

NH_4^+ 离子和 Cl^- 离子影响谷氨酰胺发酵的研究

王福源 王妙虎 王锦华 陈驹声

(上海科学技术大学)

俞 儒 钧

(上海天厨味精厂)

摘要 在微酸性条件下,当有高浓度铵盐存在时,谷氨酸发酵将转向谷氨酰胺发酵。本文阐述了用硫酸铵和氯化铵作氮源时的不同发酵结果,以及用氯化铵时 NH_4^+ 离子和 Cl^- 离子对发酵的影响。

关键词 谷氨酰胺;发酵;氨、氯离子

采用谷氨酸生产菌,可以实现谷氨酸发酵转向谷氨酰胺发酵。发酵转换的条件是:一、发酵培养基中有高浓度的铵盐存在,其含氮量比谷氨酸发酵时所用的氮量多得多,在谷氨酰胺合成酶的催化下,由谷氨酸进一步合成为谷氨酰胺;二、菌体增殖进入平衡期后,发酵 pH 值必须调整到 6.0 左右,以抑止谷氨酰胺酶的

活力,避免谷氨酰胺被分解成谷氨酸。

铵盐种类不同,发酵最终结果是不一样的。我们从几种铵盐中选择出能生成多量谷氨酰胺的硫酸铵和氯化铵这两种铵盐进一步加以比较,并研究了不同浓度氯化铵对菌体生长、发酵过程中糖的消耗和产物生成的影响,以及 NH_4^+ 和 Cl^- 离子所起的作用。研究结果表明:在相

同 NH_4^+ 离子浓度下,用硫酸铵作氮源时所生成的副产物谷氨酸的量比使用氯化铵时明显增多。另外,高浓度 NH_4^+ 离子和 Cl^- 离子对谷氨酰胺的生物合成有阻碍作用,但 NH_4^+ 离子对菌体生长的抑制不如 Cl^- 离子强烈。

材料和方法

(一) 菌种

黄色短杆菌 (*Brevibacterium flavum*) ATCC 14067。

(二) 试剂和仪器

L-谷氨酰胺标准品系日本味之素公司产品。玉米浆由上海天厨味精厂提供。其余试剂均为国产试剂、化学纯。发酵液 pH 值测定,用 pH-S 型酸度计。光密度测定用 72 型分光光度计。

(三) 测定方法

1. L-谷氨酰胺:用新华 3 号滤纸,定量点样,展开后与 L-谷氨酰胺标准液作对照,比色,定量。

2. A 值的测定:取 0.25ml 发酵液加 4.75 ml 1N HCl,摇匀后测定 610nm 的 A 值。

3. 残糖:斐林法测定还原糖法。

(四) 发酵条件

发酵温度 31°C 。在 500ml 三角烧瓶中盛放 30ml 培养基,发酵起始 pH7.2—7.3,接种后置于往复式摇瓶机(振幅 5.6 厘米,频率 140 r/min),发酵 65 小时。

(五) 培养基组成(%)

葡萄糖 12, 玉米浆 1.0ml, $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0.025, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1mg, 维生素 B_1 35 μg , $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.002, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05, Zn^{++} 1mg, 以及 CaCO_3 5。

结果和讨论

(一) 不同氯化铵浓度对谷氨酰胺发酵的影响

在选定的发酵培养基中,使用了 2%、4% 和 6% 三种不同浓度的氯化铵,观察菌体生长和发酵过程中糖耗及谷氨酰胺生成的情况,结

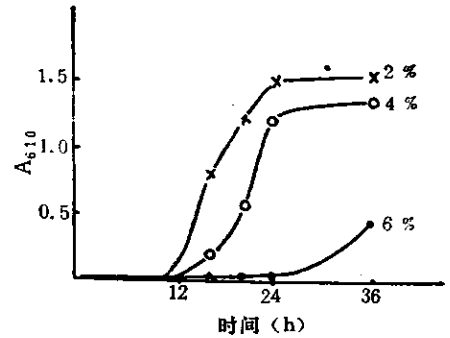


图 1 NH_4Cl 对菌体生长的影响

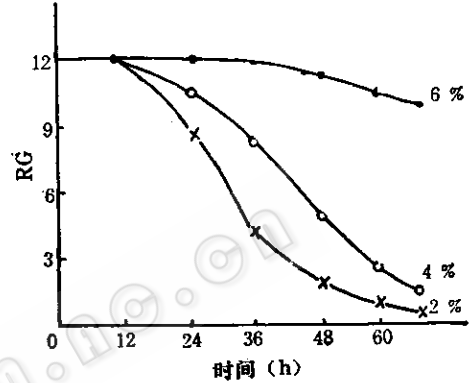


图 2 NH_4Cl 对糖耗的影响

表 1 不同浓度 NH_4Cl 对产物生成的影响

发酵时间 (h)	2		4		6	
	NH_4Cl (%)					
	GA	Gln	GA	Gln	GA	Gln
58	痕迹	0	5	28	0	0
64	痕迹	痕迹	4	28	0	痕迹

GA: 谷氨酸 Gln: 谷氨酰胺(下同)

果见图 1、2 和表 1。

从图 1、2 可以看出:氯化铵浓度对菌体生长繁殖和糖耗都有明显影响。从菌体生长的 A 值来看,2% 氯化铵所供给的氮已能满足菌体生长的需要;4% 氯化铵组由于 Cl^- 离子的抑制作用,结果 A 值明显低于 2% 氯化铵组;6% 氯化铵组,菌体受到的抑制作用最强,所以

A 值比较小。表 1 结果表明：不同氯化铵浓度对谷氨酸生成的时间和生成量有影响。为了使菌体生成多量的谷氨酸，在培养基中仅加入 2% 氯化铵是不够的，4% 氯化铵最适当，6% 氯化铵已过量。

(二) NH_4^+ 离子和 Cl^- 离子浓度与 4% NH_4Cl 相同时的发酵试验

4% NH_4Cl 中，其 NH_4^+ 离子浓度为 0.75N， Cl^- 离子浓度为 0.75N。当以 5% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 作氮源，并在培养基中加入 4% CaCl_2 进行培养时，从理论上讲，因为 NH_4^+ 离子浓度和 Cl^- 离子浓度跟 4% NH_4Cl 是相同的，发酵结果应该一致。实验结果也证实了这一点。此时溶液中虽有一定量的 SO_4^{2-} 离子，看来 Cl^- 离子的作用是主要的。为了避免加入 Cl^- 离子的同时引进阳离子而产生干扰，故选用 CaCl_2 作为 Cl^- 离子的添加剂。

(三) 在相同 NH_4^+ 离子浓度下，比较 Cl^- 和 SO_4^{2-} 离子的作用

分别以 4% 氯化铵和 5% 硫酸铵为氮源，此时，两种铵盐的 NH_4^+ 离子浓度都为 0.75N，培养基其它组成相同，在同一培养条件下进行发酵试验，观察 Cl^- 离子和 SO_4^{2-} 离子对谷氨酸发酵的影响，结果见表 2。

表 2 SO_4^{2-} 和 Cl^- 离子对产物生成的影响

发酵时间 (h)	SO_4^{2-}		Cl^-	
	产物 (mg/ml)			
	GA	Gln	GA	Gln
58	24	25	5	28
65	24	25	4	28

在相同 NH_4^+ 离子浓度下，即在提供等量氮源的情况下，用两种不同铵盐作氮源时， Cl^- 离子和 SO_4^{2-} 离子在谷氨酸发酵中所起的作用是不同的。虽然没有看到两种铵盐在生成谷氨酸上有差别，但是，用硫酸铵发酵时，副产物谷氨酸的量几乎跟谷氨酸的量相等，而用氯化铵发酵时，谷氨酸的量仅为谷氨酸的 1/6。

根据这个结果，我们可作如下设想： Cl^- 离子对细菌体内的谷氨酸有滞留作用，它阻止谷氨酸泄漏到细胞外，而 SO_4^{2-} 离子却无此作用，所以生成的谷氨酸不断泄漏到胞外，使胞外的谷氨酸浓度比较高。

(四) Cl^- 离子的抑制作用

实验 (一) 的结果表明，当氯化铵浓度为 6% 时，菌体细胞几乎不能生长繁殖。为了改善这种情况，在含 6% 氯化铵的培养基中添加牛肉浸膏或增加玉米浆用量，但效果不显著，说明氯化铵对菌体生长的抑制作用是十分强烈的。为了弄清这个抑制作用究竟是 NH_4^+ 离子还是 Cl^- 离子引起的，或者是两种离子共同作用的结果，用 4% 氯化铵作氮源，在一组培养基中添加 2% CaCl_2 ，另一组不添加，在相同条件下同时进行发酵培养。结果表明：凡添加 Cl^- 离子的，菌体生长繁殖受到抑制，发酵过程中糖的消耗变慢，发酵液残糖高，且没有谷氨酸生成。从表 3 可以看出：当有 0.75N NH_4^+ 离子存在时， Cl^- 离子的浓度为 0.75N，此时可得到最大量的谷氨酸；而 Cl^- 离子浓度增加到 1.11N 时，不仅菌体的生长繁殖受到抑制，而且只有痕迹量的谷氨酸生成，显示出 Cl^- 离子的抑制作用。

表 3 不同离子浓度和的 Gln 生成

		4% NH_4Cl	4% NH_4Cl + 2% CaCl_2
$\text{Cl}^-(\text{N})$		0.75	1.11
$\text{NH}_4^+(\text{N})$		0.75	0.75
$\text{NH}_4^+ + \text{Cl}^-(\text{N})$		1.50	1.86
$A_{260\text{nm}}$	12h	0.135	0.125
	24h	0.75	0.150
	36h	0.99	0.495
GA(mg/ml)		5	0
Gln(mg/ml)		28	痕 迹

(五) NH_4^+ 离子的抑制作用

以 4% 氯化铵为氮源，培养基中不加入 CaCO_3 ，发酵过程中用氨水来调节 pH 值，发酵结果见表 4。表 4 表明： NH_4^+ 离子不象 Cl^- 离子那样对细菌生长繁殖有强烈抑制作用，但是，

表 4 NH_4^+ 离子对菌体生长及 Gln 生成的影响

		4% NH_4Cl	4% NH_4Cl
$\text{CaCO}_3(\%)$		5	/
10% 氨水		/	4.8ml
$\text{Cl}^-(N)$		0.75	0.75
$\text{NH}_4^+(N)$		0.75	0.764
$\text{NH}_4^+ + \text{Cl}^-(N)$		1.50	1.514
A_{260nm}	12	0.135	0.125
	24	0.75	0.65
	36	0.99	0.89
GA (mg/ml)		5	4
Gln (mg/ml)		28	6

它也明显影响谷氨酰胺的生成。

实验结果说明：当培养基中用 0.75N 氯化铵作氮源时，可以得到最大量的谷氨酰胺和最少量的谷氨酸，在发酵过程中，无论是引进 Cl^- 离子还是 NH_4^+ 离子，都将明显影响谷氨酰胺的生成。

参 考 文 献

- [1] 天津轻工业学院等编著：工业发酵分析，P16—18，1979年 轻工业出版社。
- [2] 王福源等：微生物学通报，11(5)：211—213，1984。
- [3] 王福源等：应用微生物，第1期，P35—40，1984。
- [4] 王福源等：上海科技大学学报，第3期，P17—21，1984。
- [5] 中西透：発酵と工業，40(1)：15—28，1984。
- [6] 中西透：発酵工学，第6号，P453—465，1980。