

## 利用IABS模型筛选L-异亮氨酸高产菌株

张磊<sup>1</sup> 李丽燕<sup>2</sup> 刘党生<sup>2</sup> 王静敏<sup>2</sup>  
王伟平<sup>2</sup> 马海云<sup>2</sup>

(天津氨基酸公司研究所, 天津 300400)<sup>1</sup>

(沈阳药学院制药系, 沈阳 110015)<sup>2</sup>

IABS模型是本研究中确立的理性化菌种选育方法,可用于高效率地筛选多种调控变株。大大减少摇瓶筛选工作量。利用IABS模型以L-异亮氨酸产生菌 *Brevibacterium flavum* AS111为出发菌株,有目的地活化PC、HD和AHAS等酶,筛得变株23-10( $\alpha$ -AB<sup>r+</sup> + Suc<sup>r</sup> + Eth<sup>r+</sup>),23-10在优化的培养条件下可产生20mg/ml以上的L-异亮氨酸,且无L-亮氨酸积累。23-10变株25代后,产酸能力毫不下降。

**关键词** L-异亮氨酸;理性化筛选;黄色短杆菌。

L-异亮氨酸是人体必须氨基酸,也是国际市场上价格最昂贵、我国最为短缺的氨基酸之一。发酵法生产L-异亮氨酸的研究已有不少报道<sup>[1-3]</sup>。本研究以 *Brevibacterium flavum* AS111为出发菌株<sup>[4]</sup>,选育出L-异亮氨酸高产菌株23-10,23-10变株在优化条件下产酸率达20mg/ml以上。

对细菌生物合成异亮氨酸代谢控制过程分析注意到*B. flavum*生物合成L-异亮氨酸涉及到五个关键酶:PC、AK、HD、TD和AHAS\*,它们分别受不同的代谢产物的反馈控制,选育L-异亮氨酸产生菌,首先应考虑活化这些酶<sup>[6]</sup>。本研究就是利用文中介绍的IABS模型有目的地活化PC、HD和AHAS等酶,来强化L-异亮氨酸生物合成的代谢流。IABS模型将努力摆脱随机筛选的传统模式,以推理的方式进行,用于多种类型调控变株的筛选,并可将其调控机理以生物图象的方式显示出来。

1. 试剂: $\alpha$ -氨基- $\beta$ -羟基戊酸(AHV,上海生化所出品),S-( $\alpha$ -氨基乙基)-半胱氨酸(AEC,沈药合成室提供),dl- $\alpha$ -氨基丁酸( $\alpha$ -AB,上海新中化学厂出品),L-乙硫氨酸(Eth,英国charles druce limited出品),L-异亮氨酸羟肟酸(Ile. Hx,本研究中合成),琥珀酸钠(Suc,上海试剂一厂出品)。

2. 菌株:黄色短杆菌AS111(*Brevibacterium flavum* AS111, AHV<sup>r+</sup> + AEC<sup>r+</sup> + Eth<sup>r+</sup>, L-异亮氨酸产生菌,由谷氨酸产生菌T<sub>6-13</sub>获得)<sup>[4]</sup>。L-异亮氨酸生物测定指示菌为黄色短杆菌No. 8 (Ile<sup>-</sup>)。

3. 培养基:完全培养基(CM)。基本培养基(MM)参见文献[4],发酵培养基(PM)参见文献[5]。挖块培养基(DM, 1000ml):葡萄糖20g,硫酸铵10g,柠檬酸钠1.0g,磷酸二氢钾1.0g,磷酸氢二钾4.0g,硫酸镁0.5g,微量盐溶液

本文于1991年11月15日收到。

张磊现在天津华立达生物工程有限公司工作。

\* PC(磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶); HD(高丝氨酸脱氨酶); AK(天冬氨酸脱氢酶); TD(苏氨酸脱氨酶); AHAS( $\alpha$ -乙酰羟酸合成酶)

### 材料与方 法

#### (一)材料

1.0ml<sup>[3]</sup>, 生物素30μg, 硫胺素400μg, 氯化钙1.0mg, 琼脂粉10g, pH自然。

## (二)方法

1. 筛选方法: IABS 模型包括以下几步。

(1) 液体筛选: 吸取诱变处理菌液 0.1ml, 移至 2ml 含有一定浓度的选择性物质<sup>[6]</sup>的液体 MM 的试管中, 33°C 振荡培养三天, 然后进一步分离考察。

(2) 平板筛选: 将处理菌液涂布于含有一定浓度选择性物质的MM平板上, 33°C 培养 3—5 天后, 挑取菌落进一步考察。

(3) 点种琼脂块筛选: 在 25 ml 熔化的 DM 中加入一定量调节性物质<sup>[6]</sup>倾注于 φ90mm 的培养皿中, 凝固后用 φ6mm 的玻璃挖块器挖取琼脂块, 移至另一培养皿中, 用牙签挑取分离平板上的单菌落, 轻轻点种在琼脂块中央。琼脂块在 33°C 保湿培养三天, 然后将其移到含有检定菌 No. 8 的 MM 的生物检定盘上, 33°C 培养过夜, 观察琼脂块周围生长圈大小, 挑

取生长圈大的菌株进一步考察。

(4) 摇管筛选: 用牙签挑取培养出的单菌落, 将牙签投入盛有 3ml PM 的 φ18×180mm 的试管中, 33°C 振荡培养 72h, 无菌倒取培养液进行测定。摇管继续保持无污染状态, 待测定结果出来后用于传斜面。

2. 发酵培养: 产生菌 CM 斜面在 33°C 培养 18—24 h 后, 洗下菌苔, 取 1 ml 菌液接种到盛有 20ml PM 的 500 ml 三角瓶中, 33°C 振荡培养 (220r/min) 72h。

3. L-异亮氨酸定量: 采用微生物法、纸层析法<sup>[4]</sup>, 及氨基酸标准分析(日立 835-50 型氨基酸分析仪测定)。

## 结果与分析

### (一)目的变异株的获得

菌株 AS111 在实验条件下可产生 9.8 mg/ml 的 L-异亮氨酸, 以它作为出发菌株连续进行诱变, 利用 IABS 模型筛选, 最后得到目的变株 23-10。筛选过程见表 1。

表 1 目的变株的筛选过程  
Table 1 Procedure of selection of the target strain

Genealogy	IABS Model			Yield (mg/ml)
	Selector	Moderator	Enzyme	
AS111(AHV <sup>r</sup> + Eth <sup>r</sup> + AEC <sup>r</sup> )				9.8
↓ 09-01 ↓ 19-01 ↓ 20-08 ↓ 22-01 ↓ 23-10	DES + LiCl + UV(1')	Suc { 5mg/ml(1)* 5mg/ml(s)	Suc 5mg/ml Eth 1mg/ml PC	12.8
	NTG(1mg/ml, 80')	α-AB { 25mg/ml(1) 5mg/ml(s)	Val 2mg/ml Leu 2mg/ml AHAS	13.9
	UV(3')	α-AB { 30mg/ml(1) 20mg/ml(s)	Val 5mg/ml Leu 5mg/ml AHAS	13.9
	UV(3')	Eth { 25mg/ml(1) 25mg/ml(s)	Val 2mg/ml Leu 2mg/ml Eth 2mg/ml HD(TD)	
	N.S			14.0
	23-10(AHV <sup>r</sup> + AEC <sup>r</sup> + Eth <sup>r</sup> + Suc <sup>r</sup> + α-AB <sup>r</sup> )**			14.0

\*\* r—Resistant; g—Growth

\* 1—liquid screening, s—Solid screening.

在变株09-01及22-01的18h 发酵液中分别加入2mg/ml 不同的氨基酸或结构类

似物, 继续培养到72 h, 测定它们对异亮氨酸生物合成的影响, 结果见表 2。

表 2 添加物对菌株09-01及22-01的影响

Table 2 Effects of additive on strain 09-01 and 22-01

09-01	Additive	Lys	Met	Leu	Val	AHV	Control
	Relative yield	77	33	28	35	66	100
22-01	Additive	Leu	Val	Val+Leu	Met	Ile,Hx	Control
	Relative yield	96	97	101	73	96	100

由表中可以看出, 蛋氨酸, 亮氨酸和缬氨酸对09-01 变株产生异亮氨酸影响显著, 说明09-01 变株中起限制作用的酶主要是AHAS和HD 等。而缬氨酸、亮氨酸几乎不再影响22-01产生异亮氨酸, 蛋氨酸的影响也在相当程度上被削弱。22-01 分离纯化后得目的变株23-10。23-10能够利用琥珀酸作为唯一碳源迅速生长 (Suc<sup>r</sup>), 对  $\alpha$ -氨基丁酸和 L-乙硫氨酸有较强的抗

性( $\alpha$ -AB<sup>r</sup> + Eth<sup>r</sup>), 其生物合成 L-异亮氨酸的代谢流得到了强化。

## (二) IABS模型介绍

这里首次将理性化筛选同琼脂块法结合起来, 确立了一种新的筛选方法——点种琼脂块理性化筛选模型, 简称IABS模型(Inoculated agar-block rational selection model)。它的基本流程为:

出发菌株 → 液体筛选 → 固体筛选 → 点种琼脂块筛选 → 摇管筛选 → 复筛 → 目的变株  
 ↑ (增加调控 (淘汰非 株菌浓度) 调控株) (表达调控株) (优选) (复证)

IABS 是以最小的工作量把高达百万倍(或更多的)不需要的菌株淘汰掉, 而将调控变株及其调控机制以生物图像的方式表达出来。IABS 模型(图1)中使用了两个手段: 其一是选择性物质, 它能够直接或间接地参与有关的代谢控制, 借以使所需调控的变株选择性生长, 淘汰非调控变株; 其二是调节性物质, 利用它控制代谢流强度来调节琼脂块的生物圈(生长圈、抑制圈等)大小, 使非所需变株的生物圈压缩到尽可能小的程度, 同时使所需调控变株的生物圈充分表达。这样 IABS 模型与常规筛选方法相比, 就很少受随机因素(诱变, 药浓, 扩散度, 操作等)的困扰, 能够以很高的效率筛选多种类型的调

控变株。

图中照片为本研究最后一轮使用 IABS 模型琼脂块生物图谱, 照片中亲株对照的生长圈被琼脂块中调节性物质压缩到最小, 空白对照为亲株生长在不含调节性物质的琼脂块上, 它的生长圈最大, 这样被考察菌株的生长圈即表示代谢控制作用被改变的程度, 照片中生长圈大的便是所要筛选的调控变株。

应当明确的是, IABS 模型的思想是筛选调控变株, 调控变株并不一定都能直接表现出高产性状, 但它为高产提供了潜力。能否使高产性状得以表达尚需考虑这些调控变株的代谢调节方式变化情况和发酵培养条件。

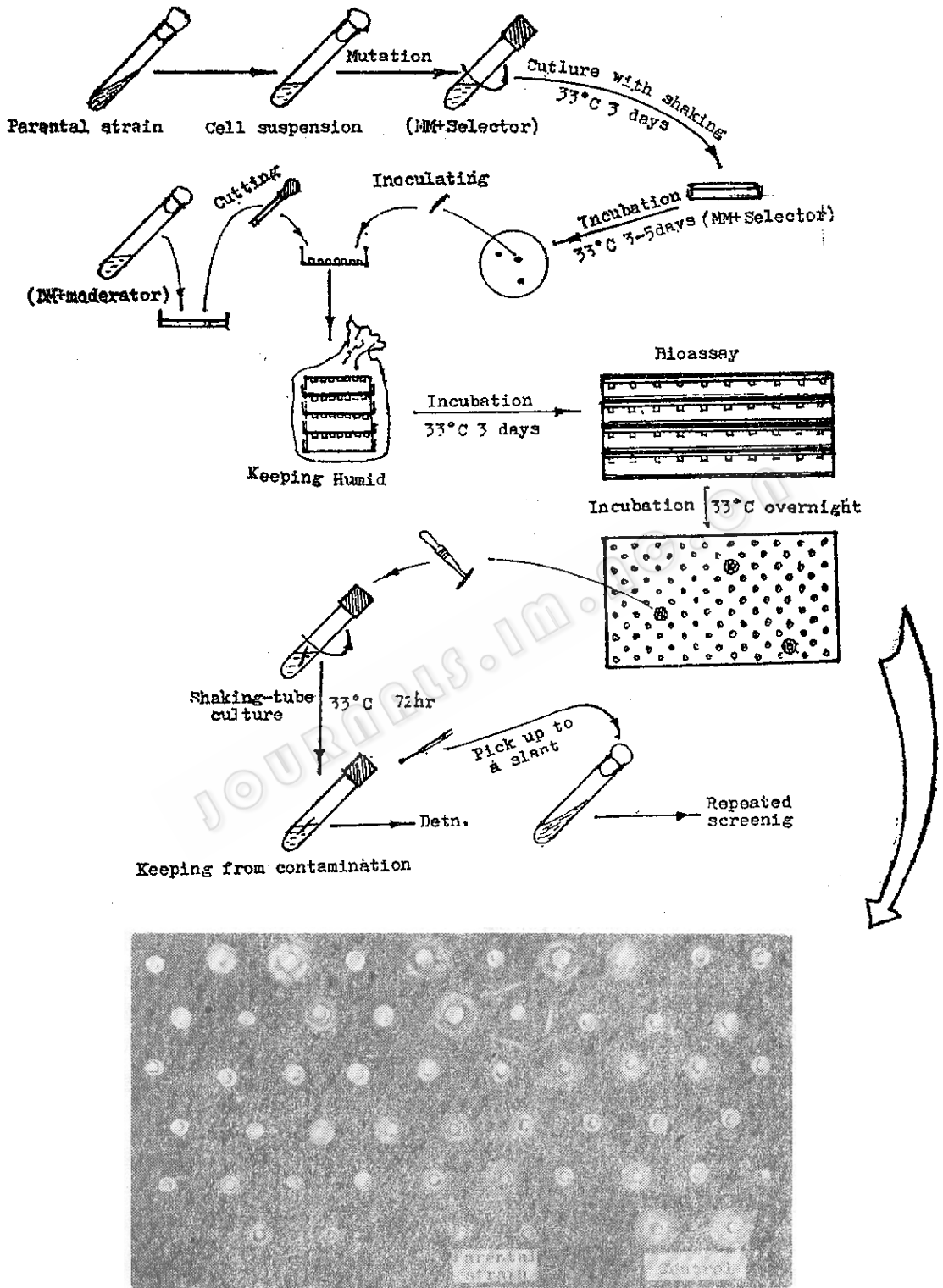


图 1 IABS模型操作示意图  
 Fig.1 Procedure of IABS model

### (三)发酵考察

PM的九种成分对产酸的影响各不相同,故根据实验确定硫酸铵、硫酸镁和微量元素浓度不变,取消氯化钙,将碳酸钙

含量提高到5%。选择葡萄糖、磷酸二氢钾、生物素和硫酸素四种成份利用均匀设计安排实验考察,因素水平安排及结果见表3。

表3 第一次均匀设计安排及结果

Table 3 Uniform design according to table  $U_{11}(11^{10})$

No.	Glucose(G) (g)	$KH_2PO_4$ (P) (g)	Biotin (B) ( $\mu$ g)	Thiamine(T)( $\mu$ g)	Yield(Y) (mg/ml)
1	8.0	0.4	15	60	10.3
2	10.0	0.8	15	80	10.4
3	12.0	0.2	12	120	16.2
4	14.0	0.6	12	40	13.0
5	16.0	1.0	9	60	9.5
6	8.0	0.2	9	100	10.5
7	10.0	0.6	6	120	5.8
8	12.0	1.0	6	40	9.3
9	14.0	0.4	3	80	5.8
10	16.0	0.8	3	100	4.4

实验数据利用计算机进行二次曲线逐步回线,得到回归方程:

$$Y = 7.8451 + 1.8777G - 0.0719G^2 - 0.12059P + 0.00089P^2 + 0.9630B - 0.0338B^2 - 1.2640T$$

$$(R = 0.9966, F = 63.67 > F(0.01/7, 2) = 9.55)$$

将其求偏微分得到葡萄糖的优化浓度为13%,生物素为0.15 $\mu$ g/ml。由于硫酸素和磷酸二氢钾在方程中无极值,将这两个因素重新安排均匀设计考察,结果见表4。

优化培养基配方为(100ml)葡萄糖130g,硫酸铵50g,生物素150 $\mu$ g,硫酸素1200 $\mu$ g,硫酸镁为0.5g,磷酸二氢钾3.5g,微量盐溶液1ml,碳酸钙50g。在优化条件下,发酵液中L-异亮氨酸标准

表4 第二次均匀设计安排及结果

Table 4 Uniform design according to table  $U_7(7^6)$

No.	$KH_2PO_4$ (g)	Thiamine ( $\mu$ g)	Yield (mg/ml)
1	0.05	100	11.1
2	0.20	40	13.2
3	0.35	120	20.5
4	0.50	60	16.8
5	0.65	140	11.6
6	0.80	80	11.1
7	0.95	160	7.6

分析测得产酸率为20.28mg/ml。发酵液中未检测到L-亮氨酸,糖转化率为25%。23-10变株具有良好的传代稳定性,二十五代后产酸能力毫下降。

### 参 考 文 献

- [1] Ikeda, S. et al.: *Agric. Biol. Chem.*, 43(9):137-140, 1978.
- [2] 小松原三郎等: *发酵与工业*, 40(9):813-818, 1982
- [3] Shio, I. et al.: *Agric. Bio. Chem.*, 37(9):2053-2061, 1973.
- [4] 刘党生: *沈阳药学院学报* 4(2):117-121, 1987.
- [5] 刘党生: *沈阳药学院学报* 4(3):194-197, 1987.
- [6] 张磊: *氨基酸杂志*, 55(3):27-29, 1992.

## Production of L-isoleucine by a Mutant Selected with IABS Model from *Brevibacterium flavum*

Zhang Lei<sup>1</sup> Li Liyan<sup>2</sup> Liu Dangsheng<sup>2</sup> Wang Jingmin<sup>2</sup>

Wang Weibing<sup>2</sup> Ma Haiyun<sup>2</sup>

(Tanjin Amino Acid Co.,Tanjin 300400) <sup>1</sup>

(Shenyang College of Pharm.,Shenyang 110015) <sup>2</sup>

A inoculated agar-block rational selection model ( IABS model) was set up. IABS model which could be used to select some kinds of regulatory mutants with high efficiency, was based on definite selectors and moderators, and the regulatory mechanism was showed in the form of bio-picture. In the present studies, a mutant, 23-10, growing quickly on succinate (as sole carbon source) medium, resistant to  $\alpha$ -AB and Eth etc., was derived from *Brevibacterium flavum* AS111 with IABS model on purpose to activate enzymes of PC, HD and AHAS. Thus, 23-10 was cultured with shaking at 33°C for 72h, production of L-isoleucine was more than 20 mg/ml and no L-leucine was produced. The productivity of 23-10 did not decrease after 25 generations.

**Key words** L-isoleucine; *Brevibacterium flavum*; IABS model; fermentation