

HU 7251 谷氨酸产生菌的筛选及 发酵条件的初步试验

杭州味精厂谷氨酸产生菌筛选诱变小组

糖质发酵生产谷氨酸在本世纪六十年代全国普遍推广应用以后,给我国的味精生产工业带来了重大技术革新。这不但在生物化学研究上有重要意义,而且对于发展我国国民经济也有很大价值。

近几年来,我国谷氨酸发酵工业,在毛主席革命路线指引下,有了很大的发展,取得了可喜的成绩。为进一步落实毛主席提出的“**深挖洞、广积粮、不称霸**”的伟大战略方针,为了赶超世界先进水平,促进味精生产的飞速发展,需要有更多更好的菌种。我们小组于1972年4月从土壤中分离筛选野生型的糖质发酵谷氨酸产生菌种,供生产使用或诱变提高。参加这一工作的有厦门第三化工厂、芜湖味素厂、上海马陆人民公社综合利用厂、苏州味精厂及常州味精厂等兄弟单位。

同年5月份分离筛选到一株野生型的糖质发酵谷氨酸产生菌编号HU 7251号。现将谷氨酸发酵试验结果报告如下。

一、材料与方 法

(一)样品的采集

微生物广泛分布于地球表层,土壤是微生物生活的良好环境,是我们这次筛选菌种的主要范围。选择好适当的地点后,用小铲子除去表土,取5—10厘米深处

的土壤几十克,装入事先消毒过的纸袋内,记录好采土时间、地点、植被等情况。我们共采集了海南岛、厦门、绍兴、莫干山、西天目山及杭州等地四十余处土壤样品,按先后采到土壤的次序于实验室进行分离。

(二)菌株的分离

1. 取采集来的新鲜土样1克用肉汤培养基(加葡萄糖0.1%)稀释(10^{-3})平板法进行分离。30℃培养2天后,挑选表面完整,色泽带黄、淡黄或乳白色,不使培养基发生任何变化和臭气之菌落,移植于含有指示剂BTB(溴百里蓝 Bromothymol Blue)的穿刺培养基中进行穿刺培养,以选其好气性并使BTB变黄色之菌株。再移植于(加0.1%葡萄糖)肉汤培养基斜面上培养保存,作进一步鉴定和试验。

2. 形态观察应为一般常用谷氨酸产生菌之特征。

2. 穿刺培养基 葡萄糖0.1%,蛋白胨0.2%, NaCl 0.3%, BTB 0.01%,琼脂0.5%, pH 7.0。

4. 液体培养基成份 葡萄糖5%, K_2HPO_4 0.1%, $MgSO_4$ 0.04%,玉米浆0.2%, Fe^{++} 和 Mn^{++} 各2 p.p.m., pH 6.8。

20×200毫米试管装8毫升,1公斤/厘米²灭菌20分钟,分别添加1.2%,接种后在30℃下,振荡培养48小时(振幅76毫米,频率108次/分,下同),然后将发酵液进行纸层析与标准谷氨酸样品对比,如有较深的

斑点样品,再进行检压技术的分析,当被检样品的谷氨酸含量在15%以上时便将该菌株进行摇瓶产酸试验。

(三) 菌种发酵谷氨酸摇瓶试验

1. 供试菌种

HU 7251 号,分离自海南岛土壤。

2. 培养基

(1) 斜面培养基成份: 葡萄糖0.1%,牛肉膏1%,蛋白胨1%,氯化钠0.5%,洋菜2.0%,用 NH_4OH 调节 pH 7.0, 1.15 公斤/厘米² 灭菌 30 分钟。

(2) 一级种子培养基成份: 葡萄糖 2.5%, 尿素 0.5%, MgSO_4 0.04%, K_2HPO_4 0.1%, 玉米浆 1.5%, Fe^{++} 和 Mn^{++} 各 2 p.p.m., pH 6.8, 1 公斤/厘米² 灭菌 15 分钟。1000 毫升三角瓶装培养液 200 毫升, 八层纱布, 一层绒布。

培养条件: 灭菌后的培养基, 接入斜面种子一环, 置于往复式摇床上振荡培养, 31℃ 培养 12—13 小时。

pH 6.4—6.5

生长光密度 (OD) 0.85—0.95

残糖 (RG) 0.1—0.25%

镜检: 菌体整齐排列人字形者多数。

(3) 摇瓶试验条件: 500 毫升三角瓶内装培养液 25 毫升, 基础培养基分别添加尿素, 控制发酵液 pH 7.2—7.3, 摇床振幅 76 毫米, 频率 108 次/分, 接种后在 30℃ 下进行振荡培养 45 小时, 发酵液先用纸层析找出较深的谷氨酸斑点, 再进行检压技术分析, 当谷氨酸的含量在 3% 以上, 菌种便可以深入进行发酵条件研究。

(四) 材料来源

1. 葡萄糖 医用口服固体葡萄糖, 杭州第一制药厂产。

2. 玉米浆 工业品, (国产)。

3. 尿素 工业品, (国产)。

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 ,

$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,

$\text{MnSO}_4 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ 等均作为 (国产) 三级试剂。

(五) 测定方法

用目前生产上所使用的常规方法。

二、内容及结果

(一) 菌株的初筛

我们从采集到的四十个土壤样品中, 经过初筛, 发现自海南岛土壤中分离出来的 HU7251 号菌株谷氨酸产率较高 (表 1)。该菌的形态培养特征是革兰氏阳性短杆菌, 镜检人字形排列, 有时棒状单个, 两端尖。在肉汁琼脂培养基上菌落显乳淡黄色, 边缘整齐润湿

表 1 初筛试验结果

菌 种	谷氨酸 (%)	残糖 (%)
HU 7251	2.11	0.40
HU 7253	1.47	1.40
HU 7257	1.85	0.60
HU 7259	1.64	0.90
AS 1.542(对照)	1.88	0.20

光滑, 略带粘稠度, 随着培养时间延长, 菌落色泽为淡黄, 生长旺盛, 容易挑起。因此决定对该菌进行进一步的摇瓶产谷氨酸的条件试验。

(二) HU 7251 菌发酵条件试验

1. 不同尿素用量的试验结果于表 2。

表 2 尿素不同用量试验结果

菌 种	尿素 用量 (%)	总尿 素量 (%)	45 小时 结果			
			pH	菌体生长 (光密度)	残糖 (%)	谷氨酸 (%)
HU 7251	1.2	3.2	7.6	0.90	0.30	5.20
			7.7	0.92	0.50	5.20
			7.5	0.92	0.40	5.23
	1.4	3.0	7.2	0.95	0.40	5.71
			7.3	0.92	0.30	5.99
			6.8	0.94	0.20	6.23
	1.6	3.0	6.7	0.95	0.40	2.20
			6.8	0.93	0.20	5.58
			7.1	0.94	0.10	5.17
	1.8	3.1	7.5	0.92	0.20	5.55
			7.2	0.88	0.30	5.51
			7.0	0.89	0.10	5.51
AS 1.542 对 照	1.6	3.0	7.0	0.95	0.10	5.23
			7.1	0.94	0.10	5.26
			7.0	0.95	0.20	5.26

注: 发酵培养基组成:

葡萄糖 13%, KH_2PO_4 0.15%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.04%, 玉米浆 0.6%, Fe^{++} 和 Mn^{++} 各 2 p.p.m. pH 6.8, 1 公斤/厘米² 灭菌 10 分钟。

表 2 结果表明, 在培养开始时培养基中含尿素 1.4% 为佳, 产酸与 AS 1.542 菌接近。可见该菌所需的氮源也如同现在使用的谷氨酸产生菌一样, 具有同化尿素的能力, 以调节 pH 和形成谷氨酸。

2. 不同玉米浆量的试验 许多谷氨酸产生菌是以生物素为必需生长因子, 培养基中生物素含量的多少, 不但对菌体的生长量有关, 而且对谷氨酸的生成量也有关。作为提供生物素来源的玉米浆用量多少与谷氨酸发酵有很大关系, 其用量试验结果见表 3。

表3 不同量的玉米浆试验

玉米浆量 (%)	总尿 素量 (%)	45 小时 结果			
		pH	菌体生长 (光密度)	残 糖 (%)	谷氨酸 (%)
0.55	3.2	7.5	0.81	1.20	5.67
		7.5	0.78	0.90	5.96
		7.2	0.84	0.95	5.47
0.60	3.2	7.6	0.85	0.90	5.71
		7.2	0.82	0.90	5.71
		7.3	0.83	0.70	5.86
0.65	3.2	7.7	0.86	0.85	5.84
		7.7	0.85	0.85	6.34
		7.6	0.87	0.40	6.06
0.70	3.3	7.2	0.84	0.35	6.17
		7.1	0.83	0.50	5.81
		6.8	0.81	0.65	5.61

注：发酵培养基成分：

葡萄糖 13%， KH_2PO_4 0.15%， MgSO_4 0.06%， Fe^{++} 和 Mn^{++} 各 2 p.p.m.，pH 6.8。

试验结果 HU 7251 菌种的玉米浆用量比 AS 1.542 稍高一些，0.65% 量比较佳。但残糖消耗比较差一些，这里可能与磷的用量有关系。

3. 不同磷的试验结果 磷的用量对糖的酵解有很大的作用，用量越少残糖越高，反之用量越大糖的酵解越快，残糖越少，但谷氨酸产率稍低，试验结果是 0.14% 的用量比较佳（见表 4）。

表4 不同 KH_2PO_4 试验

不同 磷量 (%)	总尿 素量 (%)	45 小时 结果			
		pH	菌体生长 (光密度)	残 糖 (%)	谷氨酸 (%)
0.13	3.15	6.5	0.82	1.10	5.94
		6.4	0.81	1.00	5.88
		6.5	0.82	1.25	5.76
0.14	3.2	7.2	0.90	0.10	6.50
		6.4	0.90	0.10	6.10
		6.4	0.90	0.10	6.20
0.16	3.2	6.4	0.91	0.10	6.24
		6.4	0.90	0.10	6.11
		6.4	0.90	0.05	6.05
0.18	3.2	6.4	0.91	0.05	6.17
		6.6	0.94	0.10	5.40
		6.4	0.91	0.05	5.94
0.20	3.2	6.5	0.94	0.05	5.69
		6.4	0.91	0.05	5.71
		6.4	0.93	0.05	5.68

4. 为了进一步摸索培养基成分，我们做了不同量镁的试验看看对发酵的影响，从试验结果看，镁的用量少产酸稍低一些，用量大也无明显的影响，比较来着 0.06% 的用量为宜。

5. 从不同量的铁锰离子对该菌种发酵影响的试验结果来看，不加铁锰离子产酸稍低。比较来看其用量为 6 p.p.m. 最佳。

6. 为了给下一步扩大试验打下基础，我们进行了不同风量的试验，其结果如表 5。

表5 通风量试验

不同装 液量	总尿 素量 (%)	45 小时 结果			
		pH	菌体生长 (光密度)	残 糖 (%)	谷氨酸 (%)
20 毫升	3.0	7.0	0.90	0.40	5.90
		7.0	0.91	0.40	5.85
		7.0	0.91	0.40	5.79
25 毫升	3.0	7.2	0.92	0.30	5.89
		7.2	0.92	0.20	6.10
		7.0	0.92	0.30	6.00
30 毫升	3.0	6.5	0.92	0.40	5.56
		6.5	0.92	0.35	5.98
		6.5	0.93	0.35	5.86
35 毫升	3.0	7.7	0.85	0.60	5.58
		7.7	0.85	0.55	5.70
		7.7	0.85	0.50	4.81

500 毫升三角瓶分别装 20 毫升，25 毫升，30 毫升，35 毫升培养液。试验结果，以 500 毫升三角瓶内放 25 毫升较好。

7. 代替玉米浆和添加米糖水溶液的试验 玉米浆是提供生物素的主要来源，然而在当前发酵工业中普遍感到玉米浆货源供应极其困难，因此有必要寻找其代用原料。根据我厂 AS 1.542 菌采用麸皮水解液可以代替玉米浆的情况，对 HU 7251 菌也进行了试验，其试验结果如表 6。

从这次试验来看，麸皮水解液适宜用量为 4.5%，但与玉米浆比较谷氨酸产率是低一些，糖消耗也差。由于我们缺少方法和经验，对使用麸皮水解液尚有待进一步研究的必要。

另外根据 HU 7251 要求有较丰富营养的特点，广泛促使它提高产酸率，我们还进行了添加米糖水溶液的试验，其结果见表 7。

由表 7 可见米糖水溶液，可以促使谷氨酸的提高，根据本次试验其用量 0.1% 比较佳。

(三) 发酵培养基综合试验

通过上述一系列培养基成分的单选选择试验以

表 6 麸皮水解液用量试验

麸皮水解液用量 (%)	总 尿 素 量 (%)	45 小时 结果			
		pH	菌体生长 (光密度)	残 糖 (%)	谷氨酸 (%)
3.8	3.0	7.3	0.88	1.80	4.85
		7.2	0.87	1.30	5.29
		7.2	0.87	0.90	5.38
4.0	3.0	7.3	0.88	1.20	5.36
		7.3	0.88	1.00	5.23
		7.3	0.90	0.90	5.25
4.5	3.0	7.5	0.94	1.00	5.88
		7.5	0.90	1.10	6.30
		7.5	0.95	0.90	5.93
5.2	3.0	7.8	1.05	1.00	4.90
		7.7	1.05	0.80	5.20
		7.7	1.05	1.10	5.30

注: 1. 发酵培养基成分 酶酸法水解糖 13%, KH_2PO_4 0.14%, MgSO_4 0.06%, Fe^{++} 和 Mn^{++} 各 6 p.p.m., pH 6.8, 米糠水解液 0.1%。

2. 麸皮水解条件 1 斤干麸皮 5.5 斤水, 浓 $\text{HCl}(6\text{Be}^\circ)$ 12%, 1.15 公斤/厘米² 60 分钟, 放出过滤即可。

后,基本上选出了一个比较适宜的成分,为了证实其效果,故将所选出的适宜用量综合起来进行试验,结果见

表 8。

通过综合条件摇瓶发酵试验产酸基本上稳定在 6% 以上,从而为扩大试验提供了良好的开端。

HU 7251 菌株经 11 罐次的大罐试验,谷氨酸产率平均在 5.0%,糖转化率近 40%。

表 7 米糠水解液用量试验

米糠液用量 (%)	总 尿 素 量 (%)	45 小时 结果			
		pH	菌体生长 (光密度)	残 糖 (%)	谷氨酸 (%)
0.05	3.2	7.7	0.90	0.50	5.88
		7.7	0.92	0.45	5.83
		7.7	0.93	0.50	6.02
0.10	3.2	6.9	0.83	0.95	6.28
		6.4	0.82	0.60	6.32
		6.4	0.85	0.60	6.32
0.20	3.1	6.4	0.78	0.60	6.13
		6.4	0.78	0.40	6.24

注: 1. 发酵培养基成分 葡萄糖 13%, 玉米浆 0.65%, KH_2PO_4 0.14%, Fe^{++} 和 Mn^{++} 各 6 p.p.m., pH 6.8。

2. 米糠水解条件 米糠 100 克(提炼过油), 水 500 毫升, 工业 HCl 20 毫升, 1 公斤/厘米² 60 分, 过滤即可。

表 8 综合条件发酵试验结果

No. 项目	发酵时间 (小时)		0			15		20		24		28.5		45 小时 结果			
	接种	U (%)	pH	pH	U (%)	pH	U (%)	pH	U (%)	pH	U (%)	pH	菌体生长 (光密度)	残 糖 (%)	谷氨酸 (%)		
1—1	1%	1.4	6.4	7.2	0.6	7.2	0.4	7.3	0.4	7.3	0.3	6.4	0.87	0.50	6.15		
1—2	”	”	”	7.1	”	7.2	”	7.2	”	7.3	”	7.1	0.85	0.80	6.36		
1—3	”	”	”	7.1	”	7.2	”	7.1	”	7.0	”	6.4	0.87	0.55	6.19		
1—4	”	”	”	7.1	”	7.3	”	7.2	”	7.3	”	6.4	0.87	0.30	6.04		
1—5	”	”	”	7.2	”	7.2	”	7.2	”	7.1	”	6.4	0.86	0.20	6.20		
1—6	”	”	”	7.2	”	7.2	”	7.2	”	7.2	”	6.4	0.87	0.40	6.15		

注: 1. 发酵培养基成分同表 7 所注, 米糠水解液量 0.1%。

2. 表中 U 为流加尿素量。