

产 L-谷氨酸细菌 AS1.542 菌株的研究

II. 钝齿棒状杆菌 (*Corynebacterium crenatum*)

AS1.542 的生长必需因子与 积累 L-谷氨酸的关系

陈 琦 李 玲 阁

(中国科学院微生物研究所, 北京)

钝齿棒状杆菌 AS1.542 要求生物素作为必需生长因子。在含有生物素的培养基中加入硫胺素、无维生素酪素水解物明显地促进菌体生长; 而叶酸和维生素 B_{12} 则抑制菌体生长。运用正交试验法研究了生物素、硫胺素和无维生素酪素水解物对 AS1.542 菌积累 L-谷氨酸的影响。在合成培养基上三者用量分别为 2 微克/升、150 微克/升和 0.5% 时, L-谷氨酸产量达 38 毫克/毫升。

我们曾报告了从我国广州某酿酒厂分离到的一株产 L-谷氨酸细菌的分类鉴定结果^[1], 证明是一个新种, 命名为钝齿棒状杆菌 AS1.542 (*Corynebacterium crenatum* n. sp.), 本文报告该菌的生长因子与积累 L-谷氨酸的关系。

材料与方法

菌种 钝齿棒状杆菌 AS1.542, 试验时采用在 30℃ 于普通牛肉汁琼脂斜面上培养 24 小时的新鲜培养物。

生长因子的测定 采用生长图形法^[2]测定 AS1.542 菌的生长因子。基础培养基组成 (%) 为: 葡萄糖 1.0, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 0.1, KH_2PO_4 0.05, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.04, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.002, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.002, 水洗琼脂 1.5。蒸馏水定容。pH 7.0—7.2。8 磅 30 分钟灭菌。测定时将 AS1.542 菌的新鲜培养物以生理盐水制成悬液, 离心, 将菌体洗涤 3 次。然后取 1 毫升加入预先溶化并冷至 45℃ 的 20 毫升基础培养基内, 混合均匀, 倒平板。然后取直径 0.5 厘米的无菌滤纸片, 分别浸以乙族维生素混合液以及“减一”维生素混合液, 贴在混

有 AS1.542 菌体的平板上。30℃ 下培养 24—48 小时, 记录滤纸片周围菌体生长情况。

L-谷氨酸发酵试验 发酵基础培养基组成 (%) 为: 葡萄糖 10, K_2HPO_4 0.1, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.002, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.002, 尿素 1—1.4 (分别灭菌, 接种时加入), 蒸馏水。pH 7.0。分装 500 毫升三角瓶, 每瓶 20 毫升。8 磅 30 分钟灭菌。种子培养基组成 (%) 为: 葡萄糖 3.0, 尿素 0.5, K_2HPO_4 0.1, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.04, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.002, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.002, 玉米浆 0.8, 蒸馏水。pH 7.0。分装 200 毫升三角瓶, 每瓶 25 毫升。8 磅灭菌 15 分钟。

取一接种环斜面菌种接入种子培养基内, 置摇床上振荡培养 12 小时。然后离心, 并以生理盐水洗涤菌体 3 次, 再调成菌悬液, 按 2% 接入发酵瓶。30℃ 下振荡培养 48 小时。

发酵液中 L-谷氨酸的定量测定 采用大肠杆菌 L-谷氨酸脱羧酶法。

菌体生长量的测定 将发酵液稀释 25 倍后, 于 72 型分光光度计上, 在波长 620 毫微米, 光程 1 厘米测定光密度, 以其读数示菌体生长量。

本文于 1975 年 5 月 14 日收到。

结果与讨论

一、AS1.542 的生长因子

以生长图形法测定了乙族维生素、无维生素酪素水解物、核酸碱基对 AS1.542 菌生长的影响。从表 1 结果看出：该菌在

表 1 AS1.542 菌的生长因子

培养基编号	营 养 物 组 合	生长与否
1	M	—
2	M+A	—
3	M+B	—
4	M+V	+
5	M+V+A	+
6	M+V+B	+
7	M+A+B	—
8	M+V+A+B	+

注 1. —：不生长；+：生长。

2. M：基础培养基。

3. V：10 种维生素混合液（微克/毫升）盐酸硫胺素 100，核黄素 100，菸酸 100，泛酸钙 100，吡哆素 100，生物素 60，叶酸 100，对氨基苯甲酸 100，维生素 B₁₂ 100，肌醇 700。

4. A：0.5% 无维生素酪素水解物。

5. B：示核酸碱基混合液（毫克/毫升）腺嘌呤 1，鸟嘌呤 1，黄嘌呤 1，胞嘧啶 1，胸腺嘧啶 1，尿嘧啶 1，次黄嘌呤 1。

表 2 AS1.542 菌对维生素的要求

序 号	维 生 素 混 合 液	生长与否
1	M	—
2	V-硫胺素	+
3	V-菸酸	+
4	V-核黄素	+
5	V-泛酸钙	+
6	V-吡哆素	+
7	V-生物素	—
8	V-叶酸	+
9	V-对氨基苯甲酸	+
10	V-肌醇	+
11	V-B ₁₂	+
12	V	+

注 1. +：生长；—：不生长。

2. V：10 种维生素混合液，浓度见表 1 注 3。

3. V-后的维生素即从 10 种维生素中抽去的一种。

4. M：基础培养基。

含有乙族维生素混合液的任何试验组合内均生长良好；在基础培养基及其它无维生素的试验组内均不生长。表 2 的结果证明生物素是 AS1.542 的必需生长因子。

在基础培养基内加入 2 微克/升生物素的条件下，又试验了其它 9 种维生素和 10 种无维生素酪素水解物对 AS1.542 菌的生长影响，结果如图 1 所示，硫胺素和无维生素酪素水解物明显的促进生长，而叶酸和

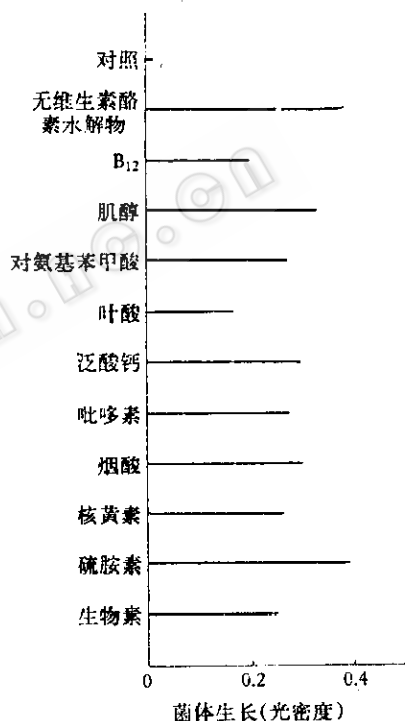


图 1 乙族维生素和 10 种无维生素酪素水解物对 AS1.542 菌生长的影响

注 1. 基础培养基组成 (%)：葡萄糖 5.0，(NH₄)₂HPO₄ 0.5，KH₂PO₄ 0.05，MgSO₄·7H₂O 0.04，FeSO₄·7H₂O 0.0002，MnSO₄·H₂O 0.0002，生物素 2 微克/升，蒸馏水。pH 7.0。分装 200 毫升三角瓶，每瓶 20 毫升。8 磅 15 分钟灭菌。

2. 维生素浓度 (微克/升)：除肌醇 500，B₁₂ 20，无维生素酪素水解物 0.5% 外，其它维生素均为 100。

3. 接种前将菌体细胞用生理盐水洗三次，种量为 2%。

4. 30℃ 下振荡培养 24 小时后，稀释 10 倍测定菌体生长。

维生素 B₁₂ 则有抑制作用。

二、生物素、硫胺素及无维生素酪素水解物对 AS1.542 菌产 L-谷氨酸的影响

生物素是控制 L-谷氨酸积累量高低的重要因素,这已为许多研究报告所证实。在 AS1.542 菌中同样发现生物素和 L-谷

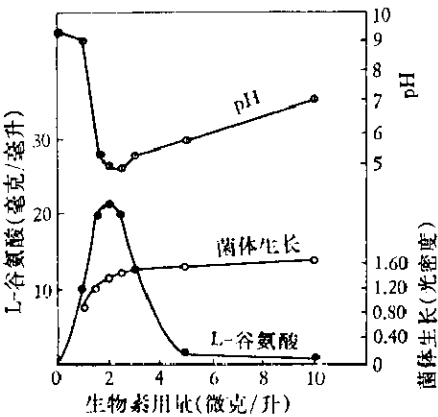


图2 生物素用量与 L-谷氨酸积累的关系

表3 试验因素与水平

因素	A	B	C
水平	生物素 (微克/升)	硫胺素 (微克/升)	无维生素酪素水解物 (%)
1	1.0	0	0
2	2.0	50	0.1
3	3.0	150	0.3
4	4.0	300	0.5

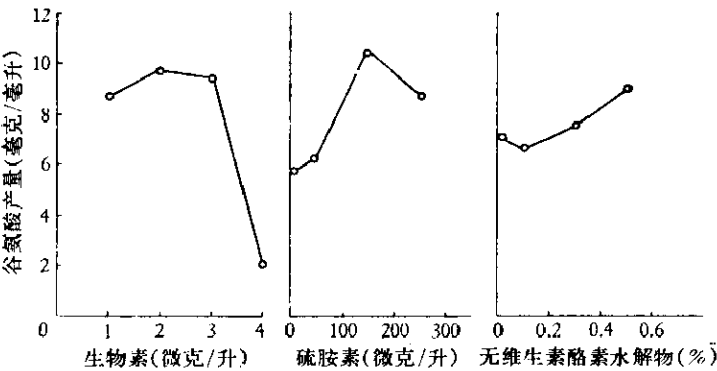


图3 生物素、硫胺素和无维生素酪素水解物同 L-谷氨酸产量的关系
注：发酵过程中未流加尿素。

表4 试验结果

列号 试验	A	B	C	谷氨酸量 (毫克/毫升)
1	1	1	1	4.5
2	1	2	2	5.0
3	1	3	3	13.0
4	1	4	4	13.1
5	2	1	2	9.0
6	2	2	1	8.0
7	2	3	4	12.4
8	2	4	3	9.5
9	3	1	3	6.7
10	3	2	4	8.0
11	3	3	1	13.2
12	3	4	2	9.5
13	4	1	4	2.5
14	4	2	3	1.8
15	4	3	2	3.0
16	4	4	1	2.6
K ₁	35.6	22.7	28.3	
K ₂	38.9	24.8	26.5	
K ₃	37.4	41.6	31.0	
K ₄	7.9	34.7	36.0	
k ₁	8.9	5.7	7.1	
k ₂	9.7	6.2	6.6	
k ₃	9.4	10.4	7.75	
k ₄	2.0	8.7	9.0	
R	7.7	5.7	2.4	

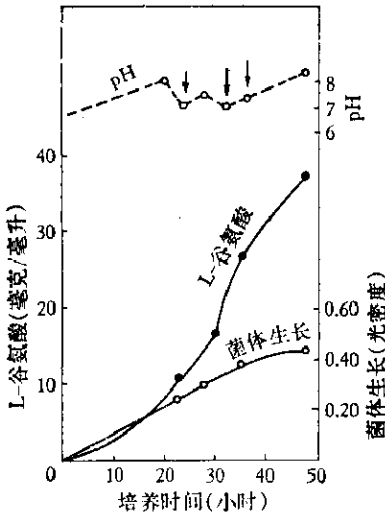


图4 按图3的适宜条件和流加尿素对谷氨酸产量的影响

氨酸产量之间具有密切关系(图2)。为了弄清对生长有促进作用的硫胺素和无维生素酪素水解物与 L-谷氨酸产量之间的关系,我们运用正交表按排试验进行了研究。试验取 3 个因素、4 个水平(表 3),选用了 $L_{16}(4^3)$ 正交表,实验结果见表 4。

根据试验结果采用直观分析,作出因素和指标(L-谷氨酸产量)关系图,如图 3。

按图 3 选定的适宜条件,同时配合流加尿素,发酵 48 小时后 L-谷氨酸产量达 38 毫克/毫升(图 4)。

结 语

钝齿棒杆菌 AS1.542 要求生物素作为必需生长因子,生物素浓度左右着谷氨酸产量的高低。但是,菌体最大生长所需生物素的适宜浓度不利于谷氨酸的积累。一

般言之,只有当生物素在所谓“亚适量”时,才可达到大量积累 L-谷氨酸的目的。近年来一些报告指出生物素的用量大小不仅与代谢控制有关,而且有改变细胞透性的作用。

然而,值得指出的是生物素用量不是绝对不变的,它会随着培养基中其它成分的变化,适宜用量亦有波动。我们的研究结果证明在有生物素存在的条件下,加入硫胺素和无维生素酪素水解物有调节菌体生长和稳定谷氨酸产量的作用。

参 考 资 料

- [1] 陈琦、李玲阁:微生物学报, 15: 119—124, 1975。
- [2] 方心芳:应用微生物学实验法, 209—211 页,财经出版社, 1962。

STUDIES ON L-GLUTAMIC ACID PRODUCING BACTERIA AS 1.542

II. GROWTH FACTORS OF *CORYNEBACTERIUM CRENATUM* AND THEIR EFFECTS ON THE ACCUMULATION OF L-GLUTAMIC ACID

Chen Qi, Li Lingge

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

Corynebacterium crenatum required biotin as a growth factor, further addition of thiamine or vitamin-free casein hydrolysate promoted bacterial growth, while folic acid and vitamin B_{12} inhibited growth.

The effects of these growth factors

on the accumulation of L-glutamic acid has been studied with orthogonal array method. In a synthetic medium containing biotin 2 $\mu\text{g/l}$, thiamine 150 $\mu\text{g/l}$, and vitamin-free casein hydrolysate 0.5%, the yield of L-glutamic acid amounts to 38 mg/ml.