

# 多重抗性突变株 L-缬氨酸发酵\*

王秀岭 屈明波 黄和容

(中国科学院微生物研究所,北京)

**摘要** 以北京棒状杆菌 (*Corynebacterium pectinense*) 产 L-缬氨酸突变株 334(Ile<sup>-</sup>,  $\alpha$ -AB<sup>R</sup>) 为亲株,经 MNNG 一次诱变,获得多重抗性突变株 VT-405 (Ile<sup>-</sup>,  $\alpha$ -AB<sup>R</sup>, 2-TA<sup>R</sup>, NL<sup>R</sup>, NV<sup>R</sup>)及其单菌落分离株 125,产酸达 28mg/ml。VT-405 再经紫外线和 LiCl 复合处理,获 A<sub>1</sub> 菌株。A<sub>1</sub> 保留其亲株的遗传特性,未再增加新的标记,产酸为 30mg/ml。通过 2.6L 自控罐发酵试验,证明 L-缬氨酸发酵属发酵动力学 II 型。采用适宜的供氧和 pH 控制,进行补料分批发酵,平均产酸率高达 36.78g/L。

**关键词** 多重抗性; L-缬氨酸发酵;补料分批发酵

L-缬氨酸属分支链氨基酸之一,系人体必需氨基酸,具有多种生理功能。主要用以配制复合氨基酸输液,合成多肽药物和食品抗氧化剂等。世界年产量已达 200 吨。我们选育的第一代 L-缬氨酸生产菌北京棒状杆菌突变株 AS 1.586<sup>[1]</sup> 于 70 年代通过中试技术鉴定已在国内推广应用。随着社会对氨基酸需求量的增长,该菌产酸水平已不适应生产要求。为此,我们进行第二代高产菌种选育和 L-缬氨酸发酵研究。新菌株产酸水平已达 35mg/ml 以上,现将试验结果报告于下。

## 材料与方 法

### (一) 菌种

北京棒状杆菌 (*Corynebacterium pectinense*) 产 L-缬氨酸的突变株 334(Ile<sup>-</sup>,  $\alpha$ -AB<sup>R</sup>),本所氨基酸研究小组选育。

### (二) 培养基

1. 普通肉汁胨加 2% 葡萄糖和 0.3% 酵母膏的斜面培养基。

2. 基础培养基(%):葡萄糖 2.0, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.2, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.1, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.04, FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.002, MnSO<sub>4</sub> · 4H<sub>2</sub>O 0.002, 生物素 3  $\mu$ g, VB<sub>1</sub> 20  $\mu$ g, pH7.0。

3. 种子培养基(%): 葡萄糖 2.0, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.2, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.1, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.04, 尿

素 0.05, 玉米浆 1.5, pH7.0。

4. 筛选培养基(%): 葡萄糖 12—14, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3.0, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.15, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.05, FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.002, MnSO<sub>4</sub> · 4H<sub>2</sub>O 0.002, 玉米浆 1.5, CaCO<sub>3</sub> 2.5, pH6.8

### (三) 结构类似物

$\alpha$ -AB ( $\alpha$ -氨基丁酸)、2-TA (2-噻唑丙氨酸)均为美国 Sigma 公司出品; NL (正亮氨酸)和 NV (正缬氨酸)均为匈牙利 Rearal 公司出品。

### (四) 分析方法

1. 还原糖测定: 3,5-二硝基水杨酸法<sup>[2]</sup>。

2. 菌体浓度测定: 发酵液经适度稀释,于 72 型分光光度计测定吸光度 A<sub>620nm</sub> 值。若发酵液中存在 CaCO<sub>3</sub>, 则加适量稀盐酸溶解后,再稀释测定。

3. pH 值测定: 采用国产精密 pH 试纸测定。

4. L-缬氨酸定量: 纸上层析分离,比色定量。

5. 氨基酸缺陷型对结构类似物敏感性及其抗性测定,采用生长图谱法。

### (五) 发酵设备

日本 L. E. Marubishi 公司生产的台式 2.6L 自控玻璃发酵罐和美国 New Brunswick

\* 本工作系“七五”攻关的部分研究内容

公司生产的 16L 自控不锈钢发酵罐。发酵液溶解氧饱和度由溶氧电极自动指示并记录, 温度自动控制并记录, 发酵过程 pH 值由 pH 电极自动显示和记录, 并可自动流加酸碱进行控制。

## 结果与讨论

### (一) 高产菌株选育

以北京棒状杆菌突变株 334 为出发菌株, 采用常规诱变方法<sup>[3]</sup>选育多重抗性高产 L-缬氨酸突变株。

1. 突变株 334 遗传标记检测结果, 该菌系不严格的异亮氨酸缺陷型和  $\alpha$ -AB 抗性株, 但对 2-TA、NL、NV 等结构类似物十分敏感, 生长受到强烈抑制。试验证明这种抑制又为缬氨酸和亮氨酸所减弱生长得到恢复, 其遗传标记为  $Ile^-$ 、 $\alpha$ -AB<sup>R</sup>、2-TA<sup>S</sup>、NL<sup>S</sup>、NV<sup>S</sup>。

2. 多重抗性突变株获得: 已知菌株 334 对 2-TA、NL、NV 均十分敏感, 再选育这三种结构类似物的抗性突变株, 进一步解除末端产物缬氨酸、亮氨酸的反馈调节, 有可能达到多量积累 L-缬氨酸的目的<sup>[4,5]</sup>。采用常规 MNNG 处理菌株 334 细胞, 经缓冲液洗涤后的细胞分别涂布于含有不同结构类似物的平板上, 30℃ 培养 4—5 天后, 挑取生长菌落。

由一次诱变结果, 获得 2-TA<sup>R</sup> 计 500 余株, NL<sup>R</sup> 和 NV<sup>R</sup> 共计 40 株。对所得的 NL<sup>R</sup> 和 NV<sup>R</sup> 及部分 2-TA<sup>R</sup> 突变株重新检测其对结构类似物敏感性时, 发现一个有趣的现象, 即不论 NL<sup>R</sup> 或 NV<sup>R</sup> 突变株对这两种结构类似物均已脱敏, 且对 2-TA 的敏感程度也大大下降。所有 2-TA<sup>R</sup> 突变株均具有 NL 和 NV 的抗性。因此一次诱变后即获得多重抗性的突变株。

3. L-缬氨酸高产菌株筛选: 由 600 多株突变株中选得 30 株产酸量高于亲株 334。它们均属于 2-TA<sup>R</sup> 兼得 NL<sup>R</sup> 和 NV<sup>R</sup> 的突变株。复筛选优得 VT-405 等 4 株突变株, 产酸在 28 mg/ml, 由 VT-405 经自然分离筛选的稳定高产菌株 125。VT-405 再经紫外线和 LiCl 复合处理<sup>[3]</sup>, 所得子代菌株经发酵筛选, 菌株 A<sub>7</sub> 产酸为 30mg/ml。通过遗传标记检测, 突变株

VT-405、125、A<sub>7</sub> 均保留亲株 334 的  $Ile^-$ 、 $\alpha$ -AB<sup>R</sup> 的特性, 同时又增加多重抗性, 它们与亲株之间差异如表 1 所示。

表 1 突变株与亲株遗传标记和产酸比较

菌株	遗传标记	L-缬氨酸 (mg/ml)
334	$Ile^-$ 、 $\alpha$ -AB <sup>R</sup> 、2-TA <sup>S</sup> 、NL <sup>S</sup> 、NV <sup>S</sup>	20
VT-405	$Ile^-$ 、 $\alpha$ -AB <sup>R</sup> 、2-TA <sup>R</sup> 、NL <sup>R</sup> 、NV <sup>R</sup>	28
A <sub>7</sub>	$Ile^-$ 、 $\alpha$ -AB <sup>R</sup> 、2-TA <sup>R</sup> 、NL <sup>R</sup> 、NV <sup>R</sup>	30

选育结果表明, 突变株 VT-405、A<sub>7</sub> 较亲株增加了对噻唑丙氨酸、正亮氨酸、正缬氨酸的抗性, 进一步解除终产物的反馈调节, 使产酸量明显的提高。而紫外线和 LiCl 处理后, 未增加新的遗传标记、产酸量基本相同, 认为其反馈调节解除的程度可能大致相同。

突变株选育谱系如图 1。

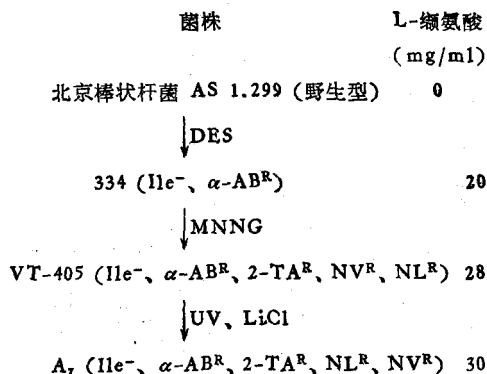


图 1 北京棒状杆菌 L-缬氨酸高产菌株选育谱系

菌株的发酵稳定性在以后的生化工程学连续培养研究中加以考察。

### (二) 缬氨酸发酵试验

#### 1. 摇瓶发酵试验:

##### (1) 按 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) 正交试验考察各种营养因

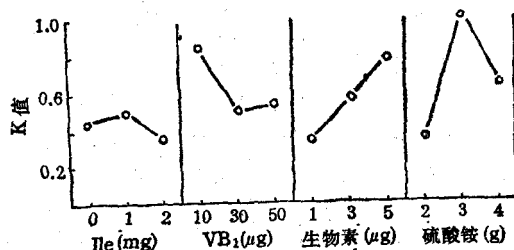


图 2 按正交试验 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) 综合考察各营养因素对突变株 125L-缬氨酸发酵影响

表2 综合考察各营养因素对突变株 125L-缬氨酸发酵影响

因素	异亮氨酸 (mg)	硫胺素 (μg)	生物素 (μg)	硫酸铵 (g)
水平	0	10	1	2
	1	20	3	3
	2.5	50	5	4
I	2.45	2.83	2.34	2.35
II	2.50	2.50	2.56	3.01
III	2.37	2.53	2.78	2.64
R	0.13	0.33	0.44	0.66
因素主次	4	3	2	1
好水平	1	10	5	3.0

培养基基础成份(%): 葡萄糖 12,  $K_2HPO_4$  0.1,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.04,  $MnSO_4 \cdot 4H_2O$  0.002,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  0.002,  $CaCO_3$  2.5, pH7.0。

素对 L-缬氨酸发酵影响,结果列于表 2,图 2。

综合最适发酵培养基组成进行摇瓶发酵,产酸达 31.9mg/ml。

(2) 末端产物氨基酸对突变株积累 L-缬氨酸的影响,结果见表 3。

表3 缬氨酸和亮氨酸对突变株积累 L-缬氨酸的影响

菌株	氨基酸 (0.5mg/ml)	发酵终 pH	生长吸光度 ( $A \times 10$ )	L-缬氨酸 mg/ml
125	*对照组	8.2	1.10	30.7
	亮氨酸	8.2	1.18	32.9
	缬氨酸	8.2	1.12	33.7
A <sub>1</sub>	*对照组	7.4	1.18	32.6
	亮氨酸	8.2	1.18	32.3
	缬氨酸	7.5	1.14	31.3

\* 仅加异亮氨酸,添加量为 10μg/ml

试验结果指出,基质中多量的缬氨酸和亮氨酸存在并未影响突变株 125、A<sub>1</sub> 合成 L-缬氨酸的能力,说明具有 2-TA 等多重抗性突变株 125、A<sub>1</sub> 其生物合成缬氨酸的关键酶——乙酰乳酸合成酶 (AlSase) 对此两种末端产物氨基酸的反馈调节已不太敏感,因而突变株能够合成大量的缬氨酸<sup>[4]</sup>。

2. 台式 2.6L 自控罐缬氨酸发酵: 从生化

工程学研究,认为 L-缬氨酸发酵属于发酵动力学 II 型。根据 II 型发酵控制的特点,前期主要创造适宜菌体生长和中后期控制有利于产酸的外部条件,诸如提供充足的营养原料,维持合适的 pH 环境以及适宜的供氧<sup>[8,9]</sup>等等。该文<sup>[7]</sup>又比较了传统的分批发酵与补料分批发酵在总糖量基本相同的条件下产酸情况,结果表明分批补料发酵大大优于传统的分批发酵,产酸量由分批发酵的 31.4g/L 提高到 38.2g/L;转化率由 17.67% 提高到 22.67%,且发酵周期缩短了 32 小时。该分批补料发酵是采用适宜的恒速补料方式进行的,对于目前国内生产工厂尚不适用。根据工厂现有设备情况,我们进行了分批间歇补料发酵试验。结果列于表 4。

采用分批间歇补料方式进行 L-缬氨酸发酵,突变株 A<sub>1</sub> 的产酸能力同样地得到充分的发挥,平均产酸率达 36.87g/L,最高达 41g/L,与文献报道的高产酸水平相同<sup>[4]</sup>。其发酵过程如图 3 所示。

表4 分批间歇补料 L-缬氨酸发酵

初糖量%	L-缬氨酸 (g/L)	发酵周期 (h)
9.0	41.0	68
	40.0	79
	32.9	62
7.0	35.3	63
	35.0	64
	36.9	66
	37.0	44

3. 台式 16L 发酵罐 L-缬氨酸发酵试验: 由 2.6L 自控罐上分批间歇补料试验证明可以达到提高转化率和高产酸率的目的。在 16L 发酵罐上又进行了适量提高初糖浓度,一次补料方式 L-缬氨酸发酵试验。其过程见图 4 所示。

试验结果指出,采用一次补料分批发酵,突变株 A<sub>1</sub> 产酸也达到 31.4g/L 水平。本研究证明选育的多重抗性突变株 125、A<sub>1</sub> 是优良的产 L-缬氨酸菌株,可以应用于 L-缬氨酸发酵生产。

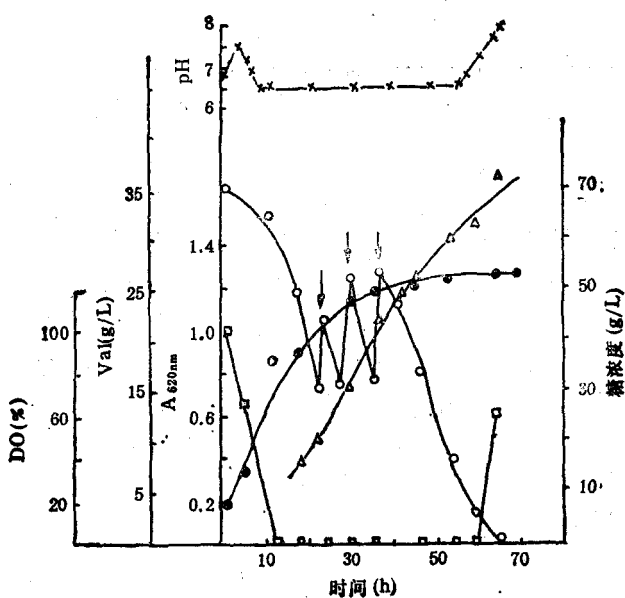


图3 突变株 A<sub>1</sub> 分批间歇补料 L-缬氨酸发酵过程 (2.6L 自控发酵罐)

× pH; Δ Val; ○ 糖浓度; □ DO; ● 生长

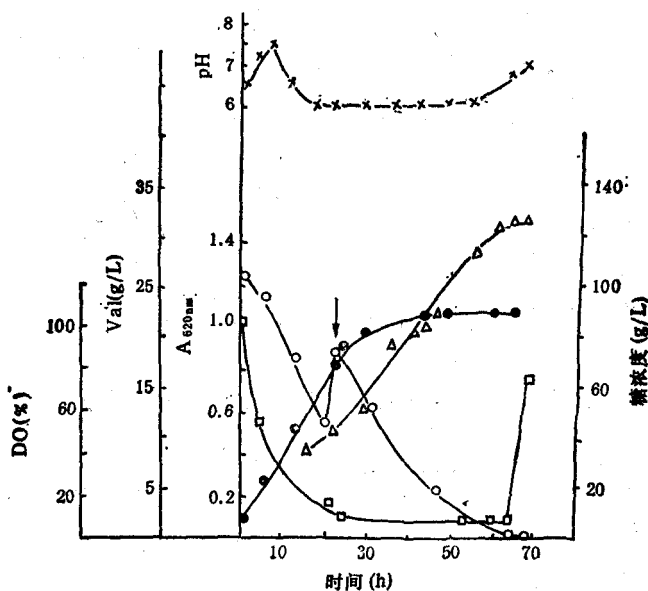


图4 突变株 A<sub>1</sub> 分批补料 L-缬氨酸发酵过程 (16L 台式自控发酵罐)

× pH; Δ Val; ○ 糖浓度; □ DO; ● 生长

### 参 考 文 献

1. 中国科学院微生物研究所氨基酸组: 微生物学报, 15(4): 325, 1975.
2. Sumner JB: *J. Biol. Chem.*, 63: 393, 1925.
3. 《微生物诱变育种》编写组: 《微生物诱变育种》科学出版社, 21页, 1973.
4. Tsuchida T et al.: *Agri. Biol. Chem.*, 39(6) 1319, 1973.
5. Izumi Y et al.: *J. Ferment. Technol.*, 55(5): 452, 1977.
6. 土田隆康: 发酵と工业, 41(4): 311, 1983.
7. 屈明波等: 生物工程学报, 待发表.
8. Akashi K et al.: *J. Ferment. Technol.*, 55(4): 364, 1977.
9. Yano T et al.: *J. Ferment. Technol.*, 57(2): 91, 1979.