

北京棒状杆菌 AS 1.563 发酵生产 L-赖氨酸研究的扩大试验

常州味精厂试验组 中国科学院微生物研究所氨基酸组

(江 苏 常 州)

(北 京)

L-赖氨酸是一种人体必需的氨基酸,国外已应用于食品、饲料、医药等方面。本文主要介绍 AS 1.563 菌发酵生产 L-赖氨酸研究的扩大试验结果。

材料与 方法

一、菌种

本试验采用的产 L-赖氨酸菌株为北京棒状杆菌 (*Corynebacterium pekinense*) AS 1.563。

二、主要设备

往复式摇床: 108 次/分, 振幅 76 毫米。

通用式发酵罐: 50 升、500 升及 5000 升。其搅拌速度分别为 370、320 及 180 转/分。

离子交换柱: 三个, 其中两个高 2 米, 直径 0.604 米, 每个柱装树脂体积为 0.418 米³, 重量

为 330 公斤。另一个为不锈钢离子交换柱, 柱高 1.85 米, 直径 0.38 米, 装树脂 110 公斤。树脂型号为 732 强酸性阳离子交换树脂。

三、基础培养基*

(一) 斜面培养基(%)

牛肉膏 1.0, 蛋白胨 1.0, 氯化钠 0.5, 葡萄糖 0.5, 琼脂 2.0, pH 7.0。

(二) 种子培养基(%)

葡萄糖 2.0, 磷酸氢二钾 0.1, 硫酸镁 0.05, 硫酸铵 0.4, 玉米浆 2.0, 毛发水解废液 1.0, pH 6.8—7.0, CaCO₃ 0.5。

(三) 第一种发酵培养基(%)

葡萄糖 10, 磷酸氢二钾 0.1, 硫酸镁 0.05, 硫酸铵 3.0, 玉米浆 2.0—3.0, 豆饼水解液 0.5, CaCO₃ 2.0。

* 培养基均用自来水配制, 并在将 pH 调整好后再加入 CaCO₃, 发酵碳源采用淀粉水解糖液。

(四) 第二种发酵培养基(%)

葡萄糖 10—12, 磷酸氢二钾 0.1, 硫酸镁 0.05, 硫酸铵 1.0—1.2, 尿素 0.4—0.8, 玉米浆 1.0, 甘蔗糖蜜 2.0, 毛发水解废液 1.0, pH 7.0。

四、分析方法

还原糖测定: 采用改良的斐林氏法。

生长的测定: 取发酵液 1 毫升, 加蒸馏水 5 毫升, 用 72 型分光光度计, 620 毫微米波长, 测定光密度。如果发酵液中含碳酸钙时, 测取发酵液 1 毫升, 加 1 NHCl 1 毫升和蒸馏水 4 毫升进行测定。

L-赖氨酸含量测定: 发酵液中 L-赖氨酸的含量采用纸上电泳法进行比色定量测定^[1]。

试验结果

一、发酵试验

(一) 毛发水解废液对 AS1.563 菌产 L-赖氨酸的影响

为了广开原料来源, 试验了以毛发水解废液代替豆饼水解液发酵制备 L-赖氨酸。结果见表 1。

表 1 豆饼水解液、玉米浆及毛发水解废液对产 L-赖氨酸的影响*

组别	玉米浆 (体积/重量) %	豆饼水解液 (%)	毛发水解废液 (体积/体积) %	发 酵 结 果			
				pH	生长 (光密度)	残糖 (%)	L-赖氨酸·HCl (%)
1	1	0.3		6.0	1.70	2.35	1.92
2	1	0.3		6.3	1.70	1.85	2.40
3	1	1.0		7.2	1.30	1.35	2.22
4	1	1.0		7.2	1.30	0.85	2.42
5	1		1.0	6.5	1.30	1.00	1.73
6	1		1.0	6.5	1.80	0.85	1.92
7	1		2.0	7.5	1.50	1.10	2.00
8	1		2.0	7.7	1.55	0.85	1.64
9	2		1.0	6.0	1.50	0.94	2.24
10	2		1.0	5.8	1.55	1.10	3.30
11	2		2.0	7.5	1.55	0.54	1.92
12	2		2.0	7.7	1.57	1.05	1.97

* 基础培养基组成(%): 淀粉水解糖 10; 硫酸铵 2; 磷酸氢二钾 0.1; 硫酸镁 0.05; 碳酸钙 2; pH 7.0—7.2。接种量 5% (体积/体积)。

从表 1 可以看出, 当培养基中玉米浆 2%, 毛发水解废液 1.0% 时, L-赖氨酸·HCl 产量可达 3.3%。证明毛发水解废液可代替豆饼水解液, 作为 AS 1.563 菌发酵的有机氮源。

(二) 以甘蔗糖蜜与淀粉水解糖为原料的对比发酵试验

以甘蔗糖蜜与淀粉水解糖为原料进行了 500 升罐的 L-赖氨酸发酵扩大试验, 结果见表 2。

表 2 以甘蔗糖蜜与淀粉水解糖为原料对比发酵试验结果*

原 料	初糖浓度 (%)	L-赖氨酸·HCl (%)	糖转化率 (%)	发酵周期 (小时)
淀粉水解糖	11.3	2.59	22.9	52
	9.0	2.27	25.2	28
甘蔗糖蜜	13.0	3.19	24.5	58
	10.6	2.54	23.9	48
	10.6	2.71	25.6	34

* 基础培养基(%): 硫酸铵 3.0; 磷酸氢二钾 0.1; 硫酸镁 0.05; 豆饼水解液 0.5 (以干物计), pH 7.0; 碳酸钙 2.0 (淀粉水解糖培养基中加玉米浆 2%)。发酵罐通气量: 1:0.6 (体积/体积), 接种量: 10% (体积/体积)。

从表 2 可以看出甘蔗糖蜜作为发酵原料较淀粉水解糖产 L-赖氨酸略高。

(三) 革除碳酸钙试验

由于在发酵培养基中含有较高量的硫酸铵, 在发酵过程中铵离子被利用而形成生理酸性, 这样便有碍菌体的生长和发酵, 故在培养基中加入适量的碳酸钙用以中和其酸度, 形成不溶性硫酸钙。但这就给 L-赖氨酸的提取带来了不便。为解决这个问题, 我们采用了在培养基中加入适量尿素并减少硫酸铵用量, 以革除碳酸钙。由菌体的尿酶水解尿素后生成的氨, 除供给菌体做氮源外, 还用来中和发酵过程中生成的酸。同时在发酵过程中视 pH 变化情况流加适量尿素, 以维持适宜的发酵 pH。结果见表 3。

(四) 不同接种量试验

在 500 升罐上进行的不同接种量的发酵试验结果见表 4。结果表明, 接种量大, 发酵周期

表3 革除碳酸钙的发酵试验结果*

罐容(升)	初糖浓度(%)	L-赖氨酸·HCl(%)	糖转化率(%)	发酵周期(小时)
500	10.9	3.28	30.1	34
500	9.7	2.58	25.6	32
500	12.9	2.90	22.7	46
500	10.1	2.53	24.1	45
5000	12.8	2.94	22.2	60
5000	9.9	2.15	21.7	70

* 培养基(%): 淀粉水解糖(用量见表3); 磷酸氢二钾 0.1; 硫酸镁 0.05; 玉米浆 2.0; 毛发水解液 1.0; 硫酸铵 1.2; 尿素 0.4; pH 6.7。

短。

表4 500升罐上不同接种量的试验

初糖浓度(%)	接种量(%)	L-赖氨酸·HCl(%)	糖转化率(%)	发酵周期(小时)
10.1	1	2.53	25.0	45
12.3	10	3.66	29.8	34

(五) 5000升罐上的L-赖氨酸发酵过程及稳定试验

综合上述试验条件,在5000升罐上连续进行四批发酵试验(见表5、图1)。

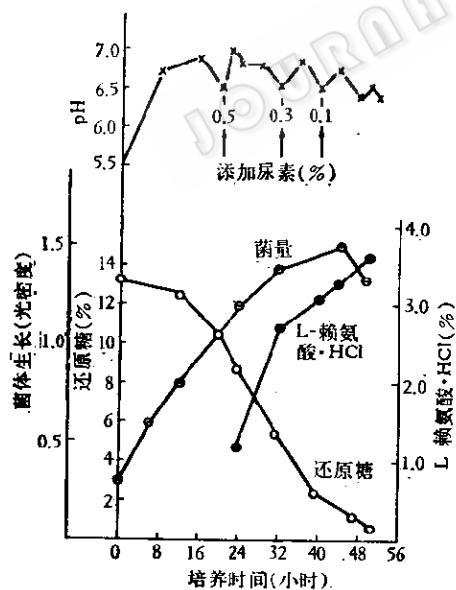


图1 5000升罐上的L-赖氨酸发酵过程

结果表明: 发酵平均产生L-赖氨酸·HCl为3.18%,最高达3.66%。

表5 5000升罐上的稳定试验*

初糖浓度(%)	总尿素量(%)	发酵终pH	发酵终生长光密度	L-赖氨酸·HCl(%)	残糖(%)	糖转化率(%)	发酵周期(小时)
13.75	1.9	7.2	1.10	3.36	0.85	24.4	51
13.35	1.6	6.3	1.32	3.66	1.10	27.4	51
13.50	1.4	7.5	1.30	2.57	1.35	19.3	65
11.00	1.3	7.0	1.30	3.12	0.70	28.3	42

* 培养基(%): 淀粉水解糖(见表5); 磷酸氢二钾 0.1; 硫酸镁 0.05; 硫酸铵 1.2; 尿素 0.4; 玉米浆 1.0; 毛发水解液 1.0; 甘蔗糖蜜 2.0; pH 6.7。灭菌前加甘油聚醚一升。

二、L-赖氨酸·HCl的制备

发酵结束后,将发酵液加热至80℃,冷却后加浓盐酸调pH 4.0—5.0,清液注入铵型732强酸性阳离子交换树脂柱吸附,流出速度为10升/分,流出液至pH 5.0即L-赖氨酸的吸附达饱和点,用茚三酮检验只有极微显色。

吸附饱和的树脂柱,用水按正、反二个方向冲洗至流出液澄清为止。然后进行洗脱,洗脱液为2N氢氧化铵,流出速度为6升/分,洗脱结果见图2。

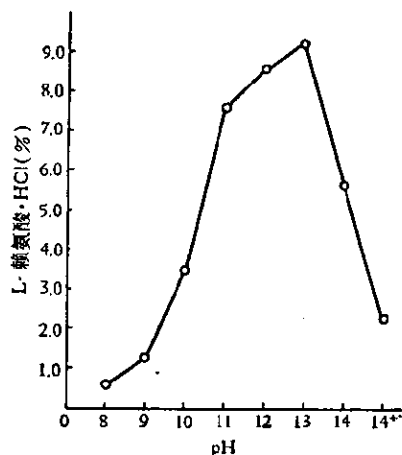


图2 L-赖氨酸洗脱液中pH及含量的变化

结果表明,分段收集pH 8.0—14.0的洗脱液,离子交换吸附的回收率约78—83%。将洗脱液减压浓缩至波美度12—14度时,用盐酸调pH 4.9后,再浓缩至波美度22—23度,低温放置过夜,即析出结晶。除去母液,即得到L-

赖氨酸·HCl 结晶。其L-赖氨酸·HCl 含量为98%以上。

取上述 L-赖氨酸·HCl, 加等量的蒸馏水溶解后, 加入适量药用活性炭脱色, 热过滤后, 冷却结晶, 结晶于 80℃ 烘干, 其 L-赖氨酸·HCl 含量为98.5%以上。比旋光度 $[\alpha]_D^{20} = +19.0 - 21.5$ ($C = 8\%$, $6NHCl$) 及其它分析指标均已达到医用 L-赖氨酸·HCl 质量标准。总回收率为 59.6%。

讨 论

从以上扩大试验结果看, AS 1.563 菌产 L-赖氨酸·HCl 的水平最高可达 3.66%, 对糖的

转化率为 30% 左右。而用甘蔗糖蜜为原料时产酸率较用淀粉水解糖略高。摇瓶试验说明, 采用甘蔗糖蜜做原料发酵时, 糖转化率最高曾达 42%。此外, 加大接种量可缩短发酵周期和提高产酸率。因此进一步提高产酸率和转化率是有希望的。

扩大试验表明, 发酵法制备 L-赖氨酸的技术路线较简便, 发酵稳定, 产酸率也较高, 提取收率达到了一定水平。所得 L-赖氨酸·HCl 符合医用标准。说明采用 AS 1.563 菌株在工业规模生产 L-赖氨酸在工艺上是可行的。

参 考 文 献

- [1] 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年。