

色氨酸发酵的初步研究

李玲阁 唐任天 傅妙福

莫凌 张素鑫 陈琦

(中国科学院微生物研究所, 北京)

我们从271株酵母菌中,选出一株可利用邻氨基苯甲酸为前体产生色氨酸的优良菌株——阿保利假丝酵母(*Candida arborea* AS 2.566)。

对该菌的发酵条件进行了初步研究,发现通气量、邻氨基苯甲酸浓度等与色氨酸产量有密切关系。采用乙醇-邻氨基苯甲酸混合分次追加的方式,可提高色氨酸的产量。用30升发酵罐试验,色氨酸产量达5克/升以上。

色氨酸为必需氨基酸之一。目前已知利用微生物发酵法产生色氨酸的途径有三:一是利用添加前体物的方法^[1];二是直接发酵法^[2,3];三是酶促转化法^[4]。这些方法各有利弊,可视其具体情况灵活运用。

我们结合我国实际需要,遵照伟大领袖毛主席关于“备战、备荒、为人民”的教导,开展了氨基酸发酵的研究。

本文报告色氨酸发酵菌种的筛选以及发酵条件的初步研究结果。

产色氨酸菌株的筛选

一、菌种来源

由我所保藏组提供的已定名的及新分离到尚未鉴定的酵母菌共271株,保存于麦芽汁琼脂斜面培养基上。

二、筛选培养基成份(%)

葡萄糖 6.0, 尿素 0.3, 硫酸铵 0.8, 磷酸氢二钾 0.1, 硫酸镁 0.05, 酵母膏 0.3, 邻氨基苯甲酸 0.1, pH 6.0, 碳酸钙 1.0(调pH后加入), 自来水配制。分装200毫升三角

瓶,每瓶25毫升,8磅30分钟灭菌备用。

三、筛选方法

将在麦芽汁琼脂斜面上生长好的待试菌株,挑取1—2环接入三角瓶中,在旋转式摇床上(偏心2.5厘米,转数220次/分),于30℃振荡培养96小时,分析产物。

四、色氨酸的鉴别和定量^[5]

取发酵液5微升点在层析滤纸上,待干。用对二甲基胺基苯甲醛溶液显色,呈现蓝紫色者,即初步判断为色氨酸。然后进一步用纸层折、纸电泳或二者并用加以确认。

定量利用比色法。在口径大小一致的试管中,加入18N H₂SO₄溶液2.5毫升及溶在2N H₂SO₄中的3%对二甲基胺基苯甲醛溶液0.5毫升,摇匀;取过滤后的发酵液0.02—0.05毫升(随发酵液中色氨酸含量而定)加到试管中,摇匀;放置1小时后,再加入2%亚硝酸钠溶液一滴,摇匀;30分钟

本文于1974年12月9日收到。

后,于 72 型分光光度计上,波长 600 毫微米,光程 1 厘米进行比色。按标准曲线计算发酵液中色氨酸含量。

五、结 果

对 271 株酵母菌进行了初筛,发现 AS 2.566 酵母菌色氨酸产量最高,达 900 毫克/升。其它产量较高的菌株是:AS 2.297、AS 2.299、AS 2.340、AS 2.879、AS 2.590、AS 2.878、AS 2.625 和 AS 2.622、其色氨酸产量分别是:600、500、412、400、322、320、289 和 238 毫克/升。

从纸层析结果来看,发酵产物颇为复杂,除色氨酸为主外,尚有一些其它未知物,推测可能是一些中间代谢产物。

对 AS 2.566 菌进行了分类鉴定,确定为阿保利假丝酵母 (*Candida arborea*)*。以后的试验均采用此菌进行。

发酵条件对色氨酸产量的影响

一、通气量对色氨酸产量的影响

溶解氧对色氨酸发酵有密切关系,而溶解氧的最适量又因底物不同而异。为简化起见,我们用不同大小三角瓶,分别装入不同量的培养基以变动其通风量。探讨其与色氨酸产量的关系,结果如表 1。

从表中可以看出:通风量的大小影响色氨酸产量。200 毫升三角瓶装 30 毫升培养基,或 500 毫升三角瓶装 50 毫升培养基色氨酸产量较高。

二、不同氮源与色氨酸产量的关系

对 6 种不同氮源进行了试验,可以看出铵基氮优于硝基氮,其中以硫酸铵最好,尿素次之,硝酸钠最差(表 2)。

表 1 通风量与色氨酸产量的关系

| 培养基装量 (毫升) | 发酵终 pH | 菌体生长量 (光密度) | 色氨酸产量 (克/升) |
|---------------|-----------|----------------|----------------|
| 200 毫升 三角瓶 | 15 | 7.7 | 1.75 |
| | 20 | 7.5 | 1.80 |
| | 30 | 7.2 | 1.75 |
| | 40 | 7.0 | 1.80 |
| | 50 | 6.4 | 1.70 |
| 500 毫升 三角瓶 | 20 | 8.0 | 1.80 |
| | 30 | 7.5 | 1.75 |
| | 40 | 7.7 | 1.70 |
| | 50 | 7.5 | 1.75 |
| | 60 | 8.0 | 1.75 |

培养基组成(%):葡萄糖 10.0,硫酸铵 2.0, K_2HPO_4 0.1, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.04, 玉米浆 1.5, 邻氨基苯甲酸 0.1, 自来水, pH 7.0, 碳酸钙 2.0。

培养条件:往复式摇床, 30℃ 下, 96 小时。

表 2 不同氮源与色氨酸产量的关系

| 氮 源 | 用 量* (克/升) | 发酵终 pH | 菌体生长量 (光密度) | 色氨酸产量 (克/升) |
|-------|---------------|-----------|----------------|----------------|
| 尿 素 | 4 | 7.5 | 1.60 | 1.00 |
| 硫 酸 铵 | 9.2 | 7.2 | 1.70 | 1.30 |
| 硝 酸 铵 | 5.3 | 6.4 | 1.80 | 0.50 |
| 磷酸氢二铵 | 8.8 | 6.4 | 1.70 | 0.70 |
| 氯化 铵 | 7.4 | 6.7 | 1.07 | 0.40 |
| 硝 酸 钠 | 11.2 | 6.4 | 1.40 | 0.30 |

基础培养基(%): 葡萄糖 10.0, K_2HPO_4 0.1, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05, 玉米浆 1.5, 邻氨基苯甲酸 0.1, 自来水, pH 6.8, $CaCO_3$ 2.0。200 毫升三角瓶装 25 毫升。

* 将不同氮源折算成氮含量后近似于 1.9 克/升。

三、邻氨基苯甲酸浓度与色氨酸产量的关系

邻氨基苯甲酸的浓度直接关系到色氨酸产量的高低。从表 3 中看出:在一定范围内,邻氨基苯甲酸用量增加,色氨酸的产量也增加,超过这一范围则显著地抑制菌体的生长,伴之而来的是色氨酸产量大幅度下降。

* 鉴定工作由谭蓓英、方心芳二同志完成,特此致谢。

表 3 邻氨基苯甲酸浓度和色氨酸产量的关系

| 邻氨基苯甲酸量 (%) | 发酵终 pH | 菌体生长量 (光密度) | 色氨酸产量 (克/升) |
|----------------|-----------|----------------|----------------|
| 0.03 | 6.7 | 1.500 | 1.20 |
| 0.10 | 6.4 | 1.500 | 1.50 |
| 0.15 | 6.7 | 1.500 | 1.90 |
| 0.20 | 6.7 | 1.500 | 2.40 |
| 0.30 | 7.2 | 0.870 | 0.58 |

基础培养基组成 (%): 葡萄糖 10.0, (NH₄)₂SO₄ 2.0, K₂HPO₄ 0.1, MgSO₄·7 H₂O 0.04, 玉米浆 1.5, 自来水, pH 6.8, CaCO₃ 2.0. 200 毫升三角瓶分装 25 毫升培养基, 8 磅 30 分钟灭菌。

以前的试验均采用试剂级邻氨基苯甲酸作原料,但成本昂贵,不易大量供应。因此,尝试用工业品代替。试验表明不同来源的工业品邻氨基苯甲酸对菌体生长和色氨酸产量效果不稳定,经重结晶处理可得到较好结果,其中是什么因子在起作用,尚不清楚。

四、分次追加邻氨基苯甲酸与色氨酸产量的关系

表 3 的结果说明两点:一是邻氨基苯甲酸是形成色氨酸的前体,在一定范围内几乎是定量的关系;二是当邻氨基苯甲酸超过一定范围时具有抑制菌体生长的作用。基于这种情况,我们推想采用分次补加邻氨基苯甲酸的方式可以提高色氨酸的产量,表 4 的结果证实了这种设想。

表 4 分次追加邻氨基苯甲酸对色氨酸产量的影响

| 处 理 | 发 酵 终 pH | 色氨酸产量 (克/升) |
|--------|-------------|----------------|
| 对 照 | 7.2 | 2.5 |
| | 7.2 | 2.3 |
| 分两次追加* | 6.4 | 3.8 |
| | 6.4 | 4.4 |

发酵培养基组成 (%): 葡萄糖 10.0, (NH₄)₂SO₄ 2.0, K₂HPO₄ 0.15, MgSO₄·7 H₂O 0.05, 玉米浆 3.0, 邻氨基苯甲酸 0.25, CaCO₃ 2.0。
* 分别在发酵后 53、77 小时追加。

采用分次加入邻氨基苯甲酸的方式,既避免了对菌体生长的抑制,又显著地提高了色氨酸的产量。

五、磷酸氢二钾用量对色氨酸产量的影响

试验中发现发酵 48 小时后葡萄糖已消耗完毕,当时认为糖的消耗速度可能与磷酸盐用量有关。但实验证明降低磷酸盐的用量色氨酸产量也下降(表 5),同时从色氨酸产量的时间曲线来看,在 48 小时前色氨酸产量是很少的,48 小时后才直线上升。这表明菌体生长和产物积累是“异步”的,这种变化规律有待深入研究。

表 5 K₂HPO₄ 量和色氨酸产量的关系

| K ₂ HPO ₄ (%) | 发 酵 终 pH | 色氨酸产量 (克/升) |
|--|-------------|----------------|
| 0 | 6.7 | 1.10 |
| 0.02 | 6.5 | 1.40 |
| 0.05 | 6.5 | 1.98 |
| 0.10 | 6.5 | 2.40 |

基础培养基组成 (%): 葡萄糖 10.0, (NH₄)₂SO₄ 2.0, MgSO₄·7 H₂O 0.05, 邻氨基苯甲酸 0.2, 玉米浆 3.0, CaCO₃ 2.0。

六、玉米浆代用品的选择

我们从生产角度出发,对一些可能代替玉米浆的原料进行了试验。从表 6 可以看出花生饼粉、米糠浸液以及蔗糖糖蜜具有类似玉米浆的作用。

表 6 玉米浆代用品与色氨酸产量的关系

| 供 试 物 质 (%) | 发 酵 终 pH | 色氨酸产量 (克/升) |
|----------------|-------------|----------------|
| 玉 米 浆 3.0 | 6.2 | 2.80 |
| 花生饼粉 1.0 | 5.6 | 2.46 |
| 米 糠 液 1.0 | 4.9 | 2.20 |
| 蔗糖糖蜜 1.0 | 5.9 | 2.80 |

基础培养基组成同表 4。

七、采用乙醇-邻氨基苯甲酸混合分次追加对色氨酸产量的影响

阿保利假丝酵母 AS 2.566 可同化乙醇。照井等^[6]报告在色氨酸发酵中流加乙醇或甘油可提高色氨酸产量。本实验指出,分次追加邻氨基苯甲酸亦可提高产量。把这两个措施配合运用获得了较好的效果,色氨酸产量从 2.4 克/升一跃而上升到 6 克/升的水平(表 7)。

表 7 乙醇-邻氨基苯甲酸混合分次流加的效果

| 追加时间(时) | 流 加 量 (%) | 发酵终 pH | 色氨酸产量* (克/升) |
|---------|--------------------|--------|--------------|
| | | 6.4 | 2.6 |
| 48, 72 | 乙醇 4 邻氨基苯甲酸 0.2 | 7.0 | 2.4 |
| 60, 72 | ” | 5.8 | 5.7 |
| 60, 84 | ” | 6.0 | 6.1 |
| 72, 96 | ” | 6.2 | 3.8 |

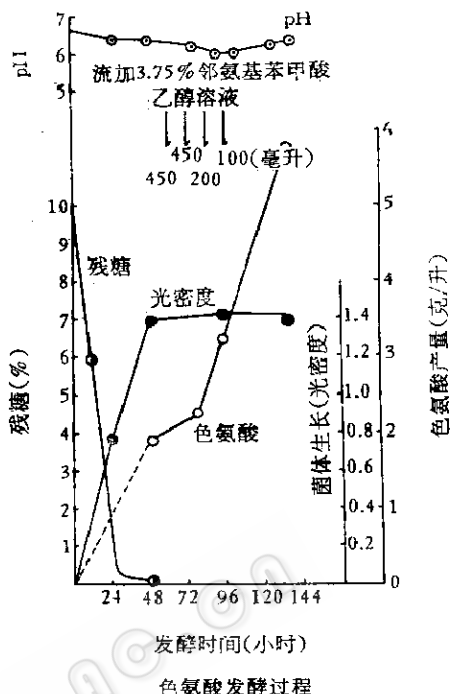
发酵培养基组成同表 5。

* 发酵 120 小时后测定结果。

采用乙醇-邻氨基苯甲酸混合流加方式,其加入时间和加入量是个关键问题,有深入研究的必要。同时从理论方面加以探讨也颇有意义,可用以指导实践。

八、扩大发酵试验

根据摇瓶试验得到的适宜发酵条件,进一步在 30 升发酵罐上进行试验,结果见下图。发酵 144 小时后色氨酸产量达 5 克/升以上。试验表明:菌体的生长和糖的消耗呈对应关系,在 48 小时前糖已耗尽,菌体生长达最大,分次加入底物伴之而出现



种子培养基组成 (%): 葡萄糖 5.0, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5, K_2HPO_4 0.1, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05, 玉米浆 1.0, CaCO_3 1.5, pH 6.8。发酵培养基组成 (%): 葡萄糖 11.0, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.0, K_2HPO_4 0.15; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05, 玉米浆 3.0, 邻氨基苯甲酸 0.25, CaCO_3 2.0, pH 6.8。30 升罐定容 15 升, 115℃ 灭菌 15 分钟。接种量 3%, 培养温度 $30 \pm 1^\circ\text{C}$ 。搅拌转速 240 转/分, 风量 1:0.5 (V/V)。

的是色氨酸的急速上升。这一特点说明了流加底物邻氨基苯甲酸可提高产量的原因。

参 考 资 料

- [1] 照井尧造: アミノ酸发酵(下), 259—274, 共立出版株式会社, 1972。
- [2] Shio, I. et al.: *Agr. Biol. Chem.*, **36**: 2315, 1972。
- [3] Shio, I. et al.: *ibid.*, **37**:1991, 1973。
- [4] 山田秀明ウ: 发协志, **32**: 34, 1974。
- [5] Spies, J. et al.: *Anal. Chem.*, **20**:30, 1948。
- [6] Terui, G. et al.: *J. Ferment. Technol.*, **47**:194, 1969。

PRELIMINARY STUDIES ON FERMENTATIVE PRODUCTION OF TRYPTOPHAN

LI LING-GE, TANG REN-TIAN, FU MIAO-FU, MO LING,
ZHANG SU-ZHEN AND CHEN QI

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

A strain of *Candida* capable of producing tryptophan from anthranilic acid was selected out from 271 strains of yeasts. It was identified as *Candida arborea* (AS 2.566).

Fermentation conditions for producing tryptophan were investigated. It was found that the yield of tryptophan

was varied with the rate of aeration and the concentration of anthranilic acid etc. The yield of tryptophan was raised by using batch feeding of alcohol-anthranilic acid mixture. More than 5 g/l of tryptophan was produced in a 30 liter fermenter.