

L-异白氨酸发酵的研究

III. 糖质原料直接发酵生产L-异白氨酸

唐任天 陈琦

(中国科学院微生物研究所,北京)

颜云生 邹庆华 童浩 史玉华 臧心曙

袁保和 周素清 白祥媛 邵国勤

(常州味精厂,江苏常州)

前文^[1]报道了 AS 1.998 直接发酵生产 L-异白氨酸的试验。本文总结了利用 AS 1.998 菌以糖质原料发酵生产 L-异白氨酸扩大试验的结果,现报告如下。

材料与amp;方法

一、设备

往复式摇床(30℃),冲程7厘米,频率105次/分。50升、500升及5,000升发酵罐均为通用定型设备,搅拌速度依次为375、300及173转/分。发酵过程中补加甘油聚醚消泡剂、尿素等视情况而定。罐温30—32℃。通气量以每分钟进气体积和与培养液体积之比表示,50升种子罐及500升、5,000升发酵罐通气量为0.25、0.50、0.25(升/分/升)。

H⁺型732强酸性阳离子交换树脂柱,直径38厘米,高85厘米。

二、菌种及培养条件

本试验采用 α -氨基- β -羟基戊酸抗性株 AS 1.998,此菌是由钝齿棒状杆菌(*Corynebacterium crenatum*) AS 1.542 经诱变获得的。

种子培养基(%):葡萄糖2.0,尿素0.3,玉米浆2.5,豆饼水解液0.4(以干豆饼量计),pH6.5。二级种子培养基另加0.4%菜籽油。一级种子装量为1,000毫升三角瓶盛200毫升培养基,接种一环牛肉膏斜面菌种,摇床培养16小

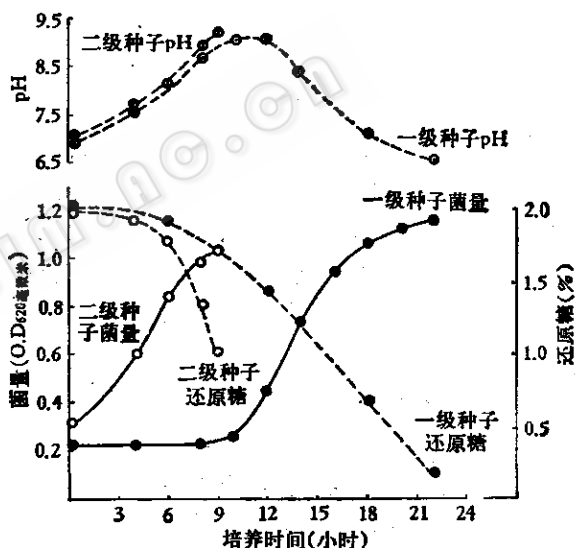


图1 一、二级种子培养情况

时。二级种子罐接种量3.5%,培养8小时。一、二级种子培养情况见图1。

三、分析方法

酸碱度、菌量、L-异白氨酸含量、比旋光度及还原糖含量的测定方法详见前文^[1]。

成品总氨基酸含量采用非水溶液滴定法测定。取8.4毫升72%高氯酸,加入400毫升冰醋酸和20毫升醋酸酐,用冰醋酸定容至1升,用邻苯二甲酸氢钾标定成0.1当量备用。测定时称取200毫克样品,加入20毫升冰醋酸和2滴0.1%甲基紫的冰醋酸溶液,以0.1当量上述

高氯酸混合液滴定到由紫变蓝绿色即为终点。若V为高氯酸混合液滴定消耗毫升数，则样品氨基酸含量C为：

$$C = (6.55 \times V)\%$$

四、工艺流程

L-异白氨酸发酵及提取工艺流程简示于图2。

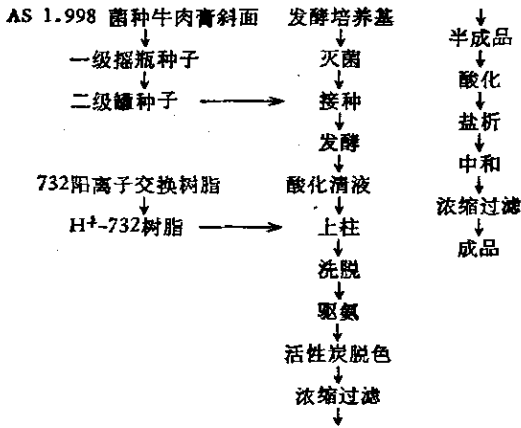


图2 直接发酵生产L-异白氨酸工艺流程

试验结果

一、L-异白氨酸发酵生产条件试验

1. 还原糖浓度试验：由表1可见，培养基的淀粉水解还原糖浓度以13—14%为宜。

2. 通气量对L-异白氨酸产量的影响：为简便起见，在整个发酵期间通气量维持恒定。表2所示结果说明0.5(升/分/升)的通气量较好。

3. 还原糖浓度与通气量组合试验：表3结果说明，还原糖13%，通气量0.5(升/分/升)较好，但方差分析表明各组间差别不大。

表1 还原糖浓度对L-异白氨酸产量的影响

还原糖浓度(%)	10	11	13	14
L-异白氨酸产量(%)	0.90	1.00	1.25	1.30
还原糖转化率(%)	9.0	9.1	9.6	9.3

注：培养基其他成份(%)：硫酸铵4.0，磷酸氢二钾0.1，玉米浆1.8，豆饼水解液0.7，碳酸钙4.0，pH7.2。500升发酵罐定容350升，接种量10%，通气量0.2(升/分/升)，30℃，培养48小时。

表2 通气量对L-异白氨酸产量的影响

通气量(升/分/升)	0.3	0.4	0.5
L-异白氨酸产量(%)	0.80	0.80	1.00

注：培养基中还原糖浓度为10%，其他条件同表1。

表3 还原糖浓度与通气量对L-异白氨酸产量的影响

试验批号	1	2	3	4
还原糖(%)	10	13	10	13
通气量(升/分/升)	0.3	0.3	0.5	0.5
L-异白氨酸产量(%)	0.80	0.86	0.90	1.25

注：除还原糖浓度及通气量如表所示外，其他条件同表1。

4. 500升发酵罐稳定性试验：以500升发酵罐连续进行4批试验的结果如表4所示，L-异白氨酸产量均稳定在1.20%以上。

表4 500升发酵罐稳定性试验

试验批号	1	2	3	4
菌量(O.D. ₆₂₀ 吸光率)	1.50	1.60	1.60	1.60
L-异白氨酸产量(%)	1.25	1.30	1.36	1.20

注：培养基还原糖浓度为13%，通气量为0.5(升/分/升)，30℃培养50小时，其余条件同表1。

5. 5,000升发酵罐扩大生产试验：表5归纳了连续3批5,000升发酵罐扩大试验的结果，其中第3批试验发酵过程的生化变化由图

表5 5,000升发酵罐扩大生产试验结果

批号	项目	发酵时间(小时)	初糖(%)	发酵pH范围	追加总尿素(%)	追加氨水(NH ₃ , %)	菌量 O.D. ₆₂₀ 吸光率	L-异白氨酸产量(%)
1		61	11.6	6.0—6.7	0.6	0.13	1.72	1.31
2		46	10.3	6.0—6.5	0.4	0.11	1.80	1.20
3		60	11.4	6.0—6.5	0.6	0.27	1.60	1.50

注：培养基成份(%)：硫酸铵4.5，磷酸氢二钾0.1，豆饼水解液0.4，玉米浆2.0，碳酸钙4.5，pH7.2。淀粉水解还原糖初始浓度见表所示。接种量1.0%，30—31℃，培养24、34、40、45及50小时左右追加尿素和氨水。通气量0.25(升/分/升)。

3所示。试验结果说明,在5,000升发酵罐规模生产L-异白氨酸,产量稳定在1.20%以上,最高达1.50%。

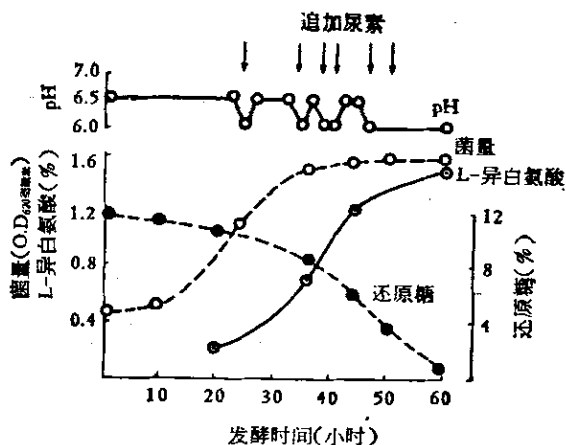


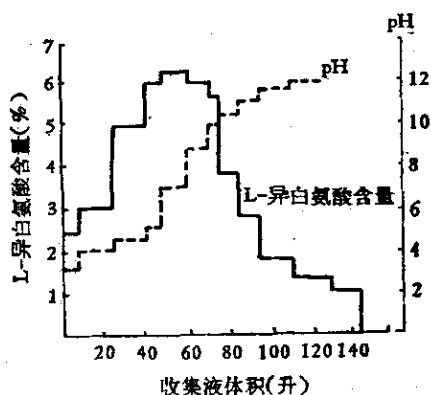
图3 5,000升发酵罐生产L-异白氨酸情况

二、L-异白氨酸的提取、制备

1. 半成品的提取:

发酵完毕后,将发酵液加热、过滤,用硫酸、草酸调至pH3.5。离心清液注入H⁺型732强酸性阳离子交换树脂柱。洗脱剂为0.5N NaOH,预热至60℃,流速3升/分,洗脱曲线见图4。收集pH3—12段,L-异白氨酸回收率约80%。

洗脱流出液真空加热驱氨,用盐酸酸化,活性炭加热脱色。脱色液真空浓缩,并用氨水中性至pH6.0,收集沉淀并烘干,即为半成品,回收率约70%。



上柱液490升,含L-异白氨酸1.3%,洗脱液0.5N NaOH(60℃),流速3升/分。

图4 L-异白氨酸含量及pH在洗脱过程中的变化

2. 成品的制备:

将含量为70%的半成品10公斤用盐析法精制,可得成品4.5公斤,对半成品中所含L-异白氨酸的回收率为60%。盐析精制流程见图5。

成品用高氯酸非水溶液滴定法测定,氨基酸含量为94.1%。取50微克在滤纸上层析仅见一个斑点。比旋光度 $[\alpha]_D^{20} = 37.8^\circ$ 。故成品质量已达现行合格标准。

综合上述各项试验结果,可以认为现行工艺较简便,无须添加 α -溴丁酸作前体^[2],成本远较蛋白质原料提取法低廉,说明用AS 1.998菌工业规模发酵生产L-异白氨酸是可行的。

讨 论

在培养基内加入碳酸钙,主要是为了稳定发酵过程的酸碱变化,但大量钙盐给提取工作增加不少困难,而且培养基含高浓度的硫酸铵会使发酵周期延长。为克服这些不利之处,我们进行了不加碳酸钙并降低硫酸铵用量的试验,在发酵期间补充尿素,以供给氮源并维持酸

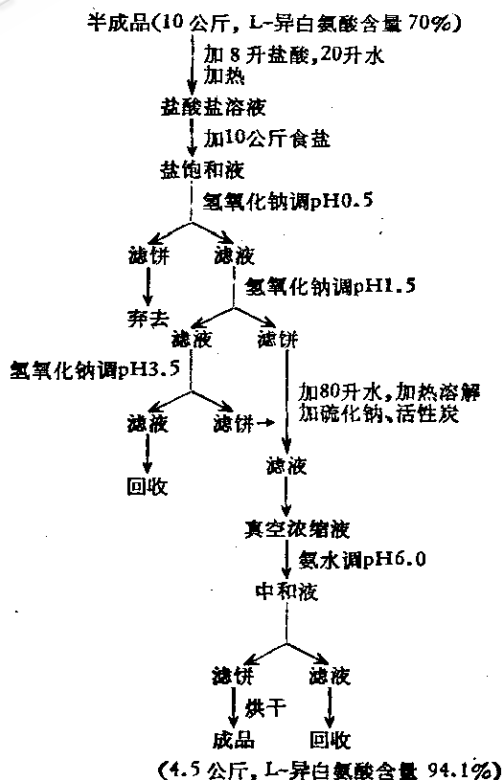


图5 盐析精制法工艺流程

碱度在 pH6.0—8.0 之间。初步试验结果表明,培养基中含硫酸铵 1.5%、尿素 0.3% 并在发酵过程中补加尿素总量约 0.54%, 发酵 32 小时, L-异白氨酸产量可达 1.39%。

同时,我们也用全糖蜜为原料进行了无钙培养基发酵试验, L-异白氨酸产量亦达 1.22%。以上结果表明,培养基中不加碳酸钙并降低氨离子浓度, L-异白氨酸仍能得到较高产量,而且发酵周期大为缩短。为了适应工业生产的需要,适宜的培养条件仍有待进一步试验。

发酵液中存在少量缬氨酸、丙氨酸及微量的白氨酸,但由于所用的离子交换树脂对中性氨基酸的分离能力低,大大降低了 L-异白氨酸的回收率。因此,选择合适的离子交换树脂,是提高回收率的关键。

参 考 文 献

- [1] 唐任天、郭永复、陈琦: 微生物学报, 18 (1): 45—51, 1978。
- [2] 唐任天等: 微生物学报, 15 (3): 205—211, 1975。