

用北京棒状杆菌细胞转化生产 L-色氨酸*

张素珍 刘英昊

(中国科学院微生物研究所, 北京 100080)

L-色氨酸是人体和动物生命活动所必需的氨基酸之一,它是含有吲哚基的芳香族氨基酸,其化学名称为 α -氨基- β -吲哚丙酸。色氨酸不仅是医用氨基酸大输液中不可缺少的一种成分,而且也是一些植物蛋白比较缺乏的氨基酸,因此用它强化食品和做饲料添加剂对提高植物蛋白质的利用率具有重要作用。近年来,随着色氨酸在医药、食品和饲料等方面应用的开拓,市场的需求量不断增加。

已报道的色氨酸生产方法有化学合成法、微生物发酵法和细胞酶促转化法。国外的研究报道较多^[1-3],其中以吲哚和丝氨酸为底物的微生物酶促转化法生产色氨酸在日本的三井东压、味之素等公司已经取得成功,并工业化生产^[4]。

我国色氨酸的研究已先后在前体发酵技术、直接发酵技术和用邻硝基乙苯作原料的化学合成技术方面取得了小试或中试的成功,有的已投入批量生产^[5-7]。本文报道北京棒状杆菌(*Corynebacterium pckinese*)细胞转化法生产 L-色氨酸的研究结果。通过对北京棒状杆菌 AS1.299 的诱变育种,获得一株能转化吲哚和 L-丝氨酸生成 L-色氨酸能力较强的突变株 E298-63。在适宜培养和转化条件下,当底物浓度为 15—30mg/ml,转化液 pH8.0,温度 30℃,摇床转化 24 小时 L-色氨酸产量为 20—30mg/ml,最高可达 42.8mg/ml,转化率为 80—90%。

材料与 方法

(一) 菌种

北京棒状杆菌(*Corynebacterium pckinese*)突变株 E298-63。

(二) 培养基与转化液

1. 斜面培养基组成(%): 葡萄糖 0.5, 蛋白胨 0.5, 牛肉膏 0.5, 酵母膏 0.5, NaCl 0.5, 琼脂 1.3。
2. 液体培养基组成(%): 葡萄糖 1.0, 蛋白胨 0.5, 牛肉膏 0.5, 酵母膏 0.7, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.02。
3. 转化液基础成分(%): 吲哚 1.0, L-丝氨酸 0.9, 5'-邻酸吡哆醛 (PLP) 0.001, Triton X-100 1.0, 用 pH 8 的 0.1mol/L KH_2PO_4 -NaOH 缓冲液配制。

(三) 转化方法

1. 菌体培养: 在 250ml 三角瓶中装培养液 20ml, 灭菌后接入 E298-63 新鲜斜面菌种, 在旋转摇床 220r/min, 温度 30℃, 培养 22 小时。
2. 细胞的分离: 将培养好的细胞培养液于 3000r/min 离心 15 分钟, 除去清液, 将细胞用转化液悬浮, 用于转化。
3. 转化试验: 将离心所得细胞加入配好的转化液中(转化液体积与培养液体积比为 1:2), 放旋转摇床上转化, 不同时间取样, 测定 L-色氨酸生成量。

(四) 分析方法

1. 菌体生长: 取培养好的菌液 1ml, 稀释后, 在 72 型分光光度计上, 于 620nm 波长, 光程 1cm 测定光密度。

本文于 1991 年 4 月 19 日收到。

* 国家“七五”攻关项目。

2. L-色氨酸含量: 用对二甲氨基苯甲醛比色法测定, 在 72 型分光光度计上, 以 600nm 波长, 光程 0.5cm 比色, 用标准色氨酸光密度做标准曲线计算色氨酸含量。

3. 转化率: 从 L-色氨酸的生成量计算对吡啉的克分子转化率。

(五) L-色氨酸的提取

转化液酸化后用阳离子交换树脂进行吸附, 洗脱液浓缩得 L-色氨酸结晶。

结 果

(一) 菌体培养的正交试验

为了摸清细胞培养对转化的影响, 在培养组分单因子的试验基础上, 就培养基的主要组分蛋白胨、酵母膏、NaCl 和培养时间进行了正交试验, 选用 $L_3(3)^4$, 培养基其它成分为牛肉膏 0.5%, 葡萄糖 0.5%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.02%, 试验结果见表 1。

正交试验结果表明, 培养时间对细胞转化生成 L-色氨酸的影响最大, 因此控制好细胞培养时间对转化吡啉和 L-丝氨酸生成色氨酸至关重要。试验表明最佳培养基组成(%)为葡萄糖 0.5, 蛋白胨 0.5, 酵母膏 0.6, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.02。最佳培养时间是 22 小时。

表 1 菌体培养条件的正交试验结果

编 号	蛋白胨 (%)	酵母膏 (%)	NaCl (%)	培养时间 (h)	L-Trp (mg/ml)	转化率 (%)
1	0.8	0.6	0	18	18.9	72
2	0.8	0.4	0.3	20	17.7	67
3	0.8	0.2	0.5	22	20.0	77
4	0.5	0.6	0.3	22	19.0	73
5	0.5	0.4	0.5	18	17.7	67
6	0.5	0.2	0	20	20.3	77
7	0.75	0.6	0.5	20	20.3	77
8	0.75	0.4	0	22	19.3	73
9	0.75	0.2	0.3	18	15.9	60
K_1	216	222	222	199		
K_2	217	207	200	221		
K_3	210	214	221	223		
$\bar{K}_1$	72	74	74	66.3		
$\bar{K}_2$	72	69	69	74		
$\bar{K}_3$	70	71	71	74.3		
R 极差	2	5	7	8		

(二) 不同缓冲液及 pH 对细胞转化的影响

本实验探讨了不同 pH 对细胞转化生成 L-色氨酸的影响, 结果见图 1。

结果表明, 在三种缓冲液中, 以 0.1mol/L KH_2PO_4 -NaOH 缓冲液在 pH7.2—8.0 时转化效果最好, 而 Tris-HCl 缓冲液则不利于 L-色氨酸合成。

(三) 温度对细胞转化的影响

在温度梯度仪上进行了不同温度下细胞转化底物形成 L-色氨酸的试验(图 2)。

该菌细胞转化最适温度为 28°—30℃, 温度高时转化率降低, L-色氨酸的产生明显减少。

(四) 吡啉浓度对细胞转化的影响

吡啉是转化的重要底物, 测定了同样转化条件下, 不同吡啉浓度对细胞转化的影响。由表 2 结果表

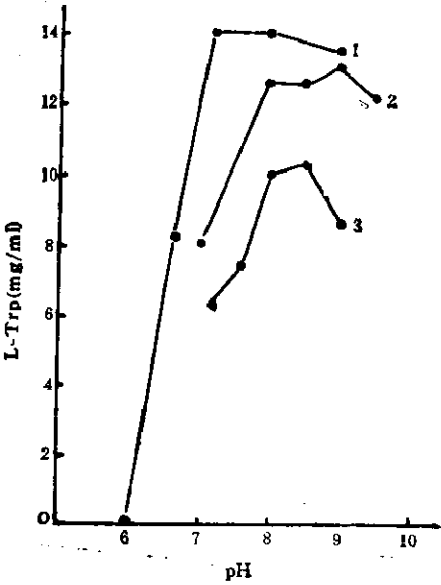


图 1 不同缓冲液及 pH 对细胞转化形成 L-色氨酸的影响

1. $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-NaOH}$ 缓冲液；2. 巴比妥钠-HCl 缓冲液；3. Tris-HCl 缓冲液

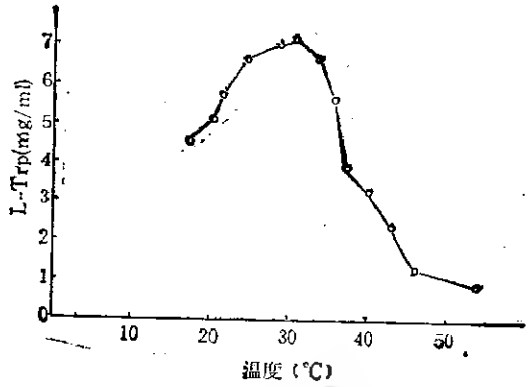


图 2 温度对转化的影响

明，在试验浓度范围内，随着吲哚浓度提高，L-色氨酸生成量增加缓慢，转化率随吲哚浓度升高而降低。

表 2 吲哚浓度对转化率的影响

吲哚浓度 (mg/ml)	10.0	15.0	20.0	25.0	30.0
L-Trp (mg/ml)	15.85	18.55	23.45	23.80	23.30
转化率(%)	90.82	70.86	67.18	54.54	44.50

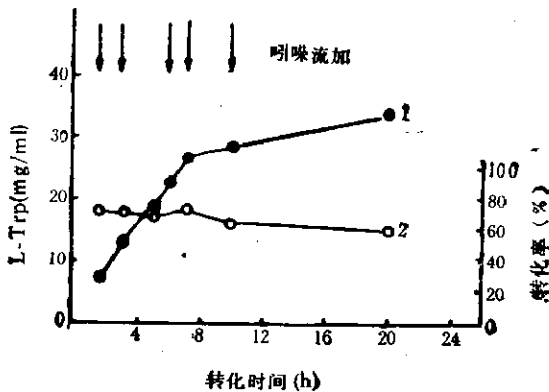


图 3 吲哚流加转化过程曲线

1. L-Trp；2. 转化率

(五) 吡啶流加试验

为减少高浓度吡啶对细胞转化产生的抑制作用,采用流加吡啶的方法取得了较好的效果,从图 3 结果看出,在 12 小时以前,掌握好吡啶流加量能使吡啶投入总量加大,利于 L-色氨酸的合成,当吡啶加到 30mg/ml 时, L-色氨酸含量可达 34.1mg/ml。

(六) 表面活性剂对细胞转化的影响

由于吡啶不溶于水,而且在转化液中吡啶浓度的增加对细胞转化合成色氨酸有抑制作用,所以多采用加表面活性剂的方法对细胞进行保护,避免细胞与吡啶直接接触,并能使细胞透性增大,利于转化形成产物,为此选用了 5 种表面活性剂进行了试验,表 3 说明选用的 5 种表面活性剂均有助于细胞转化底物生成色氨酸,其中 Triton X-100 效果最好。

表 3 不同表面活性剂对转化的影响

表面活性剂	浓度(%)	L-Trp (mg/ml)	转化率(%)
TritonX-100	1	14.80	84.80
Tween 20	1	11.20	64.17
Tween 80	1	12.20	69.90
溴代十六烷基三甲胺	0.025	11.14	63.83
N-氯代十六烷基吡啶	0.025	10.42	59.71

(七) 细胞转化过程曲线

E298-63 菌的细胞转化过程曲线见图 4。由图 4 看出,10 小时之前底物丝氨酸已基本转化, L-色氨酸积累也已到高峰。

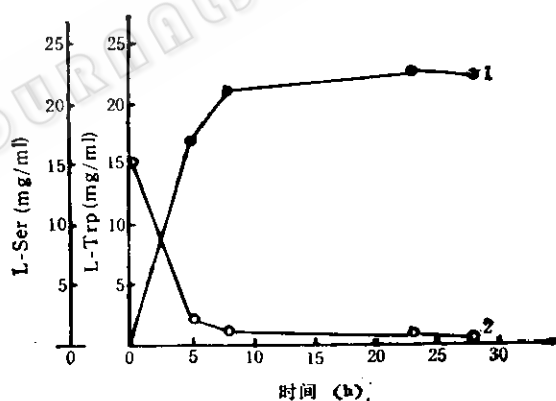


图 4 细胞转化过程曲线

1. L-色氨酸含量; 2. L-丝氨酸含量

(八) L-色氨酸的分离

转化液中的 L-色氨酸采用离子交换树脂进行分离提取,所得产品为层析单斑,纯度 98% 以上,旋光度 $[\alpha]_D^{25} = 31.5$, 提取收率在 45% 以上。

讨 论

色氨酸的生产方法可采用化学合成法、微生物发酵法和酶促转化法。化学合成法和发酵法在国内已见报道。研究表明,利用北京棒状杆菌突变株 E298-63 菌细胞转化吡啶和丝氨酸可积累色氨酸,

与发酵法相比,该法反应时间短,操作简单,产物积累量高,有一定的优越性,但该菌生长较慢,生物量略低,转化能力与国际上应用基因工程菌的转化仍有较大差距,当转化液中吲哚浓度高时,转化率有下降趋势,L-丝氨酸价格昂贵,不利于降低成本。

试验中曾用两倍量的 DL-丝氨酸在同样条件下进行转化,结果与用 L-丝氨酸转化效果相近,而 DL-丝氨酸成本较低,如果未被利用的 D-丝氨酸能进行回收利用,则将会有一定的实用价值。选育消旋酶活性高的菌株是有效利用廉价原料,开辟色氨酸生产工艺的有效途径。

参 考 文 献

- [1] 山田秀明: 日本应用酵素协会杂志, 12: 22, 1977。
- [2] Vjimar, T. et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, 46:1—5, 1983。
- [3] 张震元: 食品与发酵工业, 2: 32—45, 1985。
- [4] Hamilton, B.K.: *Trends in Biotechnology*, 3(3):64, 1986。
- [5] Kurahashi, O. et al.: *Agric. Biol. Chem.*, 51(7): 1791—1797, 1987。
- [6] Schmid, R.D.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 24:355, 1986。
- [7] 潘瑞琼等: 氨基酸杂志, 1: 56, 1984。
- [8] 张素珍等: 微生物学报, 24(3): 235, 1984。
- [9] 李德荣: 氨基酸杂志, 3: 1, 1987。

PRODUCTION OF L-TRYPTOPHAN BY CELL CONVERSION WITH *CORYNEBACTERIUM PEKINENSE*

Zhang Suzhen Liu Yinghao

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing 100080)

A *Corynebacterium pekinense* mutant E298-63 derived from *C. pekinense* AS 1.299 was obtained for tryptophan production. Intact cells of *C. pekinense* E298-63 having high tryptophan synthetase activity were used directly as an enzyme source to produce L-tryptophan from indole and L-serine. Conditions for the production of tryptophan synthetase and for the conversion of indole and L-serine to L-tryptophan were studied. L-tryptophan was produced most efficiently by cultures on shaker at 30 °C in a reaction mixture containing 30mg/ml of indole, 28mg/ml of L-serine and in 0.1mol/L potassium phosphate buffer (pH 8.0). After 21 hours cultivation, 42.8mg/ml of L-tryptophan was formed. The conversion rate was 81.85% for indole. L-tryptophan was isolated by ion exchange resin as pure crystal.

Key words L-tryptophan; *Corynebacterium pekinense*; Cell conversion