

## L-苏氨酸产生菌的选育

黄和容 李玲阁 王秀岭

李志明 郭永复 陈琦

(中国科学院微生物研究所, 北京)

以亚硝基胍 (MNNG) 诱变处理大肠杆菌 AS1.358, 获得蛋氨酸缺陷型 (Met<sup>-</sup>) 突变株, 从中得到一株 B<sub>2811</sub> 菌, 能在培养基中积累少量苏氨酸。通过连续诱变, 得 K<sub>1-73</sub> 菌株 (Met<sup>-</sup>), 在 5% 葡萄糖与 DL-蛋氨酸添加量为 75mg/l 的条件下, 能够积累 3.5mg/ml L-苏氨酸。

同样以 MNNG 诱变处理钝齿棒状杆菌 *C. crenatum* AS1.542, 获得抗  $\alpha$ -氨基- $\beta$ -羟基戊酸 (AHV<sup>r</sup>) 突变株 1770 株, 其中 6% 菌株能够积累少量苏氨酸。选得 LR-1458 菌产 L-苏氨酸 <1mg/ml。对该菌逐步诱变, 得一株抗 8mg/ml AHV 及蛋氨酸缺陷型双重突变株 (AHV<sup>r</sup>, Met<sup>-</sup>) LRA-96, 其 L-苏氨酸产率与亲株比较有明显提高, 达 3.5mg/ml。连续再诱变并结合单菌落分离选育, 得一突变株 m-85 (AHV<sup>r</sup>, Met<sup>-</sup>), 能在培养基中积累 13mg/ml L-苏氨酸。试验表明, 连续诱变处理是选育 L-苏氨酸高产菌株有效手段之一。

L-苏氨酸是人体与动物体必需氨基酸之一, 已用于配制复合氨基酸注射液<sup>[1]</sup>。利用微生物发酵法生产 L-苏氨酸已有不少的报道<sup>[2-5]</sup>, 但国内尚未见到这方面的研究报告。目前国内苏氨酸生产工艺多采用化学合成法, 其生成物为消旋的立体异构体, 获得天然型 L-体收率甚低, 因此开展利用微生物发酵生产 L-苏氨酸的研究, 不仅有其理论意义而且有着重要的实用价值。本文报道用人工诱变手段, 选育了营养缺陷型与抗反馈调节双重突变株, 人为地改变微生物固有特性, 达到有效地在基质中产生多量的 L-苏氨酸的结果。

### 材料与方 法

#### (一) 营养缺陷型突变株的获得

1. 供试菌株: 北京棒状杆菌 *C. pekinense* AS1.299, 谷氨酸产生菌<sup>[6]</sup>; 大肠杆菌 *E. coli* AS1.358; 产气气杆菌 *A. aerogenes* AS 1.489。

2. 诱变剂: 亚硝基胍 (MNNG)。

3. 培养基: 见表 1 中 1、2、3、5 号培养基。

4. 诱变处理与氨基酸需求的测定: 参照《微生物诱变育种》<sup>[7]</sup>一书进行。

#### (二) $\alpha$ -氨基- $\beta$ -羟基戊酸 (AHV) 抗性菌株的获得

1. 供试菌株: 钝齿棒状杆菌 *C. crenatum* AS 1.542, 谷氨酸产生菌<sup>[8]</sup>。

2. 诱变剂: 亚硝基胍 (MNNG), 硫酸二乙酯 (DES)。

3. 培养基: 见表 1 中 1、2、4 号培养基。

4. AHV 抗性菌株的获得: 诱变操作同前<sup>[7]</sup>, 处理后菌体经过适当稀释, 取 0.1ml 涂布于含不同量的 AHV 的 4 号培养基上, 30℃ 培养 5—10 天。平板上出现菌落, 即为抗 AHV 突变株。移至肉汁斜面上, 作为进一步筛选 L-苏氨酸产生菌试验用。

#### (三) L-苏氨酸产生菌筛选

诱变获得的蛋氨酸、异白氨酸缺陷型突变株和抗 AHV 突变株的斜面培养物, 移接一环至含 5ml 7 号或 8 号培养基的试管中 (2×20cm), 30℃ 振荡培养 72 小时, 用纸层析法定性地鉴别发酵液

本文于 1980 年 9 月 1 日收到。

表 1 培养基组成 Composition of Media

培养基 Medium 成份 Component (%)	1	**2	3	4	5	6	*7	*8
葡萄糖 Glucose		2	0.1	0.5	2.0	1.0	10.0	5.0
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>			0.1	0.15		0.3	3	1.5
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>		0.2			0.2			
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>		0.05	0.2	0.1	0.05	0.1	0.15	0.2
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>			0.7	0.3				
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O		0.04	0.01	0.01	0.04	0.05	0.04	0.05
MnSO <sub>4</sub> · 4H <sub>2</sub> O		0.005	0.005	0.001	0.005	0.001	0.001	0.001
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O		0.005	0.005	0.001	0.005	0.001	0.001	0.001
生物素 Biotin (μg/ml)		3	0	3	3	3	20	3
硫胺素 Thiamin. HCl (μg/ml)		30		10	30	20	30	20
肉膏 Meat extract	1.0							
酵母膏 Yeast extract	0.5							
蛋白胨 Peptone	1.0							
NaCl	0.5							
无维生素水解物 Caseinhydrolysate vitaminfree					0.5			
CaCO <sub>3</sub>							3.0	1.5
洋菜 Agar	2.0	2.0		2.0	2.0	2.0		

\* 为筛选蛋氨酸缺陷型或异白氨酸缺陷型发酵 L-苏氨酸菌株, 在培养基中添加 200μg/ml DL-蛋氨酸或 150μg/ml L-异白氨酸或添加 0.4% 豆饼水解液。

Screening of Met<sup>-</sup> or Ile<sup>-</sup> strains for L-threonine fermentation, 200μg/ml DL-methionine or 150 μg/ml L-isoleucine or 0.4% soybean cake hydrolysate was added.

\*\* 为鉴定各种氨基酸缺陷型, 添加 10mg/l 各种 L-氨基酸。

Various L-amino acids (10mg/l) were added for the identification of amino acid auxotrophs.

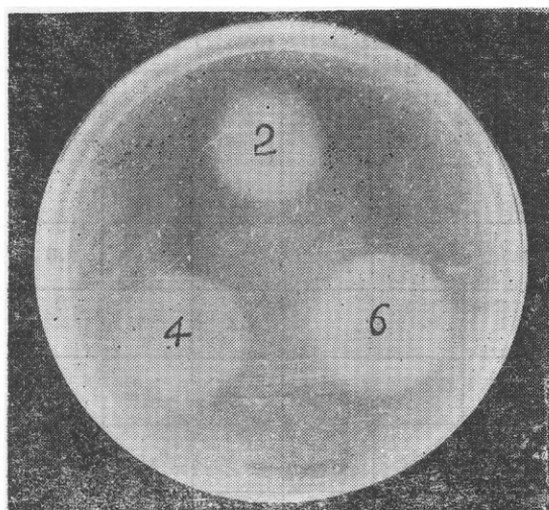


图1 A891 菌生长图谱法测定 L-苏氨酸含量  
Fig. 1 Auxanographic method for L-Threonine determination

2、4、6: L-苏氨酸含量  
2、4、6: L-Threonine content (mg/ml)

中存在苏氨酸。再以北京棒状杆菌苏氨酸缺陷型突变株 A891 (Thr<sup>-</sup>) 为检测指示菌,用生长图谱法确证所产生氨基酸为 L-苏氨酸,并可粗略判断苏氨酸的含量。

#### 1. 纸层析用溶剂系统

- (1) 正丁醇:醋酸:水 = 4:1:1
- (2) 环己胺: 丁酮:正丁醇:水 = 2:10:10:5
- (3) 丁酮: 正丁醇:浓氨水:水 = 3:5:1:1

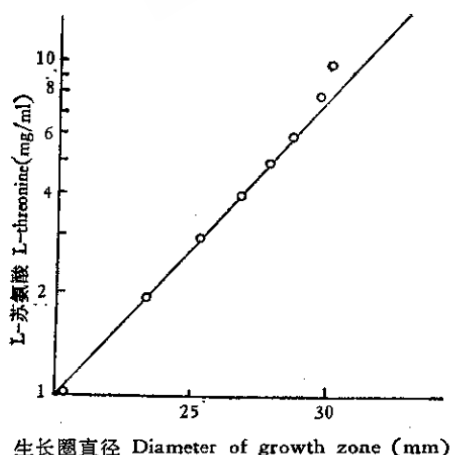


图2 生长图谱法绘制 L-苏氨酸标准曲线  
Fig. 2 Typical standard curve of L-threonine determination by auxanographic method

## 2. 生长图谱法检测 L-苏氨酸

取在 1 号液体培养基上生长 16—18 小时的 A891 菌培养液(细胞数:  $10^8$  个/ml) 5ml, 离心收集菌体,用生理盐水洗涤 2 次,再悬浮于 2ml 生理盐水中。按 1% 量加到熔化的 6 号培养基内(温度约 45℃)混匀,倒平板(9cm 培养皿内倾入 15ml 培养基)。冷凝后依次放置直径 0.5cm 灭菌的滤纸片。用微量注射器取 5μl 发酵液滴加于纸片上,并以 2mg/ml L-苏氨酸标准溶液为对照。置 30℃ 培养 16 小时,观察到纸片周围出现 A891 菌的生长圈(图 1),确证该菌发酵液中存在 L-苏氨酸。测量生长圈的直径,参照标准曲线(图 2),初步测定苏氨酸的含量。溶液中 L-苏氨酸含量在 1—6mg/ml 范围内,生长圈直径可以反映 L-苏氨酸的浓度。

发酵液中 L-苏氨酸含量除用生长图谱法测定外,也可用溶媒系统(3)纸上层析分离,比色定量法测定<sup>[9]</sup>。

## 结 果

### (一) 氨基酸营养缺陷型突变株的获得

选育氨基酸营养缺陷型突变株获得 L-苏氨酸积累已有成功的例子<sup>[2,10]</sup>。我们以不同的细菌经 MNNG 诱变,收集各种氨基酸缺陷型突变株,结果见表 2。

各类氨基酸缺陷型分布情况如表 3 所示。这三种细菌诱变后,获得组氨酸缺陷型突变株的比例比较高,而大肠杆菌氨基酸缺陷型中,蛋氨酸缺陷型突变株占 30%,这些蛋氨酸缺陷型突变株用于筛选 L-苏氨酸产生菌。

### (二) 大肠杆菌蛋氨酸缺陷型突变株 K<sub>1</sub>-73 产生 L-苏氨酸

从 114 株蛋氨酸缺陷型突变株中筛选到一株大肠杆菌 B<sub>2851</sub> (Met<sup>-</sup>), 在含 DL-蛋氨酸 100μg/ml 培养基内积累少量 L-苏氨酸。发酵液经电泳、纸层析双向分离证明, B<sub>2851</sub> 菌株除产苏氨酸外尚产生等量

表 2 MNNG 诱变处理所得营养缺陷型

Table 2 Auxotrophic Mutants Obtained by MNNG Treatment

出发菌株 Starting strains	1 号培养基上生长(株) Growth in medium No. 1 (strain)	2 号培养基上不生长 (株) No growth in medium No. 2 (strain)	氨基酸缺陷型(株) Amino acid auxotroph (strain)	氨基酸缺陷型/总营养 缺陷型(%) Amino acid/total auxotrophs
<i>C. pekinense</i> AS 1.299	3965	672	42	6.3
<i>E. coli</i> AS 1.358	3313	3126	381	12.1
<i>A. aerogenes</i> AS 1.489	3756	634	63	10.0

表 3 各类氨基酸缺陷型突变株分布

Table 3 Distribution of Amino Acid Auxotrophic Mutants

出发菌株 Starting strains	<i>C. pekinense</i> AS 1.299	<i>E. coli</i> AS 1.358	<i>A. aerogenes</i> AS 1.489
氨基酸需求 Amino acid requirement			
蛋氨酸 Methionine	9	114	8
异白氨酸 Isoleucine	—	7	3
白氨酸 Leucine	3	11	6
精氨酸 Argine	5	41	8
组氨酸 Histidine	13	159	14
苏氨酸 Threonine	3	3	1
酪氨酸 Tyrosine	—	1	1
赖氨酸 Lysine	3	2	1
天冬氨酸 Aspartic acid	—	—	1
天冬酰胺 Asparagine	—	3	1
脯氨酸 Proline	—	14	7
丝氨酸 Serine	1	4	—
高丝氨酸 Homoserine	—	1	1
胱氨酸 Cystine	—	17	3
谷氨酸 Glutamic acid	—	1	—
色氨酸 Tryptophane	1	3	2
丙氨酸 Alanine	—	—	2
缬氨酸 Valine	—	—	1
苯丙氨酸 Phenylalanine	3	—	—
甘氨酸 Glycine	—	—	1
待定 Unknown	1	—	1
总计 Total	42	381	63

的缬氨酸、丙氨酸和谷氨酸。同时以苏氨酸缺陷型 A891 菌株生长图谱法验证,发酵液中存在 L-苏氨酸。

以 B<sub>2851</sub> 菌株逐步诱变,并简化筛选操作,选得 5 株 L-苏氨酸产生菌,其中 K<sub>1</sub>-

73 菌株能积累 3.5mg/ml L-苏氨酸。该菌经氨基酸需求测定,仍为蛋氨酸缺陷型突变株。试验结果表明,选育蛋氨酸缺陷型突变株,从 L-苏氨酸合成代谢途径上阻断通向蛋氨酸合成,从而解除蛋氨酸对天

冬氨酸激酶的反馈抑制和对高丝氨酸脱氢酶的阻遏作用,有可能积累 L-苏氨酸。

K<sub>1</sub>-73 菌株选育谱系如图 3。

菌株 Strain	L-苏氨酸 L-Threonine (mg/ml)
<i>E. coli</i> AS1.358	0
↓ MNNG 2mg/ml	
B <sub>1811</sub> (Met <sup>-</sup> )	微量
↓ MNNG 1mg/ml	Trace
B <sub>1811</sub> -60 (Met <sup>-</sup> )	<1
↓ MNNG 1mg/ml	
K <sub>1</sub> -73 (Met <sup>-</sup> )	3.5

图 3 K<sub>1</sub>-73 菌株的选育谱系  
Fig. 3 Genealogy of L-Threonine producers in *E. coli*

### (三) 抗 AHV 突变株的获得

AHV 对钝齿棒杆菌 AS1.542 具有强烈的抑制生长作用<sup>[11]</sup>,这种抑制作用可被异白氨酸部分恢复。后来试验证明,AHV 的抑制作用也可被苏氨酸所恢复。由于 AHV 不仅是异白氨酸的结构类似物,也是苏氨酸的结构类似物,选育抗 AHV 突变株有可能积累苏氨酸<sup>[12,13]</sup>。我们以钝齿棒杆菌 *C. crenatum* AS 1.542 为出发菌株,经 MNNG 诱变,计得 1770 株抗 AHV 突变株。筛选结果只有 106 菌株在发酵液中积累少量苏氨酸,其中 LR-1458 (AHV<sup>r</sup> 6mg/ml) 能在发酵液中积累低于 1mg/ml 苏氨酸。但这些抗 AHV 突变株中却有 20% 以上的菌株积累异白氨酸。

### (四) 逐步诱变产 L-苏氨酸的突变株

1. AHV 抗性和蛋氨酸缺陷双重突变株 LRA-359 的获得

抗 AHV 突变株 LR-1458 积累少量苏氨酸,我们将此菌株继续诱变,一方面提高其对 AHV 的抗性,同时选育为蛋氨酸缺陷型。LRA-96 菌株不仅能抗 8mg/ml AHV,同时又是蛋氨酸缺陷型,较之亲株 LR-1458(AHV<sup>r</sup>) 苏氨酸产量有明显地提高,约为亲株的 4 倍量。LRA-96 菌株

(AHV<sup>r</sup>, Met<sup>-</sup>) 的获得表明,通过逐步诱变,将结构类似物抗性和营养缺陷型两种性状组合到同一菌株内,是提高 L-苏氨酸产量有效手段。接着又以 LRA-96 菌株再诱变,获得 300 株抗 10mg/ml AHV 突变株。对这些菌株进行 L-苏氨酸发酵试验,结果如图 4 所示。突变株按苏氨酸产量向

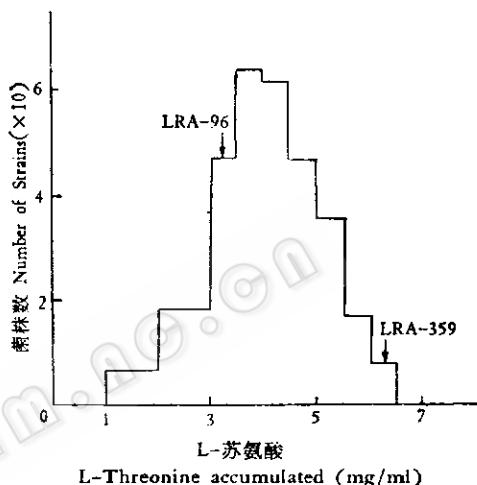


图 4 来自 LRA-96 的 300 株突变株按其产 L-苏氨酸水平的分布频率  
Fig. 4 Distribution of L-Threonine accumulated by 300 mutants derived from strain LRA-96

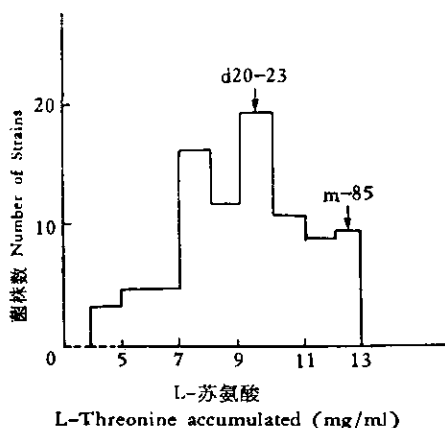


图 5 由 d20-23 突变株单菌落分离的菌株按其产 L-苏氨酸水平分布频率  
Fig. 5 Distribution of L-Threonine accumulated by those strains single colony isolated from mutant d20-23

正、负两极分化。正向突变株所占比重高于负向突变株,其中 LRA-359(AHV<sup>r</sup>, Met<sup>-</sup>)能在发酵液中积累 6.5mg/ml L-苏氨酸。

## 2. 诱变处理与单菌落分离相结合选育 L-苏氨酸高产菌株

从 LRA-359 单菌落分离中选得一株 LRA-359-66 突变株,其产 L-苏氨酸水平虽与亲株 LRA-359 相同,但其副产氨基酸如异白氨酸、缬氨酸、高丝氨酸等则较亲株为少。继续以此菌株逐步诱变,选得 d20-23(AHV<sup>r</sup> 20mg/ml, Met<sup>-</sup>),产酸水平达 9mg/ml。又将 d20-23 菌株培养于含 20mg/ml AHV 培养基上,再进行单菌落分离,计得 81 菌株。这些菌株产酸水平如图 5 所示。随着产酸量提高后,属于负极分化的菌株数增多,50% 强的菌株产酸低于亲株,37% 菌株超过亲株,明显提高者占 8% (10 株)。通过以上试验再次证明,逐步诱变处理结合单菌落分离筛选,是选育氨基酸高产菌株有效途径。

## 3. *C. crenatum* L-苏氨酸产生菌选育谱系

由钝齿棒杆菌 *C. crenatum* AS 1.542

菌株 Strain	L-苏氨酸 L-Threonine (mg/ml)
<i>C. crenatum</i> AS 1.542	0
↓ MNNG	
LR-1458(AHV <sup>r</sup> , 6mg/ml)	<1
↓ MNNG	
LRA-96(AHV <sup>r</sup> , 8mg/ml, Met <sup>-</sup> )	3.5
↓ MNNG	
LRA-359(AHV <sup>r</sup> , 10/ml, Met <sup>-</sup> )	6.5
↓ 单菌落分离 Single colony isolation	
LRA-359-66	7.0
↓ DES	
d20-23(AHV <sup>r</sup> 20mg/ml, Met <sup>-</sup> )	9.0
↓ 单菌落分离 Single colony isolation	
m-85(AHV <sup>r</sup> , Met)	13.0

图 6 *C. crenatum* L-苏氨酸产生菌选育谱系

Fig. 6 Genealogy of L-Threonine producers in *C. crenatum*

诱变得产 L-苏氨酸产生菌的选育谱系如图 6。

## 讨 论

1. Kase<sup>[12]</sup> 及 Hirakawa<sup>[14]</sup> 报道双缺或三缺突变株能积累大量 L-苏氨酸。我们试以大肠杆菌 B<sub>2851</sub> (Met<sup>-</sup>) 进行诱变,计得 Met<sup>-</sup>, Ile<sup>-</sup> 双缺 7 株, Met<sup>-</sup>, Lys<sup>-</sup> 双缺 15 株, Met<sup>-</sup>, Val<sup>-</sup> 双缺 4 株, Met<sup>-</sup>, α-氨基丁酸缺陷的双缺 10 株。经过发酵筛选,仅得 L<sub>4</sub> 菌株 (Met<sup>-</sup>, Lys<sup>-</sup>) 产 L-苏氨酸,且其产酸量未超过亲株 B<sub>2851</sub> 的产酸量,其余双缺突变株均丧失产 L-苏氨酸的能力。由于大肠杆菌苏氨酸合成调节机制比较复杂<sup>[14]</sup>,所以我们后来选育苏氨酸高产菌株的工作,则放在钝齿棒状杆菌上面。

2. 从我们选育抗 AHV 突变株筛选产 L-苏氨酸菌株的结果来看,获得抗 6mg/ml AHV 的突变株 1770 株,其中仅 6% 菌株合成苏氨酸,却有 20% 菌株积累异白氨酸。此结果与唐任天<sup>[15]</sup>报道相同。获得 AHV 抗性突变株、代谢调节上是使高丝氨酸脱氢酶对苏氨酸和异白氨酸的反馈抑制不敏感,代谢途径有可能继续向苏氨酸合成方向进行,但试验结果多数菌株苏氨酸积累不下来而积累异白氨酸,可能这些抗性菌株苏氨酸脱氢酶对异白氨酸的反馈抑制也不敏感,致使氨基酸合成代谢继续走向异白氨酸的积累。

3. 选育单一营养缺陷型 (Met<sup>-</sup>) 和抗反馈调节突变株 (AHV<sup>r</sup>) 均能获得苏氨酸的积累,从我们的试验结果已得证实,但其积累量均较低。进一步诱变,使营养缺陷型与抗反馈调节这两种性状组合于同一菌株上、产酸量有明显提高,如 LRA-96 (AHV<sup>r</sup>, Met<sup>-</sup>) 菌株。继续诱变 LRA-96 菌,经 L-苏氨酸发酵筛选结果分析,发现突变株按其苏氨酸产量向正、负两极分化,

产酸量尚低时,正向突变株所占比重高于负向突变株;随着产酸量提高后,负向分化比重增加达 50%,高于亲株者占 10% 强。说明逐步连续诱变有可能选育到高产菌株。虽然菌株产酸能力提高幅度不及 Nakamori, S. 报道的<sup>[16]</sup> (Nakamori, S. 报道的菌株 BBM-21 产酸能力是 18g/l),但还是逐步提高的。试验结果也说明,随着产酸量提高,被淘汰菌株的比例越大,因而筛选工作要建立在获得大量突变株的基础上。

4. m-85 菌株的发酵液中,除主产 L-苏氨酸外尚有一定量的赖氨酸。如果将此菌再选育为赖氨酸缺陷型,阻断 L-赖氨酸合成支路,不会建立起苏氨酸和赖氨酸对天冬氨酸激酶的协同反馈抑制,苏氨酸积累有可能再提高。

### 参 考 文 献

[1] 汤浅政昭: 化学と工業, 21: 534, 1968.

- [2] Kase, H. et al.: *Amino Acid and Nucleic Acid*, 24: 87, 1971.
- [3] Hirakawa, T. et al.: *Amino Acid and Nucleic Acid*, 26: 34, 1972.
- [4] Shiio, I. et al.: *Agri. Biol. Chem.*, 33: 1152, 1969.
- [5] Shiio, I. et al.: *Agri. Biol. Chem.*, 34: 448, 1970.
- [6] 陈琦等: 微生物学报, 13(1): 1, 1973.
- [7] <微生物诱变育种>编写组: <微生物诱变育种>, 科学出版社, 1973 年, 43—47, 69—71 页.
- [8] 陈琦、李玲阁: 微生物学报, 15(2): 119, 1975.
- [9] 潘家秀等: <蛋白质化学研究技术>, 科学出版社, 1962 年, 27—28, 79—81 页.
- [10] Hirakawa, T. et al.: *Agri. Biol. Chem.*, 37 (1): 123, 1973.
- [11] 李玲阁等: 微生物学报, 15(2): 148, 1975.
- [12] Kase, H. et al.: *Agri. Biol. Chem.*, 36: 1611, 1972.
- [13] Shiio, I. et al.: *Agri. Biol. Chem.*, 37 (3): 653, 1973.
- [14] Hirakawa, T. et al.: *Agri. Biol. Chem.*, 38 (1): 77, 1974.
- [15] 唐任天等: 微生物学报, 18(1): 45, 1978.
- [16] Nakamori, S. et al.: *Agri. Biol. Chem.*, 36: 1209, 1972.

## BREEDING OF L-THREONINE PRODUCING MUTANTS

Huang Horung Li Lingge Wang Xiuling

Li Zhiming Gue Yongfu Chen Qi

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

One hundred and fourteen strains of methionine auxotrophic mutants were derived from *E. coli* AS 1385 by N-methyl-N'-nitrosoguanidine (MNNG) treatment, among them a mutant B<sub>2851</sub> can accumulate small amount of L-threonine. By using B<sub>2851</sub> as a starting strain for treatment, a threonine producing mutant K<sub>1-73</sub> (Met<sup>-</sup>) was obtained with stepwise induction, 3.5g/l of L-threonine was accumulated in a medium containing 5% glucose and 75 mg/l methionine.

By the same way, 1770 strains of  $\alpha$ -amino- $\beta$ -hydroxy valeric acid (AHV) resistant mutant derived from *C. crenatum* AS 1542 were obtained, L-threonine was produced by about 6% of those organisms,

strain LR-1458 accumulated less than 1 g/l of L-threonine.

Using LR-1458 as a starting strain for stepwise induction, an AHV resistant and methionine auxotrophic mutant (AHV<sup>r</sup>, Met<sup>-</sup>) LRA-96 was obtained, which can accumulate 3.5 g/l of L-threonine in the cultural broth. This yield is a four-fold increase compared with the starting strain LR-1458 (AHV<sup>r</sup>).

A potent L-threonine producing mutant m-85 (AHV<sup>r</sup>, Met<sup>-</sup>) was obtained from LRA-96 by stepwise induction and single colony isolation. This strain produced 13 g/l of L-threonine. It has been proved that stepwise induction is effective artificer for breeding potent L-threonine producer.