

黄色短杆菌 ATCC 14067 产 L-谷氨酰胺的发酵条件

王福源 王妙虎 王锦华 陈驹声

(上海科学技术大学)

俞儒钧 冯容保

(上海天厨味精厂)

L-谷氨酰胺是L-谷氨酸的 γ -羧基酰胺化,其分子式为 $\text{H}_2\text{N} \cdot \text{OC} \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CH}(\text{NH}_2) \cdot \text{COOH}$,作为药物,它可以用来治疗神经衰弱,胃和十二指肠溃疡等疾病,疗效明显。我们用谷氨酸产生菌黄色短杆菌 ATCC 14067,通过改变发酵条件,使谷氨酸发酵转向谷氨酰胺发酵。发酵65小时,在每毫升发酵液中积累了30mg的谷氨酰胺。

材料与方 法

(一) 菌种

黄色短杆菌(*Brevibacterium flavum*) ATCC 14067。

(二) 试剂和仪器

生物素为英国BDH产品,玉米浆由上海天厨味精厂提供。L-谷氨酰胺标准品系日本味之素公司产品。其它试剂均为国产试剂,化学纯。发酵液pH测定用pHS-2型酸度计,光密度测定用72型分光光度计。

(三) 菌体量和 L-谷氨酰胺的测定方法

菌体量的测定:取1ml发酵液加4ml 1N HCl,摇匀后测定610nm的A值。

L-谷氨酰胺的测定:在层析滤纸上定量点样,展开后与谷氨酰胺标准液作对照、比色、定量。

(四) 发酵条件

发酵温度31℃,在500ml三角烧瓶中盛放发酵培养基30ml;发酵培养基的初始pH调节至7.2—7.4,按种后,置于往复式摇瓶机(振幅7厘米,频率145次/分),发酵72小时。

(五) 培养基组成(%)

葡萄糖12、氯化铵4、玉米浆1.2 ml、

KH_2PO_4 0.025、 FeSO_4 1 mg、维生素 B_1 350r/l、 MnSO_4 0.002、 MgSO_4 0.05、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10mg/l、初尿0.5以及 CaCO_3 5。

实 验 结 果

(一) 玉米浆量的选择

根据玉米浆中氨基酸及生物素的含量,在上述100ml培养基中,分别加入0、0.8、1.2和1.6ml的玉米浆,然后测定发酵过程中菌体量和产谷氨酰胺量。结果如表1所示。

从表1中可以看出,玉米浆用量为1.2%时发酵液中生成的谷氨酰胺量最多,小于或大于此量,不仅影响菌体生长,而且关系到谷氨酰胺的生成。

(二) 生物素的选择

在含1.2%玉米浆的培养基中,再加入5r/l的生物素及加入吐温60抑制其生物素的作用结果表明:除影响菌体生长外,对谷氨酰胺的生成都不利。根据菌体生长试验表明1.2%的玉米浆其生物素含量在6r/l左右为适宜。

(三) 铵盐的选择

用浓度分别为2%、4%和6%的五种铵盐进行试验。这五种铵盐为:氯化铵、磷酸铵、硝酸铵、硫酸铵和醋酸铵。试验结果:以氯化铵作铵盐生成的谷氨酰胺量最多,氯化铵浓度4%为最佳。不同氯化铵浓度的菌体量和谷氨酰胺生成量如表2所示。

从表2可以看出,氯化铵影响菌体生长,浓度愈高,对菌体生长的抑制愈明显。2%氯化铵组生成谷氨酰胺的时间比4%组要提前几个小时,但峰值比4%氯化铵组要小。6%氯化铵组最差。没有谷氨酰胺生成。

表 1 不同玉米浆用量对菌体生长和谷氨酰胺生成的影响

结果 发酵时间 (h)		玉米浆(%)		0.8		1.2		1.6	
				A	G*	A	G	A	G
	48			0.475	2.0	0.790	2.0	0.910	1.8
	57			0.477	2.2	0.800	2.5	0.900	2.0
	65			0.480	2.0	0.790	2.5	0.910	1.5

*G 为谷氨酰胺生成量(%)

表 2 不同 NH_4Cl 浓度对菌体及谷氨酰胺生成的影响

结果 发酵时间 (h)		NH ₄ Cl(%)		2		4		6	
				A	G*	A	G	A	G
	36			0.802	1.5	0.592	1.5	0.110	0
	48			0.790	2.0	0.560	1.8	0.900	0
	58			0.790	2.0	0.565	2.5	1.100	0
	65			0.800	1.8	0.563	2.5	1.520	0

* 谷氨酰胺生成量(%)

(四) 尿素的选择

初尿量我们选用 0.2%、0.5% 和 0.8% 三种浓度,实验结果表明:初尿 0.2%,47 小时发酵液中谷氨酰胺的蓄积量最高;初尿 0.5%,65 小时的蓄积量最高;初尿 0.8%,以 6.5—72 小时的发酵液蓄积量最高。这三种不同浓度的初尿,谷氨酰胺的蓄积峰值,以 0.5% 初尿这一组为最高,0.2% 一组次之;0.8% 一组最低。结果见表三所示。

表 3 不同初尿量对谷氨酰胺生成的影响

G (%) 发酵时间 (h)		初尿量(%)		
		0.2	0.5	0.8
	47	2.3	1.9	1.8
	65	1.8	2.6	2.0
	72	1.2	2.0	2.0

(五) Zn^{2+} 浓度的选择

在每升发酵培养基中,分别加入 0.1、1、10 和 100 mg $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,发酵结果:10mg/l $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 组发酵液中累积的谷氨酰胺最多。

综述以上实验结果,用黄色短杆菌 ATCC 14067 生产 L-谷氨酰胺,其发酵前期 pH 在 7.0—7.2,后期 pH 在 5.5—6.5,培养基成份按

上述培养基组成。

讨 论

1. 日本协和发酵公司东京研究所的中西透认为:在有 Mn^{2+} 和 Mg^{2+} 存在时,适量加入 Zn^{2+} 可提高谷氨酰胺合成酶的活力,使谷氨酰胺合成增多。我们的实验也证实了这一点。

2. 在铵盐选择中以 4% 氯化铵为最佳,过量氯离子虽对长菌有抑制作用,但一定量的氯离子对菌体的膜透性有影响;它可阻止谷氨酸的渗出,细菌为了解“毒”而将谷氨酸转变成容易透过的谷氨酰胺。

3. 发酵时的 pH 跟谷氨酰胺的生成有很大关系,最佳 pH 条件是在 5.5—6.5 之间,这是因为在谷氨酸和谷氨酰胺转换中,跟其谷氨酰胺合成酶和谷氨酰胺酶的最适 pH 有关,前者最适 pH5.5—6.5 后者 8.0—9.0。

参 考 文 献

- [1] 陈驹声:近代工业微生物学,上册,54—65 页,上海科技出版社出版,1979 年。
- [2] 中西透:发酵工学,58(6): 453—463,1980。
- [3] 中西透:发酵と工業,40(1): 15—28,1982。
- [4] Nakanishi, T.: J. Ferment. Technol., 56:179, 1978。
- [5] Nakanishi, T.: J. Ferment. Technol., 55 (3): 224, 1977。