

# L-异亮氨酸高产菌育种机理的初步研究

张伟国

(无锡轻工大学中央研究所, 无锡 214036)

陈 坚 伦世仪

(无锡轻工大学生物工程学院, 无锡 214036)

**摘要** 研究了黄色短杆菌生物合成 L-异亮氨酸代谢控制途径, 结果表明, 选育 L-异亮氨酸高产菌必须首先活化磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(PC)、天冬氨酸激酶(AK)、高丝氨酸脱氢酶(HD)、苏氨酸脱氢酶(TD)和乙酰羟酸合成酶(AS)这五个关键酶, 并减弱由丙酮酸激酶(PK)、柠檬酸合成酶(CS)、天冬氨酸 $\beta$ -脱羧酶(AD)、二羟吡啶二羧酸合成酶(PS)和高丝氨酸-O-转乙酰酶(HT)引起的五条分支代谢强度, 从而强化生物合成 L-异亮氨酸的主代谢流。根据这一育种思想, 以黄色短杆菌(*Brevibacterium flavum* ATCC14067)为出发菌株, 采用相关的氨基酸结构类似物进行定向育种, 有目的地活化 PC、AK、HD、TD 和 AS 等酶, 筛选获得的 L-异亮氨酸高产菌 ZQ-4, 产酸达 28 ~30 g/L。

**关键词** L-异亮氨酸; 育种; 黄色短杆菌

**中图分类号** TQ 922

## 0 前 言

黄色短杆菌 ATCC14067 是一株谷氨酸产生菌, 以它为出发菌株经物理和化学诱变处理, 氨基酸结构类似物定向选育, 获得 L-异亮氨酸高产菌 ZQ-4。笔者对 ZQ-2 菌的育种机理作初步探讨。

## 1 材料与方 法

### 1.1 菌株

1.1.1 出发菌株 黄色短杆菌(*Brevibacterium flavum*) ATCC14067。

1.1.2 异亮氨酸产生菌 ZQ-4 由黄色短杆菌 ATCC14067 选育而得<sup>[1]</sup>。

### 1.2 培养基

1.2.1 种子培养基 葡萄糖 2.5; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.5; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.1; MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.05; 玉米浆 4.0; CaCO<sub>3</sub> 1.0;

1.2.2 发酵培养基 葡萄糖 13.5; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3.75; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.1; MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.05;

玉米浆 2.0; CaCO<sub>3</sub> 3.0.

### 1.3 分析方法

1.3.1 菌体生长 吸收 0.2 ml 样品菌液到 5 ml 0.25 mol/L HCl 溶液中, 摇匀, 采用 721 分光光度计, 1 cm 光程 562 nm 下测定 OD 值。

1.3.2 pH 用精密 pH 试纸和酸度计测定。

1.3.3 葡萄糖 菲林试剂滴定法<sup>[2]</sup>。

1.3.4 L-异亮氨酸 纸上层析法、比色定量法<sup>[3]</sup>及氨基酸自动分析仪测定。

## 2 结果与讨论

### 2.1 黄色短杆菌 ATCC14067 生物合成 L-异亮氨酸的代谢调节机制

以葡萄糖为原料生物合成 L-异亮氨酸涉及到 EMP、HMP、TCA、乙醛酸循环、伍德-沃克曼反应, 以及苏氨酸合成水平和分支链氨基酸合成水平的调节控制。由于各系统之间相互连结, 分析起来不大方便, 如果把 TCA 等调节过程除掉, 保留生物合成 L-异亮氨酸的主代谢流, 其过程就较为简单, 如图 1 所示。选育异亮氨酸产生菌基本思路如下: 1) 强化“葡萄糖 磷酸烯醇式丙酮酸 天冬氨酸 苏氨酸 异亮氨酸”主代谢流; 2) 减弱流向丙氨酸、赖氨酸、蛋氨酸等分支代谢流强度。

黄色短杆菌生物合成异亮氨酸的主代谢流中, 有五个关键酶控制其强度。这五个关键酶分别受不同代谢产物的反馈调节, 活化这些酶有利于异亮氨酸的生物合成。1) 磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(PC), 该酶是介于合成与分解代谢的无定向途径上的第一酶。它受天冬氨酸、苹果酸的反馈抑制, 天冬氨酸、谷氨酸的反馈阻遏, 而被乙酰 CoA、GDP、GTP 或二磷酸果糖等所激活。2) 天冬氨酸激酶(AK), 受苏氨酸和赖氨酸的协同反馈抑制。3) 高丝氨酸脱氢酶(HD), 受苏氨酸的反馈抑制和蛋氨酸的反馈阻遏。4) 苏氨酸脱氢酶(TD), 受异亮氨酸的反馈抑制。5) 乙酰羟氨酸合成酶(AS), 受缬氨酸的反馈抑制及缬氨酸、异亮氨酸和亮氨酸的多价反馈阻遏。

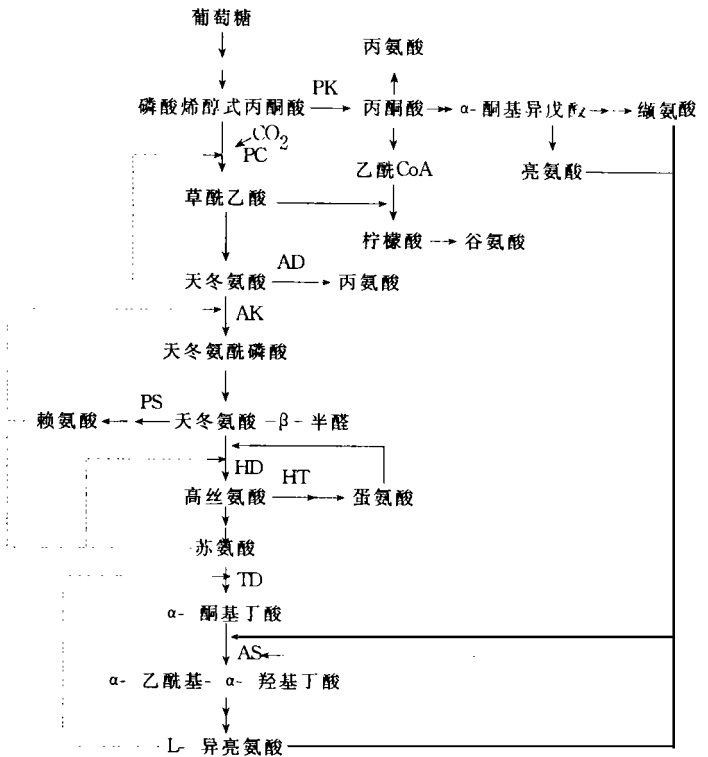


图 1 黄色短杆菌生物合成 L-异亮氨酸的代谢简图

— 反馈抑制      - - - 反馈阻遏

受异亮氨酸的反馈抑制。5) 乙酰羟氨酸合成酶(AS), 受缬氨酸的反馈抑制及缬氨酸、异亮氨酸和亮氨酸的多价反馈阻遏。

黄色短杆菌生物合成异亮氨酸过程中, 还存在着五条分支代谢途径, 它们分别由丙酮

酸激酶(PK)、柠檬酸合成酶(CS)、天冬氨酸β脱羧酶(AD)、二羟吡啶二羧酸合成酶(PS)和高丝氨酸-O-转乙酰酶(HT)催化。筛选PK、CS和PS缺失变异株及丙氨酸、蛋氨酸等营养缺陷型,可以阻断分支代谢强化主代谢流。

### 2.2 L-异亮氨酸高产菌 ZQ-4 的选育机理

通过改造微生物的某些基因,可解除正常的反馈调节机制,达到积累氨基酸之目的。这可通过选育营养缺陷型或结构类似物抗性变异株来实现。选育的营养缺陷型菌株可以是切断对目的产物合成途径有抑制作用的旁路产物的合成途径,以解除此抑制作用;也可以是切断目的产物合成途径的分支,以减少副产物的形成及原料的浪费。这类菌株的选育有一定的局限性,且往往产酸受环境影响较大。自 A delberg<sup>[4]</sup>发现氨基酸结构类似物抗性株可积累相对应氨基酸的现象以来,在代谢控制理论研究和氨基酸发酵生产方面均取得了不少进展。选育的氨基酸结构类似物抗性菌株在发酵生产氨基酸时,由于它不象营养缺陷型菌株那样,需要对培养基中的某些营养成分严格加以控制,因此较易掌握其所需条件和维持较高的生产水平。故笔者采用选育多重抗性变异株,而不选育营养缺陷型变异株。

根据以上育种思想,从野生型谷氨酸产生菌——黄色短杆菌 ATCC14067 出发,采用硫酸二乙酯(DES)、紫外线(UV)和亚硝基胍(NTG)等诱变剂诱变处理,依次赋予α-氨基-β-羟基戊酸抗性(AHV<sup>r</sup>)、S-2-氨基乙基-L-半胱氨酸抗性(AEC<sup>r</sup>)、琥珀酸为唯一碳源生长(Suc<sup>g</sup>)、磺胺胍抗性(SG<sup>r</sup>)、乙硫氨酸抗性(Eth<sup>r</sup>)、α-氨基丁酸抗性(α-AB<sup>r</sup>)和异亮氨酸氧胍氨酸抗性(IleHx<sup>r</sup>)等遗传标记,最后获得一株L-异亮氨酸高产菌ZQ-4,在最佳发酵条件下,摇瓶产酸达28~30 g/L。L-异亮氨酸高产菌ZQ-4解除反馈调节的机理见图2。

考察了选育谱系中各菌株的氨基酸积累,结果列于表1。由表1可见通过逐步诱变后氨基酸代谢流的变动情况。AHV<sup>r</sup>导致L-异亮氨酸的前体L-苏氨酸的积累,其原因在于L-苏氨酸合成的关键酶HD对L-苏氨酸脱敏,从而打开了L-苏氨酸积累的第1道“关口”。选育AEC<sup>r</sup>标记的目的在于解除L-赖氨酸和L-苏氨酸对AK的协同反馈抑制,从而打开L-苏氨酸积累的第2道“关口”。从表1可以看出,赋予AHV<sup>r</sup>AEC<sup>r</sup>标记后,氨基酸合成的代谢流明显地由谷氨酸族转向天冬氨酸族。从AHVAEC双重抗性变异株I2-137出发选育得到的Suc<sup>g</sup>变异株I3-356,其谷氨酸和丙

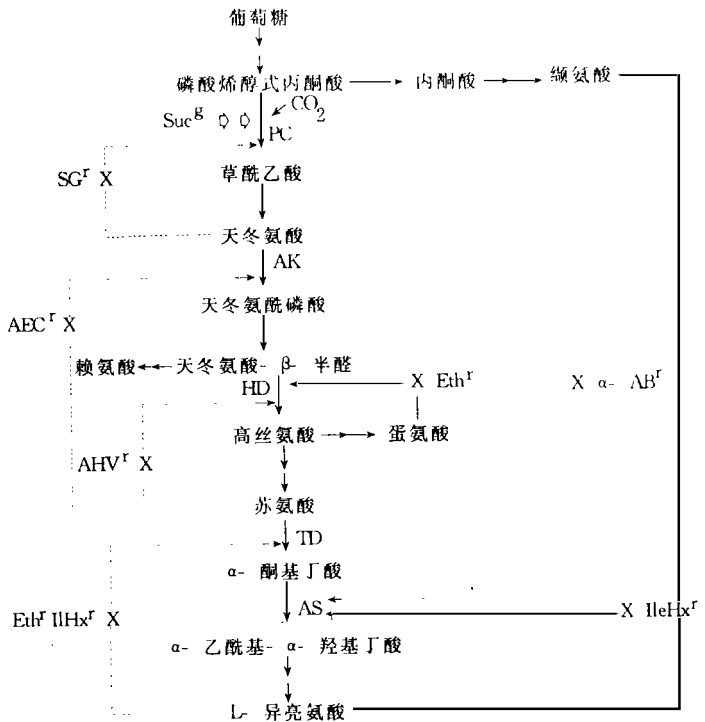


图 2 黄色短杆菌 L-异亮氨酸高产菌 ZQ-4 解除反馈调节的机理

反馈机理      反馈阻遏      激活      X 解除反馈抑制或阻遏

氨酸积累下降而天冬氨酸族氨基酸积累大幅度提高。H. W. Doelle<sup>[5]</sup>指出,所有生长在低分子量化合物如琥珀酸上的微生物有一共同特征,即为了合成细胞物质,它们必须经过糖原异生途径形成各种单糖。由于丙酮酸激酶催化的反应是不可逆反应,所以这条途径畅通与否就取决于 PC 的活性。由此推测 PC 活性大的菌株在以 Suc 为唯一碳源的培养基上生长较快,反之则较慢。因此在 Suc 上生长迅速即 Suc<sup>s</sup> 变异株中可能筛选到 PC 活性显著提高的菌株。这种菌株在以葡萄糖为碳源的培养基中因其羧化支路的加强而使草酰乙酸的供应大大增加,丙酮酸及乙酰-CoA 浓度相应下降,其结果一方面增加了天冬氨酸的供应,另一方面减弱了‘丙酮酸 丙氨酸’及‘草酰乙酸+ 乙酰-CoA 柠檬酸’的代谢流,导致丙氨酸和谷氨酸积累的下降及 L-异亮氨酸前体——L-苏氨酸还有 L-赖氨酸积累的同时增长。再选育 SGr 变异株,以解除中间产物天冬氨酸对 PC 的反馈抑制<sup>[6]</sup>,所得的变异株 I4-81 能积累少量 L-异亮氨酸和较多量的 L-苏氨酸。

表 1 选育谱系中各菌株的氨基酸积累

g/L

菌株	遗传标记	L-谷氨酸	L-丙氨酸	L-赖氨酸	L-苏氨酸	L-异亮氨酸
ATCC14067	野生型	18.2	3.6	0	0	0
I1-233	AHV <sup>r</sup>	12.5	5.7	0	2.6	微量
I2-137	AHV <sup>r</sup> AEC <sup>r</sup>	7.4	3.9	11.1	8.2	2.6
I3-356	AHV <sup>r</sup> AEC <sup>r</sup> Suc <sup>s</sup>	微量	微量	16.3	13.1	4.3
I4-81	AHV <sup>r</sup> AEC <sup>r</sup> Suc <sup>s</sup> SGr	微量	微量	9.5	15.2	6.6
I5-211	AHV <sup>r</sup> AEC <sup>r</sup> Suc <sup>s</sup> SGrEth <sup>r</sup>	微量	微量	7.3	微量	16.8
I6-176	AHV <sup>r</sup> AEC <sup>r</sup> Suc <sup>s</sup> SGrEth <sup>r</sup> $\alpha$ -AB <sup>r</sup>	微量	微量	7.6	微量	19.7
I7-314	AHV <sup>r</sup> AEC <sup>r</sup> Suc <sup>s</sup> SGr Eth <sup>r</sup> $\alpha$ -AB <sup>r</sup> IleHx <sup>r</sup>	微量	微量	6.8	微量	25.3
ZQ-4	AHV <sup>r</sup> AEC <sup>r</sup> Suc <sup>s</sup> SGr Eth <sup>r</sup> $\alpha$ -AB <sup>r</sup> IleHx <sup>r</sup>	微量	微量	7.2	微量	28~30

从菌株 I4-81 出发继续选育 Eth<sup>r</sup> 变异株, Eth 为蛋氨酸结构类似物, S. Ikeda 等<sup>[7]</sup>从黄色短杆菌 ATCC14067 L-苏氨酸产生菌诱变得到的 Eth<sup>r</sup> 变异株,不是具有对 L-异亮氨酸反馈抑制敏感的 TD 脱敏,就是表现出 TD 酶活的增加; H. Kase 等<sup>[8]</sup>从谷氨酸棒杆菌 L-苏氨酸产生菌选育 Eth<sup>r</sup> 变异株,亦能获得 L-异亮氨酸优良产生菌,这表明 Eth<sup>r</sup> 变异可解除 L-异亮氨酸对 TD 的反馈抑制,使得变异株的积累 L-异亮氨酸的能力极大地提高,实现了 L-苏氨酸向 L-异亮氨酸发酵的完全转换。另外, Eth<sup>r</sup> 亦可解除 L-蛋氨酸对 HD 的反馈抑制。

为了进一步提高 L-异亮氨酸的产酸率,选育  $\alpha$ -AB<sup>r</sup> 和 IleHx<sup>r</sup> 变异株。 $\alpha$ -AB 是 L-缬氨酸结构类似物,它能解除 L-缬氨酸对 AS 的反馈抑制<sup>[6]</sup>。IleHx 为典型的 L-异亮氨酸结构类似物,它能强烈地抑制 TD 活性;一方面,诱导的 IleHx<sup>r</sup> 变异株可使 TD 脱敏,另一方面,对于这种 TD 脱敏的 IleHx<sup>r</sup> 变异株而言,能解除对异亮氨酸——缬氨酸合成酶系 AS 的多价反馈阻遏<sup>[9]</sup>。因此,这类变异株可较大幅度地提高产酸率。

## 参 考 文 献

- 1 张伟国. L-异亮氨酸产生菌选育的研究. 氨基酸和生物资源, 1996, 18(3): 1~5
- 2 无锡轻工业学院. 工业发酵分析. 北京: 轻工业出版社, 1980
- 3 潘家秀. 蛋白质化学研究技术. 北京: 科学出版社, 1962
- 4 Adelberg E A. Selection of Bacterial Mutants which Excrete Antagonists of Antimetabolites. J Bacteriol, 1958, 76: 326
- 5 Doelle H W. 细菌的新陈代谢, 郭杰炎等译. 北京: 科学出版社, 1983, 437
- 6 张克旭. 氨基酸发酵工艺学. 北京: 轻工业出版社, 1992
- 7 Ikeda S. Screening of L-Isoleucine Producers among Ethionine Resistant Mutants of L-Threonine Producing Bacteria. Agric Biol Chem, 1976, 40(3): 511~516
- 8 Kase H. L-Isoleucine Production by Analog-resistant Mutants Derived from Threonine-producing Strain of *Corynebacterium glutamum*. Agric Biol Chem, 1977, 41(1): 109~116
- 9 张磊. 利用 IABS 模型筛选 L-异亮氨酸高产菌株. 生物工程学报, 1993, 9(2): 175~180

## Studies on the Breeding Mechanism of L-Isoleucine Hyperproducer

Zhang Weiguo

(Centre Research and Design Institute, Wuxi University of Light Industry, Wuxi 214036)

Chen Jian Lun Shiyi

(School of Biotechnology, Wuxi University of Light Industry, Wuxi 214036)

**Abstract** To enhance the main pathway of L-isoleucine biosynthesis in *Brevibacterium flavum* ATCC14067, its five key enzymes (PC, AK, HD, TD and AS) should be activated and its five branch pathways induced by the enzymes of PK, CS, AD, PS and HT should be weakened in the breeding course of L-isoleucine producer. According to this breeding theory, a mutant ZQ-4, which produced 28 ~ 30 g/L L-isoleucine, was derived from *Brevibacterium flavum* ATCC14067. The breeding mechanism of L-isoleucine hyperproducer was discussed.

**Key words** L-isoleucine; breeding; *brevibacterium flavum*

(责任编辑: 陈 娇)