

# 工业微生物学成就

——庆祝方心芳先生八十诞辰——

张树政 王修垣 主编

科学出版社

0.1

# 工业微生物学成就

——庆祝方心芳先生八十诞辰——

张树政 王修垣 主编

科学出版社

1988

## 内 容 简 介

本书是为庆祝工业微生物学家方心芳先生八十诞辰而作,共收集十九篇文章,如:氨基酸发酵的研究,甾体化合物的微生物转化与合成,麦角碱生产的研究,烷烃代谢和发酵生产二元酸,糖苷酶类的研究与应用,蛋白酶和脂肪酶的研究、生产和应用,微生物工业中的噬菌体,工业污染物的微生物降解及其生化处理,石油微生物学在中国的发展……等。这些研究工作已取得了很大进展,有的成果已推广应用并取得了经济效益。

本书可供微生物学研究工作者、大专院校有关师生及厂矿有关技术人员参考。

## 工业微生物学成就

——庆祝方心芳先生八十诞辰——

张树政 王修垣 主编

责任编辑 王惠君

科学出版社出版

北京朝阳门内大街 137 号

中国科学院印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

\*

1988年10月第一版 开本:787×1092 1/16  
1988年10月第一次印刷 印张:15 3/4 插页:2  
印数:0001—2,630 字数:365,000

ISBN 7-03-000553-8/Q·106

定价: 8.90 元

# 祝贺方心芳教授八十诞辰



中国科学院生物学部委员 方心芳 教授

## 序

为庆祝工业微生物学家方心芳先生八十寿辰,我们编写了这本小小的文集,以表示我们这些学生、朋友和同事们的衷心祝愿。祝愿他老人家健康长寿!祝愿他老人家为之艰苦创业、精心扶植、全力奉献的工业微生物学日益发展壮大,为祖国、为人民作出更大的贡献!

作者们是自愿组织起来各就自己所熟悉的领域,特别是以本人从事的工作为主写出总结性文章。有些作者则将国内有关工作进行了全面综述。文体也各有特色,未强求统一。由于是在微生物所内组织起来的,特别是因为时间仓促,编者未能邀请国内各方面的专家参加编写,难免有些重大的遗漏。例如,作为工业微生物学重要内容的传统发酵、溶剂、有机酸、抗生素、维生素及其它发酵工业,均未收入本集。维生素C二步发酵法是我国一项重大发明,获国家发明二等奖,并已转让给瑞士罗氏药厂;尹光琳同志也写好了文章交给编者,考虑到转让合同的关系,未能发表,谨向尹光琳同志致谢和道歉。

程光胜同志在筹备编写本集期间作了大量工作;微生物所领导对本文集的出版给予了大力支持,并提供了资助;科学出版社给予了大力协助,在此一并致谢!

张树政 王修垣

一九八七年七月

• • •

## 急国家之所急，想人民之所想

张树政

方心芳先生是我国现代生物学的开拓者之一，现任中国科学院生物学部委员、中国微生物菌种保藏管理委员会主任委员、中国科学院微生物所研究员、所学位委员会主任委员等职；曾任中国微生物学会副理事长、微生物学报主编、中国科学院微生物研究所副所长等职。方先生的主要经历及科学成就已由程光胜同志作传，刊载于谈家桢主编的《中国现代生物学家传》<sup>〔1〕</sup>中，本文即不多讲了。做为学生，跟随方先生三十七年之久，我深刻认识到方先生热爱祖国、热爱人民，有坚定的事业心和强烈的责任感。“急国家之所急，想人民之所想”，正是他一切工作的出发点。方先生不仅是一个卓越的工业微生物学家，更重要的是他做为这一学科的带头人和科研工作的组织者，为发展我国的工业微生物学作出了重大贡献。现仅就这一方面按几个历史阶段简述如下。

1949年黄海化学工业社迁京，1950年三月方先生随“大连科学研究所调查团”到大连调查后，知道有几百株菌株，因而向中国科学院竺可桢副院长提出分地保存菌种和成立全国菌种保藏委员会的建议。1951年中国科学院成立了菌种保藏委员会。从此，工业用菌种的重要性受到了国家的重视，再也不是方先生抱着菌种箱去防空洞避难的时代了。现在微生物所保藏的菌种已发展到八千多株。在1979年国家科委成立中国微生物菌种保藏管理委员会，方先生当选为主任委员。在成立大会上，他发言时激动万分，回想起自己四十多年来保藏菌种的苦辣酸甜的经历，实难以言语来表达。菌种对国民经济作出的贡献之大，是我们大家所共知的。

1952年8月1日原“黄海”的“发酵与菌学研究室”由中国科学院接收，仍以菌种保藏委员会的名义作为科学院所属的一个研究机构。1957年更名为中国科学院微生物研究室，成为工业微生物学研究基地。在此期间，方先生决不局限于自己专长的范围，而是根据国家需要，大力发展，积极调配人力。鉴于指导力量不足，特聘请专职或兼职学者来室工作，如请阎述初先生主持放线菌分类研究，请来波兰专家指导抗生素研究，请汤佩松先生兼任指导生理生化研究，请来王大粗先生主持土壤微生物研究，请来区嘉焯先生主持霉菌微生物和防霉药物的研究。根据当时国民经济需要，开展了淀粉酶、糖化酶、蛋白酶、酵母菌选育、沼气发酵、石油微生物及微生物浸铜等多方面的研究。糖化酶高产菌株及耐高温酵母的应用，为酒精工业增产节粮，作出了贡献。虽然我们没有推广沼气发酵，但发表的资料为某工厂的工业化生产及某些研究单位提供依据和参考。方先生从不只为自己的研究单位着想，而是着眼于推动全国工业微生物学的发展。在他的申请下，由竺可桢副院长批准，从当时菌保会调拨显微镜及其它仪器试剂及经费，支援王嶽教授在福州福建师范学院建立微生物学研究室，开展抗生素方面的研究工作。在此基础上，王教授的研究室发展壮大，日后作出很多贡献，如发现放线菌素23-21，并首先在我国研究成功蛋白酶抑制剂等。

1958年微生物研究室与应用真菌研究所合并,成立了我国第一个微生物研究所。戴芳澜先生任所长,方心芳先生任副所长并兼任工业微生物室和地微生物室的主任。在工业微生物室除继续开展酵母菌分类及遗传育种、根霉、乳酸菌及白地霉等菌的分类研究外,又建立了一些新的课题,如应著名化学家黄鸣龙合成甾体药物之需,建立了甾体转化研究组;为赶上国际形势,建立了谷氨酸发酵研究组。在三年经济困难时期,研究成功了培养白地霉生产“人造肉”代食品的工艺。1964年某位外国来访者说中国人虽能生产味精,但不会生产调味核苷酸。当时日本人在国际市场上与我国展开了激烈的味精市场争夺战。在此情况下,方先生组织大批人力攻关,筛选出产5'-磷酸二酯酶的桔青霉和产脱氨酶的米曲霉。在一年多一点的时间内成功地用酶法生产出调味核苷酸(后来这些菌种也用来生产其它核苷酸),并在天厨味精厂进行了扩大试验。由于“文革”干扰,未能发表,在本集中作了较详细的介绍。

在地微生物室则建立了石油微生物、微生物湿法冶金、光合细菌及海洋微生物等研究组(后一课题已转到青岛海洋研究所进行)。方先生对其他室的工作同样热情指导,关心倍至,如建议区嘉炜先生领导的生理生化室开展微生物代谢研究,从而建立了白地霉糖代谢研究组;建议开展工业用酶的研究,并亲自指导一些同志选育出较高活力的蛋白酶菌种,直到现在仍用于生产。后来则发展成今天的酶研究室。无锡酶制剂厂的几个生产品种大部分是微生物所的研究成果。特别是高活力糖化酶菌种的推广应用为国家创造了大量财富。饮水思源,仍应归功于方先生早年的引导。

方先生于1969年恢复工作,他亲自指导了烷烃代谢的研究,终于完成了长链二元酸的发酵生产,获得1979年国家发明三等奖。甲烷氧化菌研究组则发现了多孢子菌新属,得到了方先生的支持和赞许。

方先生热心于期刊工作。早在1939—1951年内地极端艰苦的环境下,几乎是独自一人办了《黄海发酵与菌学特辑》,共12卷72期。1957—1958年,编了微生物学参考资料三集。1959—1960年出了两卷《微生物》和《微生物通讯》。自微生物学报由微生物学会出版以来,方先生先后担任过编委和主编,付出了很多的心血和精力。

方先生特别重视对青年人的培养,安排研究课题,指出发展方向。他平时注重青年人练基本功,根深才能叶茂,经常教育每个人要坚定信心,不论在任何环境下都要努力工作,为国家、为人民作出贡献。在他的教导下,已成长起一大批科研骨干力量和不同学科的带头人。方先生的大门也是对全社会开放的。几十年来,登门求教者络绎不绝,函询者更是不计其数。方先生总是热情接待,毫无保留地把自己的经验传给别人,从不计较个人得失。我记得纺织科学研究所的薛迪庚同志就是在方先生指教后,获得了高活力 $\alpha$ -淀粉酶生产菌BF-7658,至今它的变异株一直用于工业生产,收到了很大的经济效益。

最后,用方先生自己的话作为结束语吧!他说:“我虽年老体弱,但能为社会主义四化建设发挥余热,感到内心踏实,精神愉快”。简单几句话道出了一个奉献者的心声。

## 参 考 文 献

- [1] 谈家桢主编:《中国现代生物学家传》,第一卷343页,湖南科学技术出版社,1985。

## 目 录

序.....	张树政、王修垣 ( i )
急国家之所急,想人民之所想.....	张树政 ( v )
氨基酸发酵的研究.....	陈 琦 ( 1 )
甾体化合物的微生物转化与合成.....	法幼华 ( 17 )
麦角碱生产的研究.....	陆师义、陈玉梅 ( 33 )
烷烃代谢和发酵生产二元酸.....	易祖华 ( 38 )
简述一群罕见的微生物——多孢子菌.....	陈子英 ( 50 )
糖苷酶类的研究及应用.....	张树政、戈苏国 ( 56 )
蛋白酶和脂肪酶的研究、生产和应用.....	徐家立 ( 79 )
我国固定化生物催化剂的研究和应用.....	黎高翔 ( 85 )
酶解法制造核苷酸.....	严自正 ( 100 )
微生物工业中的噬菌体.....	余茂劲 ( 115 )
工业污染物的微生物降解及其生化处理.....	杨惠芳 ( 129 )
石油微生物学在中国的发展.....	王修垣 ( 145 )
细菌浸出及其在矿冶中的应用.....	钟慧芳 ( 163 )
微生物腐蚀及其控制的研究.....	吕人豪 ( 176 )
工业器材霉腐菌种的初步调查名录.....	齐祖同 ( 195 )
根霉的研究.....	乐华爱 ( 201 )
酵母菌的研究.....	李明霞 ( 211 )
酵母菌的遗传和育种.....	蔡金科 ( 223 )
菌种保藏.....	李钟庆 ( 234 )
<b>附录:</b> 中国科学院微生物研究所与工业微生物有关的部分受奖项目表.....	( 245 )



# 氨基酸发酵的研究

陈琦

## 1. 引言

氨基酸是人和其它生物有机体的组成成分,起着与生命现象密切相关的重要作用。氨基酸的生产和应用早已引起人们的普遍重视。

氨基酸的制造是从1820年水解蛋白质开始的。1850年在实验室内化学法也合成了氨基酸。利用微生物方法生产氨基酸在本世纪50年代末才得到了具有实际应用意义的结果。1957年日人木下等报道了用微生物直接发酵糖类生产L-谷氨酸的研究及工业化投产,进而推动了其它氨基酸发酵的研究和生产<sup>[1]</sup>。

我国的谷氨酸发酵研究开始于1958年。至1961年周光宇等<sup>[2]</sup>和钱存柔等<sup>[3-4]</sup>先后连续报道了产L-谷氨酸细菌——酮戊二酸短杆菌(*Brevibacterium ketoglutarium* nov. sp.) 2990-6的分离筛选,分类鉴定和代谢方面的研究<sup>[5-8]</sup>。但该菌未能应用于生产。

我们从1962年开始进行L-谷氨酸发酵的研究,成功地分离筛选到两株产L-谷氨酸细菌,鉴定为两个新种,分别定名为北京棒状杆菌 AS 1.299 (*Corynebacterium pekinense* nov. sp. AS1. 299)<sup>[9]</sup>和钝齿棒状杆菌 AS 1.542 (*Corynebacterium crenatum* nov. sp. AS

表1 用微生物法工业生产氨基酸

氨基酸	方法	原料	微生物
L-谷氨酸	直接发酵	葡萄糖, 淀粉水	<i>Corynebacterium pekinense</i> AS1.299
		解糖或废糖蜜	<i>C. crenatum</i> AS1.542
DL-丙氨酸		葡萄糖	<i>Arthrobacter</i> sp. AS1.8
L-缬氨酸		葡萄糖	<i>C. pekinense</i> AS1.586
L-异亮氨酸		葡萄糖或淀粉水解糖	<i>C. crenatum</i> AS1.998
L-亮氨酸		葡萄糖	<i>C. crenatum</i> AS1.1004
L-赖氨酸		淀粉水解糖	<i>C. pekinense</i> AS1.563
		废糖蜜	<i>C. crenatum</i> PI-3-2
L-苏氨酸		葡萄糖	<i>C. crenatum</i> m-85
L-脯氨酸		葡萄糖	<i>C. pekinense</i> AS1.727
L-瓜氨酸		葡萄糖	<i>C. pekinense</i> B7
L-鸟氨酸		葡萄糖	<i>C. pekinense</i> B147
L-精氨酸		葡萄糖	<i>C. crenatum</i> R532
L-苯丙氨酸		葡萄糖	<i>C. crenatum</i> AC-30-19-19
L-色氨酸		葡萄糖	<i>C. pekinense</i> CG-45
L-异亮氨酸		前体物发酵	$\alpha$ -溴丁酸
L-色氨酸	邻氨基苯甲酸		<i>Candida arborea</i> AS2.566
天门冬氨酸	酶转化	反丁烯二酸 + $\text{NH}_3$	<i>C. pekinense</i> AS1.299

1.542)<sup>[10]</sup>。1965年我们采用上述两菌,在国内首先实现了在30m<sup>3</sup>罐上L-谷氨酸发酵的大规模工业化投产,并向全国推广,逐步建立起了我国的L-谷氨酸发酵工业。以后,各生产单位和有关研究部门做了大量工作,改变了味精生产工艺,促进了生产发展。至1986年,我国味精年产量已达8万多吨,较1965年全国产量提高了近30倍。

L-谷氨酸发酵投产后,我们又对以上两株L-谷氨酸生产菌AS1.299和AS1.542进行了人工诱变处理,在国内首先选育出了L-赖氨酸生产菌及产其它各种氨基酸的突变株,其中有些菌株已应用于生产,从而大大推动了国内氨基酸发酵的研究和生产。目前,我们利用代谢调控的原理,已选育出14种氨基酸的生产菌(表1)。由于解除其氨基酸生物合成中的代谢调节,使氨基酸大量积累。这些研究为建立我国的多种氨基酸工业打下了一定基础,并对推动和扩大氨基酸在调味料、食品、饲料和医药等方面的应用起了一定作用。

本文主要概述我们实验室所进行过的氨基酸发酵方面的研究结果。

## 2. 氨基酸生产菌的分离、筛选和遗传育种

### 2.1 野生菌株的分离与筛选

从自然界的不同环境中采集试样,分离、筛选产氨基酸优良菌株的比较典型的例子是L-谷氨酸产生菌,其次是DL-丙氨酸和L-缬氨酸产生菌。大量研究表明,应用于L-谷氨酸发酵生产中的优良菌株多属棒状杆菌属(*Corynebacterium*)、小杆菌属(*Microbacterium*)、节细菌属(*Arthrobacter*)和短杆菌属(*Brevibacterium*)中的一些种。它们在分类学上虽然属于不同的属,但却有共同的特性。细胞形态为类球形、短杆或棒状,无鞭毛,不运动;不形成芽胞;革兰氏染色阳性;要求生物素作为生长因素;在通气条件下发酵糖类生产L-谷氨酸。愈来愈多的研究证明,生物素是控制L-谷氨酸产量高低的重要因素。生物素的作用机制是控制细胞膜组成,从而影响其渗透性。当菌体生长在生物素限量的条件下,增强细胞的渗透性,引起谷氨酸向胞外渗透。此外,油酸、表面活性剂和青霉素也同生物素一样能引起细胞膜渗透性的改变,是L-谷氨酸发酵的控制因素。因此,在分离筛选产L-谷氨酸菌株中,既要注意微生物的种属分布和产酸力的强弱,同时在发酵研究中,必须

采取有效措施控制细胞膜的渗透性,以利于L-谷氨酸的分泌<sup>[11]</sup>。

北京棒状杆菌(*C. pekinense*) AS1.299和钝齿棒状杆菌(*C. crenatum*) AS1.542均要求生物素作为必需生长因素。加入适量的硫胺素和蛋白质水解物有促进细菌生长和L-谷氨酸积累的作用。如图1所示,当生物素用量为2μg/l时,这两株菌积累大量L-谷氨酸,超过或低于这一用量,则L-谷氨酸的产量都明显下降。用适量的玉米浆和豆饼水解物或麸皮浸液可以代替纯生物素、硫胺素和酪素水解物作为生长因素而产生大量L-谷氨酸<sup>[12-15]</sup>。

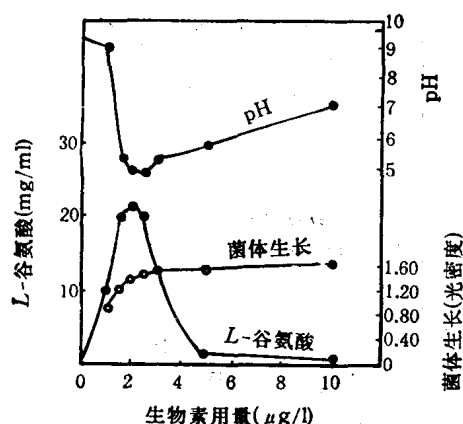


图1 生物素用量与L-谷氨酸积累的关系

上述要求生物素的产L-谷氨酸细菌也可视为天然生物素缺陷型,通过限量提供生

物素以改变细胞膜渗透性达到过量积累 L-谷氨酸的目的。

此外, 鉴于高产 L-谷氨酸菌株在分类学上归于革兰氏阳性细菌中的上述各属, 因此在分离这类细菌时, 我们采用了普通肉汁培养基和合成培养基加入 0.3—0.4% 苯乙醇, 以常法进行平板分离。苯乙醇有效地抑制了革兰氏阴性细菌的生长, 大大提高了上述革兰氏阳性细菌出现的机率, 加快了分离筛选 L-谷氨酸产生菌的进程<sup>[16]</sup>。我们分离到的产 DL-丙氨酸较高的菌株 AS 1.8 也属于革兰氏阳性菌, 该菌 (*Arthrobacter* sp.) 已用于生产<sup>[17]</sup>。

## 2.2 诱变育种

微生物在正常代谢中, 氨基酸的合成同其需要是平衡的, 严格防止这些产物的过量积累, 待这些物质消耗到最低浓度时, 细胞再重新开始合成, 维持其细胞合成的经济性。要人为地使氨基酸等代谢产物过量积累, 必须解除或突破微生物的代谢调节控制, 把生物合成的代谢途径朝人们所希望的方向加以引导, 实现人为控制发酵生产氨基酸。这是氨基酸发酵工业得以建立的一个重要前提。因此, 如果说分离筛选野生菌株并进而研究控制其胞膜渗透性, 是获得高产 L-谷氨酸菌株的重要途径, 则采用人工诱变, 选育营养缺陷型和抗反馈调节突变株以及这二者的多重突变体, 是获得生产其他多种氨基酸的另一有效方法。

### 2.2.1 营养缺陷型突变株

利用营养缺陷型突变株生产氨基酸, 是限制某种反馈抑制物或阻遏物以解除其反馈调节机制。由于在营养缺陷菌中, 生物合成途径中某一步发生酶缺陷, 合成反应不能完成。外加限量的所要求的营养物, 克服生长的障碍, 而又使最终产物不致于积累到引起反馈调节的浓度, 从而有利于中间产物或某种最终产物的积累。

在直线式的氨基酸合成途径中, 营养缺陷型突变株只能积累中间产物, 不能积累最终产物。因此, 我们以北京棒状杆菌 AS 1.299 为出发菌株, 经亚硝基胍多次诱变处理和筛选分别获得产鸟氨酸突变株 B147 和产瓜氨酸突变株 B<sub>7</sub>, 前者积累鸟氨酸 1.4%<sup>[18]</sup>, 后者积累瓜氨酸 1.73%。经初步发酵试验, 突变株 B<sub>7</sub> 瓜氨酸产量可达 2.6—2.8%<sup>[19]</sup>。突变株 B<sub>147</sub> 和 B<sub>7</sub> 均要求精氨酸。试验证明这两株均缺失精氨酸琥珀酸酶。因而, 在培养基中限量加入生长要求的精氨酸有利于鸟氨酸或瓜氨酸的积累。但未发现大量积累最终产物精氨酸的营养缺陷型突变株。

在选育产 L-脯氨酸的突变株中, 首先由北京棒状杆菌 AS 1.299 诱变出一株产脯氨酸的突变株 AS 1.727, 要求鸟氨酸。这说明, 谷氨酸到鸟氨酸的合成途径几步反应中某一步发生了酶缺陷。因此, 合成代谢受到障碍, 增强了谷氨酸向脯氨酸的转化。在适宜的培养条件下, 该突变株产脯氨酸高达 25—27 mg/ml<sup>[20]</sup>。

其次是钝齿棒状杆菌 AS 1.542 经多次诱变获得的精氨酸缺陷型突变株 F-213。试验证明, 突变株 F-213 缺乏精氨酸琥珀酸酶。经初步试验, 在含 15% 葡萄糖培养基中, 产 L-脯氨酸 23.4 mg/ml<sup>[21]</sup>。由此, 同样可以认为, 精氨酸合成代谢受阻, 在培养基中限量提供精氨酸有利于谷氨酸向 L-脯氨酸合成的方向转化。

在分叉代谢途径中, 利用营养缺陷型突变株, 通过解除协同反馈调节, 可以有效地使

表 2 不同营养缺陷型突变株产 L-赖氨酸的水平

突 变 株 号	要求的氨基酸	产 L-赖氨酸量 (mg/ml)
AS1.563	高丝氨酸	17.93
AS1.712	高丝氨酸	14.33
AS1.713	高丝氨酸	13.60
AS1.714	高丝氨酸	11.33
AS1.715	苏氨酸	6.66
AS1.718	亮氨酸	6.33
AS1.719	苏氨酸	2.33
AS1.720	苏氨酸+蛋氨酸	2.00

另一分叉途径中的终产物积累。

以北京棒状杆菌 AS 1.299 为出发菌株,经硫酸二乙酯 (DES) 诱变处理,获得了积累大量 L-赖氨酸和 L-缬氨酸的突变株。发现了要求高丝氨酸、苏氨酸、亮氨酸和蛋氨酸+苏氨酸的不同突变株积累 L-赖氨酸的水平是不同的,其中以高丝氨酸缺陷型突变株产 L-赖氨酸能力最强,见表 2<sup>[22]</sup>。

从菌株 AS 1.299 获得的一株大量积累 L-缬氨酸的突变株 AS 1.586,其营养要求除异亮氨酸外,还可利用高丝氨酸或苏氨酸作为生长因子。有趣的是,如延长培养时间,未表现出对氨基酸的要求,因此是一株不够严格的缺陷型突变株。但当培养基中异亮氨酸用量过高时,则仍抑制缬氨酸的产生<sup>[23]</sup>。

此外也发现,当产脯氨酸突变株 AS 1.727(orn<sup>-</sup>) 培养基中含精氨酸 250 μg/ml 时, L-脯氨酸产量可达最高,而含 500 μg/ml 时其产量明显下降<sup>[24]</sup>。

因此,利用营养缺陷型突变株进行氨基酸发酵生产时,要严格控制突变株所要求的氨基酸的浓度,如用量过高,仍起反馈抑制作用而降低产物的积累。

## 2.2.2 抗反馈调节突变株

自 Adlberg 发现抗氨基酸结构类似物突变株往往可积累相应的氨基酸的现象以来,推动了代谢控制理论、菌种选育和氨基酸发酵等方面的研究。由于抗氨基酸结构类似物突变株,克服了生长障碍而能够正常生长后,其正常代谢机制已被解除,因而能够积累多量的最终产物。这类突变株称为抗反馈调节突变株。

我们从钝齿棒状杆菌 AS 1.542 为出发菌株,经亚硝基胍处理获得了许多抗 α-氨基-β-羟基戊酸 (AHV、苏氨酸和异亮氨酸结构类似物)的突变株。从含 6 mg/ml AHV 的平板上分离出的 1770 株抗性突变株中 114 株产少量苏氨酸,其中最优良的一株 LR-1458 产量约 1 mg/ml<sup>[24]</sup>。

然而,在抗 AHV 突变株中大多数能积累相当量的 L-异亮氨酸,而且随着 AHV 浓度的增高,产 L-异亮氨酸突变株出现的机率相应增加,见表 3<sup>[25]</sup>。产 L-异亮氨酸最高的 LR-1000 突变株和 AS 1.998 就是在抗 AHV 8 mg/ml 的平皿上获得的<sup>[26]</sup>。这两株菌 L-异亮氨酸产量达 1% 以上。

以 AS 1.299 及 AS 1.542 菌为出发菌株进行人工诱变均能获得大量抗 S-(2-氨基乙基)-L-半胱氨酸(简称 AEC, 赖氨酸结构类似物)突变株。与出发菌株相比,这些抗 AEC

表3 抗不同剂量 AHV 突变株产 L-异亮氨酸的分布

AHV 量 (mg/ml)	获得的抗性菌株数	产 L-异亮氨酸的菌株数	百分率(%)
5	136	38	27.9
7	96	31	32.3
8	680	311	45.7

突变株几乎全部能积累相当量的赖氨酸,有些菌株产酸水平可达 2.0% 以上,由此看来初筛产酸水平虽然不高,但对迅速得到产赖氨酸菌株,却是一个简便有效的办法。从已报道的工作看,这类抗 AEC 突变株之所以能积累大量赖氨酸,是解除了苏氨酸和赖氨酸对天门冬氨酸激酶的协同反馈抑制,而支路的高丝氨酸脱氢酶仍受苏氨酸的反馈调节。

### 2.2.3 营养缺陷型与抗反馈调节双重突变株

近些年来不断报道,营养缺陷型与抗反馈调节双重突变株应用于氨基酸的发酵生产。研究表明,应用这些突变株较采用营养缺陷型或抗反馈调节单标记的突变株,对提高某些氨基酸的产量有明显的效果。

我们把上述产 L-苏氨酸的抗 AHV 突变株 LR-1458 进一步诱变后,选育出的抗 AHV 的蛋氨酸缺陷型突变株 m-85,较其亲株(LR-1458)产 L-苏氨酸提高了 10 倍以上,诱变谱系见图 2<sup>[24]</sup>。

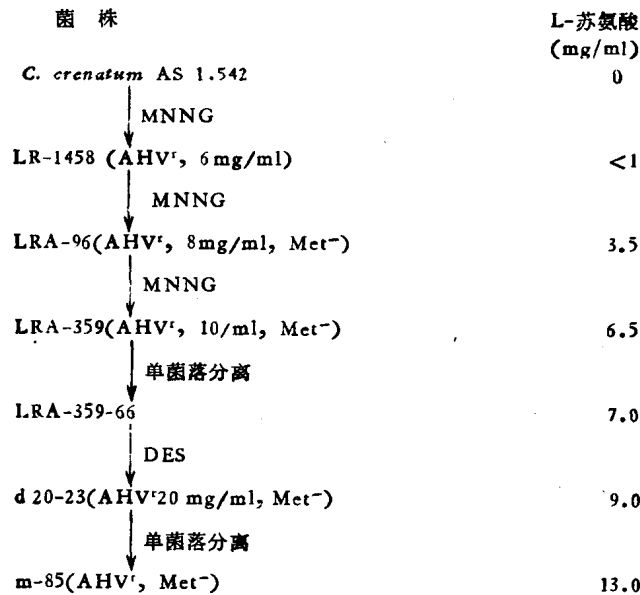


图2 *C. crenatum* L-苏氨酸产生菌选育谱系

通过诱变,从产 L-赖氨酸的高丝氨酸缺陷型 AS 1.563 中得到的抗 AEC 突变株 RR<sub>2</sub>-16-22 和从抗 AEC 突变株 No. 253 中得到的高丝氨酸缺陷型 365-259-3,产 L-赖氨酸水平均高于其亲株<sup>[27]</sup>。

以钝齿棒状杆菌 AS 1.542 为出发菌株,诱变选育出抗对氟苯丙氨酸 (PFP, 苯丙氨酸结构类似物)的突变株,在 405 株中有 105 株可产少量 L-苯丙氨酸,其中以 No. 128 号

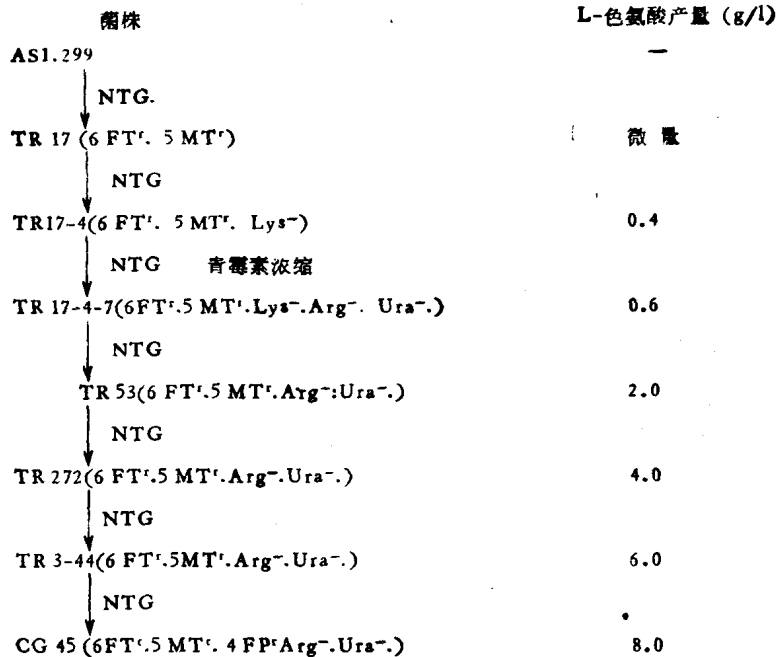


图3 产色氨酸诱变菌株谱系

菌产酸水平最高,达 3.0 mg/ml。又将菌株 No. 128 进一步诱变,得到一株次黄嘌呤缺陷型 AC-30-19-19,产 L-苯丙氨酸达 7 mg/ml<sup>[27]</sup>。

以 L-谷氨酸菌北京棒状杆菌 AS 1.299 为出发菌株,获得了产生 L-色氨酸的菌株,又采用亚硝基胍多次诱变处理,获得了几株突变株,其中 CG<sub>45</sub> 突变株属于精氨酸和尿嘧啶缺陷型,并具有对 5 MT, 6 FT, 4 FP 的抗药性。在以葡萄糖为碳源,硫酸铵为氮源而不需添加任何前体物的培养基中,直接发酵五天,产酸能达 8 g/l<sup>[28]</sup>。产 L-色氨酸菌的诱变谱系见图 3。

如上所述,由于 L-精氨酸是直线式生物合成途径的最终产物,不能大量积累。因此选育 L-精氨酸生产菌的方法,即采用钝齿棒状杆菌 AS 1.542 为出发菌株经亚硝基胍多次逐级诱变,获得了一株能够积累大量 L-精氨酸的抗磺胺胍并要求组氨酸的双重突变株 971.1 (SG<sup>r</sup>, His<sup>-</sup>)。在以葡萄糖为碳源、硫酸铵为氮源的培养基中直接发酵 4 天,产酸最高可达 25.2 mg/ml,并具有较高的产酸稳定性。该突变株的诱变谱系见图 4<sup>[29]</sup>。

对 971.1 突变株积累 L-精氨酸的机制,尚应进一步探讨。已知精氨酸与组氨酸分属不同族的氨基酸,在生物体内的代谢途径无明显的联系,而它们的合成过程都需要谷氨酸参与,因而存在着谷氨酸的流向分配。组氨酸合成阻断,可能有助于谷氨酸更多地参与精氨酸的合成。至于磺胺类药物抗性株的产酸机制也不明了。可能是由于抗性株的胞膜透性发生了变化,导致胞内氨基酸的外渗或代谢途径的改变,影响到氨基酸的合成,但这种推测有待于实验证实。

由上述结果看来,采用连续诱变选育多标记的突变株,对提高产氨基酸的水平有明显效果,如表 4 所示。但其代谢调节机制的解除尚待进一步探讨。

此外,我们以亚硝基胍诱变处理钝齿棒状杆菌 AS 1.542 选育出的产大量亮氨酸的突变株 AS 1.1004<sup>[30]</sup>。该突变株虽经过多次诱变处理,营养要求与其出发菌株 AS 1.542 相

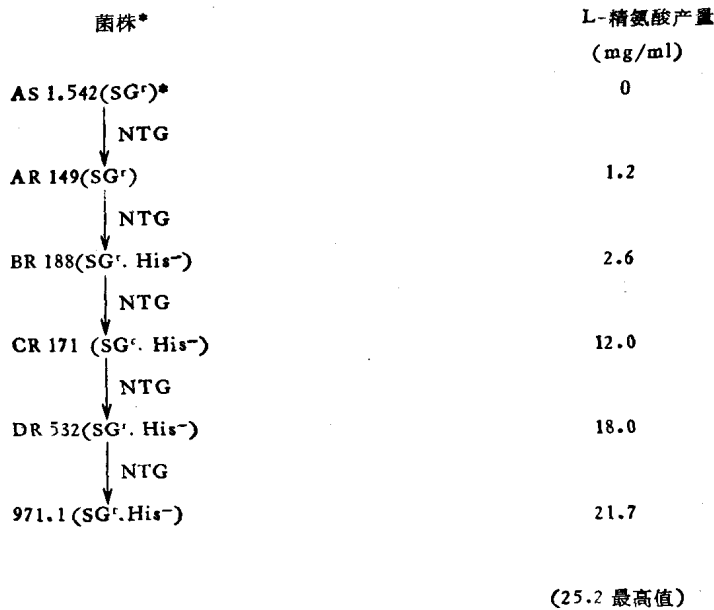


图4 精氨酸产生菌诱变谱系

\* 诱变最终获得菌株 971.1 较出发菌株 A S1.542 的抗磺胺胍药物能力有明显提高。

表4 营养缺陷型与抗氨基结构类似物双重突变株的氨基酸生产

产生的氨基酸	产 量 (mg/ml)	产生菌及其突变株特性	产生菌亲株的特性及其产量	
			特 性	产量 (mg/ml)
L-苏氨酸	13.0	钝齿棒状杆菌 m-85(AHV <sup>r</sup> , Met <sup>-</sup> )	钝齿棒状杆菌 LR-1458(ΔHV <sup>r</sup> )	1.0
L-赖氨酸 HCl	50.0	钝齿棒状杆菌 365-25P-3(AEC <sup>r</sup> , Hse <sup>-</sup> )	钝齿棒状杆菌 No. 253(AEC <sup>r</sup> )	20.0
	45.0	北京棒状杆菌 RR <sub>2</sub> -16-22(Hse <sup>-</sup> , AEC <sup>r</sup> )	北京棒状杆菌 AS1.563(Hse <sup>-</sup> )	36.6
L-苯丙氨酸	7.0	钝齿棒状杆菌 AC 30-19-19 (PPF <sup>r</sup> , Xan <sup>-</sup> /HXan <sup>-</sup> )	钝齿棒状杆菌 No. 128(PPF <sup>r</sup> )	3.0
L-色氨酸	8.0	北京棒状杆菌 CG45(6FT <sup>r</sup> , 5MT <sup>r</sup> , 4FP <sup>r</sup> , Agr <sup>r</sup> , Ura <sup>-</sup> )	北京棒状杆菌 TR 17(6FT <sup>r</sup> , 5MT <sup>r</sup> )	微量
L-精氨酸	21.7	钝齿棒状杆菌 971.1 (SG <sup>r</sup> 8mg / ml, His <sup>-</sup> )	钝齿棒状杆菌 AR 149(SG <sup>r</sup> , 4mg/ml)	1.2

注: ΔAHV<sup>r</sup>: 抗 α-氨基-β-羟基戊酸; AEC<sup>r</sup>: 抗 S-(α-氨基乙基)-L-半胱氨酸; PPF<sup>r</sup>: 抗对-氟苯丙氨酸; HSE<sup>-</sup>: 要求高丝氨酸; Xan<sup>-</sup>/HXan<sup>-</sup>: 要求黄嘌呤或次黄嘌呤; 6FT<sup>r</sup>: 抗 6-氟-色氨酸; 5MT<sup>r</sup>: 抗 5-甲基-色氨酸; 4FP<sup>r</sup>: 抗 4-氟苯丙氨酸; Arg<sup>-</sup>: 要求精氨酸; Ura<sup>-</sup>: 要求尿嘧啶; SG<sup>r</sup>: 抗磺胺胍; His<sup>-</sup>: 要求组氨酸。

同,故其产酸机制尚待进一步研究,因该突变株既非营养缺陷型,也未发现它抗某种氨基结构类似物。

## 2.3 原生质体融合

我们采用原生质体融合技术选育苯丙氨酸产生菌,是根据代谢调控原理进行的。以北京棒状杆菌 AS 1.299 为出发菌株,经亚硝基胍诱变处理,获得抗 2MT 要求酪氨酸的双重突变株 4a(5MT<sup>r</sup>, Tyr<sup>-</sup>),再将该突变株和已有的产苯丙氨酸菌株钝齿棒状杆菌 Ac 30-19-19 (PFP<sup>r</sup>, Hxan<sup>-</sup>/xan<sup>-</sup>) 分别标记氯霉素和链霉素抗性,得抗性菌株 4a-1 (5MT<sup>r</sup>, Tyr<sup>-</sup>, Chl<sup>r</sup>) 和 Ac-2(PFP<sup>r</sup>, Hxan<sup>-</sup>, Str<sup>r</sup>)。然后,将 4a-1、Ac-2 两抗性菌株的原生质体进行融合,经再生后得到上述两种抗生素抗性的融合子 696 株,其中少数是原养型。对融合子进行了性状鉴定和产酸试验。结果表明,有的融合子产生的氨基酸与亲株不同,其中融合子 F 49(Str<sup>r</sup>, Chl<sup>r</sup>, PFP<sup>r</sup>, 5MT<sup>r</sup>, Hxan<sup>-</sup>) 的苯丙氨酸产量在同批试验中比亲株 Ac-2 高 50%。融合子 F 49 的选育谱系见图 5<sup>[31]</sup>。

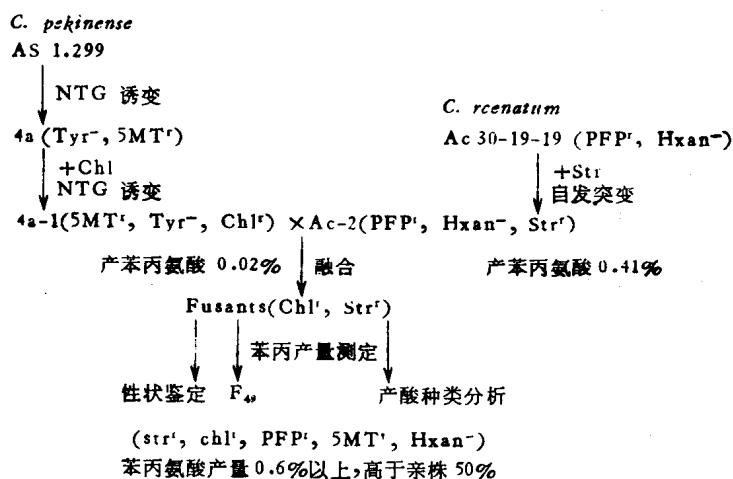


图 5 融合子 F<sub>49</sub> 选育图示

根据以上初步结果,我们认为虽然近几年来国外在选育赖氨酸和苏氨酸生产菌中已有运用原生质融合技术的报道,并取得一定结果,但利用该项技术选育氨基酸高产菌种尚有不少问题有待进一步探讨。

## 3. 氨基酸生物合成的代谢调控

### 3.1 L-异亮氨酸

从已报道的工作看,抗 AHV 突变株积累苏氨酸的机制,是由于其天门冬氨酸激酶和高丝氨酸脱氢酶不再受苏氨酸的反馈调节,从而有利于苏氨酸的过量积累。同样,抗 AHV 突变株过量积累 L-异亮氨酸的原因,可能是 L-异亮氨酸合成途径中的关键酶——苏氨酸脱氢酶和乙羟酸合成酶受 L-异亮氨酸的反馈调节已脱敏或解除。我们以下的结果初步证明了这一设想。

我们对钝齿棒状杆菌 AS 1.542 及其抗 AHV 突变株 AS 1.998 的异亮氨酸生物合成及其代谢调节初步研究结果表明,在突变株 AS 1.998 中的苏氨酸脱氢酶 (TDase) 和乙酰羟酸合成酶 (AHAase) 的总活性高于其亲株 AS 1.542。另一方面,在以苏氨酸



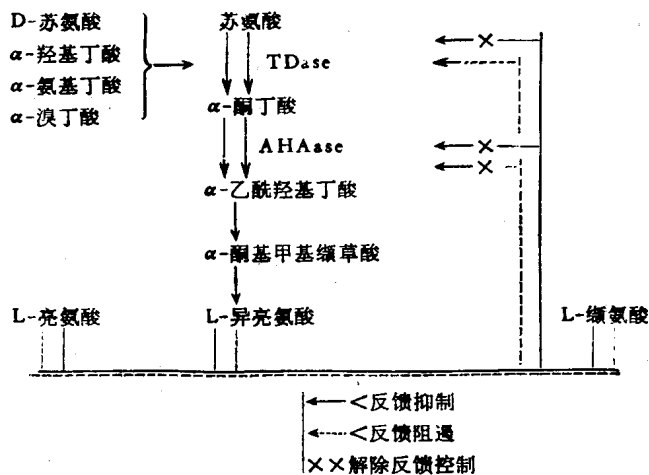


图6 AS 1.998L-异亮氨酸合成调节示意图

或丙酮酸的反应体系中，分别加入等量的亮氨酸、异亮氨酸和缬氨酸，对 TDase 和 AHAase 的抑制作用在突变株 AS 1.998 中较其亲株 AS1.542 为低。这些结果表明，在突变株 AS1.998 中，上述两种酶受异亮氨酸、亮氨酸和缬氨酸的反馈调节作用已部分解除，因而导致了 L-异亮氨酸的过量积累<sup>[32]</sup>。

然而，TDase 及 AHAase 仍受到末端氨基酸一定程度的反馈抑制，转氨酶没有太大变化，尤其 Thr 的强烈反馈控制机构仍未触动。因此，若对该菌再加以遗传上的改造，有可能使 AS 1.998 进一步提高 ILeu 的产量。

经测定，钝齿棒状杆菌 AS 1.542 具有天门冬氨酸酶，天门冬氨酸激酶 TDase 及 TAase。由此可以推测，该菌是从 Thr 经 KB 而产生 ILeu 的。根据上述各项试验结果，诱变株 AS 1.998 合成 ILeu 的调节机构的改变，可能如图 6 所示。

但是我们早已发现，在有溴代十六烷基胺盐存在时， $\alpha$ -溴丁酸， $\alpha$ -氨基丁酸， $\alpha$ -羟基丁酸或 D-Thr 并不是通过正常途径转化为 KB 进而合成 ILeu 的，而是逆向转化为 Asp<sup>[33]</sup>。这一奇怪的现象未见报道。因此，AS 1.542 菌有无别的代谢途径与调节机构，仍是一个值得进一步探讨的问题。

### 3.2 L-缬氨酸

我们从钝齿棒状杆菌 AS 1.542 出发，诱变获得一株 L-缬氨酸生产菌 AS1.1001。通过对其进行酶学研究的初步结果，探讨了该菌合成缬氨酸的途径及调节控制<sup>[34]</sup>。

通过对 AS 1.542 与 AS 1.1001 两菌株的 TDase 及 AHASase 的比活性与总活性的比较，结果表明，AS 1.1001 菌的 TDase 在三种酶制品中均较 AS 1.542 少三分之一左右，完整细胞也具有一定的酶活性。而 AS 1.1001 的 AHASase 明显增加。

末端氨基酸对 AS 1.542 菌的 TDase 及 AHASase 有反馈抑制作用，从而调节产物的合成。在 AS 1.1001 菌中，缬氨酸对 TDase 的抑制减弱，但异亮氨酸与亮氨酸的抑制有所增强；而异亮氨酸与缬氨酸对 AHASase 的抑制则有明显的降低，并且不呈协同抑制作用。

亮氨酸、异亮氨酸及缬氨酸的生物合成可以共用同一种转氨酶。以缬氨酸为底物时