

L-苏氨酸发酵条件的研究及发酵产物的鉴定

黄和容 王秀岭 李玲阁 李志明 陈琦

(中国科学院微生物研究所, 北京)

采用逐步诱变处理与单菌落分离相结合, 选育出一株产 L-苏氨酸量较多的突变株 *C. crenatum* m-85 (AHV^r, Met⁻)。试验证明, 生物素与蛋氨酸为其亲株 d20-23 生长必需因子, 同时蛋氨酸又是积累 L-苏氨酸的促进因子, 硫胺素是生长和积累苏氨酸的促进因子。当生物素、蛋氨酸、硫胺素相配合, 菌株产酸能力得以充分显示出来。通气量是 L-苏氨酸发酵外部控制的主要条件。L-苏氨酸积累需气量较大。在合适的培养条件下, 该菌可在发酵液中积累 L-苏氨酸达 13.4g/l。发酵产物的结晶经旋光测定, 红外光谱分析, 纸上层析及生物鉴定证明是 L-苏氨酸。

前报^[1]介绍了以钝齿棒杆菌 (*C. crenatum*) AS 1.542 经逐步连续诱变, 获得了抗 α -氨基- β -羟基戊酸 (AHV^r) 及蛋氨酸缺陷型 (Met⁻) 的双重突变株 m-85 (AHV^r, Met⁻), 解除了原始菌株固有的代谢调节作用, 可在发酵液内积累相当量的 L-苏氨酸。现将产 L-苏氨酸突变株发酵条件的研究和产物鉴定报道如下。

材料与方 法

(一) 供试菌株: L-苏氨酸产生菌: *C. crenatum* d20-23 (AHV^r, Met⁻)、*C. crenatum* m-85 (AHV^r, Met⁻)。

L-苏氨酸检测指示菌: *C. pekinense* A891 (Thr⁻)。

(二) 培养基: 发酵培养基见实验结果部分。生物鉴定用的培养基如前报^[1]。种子培养基组成 (%): 葡萄糖 2.0, (NH₄)₂SO₄ 0.4, KH₂PO₄ 0.1, MgSO₄ · 7H₂O 0.04, 玉米浆 0.8, 豆饼水解液 0.3, CaCO₃ 0.3, pH7.0。

(三) 发酵试验: 接种后置迴转式摇床 (190 rpm, 偏心 2.5cm) 28—30℃ 振荡培养。

(四) L-苏氨酸定量: 同前报, 采用纸层析分离, 比色定量。

结果与讨论

(一) 蛋氨酸对 m-85 (AHV^r, Met⁻) 菌株发酵 L-苏氨酸的影响: 结果如图 1。

试验结果表明, 蛋氨酸是 m-85 菌株的生长因子和产酸调节因子。缺乏, 菌株生长受阻碍, 而添加 DL-蛋氨酸浓度在 50—100 μ g/ml, 对 L-苏氨酸积累有利, 低于 50 μ g/ml 或高达 150 μ g/ml, 均对 L-苏氨酸发酵不利。这种不利影响可能由于过量的蛋氨酸对高丝氨酸脱氢酶及高丝氨酸激酶的阻遏, 使苏氨酸合成代谢受阻。

(二) 各种氨基酸对 m-85 菌株产 L-苏氨酸的影响: 各种氨基酸对 m-85 菌株产 L-苏氨酸的影响见表 1。

结果表明, 高丝氨酸对苏氨酸积累是有利的, 早期苏氨酸发酵就是采用添加高丝氨酸为前体物进行发酵的^[2]。本试验除蛋氨酸和白氨酸显示不利影响外, 其他各种氨基酸对 m-85 菌株生长和产酸均无甚影响。菌株产酸水平平均达 1% 左右。

究竟白氨酸如何起不利影响, 为此考

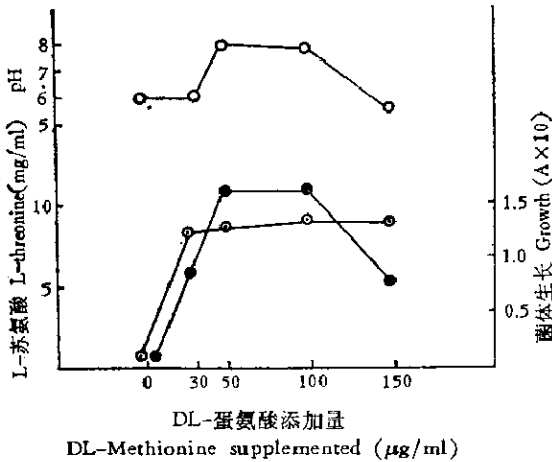


图1 蛋氨酸对 m-85 菌株发酵 L-苏氨酸的影响
Fig. 1 Effect of methionine on the L-threonine fermentation

○—○ L-苏氨酸
●—● 菌体生长
○—○ pH

基础培养基组成(%)：葡萄糖 8.0, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.0, KH_2PO_4 0.15, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.04, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.001, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.001, 生物素 5μg, 硫胺素·HCl 20μg, CaCO_3 2.0, pH 7.2, 装液量 10ml/250ml 三角瓶。30℃ 振荡培养 72 小时。

Basal composition (%): glucose 8.0, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.0, KH_2PO_4 0.15, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.04, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.001, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.001, biotin 5μg, thiamine·HCl 20μg, CaCO_3 2.0, pH 7.2. 10ml of medium distributed in 250ml flask, shaken at 30℃ for 72h.

察不同浓度白氨酸与 m-85 菌株产酸的关系,结果如图 2。试验表明,白氨酸浓度达 500μg/ml,不利于菌体生长,也影响产酸。而浓度在 50—250μg/ml 之间,无论对生长或产酸均无影响, L-苏氨酸产量同样达 1%。表 1 出现白氨酸的不利影响,主要由于所给的浓度过高的缘故。在微生物氨基酸合成代谢上,白氨酸过量会阻遏赖氨酸的合成^[3],因此影响菌体生长导致 L-苏氨酸生成量下降。这种解释是否合适,有待进一步试验证实。

表 1 出现蛋氨酸对 m-85 菌株产酸的不利影响,由图 1 结果已表明主要由于蛋氨酸过量所致。

(三) 各种生长因子对 L-苏氨酸产生菌生长及产酸的影响: 考察了生物素、硫

胺素、蛋氨酸等生长因子对 L-苏氨酸产生菌的影响,结果列于表 2。

结果表明,突变株 d20-23 仍保持出发亲株 AS1.542 的某种遗传特性,即生物素为其生长必需的主要因子^[4]。缺乏,菌体生长受到严重阻碍。但单独添加生物素(50μg/l),菌体生长与产酸呈现波动,出现过生长很差的情况,说明除生物素外尚需其他生长因子的配合。d20-23 菌株是蛋氨酸缺陷型。蛋氨酸同样是该菌生长必需因子,单一使用蛋氨酸,菌体也难生长,只有与生物素配伍,才发挥其作用。试验结果还说明硫胺素对生长和产酸仅起促进而

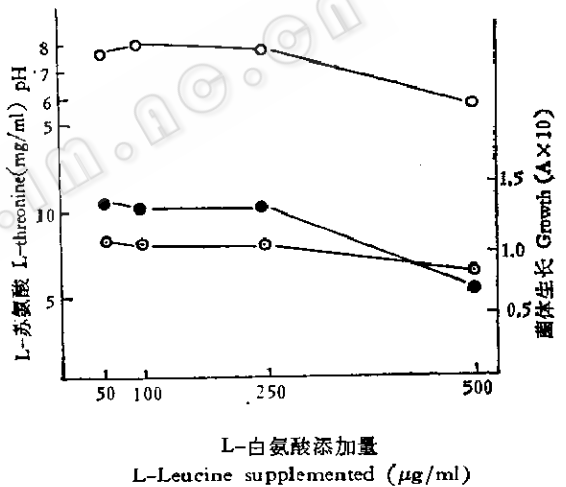


图2 不同浓度白氨酸对 m-85 菌体产 L-苏氨酸的影响

Fig. 2 Effect of L-leucine on the L-threonine production

○—○ L-苏氨酸
●—● 菌体生长
○—○ pH

基础培养基组成及培养条件与图 1 相同。
Basal composition of medium and cultural conditions were the same as in Fig. 1.

非必需生长因子,如与生物素、蛋氨酸相配合,其促进作用尤为明显。

(四) 通气条件对 L-苏氨酸发酵的影响: 以 d20-23 菌株进行 L-苏氨酸发酵试验,观察到 L-苏氨酸积累需要较大通气

表 1 各种氨基酸对 m-85 菌株产 L-苏氨酸的影响

Table 1 Effect of Various Amino Acids on the L-Threonine Production with strain m-85

| 氨基酸 Amino acids | 发酵液 pH pH of cultural broth | 生长吸光度 Growth(A)(×10) | L-苏氨酸生成 L-Threonine (mg/ml) |
|---|--------------------------------|-------------------------|--------------------------------|
| 丙氨酸 Alanine | 7.6 | 1.13 | 9.9 |
| 精氨酸 Arginine | 7.6 | 1.08 | 10.2 |
| 天冬氨酸 Aspartic acid | 7.6 | 1.09 | 9.8 |
| 胱氨酸 Cystine | 7.6 | 1.12 | 10.2 |
| 半胱氨酸 Cysteine | 7.5 | 1.12 | 9.7 |
| 谷氨酸 Glutamic acid | 7.5 | 1.00 | 10.8 |
| 高丝氨酸 Homoserine | 7.5 | 1.08 | 11.4 |
| 异白氨酸 Isoleucine | 7.5 | 1.11 | 10.8 |
| 甘氨酸 Glycine | 7.5 | 1.10 | 10.3 |
| 白氨酸 Leucine | 5.5 | 0.95 | 6.4 |
| 赖氨酸 Lysine | 7.5 | 1.05 | 10.8 |
| 苯丙氨酸 Phenylalanine | 7.5 | 1.09 | 10.7 |
| 蛋氨酸 Methionine | 7.5 | 1.12 | 7.6 |
| 脯氨酸 Proline | 7.5 | 1.06 | 10.2 |
| 组氨酸 Histidine | 7.5 | 1.06 | 9.0 |
| 苏氨酸 Threonine | 7.5 | 1.07 | 9.9 |
| 色氨酸 Tryptophane | 7.5 | 1.06 | 10.2 |
| 酪氨酸 Tyrosine | 7.5 | 1.08 | 10.1 |
| 缬氨酸 Valine | 7.5 | 1.10 | 9.8 |
| DL-蛋氨酸 50μg/ml (对照组) DL-Methionine 50μg/ml | 7.5 | 1.18 | 11.0 |

基础培养基组成及培养条件同图 1。同时加 DL-蛋氨酸 50μg/ml, 各种氨基酸添加量为 L-氨基酸 500μg/ml。
The basal composition and cultural conditions were the same as in Fig. 1. And supplemented with DL-methionine 50μg/ml, 500μg/ml of various L-amino acids.

量。对 m-85 菌株发酵试验采用 5000ml 三角瓶,分装不同量的发酵培养基,考察通气条件的影响。结果如表 3。

以 m-85 菌株进行试验结果再次表明,微生物积累苏氨酸需要较大的通气量。由于通气量不足,代谢出现“转换现象”,随着通气量降低,主产物 L-苏氨酸产量减少而副产物赖氨酸、谷氨酸增加。低通气量也不利于前体物——高丝氨酸向苏氨酸转化,故有较多量的高丝氨酸积累于发酵液中。控制通气量是 L-苏氨酸发酵的重要条件,因而进一步考察合适的通气量,结果如图 3 所示。

结果说明,虽然 L-苏氨酸积累需要较大通气量,并非越大越好。5000ml 三角

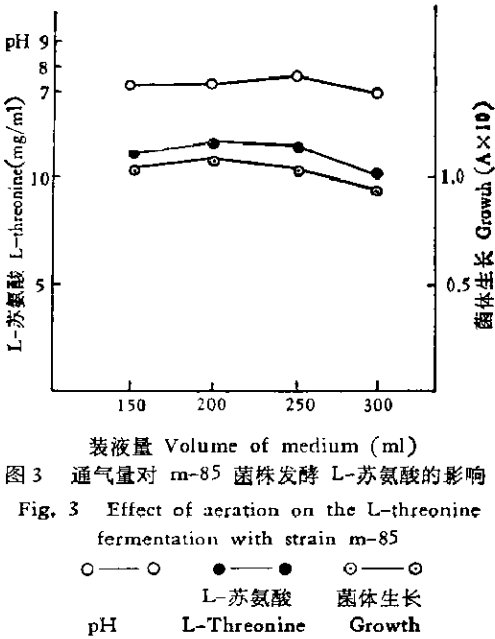


表 2 各种生长因子对 L-苏氨酸产生菌 d20-23 生长与产 L-苏氨酸的影响
Table 2 Effect of Various Growth Factors on the Growth and L-Threonine Production of L-Threonine Producer d20-23

| 生长因子 Growth factors | 发酵液 pH pH of cultural broth | 生长吸光度 Growth(A×10) | L-苏氨酸生成 L-Threonine (mg/ml) |
|--|--------------------------------|-----------------------|--------------------------------|
| 未添加(基础) Basal | 6.2 | 0.015 | — |
| DL-蛋氨酸 DL-Methionine | 6.3 | 0.025 | — |
| 生物素 Biotin | 6.1 | 0.71, 0.18 | 0.5, — |
| 硫胺素 Thiamine·HCl | 6.2 | 0.04 | — |
| DL-蛋氨酸 硫胺素 DL-Methionine, Thiamine·HCl | 6.5 | 0.025 | — |
| DL-蛋氨酸 生物素 DL-Methionine, Biotin | 8.0 | 1.00 | 6.0 |
| 硫胺素 生物素 Thiamine·HCl, Biotin | 6.0 | 0.76 | 2.6 |
| 生物素、硫胺素、蛋氨酸 Biotin, Thiamine·HCl DL-Methionine (对照组) | 8.3 | 0.98 | 8.6 |

Basal composition(%): Glucose:8.0, (NH₄)₂SO₄:2.0, KH₂PO₄:0.15, MgSO₄·7H₂O:0.04, MnSO₄·4H₂O:0.001, FeSO₄·7H₂O:0.001, CaCO₃:2.0, pH7.2. DL-methionine 100μg/ml, biotin 50μg/l, thiamine. HCl 100μg/l, volume of inoculum: 2%, shaken at 28°—30°C for 72h.

表 3 不同通气量对 m-85 菌株产 L-苏氨酸的影响
Table 3 Effect of Aeration on the L-Threonine Production with Strain m-85

| 装液量 Volume of medium (ml) | 发酵液 pH pH of cultural broth | 生 长 Growth (A×10) | L-苏氨酸生成 L-Threonine | 副产的其他氨基酸 Other amino acids |
|------------------------------|--------------------------------|----------------------|------------------------|--|
| 200 | 8.0 | 1.05 | 11.3 | 少量 Small amount |
| 500 | 5.5 | 0.72 | 4.7 | 高丝氨酸 Homoserine+ |
| 800 | 5.5 | 0.50 | 4.7 | 高丝氨酸 Homoserine++ 赖氨酸 Lysine+ 谷氨酸 Glutamic acid+ |

培养基与培养条件同表 2 对照组
Medium and cultural conditions were the same as in table 2 control.
±3mg/ml ±8mg/ml

瓶,装液量在 200—250ml 为宜。低于 200ml,产酸也出现下降趋势。超过 300 ml,对生长与产酸均不利。

(五) 综合考察各种营养因素对 L-苏氨酸发酵的影响: 在以 d20-23 菌株进行 L-苏氨酸发酵时,发现高丝氨酸还是比较多,若添加少量醋酸铵进行发酵,高丝氨

酸明显减少,但尚有一定的赖氨酸积累。采用正交试验^[5]综合考察葡萄糖、硫酸铵、醋酸铵、硫胺素及蛋氨酸等主要营养因素对比对 m-85 菌株 L-苏氨酸发酵的影响,找出适宜的发酵培养基组成。

图 4 结果表明,葡萄糖浓度对产酸影响显著,是诸因素中第一位,产酸随糖浓度

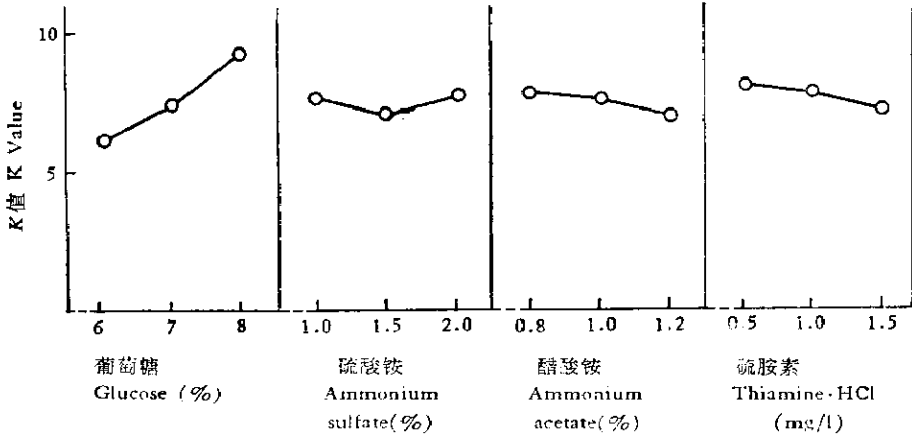


图 4 不同浓度的葡萄糖、硫酸铵、醋酸铵及硫胺素按正交试验 $L_9(3^4)$ 综合考察对 L-苏氨酸发酵的影响

Fig. 4 Effect of different concentrations of glucose, ammonium sulfate, ammonium acetate, and thiamine-HCl on L-threonine fermentation (with orthogonal experiment table $L_9(3^4)$)

基础培养基组成(%): KH_2PO_4 :0.15, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$:0.04, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$:0.001, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$:0.001, 生物素: $50\mu\text{g/l}$, DL-蛋氨酸: 50mg/l ,

CaCO_3 :2.0, pH7.2, 接种量 5%, $28^\circ\sim 30^\circ\text{C}$ 振荡培养 60 小时。

Basal composition(%): KH_2PO_4 : 0.15, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$:0.04, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$:0.001, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$:0.001, biotin: $50\mu\text{g/l}$, DL-methionine: 50mg/l , CaCO_3 : 2.0, pH 7.2, volume of inoculum 5%, shaken at $28^\circ\sim 30^\circ\text{C}$ for 72h.

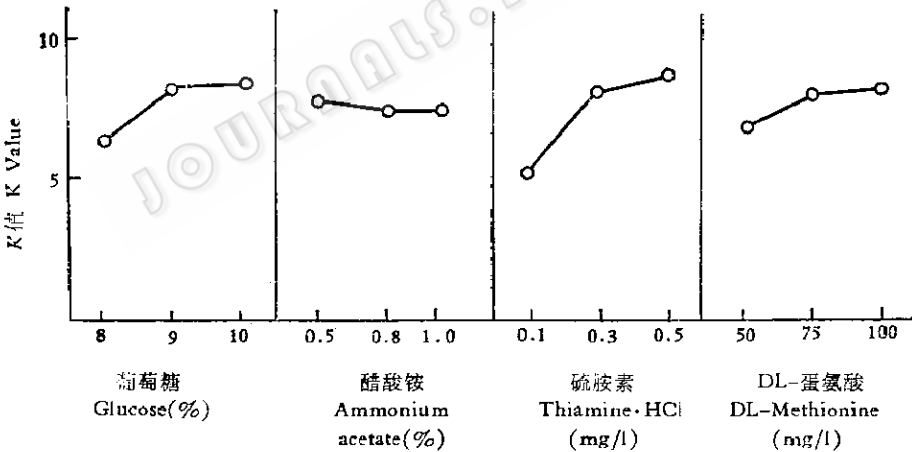


图 5 按正交试验 $L_9(3^4)$ 综合考察葡萄糖、醋酸铵、硫胺素与蛋氨酸对 m-85 菌株发酵 L-苏氨酸的影响

Fig. 5 Effect of different concentrations of glucose, ammonium acetate, thiamine-HCl, and DL-methionine on the L-threonine fermentation (with orthogonal experiment table $L_9(3^4)$)

递增。而其他成份在所提供试验水平范围内影响不太明显。其中硫胺素以 0.5mg/l 较为适宜。进一步提高葡萄糖的浓度, 配合醋酸铵、硫酸素及蛋氨酸再以正交试验综合考察影响, 结果见图 5。

结果表明, 硫胺素浓度低于 0.5mg/l 对产酸不利。产酸水平仍随糖的浓度增加而提高, 以葡萄糖 9—10% 为宜。蛋氨酸用量 75mg/l 合适。醋酸铵影响不明显, $0.5\sim 1.0\%$ 之间无差别。

综合以上正交试验得出较适宜的发酵培养基,其组成(%)如下:

葡萄糖: 10.0, 硫酸铵: 2.0, 醋酸铵: 0.8, KH_2PO_4 : 0.15, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 0.04, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$: 0.001, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 0.001, 生物素: 50 $\mu\text{g/l}$, 硫胺素: 0.5mg/l, DL-蛋氨酸: 75mg/l, CaCO_3 : 2.0, pH7.2—7.4

以上述培养基进行 m-85 菌株 L-苏氨酸发酵试验(6 l 小型发酵罐), L-苏氨酸产酸率为 13.4mg/ml, 如图 6 所示。

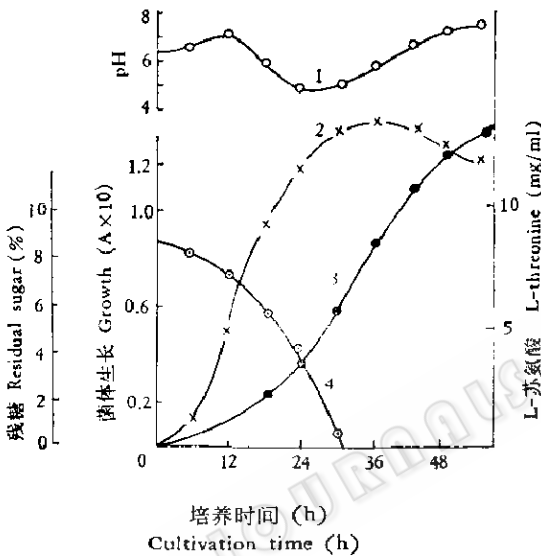


图 6 *C. crenatum* m-85 菌株于 6 l 发酵罐 L-苏氨酸发酵过程

Fig. 6 Time Course of L-Threonine Fermentation with *C. crenatum* m-85 in 6 Liter Fermentor

发酵条件:

Fermentative conditions:

温度 Temperature 30 $^{\circ}\text{C}$

通风量 Aeration 1:1 v/v/min

搅拌转速 Agitation 800 rpm/min

1. pH, 2. 菌体生长 Growth

3. L-苏氨酸 L-threonine

4. 残糖 Residual sugar

(六) L-苏氨酸提取与发酵产物鉴定:

1. L-苏氨酸提取

采用强酸阳离子树脂 (732)H 型进行交换提取,大致流程如下图。

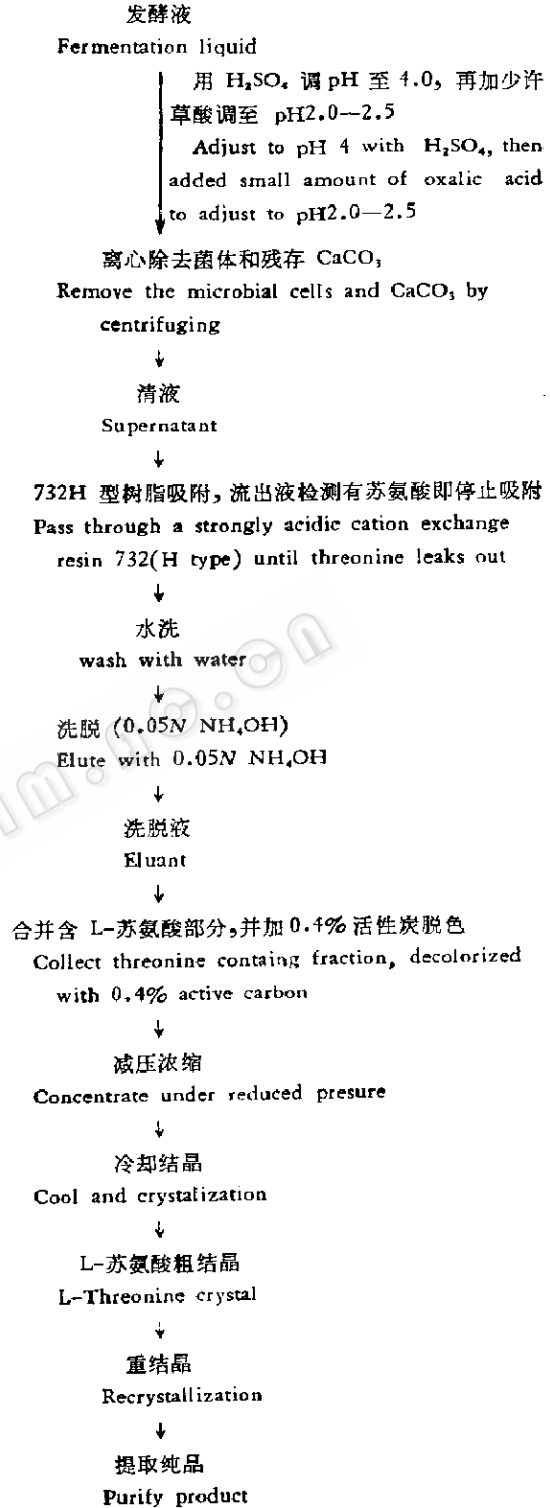


图 7 L-苏氨酸提取流程图

Fig. 7 Scheme of experimental procedure for L-threonine isolation

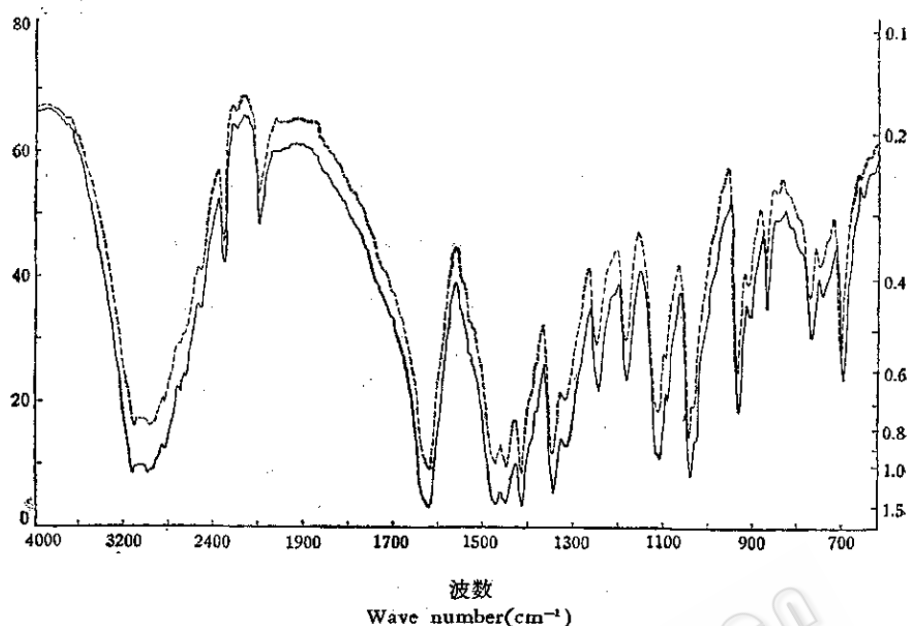


图8 L-苏氨酸红外光谱

Fig. 8 IR spectrum of L-threonine

——L-苏氨酸(味之素公司产品) L-threonine (Ajinomoto Co., Inc.)
 - - - 发酵产物提纯结晶 Purified Fermentative product

该流程是实验室小型提取发酵液中苏氨酸的操作流程,未考察提取收率。

2. 发酵产物的鉴定

(1) 比旋光度测定: 提纯的结晶样品

$[\alpha]_D^{25} = -28.8 (C = 4 \text{ 水})$ 文献值 L-苏氨酸 $[\alpha]_D^{25} = -28.5 (C = 0.5-2 \text{ 水})$ ^[6]

(2) 红外吸收光谱与日本味之素公司产品 L-苏氨酸图谱相符。见图 8。

(3) 纸上层析: 50 μ g 提纯的结晶样品, 层析谱为单一斑点, R_f 值与日本味之素公司产品 L-苏氨酸相同。溶媒系统为正丁醇:醋酸:水 (4:1:1), 见图 9。

(4) 生物鉴定: 以 *C. pekinense* A891 (Thr⁻) 为指示菌, 生长图谱法鉴定, 提纯结晶周围出现 A891 菌株生长谱。

根据以上结果, 确定由发酵液提取出的结晶样品系 L-苏氨酸。

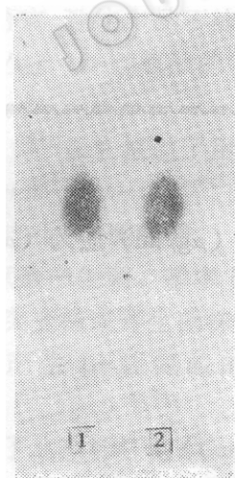


图9 L-苏氨酸纸上层析图谱

Fig. 9 Paper chromatogram of L-threonine

1——L 苏氨酸(日本味之素公司产品)
 L-Threonine (Ajinomoto Co., Inc.)
 2——发酵产物提纯结晶
 Purified fermentative product

参 考 文 献

- [1] 黄和容等: 微生物学报, 22(3): ,1982.
- [2] Hayashibe, M. et al.: *Amino Acids* (Japanese) No. 1, 80, 1959.
- [3] Tosaka, O. et al.: *Agri. Biol. Chem.*, 42(8): 1501, 1978.
- [4] 陈琦、李玲阁: 微生物学报, 15(2): 119, 1975.

[5] 俭济斌:《多因素正交选优法》,科学出版社,北京,1976, pp. 19, 32。

[6] 潘家秀等:《蛋白质化学研究技术》,科学出版社,北京 1962 年, p. 246。

CULTURAL CONDITIONS FOR L-THREONINE FERMENTATION AND IDENTIFICATION OF FERMENTATION PRODUCT

Huang Horung Wang Xiuling Li Linggo
Li Zhiming Chen Qi

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

A L-threonine producing mutant m-85 (AHV⁻, Met⁻) derived from *C. crenatum* AS 1542 was obtained with stepwise mutation and single colony isolation. It was found that biotin and methionine were essential for the growth of its parent, and methionine was also a regulatory factor for its L-threonine accumulation; whereas thiamine·HCl was only a promotive factor for both growth and L-threonine formation. The results indicated that aeration was a major factor for L-threonine fermentation.

In 6 liter fermentor, more than 13 g/l

L-threonine was accumulated in a medium containing 10% glucose, 2% (NH₄)₂SO₄, 0.8 NH₄AC, 0.15 KH₂PO₄, 0.04% MgSO₄·7H₂O, 10 mg/l MnSO₄·4H₂O, 10 mg/l FeSO₄·7H₂O, 50 mg/l biotin, 0.5 mg/l thiamine·HCl, 75 mg/l DL-methionine and 2% CaCO₃, pH 7.2—7.4, under the conditions of aeration 1:1 V/V/min; agitation 800 rpm at 30°C for 60 h.

The purified fermentation product was identified as L-threonine by paper chromatography, specific rotation, infrared absorption spectrum and bioassay.