

# 基因工程菌发酵合成 L-苏氨酸-N<sup>15</sup>

董 蕾

(中国科学院上海药物研究所, 上海 200031)

刁新民 侯静华

(化学工业部上海化工研究院, 上海 200062)

**摘要** 采用含有稳定同位素<sup>15</sup>N-硫酸铵为主要氮源的专用发酵培养基配方和提取精制条件, 在国内、外首次采用基因工程菌 AA<sub>7</sub>(p<sup>TH2</sup>) (AHV<sup>r</sup>AEC<sup>r</sup>, Thr-N<sup>r</sup>, Hom<sup>r</sup>, Ap<sup>r</sup>) 直接发酵方法研制 L-苏氨酸-N<sup>15</sup>

---

1995-06-17收稿

高丰度精制产品。每 mol  $^{15}\text{N}$ -硫酸铵实际得到 0.638 mol L-苏氨酸- $\text{N}^{15}$ , 产品  $\text{N}^{15}$  丰度达 99.09%, 仅比原料  $^{15}\text{N}$ -硫酸铵丰度下降 0.42%, 提取精制得率高达 92.83%。

**关键词** L-苏氨酸- $\text{N}^{15}$ , 生物合成, 基因工程菌, 脂肪族中性氨基酸

L-苏氨酸属于脂肪族中性氨基酸, 在食品、饲料、医药等方面有重要的用途。在食品中添加少量苏氨酸, 可提高蛋白质的有效利用率, 对幼儿大脑的发育有重要作用。苏氨酸用于配制复合氨基酸输液, 作为代谢改善剂, 并对抗溃疡、防辐射、抗菌、抗癌、催眠、镇静等方面有较好的效果<sup>[1]</sup>, 被誉为“第二限制性氨基酸”<sup>[2, 3]</sup>。此外, 苏氨酸还有抗脂肪肝等药用效果, 又是生产高效、低过敏广谱抗生素单环  $\beta$ -内酰胺的原料<sup>[4]</sup>。因此研制  $\text{N}^{15}$  标记的 L-苏氨酸完全可以作为示踪剂, 广泛应用于上述各个领域。本文报道在国内、外首次采用基因工程菌  $\text{AA}_7$  ( $p^{\text{TH2}}$ ) ( $\text{AHV}^{\text{r}}\text{AEC}^{\text{r}}$ ,  $\text{Thr}-\text{N}^{\text{r}}$ ,  $\text{Hom}^{\text{r}}$ ,  $\text{Ap}^{\text{r}}$ ) 直接发酵方法, 研制 L-苏氨酸- $\text{N}^{15}$  高丰度精制产品。经过多次发酵正交试验和提取精制条件试验, 得到了适合研制 L-苏氨酸- $\text{N}^{15}$  专用培养基配方和提取精制工艺条件。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌种

苏氨酸基因工程菌  $\text{AA}_7$  ( $p^{\text{TH2}}$ ) ( $\text{AHV}^{\text{r}}\text{AEC}^{\text{r}}$ ,  $\text{Thr}-\text{N}^{\text{r}}$ ,  $\text{Hom}^{\text{r}}$ ,  $\text{Ap}^{\text{r}}$ )<sup>[5, 6]</sup>。

### 1.2 培养基

L-苏氨酸- $\text{N}^{15}$  发酵专用培养基(%): 葡萄糖 5,  $^{15}\text{N}$ -硫酸铵 1,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.2,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1,  $\text{CaCO}_3$  2, 复合维生素(维生素  $\text{B}_1$   $1\mu\text{g}/\text{ml}$ , 维生素  $\text{B}_2$   $5\mu\text{g}/\text{ml}$ , 烟酰胺  $20\mu\text{g}/\text{ml}$ ),  $\text{pH} 7.0$ 。

### 1.3 发酵工艺

$\text{AA}_7$  ( $p^{\text{TH2}}$ ) ( $\text{AHV}^{\text{r}}\text{AEC}^{\text{r}}$ ,  $\text{Thr}-\text{N}^{\text{r}}$ ,  $\text{Hom}^{\text{r}}$ ,  $\text{Ap}^{\text{r}}$ ) 斜面菌体用生理盐水洗脱后直接接种到 L-苏氨酸- $\text{N}^{15}$  发酵专用培养基中,  $28^\circ\text{C}$  振荡培养 72h, 发酵液合并, 定容至原体积, 离心, 取上清液, 再提取精制。

### 1.4 提取精制工艺

定容、离心后的发酵上清液再次过滤, 调

$\text{pH} 2.0 \sim 2.5$ , 上 732 $\text{H}^+$  树脂, 分离得到粗品, 活性炭脱色, 无水乙醇重结晶, 即得到 L-苏氨酸- $\text{N}^{15}$  精制产品。把重结晶后的母液用 732 $\text{H}^+$  树脂进行氯化铵溶液梯度洗脱, 可再次得到重结晶母液中 2/3 以上的 L-苏氨酸- $\text{N}^{15}$  精制产品。

## 1.5 分析方法

L-苏氨酸定量: 浊度法<sup>[7]</sup>。

$\text{N}^{15}$  丰度测定: 在国内首创采用杜马法原理的封管法转化, 用 MAT-271 型质谱仪测定。

## 2 结果和讨论

### 2.1 L-苏氨酸- $\text{N}^{15}$ 发酵专用培养基试验

**2.1.1 葡萄糖、硫酸铵、酵母粉对发酵的影响:** 按  $\text{L}_9(3^3)$  正交试验, 综合考察葡萄糖、硫酸铵、酵母粉对发酵的影响(表 1)。其中以硫酸铵的影响最为显著, 其次是酵母粉, 再次是葡萄糖。其中培养基中酵母粉 0.45% 为好条件, 但酵母粉含量如此之高, 无疑会使 L-苏氨酸- $\text{N}^{15}$  产品丰度大幅度下降, 必须用微量复合维生素替代酵母粉。

表 1 葡萄糖、硫酸铵、酵母粉对发酵影响

因素	水平 (%)	$K_1$	$K_2$	$K_3$	$R$	因素 好	因素 次	因素 主	因素 平
葡萄糖	6.5, 7.5, 8.5	0.90	0.72	0.77	0.18	3	6.5		
硫酸铵	1.2, 1.6, 2.0	1.40	0.78	0.21	1.19	1	1.2		
酵母粉	0.30, 0.45, 0.60	0.62	0.91	0.86	0.29	2	0.45		

注:  $K_1$ ,  $K_2$ ,  $K_3$  值以 g 苏氨酸 / g 硫酸铵表示, 下同。培养基基础成分见 1.2。

### 2.1.2 微量维生素替代酵母粉对发酵的影响:

按  $\text{L}_9(3^3)$  正交试验, 综合考察维生素  $\text{B}_1$ 、维生素  $\text{B}_2$ 、烟酰胺对发酵的影响(表 2)。结果表明合适的微量维生素完全可以替代酵母粉, 虽然产率略有下降, 但可以保证 L-苏氨酸- $\text{N}^{15}$

表2 维生素B<sub>1</sub>、维生素B<sub>2</sub>、烟酰胺对发酵影响

因素	水平 (μg/ml)	K <sub>1</sub>	K <sub>2</sub>	K <sub>3</sub>	R	因素 主次	好 水平
维生素B <sub>1</sub>	0, 1, 2	0.77	1.13	1.04	0.36	1	1
维生素B <sub>2</sub>	0, 5, 10	0.92	1.06	0.96	0.14	3	5
烟酰胺	0, 20, 40	0.83	1.14	0.97	0.31	2	20

注:葡萄糖6.5%,硫酸铵1.2%,培养基基础成份见1.2。

表3 葡萄糖、硫酸铵对发酵影响

因素	水平(%)	K <sub>1</sub>	K <sub>2</sub>	K <sub>3</sub>	R	因素 主次	好 水平
葡萄糖	5, 6, 7	0.73	0.62	0.52	0.21	2	5
硫酸铵	1.0, 1.2, 1.4	0.85	0.59	0.51	0.34	1	1.0

注:微量复合维生素成份选择表2中好水平,培养基基础成份见1.2。

表4 葡萄糖、硫酸铵、复合维生素对发酵影响

因素	水平(%)	K <sub>1</sub>	K <sub>2</sub>	R	因素 主次	好 水平
葡萄糖	4, 5	0.77	0.82	0.05	1	5
硫酸铵	0.8, 1.0	0.79	0.80	0.01	3	1.0
复合维生素	-, +	0.78	0.80	0.02	2	+

注:培养基基础成份见1.2, +、-分别表示培养基中添加复合维生素与否。

表5 L-苏氨酸-N<sup>15</sup> 高丰度发酵试验

<sup>15</sup> N-硫酸铵 (%)	<sup>15</sup> N-硫酸铵丰度 (%)	g L-苏氨酸-N <sup>15</sup> g <sup>15</sup> N-硫酸铵	产品 L-苏氨酸-N <sup>15</sup> 丰度 (%)
1	99.51	0.83	99.09

\* 发酵液定容至原体积后所测得的分析值。

表6 L-苏氨酸-N<sup>15</sup> 产品提取精制

<sup>15</sup> N-硫酸铵 (%)	<sup>15</sup> N-硫酸铵 投料量(g)	<sup>15</sup> N-硫酸铵丰 度(%)	L-苏氨酸-N <sup>15</sup> 精制品(g)	L-苏氨酸-N <sup>15</sup> 丰度(%)	mol L-苏氨酸-N <sup>15</sup> mol <sup>15</sup> N-硫酸铵	提取精制收率 (%)
1	6.00	99.51	3.43	99.09	0.638	92.83

产品丰度不会大幅度下降。

### 2.1.3 葡萄糖、硫酸铵、维生素对发酵的影响

分别按L<sub>9</sub>(3<sup>2</sup>)、L<sub>4</sub>(2<sup>3</sup>)正交试验,综合考察葡萄糖、硫酸铵及微量复合维生素对发酵的影响,结果见表3、4。

从上述一系列正交试验可得到如下结果:

(1)培养基中酵母粉对发酵产酸影响较大,但为了防止L-苏氨酸-N<sup>15</sup>产品丰度大幅度下降,不惜牺牲产酸率用微量复合维生素替代酵母粉。(2)硫酸铵用量对发酵影响最大,在一定范围内,其用量越多,产酸量越高。但在L-苏氨酸-N<sup>15</sup>发酵中,主要目标是g苏氨酸/g硫酸铵来说不一定有利,因此最适用量为1%。(3)葡萄糖作为碳源,5%为最佳用量。

### 2.2 高丰度L-苏氨酸-N<sup>15</sup> 发酵试验

综合上述试验结果,进行高丰度L-苏氨酸-N<sup>15</sup>试验(表5)。L-苏氨酸-N<sup>15</sup>丰度达99.09%,仅比原料<sup>15</sup>N-硫酸铵丰度99.51%下降0.42%。

### 2.3 L-苏氨酸-N<sup>15</sup> 产品提取精制

从表6的结果可知,提取精制工艺得率达到国内、外L-苏氨酸最新报道的水平<sup>[8,9]</sup>。获得了适合L-苏氨酸-N<sup>15</sup>产品克数级规模的稳定操作提取精制工艺条件。

发酵法合成  $N^{15}$  标记氨基酸产品与一般发酵法合成氨基酸有很大区别。在 L-苏氨酸- $N^{15}$  生物合成过程中, 由于  $^{15}N$ -硫酸铵价格比其它原料贵重, 因此要尽量减少  $^{15}N$ -硫酸铵消耗, 提高  $N^{15}$  利用率。在苏氨酸基因工程菌合成 L-苏氨酸- $N^{15}$  过程中,  $^{15}N$ -硫酸铵用量由一般 2% 减少 1%, 并且产酸率较高。即使在相当不利的外界客观条件影响下, 每 mol  $^{15}N$ -硫酸铵得到 0.638 mol L-苏氨酸- $N^{15}$  精制产品 (正交试验后期和高丰度试验恰遇 1994 年 6 月上海地区罕见高温天气、停电事故、温度失控等影响)。因此, 在进一步提高本文  $N^{15}$  利用率上还有很大潜力。其次, 发酵过程中要严格控制天然氮源物质加入。在 L-苏氨酸- $N^{15}$  发酵过程中即为去除酵母粉, 以防止  $N^{15}$  丰度下降。而酵母粉恰恰起着稳定苏氨酸基因工程菌重组质粒和提高产酸率作用。因此通过正交试验, 选用合适的微量复合维生素替代酵母粉, 从而使 L-苏氨酸- $N^{15}$  产品丰度达 99.09%, 仅比原料  $^{15}N$ -硫酸铵下降

0.42%。再次, 采用苏氨酸基因工程菌发酵合成 L-苏氨酸- $N^{15}$  选择性好, 产酸率高, 杂酸量少 (仅占粗品的 5% 以下), 大大节约了提取精制时间, 又使提取精制得率高达 92.83%。本文采用的基因工程菌直接发酵研制 L-苏氨酸- $N^{15}$  高丰度产品的方法包括发酵、提取精制工艺以及产品  $N^{15}$  丰度下降范围等至今未见国内、外有关文献报道。

### 参 考 文 献

- [1] 张炳荣编译. 中国调味品, 1985, 12: 25~29.
- [2] 檀耀辉, 张炳荣. 生物工程学报, 1986, 2(2): 56~61.
- [3] 吴蓉, 张建国. 氨基酸杂志, 1991, 4: 16~19.
- [4] 廖晓垣, 刘方, 刘增辉. 氨基酸杂志, 1992, 3: 1~4.
- [5] 吴汝平, 杨胜利, 金科铭, 等. 生物工程学报, 1987, 3(3): 177~182.
- [6] 董蕾, 李美英, 陈燕, 等. 工业微生物, 1991, 21(2): 1~5.
- [7] 李美英, 张志毅, 董蕾, 等. 工业微生物, 1991, 21(3): 6~8.
- [8] Hisso Ito, Akio Nishi, Masayoshi Naruse. Process for Isolating and Purifying Amino Acids, U. S. P. 4,956,471, 1990.
- [9] Miyazawa Tadashi, Tamura Hajime. Purification of Hydroxyl Amino Acid, JP 78 / 140, 290, 1978.

## BIOSYNTHESIS OF L-( $^{15}N$ )-THREONINE BY GENE ENGINEERED STRAIN

Dong Lei

(Shanghai Institute of Materia Medica, Academia Sinica, Shanghai 200031)

Diao Xinmin Hou Jinghua

(Shanghai Research Institute of Chemical Industry, Ministry of Chemical Industry, Shanghai 200062)

**Abstract** L-( $^{15}N$ )-threonine was prepared by gene engineered strain of  $AA_7(p^{TH2})$  ( $AHV^+AEC^+$ ,  $Thr-N^+$ ,  $Hom^+$ ,  $Ap^+$ ) grown in a specific nutrient medium containing ( $^{15}N$ )-ammonium sulfate, and growth stimulants with subsequent isolation and purification of L-( $^{15}N$ )-threonine from culture. Per gram molecule ( $^{15}N$ )-ammonium sulfate produced 0.638 gram molecule L-( $^{15}N$ )-threonine. The yield of purification reached 92.83%. Mass spectrometric analysis was performed. The electron impact (EI) spectrum showed 99.09% enrichment of L-( $^{15}N$ )-threonine, while ( $^{15}N$ )-ammonium sulfate was 99.51% enriched.

**Key words** L-( $^{15}N$ )-threonine, Biosynthesis, Gene engineered strain, Fat family neutral amino acid