

产 L-色氨酸菌株的诱变选育

张素珍 官家发 陈琦

(中国科学院微生物研究所, 北京)

本文报道了利用细菌直接发酵糖质原料生物合成 L-色氨酸的研究结果。以谷氨酸产生菌北京棒状杆菌 AS 1.299 为出发菌株, 采用亚硝基胍多次诱变获得了几株产生 L-色氨酸的菌株, 其中 CG45 突变株属于精氨酸和尿嘧啶缺陷型并具有对 5MT, 6FT, 4FP 的抗药性。在以葡萄糖为碳源, 硫酸铵为氮源而不需添加任何前体物的培养基中, 直接发酵五天, 产酸能达 8g/l。发酵终了用离子交换树脂提取发酵液, 所得纯品经红外光谱, 比旋光度, 生物测定及纸上层析鉴定为 L-色氨酸

关键词 L-色氨酸; 选育

L-色氨酸是人体必需氨基酸之一, 是复合氨基酸注射液的成分之一, 能有效地用于预防和治疗糙皮病, 并能作为食品和饲料的营养强化剂。

近年来, 国外有人报道利用微生物直接发酵法^[1-3]酶法^[4]及前体法^[5,6]生产色氨酸。国内也曾报道过利用酵母菌转化色氨酸的前体——邻氨基苯甲酸发酵生产色氨酸的方法^[7], 但产量较低, 工业化生产困难。我们以谷氨酸产生菌北京棒状杆菌 AS 1.299 为出发菌株^[5]经亚硝基胍 (NTG) 多次诱变获得了几株产 L-色氨酸的突变株, 其中 CG45 产酸较高, 现将研究结果报道如下。

材料与方 法

(一) 菌株

1. 北京棒状杆菌 (*Corynebacterium pekinense*) AS1.299;
2. 棒状杆菌 (*Corynebacterium* sp. 075) 诱变获得的色氨酸缺陷型 No. 139;
3. 钝齿棒状杆菌 (*Corynebacterium crenatum*) AS1.542;
4. 苯丙氨酸缺陷型 P11. 均为本实验室保藏菌。

(二) 培养基

1. 完全培养基组成 (%): 蛋白胨 1, 酵母膏 0.5, 葡萄糖 0.3, 氯化钠 0.5, 牛肉汁定容, 琼脂 2, pH 7.2。

2. 基础培养基组成 (%): 葡萄糖 2, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.2, K_2HPO_4 0.1, KH_2PO_4 0.1, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.04, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2mg, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.2mg, 生物素 5 μg , VB_1 20 μg , 琼脂 2, pH 7.0, 蒸馏水定容。

3. 筛选培养基组成 (%): 葡萄糖 10, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2, KH_2PO_4 0.05, K_2HPO_4 0.05, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.025, VB_1 20 μg , 生物素 3 μg , $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1mg, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1mg, 豆饼水解液 0.2 (以干物重计), CaCO_3 2, pH 7.2。

4. 发酵培养基组成 (%): 葡萄糖 12, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3, KH_2PO_4 0.05, K_2HPO_4 0.05, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.025, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1mg, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1mg, 豆饼水解液 0.2, 玉米浆 0.5, CaCO_3 2, pH 7.2。

(三) 诱变方法

取生长 24 小时的 AS1.299 斜面培养物一环, 接入无菌生理盐水, 离心洗涤 2—3 次, 将此菌细胞转入含 1mg/ml NTG 的 pH 6.0 的 Tris-maleate 缓冲液中悬浮, 使细胞浓度为 10^8 左右, 置室温下或迴旋式摇床, 28 $^\circ\text{C}$ 处理 30 min, 处理

本文于 1982 年 11 月 22 日收到。

后的菌液经离心并用无菌生理盐水洗两次,除去 NTG 后,用生理盐水悬浮,有关产色氨酸突变株的分离,用如下三种方法进行。

1. 抗结构类似物突变株的分离法: 将 NTG 处理过的菌悬液 0.1 ml, 接种到含不同浓度的 6FT 的基础培养液中, 于 30℃ 摇床培养两天, 取培养液涂在完全培养基平板上, 得到抗 6FT 的突变株。

2. 完全培养基平板分离法: 将 NTG 处理过的菌悬液稀释到 10^{-3} , 取 0.1 ml 涂在完全培养基平板上, 挑出各种类型的突变株。

3. 青霉素浓缩法: 将 NTG 处理过的菌悬液 1 ml, 接种到含苯丙氨酸和酪氨酸的基础培养基中, 置 30℃ 摇床过夜, 离心洗涤后再接入无氮培养基中, 再放 30℃ 摇床培养 7 小时后加入 2000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 青霉素培养 16 小时, 离心洗涤后稀释, 涂完全平板, 以获得营养缺陷型突变株。

(四) 筛选方法

1. 产色氨酸菌株的初筛: 将所得突变株斜面取一环接种到装有 5 ml 发酵筛选培养基的大试管中, 置迴旋式摇床, 30℃ 培养 120 小时, 发酵液用对二甲胺基苯甲醛法显色, 以目测法选出呈蓝色反应深者, 作为产色氨酸菌株, 留作复筛用。

2. 产酸较高菌株的复筛: 将初筛获得产色氨酸菌的斜面细胞一环接种到装有 15 ml 发酵培养基的 250 ml 三角瓶中, 置迴旋式摇床, 30℃ 培养 120 小时, 发酵液离心, 取消液用对二甲胺基苯甲醛法显色后, 在 72 型分光光度计, 600 nm 波长下测定吸光度并与标准色氨酸溶液的吸光度比较计算出色氨酸的含量, 在一次诱变所得菌中, 产酸稳定并领先者则作为下一次诱变的出发菌。

(五) 分析方法

1. 菌体生长量的测定: 取 1 ml 发酵液, 加 4 ml 2N HCl 溶解 CaCO_3 , 用水稀释至 10 ml, 用 72 型分光光度计, 620 nm 波长下, 光程 1 cm, 测其吸光度表示菌体生长量。

2. 色氨酸的测定

(1) 层析法: 将发酵液离心取消液点到层析滤纸上, 放入正丁醇: 冰醋酸: 水 = 4:1:1 溶剂系统中上行层析, 取出凉干后用茚三酮丙酮溶液显色, 与标准色氨酸 Rf 值对照。

(2) 比色法: 取干净试管, 加入 18 NH_4SO_4 ,

2.5 ml, 再加以 2N NH_4SO_4 配制的 3% 的对二甲胺基苯甲醛溶液 0.5 ml, 摇匀加入离心发酵液, 摇匀放暗处 1 h 后加 1 滴 2% 的 NaNO_2 溶液, 摇匀放置 30 min 于 72 型分光光度计, 波长 600 nm, 光程 0.5 cm 进行比色, 按标准色氨酸计算出色氨酸在发酵液里的含量。

3. pH 的测定: 用 pH 5.5—9.0 精密试纸测定

(六) 诱变剂与结构类似物

诱变剂: N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍 (NTG), 西安化学试剂厂产品。

氨基酸结构类似物: DL-5-甲基色氨酸 (DL-5-Methyl-Tryptophan, 5MT), 中国科学院生物化学所东风试剂厂产品; DL-4-氟苯丙氨酸 (4-Fluoro-DL- β -phenylalanine, 4FP), BDH 产品; DL-6-氟-色氨酸 (DL-6-Fluoro-Tryptophan, 6FT), SIGMA 产品。

结 果

(一) 5 MT, 6 FT 对 P11, AS 1.299, AS 1.542 菌的抑制与恢复作用

我们选用苯丙氨酸缺陷型 P11, 北京棒状杆菌 AS 1.299, 钝齿棒状杆菌 AS 1.542, 取各菌培养过夜的斜面细胞两环, 用无菌生理盐水洗涤两次, 将洗净的细胞分别与基础培养基混合制成平板, P11 则在基础培养基中添加了苯丙氨酸。

再将 5MT 和 6FT 少许加入平板区域中心, 30℃ 温箱培养, 24h 后有抑菌圈出现, 然后在中心再加入浸过 10 mg/ml 色氨酸的滤纸片, 又继续培养 32 小时观察其恢复现象, 结果见表 1。

根据表 1 结果, 用液体培养法进一步做了 6FT 对 AS 1.299 菌的抑制与恢复试验, 在基础培养液中, 加入不同浓度的 6FT, 接种洗净的 AS 1.299 菌悬液 0.1 ml 作为 A 组, B 组除在培养液中加入不同浓度的 6FT 外, 还添加了 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的色氨酸, 同样接种菌悬液 0.1 ml, A、B 二组同时置

表 1 5MT、6FT 对各菌的抑制与恢复作用

Table 1. Growth inhibition by 5MT and 6FT and its' reversion by L-Try.

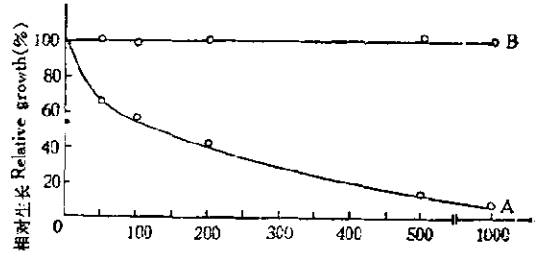
菌株 Strain:	氨基酸结构类似物 Analog of amino acid	24小时生长 growth for 24h	加色氨酸后 32小时生长 added L-Try, growth for 32h
P11	5MT 6FT	有明显抑制圈 Remarkable inhibition zone	未见生长 no growth
AS1.299	5MT 6FT	同上 ditto	明显生长 good growth
AS1542	5MT 6FT	同上 ditto	未见生长 no growth

30°C 回旋摇床上培养 20 小时后, 用 72 型分光光度计 (620 nm 波长, 光程 0.5 cm) 测定吸光度, 计算出相对生长, 结果见图 1。

从图 1 看出加入色氨酸结构类似物, AS1.299 菌随 6FT 浓度升高, 抑制加强, 而在含 6FT 又添加色氨酸时 AS1.299 生长不受抑制, 因此我们选用 AS 1.299 为产色氨酸的诱变出发菌株。

(二) 产 L-色氨酸突变株的分布

北京棒状杆菌 AS1.299 系谷氨酸产生菌, 在培养基中并不积累色氨酸, 但经 NTG 诱变并用色氨酸结构类似物 6FT 进行抗药



6FT 的浓度 Concentration of 6FT (µg/ml)

图 1 6FT 对 AS1.299 菌的抑制与 L-色氨酸对抑制的解除

Fig. 1 The growth inhibition of AS 1.299 strain by 6FT and its relief by L-tryptophan

A. 抑制曲线 Curve of inhibition
B. 恢复曲线 Curve of recover

性检测, 从 900 个突变株中获得产微量色氨酸菌 50 株, 选 TR 17 菌做第二次 NTG 诱变, 并用青霉素浓缩法分离, 从 1000 株菌中有缺陷型菌 90 株, 其中 15 株产色氨酸能力较 TR 17 菌有所提高, 产色氨酸量 0.4 g/l, 选其中 TR17-4 为出发菌再进行 NTG 诱变, 又从 3500 株菌中挑出 320 株缺陷型菌, 经摇管筛选用对二甲基氨基苯甲醛显色, 目测得到 46 株产色氨酸菌, 其中有 9 株产酸在 0.4-0.6 g/l, 选 TR 17-4-7

表 2 北京棒状杆菌 AS1.299 用 NTG 诱变后色氨酸产生菌的分布

Table 2 Distribution of L-Tryptophan-producing mutants by derivation of NTG from *C. pekinense* AS1.299

诱变次数 time	菌数 Picked up Strains	抗性菌数 resistant strains	缺陷型 Auxotroph	产色氨酸 菌株数 Tryptophan- producing strains	L-色氨酸产量 (Yield of L-Try. g/l)						
					微量 0.1--0.4	0.4--1.0	1.0--2.0	2.0--4.0	4.0--6.0	6.0--8.0	8.0 以上
1	900	900		50							
2	1000		90	15	15						
3	3500		320	46		9					
4	700			87			29				
5	300			130			24				
6	350			51				21			
7	700			103					14	6	

继续用 NTG 诱变,从 700 株菌中得到 29 株产色氨酸在 1—2 g/l, 选 TR 53 菌做 NTG 诱变,从 300 株菌中获 25 株,产酸达 4g/l。再以 TR 272 菌继续用 NTG 诱变,从 350 株菌中选出 21 株,色氨酸产量可达 6 g/l,经分离纯化后选 TR3-44 进行第七次诱变,从 700 株菌中选出产色氨酸较高的菌株,一般产酸在 6—8 g/l,最高曾达 10 g/l 以上。七次诱变产色氨酸分布见表 2。

从 AS 1.299 菌的七次诱变看出,用 NTG 诱变手段可以打破 AS 1.299 菌的正常色氨酸代谢的反馈作用,导致色氨酸的过量积累,同时也看出用 NTG 连续对第一代,第二代……第六代等突变株进行诱变时,色氨酸的产量不断增加,经过几次诱变后,获得了色氨酸产生菌,产酸能力接近 10 g/l。

在第六代用 TR 3-44 为出发菌进行 NTG 诱变后挑出 700 株菌,经目测将 2g/l 以下的菌株甩掉后,102 株突变株诱变率分布如图 2。

由图 2 可以看出,在较高产酸菌为出发菌进行诱变时诱变率较高的区域还是在靠近原菌产酸附近 6—7 g/l 处,而产酸越高则得到的菌株越少。

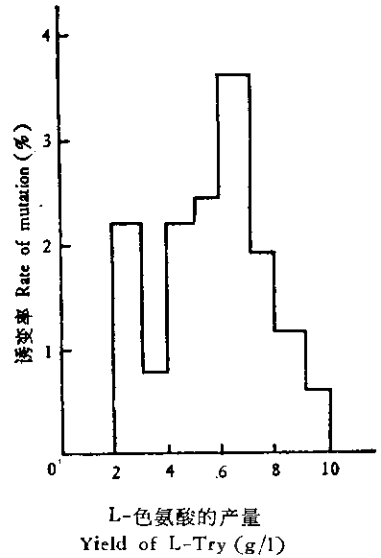


图 2 TR 3.44 菌 NTG 诱变产酸分布
Fig. 2 Distribution of mutants derived from TR 3.44 with respect to their L-Try production

(三) 产色氨酸突变株的营养要求

采用七种核酸碱基及其碱基混合液,九种维生素及其混合液及十七种氨基酸的不同组合,以生长图谱法,测定了产色氨酸突变株的营养要求,结果见表 3。

从表 3 可以看出,经 NTG 七次诱变所得产色氨酸能力较强的 CG 45 菌的营养要求与出发菌 AS 1.299 已完全不同,只供给生物素不能使它生长,必需同时有精氨

表 3 产色氨酸突变株的营养要求
Table 3 Growth factors for producing-Tryptophan mutants

菌株 Strains	培养基 medium	基础培养基 -生物素 (basis medium- biotin)	基础培养基 (Basis medium) (B)	基础培养基 + 赖氨酸 (B + Lys.)	基础培养基 + 赖氨酸 + 精氨酸 + 尿嘧啶 (B + Lys. + Arg. + Ura)	基础培养基 + 精氨酸 + 尿嘧啶 CB + Arg. + Ura.)
AS 1.299		-	+++	+++	+++	+++
TR 17		-	+++	+++	+++	+++
TR 17-4		-	+	+++	++	-
TR 17-4-7		-	-	-	+++	±
TR 53		-	-	-	+++	+++
TR 272		-	-	-	+++	+++
TR 3-44		-	-	-	+++	+++
CG 45		-	-	-	+++	+++

- 不生长 no growth +++ 生长较好 good growth

表 4 不同菌株对几种类似物的抗性

Table 4 The resistance to analogues of aromatic amino acids in Tryptophan-producing mutants

类似物 Analogues	菌株 Strains	AS1.299	TR17	TR17-4	TR17-4-7	TR272	TR3-44	CG45
5MT		-	++	++	++	++	++	++
4FP		-	-	-	-	-	-	++
6FT		-	++	++	++	++	++	++

菌株 Strain	L-色氨酸产量(克/升) yield of Try. (g/l).
AS1.299	
↓ NTG.	-
TR17 (6FT ⁺ .5MT ⁺)	微量
↓ NTG	
TR17-4 (6FT ⁺ .5MT ⁺ .Lys ⁻)	0.4
↓ NTG 青霉素浓缩	
TR17-4-7 (6FT ⁺ .5MT ⁺ .Lys ⁻ . Arg ⁻ . Ura ⁻ .)	0.6
↓ NTG	
TR272 (6FT ⁺ .5MT ⁺ .Arg ⁻ .Ura ⁻ .)	2.0
↓ NTG	
TR3-44 (6FT ⁺ .5MT ⁺ .Arg ⁻ .Ura ⁻ .)	4.0
↓ NTG	
CG45 (6FT ⁺ .5MT ⁺ .4FP ⁺ . Arg ⁻ . Ura ⁻ .)	6.0
	8.0

图 3 产色氨酸诱变菌株谱系

Fig. 3 Genealogy of L-Tryptophan-producing mutants.

酸和尿嘧啶存在时菌体才能很好地生长,它与国外报道的用苯丙氨酸和酪氨酸的双缺突变株产生色氨酸是不相同的。

(四) 产色氨酸突变株抗氨基酸结构类似物的测定

将七次诱变获得各代产酸较高的菌斜面培养的细胞,经无菌生理盐水洗涤后,接入到添加有精氨酸和尿嘧啶的基础培养基中混合,制成平板。然后用无菌牙签分别把三种氨基酸结构类似物粉末少许放置在该平板表面上,进一步测定产色氨酸突变株对氨基酸结构类似物的抗性。在 30℃ 温箱中培养 48 小时观察生长情况,能生长者为抗性菌株,其结果见表 4。

从表 4 所得结果看出,通过 NTG 诱变,所得各突变株对色氨酸、苯丙氨酸结构

类似物抗性有所不同。

(五) 由 AS1.299 诱变获得产 L-色氨酸菌株谱系

通过 NTG 对北京棒状杆菌 AS1.299 菌的连续诱变,获得了产 L-色氨酸能力不同的菌株,谱系见图 3。

从诱变谱系中可以看出,随着诱变次数增加,菌种的营养要求与抗性标记以及产色氨酸能力均有增加,说明诱变作用解除了芳香族氨基酸生物合成途径的自我调节,从而向培养基中积累 L-色氨酸,随着营养缺陷及抗性标记的增加,积累色氨酸的能力也有所着增加。

(六) 摇瓶发酵过程

取一环 CG 45 突变株斜面接种到种子培养基中,迴旋摇床培养 20 小时,以 1ml

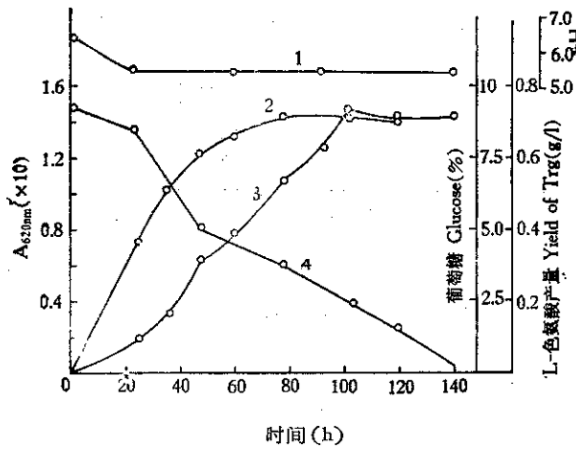


图 4 CG 45 菌发酵过程

Fig. 4 Time course of L-Try fermentation by mutant CG45

- 1. pH 2. 生长曲线 Curve of growth
- 3. L-色氨酸产量 Yield of Try 4. 还原糖 Reducing sugar

种液转接到含有 15 ml 发酵培养基的 250 ml 摇瓶中, 置往复式摇床, 30℃ 进行初步产酸周期试验, 102 小时产酸在 7.2 g/l, 其发酵过程见图 4

(七) 产物的提取

收集在摇瓶发酵五天的发酵液, 离心除去菌体和碳酸钙, 上清液加草酸酸化至 pH 2.5, 再次离心去沉淀, 取清液通过 61 大孔阳离子 (H⁺ 型) 交换树脂柱吸附, 氨水洗脱, 收集 pH8—13 区间的洗脱液, 真空浓缩, 结晶得粗品。将粗品溶于 60% 的热乙醇中, 活性炭脱色, 结晶得白色片状结晶, 烘干为 L-色氨酸精品。

(八) 产品的鉴定

1. 比旋光度: 用 WZZ-1 型自动指示旋光仪, 在 18℃ 测定产品的旋光度, $[\alpha]_D^{18} = -31.0$ 与 L-色氨酸旋光度文献值 $[\alpha]_D^{20} = -32.0$ 接近^[9]。

2. 纸层析分析: 取发酵离心清液 10 μ l 在滤纸上点样于正丁醇: 冰醋酸: 水 = 4:1:1 溶剂系统中上行层析, 14 h 取出风干, 在紫外检视灯下有荧光斑点, 用茚三酮丙酮液显色, 其 Rf 值与标准色氨酸相同, 确定为 L-色氨酸, 见图 5。

成品配成 1% 浓度溶液, 取 5 μ l 点样,

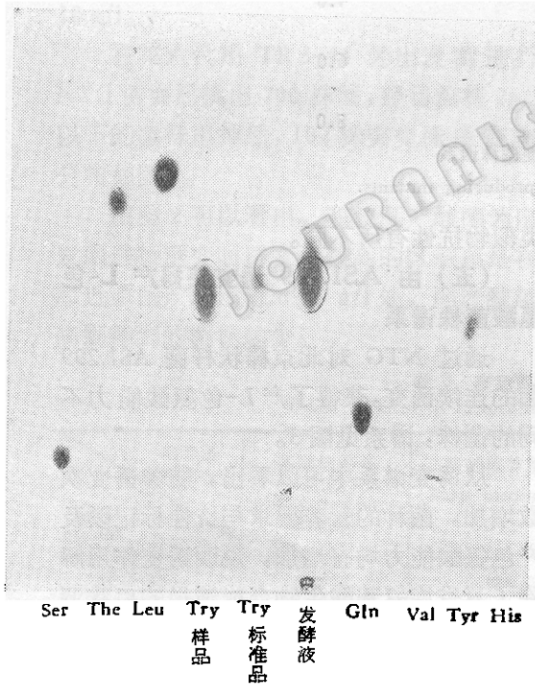


图 5 纸上层析图谱

Fig. 5 Paperchromatography (正丁醇: 冰醋酸: 水 = 4:1:1)

(n-butyl alcohol: Acetic acid, glacial: water = 4:1:1)

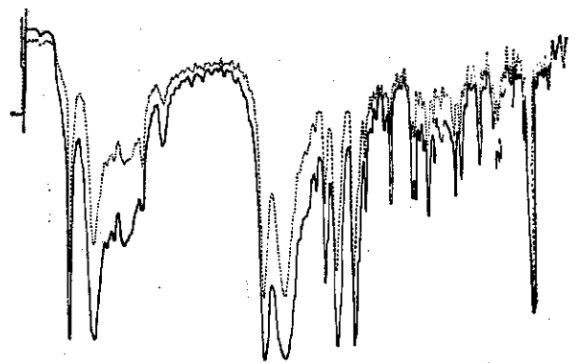


图 6 L-Tryptophan 红外光谱图

Fig. 6 IR spectrum purified product and standard L-Try.

--- 发酵提纯样品 ---- 日本味の素公司产品

显色单斑,说明无杂酸。

3. 红外光谱分析: 用岛津 IR-27C 型红外光谱仪测定吸收光谱, 结果与日本味の素公司的产品图谱相符, 见图 6。

4. 生物鉴定: 用洗净的色氨酸缺陷型 No 139 的斜面细胞与基础培养基混合制成平板, 以滤纸片取成品溶液置于平板上, 培养结果纸片周围形成生长圈。

从以上结果证明产品系 L-色氨酸。

讨 论

我们选用谷氨酸产生菌北京棒状杆菌 AS 1.299, 连续进行 NTG 诱变, 获得了一株精氨酸及尿嘧啶缺陷型及多重抗性突变株 CG45, 在以葡萄糖为主碳源的培养基中直接发酵产生色氨酸。该菌与日本学者报道的谷氨酸棒状杆菌的苯丙氨酸和酪氨酸双缺多重抗性突变株 Px-115-97^[10] 在营养要求上不同; 在 Px-115-97 菌中由于限量提供苯丙氨酸和酪氨酸而对 DAHP 合成酶的协同反馈抑制作用得以解除, 同时色氨酸对磷氨基苯甲酸合成酶的反馈抑制也得到相当程度地解除, 致使色氨酸在发酵液中过量积累。而 CG45 菌株则是精氨酸与尿嘧啶的缺陷, 与芳香族氨基酸中三条合成支路并不存在直接的联系, 但这种缺陷和抗氨基酸结构类似物突变株在生物

合成途径中也引起某种反馈抑制或阻遏的解除, 影响细胞整体代谢的调节, 从而有利于色氨酸的积累, 但其过量积累机制还有待进一步探讨。

用 CG45 菌直接发酵产生 L-色氨酸与国内报道的用前体邻氨基苯甲酸的酵母菌转化法比较, 不需要前体, 以葡萄糖为原料成本低; 产酸较高, 宜于工业化生产。

此外, 从以上初步试验结果看, 如对该菌再进一步进行诱变选育和深入进行产酸条件的研究, 其产酸水平的提高尚有潜力。

参 考 文 献

- [1] Shiiio, I. et al.: *Agr. Biol. Chem.*, **37** (9); 1991-2000, 1973.
- [2] Hiroshi, H. et al.: *Agr. Biol. Chem.*, **39** (2); 343-349, 1975.
- [3] Shiiio, I. et al.: *Agr. Biol. Chem.*, **39**(3); 627-635, 1975.
- [4] 山田秀明: 日本应用酵素协会誌, N112; 14-25, 1977.
- [5] Zaffarani, P. 等: *Agr. Biol. Chem.*, **38** (7); 1335-1342, 1974.
- [6] 照井尧造: *Amino Acids* 发酵上代谢, **3**:71-77 1961 **4**:74-80, 1961.
- [7] 李玲阁等: 微生物学报, **15** (3); 212-216, 1975.
- [8] 陈琦等: 微生物学报, **13** (1); 1-6, 1973.
- [9] 潘家秀等: 蛋白质化学研究技术, 247, 科学出版社, 北京, 1973.
- [10] Hagiao H. and Nakayama K.: Proceeding of the first intersectional congress of iams; Volume 5; 352-361, 1975.

BREEDING OF L-TRYPTOPHAN-PRODUCING STRAINS

Zhang Shuzhen Guan Jiafa Chen Qi

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

Several mutants producing a large amount of L-Tryptophan were derived from *Corynebacterium pekinense* AS 1.299 by stepwise mutagenic treatments with N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine.

One of them, mutant CG45, requires arginine and uracil as essential growth factor. This mutant is resistant to DL-5-methyl-tryptophan, DL-6-fluoro-tryptophan and 4-fluoro-DL-phenylalanine. It produced about 8g/l L-tryptophan in a medium containing (%): glucose 12, $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$ 3, KH_2PO_4

0.05, K_2HPO_4 0.05, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.025, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1mg, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1mg, cron steep liquor 0.5, soybean cake hydrolysate 0.2, CaCO_3 2, pH7.2, on rotation shaker at 30°C for 5 days.

The product isolated from fermentative broth with ion exchange resin method was identified as L-tryptophan by infrared absorption spectrum, specific rotation, bioassay and paper chromatography.

Key words

L-tryptophan; Breeding