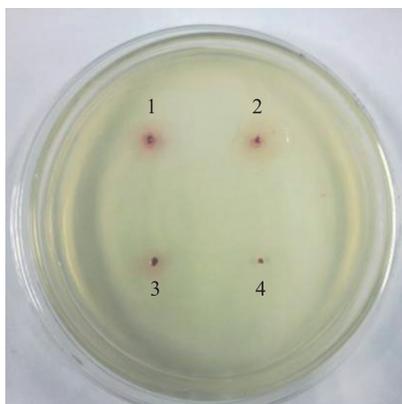


图4 L-精氨酸产量不等的 4 株钝齿棒杆菌缺陷型菌株平板显色法结果

Fig. 4 Result of plate coloration method by auxotroph strain for four *C. crenatums* of different L-arginine production

表 2 不同 L-精氨酸产量 4 株钝齿棒杆菌 平板显色红色圈直径				
Table 2 Diameters of the red halos of <i>C. crenatums</i> with different L-arginine production				
菌株编号 Strain number	1	2	3	4
L-精氨酸产量(g/L) L-arginine production	30	18	10	0
红色圈直径(mm) Diameter of the red halo	15	10	8	0

2.3.2 平板显色法快速筛选 L-精氨酸高产突变株: 挑选显色平板上红色圈较大的菌落编号, 共 68 株, 初步确定为可能的 L-精氨酸高产突变株, 如图 5 所示的平板筛选结果。

表 3 不同 N^+ 离子束剂量下 *C. crenatum* SYPA5-5 的致死率

Table 3 Sterilization rate of *C. crenatum* SYPA5-5 under different concentration of N^+ ionic beam

离子束剂量 Concentration of ionic beam ($\times 10^{14}$ ion/cm ²)	菌落数 Colonies			致死率 η (%)	
	处理组 Experimental group		对照组 Control group		
2	160	165	170	183	9.8
4	101	123	126	183	36.2
6	100	109	115	183	41.0
8	56	60	66	183	66.8
10	40	43	49	183	75.9
12	13	15	20	183	91.3

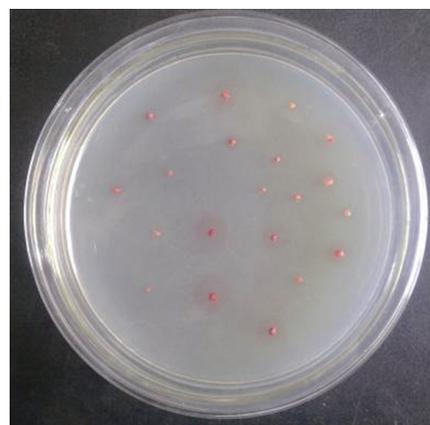


图 5 缺陷型菌株平板显色筛选精氨酸高产突变株结果
Fig. 5 Result of screening high L-arginine production mutants using plate coloration method by auxotroph strain

2.3.3 250 mL 摇瓶发酵复筛: 对平板法筛选到的 68 株菌进行 250 mL 摇瓶发酵复筛。结果表明, 50 株突变株较原始菌 *C. crenatum* SYPA5-5 单位细胞的 L-精氨酸产率有所提高, 正突变率为 73.5%。L-精氨酸产量提高最多的 9 株正突变株摇瓶发酵结果, 如表 4 所示。

2.3.4 产 L-精氨酸遗传稳定性的检测: 挑选 L-精氨酸产量较原始菌增长率最高的 4 株突变株进行斜面传代 5 次, 对每次传代的菌株进行摇瓶发酵产酸测定, 其结果如图 6 所示。其中编号为 SYPA5-5-36 的突变株相对其它 3 株菌产量较高且稳定性最好, 将其命名为 *C. crenatum* SYPA5-5-36。

表4 250 mL 摇瓶复筛结果
Table 4 Result of rescreening in 250 mL flasks

编号 Number	菌体量 Biomass (g DCW/L)	L-精氨酸产量 L-arginine pro- duction (g/L)	增加率 Increasing rate (%)
SYPAS-5	14.06	30.00	—
SYPAS-5-3	13.86	34.52	15.1
SYPAS-5-17	14.33	35.60	18.7
SYPAS-5-19	13.96	35.01	16.7
SYPAS-5-36	14.23	35.85	19.5
SYPAS-5-39	14.18	35.46	18.2
SYPAS-5-53	13.89	35.90	19.7
SYPAS-5-59	14.36	35.90	19.7
SYPAS-5-61	13.55	34.83	16.1
SYPAS-5-66	14.09	35.00	16.7

注: 表格中的数值为 3 个平行的平均值。

Note: Each digital value is expressed as a mean value of three parallels.

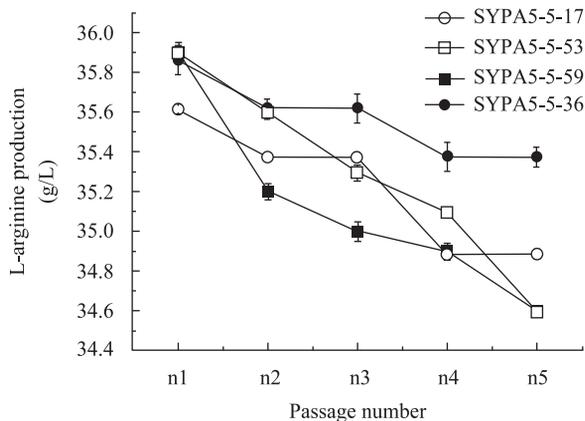


图6 4株高产突变株传代5次L-精氨酸产量的变化
Fig. 6 L-arginine production of four mutants for five passages

3 讨论

目前, 日本等国家发酵法生产 L-精氨酸处于世界领先水平, 其产量可达 60 g/L, 而国内 L-精氨酸的发酵法生产水平较低, 上海微生物研究所利用黄色短杆菌生产 L-精氨酸产量可达 40 g/L。所用的菌种大都是传统诱变育种获得, 其筛选方法多是通过筛选 L-精氨酸结构类似物抗性突变株获得高产菌株, 但是这种筛选方法正突变株的效率较低、费时费力, 且 L-精氨酸的结构类似物多比较昂贵, 因此

成本较高。我们首先建立了一种平板显色筛选法, 其实质是筛选 L-精氨酸合成能力或分泌能力增强的突变株, 分泌能力较优的菌株其胞内产物对关键酶的反馈抑制和反馈阻遏也将减弱, 从而能够合成更多的产物。结果表明, 该筛选方法筛选效率明显提高, 同时节约了成本, 并为氨基酸生产菌株的育种提供了一个新的思路。由实验结果可知, 氨基酸的分泌对氨基酸产量有着至关重要的影响, 课题组前期已在 L-精氨酸生物合成途径关键酶^[17]和发酵过程中溶氧的控制^[18-19]等方面做了一系列研究, 接下来将从 L-精氨酸分泌的角度考察 L-精氨酸生产菌株 *C. crenatum* SYPA, 如加强 L-精氨酸转运蛋白 LysE 的表达减弱胞内 L-精氨酸对关键酶的反馈抑制和反馈阻遏以进一步提高 L-精氨酸的产量, 相关工作正在进行中。

参考文献

- [1] 抹泽洋太郎. 不可缺少的氨基酸-精氨酸[J]. 日本医学介绍, 1996, 17(1): 9-10.
- [2] Niwa K, Yamamoto T, Furuita H, et al. Mutation breeding in the marine crop *Porphyra yezoensis* (Bangiales, Rhodophyta): cultivation experiment of the artificial red mutant isolated by heavy-ion beam mutagenesis. *Aquaculture*, 2011, 314(1/4): 182-187.
- [3] Song H, Chen XC, Cao JM, et al. Directed breeding of an *Arthrobacter* mutant for high-yield production of cyclic adenosine monophosphate by N⁺ ion implantation[J]. *Radiation Physics and Chemistry*, 2010, 79(8): 826-830.
- [4] Feng HY, Yu ZL, Chu PK. Ion implantation of organisms[J]. *Materials Science and Engineering: R: Reports*, 2006, 54(3/4): 49-120.
- [5] Liu J, Liu M, Wang J, et al. Enhancement of the *Gibberella zeae* growth inhibitory lipopeptides from a *Bacillus subtilis* mutant by ion beam implantation[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2005, 69(2): 223-228.
- [6] He QT, Li N, Chen XC, et al. Mutation breeding of nuclease p1 production in *Penicillium citrinum* by low-energy ion beam implantation[J]. *Korean J Chem Eng*, 2011, 28(2): 544-549.
- [7] Granik VG. Metabolism of L-arginine. *Pharm Chem J*, 2003, 37(3): 111-127.
- [8] 许正宏, 熊筱晶, 窦文芳, 等. L-精氨酸高产菌的选育及基于代谢流量分布的育种机制[J]. *工业微生物*, 2006,

- 36(4): 1-6.
- [9] Xu H, Dou WF, Xu HY, et al. A two-stage oxygen supply strategy for enhanced L-arginine production by *Corynebacterium crenatum* based on metabolic fluxes analysis[J]. *Biochem Eng J*, 2009, 43(1): 41-51.
- [10] 饶志明, 张君胜, 沈微, 等. 谷氨酸棒杆菌高丝氨酸脱氢酶编码基因 *hom* 的敲除[J]. *中国生物工程杂志*, 2007, 27(1): 59-63.
- [11] Praveen-Kumar, Tarafdar JC. 2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) as electron acceptor of culturable soil bacteria, fungi and actinomycetes[J]. *Biol Fert Soils*, 2003, 38(3): 186-189.
- [12] Nandineni MR, Gowrishankar J. Evidence for an arginine exporter encoded by *yggA* (*argO*) that is regulated by the LysR-type transcriptional regulator *argP* in *Escherichia coli*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2004, 186(11): 3539-3546.
- [13] 宋宏新, 邹联柱, 马冬, 等. PCR 检测牛乳中大肠杆菌基因组 DNA 的提取方法[J]. *食品科学*, 2010, 31(24): 308-310.
- [14] Baudin A, Ozier-Kalogeropoulos O, Denouel A, et al. A simple and efficient method for direct gene deletion in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Nucleic Acids Research*, 1993, 21(14): 3329-3330.
- [15] Su CX, Zhou W, Fan YH, et al. Mutation breeding of chitosanase-producing strain *Bacillus sp.* S65 by low-energy ion implantation[J]. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2006, 33(12): 1037-1042.
- [16] 梁慧星. 离子注入技术在微生物诱变育种中的研究[J]. *安徽农业科学*, 2007, 35(9): 2564-2565.
- [17] 刘飞, 饶志明, 徐美娟, 等. 钝齿棒杆菌乙酰谷氨酸激酶编码基因 *argB* 的克隆表达、纯化及酶学性质研究[J]. *工业微生物*, 2010, 40(4): 23-28.
- [18] 许虹, 窦文芳, 许泓瑜, 等. 不同供氧水平对 L-精氨酸分批发酵过程的影响[J]. *化工学报*, 2008, 59(9): 2295-2301.
- [19] Xu MJ, Rao ZM, Xu H, et al. Enhanced production of L-arginine by expression of vitreoscilla hemoglobin using a novel expression system in *Corynebacterium crenatum* [J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2010, 163(6): 707-719.

稿件书写规范

论文中计量单位的表示方法

为执行国务院发布的《关于在我国统一实行法定计量单位的命令》的规定, 计量单位和单位符号按国家技术监督局发布的《量和单位》GB3100-3102-93 执行。单位符号均用英文小写(正体), 不允许随便对单位符号进行修饰。现将本刊常用计量单位和符号介绍如下, 希望作者参照执行。

时间: 日用 d; 小时用 h; 分钟用 min; 秒用 s 等表示。

溶液浓度: 用 mol/L, 不用 M (克分子浓度)和 N(当量浓度)等非许用单位表示。

旋转速度: 用 r/min, 不用 rpm。

蒸汽压力: 用 Pa 或 kPa、MPa 表示。

光密度: 用 OD (斜体)表示。

生物大分子的分子量: 蛋白质用 D 或 kD, 核酸用 bp 或 kb 表示。

图表中数值的物理量和单位: 物理量符号采用斜体, 单位用正体并用括号括起, 例如: $t(h)$ (表示时间, 单位是小时)。带数值的计量单位: 计量单位不能省略, 跟数字之间加一空格(%除外), 例如: 20 cm×0.3 cm, 不能写成 20×0.3 cm; 3 °C~5 °C 不可写成 35 °C; 3%~6% 不可写成 36% 等。