

乳糖发酵短杆菌L-苏氨酸产生菌的选育

檀耀辉 张炳荣

(无锡轻工业学院, 无锡)

从谷氨酸产生菌 *Brevibacterium lactofermentum* XQ5121 出发选育 L-苏氨酸产生菌。以硫酸二乙酯 (DES) 和甲基磺酸乙酯 (EMS) 诱变处理, 用 α -氨基- β -羟基戊酸 (AHV) 和 S-(2-氨基乙基)-L-半胱氨酸 (AEC) 药物平板及琥珀酸培养基 (SAM) 平板定向筛选, 最后获得一株 L-苏氨酸高产菌 ZT-1 株 (AHV^r AEC^r SAM^s), 可在适宜的培养条件下积累 16mg/ml L-苏氨酸。试验结果表明, 在以琥珀酸为唯一碳源的平板培养基 (SAM) 上生长迅速即 SAM^s 变异可导致 L-苏氨酸积累大幅度提高。

文中对 *B. lactofermentum* L-苏氨酸产生菌的选育机理作了讨论。

关键词 L-苏氨酸; 琥珀酸培养基

L-苏氨酸为人和动物的营养必需氨基酸之一, 在食品、饲料^[1]和医药^[2]等方面有着重要用途, 被誉为第二(或第三)限制性氨基酸。发酵法生产 L-苏氨酸的研究已有不少报道^[3-7]。在日本, 味之素公司以年产近 200 吨的规模投入工业化生产。苏联于 1979 年开始工业化生产 L-苏氨酸, 年产量 40 吨。国内中国科学院微生物研究所黄和容等^[8] 1982 年报道了 *Corynebacterium crenatum* L-苏氨酸产生菌的选育, 产酸为 13mg/ml。然而我国的 L-苏氨酸发酵法工业生产至今尚属空白。为发展我国的氨基酸工业, 选育优良性状的 L-苏氨酸产生菌十分必要。本研究以 *B. lactofermentum* XQ5121 为出发菌株, 经化学诱变处理和 AHV、AEC 药物平板及 SAM 平板定向筛选, 成功地选育出 L-苏氨酸产生菌 ZT-1 株 (AHV^r AEC^r SAM^s), 产酸达 16mg/ml。

材料与方 法

(一) 材料

1. 出发菌株: 乳糖发酵短杆菌 (*Brevibacterium lactofermentum* XQ5121 (本实验室编号))。

2. 培养基成分 (%) 和培养条件

(1) 葡萄糖 2, (NH₄)₂SO₄ 0.15, KH₂PO₄ 0.1, K₂HPO₄ 0.3, MgSO₄·7H₂O 0.01, MnSO₄·4H₂O 0.001, FeSO₄·7H₂O 0.001, 生物素 3 μ g, 硫胺素 10 μ g, 尿素 0.15, 琼脂 2。

(2) 葡萄糖 0.5, 牛肉膏 1.0, 蛋白胨 1.0, NaCl 0.5, 琼脂 2。

(1) 和 (2) 均以 20% NaOH 调 pH 7.0, 1 kg/cm² 压力下灭菌 15min。

(3) 葡萄糖 10, (NH₄)₂SO₄ 3, KH₂PO₄ 0.15, MgSO₄·7H₂O 0.05,

本文于 1985 年 9 月 12 日收到。

$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.001, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.001, 生物素20 μg , 硫胺素10 μg , CaCO_3 4。

(4) 葡萄糖 10, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3, KH_2PO_4 0.15, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05, 玉米浆 1 ml, CaCO_3 4。

(3) 和 (4) 均以20%NaOH调pH 7.0, 装液量为 5 ml/ ϕ 2.5 \times 25cm 试管或 10ml/250ml 三角瓶、20ml/500ml 三角瓶, 1 kg/cm²压力下灭菌10min。培养温度31 \pm 1 $^\circ\text{C}$, 往复式摇床(振幅 6cm, 振次120次/min)。

3. 主要试剂: 硫酸二乙酯(DES)和甲基磺酸乙酯(EMS)为上海试剂一厂产品; α -氨基- β -羟基戊酸(AHV)系上海东风试剂厂产品; S-(2-氨基乙基)-L-半胱氨酸(AEC)为英国进口产品; 琥珀酸钠和L-苏氨酸分别为上海试剂一厂产品(分析纯)和上海生化研究所产品(色谱纯)。

(二) 方法

1. 诱变方法: 参照文献[9]进行。

2. 筛选方法

(1) 平板筛选

AHV^r 变异株的获得: 将处理菌液涂布于含有一定量 AHV 的 1 号培养基上, 31 $^\circ\text{C}$ 培养 2—4 天, 挑出生长的菌落, 即为 AHV^r 变异株。

AEC^r 变异株的获得: 将处理菌液涂布于含有一定量 AEC 及与 AEC 等量的 L-苏氨酸的 1 号培养基上, 31 $^\circ\text{C}$ 培养 2—4 天, 挑出生长的菌落, 即为 AEC^r 变异株。

SAM^r 变异株的获得: 将 1 号培养基中的葡萄糖改换为 5% 琥珀酸钠, 即得琥珀酸培养基 (SAM)。将处理菌液涂布于 SAM 上, 31 $^\circ\text{C}$ 培养 2—4 天, 挑出生长迅速的大菌落, 即为 SAM^r 变异株。

上述变异株菌落移至 2 号培养基斜面上, 供进一步筛选用。

(2) 液体培养

摇管初筛: 将平板筛选获得的变异株接一环于装有 5ml 4 号培养基的试管 (2.5 \times 25cm) 中, 31 $^\circ\text{C}$ 振荡培养 72h, 用纸层析法定性鉴别发酵液中的 L-苏氨酸。

摇瓶复筛: 将摇管初筛获得的 L-苏氨酸产生菌接一环于装有 20ml 4 号培养基的 500ml 三角瓶中, 31 $^\circ\text{C}$ 振荡培养 72h, 用纸层析分离、洗脱比色法定量测定 L-苏氨酸。

3. 分析方法

(1) 菌体生长: 吸取 0.2ml 样品菌液到 5ml 0.25N HCl 溶液中, 摇匀后测定 $A_{562\text{nm}}$ 值。

(2) pH: 用精密 pH 试纸测定。

(3) 葡萄糖: 斐林试剂滴定法。

(4) L-苏氨酸的定性和定量: 纸层析法^[10]。

结果与讨论

(一) 各类变异株的 L-苏氨酸生产

AHV^r 变异株: 从 XQ5121 出发, 诱变获得 AHV^r 变异株 744 株, 经摇管筛选获得 L-苏氨酸产生菌 4 株, 产量均低于 1 mg/ml。

AHV^r、AEC^r 株: 在获得 L-苏氨酸产生菌 R7-3 (AHV^r) 的基础上, 进一步诱导 AEC 抗性, 获得 AEC^r 株 631 株。其中大部分菌株的 L-苏氨酸积累有不同程度的增加, 同时还积累 L-赖氨酸。代表株 B7-8354 的摇管产酸为 2.5 mg/ml。

AHV^r、AEC^r、SAM^r 变异株: 以 B7-8354 为亲株, 诱变获得 SAM^r 变异株 175 株, 它们的摇管产酸分布如图 1 所示。最高株 C2-1261 的摇管产酸为 6.0 mg/ml。

图 2 为 L-苏氨酸产生菌 ZT-1 株的选育谱系, 图中数据是在后述的最佳发酵条

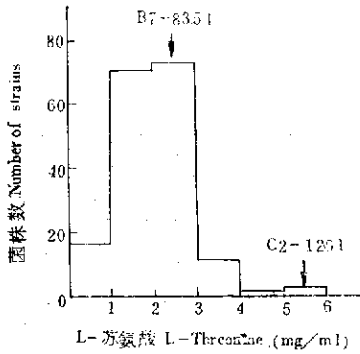


图1 来自B7-8354的175株SAM^R变异株的L-苏氨酸产量分布
Fig. 1 Distribution of L-threonine yields by 175 SAM^R mutants derived from strain B7-8354

产酸提高, 而苏氨酸、赖氨酸、蛋氨酸或异亮氨酸的添加将明显地抑制产酸(图4)。

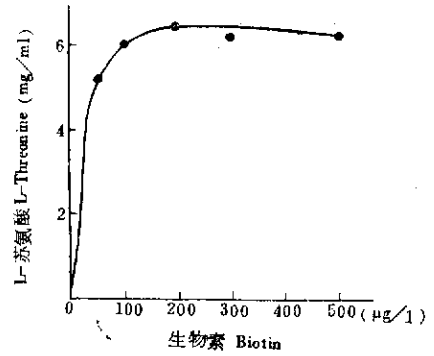


图3 生物素浓度对ZT-1菌株L-苏氨酸发酵的影响
Fig. 3 Effect of concentration of biotin on the L-threonine fermentation with strain ZT-1
将3号培养基中的生物素浓度改变, 装液量10ml/250ml三角瓶, 31℃振荡培养72h。
Concentration of biotin in medium 3 was changed, 10ml medium distributed in 250ml flask, shaken at 31℃ for 72h

菌株 Strain	L-苏氨酸 L-threonine (mg/ml)
<i>B. lactofermentum</i> XQ5121	0
↓ DES	
R7-3 (AHV ^r)	微量 Trace
↓ EMS	
B7-8354 (AHV ^r AEC ^r)	5.0
↓ EMS	
C2-1261 (AHV ^r AEC ^r SAM ^R)	15.0
↓ 单菌落分离 Single colony isolation	
ZT-1 (AHV ^r AEC ^r SAM ^R)	16.0

图2 *B. lactofermentum* L-苏氨酸产生菌选育谱系
Fig. 2 Genealogy of L-threonine producers in *B. lactofermentum*

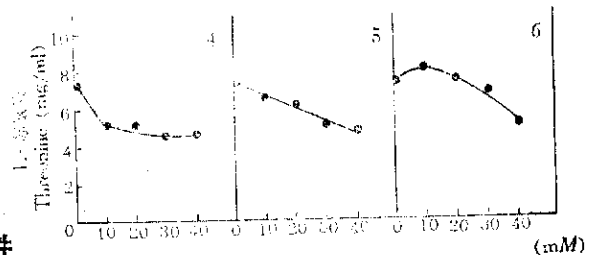
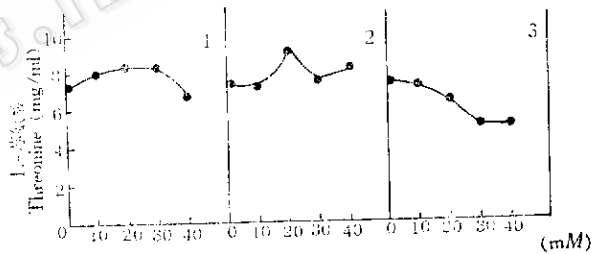


图4 天冬氨酸族氨基酸对ZT-1菌株L-苏氨酸发酵的影响
Fig. 4 Effect of amino acids of asparagus on the L-threonine fermentation with strain ZT-1
采用3号基础培养基。培养条件同图3。
The basal medium was medium 3. Cultural conditions were the same as in Fig. 3.
1. L-天门冬氨酸 L-Aspartic acid 2. L-高丝氨酸 L-Homoserine 3. L-苏氨酸 L-Threonine
4. L-赖氨酸 L-Lysine 5. L-蛋氨酸 L-Methionine 6. L-异亮氨酸 L-Isoleucine

条件下的摇瓶产酸值。
(二) ZT-1 菌株 L-苏氨酸发酵条件的研究

1. 各种营养物质对产酸的影响: 考察了生物素、天冬氨酸族氨基酸对 ZT-1 菌株 L-苏氨酸发酵的影响。结果表明, 生物素为 ZT-1 菌株生长和产酸的唯一必需因子, 缺乏, 菌体不能生长和产酸(图3)。添加前体天冬氨酸或高丝氨酸可使

表 1 ZT-1菌株L-苏氨酸发酵的最佳条件

Table 1 Optimal conditions for L-threonine fermentations with strain ZT-1

培养基 Medium	成分 Component (%) 葡萄糖 Glucose	(NH ₄) ₂ SO ₄	玉米浆 Corn steep liquor	KH ₂ PO ₄	MgSO ₄ · 7 H ₂ O	CaCO ₃	pH	其他 The others
种子培养基 Seed medium	3.0	0.5	1.0	0.10	0.05	1.0	7.0	种 龄 18h Culture for 18h
发酵培养基 Fermentation medium	12.0	3.25	2.5	0.10	0.10	4.0	7.2	装液量30ml/500ml三角 瓶, 接种量6% Volume of medium in 500 ml flask, 30ml, Volume of inoculum, 6%

2. ZT-1 菌株 L-苏氨酸发酵条件和过程: 应用正交试验法综合考察了培养基成分、种龄、接种量等多种因素对 ZT-1 菌株产酸的影响, 得到的最佳发酵条件列于表 1, 在此条件下的发酵过程示于图 5。

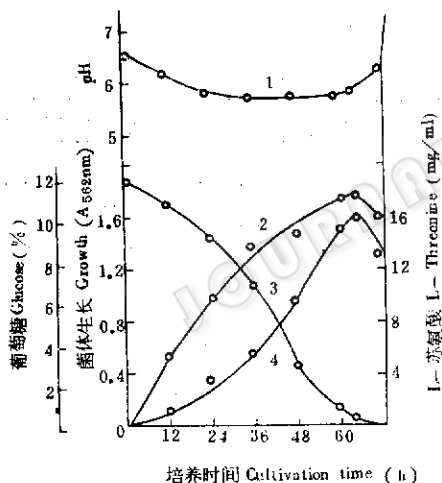


图 5 ZT-1 菌株 L-苏氨酸发酵过程
Fig. 5 Time course of L-threonine fermentation with strain ZT-1

1. pH,
2. 菌体生长 Growth,
3. 葡萄糖 Glucose, 4. L-苏氨酸 L-Threonine

(三) 关于 *B. lactofermentum*

L-苏氨酸产生菌选育机理的讨论

考察了各菌株的氨基酸积累, 结果列于表 2。由表可见通过逐步诱导后氨基酸代谢流的变动情况。首先, AHV' 变异导致 L-苏氨酸积累, 其原因在于 L-苏氨酸合成的关键酶——高丝氨酸脱氢酶对 L-苏氨

酸脱敏, 从而打开了 L-苏氨酸积累的第一道“关口”。添加 AEC' 标记的目的, 在于解除赖氨酸和苏氨酸对天冬氨酸激酶的协同抑制及赖氨酸单独的反馈抑制, 以打开 L-苏氨酸积累的第二道“关口”。从表 2 可以看到, 赋予 AHV' 株 AEC' 标记后, 氨基酸合成的代谢流明显地由谷氨酸族转向天冬氨酸族。从 AHV、AEC 双重抗性株 B7-8354 出发选育得到的 SAM' 变异株 C2-1261 及 ZT-1 株, 其谷氨酸和丙氨酸积累下降而天冬氨酸族氨基酸积累大幅度提高。根据微生物生理学知识, 分析了它的可能机制。

H. W. Doelle^[11] 指出, 所有生长在低分子量化合物如琥珀酸上的微生物有一共同特征, 即为了合成细胞物质, 它们必须经过糖原异生途径形成各种单糖 (图 6)。由于丙酮酸激酶反应是不可逆反应, 所以这条途径畅通与否就取决于 PEP 羧化酶的活性。由此推测, PEP 羧化酶活性大的菌株在琥珀酸培养基 (SAM) 上生长较快, 反之则慢。因此, 在 SAM 上生长迅速即 SAM' 变异株中, 可能筛选到 PEP 羧化酶活性显著提高的菌株。如图 7 所示, 这种菌株在以葡萄糖为碳源的培养基中, 因其羧化支路的加强而使草酰乙酸的供应增加、丙酮酸浓度及乙酰-CoA 浓度相应下降, 其结果, 一方面增加了天冬

表 2 各菌株的氨基酸积累
Table 2 Amino acids accumulated by various strains

菌株 Strain	遗传标记 Genetic marker	氨基酸积累 Amino acids accumulated (mg/ml)				
		L-谷氨酸 L-Glutamic acid	L-丙氨酸 L-Alanine	L-苏氨酸 L-Threonine	L-赖氨酸 L-Lysine	L-异亮氨酸 L-Isoleucine
XQ5121	野生型 Wild	16.3	2.5	0	0	0
R7-3	AHV ^r	12.8	3.5	微量 Trace	0	0
B7-8354	AHV ^r AEC ^r	6.8	2.0	3.5	7.0	0.8
C2-1261	AHV ^r AEC ^r SAM ^r	微量 Trace	微量 Trace	6.3	10.5	1.5
ZT-1	AHV ^r AEC ^r SAM ^r	微量 Trace	微量 Trace	8.5	8.0	1.0

采用 4 号培养基, 分装 20ml/500ml 三角瓶, 31°C 振荡 72h。

20ml medium 4 distributed in 500ml flask, shaken at 31°C for 72h.

氨酸的供应, 同时减弱了“丙酮酸→丙氨酸”及“草酰乙酸+乙酰-CoA→柠檬酸”的代谢流, 导致丙氨酸和谷氨酸积累下降及苏氨酸和赖氨酸积累同步增长。假如正是这样, 则SAM^r标记可用于所有天冬氨酸

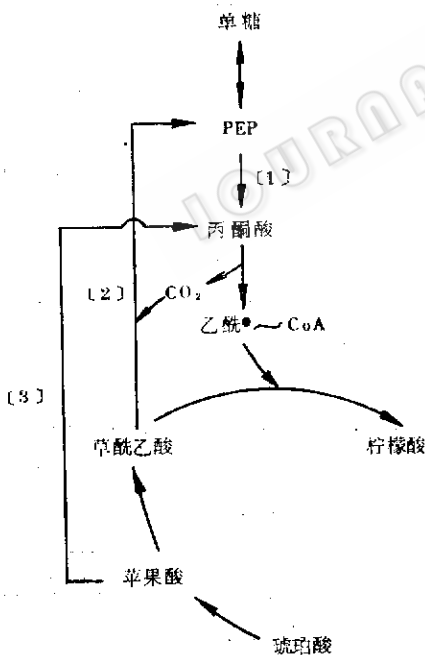


图 6 糖原生作用

Fig. 6 Glyconeogenesis

- (1) 丙酮酸激酶 Pyruvic acid kinase
(2) PEP羧化酶 Phosphoenolpyruvate carboxylase
(3) 苹果酸酶 Malic enzyme

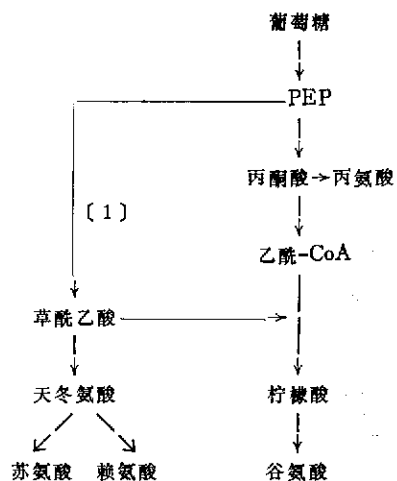


图 7 PEP羧化酶活性对L-苏氨酸生产的影响
Effect of phosphoenolpyruvate carboxylase on the L-threonine production
(1) PEP羧化酶 Phosphoenolpyruvate carboxylase

酸族氨基酸高产菌的选育。

参 考 文 献

- [1] 符文谕: 食品科学, No. 6, 1982.
- [2] 汤茂政招: 化学与工业, 21:534, 1968.
- [3] Huang, H.T., *Appl. Microbiol.*, 9:419, 1961.
- [4] Cohen, G.N. and Patte, J.C., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 28:513, 1963.
- [5] Shio, I. and Nakamori, S., *Agric. Biol. Chem.*, 33:1152, 1969.
- [6] Nakamori, S. and Shio, I., *Agric. Biol. Chem.*, 36:1209, 1972.
- [7] Tosaka, O. et al., *Agric. Biol. Chem.*, 43 (2):265, 1979.
- [8] 黄和容等: 微生物学报, 22 (3):276, 1982.
- [9] 无锡轻工业学院等: 微生物学(发酵专业), p.515, 轻工业出版社, 1980.
- [10] 张炳荣: 无锡轻工业学院硕士学位论文, 1984.
- [11] Doelle, H.W., 细菌的新陈代谢, 郭杰炎等译, p.437, 科学出版社, 1983.

THE BREEDING OF A L-THREONINE PRODUCING STRAIN FROM *BREVIBACTERIUM* *LACTOFERMENTUM*

Tan Yaohui Zhang Bingrong

(Wuxi Institute of Light Industry, Wuxi)

L-Threonine-overproducing strains were derived from *Brevibacterium lactofermentum* XQ5121, a glutamate producer, by means of mutations with diethyl sulphate (DES) and ethyl methane sulphonate (EMS). The mutants were selected directionally and stepwisely on the agar plates containing α -amino- β -hydroxy-valeric acid (AHV), S-(2-aminoethyl)-L-cysteine (AEC) respectively, and succinic acid medium (SAM) plate. A new L-threonine-overproducing strain ZT-1 (resisting to both AHV and AEC, and growing quickly on SAM) obtained thereof can accumulate 16mg/ml L-threonine in a medium containing 12% glucose under suitable conditions. Apparently mutants capable of fast growth on SAM were able to produce higher-amounts of L-threonine.

Based on the above results, the mechanism of the breeding of L-threonine-producing strains from *B.lactofermentum* are discussed.

Key words

L-Threonine; succinic acid medium (SAM)