

## L-异白氨酸发酵的研究

### 1. 以 $\alpha$ -溴丁酸为原料的 L-异白氨酸产生菌的筛选及发酵条件的研究

唐任天 郭永复 陈 琦

(中国科学院微生物研究所, 北京)

对 26 株产谷氨酸菌进行了由  $\alpha$ -氨基丁酸及  $\alpha$ -溴丁酸生产 L-异白氨酸的筛选试验。结果表明,多数菌株均能产生 L-异白氨酸,其中最优良的是北京棒状杆菌 AS1.299。

研究了 AS1.299 菌由  $\alpha$ -溴丁酸生产 L-异白氨酸的培养条件。在适宜条件下(葡萄糖 10%, 脲素 0.3%, 溴丁酸 2% (体积/体积), 玉米浆 2.5%, 碳酸钙 0.5%, 接种量 5%, 28℃ 摇床培养 4 天), L-异白氨酸产量达 23.9 毫克/毫升, 溴丁酸的转化率为 74%。

培养液经  $H^+$  型 732 强酸性阳离子交换树脂提取, 再以等电点-有机溶剂法重结晶。产品经双向纸层析、红外吸收光谱、元素分析及旋光等项鉴定, 证明北京棒状杆菌 AS1.299 由  $\alpha$ -溴丁酸发酵生产所得产品确系 L-异白氨酸。

L-异白氨酸是一种价格昂贵的必需氨基酸, 在医药及食品等方面均有重要用途。1904 年发现, 其制备方法是自蛋白质水解物中提取、化学合成和微生物发酵。但由于蛋白质水解物中 L-异白氨酸含量较少, 且不易与白氨酸等其他氨基酸分离; 化学合成也较困难, 并生成四种异构体, 因此, 近年来大都集中于研究用发酵法生产。

一般情况下, 微生物在培养液中难以过量地积累 L-异白氨酸, 这是因为代谢调节在氨基酸生物合成过程中严密地发挥着作用。细胞只合成所需要的中间代谢产物, 严格防止氨基酸的累积。在 L-异白氨酸的生物合成中, 通常是以 L-苏氨酸为前体, 利用 L-苏氨酸脱氨基酶及随后的四种酶(即所谓异白氨酸-缬氨酸酶)催化而生成的。然而, 这些酶类特别是 L-苏氨酸脱氨基酶受到终产物反馈控制, 从而强烈抑

制 L-异白氨酸的积累<sup>[1]</sup>。为绕过终产物抑制作用, 不少人研究, 加入 L-异白氨酸生物合成途径中苏氨酸以后的中间产物或其他相关的化合物作为 L-异白氨酸生产的前体物。据报道分别采用  $\alpha$ -羟基丁酸<sup>[2-3]</sup>、 $\alpha$ -氨基丁酸<sup>[4]</sup>、D-苏氨酸<sup>[1]</sup>、天门冬氨酸<sup>[1,5]</sup> 及  $\alpha$ -溴丁酸<sup>[6-8]</sup> 均得到显著效果。此外, 通过诱变得到的结构类似物耐性株, 由葡萄糖直接发酵产生 L-异白氨酸, 也取得了具有实用意义的结果<sup>[9-10]</sup>。

我们以易于取得的廉价工业原料  $\alpha$ -溴丁酸为前体物, 采用产谷氨酸菌发酵生产 L-异白氨酸, 并进行了 240 升发酵罐的扩大试验。本文报道以  $\alpha$ -溴丁酸为原料的 L-异白氨酸产生菌之筛选, 优良菌株发酵条件的研究, 以及产物的提取和鉴定结果。

本文于 1975 年 3 月 14 日收到。

## 试验方法

### 一、菌株

采用北京棒状杆菌 (*Corynebacterium pekinense*)<sup>[11]</sup>、钝齿棒状杆菌 (*Corynebacterium crenatum*)<sup>[12]</sup> 和未定名菌等 26 株产 L-谷氨酸菌株, 进行产 L-异白氨酸的筛选试验。

### 二、 $\alpha$ -溴丁酸的处理

取一定量的工业级  $\alpha$ -溴丁酸, 用浓氨水中和至中性, 在水浴中煮沸 30 分钟, 然后再以氨水中和之。配制成含 20%  $\alpha$ -溴丁酸的中性水溶液备用。

### 三、培养基

筛选及发酵培养基组成见表 1。

表 1 培养基的组成

项 目 组成 (%)	种 子 培养基	发 酵 培 养 基			
		A	B	C	D
甘蔗糖蜜		10.00	10.00		
葡萄糖	5.00			10.00	10.00
玉米浆	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
脲素	0.25	1.50	1.50	1.50	0.30
$\alpha$ -氨基丁酸		1.00			
$\alpha$ -溴丁酸 (体积/体积)	0.50*		3.00	3.00	2.00
蛋白胨		0.10	0.10	0.10	
牛肉膏		0.10	0.10	0.10	
磷酸氢二钾		0.20	0.20	0.20	
磷酸二氢钾		0.05	0.05	0.05	
碳酸钙		2.00	2.00	2.00	0.50

注: 培养基以自来水配制, 用氨水调 pH7.2, 8 磅 15 分钟灭菌。

\* 当发酵培养基有  $\alpha$ -溴丁酸时, 种子培养基含有 0.5%  $\alpha$ -溴丁酸。

### 四、培养方法

将待筛选的菌株培养在普通牛肉汁琼脂斜面上, 30℃ 温箱培养 24 小时。取一环量分别接入到装有 2.0 毫升培养基 A 或 B 的 14×150 毫米试管中, 置于迴旋式摇床上 (偏心距 2.5 厘米, 转速 180 次/分), 28℃ 培养 4 天。然后把筛选出的优良菌株的上述斜面培养物一环量, 接种到装有 25 毫升种子培养基的 250 毫升三角瓶中, 于 28℃ 摇床培养 14 小时。取 1 毫升转接到装有 25 毫升培养基 C 或 D 的 500 毫升三角瓶中, 于 28℃ 迴旋

摇床培养 4 天, 分别测定 L-异白氨酸的含量。

### 五、分析测定

1. 菌体生长量的测定 取发酵液 1 毫升到比色管中, 加入适量的 1 当量盐酸以溶解其中的碳酸钙。然后用水稀释 25 倍。装入光程 1 厘米小杯内, 以 72 型分光光度计测定其混浊度。以光密度表示菌体生长量。

2. pH 测定 用国产 pH 试纸测定。

3. L-异白氨酸含量的测定 用上行纸上层析法将发酵液中的 L-异白氨酸加以分离。溶剂系统为正-丁醇: 冰醋酸: 水 = 4:1:1。显色剂为 0.05% 茚三酮丙酮溶液。在 75℃ 下显色后, 与标准品对比以确定发酵液样品中异白氨酸色斑。然后将色斑剪下置于比色管中, 加入 1 毫升氰化钾-茚三酮-乙二醇甲醚溶液及 2 毫升 pH5.0 柠檬酸缓冲液。沸水中加热 20 分钟, 以水冷却后加 2 毫升 60% 乙醇。用 72 型分光光度计进行比色测定 (波长 570 毫微米, 光程 0.5 厘米)<sup>[13]</sup>。同法绘制异白氨酸标准曲线, 以确定发酵液中异白氨酸的含量。

4. 还原糖的测定 将样品稀释一定倍数之后取 1 毫升到试管中, 加入 3 毫升 3.5-二硝基水杨酸试液, 沸水中煮 15 分钟。用 72 型分光光度计读取 550 毫微米光密度读数<sup>[14]</sup>。同法绘制葡萄糖标准曲线, 以确定发酵液中的还原糖含量。

5. 旋光度的测定 样品用 6 当量盐酸配成 1% 溶液, 以蔡斯 (Carl Zeiss) 旋光仪测定旋光度。

## 结 果

### 一、产 L-异白氨酸菌株的筛选

#### 1. 利用 $\alpha$ -氨基丁酸产 L-异白氨酸菌株的筛选

采用培养基 A 和上述的培养方法, 对 26 株产谷氨酸细菌进行了筛选。从表 2 中的结果可以看出, 这些菌株中多数具有以  $\alpha$ -氨基丁酸为原料产生 L-异白氨酸的能力, 其中以北京棒状杆菌 AS1.299 和棒状杆菌 AS1.545 产 L-异白氨酸最多。

表 2 由  $\alpha$ -氨基丁酸产 L-异白氨酸菌株的筛选结果

L-异白氨酸产量 (毫克/毫升)	菌 株
5—6	北京棒状杆菌 ( <i>Corynebacterium pekinense</i> ) AS 1.299 棒 状 杆 菌 ( <i>Corynebacterium</i> sp.) AS 1.545; AS 1.681 钝齿棒状杆菌 ( <i>Corynebacterium crenatum</i> ) T6-5
4—5	北京棒状杆菌 ( <i>Corynebacterium pekinense</i> ) AS 1.688; AS 1.689 钝齿棒状杆菌 ( <i>Corynebacterium crenatum</i> ) AS 1.542; HU 7251 棒 状 杆 菌 ( <i>Corynebacterium</i> sp.) AS 1.584; AS 1.674; AS 1.676; AS 1.683; AS 1.686 未 鉴 定 菌 AS 1.582; AS 1.583; AS 1.585
2—4	( <i>Corynebacterium</i> sp.) AS 1.587; AS 1.673 棒 状 杆 菌 AS 1.675; AS 1.677; AS 1.678; AS 1.679; AS 1.680; AS 1.682; AS 1.684; AS 1.685

2. 由  $\alpha$ -溴丁酸产 L-异白氨酸菌株的筛选

由于  $\alpha$ -氨基丁酸价格较贵, 不宜作为工业生产 L-异白氨酸的原料, 因此选取  $\alpha$ -溴丁酸作为前体物。采用培养基 B 和上述培养方法, 对表 1 中产异白氨酸较高的 5 株菌进行筛选。由图 1 可见, 北京棒状杆菌 AS 1.299 产 L-异白氨酸最高, 其  $\alpha$ -溴丁酸的适宜浓度为 2.0—2.5% (体积/体积)。以下试验便采用 AS 1.299 菌进行发酵条件的研究。

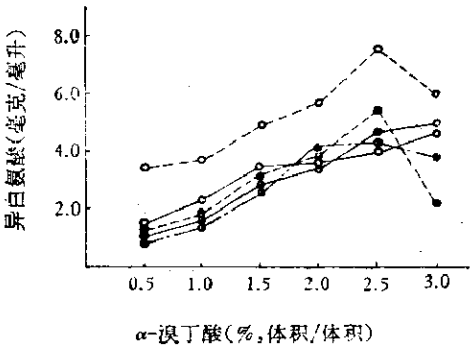


图 1 由  $\alpha$ -溴丁酸产 L-异白氨酸菌株的筛选结果

- AS 1.299      ●—● AS 1.545
- ⊙—⊙ AS 1.683    ⊖—⊖ AS 1.681
- T<sub>6-5</sub>

培养条件:

小试管装入 2 毫升培养基 B, 接入牛肉汁斜面菌种 1 环, 28℃ 摇床培养 4 天。

二、发酵条件

1. 摇瓶通气量对 AS 1.299 菌株产 L-异白氨酸的影响

在 500 毫升三角瓶内, 装入不同体积的培养基 B 或 C, 表示不同的通气量。将牛肉汁斜面上的菌种接一环到种子培养基内, 28℃ 摇床培养 24 小时。然后取 1 毫升种子液再转接到上述 500 毫升摇瓶内, 28℃ 摇床培养 4 天, 观察不同装液量对 AS 1.299 菌产生异白氨酸的影响。由图 2 可见, 不论以甘蔗废糖蜜还是以葡萄糖为碳源, 装液量均以 25—30 毫升为好。

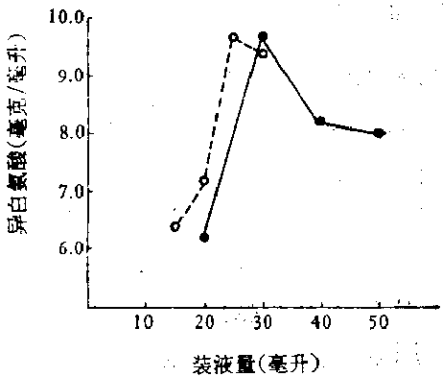


图 2 装液量对异白氨酸产量的影响

- 葡萄糖      ●—● 甘蔗废糖蜜

2. 培养基的 pH 对 AS 1.299 菌产生 L-异白氨酸的影响

用 500 毫升三角瓶, 装入 25 毫升培养基 C, 以上述培养方法进行发酵培养。在培养过程中每隔 12 小时以盐酸或氢氧化钠溶液调一次酸碱度, 使 pH 分别维持在 6.0、6.5、7.0、7.5。28℃ 摇床培养 4 天后测定异白氨酸的产量。图 3 表明培养基的酸碱度维持在 pH 6.5—7.0 为宜。

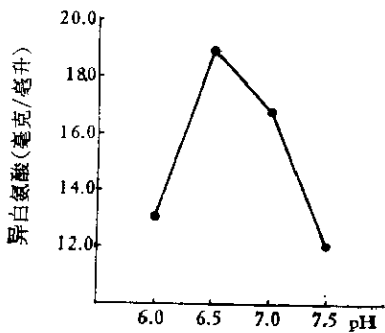


图 3 培养基不同 pH 值对产 L-异白氨酸的影响

3. 葡萄糖、脲素、玉米浆、α-溴丁酸四因子对产 L-异白氨酸影响的正交试验

以正交法试验了葡萄糖、脲素、玉米浆及 α-溴丁酸对产 L-异白氨酸的影响<sup>[15]</sup>。

这四个因子分别采用 3 种水平的浓度, 并按表 3 组合试验。然后分别将同等水平所相应的产酸数据按不同因子分别相加并除以 3, 求出  $\bar{K}$  值, 并作图。  $\bar{K}$  值的大小反映了在这一因子某种水平下的异白氨酸平均产量的高低。由图 4 可见, 葡萄糖的最适浓度为 12.5%, 脲素为 0.3%, 溴丁酸为 2.0% (体积/体积), 玉米浆为 2.5%。同时可以看到脲素浓度影响较大, 溴丁酸浓度也有一定影响。

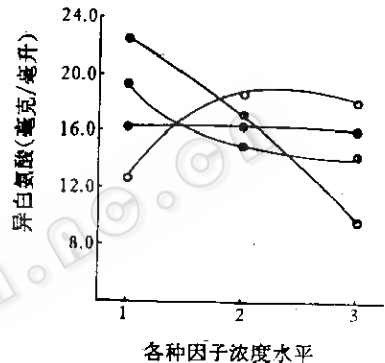


图 4 葡萄糖、玉米浆、溴丁酸、脲素对产异白氨酸的影响之正交试验

○—○ 玉米浆      ●—● 葡萄糖  
○—○ 脲素      ○—○ 溴丁酸

注: 培养条件见表 4。

表 3 葡萄糖、脲素、玉米浆和 α-溴丁酸四因子正交组合试验及其结果

因子 \ 组别	1	2	3	4	5	6	7	8	9	$\bar{K}_1$	$\bar{K}_2$	$\bar{K}_3$
葡萄糖 (%)	10	10	10	12.5	12.5	12.5	15	15	15	16.3	16.4	16.0
脲素 (%)	0.3	0.6	0.9	0.3	0.6	0.9	0.3	0.6	0.9	22.4	17.0	9.3
玉米浆 (%)	2	2.5	3	2.5	3	2	3	2	2.5	12.4	18.4	17.8
溴丁酸 (% 体积/体积)	2	2.5	3	3	2	2.5	2.5	3	2	19.3	15.1	14.2
异白氨酸 (毫克/毫升)	21.7	18.2	8.9	22.7	21.9	4.5	22.7	10.9	14.4			

注: 葡萄糖、脲素、玉米浆、溴丁酸的浓度按表 4 所示, 并加碳酸钙 0.5%, pH 7.2, 500 毫升三角瓶装 25 毫升。接入 1 毫升种子液, 28℃ 摇床培养五天。

4. 脲素、溴丁酸、接种量和培养时间四因子对产 L-异白氨酸之影响的正交试验

脲素、溴丁酸、接种量和培养时间四因子各规定三种水平, 按表 4 组合进行试验。将同一因子相同水平所对应的产酸数据相

加并除以 3, 求得  $\bar{K}$  值。从  $\bar{K}$  值可见, 最适条件为: 脲素 0.3%, 溴丁酸 2.5% (体积/体积), 接种量 5%, 28℃ 摇床培养 3—4 天。看来, 脲素浓度及接种量均有较大影响。

表 4 脲素、溴丁酸、接种量和培养时间对产异白氨酸之影响的正交试验及结果

因 子 \ 组 别	1	2	3	4	5	6	7	8	9	$\bar{R}_1$	$\bar{R}_2$	$\bar{R}_3$
脲 素 (%)	0.3	0.3	0.3	0.6	0.6	0.6	0.9	0.9	0.9	16.6	13.6	11.5
溴丁酸(%，体积/体积)	2.0	2.5	3.0	2.0	2.5	3.0	2.0	2.5	3.0	13.4	15.4	12.9
接种量 (%)	2	5	10	5	10	2	10	2	5	11.3	16.5	13.9
培养时间 (日)	3	4	5	5	3	4	4	5	3	14.3	14.4	13.1
异白氨酸产量(毫克/毫升)	13.9	21.2	14.8	17.3	15.4	10.5	12.3	9.6	13.6			

注：培养基成份(%)：葡萄糖 10；玉米浆 2.5；碳酸钙 0.5；脲素与溴丁酸则按表 5 所示。pH 7.2，500 毫升三角瓶装 25 毫升。接种量、培养时间按表 4 所示。

5. AS 1.299 菌由  $\alpha$ -溴丁酸生产 L-异白氨酸的发酵过程

综合上面的实验结果,进行了AS1.299 菌由溴丁酸产 L-异白氨酸的发酵过程的试验。由图 5 所得结果表明,L-异白氨酸产量达 23.9 毫克/毫升,溴丁酸的克分子转化率为 74%。

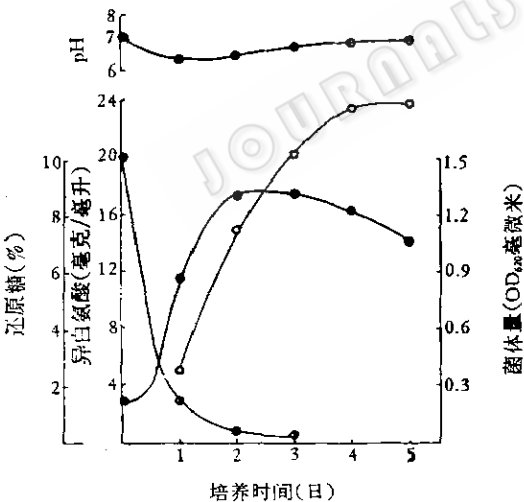


图 5 AS 1.299 菌产 L-异白氨酸的发酵过程

○——○ 异白氨酸      ●——● 菌体量  
●——● 还原糖      ○——○ pH

注：取 1 环牛肉汁琼脂斜面菌种转接入种子培养基，28℃ 摇床培养 10 小时。发酵培养基(%)：葡萄糖 10；脲素 0.3；玉米浆 2.75；溴丁酸 2 (体积/体积)；碳酸钙 0.5。

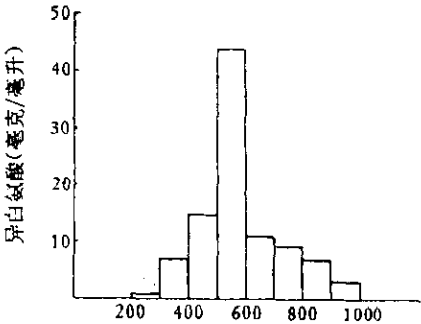
pH 7.2，500 毫升三角瓶装 25 毫升，接入种子培养液 1 毫升，28℃ 摇床培养。

三、提取、制备与鉴定

L-异白氨酸为两性分子,可用离子交换树脂提取。为适应工业化生产条件,采用 732 强酸性阳离子交换树脂。柱高 65 厘米,直径 4 厘米,装入 500 克树脂。树脂以 2 当量氢氧化钠及盐酸再生,并以水洗至中性,成为 H<sup>+</sup> 型柱。

发酵液加适量硫酸及草酸,使 pH 为 3.5。离心去沉淀。清液含异白氨酸 15.3 毫克/毫升,实际吸附量为 16.8 克。交换柱经水洗后,用 1 当量氨水洗脱,洗脱曲线见图 6。上柱及洗脱的流速均为 6—10 毫升/分钟。

取洗脱液高峰部份,加适量活性炭煮沸脱色,减压浓缩至溶液变混浊后,用盐酸调成中性,冷冻过夜。滤出沉淀,并加少量水于沉淀中,沸水浴上加热 20 分钟。冷后



洗脱液累计体积(毫升)

图 6 H<sup>+</sup> 型 732 树脂氨水洗脱曲线图

加一倍体积 95% 乙醇。冷冻过夜。滤出沉淀并烘干, 得到 8.6 克粗制品, 纯度为 94%, 回收率为 51.2%。

为除去粗制品的少量杂质, 将粗制品加到少量水中, 加热并搅拌约 20 分钟, 冷后过滤。滤渣再加入到少量水中, 加热并搅拌。待冷却后加入 1 倍体积的 95% 乙醇, 冰箱内过夜。滤出沉淀并烘干, 即得重结晶制品。制成品为蜡样闪光的叶状结晶。

将成品配成 1.5% 水溶液, 以新华一号滤纸进行双向层析(第一向为正丁醇:冰醋酸:水=4:1:1;第二向为以水饱和的叔戊醇)。结果仅在异白氨酸位置上出现一个斑点, 可见成品已达层析纯。

以 Carlo Erba 1102 色谱仪进行元素分析, 成品的 C、N、H 元素分析数据见表 5。成品测定值与理论值之比说明, 成品符合异白氨酸的元素组成, 并估计其纯度为 99%。

表 5 成品元素的分析结果

元素	测定值(%)	理论值(%)	测定值/理论值(%)
N	10.80	10.68	101.1
C	55.43	55.94	100.9
H	9.92	9.99	99.3

以 UR-10 红外分光光度计测定吸收光谱, 结果是成品的红外吸收光谱与标准 L-异白氨酸图谱相同。

成品的旋光性:  $[\alpha]_D^{20} = +40.3$  (C=1, 5N HCl), 与 L-异白氨酸的旋光度相同<sup>[16]</sup>。

以上鉴定结果说明, AS 1.299 菌以  $\alpha$ -溴丁酸为原料发酵生产得到的产品确系 L-异白氨酸。

## 讨 论

溴丁酸的酸性较强, 若预先不中和处理, 将对培养基的 pH 影响较大, 从而抑制菌体生长并降低产量。实验中以氨水加热分解溴丁酸。据所加氨水数量及层析鉴定的结果推测, 溴丁酸大部份转变为  $\alpha$ -羟基

丁酸铵和  $\alpha$ -氨基丁酸铵。松岛宏亲<sup>[6]</sup>等的实验表明, 溴丁酸加碱分解后, 溴大部份成为离子状态, 并报告了水解 30 分钟后, 溴丁酸有 45% 转化为其他物质。因此, 溴丁酸加氨分解后, 实际上可能是以  $\alpha$ -羟基丁酸或  $\alpha$ -氨基丁酸形式被微生物转化为异白氨酸的, 这些前体也许首先变成  $\alpha$ -酮丁酸后进一步转变为异白氨酸。

由于溴丁酸经加氨水解处理, 所以培养基中溴丁酸增加时所含氮量也增加。与此相应, 培养基中的尿素量便要减少, 否则在发酵过程中 pH 偏碱。同理, 溴丁酸的水解彻底与否及水解后是否很好地中和, 也是实验稳定性的关键。

松岛<sup>[6-8]</sup>等利用桃红短杆菌(*Brevibacterium roseum* ATCC 13825) 以  $\alpha$ -溴丁酸为原料发酵生产 L-异白氨酸, 产量达 16.5 克/升; 我们利用北京棒状杆菌 AS 1.299, 产 L-异白氨酸达 23.9 克/升。这表明用工业粗品  $\alpha$ -溴丁酸为原料发酵 L-异白氨酸是可行的。

## 参 考 资 料

- [1] アミノ酸, 核酸集談会編: アミノ酸发酵, 169—180, 共立出版, 1972。
- [2] 和田: 农化, 48: 359—366, 1974。
- [3] 间濑, 松岛, 根岸: 特許公报, 昭 47—41039。
- [4] 渡边, 佐藤, 木下, 中山: 特許公报, 昭 47—38995。
- [5] 中山, 荻野: 特許公报, 昭 47—33155。
- [6] 松岛, 间濑: 醸工志 51: 443—451, 1973。
- [7] 松岛, 村田, 间濑: 醸工志, 51: 775—782, 1973。
- [8] 松岛, 村田, 间濑: 醸工志, 52: 20—27, 1974。
- [9] Kisumi, M. et al.: J. Bact., 110: 761—763, 1972。
- [10] Shiio, I. et al.: Agr. Biol. Chem., 37: 2053—2061, 1973。
- [11] 陈琦等: 微生物学报, 13: 1—6, 1973。
- [12] 陈琦等: 微生物学报, 15(2): 119—124, 1975。
- [13] 潘家秀等: 蛋白质化学研究技术, 27—28, 79—81 页, 科学出版社, 1973。
- [14] Pesse, T. et al.: J. Bact., 59: 485, 1950。
- [15] 赤堀四郎等: 蛋白质化学, 1, 112 页, 共立出版, 1954。
- [16] 中国科学院数学研究所概率统计室编: 常用数理统计表, 52 页, 科学出版社, 1974。

## STUDIES ON THE FERMENTATION OF L-ISOLEUCINE

### I. SELECTION OF A BACTERIUM STRAIN UTILIZING $\alpha$ -BROMOBUTYRIC ACID AS A PRECURSOR AND ITS CULTURAL CONDITIONS

TANG REN-TIAN, GUO YONG-FU, CHEN QI

(*Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing*)

Screening of L-isoleucine producing strains from 26 strains producing glutamic acid was carried out with media containing DL- $\alpha$ -bromobutyric acid (BA) as a precursor of L-isoleucine. Most strains screened are capable of producing L-isoleucine from BA., and the best one is *Corynebacterium pekinense* AS 1.299.

Influence of various conditions on accumulation of L-isoleucine was investigated. Under suitable conditions, strain AS 1.299 produced 23.9 mg/ml L-isoleucine, the rate of conversion of BA to L-isoleucine was around 74%.

The fermentation product isolated and purified from the culture broth has been identified as L-isoleucine.