

L-赖氨酸发酵的研究

钝齿棒状杆菌 PI-3-2 的 L-赖氨酸发酵中间生产试验

陈琦 莫凌 尹明

(中国科学院微生物研究所,北京)

华祖尧 史玉华 刘敏 孙慧珍 周国良

(常州味精厂,江苏常州)

1978年我们完成了北京棒状杆菌 AS 1.563 发酵生产 L-赖氨酸研究的扩大试验^[1]。为进一步提高 L-赖氨酸产率和糖原料的转化率,采用钝齿棒状杆菌 (*Corynebacterium crenatum*) PI-3-2 进行了 L-赖氨酸发酵中间生产的研究,现报道如下。

材料与方 法

一、菌种

采用产 L-赖氨酸菌株钝齿棒状杆菌 PI-3-2。该菌株是以 L-谷氨酸生产菌钝齿棒状杆菌 AS 1.542 为出发菌株,经 N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍 (NTG) 诱变处理,选育出的要求高丝氨酸和抗 S-(2-氨基乙基)-L-半胱氨酸 (AEC) 的双重突变株。

二、主要设备

1. 往复式摇床: 振次 96 次/分,振幅 76 毫米。
2. 通用式发酵罐(升): 50, 500, 5000。其搅拌速度分别为 370, 320 及 180 转/分。
3. 离子交换柱: 柱高 2 米直径 0.64 米的 2 个,每个柱装树脂 330 公斤。柱高 2 米,直径 0.25 米的 2 个,每个柱装树脂 55 公斤。树脂为 732 强酸型阳离子交换树脂。

三、基础培养基和培养条件

1. 斜面培养基组成(%): 牛肉膏 1.0, 蛋白胨 1.0, 氯化钠 0.5, 葡萄糖 0.5, 琼脂 2.0。pH7.0。120°C 灭菌 20 分钟。接种后置于

31℃ 温箱培养 24 小时。

2. 一级摇瓶种子培养基组成(%)及培养条件: 葡萄糖 2.0, 磷酸氢二钾 0.1, 硫酸镁 0.05, 硫酸铵 0.35, 玉米浆 2.0, 毛发水解废液 1.0, 碳酸钙 0.5, pH7.2。培养基装量为 50 毫升/500 毫升三角瓶或 200 毫升/1000 毫升三角瓶。120℃ 灭菌 20 分钟, 每瓶接入培养 24 小时的斜面种子一环, 置于往复式摇床上, 31℃ 培养 16—24h。

3. 二级 (50L) 种子罐培养基组成(%)及培养条件: 培养基组成除将葡萄糖改用 2.0% 淀粉水解糖外, 其他成分与一级种子培养基相同。50L 罐的培养基定容 35L。120℃ 灭菌 5 分钟, 接种量 2.0%, 31—32℃, 培养 8 小时, 通气量 1:0.5 (V/V)。

4. 发酵基础培养基组成(%)及培养条件: 淀粉水解糖 12, 磷酸氢二钾 0.1, 硫酸镁 0.05, 硫酸铵 4.0, 生物素 300 微克/升, 硫胺素 200 微克/升, 毛发水解废液 2.0, Fe^{++} 及 Mn^{++} 各 2ppm, 碳酸钙 4.0, pH7.0。105℃ 灭菌 5 分钟, 培养温度 31—32℃。

四、分析方法

1. 还原糖测定: 采用改良的斐林氏法。

2. 生长的测定: 发酵液以 1:6—10 稀释在 72 型分光光度计上测定菌体生长光密度, 波长

620 nm, 光程 1cm。

3. L-赖氨酸含量测定: 采用尸胺杆菌 L-赖氨酸脱羧酶以检压法测定 L-赖氨酸的含量。

4. pH 测定: 采用 pH6.4—8.0 国产精密 pH 试纸。

试验结果

1. 用天然有机物代替纯生物素和氨基酸的试验: PI-3-2 菌株, 要求在培养基中含有生物素和高丝氨酸。为选择适宜的工业生产用培养基, 采用含有生物素和氨基酸的天然有机物质玉米浆、废糖蜜和毛发水解废液代替纯生物素, 高丝氨酸和硫胺素进行摇瓶试验, 结果见表 1。

表 1 说明, 在含 2.0% 玉米浆、4.0% 废糖蜜及 2.0% 毛发水解废液的一组产 L-赖氨酸培养基, 产量达 5.29%, 糖转化率为 44%。

2. 硫酸铵的用量对产 L-赖氨酸的影响: 在 500L 罐上, 试验培养基中不同硫酸铵量对产 L-赖氨酸的影响。发酵过程中, 采用流加尿素代替碳酸钙控制发酵过程中的 pH。结果说明培养基中含 2.5—3.0% 硫酸铵可得到较高的 L-赖氨酸产率。见表 2。

3. 磷酸二氢钾对生长和产酸的影响: 磷酸二氢钾来源方便, 价格便宜。在 500L 罐的试验中, 将二级种子及发酵培养基中的磷酸氢二

表 1 天然有机物对产 L-赖氨酸的影响*

瓶号	生物素 (微克/升)	硫胺素 (微克/升)	玉米浆 (%)	废糖蜜 (%)	毛发水解 废液(%)	产 L-赖氨酸 (%)	糖转化率 (%)
1	300	200	—	—	2.0	4.01	33.4
2	—	—	0.5	2.0	1.7	3.04	25.3
3	—	—	0.5	3.0	1.7	3.74	31.2
4	—	—	0.5	4.0	1.7	4.00	33.3
5	—	—	0.5	4.0	1.7	4.02	33.5
6	—	—	1.0	4.0	1.7	4.35	36.3
7	—	—	2.0	4.0	1.7	4.68	39.0
8	—	—	3.0	4.0	1.7	3.92	32.5
9	—	—	2.0	4.0	1.0	4.00	33.3
10	—	—	2.0	4.0	1.5	4.80	40.0
11	—	—	2.0	4.0	2.0	5.29	44.1
12	—	—	2.0	4.0	2.5	3.86	32.2

* 基础培养基组成(%): 淀粉水解糖 12, 磷酸氢二钾 0.1, 硫酸镁 0.05, 硫酸铵 4.0, Fe^{++} 及 Mn^{++} 各 2ppm, 碳酸钙 4.0, pH7.0, 发酵周期 72 小时。

表2 硫酸铵的用量对产L-赖氨酸的影响*

硫酸铵 (%)	初糖 (%)	发 酵 终			糖转化率(%)	周期 (h)	
		pH	生长(光密度)	加尿素总量(%)			产 L-赖氨酸(%)
1	11.2	7.2	1.7	0.5	2.0	17.9	46
1.2	11.8	6.4	1.65	0.7	3.28	27.8	47
1.2	11.4	7.0	1.6	0.5	3.14	27.5	34
2.5	14.3	7.0	1.6	0.9	4.43	31.0	50
2.5	14.4	7.0	1.6	1.15	4.65	32.3	48
3.0	14.5	7.5	1.7	1.15	4.43	30.6	56

* 基础培养基组成(%): 淀粉水解糖(用量见表2), 磷酸氢二钾 0.1, 硫酸镁 0.05, 尿素 0.2, 玉米浆 2.0, 废糖蜜 4.0, 毛发水解液 2.0, pH7.0。发酵过程中用尿素维持 pH6.4—7.0。

表3 淀粉水解糖的浓度对产L-赖氨酸的影响

初糖(%)	周期(h)	产 L-赖氨酸(%)	糖转化率(%)
11.8	47	4.22	35.8
12.0	50	4.22	35.2
13.2	50	4.50	34.1
14.0	46	4.50	32.1
14.5	56	4.83	33.3
14.4	50	4.65	32.2
14.8	46	4.90	33.1

钾改用磷酸二氢钾。结果证明磷酸二氢钾对生长及L-赖氨酸产率无影响, 其产酸平均为4.5%, 糖转化率为32—35%。

4. 淀粉水解糖浓度对产L-赖氨酸的影响: 在500L罐上, 进行不同淀粉水解糖浓度产L-赖氨酸的试验, 结果表明培养基中含14—15%的淀粉水解糖较含11—13%的糖产L-赖氨酸的量高。结果见表3。

5. 通气量试验: 在500L罐上进行通气量试验。结果表明1号罐采用1:0.3(V/V)的通气量, 2号罐在发酵12小时前采用1:0.3(V/V), 12小时后采用1:0.5(V/V)的通气量, 均可得到较高的L-赖氨酸产率, 结果见表4。

6. 不同接种量试验: 在500和5000L罐上采用不同接种量的发酵试验结果表明, 接种量大, 发酵周期短, 但对最终产酸率未见显著影响, 见表5。

7. 利用废糖蜜做原料生产L-赖氨酸: 我们利用废糖蜜做原料在500L罐上进行试验。结果表明, 菌株PI-3-2利用废糖蜜生产L-赖氨酸, 产酸量可达6.05%, 糖转化率为37.3%, 见表6。

8. 用菌株PI-3-2生产L-赖氨酸的稳产试验: 综合上述结果的适宜发酵条件, 在5000L罐上, 以淀粉水解糖为原料, 连续进行发酵稳产试验, 结果见表7。

表4 不同通气量对产赖氨酸的影响

罐号	初糖(%)	总尿素量(%)	周期(h)	通 气 量		产 L-赖氨酸 (%)	糖转化率 (%)
				12h 前	12h 后		
2	10.5	0.6	48	1:0.3	1:0.8	1.59	15.1
2	9.5	0.8	58	1:0.6	1:0.8	2.28	24.0
2	12.7	1.05	48	1:0.3	1:0.5	4.21	33.2
1	11.8	0.9	47	1:0.6	1:0.8	3.28	27.8
1	11.9	1.1	42	1:0.3	1:0.5	3.58	30.1
1	14.5	1.2	56	1:0.3	1:0.3	4.83	33.4

表5 不同接种量的发酵结果

罐容(L)	初糖浓度(%)	接种量(%)	产L-赖氨酸(%)	糖转化率(%)	发酵周期(h)
500	14	10	4.59	32.1	46
500	14.4	5	4.65	32.3	50
5000	12.1	8	4.20	34.6	48
5000	14.0	1	4.40	31.4	60

表6 用废糖蜜生产L-赖氨酸结果*

总糖浓度(%)	总尿素量(%)	发 酵 结 果					
		残糖(%)	pH	生长(A)	产L-赖氨酸(%)	糖转化率(%)	周期(h)
12.3	0.7	0.46	6.7	1.7	4.72	38.4	60
17.3	1.2	0.54	6.5	2.0	5.48	31.6	51
16.2	1.3	0.56	6.6	2.0	5.58	34.4	55
16.1	1.3	0.64	6.8	2.0	5.98	37.1	52
16.2	1.0	0.74	6.7	1.8	6.05	37.3	54
12.5	0.9	0.52	7.2	1.8	4.57	36.6	49

* 基础培养基组成(%): 废糖蜜(以含总糖量计,见表7), 磷酸二氢钾0.1, 硫酸镁0.05, 硫酸铵2.5, 尿素0.2, 毛发水解液2.0, pH7.2。发酵过程中补加废糖蜜2-3次, 流加尿素控制pH6.4-6.7。通气量1:0.3(V/V)。

表7 罐产试验结果*

初糖浓度(%)	尿素总量(%)	发 酵 结 果						周期(h)
		残糖(%)	pH	生长(A)	产L-赖氨酸(%)	糖转化率(%)	耗糖转化率(%)	
14.0	1.2	1.34	7.0	1.80	4.40	31.4	34.8	60
13.8	1.4	1.40	7.1	1.60	4.86	35.2	39.2	57
13.8	1.7	1.40	7.0	1.60	4.43	32.1	35.7	58
15.2	1.7	1.96	6.8	1.70	4.75	31.5	35.9	70
16.0	1.7	1.50	7.0	1.60	4.70	29.4	32.4	65
14.0	1.75	1.64	7.2	1.60	4.50	32.0	36.4	56

* 基础培养基组成同表6。通气量12h前为1:0.2, 12h后为1:0.3(V/V), 接种量1%。

9. L-赖氨酸·HCl 的制备: 将发酵液加热至80℃, 冷却后加浓盐酸酸化到pH4.0-4.5, 按作者前文^[1]报道的树脂法进行。上柱酸化液3500L中折算含L-赖氨酸·HCl 108.53 Kg, 洗脱液中测定后折算含L-赖氨酸·HCl 95.68 Kg, 离子交换收率84.57%。洗脱收集液经浓缩后一次结晶得含量98%的符合饲料添加剂用的L-赖氨酸·HCl 68.64 Kg, 一次收率为62.66%, 再浓缩结晶得含量82.86%的L-赖氨酸·HCl 10.0Kg, 总收率为68.64%。再经活性炭脱色后结晶, 可得含量98.5%, 比旋光度 $[\alpha]_D^{25} = +19.0-21.5$ (C=8.0, 6N HCl), 可达到医药用赖氨酸指标的标准。

讨 论

利用废糖蜜为原料可制得较高产率的L-赖氨酸·HCl, 在500L罐上产酸率为6.05%, 糖转化率为37.3%, 而摇瓶试验最高产酸率为5.29%, 对糖转化率为44%, 因此进一步提高该菌的发酵产酸率是有潜力的。与作者已报道使用AS1.563菌的试验结果^[1]相比, 扩大试验平均产酸率提高了45%, 成本降低56%。经技术鉴定, 上述结果为国内先进水平, 并建议采用PI-3-2菌株进行L-赖氨酸的工业化生产。

参 考 文 献

- [1] 常州味精厂试验组、中国科学院微生物研究所氨基酸组: 微生物学通报, 7(1): 20-23, 1980。