

L-异白氨酸发酵的研究

II. 用糖质原料直接发酵生产 L-异白氨酸

唐任天 郭永复 陈琦

(中国科学院微生物研究所, 北京)

由钝齿棒状杆菌(*Corynebacterium crenatum*) AS 1.542 经亚硝基胍诱变获得抗 α -氨基- β -羟基戊酸的突变株 AS1.998, 它的生长不再受外加的 L-异白氨酸抑制。在含葡萄糖 10%, 硫酸铵 4.0%, 磷酸氢二钾 0.1%, 玉米浆 0.75%, 麸皮水解液 0.5%, 碳酸钙 4.5% 的培养基中, 接种量 2.5%, 28℃ 振荡培养 3 天, L-异白氨酸的积累量达 14 毫克/毫升以上。用铜盐法制备的产品, 经纸上层析, 聚酰胺薄膜层析、比旋光度测定和生物鉴定, 确证是 L-异白氨酸。

前文^[1]报道了以 α -氨基丁酸或 α -溴丁酸为前体发酵生产 L-异白氨酸的研究结果。我们发现, 不加这些前体时, 所使用的菌株也可少量分泌 L-异白氨酸。

近年来, 通过诱变得到抗氨基酸结构类似物突变菌株, 由葡萄糖直接发酵生产 L-异白氨酸的研究工作, 取得了一定结果^[2,3]。

我们以钝齿棒状杆菌 AS 1.542 为出发菌株, 经 N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍(简称亚硝基胍)诱变处理, 获得了抗 α -氨基- β -羟基戊酸(简称为 AHV)的突变株, 在含葡萄糖的培养基中, 该菌株积累大量的 L-异白氨酸。经中间试验, 取得了有实际生产意义的结果。

本文报道抗 AHV 突变菌株 AS1.998 的选育及其发酵条件研究以及 L-异白氨酸制备与鉴定的结果。

试验方法

(一) 菌株

用钝齿棒状杆菌 AS1.542 为出发菌株, 经亚硝基胍处理, 得到抗 AHV 菌株 AS1.998。

(二) 培养基

培养基组成见表 1。

(三) 抗 AHV 突变株的获得

取牛肉汁斜面上长好的 AS1.542 的菌体一环, 放入含亚硝基胍(2 毫克/毫升)的 20% 甲酰胺水溶液 3 毫升中, 室温静置 30 分钟。以无菌水洗涤两次。取一部分菌体接种含 8 毫克/毫升 AHV 的基础培养基, 28℃ 振荡培养 3 天, 然后适当稀释, 涂布在含 8 毫克/毫升 AHV 的基础培养基平板上, 30℃ 培养, 长出的菌落即为抗 AHV 突变株, 将其移入牛肉汁斜面上, 30℃ 培养后保存。

(四) L-异白氨酸生产菌株的筛选及发酵

将抗 AHV 突变菌株的菌体涂在混有洗涤过的抗 AHV 的 L-异白氨酸营养缺陷型菌株 A82 的基础培养基上, 28℃ 培养 2 天, 挑取菌落周围生长圈较大的菌落到种子培养基中, 28℃ 振荡培养(迴旋式摇床; 转速 180 次/分, 偏心距 2.5 厘米或往复式摇床; 108 次/分冲程 7.6 厘米) 14—20 小时, 接种发酵培养基, 接种量为 0.5 毫升, 28℃ 振荡培养三天, 测定发酵液中 L-异白氨酸含量。

(五) 分析测定方法

pH 值, 菌体生长量, 比旋光度按前报所述方法测定^[1]。

本文于 1977 年 4 月 6 日收到。

表 1 培养基的组成

培养基 组成(%)	种 子	基 础	筛 选	发 酵		
				A	B	C
葡萄糖	5.00	2.00	10.00	10.00	10.00	
甘蔗糖蜜						8.00
硫酸铵			5.00	4.00	4.00	4.00
磷酸氢二钾				0.15	0.10	0.20
磷酸二氢钾	0.10	0.10	0.15			
磷酸氢二铵		0.2				
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.05	0.04	0.04			
Fe ⁺⁺ , Mn ⁺⁺ (ppm)		2.00	2.00			
玉米浆	0.80		0.50	1.00	0.75	
麸皮水解液					0.50	
豆饼水解液						1.25
面筋水解液			0.50	1.00		
蛋白胨	0.50					
尿素	0.40					
生物素(微克/100毫升)		10	20			
硫胺素盐酸盐(微克/100毫升)		100	40			
碳酸钙			5.00	4.00	4.50	4.00
装液量(毫升/毫升三角瓶)	20/250		2/小试管	25/500	20/500	20/500

注: 麸皮和豆饼水解液以水解前的干重计算; 玉米浆和面筋水解液以原液重计算; 糖蜜以所含还原糖计算。

还原糖用费林氏法测定^[4]。

L-异白氨酸用生物测定法测定, 其方法是: 用 A82 号菌株 (AHV^r, Ileu⁻) 作测定菌, 根据生长圈的有无决定是否产 L-异白氨酸, 同时用 A20 号菌株 (AHV^r, Ileu⁻) 作对照。

聚酰胺薄膜层析^[5]: 取 0.1 毫升经离心后的发酵液加入 0.1 毫升 0.5MNaHCO₃ 溶液中, 再加入 0.1 毫升 2.5% 的 1-二甲胺-5-萘磺酰氯, 40℃ 保温 1 小时或放置过夜。用 0.1NHCl 溶液调节 pH 为 2.5, 加入 3 毫升乙酸乙酯, 振荡抽提 5 分钟, 取上层液点样在聚酰胺薄膜^[5] 上进行双向层析, 第一向溶剂系统为苯:冰乙酸=9:1 (体积:体积), 第二向溶剂系统为 98% 甲酸:水=1.5:100 (体积:体积)。层析约 30 分钟, 在紫外光显影灯下观察 L-异白氨酸斑点的位置。聚酰胺薄膜可在丙酮 (10 份体积) 和 98% 甲酸 (1 份体积) 的混合液中浸泡过夜后, 用乙醇洗涤, 晾干再用。

结 果

(一) 抗 AHV 突变株中积累 L-异白氨酸菌株的筛选

钝齿棒状杆菌 AS1.542 经亚硝基胍处理后, 得到了抗 AHV 菌株 400 多株, 从中筛选出约 30% 的菌株可积累 L-异白氨酸, 其中以 A9、A56、AS1.998 的积累量最高, AS1.998 号菌株在筛选培养基中发酵 3 天可积累 L-异白氨酸 6.6 毫克/毫升。以下实验均用 AS1.998 号菌株进行。

(二) 发酵条件试验

1. 氮源: 比较了硫酸铵、硝酸铵和乙酸铵对积累 L-异白氨酸的影响。按表 2 组合用 L₈(2)⁷ 正交表试验。结果表明, 此三种氮源差别不大。然后用硫酸铵进行氮源最适量试验, 由表 3 可见, 以 4.0% 的硫酸铵为最好。

2. 无机盐: 试验了 K₂HPO₄、MgSO₄·7H₂O、FeSO₄·7H₂O 和 MnSO₄·H₂O 对积累 L-异白氨酸的影响, 按 L₉(3)⁴ 正交表试验。结果(表 4)表明, 在所试验的浓度范围内, 除 K₂HPO₄ 随用量增加 L-异白氨酸积累量

表 2 不同氮源对 L-异白氨酸积累的影响[用 L8(2)⁷ 正交表]

浓度 (克分子) 氮源	组别	1	2	3	4	5	6	7	8	同-氮源相等浓度 时 L-异白氨酸积 累量平均值(百分 比)	
										0.15	0.30
硫酸铵 硝酸铵 乙酸铵		0.15	0.15	0.15	0.15	0.30	0.30	0.30	0.30	0.34	0.32
		0.30	0.30	0.15	0.15	0.30	0.30	0.15	0.15	0.32	0.34
		0.15	0.30	0.15	0.30	0.15	0.30	0.15	0.30	0.35	0.31
L-异白氨酸(%)		0.36	0.33	0.37	0.30	0.31	0.30	0.35	0.32		

注: 培养基成份除无机氮源如表中所列外, 其余见表 1 中发酵培养基 A。

表 3 硫酸铵浓度对 L-异白氨酸积累的影响

硫酸铵(%)	3.0	3.5	4.0	4.5
发酵液 pH	7.2	6.4	5.5	6.0
L-异白氨酸(%)	1.00	1.12	1.19	1.10

注: 培养基成份除硫酸铵如表中所列外, 其余见表 1 中的发酵培养基 A。

表 4 几种无机盐对 L-异白氨酸积累的影响

组别 无机盐	1	2	3	4	5	6	7	8	9	同-无机盐相等浓度 时 L-异白氨酸积 累量平均值(%)		
										K ₁	K ₂	K ₃
K ₂ HPO ₄ (%)	0.15	0.15	0.15	0.25	0.25	0.25	0.35	0.35	0.35	1.25	0.98	0.72
MgSO ₄ ·7H ₂ O(%)	0.05	0.10	0.15	0.05	0.10	0.15	0.05	0.10	0.15	1.01	0.94	1.00
FeSO ₄ ·7H ₂ O(ppm)	0	0.5	1.0	0.5	1.0	0	1.0	0	0.5	0.98	0.96	1.01
MnSO ₄ ·H ₂ O(ppm)	0	2.0	4.0	4.0	0	2.0	2.0	4.0	0	1.02	1.05	0.88
发酵液 pH	6.0	6.0	6.2	6.0	6.0	6.0	5.8	6.0	6.0			
L-异白氨酸(%)	1.31	1.25	1.18	0.88	1.00	1.06	0.84	0.58	0.76			

注: 培养基成份除无机盐如表列外, 其余见表 1 中的发酵培养基 A。

明显降低外, 其它几种无机离子的用量对 L-异白氨酸积累量影响不大。为了探讨磷和钾离子的影响, 进行了表 5 所示的试验, 结果表明, 增加磷酸盐浓度, 菌体的生长受到明显抑制, 故以 0.1% 的磷酸盐用量为宜。钾离子无此作用。

3. 通气量对 L-异白氨酸积累的影响: 在摇瓶中装入不同体积的发酵培养基, 观察通气量对 L-异白氨酸积累量的影响, 由表 6 可见, 以 500 毫升三角瓶装 20 毫升发酵液较为适宜。

4. 有机营养对 L-异白氨酸积累的影

响: 试验了玉米浆、面筋水解废液、酵母膏、蛋白陈、生物素和硫胺素对 L-异白氨酸积累的影响, 结果见表 7。又进一步试验了豆饼、麸皮、面筋水解废液与玉米浆配合使用对 L-异白氨酸积累的影响, 结果见表 8。我们还试验了不同浓度的毛发水解液代替上述有机物与玉米浆配合使用对 L-异白氨酸积累的影响, 其 L₈(4 × 2⁴) 的正交试验结果见表 9。由以上试验可见, AS1.998 号菌株可利用多种有机营养物, 在配合适当时, L-异白氨酸积累量可达 14.8 毫克/毫升。

表 5 磷酸钾的不同用量及氯化钾对 L-异白氨酸积累的影响

磷酸钾盐或氯化钾	用量(%)	发酵液 pH	菌体生长情况	L-异白氨酸(%)
磷酸氢二钾	0	6.7	生长旺盛	1.13
磷酸二氢钾	0			
氯化钾	0			
磷酸氢二钾	0.05	6.4	生长稍弱	1.26
磷酸二氢钾	0.10			
磷酸氢二钾	0.10	6.7	生长稍弱	1.27
磷酸二氢钾	0.05			
磷酸氢二钾	0.15	6.4	生长稍弱	1.05
磷酸二氢钾	0.01			
磷酸氢二钾	0.5	6.7	生长微弱	1.27
	1.0	6.4		1.30
	1.5	6.7		1.19
磷酸二氢钾	0.01	6.7	生长稍弱	1.21
	0.05	6.5		1.16
	0.10	6.7		1.19
氯化钾	0.01	6.5	生长旺盛	0.95
	0.05	6.4		1.10
	0.10	6.4		1.15

注：培养基成份除磷酸盐和氯化钾含量如表列外，其余见表 1 中的发酵培养基 A。

表 6 通气量对 L-异白氨酸积累的影响

500 毫升三角瓶装发酵培养基 A 毫升数	10	15	20	25	30
发酵液终 pH	7.0	7.2	7.0	6.8	6.4
L-异白氨酸(%)	1.25	1.27	1.30	1.25	1.10

表 7 有机营养对 L-异白氨酸积累的影响

有机营养物 含量(%)	玉米浆			面筋水解液			酵母膏			蛋白胨			硫酸素盐(微克/升)			生物素(微克/升)		
	0.5	1.0	1.5	0.5	1.0	1.5	0.5	1.0	1.5	0.5	1.0	1.5	10	20	30	5	10	15
L-异白氨酸(%)	0.32	0.35	0.38	0.50	0.57	0.58	0.58	0.58	0.54	0.25	0.35	0.20	0.28	0.28	0.28	0.32	0.35	0.31

注：培养基成份如下(%)：葡萄糖 10，硫酸铵 4，磷酸氢二钾 0.15， $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05， Fe^{++} 2ppm，生物素 1 微克/升，碳酸钙 3；pH 7.0，再分别加入表中所有有机营养物。于 500 毫升三角瓶内装液 25 毫升。28℃ 振荡培养 2 天。

表 8 有机营养物配合使用对 L-异白氨酸积累的影响

有机营养物(%)	豆饼水解液			麸皮水解液			面筋水解液		
	0.2	0.6	1.0	0.5	1.0	1.5	0.5	0.8	1.0
发酵液 pH	6.4	7.5	8.0	6.0	7.0	6.7	6.4	6.5	6.0
L-异白氨酸(%)	1.07	1.29	1.31	1.00	1.32	1.23	1.00	1.02	1.07

注：培养基成份，除玉米浆用量为 0.75%，面筋水解液按表加入外，其余按表 1 中的发酵培养基 A。

表 9 不同浓度的毛发水解液、玉米浆和葡萄糖正交法 $L_8(4 \times 2^4)$ 配合对 L-异白氨酸积累影响

浓度 项目		组别								同一有机物相等浓度时 L-异白氨酸积累量平 均值(%)			
		1	2	3	4	5	6	7	8	K_1	K_2	K_3	K_4
营养成分	毛发水解(%)	0.5	0.5	1.0	1.0	1.5	1.5	2.0	2.0	1.08	1.22	1.40	1.25
	葡萄糖(%)	10	12	10	12	12	10	12	10	1.14	1.36		
	玉米浆(%)	1.25	1.75	1.25	1.75	1.25	1.75	1.25	1.75	1.15	1.35		
结果	发酵液 pH	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5				
	残糖(%)	0.9	0.8	0.6	0.9	0.8	0.5	0.4	0.4				
	L-异白氨酸(%)	0.89	1.27	1.00	1.44	1.42	1.48	1.31	1.19				

注：培养基除表列成份外，另加硫酸铵 4%，磷酸氢二钾 0.1%，碳酸钙 4.5%，500 毫升三角瓶装 20 毫升发酵培养基。

表 10 葡萄糖及几种培养基成份不同配比对 L-异白氨酸积累影响[用 $L_{16}(4^4)$ 正交表]

浓度 项目		组别																同一培养基成分 相等浓度时 L- 异白氨酸积累量 的平均值(%)			
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	K_1	K_2	K_3	K_4
培养基成分(%)	葡萄糖	10	10	10	10	11	11	11	11	12	12	12	12	13	13	13	13	0.82	0.84	0.99	1.34
	硫酸铵	4.00	4.25	4.50	3.75	4.00	4.25	4.50	3.75	4.00	4.25	4.50	3.75	4.00	4.25	4.50	3.75	0.90	1.06	1.01	1.03
	磷酸氢二钾	0.10	0.13	0.05	0.08	0.13	0.10	0.08	0.05	0.05	0.08	0.10	0.13	0.08	0.05	0.13	0.10	0.99	0.99	1.09	0.93
	玉米浆	1.75	2.00	1.25	1.50	1.25	1.50	1.75	2.00	1.50	1.25	2.00	1.75	2.00	1.75	1.50	1.25	1.08	0.94	0.99	1.00
	豆饼水解液	0.70	0.80	0.90	0.60	0.60	0.90	0.80	0.70	0.80	0.70	0.60	0.90	0.90	0.60	0.70	0.80	1.07	1.04	0.97	0.93
结果	发酵液 pH	7.5	7.5	6.7	7.2	8.0	7.2	6.5	7.2	7.3	6.5	7.4	8.0	7.8	6.7	7.5	7.2				
	L-异白氨酸(%)	0.85	0.85	0.88	0.71	0.66	0.88	0.91	0.98	1.01	1.03	0.85	1.06	1.06	1.48	1.40	1.40				

注：培养基除表中所列成份外，再加碳酸钙 4.0%，500 毫升三角瓶装发酵培养基 20 毫升，接种量 5%，30℃ 往复摇床振荡培养 3 天。

表 11 甘蔗糖蜜代替玉米浆试验[用 $L_9(3^4)$ 正交表]

浓度 项目		组别									同一培养基成分相等 浓度时 L-异白氨酸 积累量的平均值(%)		
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	K_1	K_2	K_3
	甘蔗糖蜜(按还原糖 含量百分数计)	0.6	0.8	1.0	0.8	1.0	0.6	1.0	0.6	0.8	1.24	1.27	1.16
	葡萄糖(%)	8	8	8	10	10	10	12	12	12	1.01	1.27	1.39
	豆饼水解液(%)	0.5	0.6	0.7	0.5	0.6	0.7	0.5	0.6	0.7	1.20	1.22	1.25
结果	发酵液 pH	7.5	7.5	7.3	7.2	7.4	7.5	7.6	7.5	7.4			
	残糖(%)	1.10	0.90	0.90	1.20	1.15	1.08	1.35	1.45	1.00			
	L-异白氨酸(%)	0.99	1.07	0.97	1.30	1.19	1.33	1.31	1.41	1.44			

注：培养基除表列成份外，另加硫酸铵 4.0%，磷酸氢二钾 0.1%，碳酸钙 4.5%，500 毫升三角瓶装发酵培养基 20 毫升，30℃ 往复摇床振荡培养 3 天。

5. 葡萄糖浓度对 L-异白氨酸积累的
影响：按正交表 $[L_{16}(4^5)]$ 试验了葡萄糖、

硫酸铵及培养基其它成分不同量的配比
时，对 L-异白氨酸积累的影响，结果(表

10) 表明, 葡萄糖浓度对 L-异白氨酸的积累有明显影响, 以 13% 较为适宜, 葡萄糖与硫酸铵之比约为 10:3。其它成份的影响甚小。

6. 用甘蔗糖蜜代替玉米浆试验: 甘蔗糖蜜按正交表 $L_9(3^4)$ 进行试验以代替玉米浆, 结果见表 11。结果表明甘蔗糖蜜能代替玉米浆, 使 L-异白氨酸积累量维持较好水平。

7. 发酵的全过程:

综合上述试验结果, 对发酵全过程作了研究, 结果见图 1。由图中可见, 培养 72 小时, L-异白氨酸积累量可达 1.4% 以上。

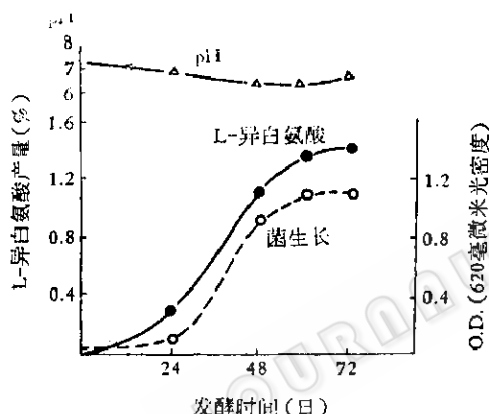


图 1 L-异白氨酸发酵全过程
用发酵培养基 B, 接种量 5%, 28°C 振荡培养。

(三) L-异白氨酸的提纯与鉴定

1. 提纯: 用离子交换树脂法^[1]提取的 L-异白氨酸混杂有少量白氨酸和缬氨酸。因此试验了用铜盐法精制 L-异白氨酸, 精制过程见图 2。由发酵液(每升含 10 克 L-异白氨酸)提取, 纯度为 85% 的产品回收率为 65%, 纯度为 98% 的产品回收率为 50%。

2. 鉴定

纸层析: 100 微克 L-异白氨酸精制品仅在纸层析谱上出现一个斑点, 其 R_f 值与标准品相同。

聚酰胺薄膜层析: L-异白氨酸精制品

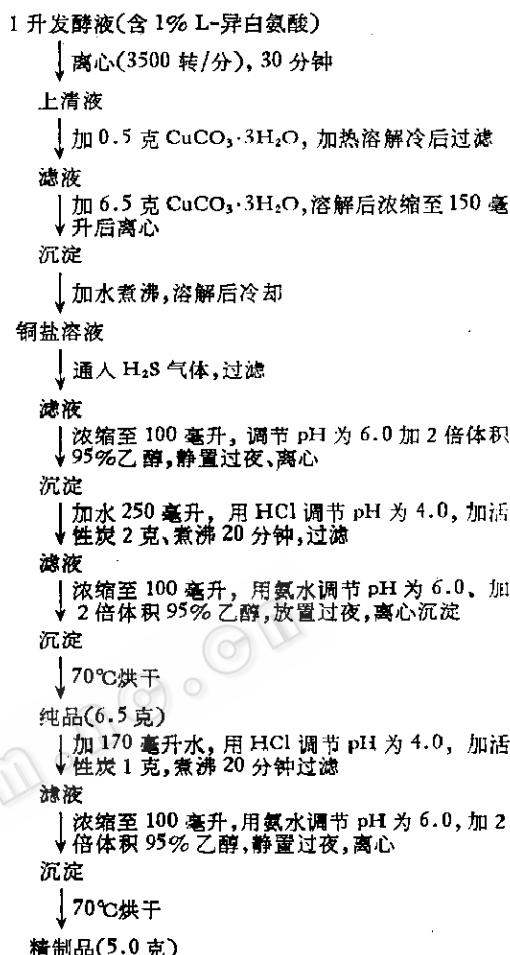


图 2 L-异白氨酸的铜盐制备法

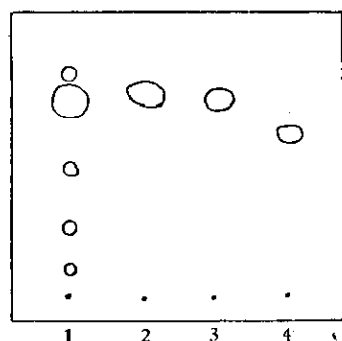


图 3 聚酰胺薄膜层析谱

1. 发酵液; 2. 由发酵液精制的 L-异白氨酸; 3. L-异白氨酸标准品; 4. L-白氨酸标准品。溶剂系统: 苯: 冰乙酸(9:1)。

与标准品的 R_f 值相同(见图 3)。

比旋光度测定: $[\alpha]_D^{20} = +40.5 (c = 1.5 \text{NHCl})$ 。

生物鉴定: 用生长图形法测定。抗

AHV 的 L-异白氨酸营养缺陷型 A82 号菌株在测定用培养皿中,于加有 L-异白氨酸精制品的周围出现生长圈;用抗 AHV 的 L-白氨酸营养缺陷型菌株 A₂₀ 作对照,该菌株在平板上,于加有 L-异白氨酸精制品的周围不出现生长圈。

根据以上结果,确定精制品是 L-异白氨酸。

讨 论

自 Adelberg^[6] 发现氨基酸结构类似物抗性菌株往往可积聚相应氨基酸的现象以来,在代谢控制的理论研究和氨基酸的发酵生产方面,有了不少进展。看来利用氨基酸结构类似物抗性菌株发酵生产氨基酸时,由于它不象营养缺陷型菌株那样,对培养基中的营养要严格加以控制,因此较易掌握其所需条件和维持较高的生产水平;而且,在筛选生产菌株时获得优良菌株的

机率较高(本文所用摇管法,用药量较少,操作较简便,也减少了筛选菌株的工作量);此外,在保藏菌株的培养基中加入相应的结构类似物,还可以较有效地防止菌株的回复突变,以防止菌株优良性能的退化。利用氨基酸结构类似物抗性菌株发酵生产氨基酸的方法预计将会广泛地应用。

本文将聚酰胺薄膜层析法直接应用于分析发酵液中 L-异白氨酸,较原法^[5]有所简化,结果令人满意。

参 考 资 料

- [1] 唐任天等:微生物学报, **15**: 205—211, 1975.
- [2] 李玲阁等:微生物学报, **15**: 148, 1975.
- [3] Shio, I. et al: *Agr. Biol. Chem.*, **37**: 2053—2061, 1973.
- [4] 京都大学農学部農芸化学教室:農芸化学実験書,第二卷, p. 680, 産業図書株式會社, 東京, 1957.
- [5] 陈远聪等:生物物理与生物化学进展, **1**: 38—40, 1975.
- [6] Adelberg, E. A.: *J. Bacteriol.*, **76**: 326, 1958.

STUDIES ON THE FERMENTATION OF L-ISOLEUCINE

II. DIRECT FERMENTATION OF L-ISOLEUCINE FROM SUGAR MATERIAL

Tang Ren-tian, Guo Yong-fu and Chen Qi

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

An α -amino- β -hydroxy-valeric acid resistant mutant AS1.998 derived from *Corynebacterium crenatum* AS 1.542 by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine treatment has been obtained, its growth was no longer inhibited by L-isoleucine.

Shaken at 28°C for 3 days, the amount of L-isoleucine accumulation by this mutant reached more than 14 mg/ml

in a medium containing 10% glucose, 4.0% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.1% K_2HPO_4 , 0.75% corn steep liquor, and 0.5% bran hydrolysate.

The fermentation product purified with copper salt method has been identified as L-isoleucine by paper chromatography, polyamide thin layer chromatography, specific rotation and bioassay.