

# L-赖氨酸产生菌 A-111 的研究

徐所维 富英华 王杏珍 唐上华 张春萍 苏令鸣

黄文涛 余志良 陆文仪 沈国良 余允龙

(上海市工业微生物研究所, 上海)

以产生谷氨酸的菌株 2305 作为出发菌株, 经 N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍 (简称为 MNNG) 和赖氨酸类似物 S-(2-氨基乙基)-L-半胱氨酸 (AEC) 诱变处理, 获得高丝氨酸缺陷型和抗 AEC 的产 L-赖氨酸菌株 A-111。本文报道该菌株的筛选方法、发酵条件试验、扩大试验结果。

## 材料与方 法

1. 菌株: 突变株 A-111。

2. 培养基组成: ①完全培养基(%): 牛肉膏 1, 蛋白胨 1, NaCl 0.5, 洋菜 2, pH 7.0。

②基础培养基(%): 葡萄糖 0.5,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1,  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  0.3,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.15,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.01, 琼脂 1.6g,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.1mg, 生物素 30 $\mu\text{g}/\text{L}$ , 硫胺素 100 $\mu\text{g}/\text{L}$ ,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.9mg,  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  0.7mg,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  9mg,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0.4mg, pH 7.2。

③补充基础培养基: 在基础培养基中加入 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  高丝氨酸 (或蛋氨酸和苏氨酸各 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )。④种子培养基(%): 葡萄糖 3,  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  0.1,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1, 玉米浆 1, 豆饼水解液 (按体积计) 5, pH 7.2。

⑤发酵基础培养基(%): 葡萄糖 12,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.1,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.05,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  4.5, 甘蔗糖蜜 2, 毛发水解废液 (按体积计) 1.5, 玉米浆 0.5,  $\text{CaCO}_3$  4.5, pH 7.2。

3. 培养条件: 将初筛产 L-赖氨酸的菌株, 转至斜面在 30 $^{\circ}\text{C}$  培养 18—20h, 取一环接入装有 20ml 种子培养基的 250ml 三角瓶中, 置于

往复式摇床 (振幅 7.6cm, 频率 120 次/分), 30 $^{\circ}\text{C}$  培养 15h, 以 4% 接种量加入装有 25ml 发酵培养基的 500ml 三角瓶中, 培养 3 天, 测定 L-赖氨酸的产量。

4. 分析方法: ①菌体生长量测定: 取 1ml 发酵液, 加水至 5ml, 搅匀后用 581 型光电比色计测定波长为 650nm 处之光密度, 表示菌体生长量。如果发酵液中含有  $\text{CaCO}_3$ , 取 1ml 发酵液加 1N 盐酸至 5ml, 搅匀后测定。②L-赖氨酸测定: 以尸胺杆菌脱羧酶的检压法测定。残糖和 pH 等测定按谷氨酸发酵的常规方法。

5. 诱变方法: 营养缺陷型突变株的选育<sup>[1,2]</sup>, 是以产谷氨酸菌 2305 对数生长期的菌体, 悬浮于含有 350 mg/ml MNNG, pH 6.0 的 Tris 缓冲液中, 制成  $2 \times 10^8/\text{ml}$  菌液, 30 $^{\circ}\text{C}$  振荡处理 60 分钟。离心、洗涤后涂布于完全培养基, 30 $^{\circ}\text{C}$  培养 2 天。然后挑取小菌落于完全培养基和基础培养基平板上, 所得的营养缺陷型菌株用生长谱法确定其营养要求。以指示菌  $L_3$  (赖氨酸缺陷型株) 测定是否产生 L-赖氨酸。

6. 抗 AEC 突变株的选育<sup>[3,4]</sup>: 从选育得到的 H-2 菌株, 按上述 MNNG 诱变方法处理, 将处理后菌液, 洗涤、稀释后涂布于补充基础培养基平板上, 每只培养皿中放置牛津小杯 4 只, 然后加入 AEC 和苏氨酸各 50mg/ml 混合液, 30 $^{\circ}\text{C}$  培养 3—4 天, 挑取抑菌圈内的菌落。所得抗 AEC 株移植到混有指示菌  $L_3$  的基本培养基平板上, 30 $^{\circ}\text{C}$  培养 2 天, 观察生长圈形成大小, 初步确定产赖氨酸的能力, 供复筛用。

# 结果与讨论

## 一、L-赖氨酸产生菌 A-111 的选育

1. 营养缺陷型菌株与产赖氨酸量的关系：不同类型的营养缺陷型菌株，产赖氨酸量不同，其中以高丝氨酸缺陷型脲酶缺损株 H-2 产量最高，见表 1。

2. 抗赖氨酸类似物突变株的选育：将 H-2 菌和抗 AEC 菌 A-111 放在含有不同浓度的 AEC 培养液中，30℃ 振荡培养 24h，结果

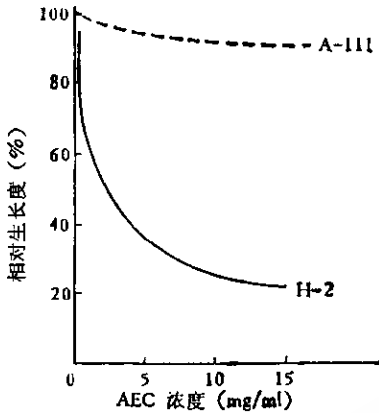


图 1 H-2 和 A-111 抗 AEC 浓度的比较

表明 A-111 菌的生长几乎不受影响。H-2 菌的生长，随 AEC 浓度的增加受到明显抑制。见图 1。

3. L-赖氨酸产量的比较：原菌 H-2 和抗 AEC 突变菌株在相同条件下进行发酵试验，结果表明突变菌株产 L-赖氨酸量比原菌株高 30%，其中以 A-111 产量最高。见表 2。

4. 稳定性试验：将斜面上的菌转接五次和保藏在安瓶瓶中半年的菌种，进行发酵试验，结果说明 A-111 菌，产酸能力稳定，见表 3。

## 二、L-赖氨酸产生菌 A-111 发酵条件试验

1. 硫酸铵浓度与产赖氨酸关系：试验说明，在无其他铵离子存在情况下，硫酸铵浓度 4.0—4.5% 时产 L-赖氨酸量较高，见表 4。

2. 通气量试验：我们在 500ml 三角瓶中进行不同装液量的试验，结果见表 5。

表 5 说明，装液量越少，产酸越高。该菌发酵需要较大的通风量。

3. pH 对赖氨酸产量的影响：在本所制造的 16L 半自动玻璃发酵罐中，用工业氨水自动流加控制培养液 pH，发酵试验结果见表 6。

表 1 不同营养缺陷型菌株号产生赖氨酸情况

结果 项目	菌号	H-2	H-22	H-30	H-34	H-211	H-248
		营养要求 L-赖氨酸产量(%)	高丝氨酸 3.0	高丝氨酸 2.55	苏氨酸 0.49	苏氨酸蛋氨酸 0.96	苏氨酸 1.33

表 2 H-2 和抗 AEC 突变株 L-赖氨酸产量的比较

结果 项目	菌号	H-2	A-8	A-21	A-38	A-73	A-93	A-109	A-111
		L-赖氨酸(%) 增长率(%)	2.96	4.13 28.3	4.31 31.3	4.06 27.1	4.23 30.0	4.20 29.5	4.23 30.0

表 3 菌种的稳定性试验

结果 项目	转接次数 和对照	1	2	3	4	5	安水瓶
		斜面保藏时间(天) 光密度 L-赖氨酸(%)	187 0.69 4.23	156 0.68 4.14	126 0.70 4.17	73 0.69 4.37	5 0.69 4.19

表 4 硫酸铵浓度对产 L-赖氨酸的影响

项目	结果	硫酸铵浓度 (%)						
		1.0	2.0	3.0	4.0	4.5	5.0	6.0
最终 pH		6.4	6.4	6.6	6.7	6.7	6.7	6.5
光密度		0.34	0.48	0.56	0.65	0.67	0.67	0.66
赖氨酸产量 (%)		0.95	2.25	3.54	4.13	4.26	4.20	3.99

表 5 通气量试验结果

项目	结果	装液量 (ml)						
		15	20	25	30	40	50	70
光密度		0.85	0.85	0.85	0.78	0.78	0.66	0.67
L-赖氨酸 (%)		5.93	5.50	5.05	4.66	4.37	4.08	3.34

表 6 pH 对赖氨酸产量的影响\*

初糖浓度 (%)	控制 pH	周期 (h)	发 酵 终				转化率 (%)
			pH	光密度	残糖 (%)	赖氨酸 (%)	
16.1	7.0±0.1	64	6.9	0.70	0.44	4.55	28.3
16.3	6.5±0.1	70	6.5	0.71	0.74	5.00	30.7
16.8	6.2±0.1	72	6.2	0.70	0.92	4.22	25.1

\*罐温 31℃, 罐压 0.6 Kg/cm<sup>2</sup>, 通气量 1:1 (V/V), 搅拌速度 600 转/分, 泡敌 2ml。

表 6 说明, 在发酵过程中, 控制 pH6.5 左右有利于 A-111 菌产生赖氨酸。

4. 生物素和有机氮源对 A-111 菌产生赖氨酸的影响: 生物素对于突变株 A-111 的生长和赖氨酸的积累都是必需的, 见图 2。

用几种有机氮源, 代替突变株 A-111 菌生长和发酵需要的生物素和高丝氨酸进行试验。结果说明使用玉米浆和毛发水解废液或豆饼水解液均可产生大量赖氨酸。以淀粉水解液代替葡萄糖的试验说明, 可以从发酵培养基中省去糖蜜, 见表 7。

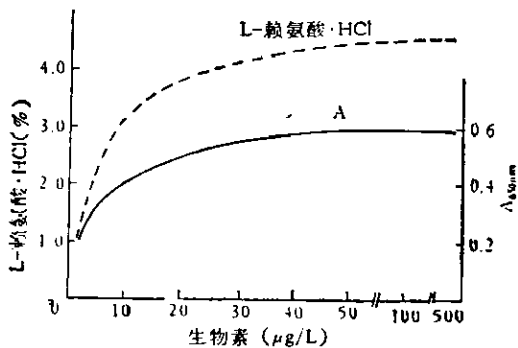


图 2 生物素对 A-111 菌生长和产酸的影响

### 三、突变株 A-111 菌 L-赖氨酸发酵中型试验

我们在 500L 发酵罐, 连续进行 11 批次试验主要培养条件如下: ①种子培养基组成 (%): 淀粉水解糖 3.0, 玉米浆 2.0, 毛发水解废液 4.0, 硫酸铵 1.0, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 3H<sub>2</sub>O 0.1, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.05, CaCO<sub>3</sub> 0.5, 泡敌 6 ml, pH7.2。②种龄: 一级种子, 30℃ 摇瓶培养 16h, 二级种子 30℃ 50L 罐培养 11—12h。③发酵培养基组成 (%): 淀粉水解糖 15.0。(上海味精厂提供), 玉米浆 1.0, 毛发水解废液 2.0, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.05, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 3H<sub>2</sub>O 0.1, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2.0, 泡敌 70 毫升, pH7.2。④发酵条件: 500L 发酵罐装培养液 400L, 罐温 30—36℃, 罐压 1Kg/cm<sup>2</sup>, 搅拌速度 320rpm/min。通气量 1:0.5 (V/V), 用工业氨水自动控制 pH6.5。结果表明, 可在 48 小时内赖氨酸产量达 4.75%, 转化率达 29.3%, 平均产酸 4.58%, 转化率 28.2%。另外用淀粉水解糖为原料发酵制造赖氨酸, 残糖较高, 我们进行纸上色层分析, 表明残留物主要是该菌不能利用的高碳架还原物,

表 7 不同氮源的发酵试验

结果 不同生物素量(%)	不同糖类及浓度(%)	葡 萄 糖					淀 粉 水 解 液				
		12	12	12	12	12	12	15	15	15	17
玉米浆	0.5	1.0	0.5	0.5	0.5	0.5	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
豆饼水解液	3.0	4.0									
毛发水解废液			1.0	1.5	2.0	1.5	1.5	1.0	1.5	2.0	1.5
甘蔗糖蜜	4.0		2.0	2.0	2.0						
甜菜糖蜜						4.0					
赖氨酸	4.02	4.18	4.20	4.38	4.28	4.32	4.17	4.83	5.10	5.18	5.57

所以淀粉的水解条件有待改进。

### 参 考 文 献

[1] 中国科学院微生物研究所等: 微生物学通报, 1: 5—

9, 1974。

[2] 佐野孝之輔等: 発酵と代謝, 17: 27—32, 1968。

[3] 戸坂修等: 公開特許公報, 61.691, 1976。

[4] Tosaka, O. et al.: Agr. Biol. Chem., 42(4): 745—752, 1978。