

## 产 L-白氨酸突变株的选育及发酵条件的研究

张素鑫 陆德如 苑兰翠 陈 琦

(中国科学院微生物研究所, 北京)

钝齿棒状杆菌 (*Corynebacterium crenatum*) AS 1.542 经亚硝基胍连续诱变处理, 选育出产大量 L-白氨酸的突变株 AS 1.1004。

该菌以生物素为必需生长因子, 酪蛋白水解物对生长有促进作用。当培养基中含生物素 5—50 微克/升时, L-白氨酸的积累随生物素含量增加而提高; 葡萄糖和醋酸铵是大量产生 L-白氨酸的最适碳源和氮源。在含葡萄糖 10%, 硫酸铵 2%, 醋酸铵 2%,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1%,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.04%,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  2 毫克/升,  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  2 毫克/升, 生物素 50 微克/升, 硫胺素·HCl 300 微克/升, 蛋白胨 0.3%, 酵母膏 0.3%,  $\text{CaCO}_3$  2%, pH7.0 的培养基中, 于旋转式摇床上, 28℃ 培养 4 天, 产 L-白氨酸 14 毫克/毫升以上。

用强酸性阳离子交换树脂 ( $\text{H}^+$ 型) 提取的产品, 经红外吸收光谱, 薄层色谱, 比旋光度, 元素分析和生物测定法检定, 证明该产品系 L-白氨酸。

L-白氨酸是人体必需氨基酸之一, 在医药上是复合结晶氨基酸静脉注射液的成份。L-白氨酸可由蛋白质水解液分离得到, 但收率低、价格高。因此, 近年来利用微生物发酵法生产 L-白氨酸的研究引起了人们的重视。

Calvo 和 Calvo<sup>[1]</sup> 从鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*) 中得到了抗 3-氟白氨酸的产白氨酸突变株。Araki 等<sup>[2]</sup> 选育出的谷氨酸棒状杆菌 (*Corynebacterium glutamicum*) 的苯丙氨酸缺陷型和 Kisumi 等<sup>[3]</sup> 研究的粘质赛氏杆菌 (*Serratia marcescens*) 的抗  $\alpha$ -氨基丁酸的异白氨酸回复突变株, 在培养液中均积累相当量的 L-白氨酸。近来 Tsuchida 等<sup>[4]</sup> 由乳酸发酵短杆菌 (*Brevibacterium lactofermentum* 2256) 的异白氨酸和蛋氨酸双重缺陷型, 诱变出的抗 2-噻唑丙氨酸突变株也能产生大量的 L-白氨酸。

我们将谷氨酸产生菌钝齿棒状杆菌 AS 1.542<sup>[5]</sup> 用 N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基

胍 (简称亚硝基胍或 NTG) 连续诱变处理, 得到了以葡萄糖为原料直接发酵产生 L-白氨酸的突变株 AS 1.1004。

本文报道 L-白氨酸产生菌 AS 1.1004 的选育, 营养要求, 发酵条件和发酵产物的提取与鉴定结果。

### 材料与方法

#### (一) 菌种

1. 出发菌株: 钝齿棒状杆菌 AS 1.542。

2. L-白氨酸产生菌: AS 1.542 菌经亚硝基胍连续诱变处理得到的产 L-白氨酸突变株 AS 1.1004。

3. L-白氨酸生物测定指示菌株: 白氨酸缺陷型突变株 No. 33\*。

#### (二) 培养基

见表 1。

#### (三) 方法

1. 诱变方法: 取生长 18 小时的 AS 1.542 斜面培养物一环, 接入装有 3 毫升完全培养液的试

本文于 1978 年 5 月 29 日收到。

\* No. 33 是一株未经鉴定的可利用液体石蜡的细菌。

表 1 培养基组成

组分 (%)	变异用培养基(%)		种子 培养基 (%)	发酵培养基	
名称	基础培 养基	完全培 养基		筛选培养 基(%)	基础发酵 培养基 (%)
葡萄糖	2		3	10	10
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.2				
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.1	0.1		0.1	0.1
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>		0.1			
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.04	0.05		0.04	0.04
MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0.0002			0.0002	0.0002
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.0002			0.0002	0.0002
生物素	2 微克			5 微克	5 微克
硫胺素·HCl	20 微克			30 微克	30 微克
尿素			0.5		
玉米浆			0.8		
豆饼水解液			0.8		
黑废液				0.5	
硫酸铵				4	2
醋酸铵					2
碳酸钙				5	2
蛋白胨		1.0			0.3
酵母膏		0.5			0.3
氯化钠		0.5			
牛肉汁		定容			
琼脂	2	2			
除白氨酸外 18 种氨基酸每种加	20 微克/ 毫升				
pH	7.0	7.0	7.2	7.2	7.2

管中,置迴旋式摇床。(偏心距 2.5 厘米,180 转/分)上,于 28℃ 培养 18 小时,取菌液 1 毫升离心收集菌体,并以 pH 7.0 的 Tris-maleate 缓冲液洗涤两次,再悬浮于 4.5 毫升浓度为 1 毫克/毫升亚硝基胍的 pH 7.0 的 Tris-maleate 缓冲液中,置迴旋式摇床于 28℃ 处理 20 分钟。处理后的菌液经离心除去亚硝基胍溶液,并用完全培养液洗涤两次,适当稀释后,取 0.1 毫升菌悬液涂布于完全培养基固体平板上,28℃ 培养 2—3 天,按下述影印复制法挑选产白氨酸的突变株。

2. 筛选方法: 白氨酸产生菌的初筛是用白氨酸营养缺陷型 No. 33 菌作指示菌,其方法是于补加有除白氨酸以外的 18 种氨基酸的基础培养基中,混入白氨酸营养缺陷型 No. 33 的菌悬液并制成平板。然后将诱变后在完全培养基平板上生长好的菌落,以影印复制法接种到已混有指示菌的

基础培养基平板上,经 24 小时培养后,凡分泌白氨酸的菌落,在其周围显示一指示菌生长谱,挑选生长谱最大的菌落转接到牛肉汁斜面上做进一步发酵试验用。

白氨酸产生菌的发酵筛选: 将初筛得到的能分泌白氨酸的菌落,移植到普通牛肉汁琼脂斜面上,28℃ 温箱培养 24 小时,取一环接入装有 15 毫升发酵筛选培养基的 250 毫升三角瓶中,置迴旋摇床于 28℃ 培养 4 天,测定 L-白氨酸的累积量。

3. 发酵培养方法: 将选出的 AS 1.1004 菌斜面培养 24 小时后取一环接入装有 15 毫升种子培养基的 250 毫升三角瓶中,置迴旋式摇床上,28℃ 培养 18 或 24 小时,接 5% 接种量接入装有 25 毫升基础发酵培养基的 500 毫升三角瓶中,置迴旋式摇床上于 28℃ 培养 4 天,测定 L-白氨酸的含量。

4. 分析方法: 菌体生长量的测定: 取发酵液 0.5 毫升加入 1N HCl 1 毫升以溶解碳酸钙,再加蒸馏水至 10 毫升,摇匀后用 72 型分光光度计,光程 1 厘米,波长 620 毫微米测定其光密度,表示菌体生长量。

pH 测定: 用 5.5—9.0 精密 pH 试纸测定。

L-白氨酸定量测定: 以纸上色谱法分离白氨酸,溶剂系统为正丁醇:冰醋酸:水 = 4:1:2,显色剂用 0.05% 的茚三酮丙酮溶液,显色温度 75℃,剪下白氨酸斑点用氰化钾-茚三酮-乙二醇甲醚显色后,用 72 型分光光度计,波长 580 毫微米,光程 0.5 厘米,所得光密度与 L-白氨酸标准样品比较,计算发酵液中的 L-白氨酸产量<sup>[4]</sup>。

## 结 果

### 一、白氨酸产生菌的选育

用指示菌法测定了从谷氨酸产生菌钝齿棒状杆菌 AS 1.542 诱变出的约 2000 个菌株,其中有 0.3% 的菌落能分泌 L-白氨酸。选择产酸较好的 L5-12 菌用亚硝基胍再次处理,挑出 300 株菌,通过发酵试验结果表明产酸在 5—10 毫克/毫升的菌株有 69 株,10 毫克/毫升以上的有 36 株。其中产 L-白氨酸能力最高的是 L289,产酸在

13 毫克/毫升左右。然后将突变株 L289 进行单菌分离,筛选出的 L289-28 菌(现编号为 AS 1.1004)产 L-白氨酸在 14.0 毫克/毫升左右。继后再用亚硝基胍对 L289-28 菌进行诱变处理,在挑出的 92 株菌中有 13 株产 L-白氨酸在 15.0 毫克/毫升以上,菌种谱系见图 1。

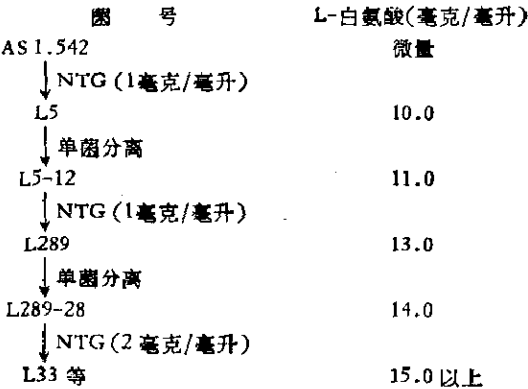


图 1 产 L-白氨酸菌种谱系

二、L-白氨酸产生菌的营养要求

已知钝齿棒状杆菌 AS 1.542 要求生物素为其生长必需因子<sup>[7]</sup>。为选择适宜的产 L-白氨酸发酵培养基,测定出从 AS 1.542 诱变出的突变株 AS 1.1004 菌的营养要求是十分必要的。为此采用生长图谱法<sup>[8]</sup>及液体培养法,测定了 B 族维生素(V),无维生素酪素蛋白水解物(A·A)和核酸碱基(B)对突变株 AS 1.1004 菌生长的影响。表 2 结果表明在基础培养基上突变株 AS 1.1004 不能生长,在氨基酸及核酸碱基上也不能生长,只有添加维生素混合液时才能正常生长。特别是同时添加维生素混合液及无维生素酪蛋白水解物则生长更好,表明氨基酸混合液对该菌的生长有促进作用,可进一步确证 B 族维生素混合液对 AS 1.1004 菌株的生长影响。从表 3 结果看出,L-白氨酸产生菌在含 10 种维生素的培养基中生长良好,但除缺少生物素不能生长外,缺少其它维生素对生长无

表 2 各类生长因子对 AS 1.1004 菌生长的影响

培养基编号	生长因子组合	固体法	液体法
		菌圈大小	生长光密度
1	M	—	0.01
2	M+A·A	—	0.03
3	M+V	+	1.06
4	M+B	—	0.07
5	M+A·A+V	+	1.47
6	M+V+B	+	1.19
7	M+A·A+B	—	0.10
8	M+A·A+B+V	+	1.44

注:1.—:不生长,+:生长。  
2.M:基础培养基(不含氨基酸混合液)。  
3.V:维生素混合液微克/毫升为固体法用量,括号内为液体法用量(微克/升)。  
硫胺素·HCl 10(100),核黄素 10(100),菸酸 20(200),泛酸钙 10(100),吡哆醇 10(100),生物素 2(20),叶酸 3(30),维生素 B<sub>12</sub> 1(10),环己六醇 50(500),对氨基苯甲酸 10(100)  
4.A·A:0.5% 无维生素酪蛋白水解物。  
5.B:核酸碱基混合物,固体法用量毫克/10 毫升,液体法用 10 毫克/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。

明显影响,由此表明突变株 AS1.1004 虽经多次诱变,在营养要求上与出发菌 AS1.542 仍然一样。

表 3 各种维生素对 AS 1.1004 菌生长的影响

编 号	维 生 素	固体培养 (菌圈大小)	液体培养 (生长光密度)
1	M	—	0.03
2	维生素混合液 V	+	1.44
3	V-硫胺素	+	1.40
4	V-核黄素	+	1.43
5	V-菸 酸	+	1.45
6	V-泛 酸	+	1.42
7	V-吡哆醇	+	1.40
8	V-生物素	—	0.02
9	V-叶 酸	+	1.40
10	V-对氨基苯甲酸	+	1.45
11	V-维生素 B <sub>12</sub>	+	1.40
12	V-环己六醇	+	1.42

M:基础培养基(不含氨基酸混合液)

三、L-白氨酸发酵条件的研究

1. 生物素不同用量对突变株 AS1.1004 菌产 L-白氨酸的影响：从营养试验结果表明，生物素仍为 AS 1.1004 菌的生长必需因子，进一步试验了发酵培养基中生物素用量对 L-白氨酸产生的影响，结果见图 2。从图 2 看出生物素用量在 5 微克/升至 50 微克/升时，L-白氨酸的积累随生物素量增加而提高，至 50 微克/升以上产酸开始降低。

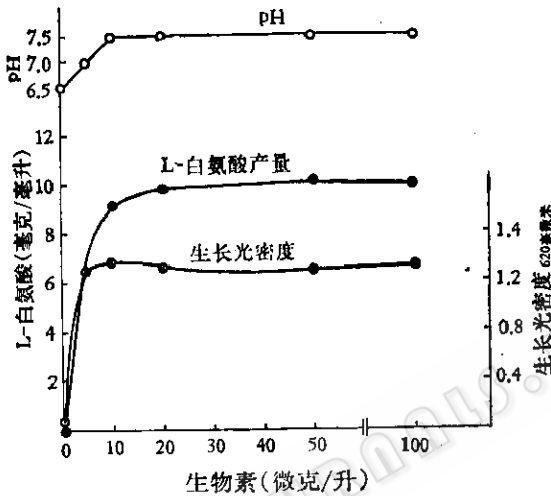


图 2 生物素对 L-白氨酸产生菌 AS 1.1004 的影响

2. 各种糖类对 L-白氨酸的影响：试验了在基础发酵培养基中，分别加入 10% 的葡萄糖、蔗糖、果糖、麦芽糖对 L-白氨酸的积累的影响。结果如表 4 所示，虽然 AS 1.1004 菌可利用四种糖类积累 L-白氨酸，但其中以葡萄糖对产生 L-白氨酸效果最好。进一步试验了葡萄糖不同浓度对产 L-白氨酸影响的结果表明，在含葡萄糖 12% 以内，随着糖浓度的增加，L-白氨酸

表 4 各种糖类对 L-白氨酸发酵的影响

结果	发酵终 pH	产 L-白氨酸 (毫克/毫升)
糖类		
葡萄糖	8.0	14.8
蔗糖	7.5	9.5
果糖	7.5	4.4
麦芽糖	8.0	5.1

的产量也随之提高，结果见图 3。

3. 不同氮源对 L-白氨酸发酵的影响：试验了在基础发酵培养基中分别加入硫酸铵、氯化铵、蛋白胨、硝酸铵、尿素、醋酸铵、磷酸氢二铵等七种氮源（含氮量以硫酸铵 4% 用量时的含氮量为 0.85 克来计算其它铵盐添加量）对 AS 1.1004 菌产 L-白氨酸的影响，结果见表 5。

从表 5 可以看出醋酸铵为氮源时产 L-白氨酸最好，其次为硫酸铵。此外，从醋酸铵与硫酸铵不同配比试验结果（见表 6），可以进一步说明醋酸铵作为氮源有利于 L-白氨酸的积累。当基础发酵培养基中分别含醋酸铵 2% 和醋酸铵 4% 而无硫酸铵时，L-白氨酸产量是 11.7 毫克/毫升和 13.8 毫克/毫升。醋酸铵含量 2% 时，添加硫酸铵 2% 或 3% 可以提高 L-白氨酸产量，但是无醋酸铵时虽硫酸铵含量达 4% 时 L-白氨酸产量仍较低。因此，说明 AS 1.1004 菌大量积累 L-白氨酸不仅要求培养基中氮源含量高，而且醋酸铵的存在有利于 L-白氨酸的产生。同时醋酸铵中的醋酸根离子也可以作为碳源被该菌利用，因为原菌 AS 1.542 能以醋酸为原料并在培养液中积累大量的 L-谷氨酸<sup>[9]</sup>。

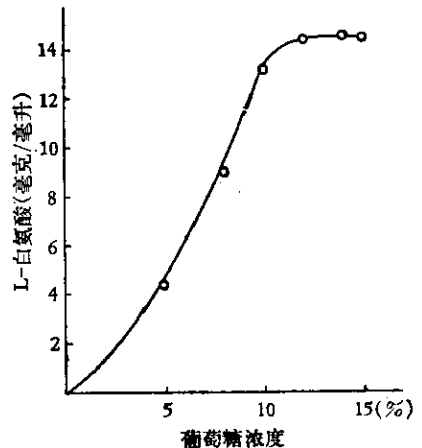


图 3 葡萄糖不同浓度对 L-白氨酸产生的影响

表 5 不同氮源对 L-白氨酸发酵的影响

氮 源		发 酵 结 果	
种 类	添加量(%)	发酵终 pH	产 L-白氨酸 (毫克/毫升)
硫酸铵	4.0	8.0	7.7
氯化铵	3.2	5.5	3.4
酒石酸铵	5.6	8.5	5.1
蛋白胨	2.0	5.5	2.4
硝酸铵	2.4	5.5	4.0
尿素*	1.8	9.0	—
醋酸钠	4.5	8.5	11.2
磷酸氢二铵	4.0	7.5	—

\* 当尿素降为 1.0—1.2% 时,可被该菌利用,并能产生 L-白氨酸与原菌相同,有强的脲酶活性<sup>[5]</sup>。

表 6 醋酸钠与硫酸铵不同配比对 L-白氨酸发酵的影响

NH <sub>4</sub> Ac (%)	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (%)	CaCO <sub>3</sub> (%)	发酵终 pH	产 L-白氨酸 (毫克/毫升)
2	0	2	8.0	11.7
2	1	2	8.0	11.3
2	2	2	8.5	12.7
2	3	2	8.0	13.2
3	2	2	8.5	12.2
3	1	2	9.0	11.7
4	1	2	9.0	13.7
4	2	2	9.0	12.8
4	0	4	9.0	13.8
0	4	4	8.0	9.3

四、L-白氨酸发酵过程

采用 500 毫升三角瓶装基础发酵培养基 25 毫升,进行发酵过程试验,结果见图 4。由图中可见在 28℃,旋转摇床上培养 72 小时, L-白氨酸产量最高达 15.3 毫克/毫升。

五、L-白氨酸的提纯和鉴定

1. 提取和精制: 取发酵液离心除去菌体和碳酸钙,上清液加草酸酸化至 pH2.5,再次离心去掉沉淀后,取酸化液上强酸性阳离子 732 (H<sup>+</sup> 型)交换树脂柱,吸附饱和后用 1N 的氨水洗脱,收集 pH5—11 的洗脱液于 50—60℃ 真空减压浓缩至出现结晶,抽滤,将结晶 70—80℃ 下烘干,即得 L-

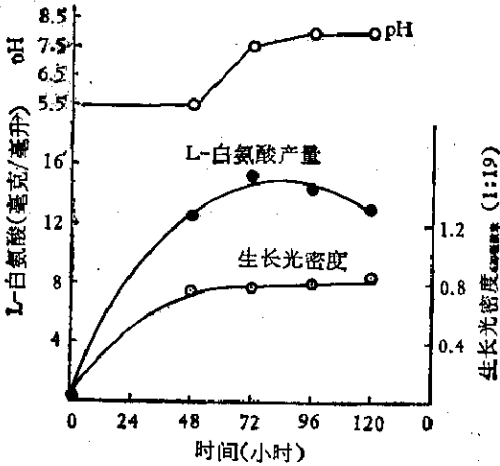


图 4 L-白氨酸发酵过程

白氨酸粗品。粗品溶解后用活性碳脱色,浓缩放冷处结晶或用 95% 的乙醇结晶均可得到 L-白氨酸精品。由于采用小型树脂柱提取,损失较多,收率约在 30% 左右。提取和精制过程见图 5。

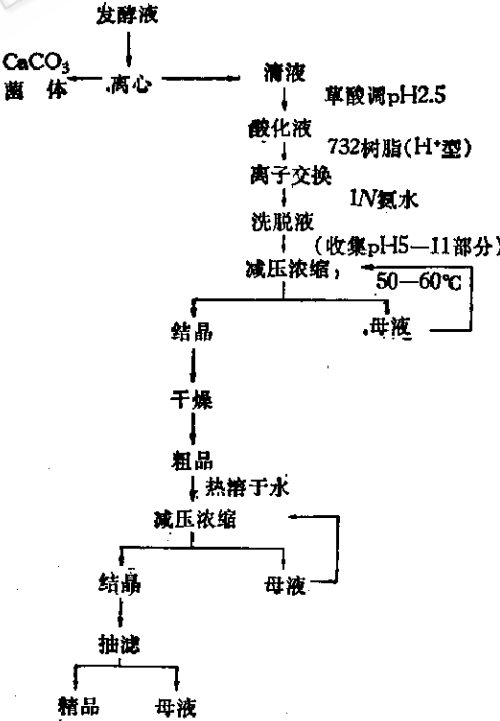


图 5 L-白氨酸提取和精制流程图

2. 鉴定: (1)元素分析: 以 Carlo Erba 1102 元素分析仪分析,结果见表 7。成品

测定值与理论值之比说明, 成品符合 L-白氨酸的元素组成, 纯度估计为 98% 左右。

表 7 元素分析值

元 素	测定值(%)	理论值(%)	测定值/理论值(%)
H	10.28	9.99	102.90
N	10.89	10.68	101.97
C	54.94	54.92	100.04

(2) 比旋光度: 用日本 OR-20 型旋光仪在 20℃ 测定成品旋光度, 结果为  $[\alpha]_D^{20} = +16.5 (C = 1, 5 \text{ NHCl})$  与 L-白氨酸的旋光度  $[\alpha]_D^{20} = +16.0$  接近<sup>[6]</sup>。

(3) 薄层色谱分析: 样品在纤维素薄板上点样后, 放入饱和的叔戊醇溶剂, 经 8—12 小时, 取出风干后用茚三酮显色, 精制成品 Rf 值与标准 L-白氨酸相同, 并有一微弱的缬氨酸的斑点。

(4) 红外光谱分析: 用美国 180 型红外光谱仪测定吸收光谱, 成品的红外吸收光谱与标准 L-白氨酸图谱相符。

(5) 生物鉴定: 采用白氨酸营养缺陷型 No. 33 以生长图形法鉴定, 培养 2 天可见精制样品周围出现 No.33 菌的生长谱, 而异白氨酸样品周围未出现生长谱。

根据以上结果确定从发酵液中提纯的精制品为 L-白氨酸。

## 讨 论

在选育产 L-白氨酸突变株的过程中, 我们采取的方法是亚硝基胍对 AS 1.542 诱变处理, 以指示菌和影印复制法选择产 L-白氨酸的突变株后, 再用亚硝基胍对产酸

高的菌株进行再次诱变处理。结果由原始菌 AS 1.542 通过诱变和单菌分离得到了产白氨酸 14 毫克/毫升以上的一些突变株, L289-28, L33, L1, L15 等等。这一方法与已报道的通过营养缺陷型突变株或抗代谢类似物突变株选育产 L-白氨酸菌的方法相比, 具有方法简便, 效率高的特点。然而, 突变株 AS 1.1004 虽然经过多次诱变处理, 营养要求仍与其出发菌株 AS 1.542 相同。AS 1.542 是典型的产谷氨酸菌, 积累 L-白氨酸量极少, 而突变株 AS 1.1004 菌能积累大量的 L-白氨酸, 其产酸机制可能与已报道的营养缺陷型积累白氨酸不同。但该突变株是否与产 L-白氨酸的抗代谢类似物调节突变体一样, 因调节基因的突变解除了反馈抑制或反馈阻遏而引起 L-白氨酸的过量积累, 对此, 尚须进一步探讨和研究。

除摇瓶试验外, 我们还进行了 30 升和 500 升罐的白氨酸发酵的扩大试验, 已取得具有实用意义的初步结果。

## 参 考 文 献

- [1] Calvo, R. A. and J. M. Calvo: *Science*, 156: 1107—1109, 1967.
- [2] Araki, K. et al.: *Agri. Biol. Chem.*, 38(3): 565—572, 1974.
- [3] Kisumi, M. et al.: *J. Biochem.*, 73: 105—115, 1973.
- [4] Tsuchida, T. et al.: *Agri. Biol. Chem.*, 38(10): 1907—1911, 1974.
- [5] 陈琦, 李玲阁: *微生物学报*, 15(2): 119—124, 1975.
- [6] 潘家秀等: *蛋白质化学研究技术*, 27: 242, 1973.
- [7] 陈琦, 李玲阁: *微生物学报*, 16(1): 37—40, 1976.
- [8] 方心芳: *应用微生物学实验法*, 209—211, 1962.

## STUDIES ON THE SELECTION OF LEUCINE-PRODUCING MUTANTS AND THEIR FERMENTATION CONDITIONS

Zhang Shu-zhen   Lu De-ru   Yuan Lan-cui   Chen Qi

(*Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing*)

A mutant AS 1.1004 producing a large amount of L-leucine was stepwisely derived from *Corynebacterium crenatum* AS 1.542 by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine continual treatment.

It was found that this mutant still required biotin as essential growth factor and that further addition of casein-hydrolysate also promoted its growth. The accumulation of L-leucine depended on the amount of biotin in a medium containing 5—50  $\mu\text{g/l}$  of biotin. Glucose and  $\text{NH}_4\text{Ac}$  were the best carbon and nitrogen sources in fermentation tests.

Yield of L-leucine was about 14 mg/ml in a medium containing 10% glucose, 2%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 2%  $\text{NH}_4\text{Ac}$ , 0.1%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.04%  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 2 mg/l  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 2 mg/l  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 50  $\mu\text{g/l}$  biotin, 300  $\mu\text{g/l}$  thiamine hydrochloride, 0.3% peptone, 0.3% yeast extract and 2%  $\text{CaCO}_3$ , pH 7.2 on rotation shaker at 28°C for 4 days.

The product isolated from fermented liquid was identified to be L-leucine by element composition, infrared absorption spectrum, cellulose thin layer chromatography, specific rotation and bioassay.