

# 利用谷氨酸生产菌转化生产 L-天门冬氨酸

唐任天 郭永复 陈 琦

(中国科学院微生物研究所,北京)

L-天门冬氨酸在生理代谢上具有重要作用,是高血氨症、心肌功能障碍、脑神经机能亢进和肝脏系统疾病的有效治疗药物,又可作为合成高效无毒甜味剂的原料。利用微生物生产 L-天门冬氨酸的方法较多<sup>[1-7]</sup>,近几年来又有关于用  $\alpha$ -溴丁酸发酵生产 L-异亮氨酸时所得废菌体转化反丁烯二酸生产 L-天门冬氨酸的报道<sup>[8]</sup>。

我们发现谷氨酸生产菌北京棒状杆菌 (*Corynebacterium pekinense*) AS 1.299 和钝齿棒状杆菌 (*Corynebacterium crenatum*) AS 1.542 的 L-天门冬氨酸酶活性均很高。为此,初步摸索了该菌在味精生产中的废菌体转化反丁烯二酸生产 L-天门冬氨酸的反应条件,并进行了小型扩大试验。

## 材料和方法

菌体:钝齿棒状杆菌 AS 1.542 或北京棒状杆菌 AS 1.299 培养 60 小时的菌体,离心水

洗,每升湿菌体于 80℃ 烘烤 6 小时后的干物重为 0.15 克。在实验中菌体量以反应液中菌体干物重百分浓度表示。

反丁烯二酸:将反丁烯二酸加到 2 倍重量的浓氨水中,水浴加热 30 分钟,再以氨水调 pH 7.0,配成 10% 水溶液。

表面活性剂:溴代十六烷基三甲胺等。

转化反应条件:将菌体、反丁烯二酸与表面活性剂加到 250 或 500 毫升三角瓶中,在回旋式摇床(偏心距 2.5 厘米,转速 180 次/分)上,28—30℃ 反应 2—4 天。扩大试验采用通用 50 升发酵罐进行转化。

L-天门冬氨酸的测定:反应液离心后,取清液 3 微升点样在滤纸上进行电泳。电泳缓冲液为 0.2M 的醋酸溶液, pH 2.75, 600 伏泳动 1 小时。然后以氰化钾-茚三酮-乙二醇甲醚法比色<sup>[9]</sup>。

反丁烯二酸生成 L-天门冬氨酸的转化率按下式计算:

$$\begin{aligned}\text{反丁烯二酸转化率} &= 100 \times \frac{\text{反丁烯二酸克分子量} \times \text{天门冬氨酸浓度}}{\text{天门冬氨酸克分子量} \times \text{反丁烯二酸浓度}} \\ &= 87.14 \times \frac{\text{天门冬氨酸浓度}}{\text{反丁烯二酸浓度}}\end{aligned}$$

吡啶显色<sup>[9]</sup>：样品经电泳及滤纸层析(正丁醇:冰醋酸:水=4:1:2)后,以吡啶显色液(1克吡啶、100毫升95%乙醇与10毫升冰醋酸混合液)喷布,60℃烘烤30分钟显色。

条件试验

一、表面活性剂的选择

若不加表面活性剂,AS1.542或AS1.299菌体并不能使反丁烯二酸转化为L-天门冬氨酸。试验表明,添加溴代十六烷基季胺及溴代十八烷基季胺会生成大量L-天门冬氨酸。

二、反丁烯二酸与溴代十八烷基季胺(1661)的适宜比例

菌体量与1661相互比例适当,才能得到较高的转化率。为此进行了L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>)正交试验,由表1可见,当反丁烯二酸为5%、1661为0.28%时,AS1.542菌体量多于3.8%为好。表2则说明,当反丁烯二酸为5%,1661为0.1%时,AS1.299菌体量多于2.6%为宜。

三、转化反应的最适pH

试验采用AS1.299菌体量3.5%、反丁烯二酸5%、1661为0.2%,当反应体系在pH7.5—

表 1 AS 1.542 菌体、反丁烯二酸与 1661 的不同配比试验

浓度(%) 成份		组别									L-天门冬氨酸 平均产量(%)			反丁烯二酸平 均转化率(%)		
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	K <sub>1</sub>	K <sub>2</sub>	K <sub>3</sub>	K' <sub>1</sub>	K' <sub>2</sub>	K' <sub>3</sub>
反丁烯二酸 菌体 1661		5	5	5	6.3	6.3	6.3	7.5	7.5	7.5	1.89	2.09	2.19	33.2	29.1	25.4
		1.8	2.8	3.8	1.8	2.8	3.8	1.8	2.8	3.8	1.12	2.20	2.85	16.3	31.3	40.1
		0.23	0.25	0.28	0.25	0.28	0.23	0.28	0.23	0.25	2.16	2.19	1.81	29.4	30.6	27.4
结 果	L-天门冬氨酸产量(%)	1.11	2.07	2.50	1.35	2.03	2.88	0.90	2.50	3.16						
	反丁烯二酸转化率(%)	19.4	36.3	43.8	18.9	28.5	39.9	10.5	29.0	36.7						

注：大试管定容8毫升，pH7.0，28℃摇床反应3天。K值表示在某成份浓度相同的各项试验中所得L-天门冬氨酸平均产量；K'则表示以相应的反丁烯二酸转化率平均值。

表 2 AS 1.299 菌体、1661 不同配比试验

浓度(%) 成份		组别									L-天门冬氨酸 平均产量(%)			反丁烯二酸平 均转化率(%)		
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	K <sub>1</sub>	K <sub>2</sub>	K <sub>3</sub>	K' <sub>1</sub>	K' <sub>2</sub>	K' <sub>3</sub>
1661 菌体		0.1	0.1	0.1	0.2	0.2	0.2	0.3	0.3	0.3	3.06	2.97	1.89	53.4	41.9	33.1
		0.6	1.6	2.6	0.6	1.6	2.6	0.6	1.6	2.6	0.55	3.11	4.26	9.7	54.3	64.4
结 果	L-天门冬氨酸产量(%)	0.81	4.15	4.21	0.45	4.30	4.17	0.40	0.88	4.40						
	反丁烯二酸转化率(%)	14.2	72.5	73.5	7.9	75.0	42.7	7.0	15.4	77.0						

注：500毫升三角瓶定容5毫升，反丁烯二酸5%，pH7.7，30℃摇床反应3天。

8.0范围内时，反丁烯二酸转化率最高，可达85.5%。

扩大试验

参考上述试验结果，在常州味精厂试验车间协助下，进行了试制L-天门冬氨酸的扩大试验。

一、发酵

取1公斤反丁烯二酸加水10升和工业氨水3升，装入50升小罐内，密封加热至90℃，搅拌20分钟，冷却后以氨水调至pH7.7，加入指定量的1661及AS1.299菌体，并定容至20升。罐温维持32℃，搅拌速度173转/分，密闭。转化

反应进行 30 小时,结果如表 3 所示。其中最佳产量 4.25%,反丁烯二酸转化率为 74%,转化反应条件为 5% 反丁烯二酸、3.4% AS 1.299 菌体、0.1% 的 1661, pH 7.8, 32℃ 搅拌 30 小时。

表 3 天门冬氨酸扩大试验

批号	项目	1661 (%)	菌体 (%)	天门冬氨酸产量(%)		
				12小时	24小时	30小时
1		0.09	3.4	2.50	3.00	3.80
2		0.10	3.4	3.40	3.90	4.25

## 二、提取

由于 L-天门冬氨酸在 pH 2.77 时的溶解度极小,故等电点沉淀法是简便有效的提取手段。取 pH 7.5 的反应液 100 毫升, (L-天门冬氨酸 3.0%)离心去不溶物,清液减压浓缩 4 倍后,于搅拌条件下用盐酸逐渐调至 pH 2.8,冷冻过夜,滤取结晶并以少量冷水洗涤。烘干后得 2.8 克粗品,回收率 92%。

粗制品于稀氨水中加热溶解 (pH 5), 用少量活性炭脱色后,经等电点沉淀再结晶,得成品 2.5 克,总回收率为 83%。

## 三、产品鉴定

取 5 微升 1.5% L-天门冬氨酸成品水溶液,经正丁醇、冰醋酸、水(三者比例为 4:1:2)滤纸单向层析,并在垂直方向于 pH 2.75 醋酸缓冲液中进行电泳,仅在 L-天门冬氨酸位置上出现一个斑点,以茚三酮法测定,其纯度为 99.8%。

成品的比旋光度为:

$$[\alpha]_D^{20} + 25.2 (C = 2, 6\text{NHCl}).$$

元素分析结果: N 为 10.52, C 为 36.29, H 为 5.49, 与理论值相近。估计纯度约 98%。

## 反应机理的初步探讨

实验证明,在以  $\alpha$ -溴丁酸为前体发酵生产

异亮氨酸过程中得到的 AS 1.299 菌体,以及直接发酵生产异亮氨酸的  $\alpha$ -氨基- $\beta$ -羟基戊酸抗性株 A60 号菌体,也具有高活性的天门冬氨酸酶,然而,只有加入表面活性剂 1661 时,这些菌体才能转化反丁烯二酸大量生成 L-天门冬氨酸。

为了解 L-天门冬氨酸何以不继续转化为 L-苏氨酸及 L-异亮氨酸,在 250 毫升三角瓶内,加入 7.5% AS 1.542 菌体和 0.2% 1661,再分别加入 6.5% 的 D-苏氨酸或经氨水处理过的反丁烯二酸与  $\alpha$ -溴丁酸,总装液量为 20 毫升。pH 7.0, 28℃ 摇床反应 4 天。反应液进行滤纸层析,然后在垂直方向于 pH 1.85、pH 6.0 或 pH 8.0 醋酸-醋酸钠缓冲液中进行电泳 30 分钟。以茚三酮法及吲哚醌法定性分析反应产物。反应液有 5—7 种氨基酸类物质,其中 4 种产物为中性,三种为酸性。发现 D-苏氨酸和溴丁酸试验组也产生了大量的 L-天门冬氨酸 (5 号产物)。这可能是由于在反应条件下, L-异亮氨酸合成酶系受到抑制, D-苏氨酸等底物倾向于分解代谢所致。这种情况也许与反丁烯二酸形成的 L-天门冬氨酸不再转化为 L-苏氨酸或 L-异亮氨酸有关。

## 参 考 资 料

- [1] Kisumi, K. et al.: *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan*, **24**: 296—305, 1960.
- [2] 渡辺ら: 農化, **38**: 434—440, 1964.
- [3] 北原ら: 農化, **34**: 44—48, 1960.
- [4] 大和谷ら: 武田研究所报, **25**: 32—41, 1966.
- [5] 堀田、高尾: 醸工, **51**: 12—18, 1973.
- [6] Tosa, T. et al.: *Biotechnol. Bioeng.*, **15**: 69—84, 1973.
- [7] Tosa, T. et al.: *Appl. Microbiol.*, **27**: 886—889, 1974.
- [8] 松島ら: 醸工, **52**: 431—437, 1974.
- [9] 潘家秀等: 蛋白质化学研究技术, 18—19, 27—28, 62—64, 79—81 页, 科学出版社, 1973.