

L-亮氨酸发酵的研究

张素珍 陈琦

(中国科学院微生物研究所,北京)

郑翠凤 苏千兴 张德安 刘辉凯

(湖南株洲制药厂)

摘要 钝齿棒状杆菌 (*Corynebacterium crenatum*) L-421 是一株能产大量亮氨酸的突变株,它是从 *Corynebacterium crenatum* AS1.1004 菌株经 NTG 和快中子处理后获得的突变株。在含有葡萄糖、硫酸铵和尿素的培养基中,在 2000 升罐上,30℃ 发酵 40 小时,产亮氨酸可达 20g/L。经强酸性阳离子交换树脂提取,收率可达 40% 以上,并得到符合美国药典 85 年 21 版标准的精品。发酵提取工艺简单,适于工业化生产。

关键词 L-亮氨酸;发酵

L-亮氨酸是支链氨基酸,是人体和动物体必需氨基酸之一,也是目前临床选用的复合结晶氨基酸静脉注射液不可缺少的原料。L-亮氨酸对维持危重病病人的营养需要,抢救患者生命起着积极作用。另外亮氨酸可做降血糖剂,乙酰-L-亮氨酸和乙醇胺的脂也做晕眩的治疗药。^[1] 目前我国亮氨酸的生产多采用水解蛋白质提取获得,^[2]该方法工艺费时,收率低,不适合大规模工业生产。我国 1979 年曾报道了用谷氨酸产生菌钝齿棒状杆菌 (*Corynebacterium crenatum*) AS1.542 经 NTG 多次诱变获得一株产 L-亮氨酸菌 AS1.1004^[3]。在此基础上采用化学药物处理及快中子照射获得一株 L-421 菌,产酸达 20g/L。在 2000 升罐上进行了发酵试验,产酸稳定,为工业性生产提供了技术依据。

材料和方法

(一) 菌种

产 L-亮氨酸菌:钝齿棒状杆菌 *Corynebacterium crenatum* L-421 (Ile⁻, 2TA⁺)。

(二) 培养基

1. 完全培养基斜面组成(%):葡萄糖 1.0,牛肉膏 1.0,蛋白胨 1.0,酵母膏 0.5,NaCl 0.5,琼脂 2.0, pH7.0。

2. 种子培养基组成(%):葡萄糖 3.0,硫酸铵 0.5,玉米浆 2.0,尿素 0.1,豆饼水解液 0.3, KH₂PO₄ 0.05, MgSO₄ · 7H₂O 0.04, pH6.5。

3. 发酵培养基组成(%):葡萄糖 14,硫酸铵 2.5,玉米浆 2.0,豆饼水解液 0.8, KH₂PO₄ 0.05, MgSO₄ · 7H₂O 0.04, CaCO₃ 3.5, pH7.0。

(三) 分析方法

1. 还原糖测定:用 Lane-Eynam 改良的斐林氏法。

2. 菌体生长:取发酵液适量,用蒸馏水稀释到一定浓度,在 620nm 下用 72 型分光光度计,光程 0.5cm,蒸馏水做空白对照,测定菌体的光密度 OD。

3. L-亮氨酸含量的测定:发酵液经纸层析后用 KCN-乙二醇甲醚-茚三酮法测定含量。

结 果

(一) 种子培养基和发酵培养基中四种重要组分的正交试验

为了探索 L-421 菌的适宜营养和发酵条件,进行了种子培养基和发酵培养基中豆饼水解液、玉米浆、(NH₄)₂SO₄ 和 KH₂PO₄ 四个因素的正交试验,选用 L₄(3⁴) 结果见表 1 和表 2。

综合因素试验表明,种子培养基和发酵培养基中 KH₂PO₄ 和玉米浆的用量对 L-Leu 的

表1 种子培养基中豆饼水解液等4因素对发酵的影响

原料 编号	豆饼水 解液 (%)	玉米浆 (%)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (%)	KH ₂ PO ₄ (%)	Leu(g/L)				平均 Leu (g/L)
					1	2	3	4	
1	0.2	1.0	0.3	0.05	18.6	17.1	10.7	18.2	16.2
2	0.2	1.5	0.5	0.08	17.3	15.7	12.5	19.1	16.2
3	0.2	2.0	0.7	0.10	14.7	18.0	10.5	17.8	15.3
4	0.3	1.0	0.5	0.10	17.7	15.7	11.6	19.1	16.0
5	0.3	1.5	0.7	0.08	16.6	15.6	13.9	15.9	15.5
6	0.3	2.0	0.3	0.05	17.3	15.4	17.9	18.9	17.4
7	0.4	1.0	0.7	0.08	17.1	16.0	19.1	17.3	17.4
8	0.4	1.5	0.3	0.10	16.2	16.9	13.4	—	15.5
9	0.4	2.0	0.5	0.05	20.8	16.0	18.3	21.2	19.1

I 产率之和 47.7 49.6 49.1 52.7

II 产率之和 48.9 47.2 51.3 49.1

III 产率之和 52.0 51.8 48.2 46.8

极差 R 4.3 4.6 3.1 5.9

主次 3 2 4 1

好水平 0.4% 2.0% 0.5% 0.05%

注: 培养基其它成分: 葡萄糖 3%, 尿素 0.1%,
MgSO₄ · 7H₂O 0.04%。

表2 发酵培养基中四种因素对发酵的影响

原料 编号	KH ₂ PO ₄ (%)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (%)	豆饼水解液 (%)	玉米浆 (%)	Leu(g/L)		平均 产率
					1	2	
1	0.05	2.0	0.4	1.0	17.1	20.2	18.7
2	0.05	2.5	0.6	1.5	19.7	23.2	21.5
3	0.05	3.0	0.8	2.0	20.9	20.3	20.6
4	0.1	2.0	0.6	2.0	16.2	16.6	16.4
5	0.1	2.5	0.8	1.5	17.5	15.3	16.4
6	0.1	3.0	0.4	1.0	14.4	20.6	17.5
7	0.15	2.0	0.8	1.5	14.5	10.8	12.7
8	0.15	2.5	0.4	2.0	15.7	19.1	17.1
9	0.15	3.0	0.6	1.0	11.4	13.8	12.6

I 产率之和 60.8 42.8 53.3 48.8

II 产率之和 50.3 55.0 50.5 50.6

III 产率之和 42.4 50.7 49.7 54.1

极差 R 18.4 12.2 3.6 5.3

主次 1 2 4 3

好水平 0.05% 2.5% 0.4% 2.0%

注: 发酵培养基其它成分(%): 葡萄糖 14, MgSO₄ · 7H₂O 0.04, CaCO₃ 3.5。

积累起着重要的作用。

pH 值, 稳定和提高产酸需加 CaCO₃, 结果见图 1。

(二) 碳酸钙用量对 L-亮氨酸产生的影响

在摇瓶试验中为了较好地维持发酵液的

结果表明发酵液中 CaCO₃ 在 3.5% 时对产

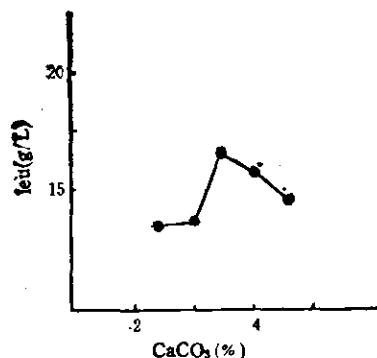


图1 CaCO_3 用量对 L-亮氨酸积累的影响

L-亮氨酸有利,看来 CaCO_3 除了起调节发酵液 pH 的作用外, Ca^{++} 对 L-亮氨酸发酵可能也有一定的促进作用。^[4]

(三) 葡萄糖浓度对 L-421 菌产酸及转化率的影响

葡萄糖是发酵的主要原料,为找出合适的 L-亮氨酸产率高和对糖的转化率高时的葡萄糖用量,做了葡萄糖浓度比较试验,结果见表

表3 葡萄糖用量对 L-亮氨酸产生的影响

葡萄糖用量 (%)	Leu. (g/L)	对糖的转化率 (%)
11.0	17.4	17.19
12.0	25.1	22.74
13.0	24.1	20.40
14.0	24.7	19.18
15.0	26.3	19.06

3。

试验表明葡萄糖含量在 12—15% 时, L-亮氨酸产量波动不大,都在 20g/L 以上。当糖浓度为 12% 时转化率最高。从节约原料看对糖浓度不宜过高。采用流加糖的方法可期望提高产酸和对糖的转化率有待进一步研究。

(四) 通气量对 L-亮氨酸产生的影响

在一定搅拌形式下,通气量对菌体产生亮氨酸有较大的影响,在 200 升罐上试验结果见

表4 通气量对 L-亮氨酸产生的影响

通气 V/V/min	1:0.5	1:0.6	1:0.8	1:1.0
Leu. (g/L)	16.7	16.9	19.5	17.2

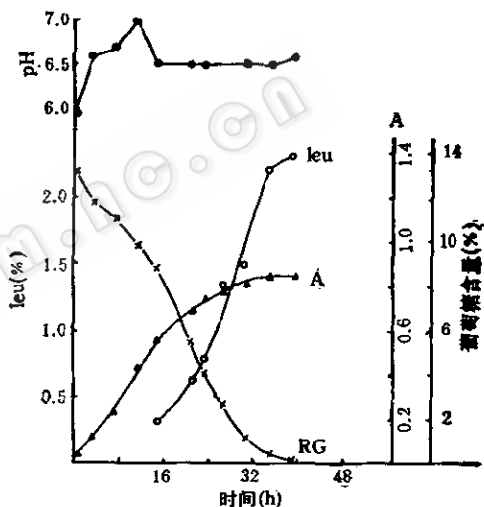


图2 L-亮氨酸发酵过程

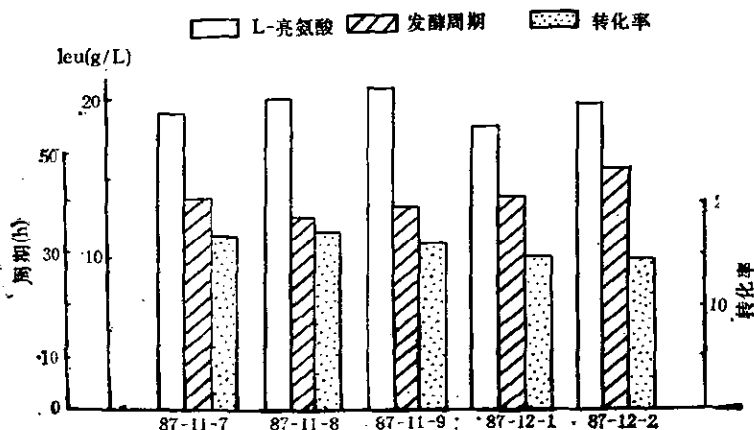


图3 L-亮氨酸稳产试验

表 4。合适的搅拌与通风量有利菌体在发酵液中积累亮氨酸。

(五) L-亮氨酸发酵过程

在 2000 升罐上发酵过程见图 2,当发酵 39 小时 L-亮氨酸产酸可达 20g/L, 糖的转化率达 16%。

(六) 2000 升罐发酵稳产试验

用 L-421 菌在 2000 升罐上连续五批稳产试验证明 L-421 菌产 L-亮氨酸比较稳定, 平均 L-亮氨酸产量为 19.6g/L, 对糖的转化率为 15.82%, 提取收率可达 40% 以上。说明 L-421 菌是一株优良的产 L-亮氨酸菌株。结果见图 3。

讨 论

钝齿棒状杆菌 AS1.542 经多次 NTG 诱

变,快中子照射和单菌分离获得 L-421 菌,通过摇瓶条件试验、200 升和 2000 升罐发酵试验均证明该菌是发酵生产 L-亮氨酸的优良菌种。其性能稳定,所用原料简单,发酵工艺简便,周期短,适于工业生产。

据日本文献报道,利用 CaCl_2 能促进 L-亮氨酸产率提高,有必要用 CaCl_2 对 L-421 菌的影响做进一步探讨,以便更稳定地提高 L-亮氨酸产量。

参 考 文 献

- [1] 王孟薇等: 氨基酸杂志, 2: 16—18, 1984。
- [2] 俞长奎: 氨基酸杂志, 1: 6—11, 1984。
- [3] 张素珍等: 微生物学报, 19(2): 180—186, 1979。
- [4] 明石邦彦(味の素): 特许公报 48: 194, 1977。