

# 利用薯干水解糖发酵谷氨酸

孙智凤 李文谦 费巧莲 徐丽和

(上海市工业微生物研究所) (上海天厨味精厂, 上海)

目前所知生物素对 L-谷氨酸的产生有显著影响。目前谷氨酸产生菌还不能适用于含过量生物素的薯干等粗制原料, 除非在生长的一定阶段流加表面活性剂或青霉素。此外, 国外还有采用油酸缺陷型<sup>[1,2]</sup> 以及其它营养缺陷型变异株的报道<sup>[3,4]</sup>。近年来, 国外出现的一种温度敏感型变异株<sup>[5]</sup>, 可在生物素过剩的培养基中, 在不添加表面活性剂的条件下也能生产谷氨酸。本文介绍我们选育的一株温度敏感型变异株 No. 207 菌的特性及以薯干水解糖为原料时该菌产酸试验结果。

## 材 料 和 方 法

### (一) 菌株

钝齿棒状杆菌 (*Corynebacterium crenatum*) AS 1.542 为出发菌株, 经紫外线处理获得一株温度敏感突变型 No. 207 菌株 (以下称 No. 207)。

### (二) 培养方法

1. 斜面培养基 (%): 牛肉膏 1, 蛋白胨 1, NaCl 0.25, 葡萄糖 0.25, 油酸钠 0.02, 琼脂 2。

#### 2. 种子培养

(1) 一级种子 (%): 葡萄糖 3,  $K_2HPO_4$  0.15,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.05,  $Mn^{++}$  2 ppm, 尿素 0.5, 玉米浆 1.7。250ml 三角瓶装 20ml, 30℃ 往复摇床 (100 rpm, 7.5cm) 培养 8—9 小时。

(2) 二级种子 (%): 薯干水解糖\*, 2.5—3.0,  $K_2HPO_4$  0.15,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.05,  $Mn^{++}$  4 ppm, 尿素 0.5, 玉米浆 1.5。50L 发酵罐投料 40 L, 30—32℃ 温度下搅拌 (250rpm) 培养 8—9 小时。

#### 3. 发酵培养

摇瓶发酵培养基 (%): 薯干水解糖 10—

11,  $K_2HPO_4$  0.125,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.03,  $Mn^{++}$  4ppm。初脉 0.5 (分开灭菌)。

500L 罐发酵培养基 (%): 薯干水解糖 12—13,  $K_2HPO_4$  0.125,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.05,  $Mn^{++}$  4 ppm, 初脉 0.6 (分消), 搅拌 (340 rpm) 培养。

## 结 果

### (一) No. 207 菌的形态和菌落特征

将在斜面上生长 24 小时的菌体制片, 经显微镜观察, No. 207 与 AS 1.542 在形态上无大差别, 但细胞大小区别较明显, 前者为  $2 \times 1.5 - 4 \mu$ , 后者为  $1.5 \times 0.8 - 2.3 \mu$ 。

No. 207 及 AS 1.542 分别涂于肉汤平板, 48 小时后观察, 前者菌落直径为 2.3 mm, 后者则达 3.1 mm。

### (二) No. 207 菌的一些特性

1. 不同温度对生长的影响: 将摇瓶种子, 于 30、37、40 和 45℃ 下分别培养 8—9 小时, 测定  $OD_{660nm}$ , 结果表明 No. 207 菌在 30℃ 生长略低于 AS 1.542, 而 40℃ 时几乎不长。

2. 生物素浓度对菌体生长及产酸的影响: 将在 30℃ 培养 20 小时左右的斜面接至种子培养基中, 摇瓶培养 8—9 小时后再接入含不同浓度生物素的发酵培养基中, 30℃ 和 37℃ 分别培养 40 小时, 测定 OD 及产酸率, 结果见表 1。试验表明, No. 207 在 30℃ 能耐生物素 25  $\mu g/l$  左右 (为亲株的 8—9 倍), 在 37℃ 时, 能耐生物素 100  $\mu g/l$  以上。No. 207 要在较高生物素浓度下才能较好生长, 同时要在较高温度下

参加本项工作的还有: 上海市工业微生物研究所的王英, 上海天厨味精厂的倪爱媛、陈爱玉等同志。

\* 由上海酵母厂提供。

表 1 生物素浓度对 No. 207 及 AS 1.542 生长及产酸影响\*

生物素 ( $\mu\text{g/l}$ )	30 $^{\circ}\text{C}$				37 $^{\circ}\text{C}$			
	L-谷氨酸(%)		OD		L-谷氨酸(%)		OD	
	AS1.542	No. 207	AS1.542	No. 207	AS1.542	No. 207	AS1.542	No. 207
2.0	3.20		0.68	0.15	3.45		0.68	
3.0	3.10		0.68	0.20	3.55		0.67	
5.0	0.80		0.68	0.25	1.05		0.64	
10.0	0.43	1.50	0.85	0.51	0.52		0.68	0.28
19.0		3.20	0.92	0.60		4.01	0.94	0.45
25.0		3.10	0.93	0.62		4.1	0.93	0.55
38.0		2.65	0.93	0.73		4.1	0.93	0.55
52.0		1.75	0.95	0.74		4.2	0.95	0.60
72.0		1.21	0.93	0.73		4.2	0.93	0.62
92.0		0.52	0.96	0.75		4.15	0.93	0.62
112.0		0.48	0.93	0.74		4.3	0.93	0.61

\* 置于水解糖中生物素含量为 38 $\mu\text{g/l}$ , 用活性炭去除; 生物素含量用标准生物素调整。

表 2 温度变化对产酸的影响\*

温度变化 (30 至 37 $^{\circ}\text{C}$ ) 时间(小时)	OD	OD 净增值	L-谷氨酸 (%)				
			发酵时间 (小时)				
			34	36	40		
0	0.1						
3	0.13	0.03	4.58	4.61	4.52		
5	0.17	0.07	5.40	5.40	5.25		
8	0.20	0.10	4.95	4.98	4.89		
10	0.35	0.25	4.70	4.80	4.72		
12	0.55	0.45	3.41	3.40	3.27		
18	0.65	0.55	2.60	2.70	2.57		

\* 同样条件下, AS 1.542 菌产酸均在 1% 以下; 对照 (37 $^{\circ}\text{C}$  发酵), 40 小时后产酸才达峰值, 为 4.5%。

表 3 500L 罐发酵产酸结果\*

批号	初糖 (%)	发酵周期 (小时)	pH	A 值	残糖 (%)	L-谷氨酸 (%)	对糖转化率 (%)
1	12.4	23	7.6	0.47	1.16	5.54	47.4
2	12.4	21	7.5	0.40	1.40	5.00	42.5
3	12.6	20	7.5	0.50	1.00	5.10	43.0
4	12.2	20	7.4	0.40	1.12	5.25	45.5
5	12.0	21	7.5	0.46	1.26	5.20	46.0

\* 接种量为 2%, 当 OD 净增 0.1 后升温到 37—39 $^{\circ}\text{C}$ , 通气量从 1:0.15 提高到 1:0.9。

才能正常发酵产酸。

### (三) 摇瓶发酵试验

1. 通气量对产酸的影响: 用 500ml 三角瓶, 以 15、20、25、30ml 装液量进行比较, 37 $^{\circ}\text{C}$  发酵时, 以 20ml 为宜。

2. 温度变化对产酸的影响: 从表 2 中可看

出, No. 207 菌在发酵初期, 当 OD 值净增 0.07 后升温到 37 $^{\circ}\text{C}$  继续培养, 谷氨酸产率可达 5% 以上, 转化率达 50% 以上, 发酵周期可缩短 6 小时左右。

### (四) 500L 发酵罐中试

按上述适宜发酵条件, 以薯干水解糖为原

料,采用 No. 207 菌连续进行稳产试验,谷氨酸产率达到 5% 以上,对糖转化率平均为 44%,结果见表 3。

## 讨 论

关于 No. 207 菌获得耐生物素的特性,并且随温度提高而增强,对此尚未深入研究。发酵初期采用升温工艺可提高产酸和缩短发酵周期,笔者认为这是由于 30℃ 下培养的种子转移到 37℃ 下的环境中要有一个适应过程。然而,生长过分(A 值超过 0.25),即在发酵中、后期升温,细胞相对地成熟,就不能有效地改变细胞膜结构,不能使细胞膜透性增强并分泌更多谷氨酸。

No. 207 菌与文献报道的 AJ3956<sup>[5]</sup> 相似,但又有重要区别:AJ3956 在 30℃ 下生长,40℃

产酸;No. 207 则在 37—38℃ 下才能正常生长和产酸。此外,在耐生物素能力上,与 Momose 等报道的<sup>[6]</sup>也不一致。

用 No. 207 菌生产谷氨酸,可以使用生物素含量高的原料,如薯干、玉米、糖蜜等直接进行发酵生产,不需特殊处理。具有节省能源,缩短发酵周期,节约粮食、降低成本等优点。

## 参 考 文 献

- [1] Kanaki, T. et al.: *Agr. Biol. Chem.*, **31**: 1307—1313, 1967.
- [2] Okazaki, H. et al.: *Agr. Biol. Chem.*, **31**: 1314—1317, 1967.
- [3] 木下祝郎: 特许公报, 昭 49-1577, 1974.
- [4] 中山 清: 特许公报, 昭 50-19633, 1975.
- [5] 百濑春生: 公开特许, 昭 52-66687, 1977.
- [6] Momose, H. and T. Takagi: *Agr. Biol. Chem.*, **42**: 1911—1917, 1978.