

一个产生 α -酮戊二酸及谷氨酸 的短杆菌新种*

楊常仁

錢存柔

周光宇

(中国科学院) (北京大学生物学系, 北京) (中国科学院
生物化学研究所, 上海) (生物化学研究所, 上海)

細菌能在培养基中积累大量游离 α -酮戊二酸的現象, 早在1946年 Lockwood 和 Stadola^[1] 在一株 *Pseudomonas fluorescense* NRRL B-6 中发现。以后相繼发现許多細菌^[2,3,4], 包括 *Bacillus*, *Bacterium*, *Pseudomonas*, *Serratia* 和 *Kluyvera* 等属中的菌株也有累积 α -酮戊二酸的能力, 其量可达加入葡萄糖量的40—60%。利用細菌发酵产生 α -酮戊二酸已在日本进行生产。

L-谷氨酸以往从蛋白質原料进行水解或由化学方法合成进行生产, 但蛋白質原料昂貴, 化学合成方法生产的谷氨酸系 DL 型, 分离很不方便。为此, 寻找比較价廉而又合乎要求的生产方法极为迫切。自发现細菌能积累 α -酮戊二酸后, 曾有人^[5,6] 试图利用产生 α -酮戊二酸的微生物在适宜条件下发酵, 然后再利用第二种微生物或利用动植物組織中提取出的酶使 α -酮戊二酸轉变为 L-谷氨酸。但方法依然复杂, 不能令人滿意。

直接利用微生物在含糖及銨盐的培养基中进行发酵生产 L-谷氨酸的工作, 是由朝井^[7]和木下^[8]等人于1957年开始进行的。近年来各国发现的产 L-谷氨酸的高产菌种已有 *Micrococcus varians*^[7], *M. glutamicus*^[9], *Bacillus* sp.^[10], *Brevibacterium diversicatum*^[11], *Brevibacterium aminogenes*^[12], *Microbacterium* sp.^[13], 及 *Brevibacterium* 属中的一些种^[14]。

錢存柔等^[15]从北京的水沟泥中分离出1株2990-6号杆菌, 在含銨盐量低的葡萄糖无机培养基中能积累 α -酮戊二酸。若銨盐浓度增加, 則使 α -酮戊二酸轉变为谷氨酸^[16]。发酵实验的結果^[17], 谷氨酸的产量达到很高的水平。本文报导这一杆菌鉴定的結果。

一、方法与結果

鉴定所用方法系按照 *Manual of Microbiological Methods*^[18] 和 *A Guide to the Identification of the Genera of Bacteria*^[19] 两书中所述方法进行, 并依据 *Bergey 氏細菌学鉴定手册第七版*^[20] 加以鉴定。2990-6号菌經常保存在含蛋白胨2%, 牛肉膏1%, 葡萄糖2%, 酵母膏0.2%, 氯化鈉0.25%, 碳酸鈣0.5%, 琼脂1.5%的斜面培养基上。

下述各項試驗所用材料, 除少数項目特別說明者外, 一般为在30—33°C, 培养24—36小时的肉汁琼脂斜面的培养物。其成分含牛肉膏0.3%, 蛋白胨0.5%, 氯化鈉0.5%, 琼

* 本文写作时, 承童村及陈駒声两位先生提出宝贵意見, 特此致謝。
本文1962年11月8日收到。

脂 1.5%，pH 7.0—7.2。

(一) 細菌的形态与染色特性

用普通光学显微镜染色检查或用相差显微镜直接观察 18, 24, 48 及 72 小时的培养物时，細胞均为杆形，整齐不分枝，无多形态现象。細胞为单个排列或成鏈状，有时两个細胞排成“V”形。在电子显微镜下测得細胞大小为 0.8×1.7 — 2.1 微米，振荡培养时，菌体多数是单个存在。

革兰氏染色(Hucker 改良法)，48 小时之内的培养物为阳性反应，但年老的細胞(4 天以上)易被 95% 乙醇脱色，有时細胞边缘为阳性反应而内部呈阴性反应。

用 Dorner 氏芽孢染色法检查 2 天及 1 周的培养物未发现芽孢。用 Antony 氏荚膜染色法检查亦未发现荚膜。用 Ficher 和 Conn 改良的 Bailey 氏鞭毛染色法染色，以及在电子显微镜下检查均未发现有鞭毛。2990-6 号杆菌經 Zielh-Neelsen 法染色証明无抗酸能力，用 Neisser 氏美蓝染色亦未发现异染顆粒。穿刺培养及显微镜下悬滴检查均未发现有运动能力。

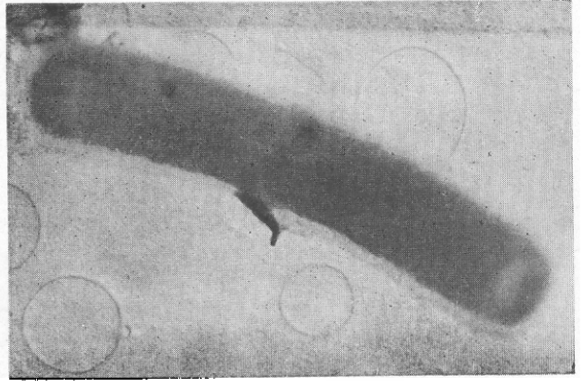


图 1 电子显微镜下放大 20,000 倍的照片，经过镀膜处理

(二) 培养特征

2990-6 号杆菌在肉汁琼脂斜面上划线培养时，菌体为中等生长，呈珠状至鏈状，白色、半透明、有光泽，湿润，无粘性。培养基内无色素生成。

在肉汁琼脂平板上菌落的形态为圆形，直径約 2 毫米，白色，中央微微隆起，表面光滑，边缘整齐，无色素扩散到培养基内。

在肉湯中生长时为均匀混浊，无块状沉淀，表面无菌膜或环状物，亦无气味。

能在一般的蛋白胨水中正常生长。

半固体琼脂穿刺培养时，沿穿刺线生长，不向四周扩展。

(三) 生理性状

1. 对氧气的要求：生长在振荡培养的条件下較静止培养为迅速，在以石蜡油隔绝空气的缺氧环境中亦能生长，但极为缓慢、表现为兼性厌氧菌。

2. 对温度的关系：

菌株在 28—33°C 生长最适，在 20—40°C 均能生长。

以 24 小时的肉湯培养物分装在薄壁毛细管内，在 50°, 55°, 60°, 65°, 70°, 75° 及 80°C 各处理 10 分钟，取出迅速冷却，再接入新鲜培养基中 33°C 培养 3 天，观察生长情况。结果 2990-6 号杆菌在 60°C 热处理 10 分钟已全部死亡。

3. pH 的影响：

以 50 毫升肉湯培养液盛于容量为 250 毫升的锥形瓶内，灭菌后以无菌操作调节酸度至 pH 6.4, 7.0, 8.0, 9.0 及 9.4。接种培养物后，在 33°C 振荡培养 48 小时，在 600m μ 处比色，并以空白培养基为对照，讀光密度代表細菌生长程度。结果如表 1 所示，在 pH 6.4

时生长极微弱, pH 8.0 时生长最好, pH 达 9.0 时生长又趋缓慢。

表 1 培养基酸度对生长的影响

培养基酸度(pH)	6.4	7.0	8.0	9.0	9.4
培养物比浊(600m μ 光密度)	0.003	0.012	0.063	0.055	0.030

4. 糖发酵试验:

基础培养基为蛋白胨水,各种发酵糖的浓度为 1%,加入溴麝香草蓝作为指示剂,分装于试管内,每管装杜汉氏发酵管 1 枚。在 33°C 培养 1 周,每日观察酸度的变化及气体的产生。2990-6 号杆菌对各种糖发酵的结果如下:

表 2 2990-6 号杆菌对不同糖发酵的结果

糖的种类	葡萄糖	半乳糖	木糖	乳糖	蔗糖	淀粉	甘油	甘露醇
发酵结果	+	+	+	+	+	+	-	-

注:“+”产酸不产气;“-”不产酸不产气。

5. MR 试验及 VP 试验均为阴性反应。
6. 能水解淀粉,不能分解纤维素。
7. 能够利用柠檬酸盐。
8. 不能在含酵母膏乙醇的培养中生长。
9. 不能在含牛磺胆酸钠的琼脂上生长。
10. 不产生 H₂S, 亦不产生吲哚。
11. 不能还原硝酸盐,但在无机氮合成培养基中能利用硝基态氮。
12. 对石蕊牛乳不发生变化。
13. 利用 Smith 氏根据 Prozier 氏的改良法,在明胶琼脂平板上划线接种,30—33°C 培养 5 天,然后用升汞盐酸溶液试剂试验,结果菌落周围有一圈透明无沉淀的区域出现,说明 2990-6 号杆菌能够液化明胶。
14. 尿素酶试验为阳性。
15. 不能水解油脂。
16. 在含 4、5、7、10、12% 氯化钠的肉汁琼脂斜面上不能生长。
17. 在葡萄糖无机盐的培养基中能产生大量 α -酮戊二酸。若培养基中有较高浓度铵盐时,则转变为谷氨酸。
18. 本菌株系自北京水沟泥中分出,为腐生菌。

二、讨论

2990-6 号菌株系菌形整齐的杆菌,不弯曲,培养过程中亦未见有分枝现象,革兰氏染色呈阳性反应,无耐酸性,无异染颗粒,不生芽孢,是异养型的微生物。根据这些性状,依据 Bergey 氏细菌学鉴定手册第七版^[20]中描述的情况,应列为短杆菌科(Brevibacteriaceae)。

与短杆菌科相近的,同为革兰氏染色阳性反应、不生芽孢者还有乳杆菌科(Lactobacteriaceae)、丙酸菌科(Propionibacteriaceae)及棒状杆菌科(Corynebacteriaceae) 3 科。但 2990-6 号菌株是整齐的杆菌,发酵糖时只产酸不产气体,生长在氧气充足的振荡条件下比静止培养好,故不可能是乳杆菌科或丙酸菌科。2990-6 号菌株也不可能是棒状杆菌科,因细胞不分枝,观察了 18 至 72 小时的培养物未发现断裂成链状的现象。细胞内无异染颗粒,亦非致病菌。

在短杆菌科中仅有二属。其中 *Kurthia* 属是包括一些长杆状、有周身鞭毛、能运动的细菌,有时可断裂成球状细胞,不能分解糖。2990-6 号菌株显然与此不符。另一属为 *Brevibacterium*,在手册中描写此属特征是:典型短而不分枝的杆菌。一般不能运动,能运动的种具周身鞭毛或不定。有时产色素,具有不溶于水的红色、红橙色、黄色或棕色的色素。能还原硝酸盐或否。常使葡萄糖肉汤变酸,对乳糖不发酵。对蛋白质分解的作用依种而异。好氧性或兼性厌氧性,微嗜氧的少见。在乳制品、土壤、海水和淡水以及分解的有机物中可以找到各种类型。2990-6 号菌株的特性基本上是与 *Brevibacterium* 一致的。

Brevibacterium 属记载了 23 个种,其中象 2990-6 号菌不产色素又不能运动者有 9 个种。前 4 个种 *Brev. minitiferula*、*Brev. sociovivum*、*Brev. immotum* 及 *Brev. marinopiscosum* 初分离时都需用海水琼脂培养,而 2990-6 号菌在含不同盐浓度的培养基上均不生长;后 4 个种 *Brev. stationis*、*Brev. quale*、*Brev. ammoniagenes* 及 *Brev. healii*,均能还原硝酸盐,特性与 2990-6 号菌株均不相同。剩下的 *Brev. tegumenticola* 种与 2990-6 号菌比较时,前者细胞较小,不能水解淀粉,并且发酵乳糖的性状也不相同。由此看来,我们的菌株与手册中记载的 23 个种均不相同。

近年来报导的 *Brevibacterium* 属中具有产谷氨酸活性较高的种已有多起,但性质与 2990-6 号菌株均有若干差异。如太田修^[2]报导的 *Brev. aminogenes* 不能水解淀粉,能使石蕊牛乳变碱性,不液化明胶,不能利用柠檬酸盐,MR 试验为弱阳性反应;苏运志等^[1]报导的 *Brev. divaricatum* 为灰黄色的菌株。奥村信二等^[4]曾将自然界中分出的能产谷氨酸较多的菌株,列为 *Brevibacterium* 中者共 10 种,以颜色大别为 2 群。在第一群中包括黄色、淡黄或乳白色的菌株,其中不能还原硝酸盐者只有 2 株,但此 2 株对石蕊牛乳均能起产酸或产碱的变化,也和 2990-6 号菌株不同。

这株菌所以能大量产生谷氨酸的原因,是由于它具有在葡萄糖无机盐培养基中首先积累 α -酮戊二酸的代谢特征,为此我们将它定名为 *Brevibacterium ketoglutaricum*, sp. nov., 即酮戊二酸短杆菌,北京 2990-6,或简称北京 2990-6 号杆菌。

参 考 文 献

- [1] Lockwood, L. B. and Stadola, F. H.: *J. Biol. Chem.*, **164**: 81—83, 1946.
- [2] 增尾荣太郎, 脇阪义治: 日本农艺化学会志, **29**: 550—555, 1955.
- [3] Asai, T.; Aida, K.; Sugisaki, Z. and Yakeiski, N.: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **1**: 308—346, 1955.
- [4] 朝井勇宣, 相田浩, 杉崎治郎: 日本农艺化学会志, **27**: 129—132, 1953.
- [5] 道喜美代等: 日本农艺化学会志, **33**: 193—195, 1959.
- [6] Smythe, C. V. and Huang, H. T.: *U. S. Patent*, 2,749,297, 1956.
- [7] 朝井勇宣, 相田浩, 大石邦夫: 醱酵协会志, **15**: 371—379, 1957.
- [8] Kinoshita, S., Udaka, S. and Shimono, M.: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **3**: 193—205, 1957.

- [9] Kinoshita, S., Nakayama, K. and Akita, S.: *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan*, 22: 176—185, 1958.
- [10] Chao, K. C. and Foster, J. W.: *J. Bact.*, 77: 715—725, 1959.
- [11] Su, Y. C. and Yamada, K.: *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan*, 24: 69—74, 1960.
- [12] 太田修等: 发酵工学杂志, 37: 261—264, 1959.
- [13] 上井新次等: 发酵工学杂志, 34: 863—866, 1960.
- [14] 奥村信二等: 日本农艺化学会志, 36: 141—159, 1962.
- [15] 錢存柔、黄仪秀、林稚兰、陈德元: 微生物学报, 8(4): 386—389, 1962.
- [16] 龔葵之、周光宇: 谷氨酸发酵菌——北京 2990-6 的代謝: 三羧酸循环. 待发表.
- [17] 周光宇、龔葵之、余微明、陈志民: 生物化学与生物物理学报, 1: 124—136, 1961.
- [18] *Manual of Microbiological Methods*. The Society of American Bacteriologists Committee on Bacteriological Technic, New York, McGraw-Hill, 1957.
- [19] Skerman, V. B. D.: *A Guide to the Identification of the Genera of Bacteria*, Baltimore, Williams and Wilkins, 1959.
- [20] Breed, R. S.: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 7th ed., London, Bailliere, Tindall Cox, Ltd., 1957.

A NEW SPECIES OF BREVIBACTERIUM CAPABLE OF PRODUCING α -KETOGLUTARIC ACID AND GLUTAMIC ACID

YANG CHANG-JEN

(Institute of Biochemistry, Academia Sinica, Shanghai)

CHIEN TSWEN-ROU

(Department of Biology, Peking University, Peking)

CHOW KWANG-YU

(Institute of Biochemistry, Academia Sinica, Shanghai)

A rod form of bacterium numbered 2990—6 was isolated from polluted water collected from the suburbs of Peking. It can produce α -ketoglutaric acid in a glucose-mineral medium and convert glucose quantitatively to glutamic acid if there is enough ammonium salt.

This strain of bacterium is straight, unbranched, colourless, non-motile, without endospore, gram positive and facultatively anaerobic. The size of the cell under electron microscope measures 0.8×1.7 — 2.1μ . It can hydrolyse starch, but cannot liquify gelatin, and cannot reduce nitrate to nitrite. Glucose, galactose, xylose, lactose, sucrose, and starch are fermented into acid, but no gas is formed. Glycerol and mannitol are not attacked. It is distinguishable from all other bacteria known to produce α -ketoglutaric acid and L-glutamic acid.

We propose to name this new strain of bacterium Peking 2990—6: *Brevibacterium ketoglutaricum* sp. nov.