

## L-脯氨酸发酵研究

方佩静 毛维颖 陈琦

(中国科学院微生物研究所, 北京)

本文报道北京棒状杆菌 (*Corynebacterium pekinense*) AS 1.299 鸟氨酸缺陷型突变株 AS 1.727 发酵产生 L-脯氨酸的研究结果。

培养基中需适量的精氨酸、80—100  $\mu\text{g/l}$  的生物素和高浓度的铵离子。氮源以氯化铵最优, 硫酸铵次之。实验表明氯离子有利于产生 L-脯氨酸, 镁离子也有促进作用。在本实验所使用的培养基中, 30 $^{\circ}\text{C}$  培养 5 天, 产 L-脯氨酸达 25mg/ml 以上。

用生成特殊的、难溶于水的五氯酚-脯氨酸复合物, 结合离子交换法和溶媒抽提法等分离技术, 提取产品。经熔点、元素分析、比旋光度、红外光谱分析及纸上色谱分析, 证明产物确是 L-脯氨酸。

L-脯氨酸主要用于复方氨基酸大输液的配制, 此外它还可用于不对称合成和作为氢化、聚合、水解等反应的催化剂和某些药物合成中的重要原料。由于它具有一种特殊的甜香味, 近年来, 国外食品工业上也已开始应用。以往采用明胶水解法制备 L-脯氨酸, 操作费时、收率低, 且常混杂羟脯氨酸, 不易分离, 致使产品不纯。因此用微生物发酵法生产 L-脯氨酸的研究引起了人们的重视。

Yoshinaga 等<sup>[1]</sup>最先报道了用黄色短杆菌 (*Brevibacterium flavum*) 异白氨酸缺陷型突变株发酵产生 L-脯氨酸。此后报道的一些 L-脯氨酸产生菌, 基本上都是谷氨酸产生菌的突变株或野生菌株<sup>[2-11]</sup>, 非谷氨酸产生菌产生 L-脯氨酸的报道较少<sup>[12]</sup>。

我们研究了北京棒状杆菌 (*Corynebacterium pekinense*) AS1.299 鸟氨酸缺陷型突变株 AS1.727, 发酵产生 L-脯氨酸达 25mg/ml 以上。至今未曾见到产谷氨酸菌的鸟氨酸缺陷型突变株发酵产生 L-脯氨酸达到上述产量的报道。

## 材料与方法

### (一) 菌种

北京棒状杆菌鸟氨酸缺陷型突变株 AS 1.727, 此菌是从 73 株产谷氨酸的野生菌株和突变株中筛选得到的。

### (二) 培养基和培养条件

培养基组成的含量取决于不同实验。详见表 1。摇床转速为 200rpm, 250ml 三角瓶装液 15ml, 30 $^{\circ}\text{C}$  培养 120 小时, 接种量为 10%。

### (三) 分析方法

1. 细胞生长的测定: 一定体积的培养液用盐酸处理, 除去碳酸钙。用蒸馏水稀释到一定倍数, 在 620nm 下用 72 分光光度计测吸光度。

2. L-脯氨酸定性测定: 在新华一号层析纸上点样, 溶剂系统为正丁醇: 醋酸: 水 = 5: 2: 2, 以 1% 吡啶-乙醇-醋酸溶液 (1g 吡啶溶于 100 ml 乙醇及 10ml 冰醋酸中) 作为显色剂, 70 $^{\circ}\text{C}$  显色。

3. L-脯氨酸定量测定: 在 pH 大约为 1.0 时, L-脯氨酸和茚三酮形成一种红色水溶性产

本文于 1980 年 11 月 17 日收到。

本文曾在 1980 年 9 月由中国微生物学会与中国轻工学会召开的全国发酵制品学术交流会上宣读, 这次全文发表对内容作了补充和修改。

表 1 培养基的组成  
Table 1 Components of Culture Media

项 目 Item	筛选(%) Screening		种子(%) Seeds	发酵(%) Fermentation	
	野生菌 Wild type	突变株 Mutants		A	B
葡萄糖 Glucose	20	10	3	15	15
$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$	0.05	0.1	0.15	0.065	0.065
$KH_2PO_4$	0.05		0.05	0.05	0.05
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.05	0.05	0.05	0.05	0.5
$MnSO_4 \cdot H_2O$	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002
生物素 $\mu g/l$ Biotin	40			100	100
硫胺素·HCl $\mu g/l$ Thiamine·HCl	1000			1000	1000
尿 素 Urea			0.25		
玉 米 浆 Corn-steep liquor		1	1		
豆饼水解液* Hydrolysate of soybean cake meal		1	0.5		1
$(NH_4)_2SO_4$		4			1.23
$NH_4Cl$	6				4
碳 酸 钙 $CaCO_3$	5	4		5	5
pH	6.7	6.7	6.5	6.7	6.7

\* 加入量以水解前干重计算。

The amount added is calculated as the dry weight before hydrolysis.

物<sup>[13]</sup>,而大多数其他氨基酸没有明显干扰。从发酵液中直接取适量\*样品,加入 1ml 蒸馏水中,然后加入 1ml 冰醋酸和 1ml 试剂溶液(每 ml 试剂溶液含 0.4ml 6M 磷酸和 0.6ml 冰醋酸,25mg 茚三酮)试剂空白是 1ml 试剂溶液和 1ml 冰醋酸加入 1ml 蒸馏水中。每个比色管的内容物摇匀后,在沸水浴中加热 1 小时,用冰醋酸稀释至体积为 5.0ml。使用 721 分光光度计,在波长 510nm 下,测得吸光度与 L-脯氨酸标准品比较,计算发酵液中 L-脯氨酸的产量。读数在 1 小时内至少是稳定的。

4. 还原糖测定: 3,5-二硝基水杨酸法<sup>[14]</sup>。

## 结 果

### (一) L-脯氨酸发酵条件试验

1. 不同氮源对产 L-脯氨酸的影响:

在以六种铵盐及尿素作为氮源的比较试验中,以 4% 氯化铵中的含氮量为基础,计算其他氮源的添加量。在基础发酵培养基 A 中另外加入 1.2% 的豆饼水解液,水解液中盐酸用氢氧化钠中和。试验结果见表 2。由表 2 可见,氯化铵作为氮源, L-脯氨酸产量最高,其次是硫酸铵。

2. 镁离子对产 L-脯氨酸的影响:在培养基 A 中,加入 4% 氯化铵和 1.2% 豆饼水解液,豆饼水解液用氢氧化钠中和。加入不同量的硫酸镁,测定产 L-脯氨酸量,结果见表 3。

\* 样品量须满足在所用分光光度计读数误差范围内。

表 2 不同氮源对产 L-脯氨酸的影响

Table 2 Effect of Various Nitrogen Sources on L-Proline Production

氮源种类 Nitrogen sources	添加量(%) Supplement	发酵终 pH Ending pH	产 L-脯氨酸 (mg/ml) L-Proline produced
NH <sub>4</sub> Cl	4.0	6.4	15.2
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	4.95	7.5	13.1
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>6</sub>	6.9	7.0	5.9
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	3.0	6.3	3.1
尿素 Urea	2.25	7.4	1.4
NH <sub>4</sub> Ac	5.8	6.4	2.3
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	4.37	5.4	4.8

表 3 镁离子对产 L-脯氨酸的影响

Table 3 Effect of Magnesium Ion on L-Proline Production

MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O(%)	产 L-脯氨酸 (mg/ml) L-Proline produced
0.1	15.4
0.25	16.0
0.5	18.3
1.0	18.1

由表 3 可见,镁离子对产 L-脯氨酸有促进作用,但过多的镁离子作用不明显,以 0.5% 浓度为宜。在高浓度氯离子存在下(部分来自氯化铵,部分来自水解液中盐酸),镁离子有促进生长作用,而在较低浓度镁离子时(0.05% MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O),菌的生长往往不稳定。另外的实验还表明,硫酸镁浓度为 0.5% 以下时,增加锰离子浓度, L-脯氨酸产量并不增加。硫酸锰浓度达 0.2% 时,抑制菌的生长。

3. 通气量对产 L-脯氨酸的影响: 在 250ml 三角瓶中装入不同体积的发酵培养基,观察通气量对产 L-脯氨酸的影响。发酵培养基是在培养基 A 中加入 3.5% 氯化铵和 0.8% 豆饼水解液,后者用氢氧化钠中和。结果见表 4。

由表 4 可见,装液量的减少有利于产 L-脯氨酸。Akashi 等<sup>[27]</sup>也有类似的报道,认为 L-脯氨酸发酵需要氧的充分供应。

表 4 通气量对产 L-脯氨酸的影响

Table 4 Effect of Air Supply on L-Proline Production

培养基装量 (ml) Vol. of medium added	菌量 (A <sub>620</sub> ) Growth	产 L-脯氨酸 (mg/ml) L-Proline produced
15	1.01	15.2
20	0.92	12.9
30	0.89	12.5
40	0.86	10.7
50	0.86	9.0

4. 精氨酸对产 L-脯氨酸的影响: 精氨酸由鸟氨酸转化而来。由于使用的菌株是鸟氨酸缺陷型,因此有必要在培养基中

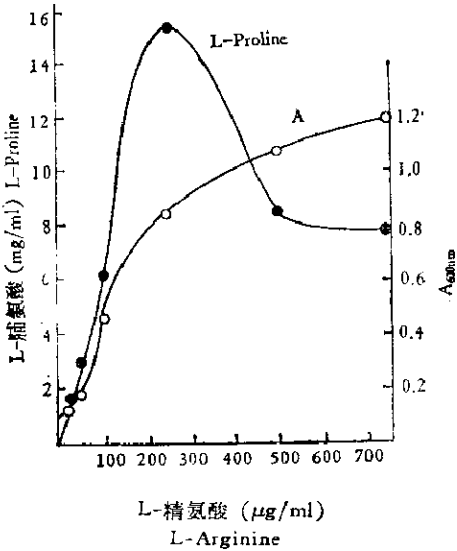


图 1 精氨酸对产 L-脯氨酸的影响  
Fig. 1 Effect of L-arginine on L-proline production

加入一定量的精氨酸维持菌的生长。为了便于定量研究,用精氨酸进行实验。将液体种子用灭菌生理盐水,无菌操作下洗涤三次,恢复原体积后,以 10% 接种量接入发酵培养基。在培养基 A 中,除了加入 4% 氯化铵外,加入不同量的精氨酸。结果见图 1。

从图 1 看出,精氨酸浓度为零时,菌不繁殖。随着精氨酸浓度的增加,虽然发酵液中菌量也相应增加,但 L-脯氨酸量出现一最高峰后逐渐降低。这说明该菌在亚适量的精氨酸下,积累 L-脯氨酸量最高。氯化铵浓度为 4% 时,以添加 250 $\mu$ g/ 精氨酸为宜。

5. 生物素对产 L-脯氨酸的影响: 在培养基 A 中,加入 1% 豆饼水解液。水解液中盐酸用氨水中和。中和后的水解液内含 13% 氯化铵和 10% 豆饼(水解前干重)。每 100ml 培养基中实际加入中和后豆饼水解液量为 10ml。另外每 100ml 培养基中添加 2.7g 氯化铵,以补足 4% 氯化铵浓度。培养基中加入不同量的生物素。结果见表 5。

表 5 生物素对产 L-脯氨酸的影响

Table 5 Effect of Biotin on L-Proline Production

生物素 ( $\mu$ g/l) Biotin	产 L-脯氨酸 (mg/ml) L-Proline produced
60	17.7
80	20.7
100	20.9
120	20.9
150	20.1

从表 5 可见,生物素浓度为 60 $\mu$ g/l 时, L-脯氨酸产量较低; 80—100 $\mu$ g/l 时,产量十分接近; 大于 100 $\mu$ g/l 时,产量未见增加; 所以生物素以 80—100 $\mu$ g/l 为宜。看来丰富的生物素促进胞内谷氨酸的积累,有利于 L-脯氨酸的转化,而 L-脯氨酸被

认为较易透过胞壁<sup>[4]</sup>。

6. 氯化铵和硫酸铵对产 L-脯氨酸的影响: 实验中先将氯化铵和精氨酸结合起来考察。在培养基 A 中,加入不同量的氯化铵和精氨酸。试验分 A、B、C 三组,分别加入 3.5%, 4.0% 和 4.5% 氯化铵。每组加入精氨酸量也不同, A 组分别为 150、200、250 $\mu$ g/ml; B 组分别为 200、250、300 $\mu$ g/ml; C 组分别为 200、300、400 $\mu$ g/ml。结果见图 2。

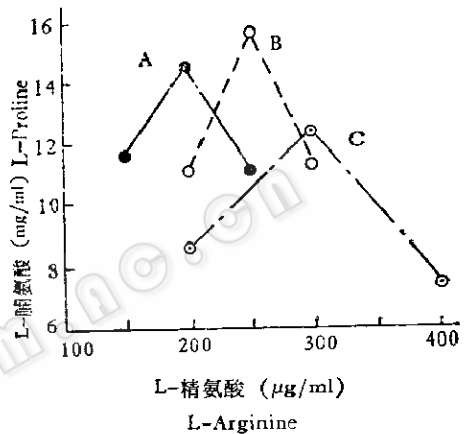


图 2 不同氯化铵和精氨酸对产 L-脯氨酸的影响

Fig. 2 Effect of various concentration of ammonium chloride and L-arginine on L-proline production

从图 2 看出,在同一氯化铵浓度下,有各自最适精氨酸浓度。它是一个亚适量浓度,随着氯化铵浓度的增加,精氨酸的最适浓度也相应增加,但过高和过低的氯化铵浓度对产 L-脯氨酸是不利的,过高氯化铵浓度的不利影响更为明显。

进一步试验表明,在培养基 A 中,加入 250 $\mu$ g/ml 精氨酸,并加入 4.95%、6.16% 和 7.39% 硫酸铵,分别相当于 4%、5% 和 6% 氯化铵中的含氮量,以 4% 氯化铵为对照。结果见表 6。

从表 6 可见,增加硫酸铵浓度达 7.39% 时, L-脯氨酸产量与 4% 氯化铵时接近,同时菌量有所增加。实验表明高浓度

表 6 硫酸铵对产 L-脯氨酸的影响

Table 6 Effect of Various Concentration of Ammonium Sulfate On L-Proline Production

铵盐类别 Ammonium salts		菌量 (A <sub>620</sub> ) Growth	产 L-脯氨酸 L-Proline produced (mg/ml)
NH <sub>4</sub> Cl 4%		0.93	16.8
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (%)	4.95	1.11	12.0
	6.16	1.15	13.1
	7.39	1.28	16.4

铵离子并不抑制菌的生长;而适量氯离子对产 L-脯氨酸有促进作用。

7. 豆饼水解液与葡萄糖对产 L-脯氨酸的影响: 为了用豆饼水解液代替精氨酸,又考虑到精氨酸、氯化铵和硫酸铵对产 L-脯氨酸的相互影响,选用 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) 正交表,对这三个因素以及葡萄糖加量进行综合考察。

培养基用基础发酵培养基 B。上述四个因素加入量见表 7。水解液中盐酸用氨

水中和后,亦含 13% 的氯化铵。每组培养基加入水解液后,氯化铵根据要求量,不足之数加入固体氯化铵补足之。0.62%、1.23% 和 1.85% 硫酸铵中含氮量分别相当于 0.5%、1% 和 1.5% 氯化铵中之含氮量。结果见表 7。

从表 7 得知,最优条件是 1.0% 豆饼水解液,15% 葡萄糖、4% 氯化铵和 1.23% 硫酸铵。诸因素中最重要的是水解液,其次是葡萄糖。

(二) L-脯氨酸发酵过程

采用 250ml 三角瓶,装培养基 B 15ml 进行发酵过程试验。结果见图 3。

从图 3 看出,在 30℃,旋转摇床培养 120 小时, L-脯氨酸产量达 27.0mg/ml。

(三) L-脯氨酸的提取和鉴定

1. 提取和精制: 五氯酚能与脯氨酸形成难溶于水的复合物,而对丙氨酸、缬氨

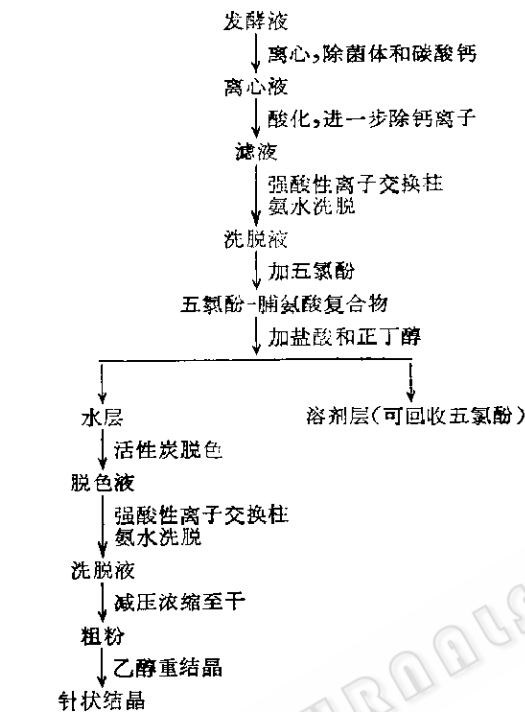
表 7 豆饼水解液、葡萄糖、氯化铵和硫酸铵对产 L-脯氨酸的影响

Table 7 Effect of Hydrolysate of Soybean Cake Meal, Glucose, NH<sub>4</sub>Cl, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> on L-Proline Production

项目 Item	组别 Series									K**mg/ml			R***
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	K <sub>1</sub>	K <sub>2</sub>	K <sub>3</sub>	
葡萄糖(%) Glucose	15	15	15	12.5	12.5	12.5	10	10	10	20.8	19.4	15.6	5.2
豆饼水解液(%) Hydrolysate of soybean Cake meal	0.6	1.0	1.4	0.6	1.0	1.4	0.6	1.0	1.4	17.6	23.8	14.5	9.3
NH <sub>4</sub> Cl(%)	3.5	4.0	5.0	4.0	5.0	3.5	5.0	3.5	4.0	19.5	19.8	16.5	3.3
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (%)	0.62	1.23	1.85	1.85	0.62	1.23	1.23	1.85	0.62	18.8	20.2	16.9	3.3
产 L-脯氨酸 (mg/ml) L-Proline produced (mg/ml)	20.9	28.8	12.8*	17.9	22.6	17.8	14.1	19.9	12.8				

\* 此组未生长,以其余 8 组中最小的数值代入  
Microorganisms didn't grow in this series, so the minimum of the other eight series was inserted.  
\*\* 同一培养基成分相等浓度时 L-脯氨酸积累量平均值  
The average value of L-proline accumulated at the same concentration of the same media component  
\*\*\* 极差  
Difference between the Kmax and the Kmin.

酸、丝氨酸、甘氨酸等易溶的中性氨基酸不形成沉淀<sup>[15]</sup>。基于五氯酚有相当高的选择性，本提取采用沉淀法和离子交换法及其它分离技术相结合，获得较满意的结果，提取率达 70 % 以上。提取过程如下：



2. 鉴定：

熔点： 220—222℃ d. 与 L-脯氨酸一致<sup>[16]</sup>。

元素分析：以 Carlo Erda 1102 元素分析仪测定，结果见表 8。

表8 元素分析值		
Table 8 Value of Elements Analysis		
元 素 Elements	测定值(%) Found	理论值(%) Theory
C	51.62	52.16
H	7.80	7.88
N	11.93	12.17

比旋光度：用日本 OR-20 型旋光仪在 20℃ 测定成品旋光度，结果为  $[\alpha]_D^{20} = -86.71$  (C = 0.516%，H<sub>2</sub>O) 与 L-脯氨酸

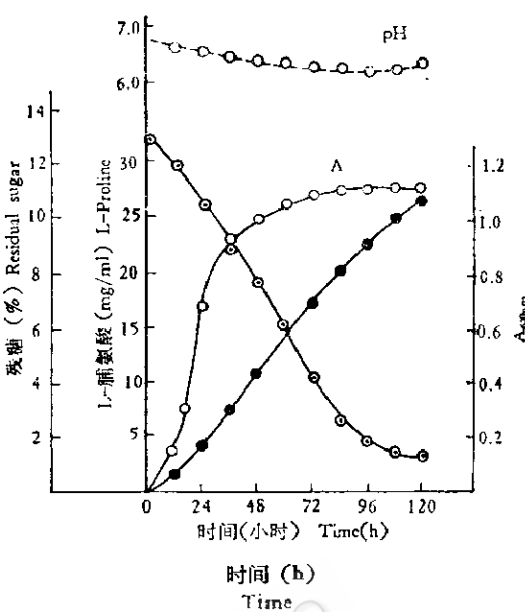


图 3 L-脯氨酸发酵过程  
Fig. 3 Time course of growth and L-proline production by AS 1.727  
●—● L-脯氨酸产量 (mg/ml)  
L-Proline produced  
○—○ 残糖(%)  
Residual sugar

酸的旋光度  $[\alpha]_D^{25} = -86.2$  接近<sup>[15]</sup>。  
红外光谱分析：用日本 IR-400 型红外光谱仪测定吸收光谱，成品的红外吸收光谱与日本标准 L-脯氨酸图谱相符。  
纸上色谱分析：50μg 样品与标准品在新华一号滤纸上点样后，用丁醇：醋酸：水 = 5:2:2 系统展开，层析温度在 70℃ 左右，4 小时后取出晾干，用茚三酮显色，样品呈单斑且 R<sub>f</sub> 值与标准 L-脯氨酸一致。  
根据以上结果，确定从发酵液中提纯的精品为 L-脯氨酸。

讨 论

已知谷氨酸的五碳链是脯氨酸和鸟氨酸的直接前体，鸟氨酸进一步合成精氨酸。本文中 AS1.727 菌株是鸟氨酸缺陷型，由于形成鸟氨酸的途径受阻，有利于 L-脯氨酸的积累。

Yoshinaga<sup>[4,17]</sup> 对黄色短杆菌异白氨酸缺陷型突变株产 L-脯氨酸的机制进行了研究,认为该菌缺失苏氨酸脱水酶,造成胞内苏氨酸的积累;由于苏氨酸的积累,抑制了天冬氨酸激酶和高丝氨酸激酶的活性,导致代谢库中 ATP 浓度升高,因而促进了脯氨酸生物合成中第一个酶,即谷氨酸激酶的反应。Araki 等<sup>[6]</sup>认为谷氨酸棒杆菌异白氨酸缺陷型突变株有类似的产 L-脯氨酸的机制。我们采用的是北京棒杆菌鸟氨酸缺陷型,而不是异白氨酸缺陷型突变株。换言之,合成异白氨酸这一途径并没有阻断,但也能大量积累 L-脯氨酸,这是值得进一步研究的。此外高浓度铵离子、适量的氯离子和镁离子对产 L-脯氨酸有促进作用,又与 Araki 等报道的情况相同,也值得进一步探讨和研究。

### 参 考 文 献

- [1] Yoshinaga, F. et al.: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **12**: 219, 1966.
- [2] Yamatodani, S. et al.: *Amino Acid and Nucleic Acid*, **16**: 126, 1967.
- [3] 野口佑一ら: 特許公報, 昭43-13679, 1968.
- [4] 吉永文弘: 日本農芸化学会誌, **42**: 703, 1968.
- [5] Nakanishi, T. et al.: *J. Ferment. Technol.*, **57**(10): 742, 1973.
- [6] Araki, K. et al.: *Agr. Biol. Chem.*, **39**(6): 1193, 1975.
- [7] Akashi, K. et al.: *J. Ferment. Technol.*, **57**(4): 321, 1979.
- [8] 金子修: 特許公報, 昭51-33190, 1976.
- [9] 吉永文弘ら: 特許公報, 昭51-40158, 1976.
- [10] 犬塚恵一ら: 公开特許公報, 昭54-41386, 1979.
- [11] Nakamori, S. et al.: Ger. Patent, 2903315, 1979.
- [12] Kato, J. et al.: *Appl. Microbiol.*, **16**:1200, 1968.
- [13] Chinard, F. P.: *J. Biom. Chem.*, **199**: 91, 1952.
- [14] Summer, J. B.: *J. Biol. Chem.*, **65**: 393, 1925.
- [15] 明石武ら: 化学と生物, **11**(1): 13, 1973.
- [16] 潘家秀等: 蛋白质化学研究技术, 北京, 科学出版社, 1962.
- [17] Yoshinaga, F., *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **15**: 387, 1969.

## STUDIES ON THE FERMENTATION OF L-PROLINE

Fang Peijing Mao Weiying Chen Qi

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

An ornithine auxotrophic mutant AS 1.727 derived from *Corynebacterium pekinense* AS 1.299 produced L-proline by fermentation.

In the culture medium suboptimal arginine was required by the mutant and 80—100  $\mu\text{g/l}$  biotin and high concentration of ammonium ion were also required. Among several compounds for nitrogen source, ammonium chloride was the first and ammonium sulfate was the second. It was showed that chlorine ion promoted the production of L-proline. Magnesium ion also had the same effect. Yield of L-proline was more than 25 mg/ml in a medium containing 15% glucose, 1% acid-hydroly-

zate of soybean cake meal (the weight before hydrolysis), 4%  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 1.23%  $(\text{NH})_2\text{SO}_4$ , 0.65%  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , 0.05%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.5%  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.002  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 0.002%  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 100  $\mu\text{g/l}$  biotin, 1000  $\mu\text{g/l}$  thiamine hydrochloride and 5%  $\text{CaCO}_3$ , pH 6.7 (before sterilization) on rotary shaker at 30°C for 5 days.

The product was purified by the formation of a special non-soluble pentachlorophenol-proline complex and other techniques such as ion-exchange and solvent extraction. It was identified to be L-proline by melting point, element composition, specific rotation, infrared absorption spectrum and paper chromatography.