

几种淀粉对谷氨酸发酵周期的影响

全国谷氨酸发酵第一协作组

我们这个以工人为主体的“三结合”试验小组,是在批林批孔运动的推动下,在党的基本路线指引下成立起来的。为了提高和稳定谷氨酸发酵产率,我们遵照伟大领袖毛主席关于“独立自主、自力更生”的教导,团结协作,研究了几种不同质量的淀粉对谷氨酸发酵的影响。AS 1.542 菌株的发酵结果表明:淀粉原料中生物素含量的不同,谷氨酸发酵的周期和产率就有明显差异。因此,当使用不同淀粉原料进行谷氨酸发酵时,应依其生物素含量补充玉米浆,以使生物素含量维持在谷氨酸发酵的适宜水平,即可达到发酵周期短,谷氨酸产率高的要求。

材料与方 法

一、菌株

钝齿棒状杆菌 (*Corynebacterium crenesum*) AS 1.542 菌株,要求生物素作为必须生长因子。

二、原料

一般淀粉:淀粉厂生产的玉米淀粉,杂质较少,比较纯净。

白淀粉:系人民公社粉坊加工生产的淀粉,原料多为薯干。

黑淀粉:粉坊以薯干为原料制白淀粉时,在合格的白淀粉上层的不易沉淀的部分经烘干而成,杂质较多,质量低劣。

d-生物素、d-葡萄糖、硫酸镁、磷酸氢二钾、硫酸锰、硫酸亚铁,摇瓶试验用分析纯,中型试验用化学纯。

三、培养基

(一) 斜面培养基为牛肉膏培养基。

(二) 种子及发酵培养基见表 1。

四、发酵条件

(一) 摇瓶试验

装液量:每 500 毫升三角瓶装 25 毫升,在 $30 \pm$

1℃ 室温中,以往复式摇床(冲程 7.6 厘米,振次 104 次/分)振荡培养,流加 pH6.7—7.2。分别于 18、24、36 小时测残糖、谷氨酸。下摇床后还加测菌生长光密度。

表 1 培养基成份

| 成 份 | 种 子 | | 摇 瓶 发 酵 | | 中型 发酵 |
|------------|--------|--------|---------|------------|----------|
| | 一级 | 二级 | 天然 | 合 成 | |
| 淀 粉 糖(%) | 0.25 | 0.22 | 12 | | 11—13 |
| d-葡 萄 糖(%) | | | | 13 | |
| 玉 米 浆(%) | 0.7 | 0.9 | 不定 | | 不定 |
| 生 物 素 | | | | 0—50(微克/升) | |
| 磷酸氢二钾(%) | 0.2 | 0.2 | 0.15 | 0.15 | 0.15 |
| 硫 酸 镁(%) | 0.06 | 0.06 | 0.075 | 0.075 | 0.075 |
| 硫 酸 锰(%) | 0.0002 | 0.0002 | 0.0002 | 0.0002 | 0.0002 |
| 硫 酸 亚 铁(%) | 0.0002 | — | 0.0002 | 0.0002 | — |
| 尿 素(%) | 0.5 | 0.3 | 1.2 | 1.0 | 1.0 |
| pH | 7.0 | 7.0 | 7.0 | 7.0 | 7.0 |

(二) 中型试验

罐容 500 升,定容 350 升,搅拌转数 280 转/分,通风量 1:0.3,接种量 1.0%,培养温度 30—34℃,流加液 pH7.1,种子为二级种子。

五、分析方法

L-谷氨酸、残糖、菌体生长量(以光密度表示)及 pH 测定均按淀粉糖质发酵谷氨酸常规方法。

生物素含量用生物测定法。

试 验 结 果

一、几种淀粉水解糖对谷氨酸发酵周期的影响

摇瓶试验结果表明:在不加玉米浆时,黑淀粉水解糖的培养基中菌生长状况最好,耗糖、产谷氨酸速度也最快。在白淀粉、一般淀粉水解糖的培养基中,菌生长、积累谷氨酸量依次减少,耗糖速度依次减慢(图 1)。中型试验结果也表明,用黑淀粉比用白淀粉水解糖时发酵周期要短(表 2)。

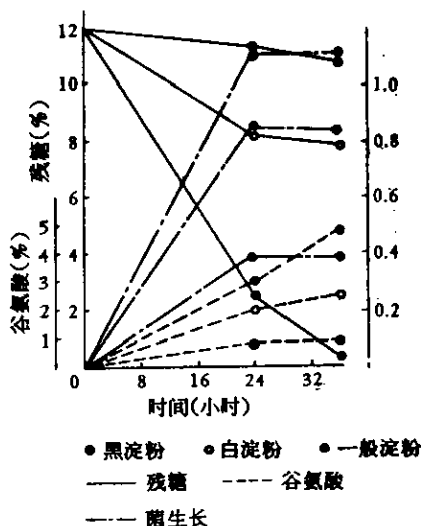


图1 几种淀粉水解糖对谷氨酸发酵周期的影响

表2 黑、白淀粉水解糖谷氨酸发酵周期的比较

| 糖源 | 玉米浆 (%) | 残糖 (%) | 菌生长 (光密度) | 谷氨酸 (%) | 发酵周期 (小时) |
|--------|---------|--------|-----------|---------|-----------|
| 黑淀粉水解糖 | 0 | 0.9 | 1.1 | 3.52 | 38 |
| | 0.3 | 0 | 1.15 | 4.12 | 26 |
| | 0.75 | 0 | 1.5 | 4.00 | 20.5 |
| 白淀粉水解糖 | 0 | 0.7 | 0.9 | 2.04 | 68 |
| | 0.3 | 0.2 | 1.05 | 4.4 | 30 |
| | 0.75 | 0 | 1.2 | 4.5 | 25 |

二、玉米浆对几种淀粉水解糖谷氨酸发酵周期的影响

玉米浆是成分复杂的天然有机物,实验证明,玉米浆的加入量对谷氨酸发酵有明显影响,在黑淀粉、白淀粉和一般淀粉水解糖的培养基中,加入玉米浆较多的发酵时间较短。原料不同,对玉米浆的要求量也不等,

一般淀粉、白淀粉、黑淀粉为原料时,对玉米浆的需要量依次减少。对大量积累谷氨酸而言,玉米浆用量有一个相当的幅度(图2)。

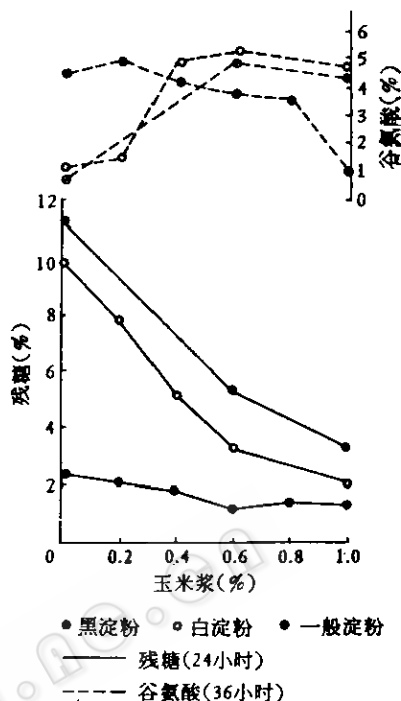


图2 玉米浆对几种淀粉水解糖谷氨酸发酵的影响

三、在合成培养基中生物素对谷氨酸发酵的影响

据国内外大量的文献报道,以糖类为基质的谷氨酸生产菌绝大多数要求生物素作为必需的生长因子。为查明上述几种淀粉水解糖及玉米浆用量对谷氨酸发酵的影响是否由于生物素的作用,特对生物素用量与谷氨酸发酵的关系作了探讨。结果表明,AS1.542菌株在合成培养基(表1)中添加生物素时可以生长良好,

表3 生物素对AS1.542菌株谷氨酸发酵的影响*

| 生物素 (微克/升) | 18 | | | 24 | | | 36 | | |
|------------|-----------|--------|---------|-----------|--------|---------|-----------|--------|---------|
| | 菌生长 (光密度) | 残糖 (%) | 谷氨酸 (%) | 菌生长 (光密度) | 残糖 (%) | 谷氨酸 (%) | 菌生长 (光密度) | 残糖 (%) | 谷氨酸 (%) |
| 0 | 0.065 | 12.8 | 0 | 0.07 | 13.0 | 0.04 | 0.07 | 12.2 | 0.16 |
| 0.5 | 0.42 | 10.9 | 0.51 | 0.40 | 10.7 | 0.67 | 0.42 | 9.1 | 0.92 |
| 1.0 | 0.6 | 10.2 | 0.90 | 0.58 | 8.5 | 1.48 | 0.63 | 6.3 | 2.20 |
| 2.5 | 0.81 | 7.5 | 1.14 | 0.83 | 5.7 | 2.49 | 0.88 | 0.4 | 3.40 |
| 5.0 | 0.92 | 3.9 | 0.78 | 0.98 | 2.0 | 1.28 | 1.0 | 0.3 | 2.46 |
| 10.0 | 1.00 | 2.8 | 0.28 | 1.10 | 2.4 | 0.33 | 1.18 | 0.3 | 0.55 |
| 50.0 | 1.02 | 2.7 | 0.21 | 1.15 | 2.7 | 0.08 | 1.19 | 0.7 | 0.34 |

* 摇瓶试验,一级种子经离心,18、24、36小时样品为同一批三个平行样。

生物素用量在 2.5 微克/升以下时, 菌生长、耗糖及积累谷氨酸的速度均依生物素用量的提高而加快。当用量超过 2.5 微克/升时, 随生物素用量的提高, 谷氨酸的积累则降低 (表 3)。

四、几个因素对谷氨酸发酵影响的综合考察

正交设计法系多因素的优选法, 在谷氨酸发酵试验中使用此法, 便于找出主要影响因素和适宜条件, 用正交设计法对糖源、初尿量等因素进行综合考察, 结果见表 4。

从表中可以看出, 糖源和玉米浆对谷氨酸产率的

表 4 几个因素对谷氨酸发酵的综合考察
I. 因素及水平

| 水平 | 因 素 | 糖源 | 尿 素 初用量 (%) | 玉米浆 (%) | 磷酸盐 (%) | 黑废液 (%) | 硫酸镁 (%) |
|----|-----|-------|-------------------|------------|------------|------------|------------|
| 1 | | 白淀粉 | 0.8 | 0.2 | 0.05 | 0 | 0.03 |
| 2 | | 黑淀粉 | 1.0 | 0.5 | 0.15 | 0.5 | 0.075 |
| 3 | | 白、黑各半 | 1.5 | 0.8 | 0.25 | 0.7 | 0.15 |

II. 正 交 试 验 设 计 表*

| 试 验 号 | 因 素 | 糖 源 | 尿 素 初用量 | 玉米浆 | 磷酸盐 | 黑废液 | 硫酸镁 | 24 小 时 | | 36 小 时 | |
|------------------------------|-----|-------|------------|-------|-------|-------|-------|-------------------------------------|------------|------------|------------|
| | | | | | | | | 残 糖 (%) | 谷氨酸 (%) | 残 糖 (%) | 谷氨酸 (%) |
| 1 | | 1 | 1 | 3 | 2 | 2 | 1 | 1.0 | 2.74 | 0.9 | 3.05 |
| 2 | | 2 | 1 | 1 | 1 | 1 | 2 | 3.5 | 0.89 | 0.9 | 1.54 |
| 3 | | 3 | 1 | 2 | 3 | 3 | 3 | 1.1 | 2.51 | 0.6 | 2.84 |
| 4 | | 1 | 2 | 2 | 1 | 2 | 3 | 2.5 | 2.78 | 0.7 | 3.96 |
| 5 | | 2 | 2 | 3 | 3 | 1 | 1 | 0.9 | 1.20 | 0.6 | 1.70 |
| 6 | | 3 | 2 | 1 | 2 | 3 | 2 | 2.1 | 3.18 | 0.5 | 4.27 |
| 7 | | 1 | 3 | 1 | 3 | 1 | 3 | 5.0 | 2.90 | 2.1 | 4.64 |
| 8 | | 2 | 3 | 2 | 2 | 3 | 1 | 1.0 | 1.51 | 0.5 | 1.90 |
| 9 | | 3 | 3 | 3 | 1 | 2 | 2 | 3.3 | 1.08 | 0.8 | 3.20 |
| 10 | | 1 | 1 | 1 | 1 | 3 | 1 | 3.2 | 3.10 | 1.1 | 4.20 |
| 11 | | 2 | 1 | 2 | 3 | 2 | 2 | 1.1 | 2.73 | 0.3 | 2.80 |
| 12 | | 3 | 1 | 3 | 2 | 1 | 3 | 1.1 | 1.84 | 0.5 | 2.07 |
| 13 | | 1 | 2 | 3 | 3 | 3 | 2 | 1.5 | 2.13 | 0.8 | 2.25 |
| 14 | | 2 | 2 | 1 | 2 | 2 | 3 | 1.1 | 2.35 | 0.6 | 2.21 |
| 15 | | 3 | 2 | 2 | 1 | 1 | 1 | 2.3 | 1.10 | 0.7 | 1.92 |
| 16 | | 1 | 3 | 2 | 2 | 1 | 2 | 2.5 | 2.23 | 0.8 | 4.71 |
| 17 | | 2 | 3 | 3 | 1 | 3 | 3 | 2.6 | 0.60 | 0.6 | 1.44 |
| 18 | | 3 | 3 | 1 | 3 | 2 | 1 | 1.1 | 3.41 | 0.5 | 4.53 |
| I = 6 个 1 水平 结果之和 | a | 22.81 | 16.50 | 21.39 | 16.26 | 16.58 | 17.30 | 注: a 表示 36 小时谷氨酸 b 表示 24 小时残糖 | | | |
| | b | 15.7 | 11.0 | 16.0 | 17.4 | 15.3 | 9.5 | | | | |
| II = 6 个 2 水平 结果之和 | a | 11.59 | 16.31 | 18.13 | 18.28 | 19.75 | 18.77 | | | | |
| | b | 10.2 | 10.4 | 10.5 | 8.8 | 10.1 | 14.0 | | | | |
| III = 6 个 3 水平 结果之和 | a | 18.83 | 20.42 | 13.71 | 18.76 | 16.90 | 17.16 | | | | |
| | b | 11.0 | 15.5 | 10.4 | 10.7 | 11.5 | 13.4 | | | | |
| 大 一 小 | a | 11.22 | 4.11 | 7.68 | 2.50 | 3.17 | 1.61 | | | | |
| | b | 5.5 | 5.1 | 5.6 | 8.6 | 5.2 | 4.5 | | | | |
| 效 应 值 ($\frac{a-b}{6}$) | a | 1.87 | 0.69 | 1.28 | 0.42 | 0.53 | 0.27 | | | | |
| | b | 0.92 | 0.85 | 0.93 | 1.43 | 0.87 | 0.75 | | | | |

* 原表为 L₁₈(2¹ × 3⁷)。去掉第 1 列和第 8 列得。

影响较大。在综合试验中白淀粉水解糖比黑淀粉水解糖谷氨酸产率高,玉米浆含量低的较含量高的产酸率高,黑淀粉水解糖和玉米浆含量较高的耗糖速度较快。磷酸盐用量对耗糖影响较大,在“1”水平(0.05%)残糖最高,但这个数值远低于一般谷氨酸发酵用量(0.15%左右),在磷酸盐较高的情况下(“2”水平和“3”水平),对耗糖的影响不显著。可见几个因素的合适搭配有利于谷氨酸的积累和适当缩短发酵时间。

讨 论

从以上试验结果可以看出,生物素的用量对钝齿棒杆菌 AS1.542 菌株的谷氨酸发酵有明显影响,在生物素用量适宜时,谷氨酸产率高,发酵时间短。

玉米浆中的生物素对谷氨酸发酵影响较大。在几种淀粉原料的谷氨酸发酵中,由于淀粉本身所含的生物素不同(表5),所以,在使用生物素含量高的淀粉时,不加或少加玉米浆即可使培养基中的生物素达到细菌生长和积累谷氨酸的需要量,而生物素含量低的一般

表5 几种淀粉水解糖的生物素含量*

| 编 号 | 糖 源 | 生物素含量(微克/升) |
|-----|---------|-------------|
| 1 | 一般淀粉水解糖 | 8.0 |
| 2 | 白淀粉水解糖 | 9.8 |
| 3 | 黑淀粉水解糖 | 21.6 |

* 各淀粉的水解条件相同。

淀粉,则需要多加入玉米浆才能满足菌生长和积累谷氨酸的需要。不同质淀粉之所以对谷氨酸发酵有影响,其主要原因可能是生物素含量不同。在合成培养基中,使生物素含量在2.5微克/升时,产酸量曾达到4.29%,过高或过低均有明显的不良影响(表4)。因此,在几种淀粉水解糖的培养基中各加入不等量的玉米浆,从而使培养基中生物素含量达到该菌株谷氨酸发酵的适宜水平时,在其它条件正常的前提下,即使发酵周期短,产酸高。几个因素的综合考察表明,糖源、玉米浆是影响发酵产率和时间的主要因素,然而也可以看出,几个因素的合理搭配也是重要的。