

北京棒状杆菌 AS 1.299 的营养缺陷型 变异株生产赖氨酸的研究*

中国科学院微生物研究所、杭州味精厂

赖氨酸是一种必需氨基酸。在食品、饲料及医药应用方面具有相当重要的实用意义。目前有不少国家非常重视以微生物发酵进行赖氨酸生产的研究。

1956 年 Casida^[1] 报道了二步发酵法进行工业生产赖氨酸的专利,首先是培养大肠杆菌的赖氨酸营养缺陷型,使之产 α , ϵ -二氨基庚二酸,然后再以产气杆菌或不要求赖氨酸的大肠杆菌野生型所产生的二氨基庚二酸脱羧酶,将 α , ϵ -二氨基庚二酸脱去羧基而形成赖氨酸。

1958 年 Kinoshita 等^[2]和 1961 年 Nakayama 等^[2]先后报告了利用谷氨酸小球菌(*Micrococcus glutamicus*)的高丝氨酸或蛋氨酸与苏氨酸,蛋氨酸营养缺陷型,以糖质原料直接发酵产生大量赖氨酸的研究,之后,Зайцева^[3] 也发表了采用谷氨酸小球菌的营养缺陷型直接发酵产生赖氨酸的研究。1967 年 Sano 和 Shiio^[3] 报告了利用黄色短杆菌(*Brevibacterium flavum*)的营养缺陷型生产赖氨酸的研究工作。

我们对谷氨酸产生菌北京棒状杆菌 (*Corynebacterium pekinense*) AS 1.299^[4] 进行了人工诱变,获得了产生赖氨酸的高丝氨酸、苏氨酸、亮氨酸或蛋氨酸与苏氨酸营养缺陷型,并初步研究了高丝氨酸缺陷型 AS1.563 菌株产生赖氨酸的培养条件。

一、实验方法

(一) 菌种

以产谷氨酸菌北京棒状杆菌 (*Corynebacterium pekinense*) AS 1.299 作为人工诱变的初发菌株,经硫酸二乙酯处理得到的高丝氨酸、苏氨酸、亮氨酸或蛋氨酸与苏氨酸等营养缺陷型。

(二) 培养基组成

完全培养基:牛肉膏 10 克,蛋白胨 10 克,酵母膏 5 克,氯化钠 5 克,洋菜 20 克,自来水 1000 毫升, pH 7.0。

基础培养基:葡萄糖 20 克, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 2 克, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.4 克, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 和 $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 各 20 毫克,生物素 20 微克,硫酸素 200 微克,水洗洋菜 20 克,蒸馏水 1000 毫升, pH 7.0。

发酵基础培养基:葡萄糖 100 克, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 20 克, K_2HPO_4 0.5 克, KH_2PO_4 0.5 克, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.25

* 本文曾于 1973 年 5 月在芜湖召开的全国微生物育种学术讨论会分组会上宣读过,这次发表对内容作了补充。

克, 酪蛋白胨 5 克, 生物素 20 微克, 硫胺素 200 微克, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 及 $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 各 20 毫克, CaCO_3 10 克, 自来水 1000 毫升, pH 7.2。

(三) 诱变方法

以 AS 1.299 新鲜斜面菌种, 接种于液体完全培养基, 在 30℃ 摇床振荡培养 18 小时, 然后离心收集菌体。所得菌体以生理盐水洗二次, 并以磷酸盐缓冲液 (pH7) 制成 5×10^8 毫升菌液。取 10 毫升菌液加入 0.2 毫升硫酸二乙酯 (北京化工厂) 在 200 毫升三角瓶, 30℃ 摇床振荡 20 分钟, 振荡完毕, 吸取 0.1 毫升菌液 (硫酸二乙酯未去除) 加入 10 毫升完全培养基, 于 30℃ 摇床振荡培养 18 小时, 然后以生理盐水作适当稀释涂在完全培养基平板上, 置 30℃ 温箱培养 48 小时。

为了分离营养缺陷型, 用影印复制法测定上述平板上菌落, 所得的营养缺陷型再进一步用基础培养基和基础培养基加酪素水解物培养基测定氨基酸缺陷型, 测定结果确定是氨基酸缺陷型者, 接种于牛肉汁斜面上, 供发酵筛选用, 同时用生长图谱法^[10] 测定其营养需要。

(四) 发酵培养方法

将经诱变所分离出的营养缺陷型菌株, 30℃ 18—24 小时培养斜面, 取一环接入装有 10 毫升发酵基础培养基的 200 毫升的三角瓶中, 然后置于迴旋式摇床 (转速: 160—180 转/分, 偏心 2.5 公分) 上, 30℃ 培养 72 小时, 测定产赖氨酸结果。

(五) 发酵液中赖氨酸的定性和定量测定

发酵终, 发酵液以 3000 转/分离心, 所得上清液, 采用纸上电泳法分离其中的赖氨酸。电泳条件: 缓冲液 0.2 M NaAC 溶液, pH 6.4, 电压 300 伏, 电泳时间 2 小时。然后将电泳滤纸取出, 70℃ 干燥, 用 0.05% 茚三酮丙酮液显色。与标准样品对比确定赖氨酸在滤纸上的色谱。将赖氨酸的色谱剪下, 投入比色管中, 洗脱再行显色, 用 72 型分光光度计进行比色定量, 波长为 530 mμ^[11]。同法绘制赖氨酸标准曲线, 以确定样品中的

赖氨酸含量。

二、实验结果

(一) 不同氨基酸缺陷型产赖氨酸的比较

采用上述发酵培养基和培养方法进行了赖氨酸发酵试验, 从表 1 所得结果, 可以看出不同氨基酸缺陷型产生赖氨酸量是有差异的, 其中以高丝氨酸缺陷型菌株 AS 1.563 产量最高, 同时也表明其他高丝氨酸缺陷型菌株的赖氨酸产量也优于其他几种氨基酸缺陷型菌株。

表 1 北京棒状杆菌 AS 1.299 的不同氨基酸缺陷型变异株产赖氨酸的比较

菌号	要求的氨基酸	赖氨酸产量(毫克/毫升)	菌号	要求的氨基酸	赖氨酸产量(毫克/毫升)
AS1.563	高丝氨酸	17.93	AS1.715	苏氨酸	6.66
"1.712	"	14.33	"1.718	亮氨酸	6.33
"1.713	"	13.60	"1.719	苏氨酸	2.33
"1.714	"	11.33	"1.720	苏氨酸、蛋氨酸	2.00

我们采用了上表所得出的要求高丝氨酸的营养缺陷型菌株 AS 1.563 进行了初步的发酵试验。

(二) 不同糖类对 AS 1.563 菌产赖氨酸的影响

试验采用了上述发酵基础培养基, 分别加入葡萄糖、蔗糖及麦芽糖各 10%, 同上法进行发酵培养。培养 72 小时测得产酸结果见表 2。

表 2 AS 1.563 菌利用不同糖类产赖氨酸的结果

产 物	葡萄糖	蔗糖	麦芽糖
赖氨酸(毫克/毫升)	15.6	15.20	18.27

从上表可以看出利用麦芽糖产赖氨酸的结果优于另外二种糖类, 利用葡萄糖和蔗糖产赖氨酸的结果无大差异。为此, 从工业生产考虑, 又采用废糖蜜和豆饼水解物分别代替葡萄糖和酪蛋白胨。进行赖氨酸发酵试验, 从表 3 所列结果, 认为未经转化的甘蔗糖蜜作为

表 3 1.563 菌利用废糖蜜产赖氨酸的结果

碳源	碳源处理情况	豆饼粉水解物(%)	生物素(微克/升)	硫胺素(微克/升)	$\text{Fe}^{++}, \text{Mn}^{++}$ (ppm)	酪蛋白胨(%)	菌体生长(光密度)	赖氨酸(毫克/毫升)
甘蔗糖蜜	未经转化	0.3	—	—	—	—	0.88	16.33
甘蔗糖蜜	经转化	0.3	—	—	—	—	1.10	16.00
甜菜糖蜜	未经转化	0.3	—	—	—	—	0.88	11.53
甜菜糖蜜	经转化	0.3	—	—	—	—	0.89	10.10
葡萄糖	—	—	20	200	2	0.5	0.83	17.16

注: 基础培养基组成(%): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.0, K_2HPO_4 0.05, KH_2PO_4 0.05, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.025, pH 7.2, CaCO_3 1.0

碳源进行赖氨酸发酵是可行的。

(三) 各种氮源对产赖氨酸的影响

采用发酵基础培养基，分别试验了表 4 所列的各种氮源对 AS 1.563 菌产赖氨酸的影响。结果表明 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 和 NH_4Cl 对产赖氨酸最为有利。

表 4 氮源对 1.563 菌产赖氨酸的影响

氮化物种类	用量 (%)	加入化合物的含氮量 (%)	赖氨酸产量 (毫克/毫升)
NH_4Cl	1.5	0.38	16.55
NH_4NO_3	1.1	"	5.55
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1.8	"	19.90
KNO_3	2.7	"	0
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	1.8	"	8.63
$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	3.0	"	7.55
酒石酸铵	2.5	"	9.43
醋酸铵	2.0	"	7.30
尿素	0.8	"	5.00

(四) 有机氮源和生物素对 AS1.563 菌产赖氨酸的影响

用无维生素酪蛋白水解物代替酪蛋白胨进行赖氨酸发酵试验，试验结果表明：AS 1.563 菌株必需由酪蛋白水解物来满足其对氨基酸的要求，适宜用量为 0.5%。1.0% 用量对产赖氨酸有不利影响。见图 1。在另外的试验中也考察到生物素对积累赖氨酸也是必需的，用量在 5 微克/升已足够。结果见图 2。

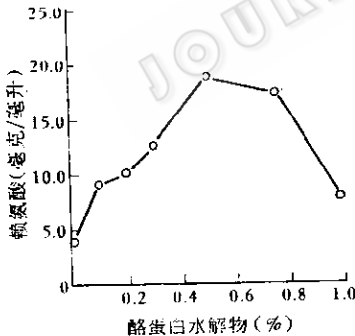


图 1 酪蛋白水解物对产赖氨酸的影响

注：发酵基础培养基(%)：葡萄糖 10, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.0, K_2HPO_4 0.05, KH_2PO_4 0.05, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.025, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 及 $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 各 0.002, 生物素 20 微克/升, 硫酸素 200 微克/升, CaCO_3 1.0, pH 7.2。

此外,用豆饼粉水解物,味精废液,酒糟,玉米浆和动物血料酶水解物代替酪蛋白胨,进行赖氨酸发酵,试验结果表明:使用上述廉价的有机氮源,AS1.563 菌均可产生多量的赖氨酸,其中以使用豆饼粉水解物者产量最高。从而为赖氨酸发酵要求氨基酸营养而不使用

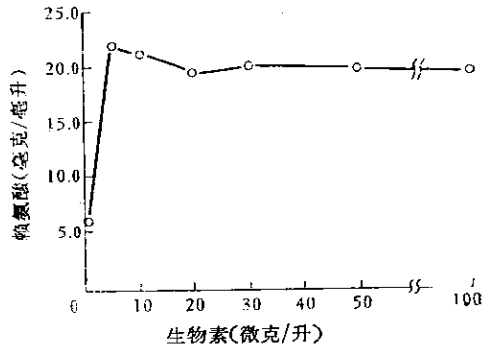


图 2 生物素对产赖氨酸的影响

注：发酵基础培养基(%)：葡萄糖 10, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.0, K_2HPO_4 0.05, KH_2PO_4 0.05, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.025, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 及 $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 各 0.002, 硫酸素 200 微克/升, 无维生素酪蛋白水解物 0.5, CaCO_3 1.0, pH 7.2。

昂贵的酪蛋白水解物提供了比较可行的途径,结果见表 5。

表 5 1.563 菌利用几种廉价有机氮源产赖氨酸结果

有机氮源种类	用量 (%)	发酵终 pH	菌体生长 (光密度)	赖氨酸产量 (毫克/毫升)
豆饼水解物	0.3	5.4	0.87	22.7
	0.5	6.0	0.82	19.0
	1.0	6.2	0.92	22.4
味精废液	0.3	6.0	0.80	16.33
	0.5	5.9	0.78	17.50
	1.0	6.2	0.86	15.60
酒糟	0.6	6.1	0.94	15.83
	1.0	6.2	0.92	15.20
	1.5	6.3	1.08	15.60
玉米浆	1.0	5.4	0.92	11.70
	1.5	5.9	0.82	16.00
	2.0	5.9	0.85	17.17
动物血料酶水解物	1.0	5.9	0.85	15.20
酪蛋白胨	0.5	5.9	0.78	17.33

注：1. 发酵基础培养基成分见方法部分，仅以表中前五种有机氮源分别代替酪蛋白胨。

2. 除玉米浆和味精用湿重及体积计外，其他几种均按干重计。

(五) 初步确定的 AS 1.563 菌株摇瓶发酵产赖氨酸培养条件

综合上述各项对 AS 1.563 菌株的试验结果,我们初步确定了摇瓶培养产赖氨酸的培养条件,同时进行了摇瓶培养的通气试验。试验结果见图 3。采用的发酵培养条件如下:

种子培养基(%)：甘蔗糖蜜糖 2.0, 硫酸铵 0.4,

磷酸氢二钾 0.1, 硫酸镁 0.04, 豆饼粉水解物 0.5, 自来水, pH 7.2, 碳酸钙 0.5, 分装 200 毫升三角瓶, 培养基装量为 25 毫升, 8 磅 15 分钟灭菌。

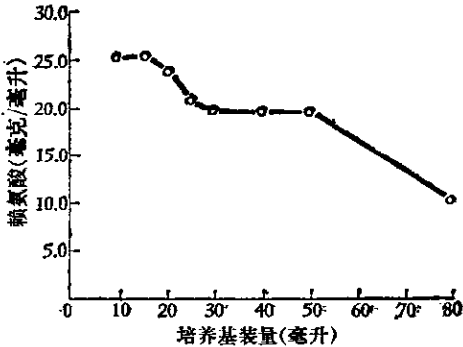


图3 摇瓶通气状况对产赖氨酸的影响

发酵培养基(%)：甘蔗糖蜜糖 10, 硫酸铵 2.0, 磷酸氢二钾 0.1, 豆饼粉水解物 0.3, 自来水, pH 7.0, 碳酸钙 1.0, 分装 500 毫升三角瓶, 培养基装量分别为 10、15、20、25、30、40、50 及 80 毫升(表示各瓶培养过程中的通气量的不同)。8 磅 15 分灭菌。

种龄 12 小时, 接种量 2%, 30℃ 摇瓶培养 72 小时(往复式摇床, 振幅 7.6 厘米, 振次 96 次/分)。

从图 3 所得结果表明, 摇瓶中培养基装量越少对赖氨酸的产生越有利。当 500 毫升三角瓶装 10—15 毫升培养基时产赖氨酸最高, 达 25 克/毫升以上, 装 20 毫升培养基时, 产酸略有下降, 装 25 毫升培养基以上者, 对赖氨酸的产生有明显的不良影响。然而上述摇瓶通气试验所得结果只是相对的。因此, 该菌株的赖氨酸发酵要求的最适通气量, 应以要求的溶解氧系数(Kd 值)表示更为确切, 这是应进一步研究的问题。

(六) AS 1.563 菌株 L-赖氨酸发酵中型试验

我们于 1970 年与北京人民食品厂协作进行了中型赖氨酸发酵初步扩大试验。试验中采用了 500 升发酵罐, 主要培养条件如下:

种子培养基组成(%)：葡萄糖 2.0, (NH₄)₂SO₄ 0.4, K₂HPO₄ 0.1, MgSO₄·7H₂O 0.04, 玉米浆 0.6, 味精废液 0.3(按体积计), pH 7.0, CaCO₃ 0.5。

种龄：一级种子, 30℃, 摇瓶培养 16 小时, 二级种子, 30℃, 30 立升罐培养 10—12 小时。

发酵培养基组成(%)：葡萄糖 10, (NH₄)₂SO₄ 2.0, K₂HPO₄ 0.1, MgSO₄·7H₂O 0.05, 玉米浆 0.6, 味精废液 0.3(按体积计), pH 7.2, CaCO₃ 1.0。

发酵培养条件：种子接种是 3%, 培养温度 30℃, 通气量 1:1.2—1.5(V/V), 搅拌 190—200 r.p.m.。

经初步扩大培养试验, 赖氨酸产率可达 26.0 毫克/毫升, 结果见图 4。

从图 4 所表明的发酵过程可以看出, 残糖较高。

如延长培养时间, 残糖仍未见明显消耗, 产酸也无显著增长, 因此中型试验中所采用的培养条件可能不是最适宜的, 尚需进一步试验。

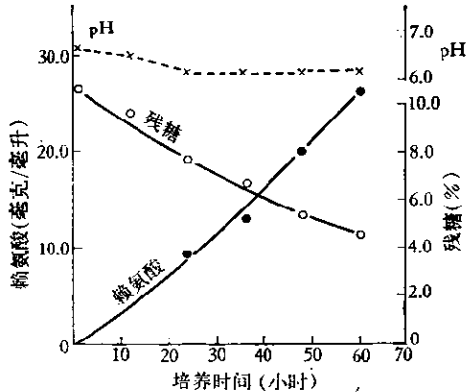


图4 AS 1.563 菌株 500 升罐赖氨酸发酵过程

三、讨 论

1. 从以上所得初步研究结果看, 要求高丝氨酸的变异菌株产赖氨酸的能力, 较要求苏氨酸、亮氨酸以及同时要求苏氨酸和蛋氨酸的菌株都高。这与 Nakayama 等^[3] 和 Sano 等^[4] 所得结果是一致的。Зайцева^[4] 和 Plachy^[4] 在赖氨酸发酵研究中也是采用的要求高丝氨酸的变异菌株。但是 Арешкина 等^[9] 采用短杆菌 No. 22 (*Brevibacterium* No. 22) 的要求苏氨酸的变异菌株, 也能产生大量的赖氨酸, 看来还不能肯定产赖氨酸能力高的菌株仅是要求高丝氨酸的变异菌株。

2. AS 1.563 产赖氨酸菌株, 在含糖 10% 的培养基中, 摇瓶培养 72 小时, 赖氨酸产量达 25.44 毫克/毫升。这一产酸能力高于 Nakayama 等, Зайцева 和 Арешкина 等人所得的结果, 而与 Plachy 研究的结果一致。但从 Sano 等人已得到的产赖氨酸达 40 毫克/毫升以上的高丝氨酸缺陷型菌株看, 从我们的中型扩大试验初步结果和存在的问题看, 进一步研究提高 AS 1.563 菌株的赖氨酸产率, 还是有潜力的。

3. 营养要求的试验表明, 在合成培养基中加入苏氨酸和蛋氨酸, 能代替高丝氨酸使 AS 1.563 菌株生长。因此, 采用蛋白质类水解物供 AS 1.563 菌株赖氨酸发酵的营养要求, 但是用量应注意控制, 否则, 对赖氨酸产量有明显的不良影响。

四、摘 要

北京棒状杆菌 AS 1.299 (*Corynebacterium pectinense* AS 1.299) 经硫酸二乙酯处理, 得到的 8 株产赖氨酸的营养缺陷型中, 要求高丝氨酸的 4 株, 要求苏氨酸的 2 株, 要求亮氨酸的 1 株, 同时要求苏氨酸和蛋氨酸的

1 株。

产赖氨酸能力最高者为 4 株要求高丝氨酸的菌株,其次是要求亮氨酸的和一株要求苏氨酸的菌株,而另一株要求苏氨酸和同时要求苏氨酸及蛋氨酸的菌株仅产少量赖氨酸。

我们选取了一株产赖氨酸较高的,要求高丝氨酸的变异株 AS1.563,进行了摇瓶发酵条件的研究,这一菌株在含糖 10% 的培养基中赖氨酸产率达 25.44 毫克/毫升,糖转化率 25% 左右。经 500 立升罐扩大培养的初步试验,赖氨酸产率可达 26.0 毫克/毫升。

参 考 资 料

[1] Casida, L. E. Jr. & Bladwin, N. Y.: U. S. patent, 2, 771, 396. 1956.

[2] Kinoshita, S. et al: *J. Gen. Appl. Microbiol.* **4**: 128—129 1958.

[3] Nakayama, K. et al: *J. Gen. Appl. Microbiol.* **7**: 145—172 1961.

[4] Зайчева, З. М.: *Прикл. Биохим. и Микробиол.* **2**: 519—525 1966.

[5] Sano, K. & Shiio, I.: *J. Gen. Appl. Microbiol.* **13**: 349—358 1967.

[6] 陈琦等: *微生物学报*, **13**(1): 1—6 1973.

[7] 潘家秀等编著: *蛋白质化学研究技术*, 科学出版社, 27—28, 79—81 页 1962.

[8] Plachy, J.: *Folia Microbiologica*, **15**: 347—349 1970.

[9] Арешкина, Л. Я. 等: *Прикл. Биохим. и Микробиол.* **1**: 396—403 1965.

[10] Ryan, F. J.: *Methods in Medical Research*, **3**: 51 1950.