

不同破壁方法 对细菌蛋氨酸产量的影响

贾翠英, 张玉辉, 魏娟

(河南科技学院生命科学技术学院, 河南新乡 453003)

摘要:为考察不同破壁方法对细菌蛋氨酸产量的影响,分别采用碱解、溶菌酶、超声波以及碱解与超声波、溶菌酶与超声波之间的复合破壁方法对一株产蛋氨酸细菌进行细胞破壁,并用氯铵-T法分别测定胞外发酵液和各种破壁条件下胞内蛋氨酸的含量。结果表明:发酵液中蛋氨酸为0.952mg/L,经碱破壁、溶菌酶破壁、超声波破壁、碱与超声复合破壁、溶菌酶与超声波复合破壁后,蛋氨酸总产量分别提高了10.9%、12.0%、18.3%、19.6%、22.2%,上述结果表明细菌细胞破壁后,蛋氨酸产量明显提高,且不同破壁方法提高程度不同,复合破壁方法与单一破壁方法相比,蛋氨酸产量提高效果显著。

关键词:蛋氨酸, 细胞破壁, 蛋氨酸产量

Effect of different disintegrated cell wall methods on methionine yield of bacterium

JIA Cui-ying, ZHANG Yu-hui, WEI Juan

(School of Life Science and Technology, Henan Institute of Science and Technology, Xinxiang 453003, China)

Abstract: Different methods including alkali-hydro, lysozyme, ultrasonic method, alkali-ultrasonic synergic and lysozyme-ultrasonic synergic method were respectively used in order to investigate the effect of different cell wall disrupting methods on methionine yield of bacterium. Ammonium chloride-T method was used to respectively determine the yield of methionine in fermentation broth and in cell. The results showed that in original fermentation broth there was 0.952mg/L of methionine. And after the cell wall being disrupted by different methods such as alkali-hydro, lysozyme, ultrasonic method, alkali-ultrasonic method and lysozyme-ultrasonic method, the total yield of methionine enhanced 10.9%, 12.0%, 18.3%, 19.6% and 22.2% respectively. All of above results improved further that different methods displayed different efficiency for enhancing methionine yield, especially multiple and synergic disrupting method were better than single disrupting method.

Key words: methionine; cell wall disrupting methods; yield of methionine

中图分类号: TS201.2+4

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2012)09-0325-04

蛋氨酸(Methionine, Met)分子量149.21, 白色薄片状结晶或结晶性粉末, 有特殊气味, 味微甜, 熔点280~281℃(分解), 对强酸不稳定, 可导致脱甲基作用, 溶于水(3.3g/100mL, 25℃), 稀酸和稀碱, 极难溶于乙醇, 几乎不溶于乙醚^[1]。蛋氨酸是维持人和动物正常发育所必需的一种限制性氨基酸, 在饲料工业、医药工业、保健业及食品工业中具有广泛的应用^[2-5]。近年来国内外市场对蛋氨酸的需求逐年增长^[6], 成为需求量增长最快的氨基酸品种之一。然而我国目前还未实现蛋氨酸工业化生产, 尤其是饲料用蛋氨酸

主要依赖进口。国际上蛋氨酸的生产主要采用化学合成法, 近年来又开发出固-液相转移催化法^[7]。多数厂家采用化学合成法, 这种方法存在着生产成本低、收率低、污染环境严重等缺点, 导致许多以精氨酸为原料的产品价格居高不下, 给人们的生活带来不便。微生物发酵法生产蛋氨酸是一种理想的选择。然而, 蛋氨酸作为微生物发酵后的产物, 除了发酵液中存在, 在发酵后菌体内也有大量残留, 因此经生物发酵后能否最大限度地提高蛋氨酸产量是一个比较重要的问题。将发酵后菌体离心并对细胞进行破壁可提高蛋氨酸的总产量。目前, 细胞破碎技术主要包括机械破碎、物理破碎、化学破碎和酶法破碎以及多种方法的联合使用, 机械破碎又包括高压匀浆破碎、研磨破碎等, 物理破碎包括反复冻融法、超声波破碎法等, 化学破碎包括酸、碱破碎以及有机溶剂破碎等^[8-11]。因

收稿日期: 2011-08-01

作者简介: 贾翠英(1974-), 女, 博士, 讲师, 研究方向: 生物化工与生物制药。

基金项目: 河南省科技攻关项目(082102220001)。

此, 本实验考察并比较了不同细胞破壁方法对细胞蛋氨酸产量的影响, 通过快速灵敏的蛋氨酸^[12-14]测定方法来检测菌株内残留的蛋氨酸的量, 以便于有效提取胞内的蛋氨酸, 对增加蛋氨酸的产量具有重要的现实意义。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

本实验所用的菌株 河南科技学院分离工程教研室提供; EDTA (0.5mg/mL) Augus, 由0.1mol/L的pH8.0的磷酸盐缓冲液配制, 冷藏保存; 氯铵-T (0.01mol/L) Sigma-Aldrich, 冷藏保存; 5, 5'-二硫代双硝基苯甲酸(DTNB, 4mg/mL) Sigma, 由0.5mg/mL的EDTA溶液配制冷藏保存; 焦碳酸二乙酯(DEPC) Sigma, 冷藏保存; 硼氢化钠 北京化学试剂公司, 分析纯, 室温保存; NTB溶液(新鲜配制) DTNB贮液用少量硼氢化钠还原, 盐酸溶液中和过量硼氢化钠, 直至无气体产生, 磷酸盐缓冲液5~10mL调节pH至8.0; 0.1mg/mL蛋氨酸标准溶液 由0.5mg/mL EDTA溶液配制, 冷藏保存; 完全培养基 牛肉膏0.4%、蛋白胨1%、NaCl 0.5%, 固体培养基另加1.5%琼脂(pH7.0~7.2); 种子培养基 葡萄糖5%、尿素0.3%、 K_2HPO_4 0.06%、 KH_2PO_4 0.10%、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05%、蛋白胨3%、酵母浸膏0.5%, pH7.0~7.2; 发酵培养基 葡萄糖4%、 $(NH_4)_2SO_4$ 0.4%、尿素0.1%、 KH_2PO_4 0.05%、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05%、 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.02%、 $MnSO_4 \cdot H_2O$ 0.02%、生物素8 μ g/100mL、硫胺素200 μ g/100mL(分消), 固体培养基另加2%琼脂(pH7.0~7.2)。

10~100 μ L吉尔森移液枪 法国GILSON; S-450D超声波破碎仪 美国BRANSON公司; JA1003电子天平 上海电子天平厂; HHH11电热恒温培养箱 天津市三水科学仪器有限公司; HZ250L型恒温摇床 武汉瑞华仪器设备有限公司; 洁净工作台 素净集团安泰公司; 80-1离心沉淀器 上海手术器械厂; YXQ-LS-SH全自动立式电热压力蒸汽灭菌器 上海博讯实业有限公司医疗设备厂; 722N可见分光光度计 上海精美科学仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 蛋氨酸标准曲线的绘制 取0.1mg/mL的蛋氨酸标准液0、0.075、0.10、0.15、0.20、0.25mL于试管中, 加EDTA溶液定容至1.0mL, 同时均加入10 μ L DEPC作为掩蔽剂, 室温过夜; 分别加入3.0mL磷酸盐缓冲液和0.03mL的氯铵-T溶液, 室温反应40min后, 再加入0.2mL NTB溶液, 以试剂空白为对照, 于412nm下测其OD值。绘制OD-蛋氨酸含量(μ g)标准曲线。

1.2.2 菌种活化 将购买的出发菌株接种于固体斜面培养基中, 30℃恒温培养48h, 挑取一环接种于盛有30mL种子液体培养基的250mL三角瓶中, 180r/min, 30℃恒温振荡培养16~18h。

1.2.3 发酵培养 将种子培养液按10%的接种量接入装有50mL发酵液体培养基的250mL三角瓶中, 30℃ 180r/min摇床培养60h。

1.2.4 蛋氨酸含量测定 取发酵液10mL于离心管中, 3500r/min, 离心15min, 取上清稀释; 将离心后的

菌体收集, 进行破壁处理, 离心取上清稀释; 分别向上述不同上清稀释液中, 加EDTA溶液定容至1.0mL, 同时均加入1mL DEPC作为掩蔽剂, 室温过夜; 加入3.0mL磷酸盐缓冲液和0.03mL的氯铵-T溶液, 室温反应40min后, 再加入0.2mL NTB溶液, 以试剂空白为对照, 于412nm下分别测其OD值, 计算蛋氨酸含量。

1.2.5 各种细胞破壁条件的确定

1.2.5.1 碱解破壁条件的确定 将10mL发酵液3500r/min离心15min, 收集菌体, 用缓冲液洗涤2~3次, 再分别加入2mL 4mol/L NaOH混匀, 分别在20、40、60℃水浴加热条件下对每种浓度的氢氧化钠分别加热1、2、3h, 每组做三个重复; 水浴加热结束分别加入HCl调pH至8.0, 再加入缓冲液至10mL, 5000r/min离心10min, 取上清再稀释2倍, 进行蛋氨酸含量测定。

1.2.5.2 溶菌酶破壁条件确定 将10mL发酵液3500r/min离心15min, 收集菌体, 用缓冲液洗涤2~3次, 分别加入10 μ g/mL溶菌酶2、4、6mL, 用缓冲液定容到10mL, 混匀, 各浓度下分别30℃水浴反应1、2、3h, 重复三次; 反应结束后, 5000r/min离心10min, 取上清再稀释2倍, 进行蛋氨酸含量测定。

1.2.5.3 超声波破壁条件确定 将10mL发酵液3500r/min离心15min, 收集菌体, 用缓冲液洗涤2~3次, 再用缓冲液定容到10mL, 分别在15、20、25kHz的频率下以4s的破停间隔分别破壁10、15、20min, 重复三次。超声结束后, 5000r/min离心10min, 取上清再稀释2倍, 进行蛋氨酸含量测定。

1.2.5.4 碱解和超声波复合破壁 参考碱解破碎最佳条件和超声波破碎的最佳条件, 将细胞进行碱解和超声波复合破壁, 破碎后的菌悬液经适当稀释后, 测定蛋氨酸含量。

1.2.5.5 溶菌酶和超声波复合破壁 参考溶菌酶破碎最佳条件和超声波破碎的最佳条件, 将细胞进行溶菌酶解和超声波复合破壁, 破碎后的菌悬液经适当稀释后, 测定蛋氨酸含量。

2 结果与讨论

2.1 蛋氨酸标准曲线的制作

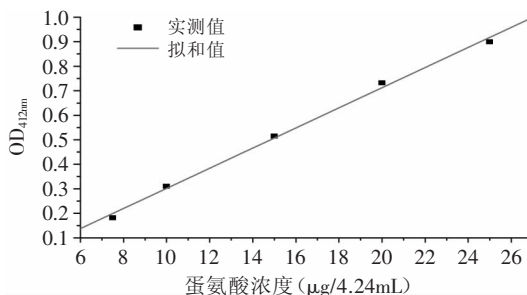


图1 蛋氨酸标准曲线

Fig.1 Standard curve of methionine

图1显示了蛋氨酸含量与吸光值OD₄₁₂之间的关系, 由图可知, 蛋氨酸含量在7.5~25 μ g/4.24mL与吸光值OD₄₁₂存在线性关系, 蛋氨酸的计算公式为 $x = (y + 0.10873) / 0.04105$, 相关系数 $R^2 = 0.99833$, 因此, 所作标准曲线能够用于蛋氨酸含量的测定与计算。由蛋氨酸标准曲线制作过程, 以及蛋氨酸含量与吸光值OD₄₁₂

之间的关系,可测得并计算出原发酵液中蛋氨酸含量为0.952mg/L,即细胞破碎前发酵液中蛋氨酸含量。

2.2 各种破壁方法最佳条件确定

2.2.1 碱解破壁最佳条件确定 菌体经1.2.5.1碱解破壁后,样液于波长412nm处测定测得的OD值如表1所示。

表1 碱解破壁条件的确定

Table 1 Determination of cell wall disrupting condition with alkaline method

时间(h)	温度(℃)		
	20	40	60
1	0.041±0.001	0.142±0.002	0.124±0.001
2	0.053±0.001	0.137±0.001	0.132±0.001
3	0.071±0.002	0.129±0.001	0.129±0.002

由表1可知,升高温度有利于胞内蛋氨酸的释放,但是温度的继续升高可能破坏了蛋氨酸的结构和性质,使得所测得的蛋氨酸含量降低,此外,相同破碎温度下,破碎时间的延长有利于胞内蛋氨酸释放,但过长时间也会导致蛋氨酸含量降低。从表1中的数据可知,碱解破壁的最佳条件是40℃水浴1h,在此条件下破壁可获得蛋氨酸产量的OD₄₁₂平均值为0.142,计算可得蛋氨酸含量为0.104mg/L,即细胞经40℃水浴1h的碱解破壁后,与细胞破碎前相比,蛋氨酸总产量增加了10.9%。

2.2.2 溶菌酶破壁最佳条件确定 菌体经1.2.5.2溶菌酶破壁后,样液于波长412nm处测定测得的OD值如表2所示。

表2 溶菌酶最佳破壁条件确定

Table 2 Determination of cell wall disrupting condition with lysozyme method

时间(h)	溶菌酶浓度(μg/mL)		
	2	4	6
1	0.029±0.001	0.121±0.001	0.131±0.001
2	0.064±0.001	0.166±0.001	0.131±0.001
3	0.091±0.002	0.099±0.001	0.110±0.001

由表2可知,所用溶菌酶浓度越大越有利于胞内蛋氨酸的释放。另外,以相同溶菌酶浓度进行细胞破碎,破碎时间的延长有利于胞内蛋氨酸释放,但当溶菌酶浓度高于4μg/mL时,延长溶菌时间会导致蛋氨酸含量降低。原因可能是低浓度溶菌酶对细胞破碎程度小,但通过延长破碎可提高破碎效果;高浓度溶菌酶对细胞破碎程度大,如继续延长破碎时间可能对蛋氨酸也造成一定破坏,从而影响检测结果。从表2中的数据可知,溶菌酶破壁的最佳条件是4μg/mL溶菌酶30℃水浴2h,在此条件下破壁可获得蛋氨酸产量的OD₄₁₂平均值为0.166,计算可得蛋氨酸含量为0.114mg/L,即经溶菌酶30℃水浴2h破壁后,与细胞破碎前相比蛋氨酸总产量增加了11.9%。

2.2.3 超声波破壁最佳条件确定 菌体经1.2.5.3超声波破壁后,样液于波长412nm处测定测得的OD值如表3所示。

由表3可知,所用超声波的频率越大越有利于胞内蛋氨酸的释放,但是超声时间也影响到胞内蛋氨酸的释放,当超声时间为10~15min时,随着超声波频率

表3 超声波最佳破壁条件确定

Table 3 Determination of cell wall disrupting condition with ultrasonic method

频率(kHz)	时间(min)		
	10	15	20
15	0.167±0.001	0.217±0.001	0.264±0.001
20	0.200±0.001	0.235±0.001	0.312±0.002
25	0.233±0.003	0.256±0.003	0.273±0.001

增大,细胞破碎效果越明显,即越有利于胞内蛋氨酸的释放。但是当超声时间为20min时,超声波超声频率的增大反而降低了蛋氨酸含量,原因可能是高频率长时间超声破碎,会产生相当的热量,造成对蛋氨酸的破坏而影响检测结果。从表3中的数据可知,超声波破壁最佳条件是20kHz超声20min,在此条件下破壁可获得蛋氨酸产量的OD₄₁₂平均值为0.312,计算可得蛋氨酸含量为0.174mg/L,即经溶菌酶30℃水浴2h破壁后,与细胞破碎前蛋氨酸总产量增加了18.3%。

2.2.4 碱解与超声波复合破壁 菌体经1.2.5.4碱解与超声波复合破壁后,样液于波长412nm处测定测得的OD值如表4所示。

表4 碱解与超声波复合破壁的结果

Table 4 Results of cell wall disruption with alkali-ultrasonic complexed method

碱解与超声波复合破壁	1	2	3	平均值
OD ₄₁₂	0.342	0.342	0.345	0.343

从表4中的数据分析可知,经碱解与超声波复合破壁后,样液中可获得OD₄₁₂平均值为0.343的蛋氨酸产量,计算可得蛋氨酸含量为0.187mg/L,即经碱解与超声波复合破壁后,与细胞破碎前蛋氨酸总产量增加了19.6%,可见复合破碎更有利于胞内蛋氨酸的释放。

2.2.5 溶菌酶与超声波复合破壁 菌体经1.2.5.5溶菌酶与超声波复合破壁后,样液于波长412nm处测定测得的OD值如表5所示。

表5 溶菌酶与超声波复合破壁的结果

Table 5 Results of cell wall disrupting with lysozyme-ultrasonic complexed method

溶菌酶与超声波复合破壁	1	2	3	平均值
OD ₄₁₂	0.401	0.400	0.402	0.401

从表5中的数据分析可知,经溶菌酶与超声波复合破壁后,样液中可获得OD₄₁₂平均值为0.401的蛋氨酸产量,计算可得蛋氨酸含量为0.211mg/L,即经溶菌酶30℃水浴2h破壁后,与细胞破碎前蛋氨酸总产量增加了22.2%。

2.3 不同破壁方法的比较

通过以上五种破壁方法破壁后所测得的蛋氨酸总产量高低进行比较,结果如表6所示。

如表6分析可知,溶菌酶与超声波复合破壁、碱解与超声波复合破壁、超声波破壁这三种方法对蛋氨酸总产量的提高比例为18.3%~22.2%左右,且表6还显示复合破壁方法对蛋氨酸产量的提高比例显著优越于单一破壁方法。

(下转第430页)

male rats[J]. J Vet Sci, 2005, 6(2): 103-109.

[26] U.S Department of Health and Human Services. Hazardous substances data bank(HSDB, online database). National Toxicology Information Program, National Library of Medicine, Bethesda, MD. 1993[Z].

[27] Sittig M. Handbook of toxic and hazardous chemicals and carcinogens[M]. 2nd ed. Noyes Publications, Park Ridge, NJ, 1985.

[28] Vitaglione P, Fogliano V. Use of antioxidants to minimize the human health risk associated to mutagenic/carcinogenic heterocyclic amines in food[J]. Journal of Chromatography B, 2004, 802: 189-199.

[29] 薛菲, 彭英云. 食品烹调过程中产生的致突变物: 杂环胺[J]. 科技咨询, 2007(36): 221-222.

[30] 步云. 天然水解香料: 水解植物蛋白[J]. 北京日化, 1994(2): 19-23.

[31] 张辉, 丁晓雯. 食品中氯丙醇污染及其毒性[J]. 粮食与油脂, 2005(7): 44-47.

[32] 丁原洲. 咸味香精中氯丙醇的危害与对策[J]. 中国食品添

加剂, 2007(1): 181-183.

[33] 黄剑锋, 吴秀登, 傅武胜. 氯丙醇的全毒理学评价[J]. 概况实用预学, 2002(4): 427-430.

[34] Haratake J, Furuta A, Iwasa T, et al. Submassive hepatic necrosis induced by di-chloropropanol[J]. Liver, 1993, 13: 123-129.

[35] 李文兰, 季宇彬, 杨波, 等. 环境中邻苯二甲酸丁苄酯的雌激素生物活性[J]. 城市环境与城市生态, 2003, 16(1): 22-24.

[36] Susan J, Tracey R, Roger W, et al. A variety of environmentally persistent chemicals, including some phthalate plasticizers are weakly estrogenic[J]. Environ Health Perspect, 1995, 103(6): 582-587.

[37] 齐文启, 孙宗光. 痕量有机污染物的监测[M]. 北京: 化学工业出版社, 2002: 1-31.

[38] 杜世祥. 食品香料安全性评价[J]. 中国食品添加剂, 2003(2): 16-18.

[39] 钟全斌, 吴威. 我国食品用香料香精法规标准存在的问题和对策[J]. 上海标准化, 2009(8): 40-41.

(上接第327页)

表6 不同破壁方法细胞蛋氨酸总产量的比较结果

Table 6 Comparison results of yield of methionine after cell wall being disrupted with different methods

破壁方法	破壁后蛋氨酸增加量 (mg/L)	破壁前发酵液中蛋氨酸含量 (mg/L)	蛋氨酸总产量提高量 (%)
碱解破壁	0.104	0.952	10.9
溶菌酶破壁	0.114	0.952	11.9
超声波破壁	0.174	0.952	18.3
碱与超声波复合破壁	0.187	0.952	19.6
溶菌酶与超声波复合破壁	0.211	0.952	22.2

3 结论

细胞的破壁方法有很多种, 主要分为物理破碎、化学破碎、生物破碎三种, 物理破碎中的高压匀浆法、珠磨法、反复冻融法、干燥法等对设备资源的要求较高, 故选用了较常用的超声波破碎法。化学破碎法中, 表面活性剂法、抗生素法等对菌种类型、产物类型要求较严格, 且成本较高, 又因为蛋氨酸在酸性条件下不稳定, 因此, 本实验选用了NaOH破壁较为简单且廉价的方法进行破壁。生物破壁方法主要是溶菌酶破壁, 本实验也选用了此方法。为了提高细胞破壁率, 本实验先进行单一方法破壁, 然后进行复合破壁实验, 结果表明复合破壁效果较好。

考虑到应用于生产实践中的生产成本、生产工艺等问题如溶菌酶价格比较高, 复合破壁比较复杂, 碱解破壁已造成污染, 建议选用超声波破壁方法。目前, 蛋氨酸生产成本较高, 产量较低, 导致许多以蛋氨酸为原料的产品价格居高不下, 给人们的生活带来不便。从本实验的结果来看, 蛋氨酸生产株在完成发酵时, 细胞内的蛋氨酸含量也相当可观, 研发出较为可行的方法将细胞内的蛋氨酸提取出来, 必将为

提高蛋氨酸的生产效率做出贡献。

参考文献

- [1] 孙晓东, 王雅琴. 新型蛋氨酸测定方法的建立[J]. 食品科学, 2004(12): 159-160.
- [2] 陈英军, 张卓标, 吕海龙. 我国蛋氨酸生产现状及市场分析[J]. 精细与专用化学品, 2005, 16(13): 22-24.
- [3] 马燕. L-甲硫氨酸产生菌诱变育种和突变株发酵条件研究[D]. 成都: 四川师范大学, 2004.
- [4] Kumar D, Subramanian K, Bisaria V S, et al. Effect of cysteineon methionine production by aregulatory mutant of *Corynebacteriumlilium* [J]. Bioresource Technology, 2005, 96: 287-294.
- [5] 谭圣君, 邵友元, 李卫. 蛋氨酸的研究现状及其应用前景[J]. 湖北工业大学学报, 2006, 21(6): 66-70.
- [6] 张伦. 蛋氨酸国产化, 进程加快[J]. 中国制药信息, 2006, 22(2): 36-39.
- [7] 黄光斗, 鲁国彬, 黄征青, 等. 蛋氨酸的合成及研究进展[J]. 化工时刊, 2003, 17(3): 10-12.
- [8] 杨冬梅, 李俊年, 田向荣, 等. 不同破壁法对高原油菜花粉挥发性成分的影响[J]. 湖南农业科学, 2011(7): 88-91.
- [9] 王小红, 钱骅, 张卫明, 等. 双孢蘑菇中核酸提取的研究[J]. 食品工业科技, 2010, 31(4): 216-219.
- [10] 华洵璐, 张一平, 匡群, 等. 酶法结合超声破壁提取香菇水溶性糖和多糖的研究[J]. 食用菌, 2011(2): 54-57.
- [11] Timothy, E Mccarthy, M X Sullivan. A new and MgMy specific colorimetric test for methionine[J]. Bio-Chem, 2004, 141: 871-874.
- [12] 何照苑, 张迪青. 保健食品化学及其检测技术[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1996: 155.
- [13] 胡克燥. 蛋氨酸分析方法的探讨[J]. 浙江化工, 1996, 27(3): 44-45.
- [14] 钟国清. 蛋氨酸的两种测定方法比较[J]. 江西饲料, 2002(3): 20-22.